

**Міністерство освіти і науки України
Кам'янець-Подільський національний університет імені
Івана Огієнка**

І.Д. ГРИГОРЧУК

**МОЛЕКУЛЯРНА
БІОЛОГІЯ
(курс лекцій)**

**Кам'янець-Подільський
2025**

УДК 577.2

ББК 28.072я73

Г 83

Рекомендовано до друку вченою радою Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка (протокол № 9 від 25 вересня 2019 року)

Рецензенти:

Супрович Т.М. – професор, доктор сільськогосподарських наук, завідувач кафедри інфекційних та інвазійних хвороб Подільського державного аграрно-технічного університету

Овчарук О.В. – кандидат сільськогосподарських наук, асистент кафедри агрохімії, хімічних і загально-біологічних дисциплін Подільського державного аграрно-технічного університету

Федорчук І.В. – кандидат біологічних наук, доцент кафедри екології Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка

Г83

Григорчук І.Д.

Молекулярна біологія (курс лекцій). Видання 2-е, стереотипне. – Кам'янець-Подільський : ФОП Яцишин Ю.І., 2025. – 132 с.

Навчальне видання «Молекулярна біологія (курс лекцій)» на сучасному рівні викладає основні теми навчальної дисципліни: будову, властивості та функції амінокислот, білків, нуклеїнових кислот, особливості збереження та відтворення генетичної інформації на молекулярному рівні.

Рекомендовано для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації, освітнього рівня «Бакалавр», спеціальностей 091 Біологія та 014.05 Середня освіта (Біологія) за освітньою програмою Біологія.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	5
ТЕМА: ВСТУП ДО КУРСУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ	6
1. Предмет і завдання молекулярної біології	6
2. Етапи розвитку молекулярної біології	6
3. Методи молекулярної біології	9
БІЛКИ	14
Загальна характеристика білків, їх функції	14
Амінокислотний склад білків. Властивості і класифікація амінокислот	15
Будова білків	20
Фізико-хімічні властивості білків	24
Класифікація білків	29
НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ	32
Хімічний склад і будова нуклеїнових кислот	32
Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК)	38
Рибонуклеїнова кислота (РНК)	42
Властивості нуклеїнових кислот	45
СТРУКТУРА ГЕНА І ГЕНОМУ	47
Будова гена	47
Особливості будови вірусних геномів	50
Структурна організація геному прокаріот	51
Особливості структурної організації геному прокаріот	51
Цитоплазматичні генетичні структури геному прокаріот (плазміді та епісоми)	55
Мобільні генетичні елементи геному прокаріот (IS-елементи і транспозони) ..	56
Організація геному еукаріот	58
Структурна організація геному	58
Повтори в молекулі ДНК еукаріот	59
Організація генів на структурі геномів еукаріот	60
Геном ДНК-вмісних цитоплазматичних структур	64
Мобільні генетичні елементи геному еукаріот	66
Геном людини	70
МАТРИЧНИЙ СИНТЕЗ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ	73
РЕПЛІКАЦІЯ	73
Загальні закономірності реплікації	73
Реплікація в клітинах прокаріот	75
Реплікація ДНК у клітинах еукаріот	82
Постреплікативна модифікація ДНК	87
ПЕРЕДАЧА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ. ПРЯМА ТА ЗВОРОТНА ТРАНСКРИПЦІЯ	89
Загальні закономірності передачі генетичної інформації	91
Транскрипція у клітинах прокаріот	91
Ініціація транскрипції	91

Елонгація транскрипції.	93
Термінація транскрипції.	93
РНК-залежний синтез ДНК (зворотна транскрипція).	94
Транскрипція в клітинах вищих еукаріот.	96
Посттранскрипційна модифікація первинних транскриптів (процесінг РНК). ..	98
Регуляція транскрипції генів у клітинах еукаріот.	102
РЕАЛІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ. МАТРИЧНИЙ СИНТЕЗ БІЛКА	107
Молекулярні механізми передачі та реалізації генетичної інформації генетичний код).....	107
Характеристика компонентів білоксинтезуючої системи.	111
Основні етапи трансляції.	113
Особливості трансляції в клітинах прокариот.....	116
Особливості трансляції в клітинах еукаріот.	120
Регуляція інтенсивності трансляції у клітинах про- і еукаріот.	123
Посттрансляційна модифікація білків.	129
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	131

ПЕРЕДМОВА

Молекулярна біологія – наука, яка вивчає основні прояви та особливості процесів життєдіяльності на молекулярному рівні, забезпечує можливість підходів до розуміння сутності життєвих явищ на основі з'ясування ролі атомів і молекул у формуванні біологічних структур із специфічними властивостями та функціями.

Навчальне видання «Молекулярна біологія (курс лекцій)» на сучасному рівні викладає основні теми навчальної дисципліни: будову, властивості та функції амінокислот, білків, нуклеїнових кислот, особливості збереження та відтворення генетичної інформації на молекулярному рівні.

Курс лекцій з молекулярної біології рекомендовано для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації, освітнього рівня «Бакалавр», спеціальностей 091 Біологія та 014.05 Середня освіта (Біологія) за освітньою програмою Біологія. Теоретичний матеріал курсу може бути використаний також вчителями та учнями загальноосвітніх шкіл в класах з поглибленим вивченням біологічних дисциплін. Лекційний курс розроблено відповідно до змісту навчальної програми з «Молекулярної біології».

Знання отримані при вивченні дисципліни «Молекулярна біологія» є базовими для вивчення радіобіології, біофізики, генетики, біотехнології з основами нанотехнології.

Курс лекцій підготовлено з урахуванням того, що студент засвоїв основи загальної, неорганічної та органічної хімії, біохімії, має уявлення про будову та реакційну здатність основних функціональних груп таких органічних молекул як білки та нуклеїнові кислоти.

Запропонований курс лекцій у значній мірі сприятиме покращенню засвоєння студентами теоретичного матеріалу та забезпечить формування належного рівня їхньої професійної компетентності.

ТЕМА: ВСТУП ДО КУРСУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

План

1. Предмет і завдання молекулярної біології.
2. Етапи розвитку молекулярної біології.
3. Методи молекулярної біології.

1. ПРЕДМЕТ І ЗАВДАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Молекулярна біологія – наука, яка вивчає основні прояви та особливості процесів життєдіяльності на молекулярному рівні, забезпечує можливість підходів до розуміння сутності життєвих явищ на основі з'ясування ролі атомів і молекул у формуванні біологічних структур із специфічними властивостями та функціями.

Молекулярна біологія – наука про механізми зберігання, відтворення, передачу і реалізацію генетичної інформації, про структуру та функції таких біополімерів, як нуклеїнові кислоти та білки.

Об'єктом вивчення молекулярної біології є субклітинні генетичні структури представників різних таксономічних груп живих організмів, а також вірусів і бактеріофагів.

Предметом вивчення цієї науки є структурна організація, властивості і функції сполук, які є основою будови живих організмів, особливості їх молекулярної організації, механізми збереження, передачі та реалізації генетичної інформації, принципи регуляції клітинного метаболізму і підтримання гомеостазу.

Метою молекулярної біології є розкриття молекулярних механізмів перебігу процесів, які лежать в основі життєдіяльності та забезпечують здатність організмів до самовідтворення, самооновлення і саморегуляції.

Головними **завданнями молекулярної біології** є:

- з'ясування яким чином та в якій мірі ріст і розвиток живих організмів, збереження та передача генетичної інформації зумовлені особливостями структурної організації і властивостями біополімерів клітини;
- вивчення специфічного молекулярного складу клітин живих організмів;
- дослідження структурної організації геномів представників різних таксономічних груп організмів, а також вірусів і бактеріофагів, їх регуляції та механізмів, які забезпечують захист генетичної інформації і підтримання стабільності геному;
- розкриття механізмів матричного синтезу біополімерів (реплікації, транскрипції, трансляції), які лежать в основі збереження, передачі і реалізації генетичної інформації внаслідок експресії генів.

2. ЕТАПИ РОЗВИТКУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Молекулярна біологія у своєму розвитку пройшла шлях від узагальнення теоретичних надбань багатьох світових наукових шкіл до прикладних розробок, на основі широкого застосування новітніх, сучасних методів дослідження.

Виокремлення молекулярної біології, як важливої галузі знань про живу природу, на межі біохімії, генетики, біології, цитології, вірусології та інших наукових дисциплін, відбулося в 50-х роках минулого століття. Цьому, у

значній мірі, сприяли суттєві революційні зміни в біологічній науці, започатковані у другій половині ХХ ст., які не спростували всі попередні наукові надбання та досягнення, а лише розширили, поглибили та вдосконалили їх.

Вперше термін „молекулярна біологія” запропонував У. Уівер (1938 р.), який вказував, що на межі хімії, фізики і біології формується нова галузь знань – молекулярна біологія, метою якої є розгадка найглибших таємниць живої матерії.

На початку 40-х років ХХ ст. відомий вчений У. Естбюрі отримав першу рентгенограму ДНК та започаткував вивчення ультраструктури цієї важливої біомолекули, що дало підстави йому називати себе „молекулярним біологом”. Одночасно з цим, до формування молекулярної біології як науки, пройшло ще декілька десятиліть, протягом яких було створено підґрунтя для її розвитку. За цей час було зроблено низку епохальних відкриттів, які дали змогу підійти до розуміння молекулярних аспектів процесів життєдіяльності. Серед них найважливішими є наступні:

- З'ясування генетичної ролі нуклеїнових кислот (Ф. Гріффітс (1928 р.), О. Евері, М. Маккарті, К. МакЛеод (1944 р.);
- Встановлення закономірностей чергування чотирьох нуклеотидів пуринового і піримідинового ряду в структурі ДНК (правила Чаргаффа).
- Вивчення структурної організації білків: розроблено модель вторинної структури у вигляді α -спіралі та β -форми (Л. Полінг і Р. Корі, 1951 р.).
- Застосування рентгеноструктурного аналізу для вивчення просторової структури ДНК (Л. Уілкінс і Р. Гослінг, 1953 р.).
- Припущення про вторинну структуру ДНК у вигляді подвійної спіралі, що започаткувало уявлення про механізми матричного синтезу біополімерів (Дж. Уотсон і Ф. Крік, 1953 р.).
- З'ясування загальної схеми транскрипції та передачі інформації в напрямку ДНК \rightarrow РНК (А. Коренберг, 1958 р.).
- Вивчення третинної структури білка міоглобіну, який є резервом кисню в м'язовій тканині (Дж. Кендрю, 1960 р.).
- Відкриття посередника передачі генетичної інформації з ядерного апарату клітини до цитоплазми (іРНК) та з'ясування її ролі в забезпеченні видоспецифічного синтезу білка (А. Білозерський і О. Спірін, 1965 р.).
- Виділення з бактеріальних клітин ферментів рестриктаз, здатних „розрізати” (секвенувати) молекулу РНК на певних ділянках полінуклеотидного ланцюга з утворенням невеликих фрагментів (секвентів) (Р. Холлі і М. Геллерт, 1965 р.).
- Вивчення четвертинної структури білка гемоглобіну, який входить до складу еритроцитів та забезпечує дихальну функцію крові (М. Перутц, 1966 р.).
- Розшифрування генетичного коду, що підтверджувало передачу генетичної інформації у клітині в напрямку ДНК \rightarrow іРНК \rightarrow білок та сприяло розкриттю механізмів реалізації цього процесу (М. Ніренберг, С. Очоа, Г. Корана, 1968 р.).

- Вивчення молекулярних аспектів регуляції функціональної активності генів у клітинах про- і еукаріот – індукції і репресії (Ф. Жакобо і Дж. Моно, 1968 р.).
- З'ясування механізмів фрагментарної реплікації на “запізнюючому” ланцюгу ДНК (Р. Оказакі, 1968 р.).
- З'ясування механізмів передачі інформації у РНК-геномних вірусів за участю ферменту зворотної транскриптази або ревертази (Г. Темін, Д. Балтимор, 1970 р.).
- Отримання рекомбінантних молекул ДНК з використанням специфічних векторів, що стало передумовою формування прикладного напрямку молекулярної біології – генної інженерії (С. Коен, П. Берг, 1972 р.).
- Застосування рестриктазно-лігазного методу для отримання гібридних молекул ДНК та створення молекулярних векторів (С. Коен, 1973 р.).
- Розкриття механізмів SOS-репарації, яка забезпечує корегування помилок реплікації ДНК – порушення комплементарності азотистих основ нуклеотидів (М. Рідман, 1974 р.).
- Розшифрування первинної структури нуклеїнових кислот та фрагментів генів на основі застосування специфічних хімічних методів (А. Максам, У. Гілберт, 1975 р.).
- Відкриття „мозаїчності” окремих генів у геномі еукаріот та встановлення причин порушення принципу колінійності при передачі генетичної інформації в клітині (відповідності первинної структури ДНК первинній структурі білків) (У. Гілберт, 1976 р.).
- Вивчення первинної структури ДНК бактеріофага φX-174 та відкриття явища перекривання генів – “гени в генах” (Ф. Сенгер, 1977 р.).
- Застосування ензиматичного методу для розшифрування фрагментів генів геному про- і еукаріот (Ф. Сенгер, А. Коулсон, 1979 р.).
- Розкриття сутності посттранскрипційної модифікації первинних транскриптів (різних видів РНК), синтезованих на структурі генів еукаріот (В. Келлер, 1982 р.).
- Розробка методу ампліфікації генів, який ґрунтується на полімеразній ланцюговій реакції – ферментативному синтезі *in vitro* фрагментів ДНК на основі первинної структури матриці (К. Ньоліс, 1983 р.).
- Роботи по розшифруванню геному людини, бактеріальних геномів, геномів дріжджів (К. Вентер, Ф. Коллінз, 1984-2005 рр.).
- Картування геномів клітин еукаріот – дріжджів, нематоди та плодової мушки дрозофіли (Міжнародна програма HUGO, 1996-2000 рр.).
- Ідентифікація генів, які включають програму апоптозу в нематод та розкриття механізмів запрограмованої смерті клітин (С. Бренер, Г. Хорвіц, Дж. Салстон, 2002 р.).
- Відкриття вірусу папіломи людини та вивчення структури генів, що зумовлюють розвиток спадкових захворювань, канцерогенезу і старіння (Х. Хаузен, 2008 р.).

У наш час, на основі досягнень молекулярної біології, розроблено сучасні методи діагностики і лікування різних метаболічних розладів, спадкових та вірусних захворювань. Широкого застосування набула ДНК-діагностика для встановлення батьківства, ідентифікації особистості (молекулярна дактилоскопія).

Значного розвитку набувають науково-прикладні напрямки молекулярної біології такі як: гена і клітинна інженерія, біотехнологія, біоінформатика, які відкривають нові перспективи для прогресу біологічної науки XXI ст.

Все це, у значній мірі, сприятиме розв'язанню чисельних проблем, що стоять перед людством та створить передумови для подальшого прогресу сучасної біологічної науки.

3. МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Для вивчення живих об'єктів, їх будови, молекулярної архітектури та особливостей надмолекулярної організації окремих складових компонентів клітин і тканин організму застосовують високоспецифічні якісні та кількісні методи дослідження. Ці методи дають змогу отримати цінну інформацію про будову клітин і клітинних органел, з'ясувати локалізацію в клітині різних біомолекул, вивчити особливості їх функціонування.

Фізіологічні методи. В наукових дослідженнях найчастіше використовують гісто- та цитоаналіз, електронну та світлову мікроскопію. Цитологічні та гістохімічні методи ґрунтуються на здатності різних структурних компонентів клітини забарвлюватися специфічними барвниками з наступною ідентифікацією та мікроскопічним вивченням досліджуваних зразків.

Методи мікроскопії дають змогу вивчати ультраструктуру клітин та клітинних органел, транспорт і синтез різних сполук, специфічні закономірності перебігу окремих фаз клітинного циклу, механізми міжклітинної взаємодії. За допомогою цих методів можна вивчати локалізацію різних біополімерів у клітині (ДНК, РНК, білків, вуглеводів, ферментів), з'ясувати їх функції та властивості.

Фізико-хімічні методи. Ці методи застосовують для вивчення структури біополімерів, їх складу, видів зв'язків між атомами та молекулами, їх довжину та локалізацію. Серед них найпоширенішими є: електронний парамагнітний резонанс, мас-спектрометрія, радіоавтографія, рентгеноструктурний аналіз та ін.

Радіоізотопний метод (радіоавтографія). Метод дає змогу з'ясувати локалізацію процесів синтезу і розкладу біополімерів у клітині, шляхи транспорту різних речовин та йонів, особливості функціонування окремих клітинних органел і біомолекул. Він ґрунтується на включенні радіоізотопів (^{14}C , ^{32}P , ^3H) у досліджувані об'єкти – мономерні ланки біополімерів (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти), або різні метаболіти, які зазнають певних перетворень у клітині, та реєструвати їх за допомогою фотоемульсії. При розпаді радіоізотопів, β -часточки потрапляють в зону чутливого фоточару і активують в його складі гранули AgBr локалізацію яких, після проявлення та відновлення, визначають за допомогою мікроскопії.

Рентгеноструктурний аналіз. Один з високоінформативних методів дослідження, який дає змогу вивчити особливості структурної організації біополімерів, отримати тривимірне зображення молекул та виявити розміщення атомів у їх складі, будову зв'язків, що стабілізують нативну

конформацію. Метод ґрунтується на дифракції рентгенівських променів. При проходженні променів через об'єкт вивчення, вони вступають з ним у певну взаємодію. Це зумовлює збудження атомів та надає кінетичної енергії вибитим електронам, що індукує випромінювання специфічного спектру та появу вторинних ефектів у вигляді ліній, які реєструються спеціальними приладами.

Біохімічні методи. Найпоширенішими серед цих методів є оптичні (фотоелектроколориметрія, спектрофотометрія, нефелометрія, спектрофлуориметрія), хроматографія, електрофорез, седиментаційний аналіз та ін. Біохімічні методи використовують для виділення, розділення та очищення різних сполук, кількісного визначення складових компонентів рідин і тканин організму. Вони дають змогу вивчати окремі аспекти обміну речовин в організмі та особливості функціональної активності різних біосубстратів.

Оптичні методи. Ці методи можуть надати цінну інформацію про кількісний вміст різних метаболітів у рідинах організму, ідентифікувати різні речовини за властивостями, якісним складом та функціями, з'ясувати механізми біохімічних перетворень різних сполук. Вони дають змогу вивчати окремі показники гомеостазу на основі вимірювання зміни інтенсивності гомо-чи гетерохроматичного потоку світлового випромінювання, внаслідок вибіркового поглинання чи розсіювання його речовиною, що знаходиться в розчині. З цією метою, найчастіше застосовують абсорбційну та емісійну фотометрію. На принципі абсорбційної фотометрії ґрунтується колориметрія, спектрофотометрія і нефелометрія. Емісійна фотометрія забезпечує кількісне визначення різних сполук внаслідок вимірювання енергії, яку випромінює досліджуваний об'єкт у збудженому стані (спектрофлуориметрія, полум'яна фотометрія).

Седиментаційний аналіз. Впроваджено в наукові дослідження Т. Сведбергом (1926 р.). Метод ґрунтується на різниці у швидкості седиментації часточок при відцентровому прискоренні, залежно від їх щільності, форми та розмірів. Особливістю методу є те, що для його проведення необхідне отримання гомогенатів тканин чи суспензій клітин, які використовують для вивчення. Застосування седиментаційного аналізу мало важливе значення в дослідженнях по визначенню молекулярної маси біополімерів та вивченню цілого ряду внутрішньоклітинних процесів.

Хроматографія. Високоінформативний метод, який застосовують для розділення складних сумішей речовин невідомого складу та виділення цінних компонентів, ідентифікації сполук, подібних за будовою і властивостями. Метод було відкрито М. Цветом (1903 р.) для вивчення екстрактів зелених листків рослин (фракцій хлорофілу). Існує велика кількість модифікацій цього методу залежно від носіїв, на яких проводять розділення (рідких, твердих і газоподібних), механізму розділення, способу проведення, тощо. Так, за механізмом розділення виділяють такі види хроматографії як: адсорбційна, розподільна, дифузона, іонообмінна, афінна. За видом носіїв – паперова, колонкова, тонкошарова, молекулярно-ситова. Крім аналітичних цілей, хроматографію, в наш час, широко застосовують в різних галузях народного господарства для розділення і виділення різних сполук.

Електрофорез. Один з найпоширеніших методів розділення та кількісного визначення різних сполук, вивчення їх компонентного складу. Електрофорез ґрунтується на здатності полярних молекул, що несуть певний сумарний заряд, внаслідок протонування чи іонізації функціональних груп у

водному середовищі, при певних значеннях рН, рухатися в електричному полі до позитивного чи негативного джерела струму (аноду чи катоду). На електрофоретичну рухливість впливають сила струму, електричний опір, рН буферних систем та іонна сила розчинів. Швидкість руху досліджуваних зразків в електричному полі прямо пропорційна силі струму та електричній напрузі. Метод електрофорезу дає змогу розділити на специфічних носіях різні біомолекули за величиною їх заряду, формою молекул, молекулярною масою та іншими критеріями.

Імунологічні методи.

Імуноелектрофорез. Високоінформативний метод, за допомогою якого проводять виявлення антигенів у складі рідин організму та різних біологічно активних сполук. Він ґрунтується на поєднанні принципів тонкошарового електрофорезу та імунодифузії. Основою методу є реакція преципітації та утворення комплексу антиген/антитіло. Досліджуваний зразок спочатку розділяють електрофорезом на агаровому гелі, після чого у вирізані на поверхні гелю жолобки вносять суміш антитіл. Через певний час проходить дифузія антитіл і антигенів відповідно в латеральному та радіальному напрямках. Після їх зустрічі відбувається утворення комплексу антиген/антитіло, свідченням чого є поява дуг преципітації, які дають змогу ідентифікувати наявність певних антигенів.

Імуноферментний аналіз (ІФА). Сучасний метод дослідження, який застосовують для ранньої діагностики, так званих, TORCH-інфекцій (токсоплазмозу, цитомегаловірусу, вірусу герпесу, червонички, паразитарних інвазій), проведення тестів на наявність онкомаркерів, контролю за вживанням ліків та наркотичних засобів, діагностики вагітності та ін. Імуноферментний аналіз поєднує високу чутливість імунологічних реакцій та специфічність каталітичної дії ферментів. Антиген, зв'язаний з ферментом у твердій фазі, конкурує з досліджуваним вільним антигеном за специфічні антитіла. Тобто, індикаторами імунологічних реакцій, в цьому випадку, є маркерні ферменти.

Методи молекулярної генетики та генної інженерії.

Розробка цих методів мала важливе значення для становлення та розвитку молекулярної біології, конструювання рекомбінантних ДНК, можливості ампліфікації генів, за допомогою хіміко-ензиматичних методів і полімеразної ланцюгової реакції. Це забезпечило формування специфічних генетичних структур із заздалегідь передбачуваними властивостями та функціями і створило умови для широкого застосування досягнень генної інженерії в різних галузях народного господарства і медицини.

Методи молекулярної генетики та генної інженерії ґрунтуються на специфічних особливостях геному представників різних таксономічних груп живих організмів, а також вірусів і бактеріофагів. Це, в першу чергу, стосується здатності їх до взаємного інтегрування трансформациї, а також універсальності генетичного коду, що забезпечує можливість експресії в організмі чужорідних генів. Особливістю цих методів є те, що вони, на відміну від штучного мутагенезу та гібридизації, які застосовують в межах одного виду організму, дають змогу цілеспрямованої зміни структури і функції геномів організмів розділених міжвидовими бар'єрами. Застосування цих методів в наукових дослідженнях сприяло вивченню структури нуклеїнових кислот, ідентифікації та виділенню генів, з'ясуванню їх будови та молекулярних механізмів

регуляції, завдяки чому було створено передумови для розвитку сучасних біотехнологій.

Важливим для становлення сучасних біотехнологій було відкриття ферментів рестриктаз та вивчення їх субстратної специфічності, що сприяло детальному вивченню первинної структури ДНК, генів та їх фрагментів за допомогою рестрикційно-лігазного та коннекторного методів. Вказані методи дають змогу проводити не лише фрагментацію генетичних структур та отримувати необхідні гени, але і з'єднувати їх з ДНК реципієнтних клітин при формуванні рекомбінантних молекул.

Важливе значення для розвитку молекулярної біології, генетики та генної інженерії мало застосування синтезу генів *in vitro* хімічними та ензиматичними методами на основі інформації про чергування залишків амінокислот в структурі певних генних продуктів. Для вивчення специфічного нуклеотидного складу ДНК, зокрема ділянок, що містять тандемні повтори нуклеотидів, використовують блот-гібридизацію (ДНК-фінгерпринтинг). Суть методу в тому, що фрагментовані і розділені методом електрофорезу сайти ДНК переносять на мембранні фільтри (блотінги), які містять зонди з радіоізотопною міткою. Після гібридизації виявляють рестрикційні фрагменти, гомологічні до ДНК зондів. Для синтезу генів широко використовують також фермент зворотною транскриптазу. Цим методом було синтезовано гени глобіну, вірусу віспи та ряду бактеріофагів. Отримання виділених чи синтезованих генів для синтезу необхідних генних продуктів включає ампліфікацію, збільшення їх кількості. З цієї метою застосовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). В дослідженнях генної інженерії широко використовують також методи відбору та клонування клітин, що містять рекомбінантні ДНК, експресію їх у різних системах *in vivo* чи *in vitro*. Це дає змогу отримання генних продуктів із заздалегідь передбачуваними властивостями.

Методи клітинної інженерії.

Клітинні культури. Один з найпоширеніших сучасних методів, який дає змогу вивчити особливості функціонування клітин *in vitro* в специфічних культуральних середовищах. За допомогою цього методу можна досліджувати морфогенез та диференціювання клітин, вплив на них різних ушкоджуючих чинників (хімічних сполук, різних токсинів, лікарських препаратів, вірусів, електромагнітних хвиль, радіоактивного випромінювання), проводити певні маніпуляції на рівні клітини (мікрохірургію, ін'єкцію розчинів різних сполук).

Метод культури тканин і органів. Цей метод застосовують для вивчення механізмів клітинного диференціювання, гістогенезу, міжклітинної і міжклітинної взаємодії. На відміну від культури клітин, цей метод дає змогу вивчати особливості функціонування клітин, тканин і органів при збереженні їх нативної структури та функцій. У зв'язку з цим, його широко застосовують для з'ясування закономірностей формування і розвитку зачатків органів у нормі та при експериментально змінених умовах. Важливим напрямком застосування культури тканин і органів рослин є мікроклональне розмноження внаслідок якого отримують генетично ідентичні форми посадкового матеріалу. У вигляді експлантатів використовують генеративні та вегетативні органи рослин.

Метод безклітинних систем.

За допомогою безклітинних систем вивчають молекулярні механізми біохімічних процесів, які за цих умов є ізольованими, тому їх перебіг

відбувається в нативних умовах без будь-якого зовнішнього впливу та артефактів, що можуть призвести до хибних уявлень і висновків. Використання безклітинних систем з успіхом застосовували при з'ясуванні механізмів білкового синтезу М. Ніренберг і Х. Корана (1966 р.). З цією метою із неочищених клітинних екстрактів, після багаторазового фракціонування, отримували рибосоми, тРНК та інші компоненти білоксинтезуючої системи. Ці компоненти вносили в безклітинне середовище (гомогенати клітин), яке містило відповідні матриці та необхідні сполуки, і вивчали їх роль у перебігу трансляції. За участю безклітинних систем було розшифровано генетичний код. У вигляді матриці, в цьому випадку, використовували штучні гомо- та гетерорибополінуклеотиди відомого складу, що дало можливість з'ясувати будову кодонів іРНК, які відповідають за включення до складу білкових молекул певних амінокислот.

Контрольні запитання:

1. Зміст, предмет, завдання молекулярної біології.
2. Назвіть основні етапи розвитку молекулярної біології.
3. Зв'язок молекулярної біології з іншими дисциплінами.
4. Які методи молекулярної біології ви знаєте?

Тема: БІЛКИ

План

1. Загальна характеристика білків, їх функції.
2. Амінокислотний склад білків. Властивості і класифікація амінокислот.
3. Будова білків.
4. Фізико-хімічні властивості білків.
5. Класифікація білків.

1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІЛКІВ, ЇХ ФУНКЦІЇ

Білки — високомолекулярні органічні сполуки, молекули яких являються гетерополімерами, мономерами яких є амінокислоти.

Важлива роль білків в життєдіяльності організмів відзначалася ще в першій половині XIX ст. Так, Н. Мульдер у 1838 р. назвав їх протеїнами (від грец. *proteous* — перший, найважливіший). Назва «білки» виникла в зв'язку з тим, що вони за рядом своїх властивостей нагадували яєчний білок. Зараз у біологічній літературі використовуються обидва терміни — білки і протеїни.

Білки в організмі виконують найрізноманітніші функції.

Структурна функція. Білки в середньому становлять 18-21% загальної сирової маси організму людини і тварин. Білки входять до складу усіх органів і тканин. Вони беруть участь в утворенні структурної основи клітин і їх органел — мембранних структур, мітохондрій, рибосом, цитоплазми.

Каталітична (ферментативна) функція. Усі ферменти — біологічні каталізатори, що зумовлюють перебіг хімічних реакцій в організмі — мають білкову природу. Вони є необхідними для життєдіяльності кожного живого організму. За участю ферментів у клітинах при звичайних температурах і тиску з досить великою швидкістю одночасно проходить багато різних хімічних реакцій, які забезпечують синтез і розпад різноманітних сполук.

Гормональна функція. Значна кількість гормонів є білками або продуктами білкового обміну. Це, зокрема, такі гормони як інсулін, тетелін, тиреотропін, адренкортикотропний гормон, окситоцин, вазопресин та ін.

Гормони беруть активну участь в регуляції обміну, впливають на проникність клітинних мембран, регулюють активність ферментів, діють на процеси трансляції і транскрипції та ін.

Транспортна функція. Для нормальної життєдіяльності організму необхідне постійне забезпечення його органів і тканин поживними речовинами. Ці речовини переносяться з током крові сполуками білкової природи. Так, перенесення кисню до тканин, а на зворотному шляху вуглекислого газу до легень здійснюється за допомогою складного білка хромопротеїдного типу — *гемоглобіну*. Транспорт різних груп ліпідів і жиророзчинних вітамінів до різних органів і тканин здійснюється за участю складних білків — ліпопротеїдів.

Захисна функція здійснюється в основному за участю білків γ-глобулінів, з якими зв'язані імунні реакції організму. Антитіла, які утворюються в організмі при несприятливій дії на нього різних факторів (хвороботворних бактерій, вірусів, токсинів), мають білкову природу. Зв'язуючись з мікроорганізмами чи токсинами, вони інактивують їх, гальмують патогенну дію і знешкоджують токсичні продукти. Відомо ряд інших процесів, в яких білки також виконують захисну функцію, наприклад у процесах зсідання крові, оберігаючи організм від надмірної втрати її при різних травмах, тощо.

Механічна функція. Білки беруть участь в забезпеченні різних форм механічного руху — скороченні і розслабленні м'язів, роботі внутрішніх органів — серця, легень, шлунку тощо. Ці процеси здійснюються за участю таких білків, як актин, міозин, тропоміозин і ряду інших.

Рецепторна функція. Мембранні рецептори, що сприймають різні хімічні сигнали, мають білкову природу.

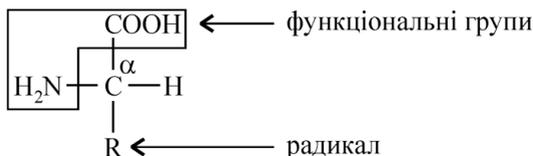
Енергетична функція. Білки, як і вуглеводи та ліпіди, є важливим джерелом енергії для організму. Так, при розщепленні 1 г білка виділяється 17,7 кДж енергії. За рахунок білків організм людини одержує 10-15 % енергії.

Отже, з далеко неповного переліку функцій білків в організмі видно, що їм належить ведуча роль у забезпеченні процесів його життєдіяльності.

2. АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД БІЛКІВ. ВЛАСТИВОСТІ І КЛАСИФІКАЦІЯ АМІНОКИСЛОТ

Амінокислоти є похідними органічних кислот аліфатичного або ароматичного ряду і містять аміно- ($-NH_2$) і карбоксильну ($-COOH$) групи.

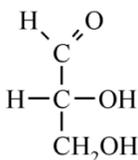
Залежно від розташування NH_2 -групи розрізняють α -, β -, γ - та інші амінокислоти. В амінокислотах, які входять до складу білків, аміногрупа розміщена біля α -вуглецевого атома, тобто усі вони є α -амінокислотами. Загальну формулу амінокислот можна записати так:



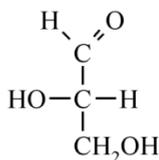
Амінокислоти відрізняються між собою лише хімічною природою радикалів. Радикал – це угруповання атомів в молекулі амінокислоти, що зв'язане з α -вуглецевим атомом. Радикалами є залишки жирних кислот, ароматичні ядра, різні гетероцикли та ін.

Всі амінокислоти, за винятком гліцину, мають хіральний (асиметричний) центр, внаслідок чого мають оптичну ізомерію. Хіральний центр – атом вуглецю амінокислоти (у протеїногенних амінокислот це α -вуглець), при якому є 4 різних замісники: радикал амінокислоти ($-R$), карбоксильна група ($-COOH$), аміногрупа ($-NH_2$), атом водню (H). Це і зумовлює несиметричність молекул амінокислот.

Явище оптичної ізомерії пов'язано з тим, що деякі речовини здатні змінювати площину поляризації поляризованого світла, що проходить через них. Для позначення обертань площини світла використовують знаки (+) і (-), а для інформування про відносне просторове положення груп у асиметричного атома використовують позначення D і L. Кожна молекула амінокислоти може бути правообертаюча, яку позначають знаком плюс (+), або лівообертаюча, яку позначають знаком мінус (-). Конфігурацію амінокислот визначають в порівнянні з гліцериновим альдегідом. Відомо D- і L-форми гліцеринового альдегіду:

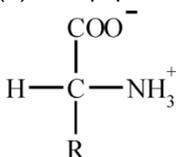


D-Гліцеральдегід

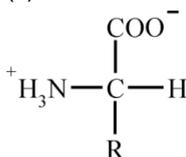


L-Гліцеральдегід

Якщо розташування атома водню біля вуглецю в α -положенні амінокислоти подібне до розташування водню в тому ж положенні D-гліцеринового альдегіду, то амінокислота належить до D-ряду (аміногрупа праворуч). Якщо ж розміщення атома водню амінокислоти відповідає L-формі гліцеринового альдегіду, то і амінокислота належить до L-ряду (аміногрупа ліворуч). D-Форма гліцеринового альдегіду завжди обертає площину поляризації вправо (+), а L-форма – вліво (-).



D- α -аміно-
кислота



L- α -аміно-
кислота

D- і L-ізомери – дзеркальні ізомери відповідної амінокислоти, що називаються енантіомерами. Суміш енантіомерів в рівних молярних частках, яка не володіє оптичною активністю називається **рацемічною сумішшю**. Усі α -амінокислоти, які входять до складу білків тварин і людини, мають L-конфігурацію.

Класифікація амінокислот

У природі виявлено багато різних амінокислот, проте до складу більшості білків їх входить лише 20. Всі амінокислоти, що входять до складу білків, часто називають **протеїногенними**. Решта амінокислот входить до складу фізіологічно активних речовин (гормонів, коферментів, антибіотиків) або знаходиться в органах і тканинах тварин і рослин у вільному стані.

Амінокислоти класифікують за заміністю-незамінністю, будовою та поляриністю радикалів.

✓ Класифікація за заміністю-незамінністю

Усі амінокислоти, які виявлено в складі білка, синтезуються в рослинних організмах. В організмі людини і тварин синтезується лише частина протеїногенних амінокислот, а деякі з них утворюються в недостатній кількості для нормального синтезу білка. У зв'язку з цим усі протеїногенні амінокислоти поділяють на три групи:

- незамінні
- напівнезамінні
- замінні.

Незамінні амінокислоти — це такі амінокислоти, які в організмі не синтезуються. Тому вони повинні обов'язково поступати в організм ззовні, в

основному з їжею. Для організму людини повністю незамінними є вісім амінокислот: *валін, лейцин, ізолейцин, треонін, лізин, метіонін, фенілаланін і триптофан*.

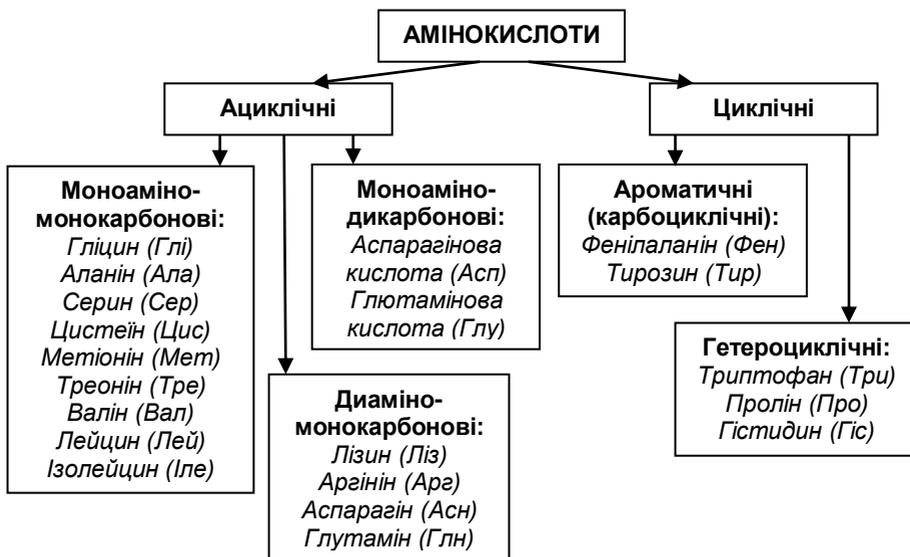
До **напівнезамінних** належать амінокислоти, які синтезуються в організмі в недостатній кількості. Такі амінокислоти повинні частково поступати в організм з їжею. Для організму людини такими амінокислотами є *аргінін, тирозин і гістидин*.

Замінні амінокислоти синтезуються в організмі з цілого ряду органічних сполук, в тому числі з деяких амінокислот. Організм може певний час обходитися без таких амінокислот при умові, що з їжею поступатимуть речовини, з яких синтезуються замінні амінокислоти. Це *гліцин, пролін, аланін, серин, цистеїн, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, аспарагін, глутамін*.

✓ **Класифікація за будовою бічного радикалу**

За будовою бічного радикала, амінокислоти поділяються на аліфатичні (ациклічні) та циклічні, які, своєю чергою поділяються на підгрупи. Так, амінокислоти аліфатичного ряду в залежності від кількості аміно- і карбоксильних груп поділяються на моноаміномонокарбоніві, діаміномонокарбоніві, моноамінодикарбоніві, діамінодикарбоніві, а циклічні на ароматичні (карбоциклічні) та гетероциклічні.

СХЕМА КЛАСИФІКАЦІЇ АМІНОКИСЛОТ



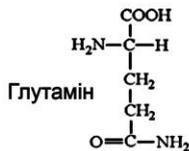
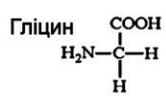
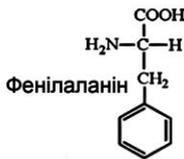
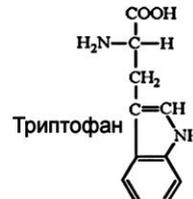
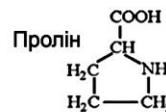
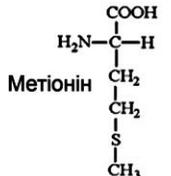
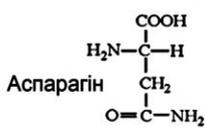
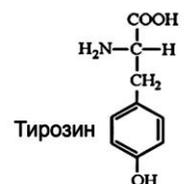
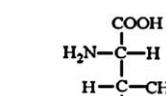
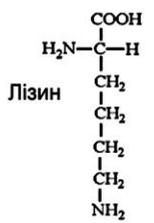
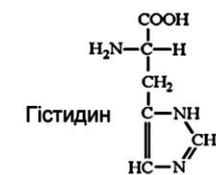
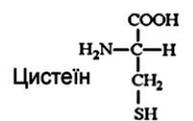
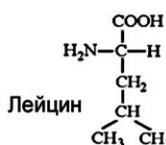
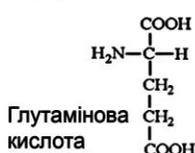
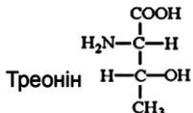
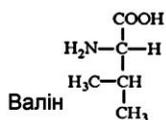
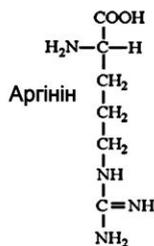
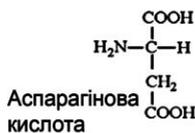
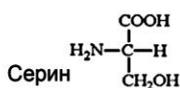
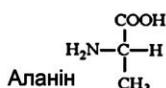
При взаємодії двох молекул амінокислоти цистеїну утворюється діамінодикарбонова амінокислота цистин.

✓ **Класифікація за полярністю бічних радикалів**

Класифікація амінокислот за полярністю радикалів ґрунтується на здатності їх до взаємодії з водою при фізіологічних значеннях рН (близько рН 7,0). Вона включає 4 класи амінокислот:

- **неполярні** (гідрофобні), бокові радикали яких не мають спорідненості з водою. До них відносяться *аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан, пролін*;
- **полярні** (гідрофільні) **незаряджені** – гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін, глютамін;
- **полярні негативно заряджені** – аспарагінова і глютамінова кислоти;
- **полярні позитивно заряджені** – лізин, аргінін, гістидин.

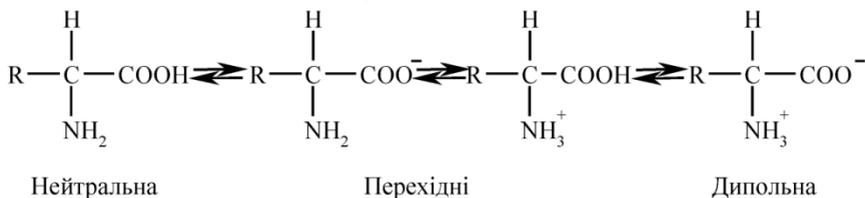
СТРУКТУРНІ ФОРМУЛИ АМІНОКИСЛОТ



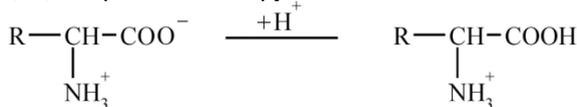
Фізико-хімічні властивості амінокислот

Оскільки АК у своєму складі мають як основні групи (-NH₂), так і кислотні (-COOH), вони відносяться до **амфотерних електролітів**, тобто сполук, що проявляють властивості як кислот, так і лугів (від грецького слова *amphi* – обидві).

Тому у звичайних умовах у водних розчинах або кристалічному стані можлива взаємодія між аміно- і карбоксильною групами з утворенням дипольних іонів або цвіттер-іонів, які мають два протилежних заряди — негативний, утворений внаслідок відщеплення позитивно зарядженого протону від карбоксильної групи, і позитивний, утворений внаслідок приєднання протону до аміногрупи. В результаті внутрішньомолекулярної взаємодії утворюється нейтральна сполука — **внутрішня сіль амінокислоти**, тому розчини амінокислот у більшості випадків мають нейтральний характер і на індикатори не діють (за винятком амінокислот, які містять у складі молекул кілька аміно- чи карбоксильних груп).

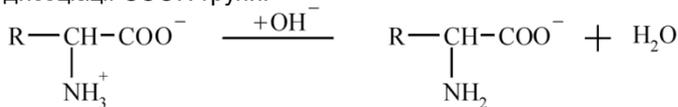


У залежності від pH середовища амінокислоти можуть мати кислі або основні властивості. У кислому середовищі (pH < 7) амінокислоти несуть позитивний заряд (катиони), оскільки надлишок протонів у середовищі пригнічує дисоціацію карбоксильних груп:



У цьому випадку амінокислоти пересуваються в електричному полі до катоду.

У лужному середовищі (pH > 7), коли є надлишок іонів OH⁻, амінокислоти перебувають у вигляді негативно заряджених іонів (аніони), внаслідок дисоціації COOH-групи:



У лужному середовищі амінокислоти в електричному полі рухаються до аноду. Отже, у залежності від pH середовища амінокислоти мають сумарний нульовий, позитивний або негативний заряд.

Відповідно до своєї амфотерної природи амінокислоти можуть утворювати різні солі, реагуючи як з основами, так і з кислотами.

Стан, у якому заряд амінокислоти дорівнює нулю, називається ізоелектричним станом. Значення pH, при якому амінокислоти досягають цього стану і вже не рухаються в електричному полі ні до аноду, ні до катоду, називається **ізоелектричною точкою (ІЕТ)** і позначається **pI**.

Для різних амінокислот ізoeлектрична точка різна і залежить від наявності в їх складі здатних до іонізації карбокси- і аміногруп. Ізоелектрична точка моноамінокарбонових кислот знаходиться при $pH = 6$. Водні розчини цих амінокислот крім диполярних іонів містять невелику кількість аніонів та іонів водню.

Для нейтральних α -амінокислот значення ІЕТ дещо нижчі за 7 (5,5-6,3) внаслідок більшої здатності до іонізації карбоксильної групи. У кислих α -амінокислот (аспарагінова і глутамінова кислоти) ІЕТ знаходиться значно нижче 7, наприклад, для глутамінової кислоти $pI = 3,2$. Для лужних амінокислот ІЕТ знаходиться у межах pH вище 7, і в організмі вони містяться у вигляді катіонів, тобто в них протонізовані обидві аміногрупи.

Виділені з білків амінокислоти – це безбарвні, кристалічні речовини, більшість з яких добре розчиняється у воді, і погано – в органічних розчинниках. Здатність α -амінокислот розчинятися у воді є важливим фактором, який забезпечує їх біологічні властивості. Розчинність у воді зумовлене всмоктуванням α -амінокислот, їх транспорт в організмі і т.ін. Всі амінокислоти плавляться за температури вище $200^{\circ}C$, деякі з них при нагріванні розкладаються.

3. БУДОВА БІЛКІВ

Вивчати будову білків дуже складно. Під час досліджень необхідно визначити кількісний і якісний амінокислотний склад білків, вивчити типи зв'язків у їх молекулах, послідовність розташування залишків амінокислот, розміщення поліпептидних ланцюгів молекул білка у просторі та ін.

Вперше вивчення будови білкових речовин було поставлено на наукову основу російським вченим О.Я. Данилевським в кінці XIX ст. Він висунув гіпотезу про те, що основними компонентами молекул білка необхідно вважати амінокислоти, які зв'язані між собою за допомогою груп $—CO—NH—$. До такого висновку О.Я. Данилевський дійшов внаслідок тривалих досліджень продуктів гідролізу білка. Він встановив, що при доливанні до продуктів розпаду молекул білка лужного розчину сульфату міді з'являється синьо-фіолетове забарвлення. Таке ж забарвлення утворювалося при доливанні сульфату міді і до розчину біурету ($NH_2—CO—NH—CO—NH_2$). О.Я. Данилевський припускав, що біуретова реакція зумовлена чергуванням груп $—CO—NH—$ у молекулі біуретового комплексу, висловивши припущення про те, що саме такими групами зв'язані між собою залишки амінокислот у молекулі білка.

На початку XX ст. німецький учений Е. Фішер підтвердив гіпотезу О.Я. Данилевського, здійснивши синтез поліпептиду, який складався з 18 амінокислот і вже мав деякі властивості білків (давав біуретову реакцію, розщеплювався ферментами тощо). Зв'язок, який утворювався між амінокислотами, Е. Фішер назвав пептидним.

Способи зв'язку амінокислот у молекулі білка

Ковалентні зв'язки

Пептидні зв'язки — виникають внаслідок взаємодії карбоксильної групи однієї амінокислоти з аміногрупою другої амінокислоти. Сполуки, які при цьому утворюються, називаються *пептидами*. Утворений дипептид може взаємодіяти з наступною амінокислотою, утворюючи тетрапептид, і т.д.

Залежно від кількості залишків амінокислот, які беруть участь в реакції поліконденсації, утворені сполуки мають назву ди-, три-, тетра- або поліпептидів.

Назви пептидів складаються з назв амінокислот, які входять до їх складу. Кожний пептид або поліпептидний ланцюг будь-якої довжини має N-кінцеву амінокислоту, що містить вільну α -NH₂-групу і C-кінцеву амінокислоту, що містить вільну COOH-групу біля α -вуглецевого атома. Причому в назві амінокислот, карбоксигрупи яких беруть участь в реакції конденсації і руйнуються, утворюючи ацильні залишки, суфікс «н» змінюється на «л», тобто «аланін» замість «аланін», «аспарагіл» і т.д. Найменування пептидів складається з назви першої N-кінцевої амінокислоти із закінченням «іл», наступних амінокислот із таким самим закінченням і повної назви C-кінцевої амінокислоти з вільною COOH-групою біля α -вуглецевого атома.

Довжина зв'язку між вуглицем карбонільної групи та азотом іміногрупи в пептидах значно менша, ніж в інших органічних сполуках, що вказує на деякі особливості пептидного зв'язку. Дослідженнями встановлено, що пептидний зв'язок є проміжним між подвійним і простим (одинарним) зв'язком. Так, відстань між атомами вуглецю і азоту (C—N) в пептидному зв'язку дорівнює 0,132 нм, тоді як довжина одинарного зв'язку між вуглицем і азотом становить 0,147 нм, а подвійного — 0,125 нм.

Дисульфідний зв'язок — це міцний ковалентний зв'язок, що утворюється між залишками молекул цистеїну, що входять до одного або різних пептидних ланцюгів.

Дисульфідні зв'язки мають важливе значення в формуванні третинної структури білків. Руйнування цих зв'язків призводить до дестабілізації даного рівня структури і втрати білком його біологічної активності.

Нековалентні зв'язки та слабкі взаємодії

Це фізико-хімічні зв'язки, що беруть участь у взаємодії як певних частин одного пептидного ланцюга, так і різних, близько розташованих ланцюгів, утворюючи вищі рівні конформації білкових молекул. Це слабкі зв'язки.

1. Водневі зв'язки — виникають між двома електронегативними атомами за рахунок атома водню, ковалентно зв'язаного з одним із електронегативних атомів. Вони найчастіше утворюються між воднем, що входить до складу груп =NH, -OH, та сусіднім атомом кисню.

2. Іонні зв'язки — зв'язують між собою іонізовані аміні та карбоксильні групи (головним чином, бічних радикалів діаміномонакарбонічних та моноамінодикарбонічних амінокислот). Іонний зв'язок відіграє важливу роль при утворенні третинної структури білка.

3. Гідрофобний зв'язок — утворюється внаслідок міжмолекулярної взаємодії (сил Ван дер Ваальса) між гідрофобними (неполярними) радикалами таких амінокислот, як аланін, валін, лейцин, ізолейцин, фенілаланін тощо. Гідрофобний зв'язок має важливе значення для стабілізації третинної і четвертинної структур білків.

Просторова структура білка

За способом згортання і асоціації поліпептидних ланцюгів, виділено чотири рівні просторової структури білка: первинна, вторинна, третинна, четвертинна.

Первинна структура білків

Первинна структура білка — це певна послідовність залишків амінокислот в поліпептидних ланцюгах молекул білка. Вона специфічна для кожного білка і визначається генетичною інформацією.

Первинна структура білка сформована за допомогою пептидних зв'язків.

Вторинна структура білків

Вторинна структура білків – це ряд конформацій (просторова структура), утворення яких зумовлено, головним чином, водневими зв'язками між окремими ділянками пептидного ланцюга або різними пептидними ланцюгами.

Розрізняють два основних типи впорядкованої вторинної структури білкових молекул: α -спіраль та β -структуру.

α -спіраль

α -спіраль – це конформація, яка утворюється при просторовому скручуванні поліпептидного ланцюга за рахунок водневих зв'язків, що виникають між C=O та -NH-групами поліпептидного ланцюга, що віддалені одна від одної на чотири амінокислотних залишки. Водневі зв'язки в α -спіралі спрямовані паралельно до осі молекули. α -спіраль можна уявити собі у вигляді лінії, що йде по боковій поверхні уявного циліндра.

Радіус α -спіралі – 0,25 нм, крок (період ідентичності, виток) – 0,54 нм, висота одного амінокислотного залишку 0,15 нм, на один виток спіралі припадає 3,6 амінокислотних залишків. У природних білках виявлено тільки праві α -спіралі.

Формування α -спіралі залежить від амінокислотного складу поліпептидного ланцюга. Деякі амінокислоти (аланін, метіонін, лейцин, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин) сприяють утворенню α -спіралі, інші – гліцин, серин, треонін, лізин, аргінін, аспарагінова і глутамінова кислоти – її дестабілізують.

Природних білків, які б склалися лише з α – спіралей, майже немає.

β -структура

β -структура – це структура типу складчастого шару, складається із зигзагоподібно згорнутих поліпептидних ланцюгів, що розташовані поряд (двох або більшої кількості).

β -структури утворюються за рахунок міжланцюгових водневих зв'язків, що з'єднують групи C=O та -NH сусідніх поліпептидів.

β -структура характерна для білків опірних тканин – колагену (білок сухожилля, шкіри), фіброїну (білок шовку), окремих видів кератину (білок шерсті, волосся) та ін.

У білках можливі переходи α -спіралі у β -структури і навпаки.

Третинна структура білків

Цей рівень структури характеризується певною конформацією спіралізованих і лінійних ділянок поліпептидних ланцюгів у просторі.

Для кожного білка характерна своя третинна структура, від якої залежать його біологічні властивості. Третинна структура значною мірою визначається первинною структурою білків, тобто послідовністю чергування залишків амінокислот в їх молекулах, розміром, формою і полярністю радикалів залишків амінокислот.

Необхідно відзначити, що поліпептидні ланцюги не просто укладаються, утворюючи структуру, близьку до сферичної. Укладання їх відбувається через цілий ряд точно визначених станів, з утворенням певної конформації молекули білка. Під час формування третинної структури поліпептидні ланцюги укладаються так, щоб максимальна кількість гідрофільних груп залишків амінокислот була розміщена назовні, тобто повернута до водного середовища, а гідрофобні групи розміщуються всередині структури (глобули). На конформацію утвореної глобули значний вплив мають такі фактори, як рН середовища, іонна сила розчину, температура, взаємодія білкових молекул з іншими речовинами тощо.

Третинна структура білка визначає форму білкової молекули, утворюючи або глобулу (глобулярні білки) або достатньо витягнуті волокна (фібрилярні білки).

Незначне порушення третинної структури білка, як правило, призводить до втрати ним біологічних властивостей.

У стабілізації третинної структури важливу роль відіграють гідрофобні, водневі, дисульфідні та іонні зв'язки.

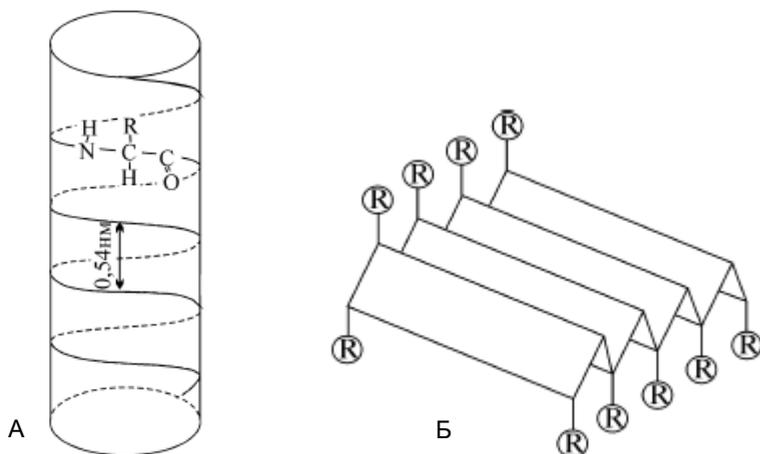


Рис. 1. Вторинна структура білка: А – схема α -спіральної конформації, Б – β -структура

Четвертинна структура білків

Для білків, молекули яких побудовані з одного поліпептидного ланцюга, можливі лише первинна, вторинна і третинна структури. Четвертинна структура характерна лише для тих білків, які складаються з двох, чотирьох і більше, в основному парної, кількості індивідуальних поліпептидних ланцюгів з власною третинною структурою. Такі поліпептидні ланцюги називаються протомерами, а білки, побудовані з них – олігомерами. Отже, взаємне просторове розміщення протомерів у білковій молекулі і становить її четвертинну структуру.

Окремі протомери (субодиниці) в білках з четвертинною структурою об'єднані слабкими нековалентними зв'язками (водневими, іонними або гідрофобними), що спричиняє порівняно їх легку дисоціацію при зміні фізико-хімічних властивостей середовища.

Прикладом білків з четвертинною структурою є олігомерні білки з молекулярною масою вище 50 кД (алкогольдегідрогеназа, піруваткіназа). Це гемоглобін, білок вірусу тютюнової мозаїки, білок вірусу жовтої мозаїки ріпи та ін.

4. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ

Молекулярна маса. Молекулярна маса білків дуже велика – від декількох тисяч до мільйонів дальтон. Вважають, що сполуки з молекулярною масою < 6000 належать до поліпептидів, а >50000–60000 – до олігомерів. Середнє значення молекулярної маси білків наведено у табл. 1.

Найпоширенішими методами її визначення є ультрацентрифугування, гель-електрофорез, гель-фільтрація, осмометричний, дифузійний метод, РСА, метод електронної мікроскопії та ін.

Таблиця 1

Молекулярні маси і ІЕТ деяких білків

Білок	Молекулярна маса, тис. од.	ІЕТ
Інсулін	6,0	–
Цитохром с	13,0	10,61
Кінський міоглобін	7,0	7,0
Альбумін молока	17,4	6,9
Ячний альбумін	40,0	6,9
Гемоглобін людини	68,0	6,4-7,2
Сироватковий γ -глобулін	160,0	5,6
Каталаза	250,0	5,6
Уреаза (із сої)	480,0	5,1
Тиреоглобулін	660,0	–
Актоміозин	5000,0	–
Вірус тютюнової мозаїки	40000,0	–

Амфотерні властивості білків. Білки є амфотерними електролітами, оскільки у складі їх молекули містяться як кислотні, так і лужні групи. Кислотно-основні властивості визначаються, головним чином, бічними радикалами амінокислот, здатними до іонізації. До іонізованих груп належать COO^- -групи бокових радикалів аспарагінової і глутамінової кислот, NH_3^+ -групи залишків лізину й аргініну. Іонізація решти груп у молекулах білка істотного значення не має, оскільки $\alpha\text{-NH}_2$ -і $\alpha\text{-COOH}$ -групи утворюють пептидні зв'язки, а кількість N- і C-кінцевих груп є незначною у зв'язку з великими розмірами молекул білка.

Ступінь іонізації функціональних груп залежить від значення рН. У кислому середовищі іонізуються -NH_2 -групи, у лужному середовищі -COOH . Тому білки у водному середовищі, подібно до амінокислот, мають властивості амфолітів: у кислому середовищі вони реагують як основи, у лужному – як кислоти.

Значення рН середовища, при якому білок не несе сумарного заряду й не рухається в електричному полі, називається **ізоелектричною точкою (ІЕТ)**. Ізоелектричні точки деяких білків наведені в таблиці 1.

ІЕТ білка характеризується низкою особливостей: в ІЕТ білок має найменшу розчинність і досить легко випадає в осад, втрачаючи здатність рухатися в електричному полі. Слід зазначити, що в ІЕТ білок випадає в осад у більшості випадків після додавання водовідбираючих речовин, котрі руйнують гідратну оболонку (спирту, ацетону, нейтральної солі та ін.). Знаючи ІЕТ індивідуальних білків, можна підібрати найкращі умови для їх осадження з біологічних рідин, тканинних екстрактів, які містять суміш різних білків, а також для одержання й очистки білкових препаратів.

Наявність великої кількості точок дисоціації визначає і здатність білкових молекул до взаємодії з малими іонами, зокрема з іонами металів, іншими зарядженими молекулами, що дуже важливо для функціонування білка. Відомо, що транспорт іонів, наприклад, іонів Cu^{2+} і Zn^{2+} забезпечується білками, деякі ферменти виявляють каталітичну дію тільки при наявності у складі їх молекули іонів металів. Здатність білків утворювати з іонами металів комплекси використовується в медицині для усунення наслідків отруєння важкими металами. У цьому випадку дають випити розчин яєчного білка або молока, котрі зв'язують іони металів, перешкоджаючи їх всмоктуванню.

Внаслідок наявності в складі білкової молекули великої кількості реакційноздатних груп, білки можуть брати участь в реакціях окислення, відновлення, солеутворення, ацетилювання, етерифікації, фосфорилування і т.ін. Усі ці реакції мають місце в живих організмах і забезпечують процеси їх життєдіяльності.

Білки, як амфотерні електроліти, виявляють в організмі буферні властивості, що має відношення до підтримання сталості рН.

Розчинність білка. Розчинність різних білків у воді та в різних розчинниках неоднакова і залежить від природи білка та розчинника, значення рН, температури, іонної сили тощо. Багато білків розчиняється у воді (альбуміни) або в сумішах спиртів (проламіни). Білки ж опірних тканин взагалі нерозчинні у воді.

Розчинність білків значною мірою залежить від значення рН та присутності солей. Причому присутність солей може або зменшувати, або збільшувати їх розчинність. Це явище пов'язане не з концентрацією розчину, а з його іонною силою. При низьких значеннях іонної сили розчинність білків збільшується, а при високих — зменшується.

Процес підвищення розчинності білків при доливанні невеликої кількості розчинів нейтральних солей (Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та ін.) має назву сольового розчинення, або **засолювання**. При значному збільшенні іонної сили розчину спостерігається протилежне до засолювання явище — розчинність білків різко знижується і вони випадають в осад. Цей процес має назву **висолювання** і пояснюється, очевидно, конкуренцією між білком та іонами солі за іони води. Число молекул води, які можна використати для гідратації білка, значно зменшується, що і призводить до осадження білків. Отже, **висолювання** — це осадження білків концентрованими розчинами нейтральних солей. Висолювання має зворотний характер — при видаленні з розчину іонів солі білок знову переходить у розчин.

Оскільки процес розчинення білків залежить від гідратації їхніх молекул, а наявність гідратної оболонки разом із зарядом є важливим фактором стабілізації молекули білка, то всі фактори, котрі послаблюють гідратацію білка або сприяють руйнуванню гідратних оболонок, зменшують таким чином розчинність білка й призводять до його осадження. У разі втрати білками гідратної оболонки виникають дипольні сили, котрі забезпечують агрегацію білкових молекул. Білки з високим дипольним моментом (глобуліни, міозин) випадають в осад за низьких концентрацій солей, а білки з низьким дипольним моментом – за високих концентрацій солей (альбуміни). Так, глобуліни випадають в осад у напівнасичених розчинах нейтральних солей, а альбуміни – при добавленні 100% насичених сольових розчинів. Знизити гідратацію білкових розчинів можна добавленням спирту, ацетону й інших органічних розчинників.

Осадження білків органічними розчинниками за низьких температур, а також при висолюванні має назву **зворотного осадження**. Після додавання води і відновлення гідратних оболонок білок знову розчиняється і набуває початкового нативного стану. Оборотно осадження білків органічними розчинниками і методом висолювання використовують у фармацевтичній практиці для виділення білків і для їх розподілу на білкові фракції при одержанні очищених білкових, у тому числі, ферментних і гормональних препаратів, а також для одержання білків у кристалічному стані.

Денатурація білків. Під впливом фізичних (температура, ультразвук, іонізуюча радіація і т.ін.), хімічних (мінеральні й органічні кислоти, луги, органічні розчинники, важкі метали, алкалоїди, детергенти, деякі аміди, наприклад, сечовина та ін.) факторів відбуваються глибокі зміни в молекулі білка, пов'язані з порушенням четвертинної, третинної і вторинної структур, що спричиняє, своєю чергою, зміну фізико-хімічних і біологічних властивостей білка, тобто **денатурацію**.

При денатурації білка руйнуються усі види зв'язків (крім ковалентних зв'язків основного кістяка поліпептидного ланцюга). Це призводить до зміни просторової структури і властивостей молекул білка. В результаті денатурації глобула білка розкручується, зменшуються гідрофільні властивості білка, внаслідок чого втрачає здатність розчинятися у звичайних для нього розчинниках і позбувається своїх біологічних функцій. Після денатурації змінюється більшість фізико-хімічних властивостей білка: зменшується розчинність, посилюється в'язкість, з'являється більше хіральних атомів вуглецю, змінюються оптичні властивості і константа седиментації. Під час денатурації білка вивільняються реактивні групи, які в його нативному стані були не зовсім доступні (сульфгідрильні, фенольні, гідроксильні, імідазольні та ін.), що спричиняє зміну ІЕТ білків. Найчастіше вона зміщується у бік лужних значень рН. Денатурація білків супроводжується зростанням оптичної активності. Пеєрвінна структура не порушується, тому після розкручування поліпептидного ланцюга (стадія нитки) він може знову стихійно скручуватися, утворюючи «випадковий клубок», тобто переходить до хаотичного стану. При цьому спостерігається агрегація білкових частинок і випадання їх в осад.

При недовготривалій дії денатуруючого агента білок можна повернути в попередній, нативний, стан. Цей процес має назву **ренатурації**, або пептизації. При ренатурації білків ніяких нових зв'язків і нових властивостей, не

властивих нативному білку, не виникає, а відновлюються лише ті, які були для нього характерними.

Процес денатурації білків широко використовується в клініці, фармації і біохімічних дослідженнях для осадження білка в біологічному матеріалі з метою подальшого визначення в ньому небілкових і низькомолекулярних сполук; для встановлення наявності білка і його кількісного визначення; для знезараження шкіри і слизових покривів; для зв'язування солей важких металів під час лікування отруень солями ртуті, свинцю, міді тощо або для профілактики таких отруень на підприємстві.

Колоїдні властивості білків. Білки, маючи велику молекулярну масу, при розчиненні у воді утворюють колоїдні розчини із частинками розміром від 0,001 до 0,1 мкм. У розчинах вони виявляють колоїдні властивості: повільно дифундують, не проходять через напівпроникну мембрану, розсіюють світло, мають високу в'язкість. Проте білкові розчини не відносять до типових колоїдних розчинів, оскільки білки, диспергуючись до одиничних молекул, утворюють гомогенний розчин. Зрештою, їх можна вважати істинними розчинами. На відміну від них типові колоїдні розчини гетерогенні, двофазні (розчинена речовина і розчинник). Колоїдні частинки (міцели) розчиненої речовини складаються з декількох молекул. Схожість білкових та істинних колоїдних розчинів ґрунтується на тому, що молекули білка мають розміри, близькі до розмірів міцел колоїдного розчину (10^{-4} – 10^{-7} см). Особливістю гідрофільних білкових колоїдів (золей) є здатність за певних умов втрачати свою текучість і утворювати гелі, або драглі. Вони утворюються внаслідок об'єднання молекул у вигляді сітки, внутрішній простір якої заповнений великою кількістю розчинника. При цьому розподіл на тверду і рідку фази, як у випадку коагуляції, не відбувається.

Утворення колоїдних розчинів білками і гелеутворення зумовлюють більшість із тих фізико-хімічних явищ, які спостерігаються в біологічних рідинах і в організмі в цілому. У ряді тваринних тканин білки знаходяться не тільки у вигляді розчинів, але й гелей (у протоплазмі клітин, хрусталику ока, сполучній тканині тощо).

Осмотичні властивості білків. Через високу молекулярну масу білки не здатні проникати крізь біологічні і штучні мембрани (наприклад, целофан, пергамент, висушені плівки колоїдію і т.ін.), що є зручним для очистки розчинів білка від низькомолекулярних органічних і неорганічних домішок. Такий процес називають **діалізом**. *Діаліз* – це особливий різновид розподілу речовин з використанням мембран, нездатних пропускати через свої пори високомолекулярні молекули. Діаліз використовують у біохімічних дослідженнях для очистки високомолекулярних сполук (білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів і т.ін.) від низькомолекулярних і у фармації для одержання лікарських препаратів, у тому числі і білкових. Метод діалізу використовується в практичній медицині для очистки крові від природних низькомолекулярних «шлаків» і токсичних сполук при захворюванні нирок і деяких отруєннях (апарат «штучна нирка»). Нездатність білків дифундувати через напівпроникні мембрани спричиняє явище осмосу, тобто переміщення молекул води через мембрану в розчин білка. Якщо розчин білка відокремити від води целофановою мембраною, то, прагнучи досягти рівноваги, молекули води проникають у розчин білка. Це підвищує гідростатичний тиск (тиск стовпа води), який перешкоджає подальшій дифузії молекул води. Той тиск, або сила,

яку треба прикласти, щоб зупинити осмотичний потік води, називається **осмотичним тиском**. Біологічні мембрани також непроникні для білка, тому осмотичний тиск, утворений білком, залежить від концентрації його усередині і поза клітиною. Осмотичний тиск, зумовлений білком, називають також **онкотичним тиском**.

В'язкість розчинів білка. Для розчинів високомолекулярних молекул білка характерною є висока в'язкість. Підвищення його концентрації призводить до збільшення в'язкості розчину, оскільки зростають сили зчеплення між молекулами білка. В'язкість залежить від форми молекул. Розчини фібрилярних білків більш в'язкі, ніж глобулярних. На в'язкість розчинів сильно впливають температура і наявність електролітів. Із підвищенням температури в'язкість знижується. Додавання деяких солей, наприклад, кальцію, підвищує в'язкість, сприяючи зчепленню молекул за допомогою кальцієвих місточків. Іноді в'язкість білкового розчину збільшується настільки, що він втрачає текучість і набуває гелеподібного стану.

Білки як емульгатори. Завдяки гідрофільним і гідрофобним групам білки можуть впливати на розчинність інших речовин, виступаючи в ролі емульгаторів. Емульгатори – це речовини, котрі стабілізують емульсію, утворену взаємнерозчинними рідинами (вода-масло). Білок утворює на поверхні крапельок жиру тонку плівку, де гідрофобні групи білків занурюються у верхній шар крапельок масла, а гідрофільні – знаходяться на поверхні і спрямовані до водного середовища, що перешкоджає злиттю крапельок масла в суцільний шар. Білкові емульгатори застосовуються для приготування лікарських форм, наприклад, желатоза. В організмі людини в емульгованому стані знаходяться ліпіди крові та лімфи. Однією з причин утворення сечових та жовчних каменів може бути нестача в організмі муцинів – слизових глікопротеїнів, які обволікають гідрофобні мікрочастинки і сприяють тим самим їх виведенню з організму. Молоко можна розглядати як емульсію, де емульговані казеїногенем (білок молока) дрібні крапельки жиру рівномірно розподілені у воді. Звідси і білий колір молока.

Оптичні властивості білків. Як правило, усі білки, поглинають ультрафіолетове (УФ) світло у трьох зонах. Поглинання при довжині хвиль понад 250 нм з максимумом близько 280 нм зумовлюється наявністю виключно ароматичних амінокислот – фенілаланіну, тирозину, триптофану. Смуга поглинання, максимум якої знаходиться поблизу 190 нм, зумовлюється, головним чином, пептидними зв'язками. В інфрачервоній (ІЧ) частині спектра (760-10000 нм) поглинають світло всі білки. ІЧ-спектроскопію широко використовують для визначення відносного вмісту α -спіралей, β -структур та аморфних ділянок у білковій молекулі.

Білки є оптично-активними сполуками: вони обертають плоскополяризоване світло, яке проходить через їх розчин, і неоднаково поглинають ліве і праве циркулярно поляризоване світло. Зазначена властивість білків пояснюється наявністю в їх молекулі хіральних атомів вуглецю.

Білкові розчини здатні також флуоресцювати – випускати квант світла при переході з електронного збудженого стану до основного. На цій властивості білків ґрунтується флуоресцентна спектроскопія. Флуоресценція характерна для таких амінокислотних залишків у молекулі білка, як фенілаланін, тирозин, триптофан.

5. КЛАСИФІКАЦІЯ БІЛКІВ

Білки класифікують за фізико-хімічними властивостями та хімічним складом. За цими ознаками білки поділяють на дві групи – **прості (протеїни)** і **складні (протеїди)**. *Протеїни* – це білки, до складу яких входять лише залишки амінокислот, *протеїди* – крім амінокислот містять ще й інші компоненти – протетичні групи.

Прості білки (протеїни) поділяються на такі класи: альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, проламіни, глутеліни і протеїноїди.

Альбуміни. Це водорозчинні білки, які осаджуються при насиченні розчинів нейтральними солями, наприклад $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для їх осадження необхідне 100%-не насичення розчинів солями.

Альбуміни широко розповсюджені в природі. Вони складають біля 50% усіх білків плазми людини. Молекулярна маса альбумінів 35000–70000. Для хімічного складу характерним є вміст лейцину (15%), значної кількості сірковмісних амінокислот, лізину, аспарагінової і глутамінової кислот, а також незначний вміст гліцину.

Основні функції альбумінів – регуляція осмотичних процесів і транспорт різних речовин. При зменшенні вмісту альбумінів порушується транспорт ліпідів. Вони регулюють також вміст у плазмі крові іонів Ca^{2+} , стероїдних гормонів, деяких лікарських препаратів (дикумарину, пеніциліну, аспірину), утворюючи з ними комплекси.

Глобуліни. Глобуліни, як і альбуміни, дуже поширені у складі тваринних і рослинних тканин. На відміну від альбумінів, глобуліни не розчиняються в концентрованих розчинах нейтральних солей. Із тканин їх виділяють за допомогою екстрагування 10% розчином солей. При підвищенні концентрації солей розчинність глобулінів зменшується, а в 50% розчині вони випадають в осад. Молекулярна маса глобулінів – 0,9-1,5 млн. Вони більш грубодисперсні і менш гідрофільні, ніж альбуміни. За хімічним складом глобуліни дещо відрізняються від альбумінів і містять більше гліцину (приблизно 5%) і меншу кількість сірковмісних амінокислот. Під час електрофорезу білки сироватки крові в залежності від рухливості розподіляються на декілька фракцій, серед яких альбуміни становлять 54–58%, фракція глобулінів неоднорідна і розділяється на α_1 -глобуліни (6–7%), α_2 -глобуліни (8–9%), β -глобуліни (13–14%), γ -глобуліни (11–12%).

Гістони. Це лужні білки з молекулярною масою 12000–30000, які містять 20–30% лужних амінокислот. Вони розчиняються у слабких кислотах, осаджуються спиртом, не містять триптофану і, у більшості випадків, цистеїну і цистину. Основна маса гістонів входить до складу хромосом ядер клітин і відіграє важливу роль у стабілізації ДНК. Певну роль вони виконують у процесах біосинтезу білків, оскільки є компонентами дезоксирибонуклеопротеїнів ядра. Гістони не знайдено в хромосомах прокариот.

Протаміни. Це сильно лужні білки з низькою молекулярною масою (до 12000), завдяки чому деякі з них проходять через целофан при діалізі. Протаміни розчиняються в слабких кислотах, не осаджуються при кип'ятінні; у їх молекулі вміст діаміномонокарбонових кислот становить близько 80%, особливо багато аргініну. У протамінах не зустрічаються цистеїн, триптофан, аспарагін, найчастіше відсутні тирозин, фенілаланін, тому вони не дають

багатьох кольорових реакцій на білок. Завдяки високому вмісту основних амінокислот протаміни являють собою полівалентний органічний катіон, що легко реагує з молекулами, які мають надлишок негативно заряджених груп, наприклад, із нуклеїновими кислотами. Протаміни надають ДНК біологічної інертності, що є необхідною умовою збереження спадкових властивостей організму.

Протаміни широко розповсюджені в природі. Вони містяться в статевих клітинах тварин і людини і складають основну масу білків хроматину.

Проламіни. Ця група білків дуже поширена в рослинних організмах, добре розчиняється в 60–80% етиловому спирті, до їх складу входить багато проліну, а також глютамінової кислоти. У незначній кількості до складу цих білків входять лізин, аргінін, гліцин. Вони входять до складу насіння злакових культур. Представниками їх є гліадин пшениці, орозеїн рису, гордеїн ячменю, зеїн кукурудзи, авенін вівса тощо. Назва «проламіни» була запропонована в зв'язку з тим, що до їх складу входить значна кількість проліну. Для проламінів характерним є те, що вони зовсім не містять лізину.

Глутеліни як і проламіни, містяться у зелених частинах рослин і насінні. Характерною особливістю білків є те, що до їх складу входять велика кількість глютамінової кислоти і лізину. Добре розчиняються у лугах.

Протеїноїди. Це важкорозчинні білки, котрі не розчиняються у воді, розчинах солей та в розчинах кислот і лугів; для їх складу характерною є висока частка сірковмісних амінокислот. До протеїноїдів належать фібрилярні білки: кератини, колагени, фіброїни шовку та ін. Вони відрізняються високою стійкістю й еластичністю. Протеїноїди слабо розщеплюються ферментами кишкового тракту, тому погано засвоюються і сприяють процесам гниття в кишечнику.

Складні білки (протеїди) складаються з простого білка і сполуки небілкової природи – простетичної групи (від грецького слова *prosteto* – приєдную, додаю). Залежно від хімічної природи простетичної групи складні білки поділяються на нуклеопротеїни, хромопротеїни, металопротеїни, глюкопротеїни, фосфопротеїни і ліпопротеїни.

Нуклеопротеїни – це складні білки, простетичною групою яких є нуклеїнові кислоти. Залежно від природи нуклеїнової кислоти нуклеопротеїни поділяються на рибонуклеопротеїни (РНП), якщо до їх складу входить рибонуклеїнова кислота (РНК), а якщо дезоксирибонуклеїнова кислота – ДНП.

Хромопротеїни – побудовані з простого білка і забарвленої простетичної групи. До хромопротеїнів належать гемпротеїди (які містять простетичну групу гем), хлорофілпротеїди (простетична група – хлорофіл), флавопротеїди (простетична група – похідні ізоалоксазину), ретинальпротеїди (простетична група – вітамін А в альдегідній формі), кобамідпротеїди (простетична група представлена вітаміном В₁₂), цитохроми, каталаза, пероксидаза тощо.

Глікопротеїни – у складі простетичної групи містять залишки вуглеводів та їх похідні. Входять до складу крові, білків молока, яєць, ферментів, гормонів.

Металопротеїни – до складу простетичної групи входять залізо, мідь, кобальт, цинк та інші елементи. До металопротеїднів належить велика група ферментів. Металопротеїни в організмі виконують транспортну функцію, інші – частково депонуючу. У транспортних білків вміст металу становить

десяти долі відсотка, а в депонуємих білків цей відсоток значно вищий. У перших зв'язок металу з білковою частиною неміцний і легко розривається. Типовими представниками транспортних білків є речовини, що містять залізо: феритин, трансферин, гемосидерин і ті, що містять мідь: церулоплазмін, пластоціанін та ін.

Фосфопротеїни – містять у вигляді простетичної групи залишки ортофосфорної кислоти. До фосфопротеїдів належить багато білків, які виконують важливу роль у харчуванні молодих організмів. Це основний білок молока – казеїн, а також вітелін, вітеленін та фосвітин, виділені з жовтка курячого яйця; овальбумін, відкритий у білку курячого яйця, іхтулін, який міститься в ікрі риб та ін. Значну кількість фосфопротеїнів містить центральна нервова система. Фосфопротеїни – це цінне джерело енергетичного та пластичного матеріалу в процесі ембріогенезу і подальшого постнатального росту і розвитку організму.

Ліпопротеїни – у складі простетичної групи містять ліпіди і їх похідні (тригліцериди, фосфоліпіди, холестерин тощо). Найчастіше простетичною групою є нейтральні жири – тригліцериди. Входять до складу біологічних мембран, крові, лімфи, нервових тканин та інше.

В комплексі з білками ліпіди набувають нових властивостей: вони здатні розчинятися у воді і втрачають здатність розчинятися у органічних розчинниках. Ліпіди ж не розчиняються у воді і розчиняються у органічних розчинниках.

Ліпопротеїни широко розповсюджені в природі: в рослинах, тканинах тварин і в мікроорганізмах, та виконують різноманітні біологічні функції. Ліпопротеїни входять до складу клітинної мембрани та внутрішньоклітинних біомембран ядра, мітохондрій, мікросом (це структурні ліпопротеїни), а також присутні у вільному стані (головним чином – у плазмі крові). Встановлено також, що ліпопротеїни беруть участь у структурній, комплексній організації мієлінових оболонок нервової тканини, хлоропластів, фоторецепторної й електронтранспортної систем, паличок і колбочок сітківки ока і т.ін.

Контрольні запитання:

1. Амінокислотний склад білків і пептидів.
2. Класифікація амінокислот.
3. Будова білків.
4. Назвіть основні функції білків.
5. Охарактеризуйте первинну, вторинну, третинну і четвертинну структуру білка.
6. Назвіть основні хімічні зв'язки, що забезпечують формування структури білка.
7. Назвіть основні хімічні властивості білків.
8. Класифікація білків. Прості і складні ліпіди.

Тема: НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ

План

1. Хімічний склад і будова нуклеїнових кислот.
2. Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК).
3. Рибонуклеїнова кислота (РНК).
4. Властивості нуклеїнових кислот.

1. ХІМІЧНИЙ СКЛАД І БУДОВА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

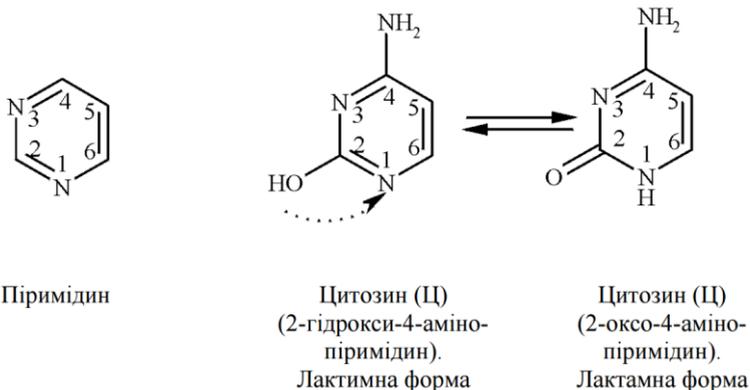
Нуклеїнові кислоти були відкриті швейцарським вченим Ф. Мішером у 1869 р. в ядрах лейкоцитів. У зв'язку з тим, що вони вперше були виявлені в ядрах клітин, то спочатку їх називали нуклеїном (*nucleus* — ядро, лат.). Пізніше в нуклеїні була відкрита фосфорна кислота і його стали називати нуклеїновою кислотою. Пізніше було встановлено, що нуклеїнова кислота міститься не тільки в ядрах лейкоцитів, а й в ядрах різних клітин. Потім нуклеїнова кислота (дещо відмінна від тієї, що міститься в ядрах) була знайдена і в цитоплазмі клітин. Так було доведено, що нуклеїнові кислоти містяться в усіх клітинах організмів і відіграють важливу біологічну роль, зокрема є основними носіями передачі спадковості та беруть безпосередню участь у синтезі білків в організмі.

Нуклеїнові кислоти, як і білки, є високомолекулярними сполуками. Вони побудовані з великої кількості структурних одиниць, які називаються нуклеотидами, тобто нуклеїнові кислоти — полінуклеотиди.

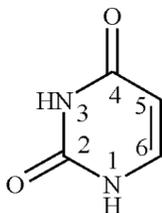
Нуклеотиди — це трьохкомпонентні сполуки. Вони складаються з азотистих основ, пентоз і фосфорної кислоти.

Азотисті основи, які входять до складу нуклеїнових кислот, є похідними гетероциклічних сполук — **пурину** і **піримідину**. До піримідинових основ відносять цитозин (Ц), урацил (У) і тимін (Т), а до пуринових основ — аденін (А) і гуанін (Г). Вони являють собою або оксо- (урацил, тимін), або аміно- (аденін), або змішані — оксо- і аміно- (цитозин, гуанін) похідні піримідину чи пурину. Для оксопохідних піримідину і пурину характерна лактим-лактамна (енольна-кетонна форми) таутомерія. Тому азотисті основи здатні існувати в різноманітних таутомерних формах, проте стійкішими є лактамні (оксо-) форми. У такій формі вони входять до складу нуклеїнових кислот.

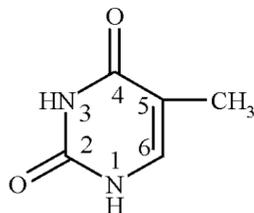
Піримідинові основи:



Піримідинові основи:

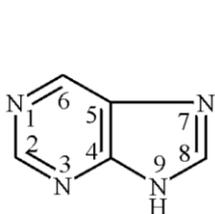


Урацил (У)
(2,4-діоксопіримідин)

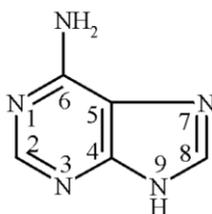


Тимін (Т)
(2,4-діоксо-5-метилпіримідин)

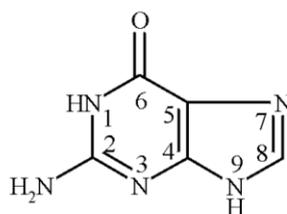
Пуринові основи:



Пури́н



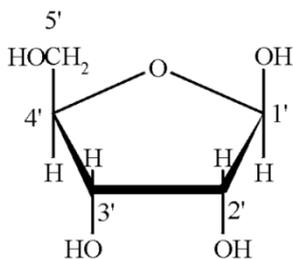
Аденін (А)
(6-амінопури́н)



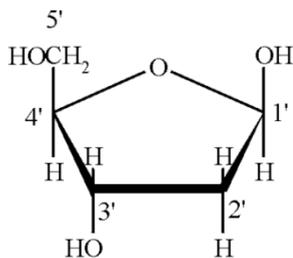
Гуанін (Г)
(2-аміно-6-оксопури́н)

До складу ДНК входять аденін, гуанін, цитозин, тимін, а до складу РНК – аденін, гуанін, цитозин, а замість тиміну – урацил.

Із вуглеводних компонентів – пентоз – до складу нуклеотидів входить рибоза або дезоксирибоза:

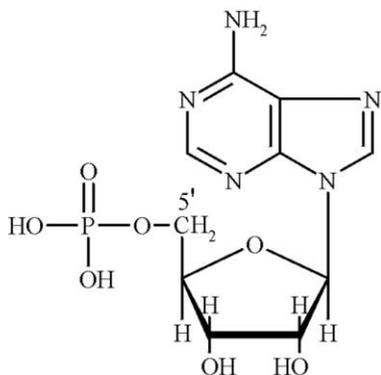


β -D-рибофураноза
(рибоза)

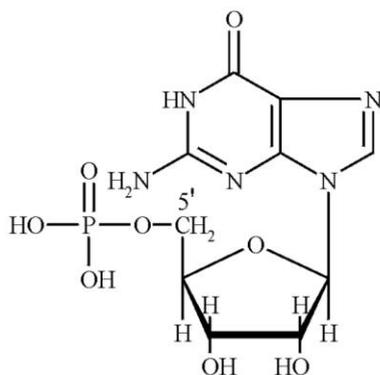


β -2'-дезоксі-D-рибофураноза
(дезоксирибоза)

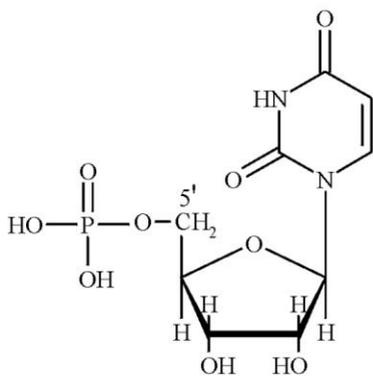
1. Рибонуклеотиди



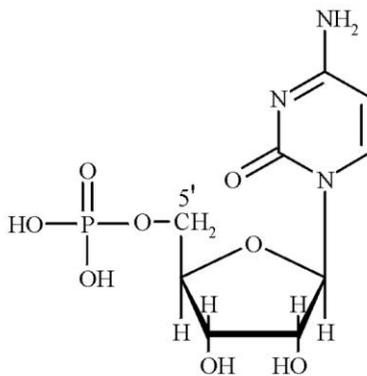
Аденозин-5'-монофосфат
Аденілова кислота
(АМФ)



Гуанозин-5'-монофосфат
Гуанілова кислота
(ГМФ)

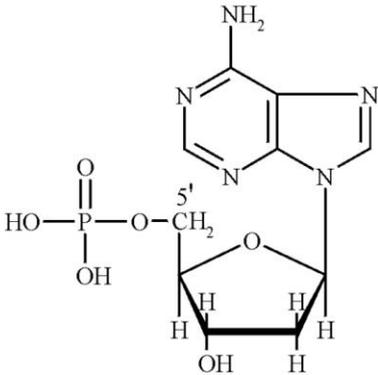


Уридин-5'-монофосфат
Уридилова кислота
(УМФ)

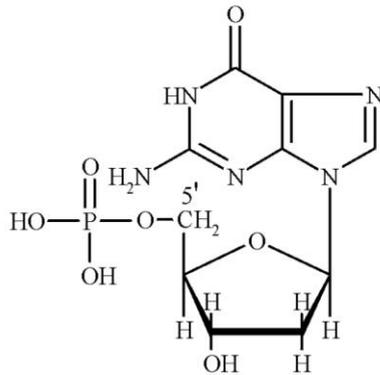


Цитидин-5'-монофосфат
Цитидилова кислота
(ЦМФ)

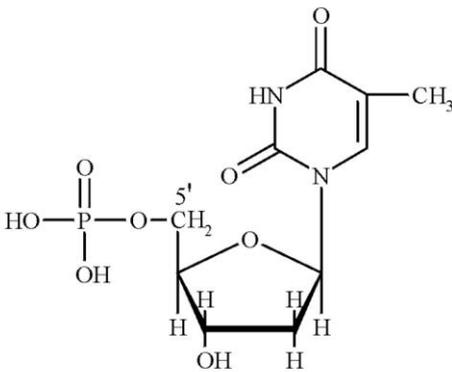
2. Дезоксирибонуклеотиди



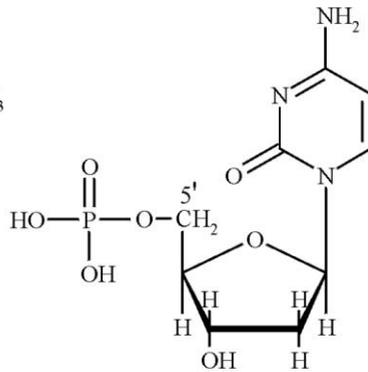
Дезоксиаденозин-5'-монофосфат
Дезоксиаденілова кислота
(дАМФ)



Дезоксигуанозин-5'-монофосфат
Дезоксигуанілова кислота
(дГМФ)

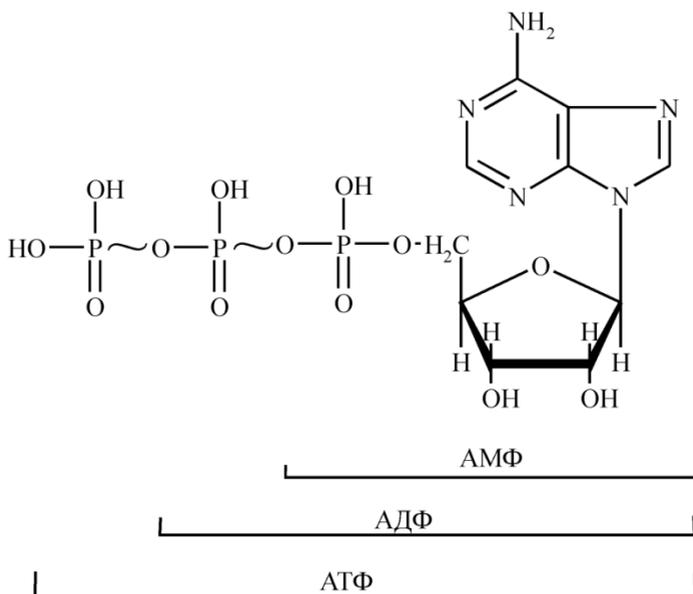


Дезокситимідин-5'-монофосфат
Дезокситимідилова кислота
(дТМФ)



Дезоксицитидин-5'-монофосфат
Дезоксицитидилова кислота
(дЦМФ)

До нуклеозидмонофосфатів може приєднуватися за допомогою фосфоангідридного зв'язку ще один або два залишки фосфорної кислоти. При цьому утворюються нуклеозидди- та нуклеозидтрифосфати:



АМФ, АДФ і АТФ виконують важливу роль в обмінних процесах організму. Наприклад, АТФ бере участь в енергетичному обміні організму, є однією з основних макроергічних сполук. Під час відщеплення від АТФ однієї або двох молекул фосфорної кислоти, які з'єднані між собою макроергічним зв'язком (~), виділяється 32-42 кДж/моль енергії, тоді як енергія звичайного фосфатного зв'язку – 8-12 кДж/моль. В обміні речовин та енергії беруть участь й інші фосфорильовані нуклеотиди: ГТФ, ЦТФ, УТФ та ін.

Окрім зазначених нуклеотидів відомі нуклеотиди, у яких фосфорна кислота одночасно етерифікує (зв'язує) дві гідроксильні групи пентозного залишку, утворюючи циклофосфати. Практично в усіх клітинах є присутніми два циклічних нуклеотиди – цАМФ і цГМФ. Циклічні нуклеотиди є найважливішими регуляторами внутрішньоклітинних процесів.

Будова і властивості нуклеїнових кислот

Окремі нуклеотиди, які побудовані з пуринових або піримідинових основ, рибози або дезоксирибози і залишку фосфорної кислоти, сполучаючись між собою, утворюють ди-, три-, тетра-, пента- гекса- і полінуклеотиди, тобто нуклеїнові кислоти. До складу нуклеїнових кислот входять сотні і тисячі окремих нуклеотидів. Вони з'єднані між собою за допомогою 3',5'-фосфодиефірного зв'язку, який утворюється внаслідок взаємодії гідроксильної групи, що знаходиться біля 3'-атома вуглецю пентози одного нуклеотиду з залишком фосфорної кислоти, який знаходиться біля 5'-атома вуглецю пентози наступного нуклеотиду. Таким чином, на одному кінці полінуклеотидного ланцюга знаходиться нуклеотид з вільною фосфатною групою п'ятого атома вуглецю пентози (5'-кінець) – початок ланцюга, а на другому – нуклеотид з вільною ОН-групою у третьому вуглецевому атомі пентози (3'-кінець) – кінець ланцюга.

З 5'-кінець починається синтез полінуклеотидних ланцюгів у процесах реплікації, транскрипції і репарації. Скорочено напрямом ланцюга позначається 5'→3'.

Нуклеїнові кислоти залежно від хімічного складу, структури і біологічної ролі поділяють на дві групи:

- **дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК).**
- **рибонуклеїнові кислоти (РНК)**

До складу ДНК входять нуклеотиди, побудовані з дезоксирибози та азотистих основ – аденіну, гуаніну, цитозину і тиміну.

РНК побудовані з нуклеотидів, які крім залишку фосфорної кислоти містять рибозу і азотисті основи – аденін, гуанін, цитозин і замість тиміну урацил.

Функції нуклеїнових кислот

Нуклеїнові кислоти в організмі відіграють різноманітні функції, але найважливішими серед них є участь в передачі спадкових ознак і процесах біосинтезу білка.

Основними носіями генетичної інформації в більшості організмів є ДНК. Винятком є тільки окремі фаги, дрібні віруси тварин і більшість рослинних вірусів, в яких носіями генетичної інформації є молекули РНК. Спадкова інформація організму закладена і зберігається в структурі ДНК, а реалізується (виявляється) у процесі біосинтезу білка.

При біосинтезі білка певну роль відіграють не тільки ДНК, а й різні види РНК. Встановлено, що всі види РНК (іРНК, рРНК, тРНК) беруть участь у біосинтезі білка. При цьому кожний з них виконує свою функцію. Так, іРНК одержує інформацію про специфічність біосинтезу білка в ядрі від ДНК і переносить її до рибосом, а тРНК переносить активовані амінокислоти до місця біосинтезу білка. Роль рРНК в синтезі білка ще повністю не з'ясована. Вважають, що вони формують рибосоми, на яких відбувається синтез білка.

2. ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕЇНОВА КИСЛОТА (ДНК)

ДНК є основним генетичним матеріалом живих систем. В організмах, за винятком вірусів і бактерій, вона сконцентрована в ядрах клітин. Невелика кількість ДНК міститься в мітохондріях, хлоропластах та в деяких інших структурах клітин.

Характерною ознакою ДНК є висока її молекулярна маса. Вона коливається в досить широких межах і залежить, в першу чергу, від того, з якого організму вона виділена. Зараз найкраще вивчена молекулярна маса ДНК вірусів і фагів. Вона вимірюється десятками і сотнями мільйонів дальтон.

Для ДНК, як і для білків, властиві кілька рівнів структур: первинна, вторинна і третинна.

Первинна структура – це порядок (певна послідовність) розміщення нуклеотидів у полінуклеотидних ланцюгах ДНК.

Дослідження хімічного складу нуклеїнових кислот, проведені за останні десятиріччя, показали, що ДНК різних видів організмів відрізняються одна від одної і характеризуються своїм особливим нуклеотидним складом. Разом з цим були встановлені і певні загальні закономірності нуклеотидних співвідношень, що лежать в основі будови різних видів ДНК.

Великих успіхів у вивченні структури ДНК досягли Е.Чаргафф і співробітники його лабораторії, які, використовуючи метод хроматографії,

вперше в 1950 р. визначили нуклеотидний склад ДНК, виділеної з різних організмів. Вони встановили, що співвідношення азотистих основ у ДНК підпорядковується універсальним законамірностям, які одержали назву правил Чаргаффа:

1. Сума пуринових нуклеотидів дорівнює сумі піримідинових нуклеотидів (Пур=Пір, або Пур/Пір = 1).
2. Молярний вміст аденіну (А) дорівнює молярному вмісту тиміну (Т): $A = T$, або $A/T = 1$.
3. Молярний вміст гуаніну (Г) дорівнює молярному вмісту цитозину (Ц): $G = C$, або $G/C = 1$.
4. Відношення суми молярних концентрацій Г і Ц до суми молярних концентрацій А і Т у різних видів ДНК відрізняється між собою.

В одних видах ДНК, зокрема виділених з організму тварин, вищих рослин і багатьох мікроорганізмів, нуклеотиди, що містять аденін і тимін, переважають над нуклеотидами, що містять гуанін і цитозин ($A + T > G + C$). Такі дезоксирибонуклеїнові кислоти називаються ДНК АТ-типу. В інших ДНК, виділених із мікроорганізмів і бактерій, нуклеотиди, які містять гуанін і цитозин, переважають над нуклеотидами, які містять аденін і тимін ($G + C > A + T$). Такі ДНК утворюють ГЦ-тип дезоксирибонуклеїнових кислот. У природі переважають ДНК АТ-типу.

Вторинна структура – це просторова конфігурація полінуклеотидних ланцюгів ДНК.

Модель структури молекули ДНК вперше була запропонована вченими із Кембріджського університету Дж. Уотсоном і Ф. Кріком у 1953 р. Основою для побудови даної моделі стали відомості про хімічний склад ДНК, одержані Е. Чаргаффом, також дані рентгеноструктурного аналізу, одержані Л. Уілкінсом, Р. Гослінгом і Р. Франкліном.

Відповідно до моделі Дж. Уотсона і Ф. Кріка молекула ДНК це подвійна спіраль, тобто складається з двох полінуклеотидних ланцюгів, які закручені правильними витками навколо однієї спіральної вісі. Полінуклеотидні ланцюги ДНК розміщені антипаралельно: 5'-кінець одного полінуклеотидного ланцюга знаходиться навпроти 3'-кінця другого ланцюга. Вони обернені один до одного азотистими основами, а зовні розміщені залишки дезоксирибози і фосфорної кислоти.

Стабілізація подвійної спіралі здійснюється за рахунок водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій. Утворення водневих зв'язків у молекулі ДНК – процес точно визначений. Так, *аденін* одного полінуклеотидного ланцюга завжди зв'язується двома водневими зв'язками з *тиміном* другого полінуклеотидного ланцюга, а *гуанін* – трьома водневими зв'язками з *цитозином*. Ця закономірність називається *комплементарністю* (доповнюваністю).

Двоспіральна ДНК залежно від умов (вмісту води, іонної сили та ін.) може набувати певну конформацію. Значний інтерес становить вивчення таких форм ДНК, як **A**, **B**, **C**. При зміні вологості і катіона солі, ці форми ДНК можуть переходити одна в одну.

В-форма відповідно моделі Дж. Уотсона і Ф. Кріка є формою ДНК, яка найбільш часто зустрічається в живих організмах і в розчинах. Діаметр спіралі ДНК становить 2 нм, період її ідентичності (крок) – 3,4 нм, кожний виток спіралі містить 10 пар нуклеотидів, а кожна пара їх займає 0,34 нм по осі спіралі.

Коли вологість препаратів ДНК складає менше 70%, В-форма перетворюється в А-форму.

А-форма відрізняється від В-форми тим, що пари азотистих основ розміщені не перпендикулярно до осі спіралі, а під кутом 70° . Внаслідок цього крок спіралі зменшується від 3,4 до 2,8 нм. В А-формі ДНК на один виток припадає 11 пар основ, що зумовлює скорочення полінуклеотидного ланцюга приблизно на 25%.

С-форма характеризується більш пухкою і розкрученою структурою. На один виток припадає 9,3 нуклеотидів. Допускають, що в С-формі ДНК знаходиться у складі хроматину.

Вважають, що різні форми ДНК відповідають різним функціональним станам. Так, В-форма характерна для процесів реплікації, А-форма – для транскрипції і С-форма – для упаковки ДНК у складі надмолекулярних структур хроматину і деяких вірусів. Отже, вторинна структура молекули ДНК, очевидно, в першу чергу зв'язана з інформаційними процесами в живих системах, наприклад, А-форма з передачею інформації від ДНК до РНК, В-форма із збільшенням кількості інформації і С-форма – із її збереженням.

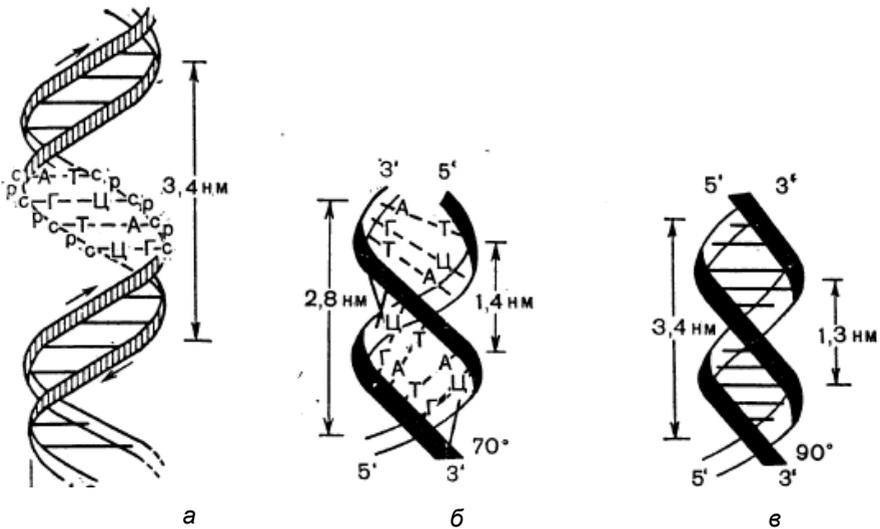


Рис. 2. Схематичне зображення подвійної спіралі ДНК: а – за Дж. Уотсоном і Ф. Кріком, б – А-форма ДНК, в – В-форма ДНК

Виділення ДНК з різних видів організмів та вивчення її структури показало, що дволанцюгові ДНК окремих прокариотів — вірусів, бактерій і клітинних органел — мітохондрій та хлоропластів — не лінійні, а замкнуті в кільце.

Разом з цим необхідно відзначити, що в ряді мікроорганізмів виявлені одностанцюгові ДНК, які мають як лінійну, так і кільцеву структури. Так, наприклад, в окремих вірусів (вірус поліомієліту, дрібний вірус мишей) знайдено лінійні одностанцюгові ДНК. Вони, на відміну від дволанцюгових ДНК,

мають меншу молекулярну масу, з них часто не зберігається відповідне співвідношення між азотистими основами: А – Т і Г – Ц і т. д.

Третинна структура ДНК – це утворені з лінійних дволанцюгових або кільцевих форм ДНК спіралізовані і суперспіралізовані форми.

Третинна структура забезпечує економну упаковку ДНК в хроматині, тобто в комплексі молекул ДНК та специфічних білків, що складає хромосоми.

В еукаріот особливістю суперспіралізованої третинної структури є те, що вона реалізується у формі складних комплексів ДНК з гістоновими і негістоновими білками, РНК та іонами металів.

Основну масу хроматину становлять білки гістони, які за вмістом залишків аргініну і лізину поділяють на п'ять груп: **H1; H2A; H2B; H3; H4**. Взаємодія між гістонами і молекулами ДНК забезпечується за рахунок утворення іонних зв'язків між негативно зарядженими залишками фосфату та позитивно зарядженими групами діаміномонокарбонових амінокислот аргініну і лізину.

В організації хромосом виділяють три рівні, які відображають і рівні третинної структури ДНК. **Перший рівень – нуклеосомний**. До складу нуклеосом входять відрізки двоспіральної молекули ДНК довжиною 120-250 пар основ, H1 і по дві молекули інших груп гістонів (октет гістонів) (рис. 4). Гістоновий октамер утворює ядро нуклеосоми, або нуклеосомний кор, який являє собою диск діаметром 11 нм і товщиною 5,7 нм. На поверхню даного диску намотується відрізок двоспіральної молекули ДНК, утворюючи 1,75 витка. Між коровими ділянками нуклеосоми розміщуються *перемички*, або *лінкери*, які складаються з ділянок молекул ДНК довжиною 30-60 пар основ, зв'язаних з гістоном H1 і негістоновими білками. Довжина лінкерів залежить від типу клітин. Всього близько 90% ДНК входить до складу нуклеосом – решта становить лінкерні ділянки.

Вважають, що нуклеосоми – це фрагменти неактивного хроматину, а лінкерні міжкорові ділянки – фрагменти активного хроматину. Під електронним мікроскопом хроматин має вигляд намистин – кулеподібні нуклеосоми чергуються з ниткоподібними лінкерними міжкоровими ділянками.

Упаковочний коефіцієнт даного рівня структури дорівнює 6-7, тобто внаслідок утворення нуклеосом довжина ланцюга ДНК зменшується в 6-7 разів.

Другий рівень упаковки ДНК у хроматині – спіралізація і укладання нуклеосом у вигляді товстих фібрил – **соленоїдів**. Крок спіралі соленоїду дорівнює 11 нм, на 1 виток припадає 6-10 нуклеосом. В цілому завдяки наявності *першого і другого рівнів упаковки ДНК в хроматині забезпечується зменшення довжини молекули в 40-50 разів*.

Третій рівень упаковки ДНК в хроматині вивчено недостатньо. Вважають, що соленоїди утворюють **суперспіралізовані петлі**, що призводить до зменшення лінійних розмірів ДНК у 200 разів. Суперспіралізовані петлі являють собою домени ДНК, які відповідають, очевидно, одиницям транскрипції і реплікації хроматину. Петлеподібна, доменна організація сприяє укладанню хроматину в метафазних хромосомах в спіральні структури більш високого порядку.

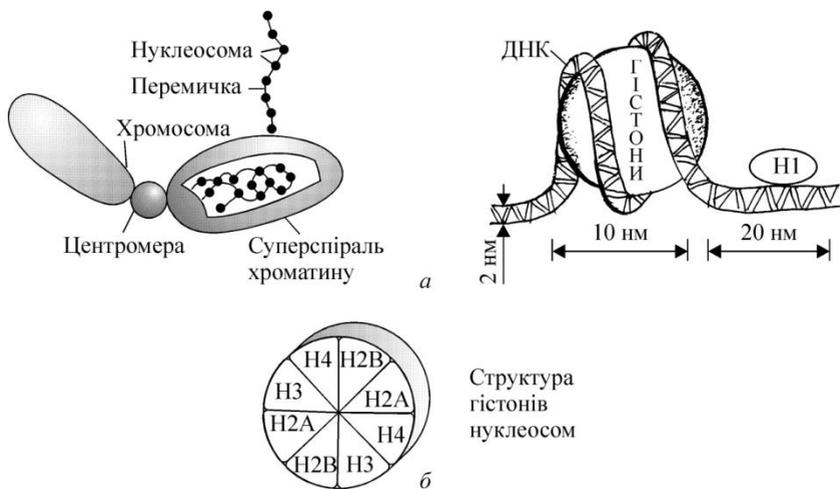


Рис. 3. Схема структурної організації ДНК у хроматині хромосом

3. РИБОНУКЛЕЇНОВА КИСЛОТА (РНК)

Рибонуклеїнові кислоти (РНК) виявлені майже в усіх клітинних фракціях. Основна маса клітинної РНК міститься в цитоплазмі і лише 10-20 % міститься в ядрі.

Рибонуклеїнові кислоти залежно від їх функцій, молекулярної маси і локалізації в клітині поділяють на рибосомні РНК (рРНК), транспортні РНК (тРНК) та інформаційні або матричні РНК (іРНК, або мРНК).

Рибосомні РНК (рРНК) – зосереджені в рибосомах, де вони міцно зв'язані з білком. Їх кількість досягає майже 80% загальної кількості РНК.

Відомо декілька різновидів рРНК з різними коефіцієнтами седиментації: 28S рРНК, 18S рРНК, 5S рРНК, де S – коефіцієнт седиментації, який вимірюється в одиницях Сведберга і визначається швидкістю осідання молекул при ультрацентрифугуванні.

Транспортні РНК (тРНК) – становлять 10-15% всієї РНК клітини. Вони локалізовані в основному у гіалоплазмі клітини, ядерному соку і в безструктурній частині мітохондрій та хлоропластів.

Характерною ознакою тРНК є їх невелика молекулярна маса — 20-35 тис. дальтон. Основна функція тРНК — кодування і перенесення активованих амінокислот до місця біосинтезу білка, тобто до рибосом.

Дослідження тРНК показали, що вони мають високу специфічність. Кожна амінокислота має свою тРНК. Чисельність тРНК перевищує чисельність амінокислот, які беруть участь у побудові білків. Це зумовлено тим, що деякі α-амінокислоти транспортуються не однією, а декількома тРНК. На сьогодні ідентифіковано більше 60 різних тРНК.

Інформаційна, або матрична РНК (іРНК, або мРНК). Інформаційні РНК становлять близько 5% всієї клітинної РНК – їх молекулярна маса коливається від 300 тис. до 4 млн. дальтон. Кожна молекула іРНК під час синтезу в ядрі одержує інформацію від ДНК у формі скопійованої послідовності

азотистих основ і переносить її на рибосоми, де вона реалізується при біосинтезі білка. Кожний білок, який синтезується в клітині, кодується специфічною іРНК або специфічною ділянкою іРНК. іРНК завжди з'єднується іонними зв'язками з білком і утворює рибонуклеопротеїдні частинки.

Вірусні РНК є складовими частинками вірусних і фагових рибоиуклеопротеїдів і несуть всю інформацію, необхідну для розмноження вірусу в клітинах господаря. Їм властива висока молекулярна маса, яка досягає декількох мільйонів дальтон. Окремі віруси мають дволанцюгові РНК.

Для РНК, як і для ДНК, характерні декілька рівнів структур.

Первинна структура. Основою хімічної будови РНК є полінуклеотиди різної довжини. Послідовність чергування залишків відповідних нуклеотидів в ланцюгах становить *первинну структуру РНК*.

Дослідження первинної структури різних видів РНК свідчить про те, що для них характерна в основному така ж закономірність у співвідношеннях нуклеотидів, як і для ДНК. При цьому слід мати на увазі, що молекула РНК відрізняється від молекули ДНК: замість тиміну в ДНК у РНК присутній урацил; дезоксирибоза замінена на рибозу; молекула РНК на відміну від ДНК складається (окрім незначної кількості винятків) із одного полінуклеотидного ланцюга; сума пуринових основ у РНК не відповідає сумі піримідинових; молекула РНК менша за молекулу ДНК, але кількість РНК у клітині більша, аніж ДНК; РНК представлена декількома різновидами молекул, які синтезуються на матриці ДНК.

Особливістю первинної структури іРНК еукаріотичних організмів є наявність в їх складі структур, які не кодуються відповідним геном, а побудовуються до неї після її транскрипції. Так, на 3'-кінці полінуклеотидного ланцюга більшості іРНК виявлена послідовність полі-А довжиною 150-200 нуклеотидів. Дана послідовність приєднується до 3'-кінця після транскрипції іРНК в ядрі за участю ферменту полі-А-полімерази. На 5'-кінці еукаріотичних іРНК розміщується інша структура, так званий «кел» (від англ. *cap* — шапочка). У більшості випадків він містить 2-3 нуклеотиди. Дані нуклеотиди приєднуються до 5'-кінця також після транскрипції іРНК.

При вивченні первинної структури тРНК встановлено, що вони побудовані переважно із 70-90 нуклеотидних залишків і мають певні спільні ознаки. Так, на 5'-кінці полінуклеотидного ланцюга у переважній більшості випадків знаходиться залишок гуанозинмонофосфорної (ГМФ), а на 3'-кінці – фрагмент, який складається з двох залишків цитидинмонофосфорної кислоти і одного залишку аденозинмонофосфорної кислоти (ЦМФ, ЦМФ, АМФ). Між ними в полінуклеотидному ланцюгу в точно визначеній послідовності розміщені всі інші пуринові і піримідинові нуклеотидні залишки.

Вторинна структура. РНК, на відміну від ДНК, побудована з одного полінуклеотидного ланцюга, для якого властива своєрідна спіралізація. Полінуклеотидний ланцюг РНК закручується сам на себе, утворюючи водневі зв'язки між азотистими основами аденін – урацил і гуанін – цитозин.

Характерною особливістю вторинної структури РНК є те, що полінуклеотидний ланцюг спіралізований не повністю. Крім того, на відміну від ДНК, спіралізація окремих ділянок полінуклеотидного ланцюга РНК менш досконала.

Кількість і величина спіралізованих ділянок в межах одного ланцюга для різних РНК різні. Низький ступінь спіралізації властивий для мРНК, що,

очевидно, зв'язано з їх функцією в процесі біосинтезу білка. Наявність значної кількості спіралізованих ділянок затруднювало би виконання ними функцій матриці при синтезі поліпептидного ланцюга на рибосомах. Разом з цим на початку полінуклеотидних ланцюгів окремих мРНК виявлені значні спіралізовані ділянки. Можливо, що складна просторова конформація 5'-кінця мРНК необхідна для розпізнання її генетичної інформації факторами ініціації під час трансляції.

Вищий ступінь спіралізації (більше 50 %) властивий для тРНК і рРНК.

Вивчення вторинної структури тРНК свідчить, що вона нагадує форму листка конюшини, в якому розрізняють такі основні ділянки (рис. 5):

- 1) центральна ділянка (акцепторна ділянка), яка відповідає за приєднання залишків амінокислот. В усіх тРНК вона однакова і закінчується триплетом – ЦМФ, АМФ;
- 2) антикодонава петля містить антикодон – триплет з нуклеотидним чергуванням, комплементарним кодону мРНК. Нуклеотиди, які утворюють антикодон, завжди розміщені на середині петлі;
- 3) псевдоуридилова петля (Т-Ψ-Ц-петля) завжди містить мінорний нуклеотид – псевдоуридил (Ψ), який зв'язаний також з мінорною основою для РНК – тиміном. Вважають, що саме ця петля відіграє важливу роль у взаємодії тРНК з рибосоною;
- 4) дигідроуридилова петля, очевидно, має значення в розпізнанні тРНК ферментом – аміноацилсинтетазою;
- 5) додаткова петля (S-ділянка), біологічна роль якої вивчена недостатньо. У деяких тРНК вона відсутня.

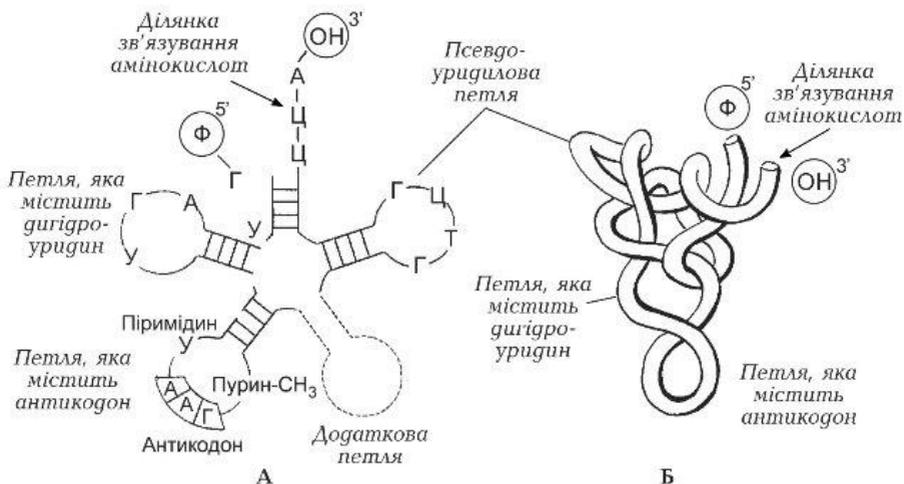


Рис. 4. Вторинна (А) та третинна (Б) структури тРНК

Третинна структура. Третинна структура РНК характеризується більшою укомплектованістю в просторі і може мати вигляд одиночного ланцюга, компактного стрижня або клубка.

Усі три структури можуть переходити одна в одну в залежності від умов навколишнього середовища - концентрації солей, рН, температури і т.п.

4. ВЛАСТИВОСТІ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Нуклеїнові кислоти – це речовини білого кольору, волокнистої будови, погано розчинні у воді. Їх солі (лужних металів) добре розчинні у воді. Нуклеїнові кислоти розчиняються також в розчинах солей: РНК – в розбавлених, а ДНК – в більш концентрованих.

Молекулярна маса ДНК – від 0,5 млн до 20 млн і вище, а її молекула складається з багатьох тисяч нуклеотидів; молекулярна маса РНК – від 30 тис. до 2 млн, а нуклеотидів у молекулі – до 4-6 тис.

Завдяки негативному заряду молекули нуклеїнових кислот рухаються в електричному полі. Нуклеїнові кислоти міцно зв'язують іони металів, зазнають модифікації шляхом алкілування і дезамінування. При фізіологічних значеннях рН усі нуклеїнові кислоти є поліаніонами й оточуються протиіонами з білків і неорганічних катіонів.

Усі нуклеїнові кислоти здатні поглинати світло в ультрафіолетовій частині спектра близько 260 нм. Порухення нативності нуклеїнових кислот супроводжується підвищенням поглинання світла – має місце так званий гіпохромний ефект. Величина гіпохромності – найважливіша ознака ступеня спіралізації нуклеїнових кислот. У зв'язку із цим *гіпохромний ефект* використовується для вивчення процесів денатурації і ренатурації нуклеїнових кислот, а також гібридизації спіралей ДНК-РНК тощо.

Нуклеїнові кислоти мають здатність до **денатурації** та **ренатурації**.

Денатурація полягає в розриві водневих і ван-дер-ваальсових зв'язків, в деспіралізації та розходженні полінуклеотидних ланцюгів ДНК і двоспіральних ділянок молекул РНК. Денатурацію нуклеїнових кислот можуть викликати кислоти, луги, спирти, висока температура тощо. Внаслідок денатурації кожний із полінуклеотидних ланцюгів молекули нуклеїнової кислоти набуває форму безладного клубка. Тому даний процес ще називають переходом спіраль – клубок.

Під час денатурації нуклеїнових кислот настає такий момент, коли кількість спіралізованих ділянок дорівнює кількості неспіралізованих. Температуру, при якій настає така рівновага, називають *температурою плавлення*.

Для вивчення біологічної ролі і функції ДНК в організмі важливе значення має вияснення причин і умов, за яких може відбуватися відновлення нативної двоспіральної структури ДНК. В результаті досліджень було встановлено, що при підвищенні температури приблизно на 5 °С вище температури плавлення ланцюги денатурованої ДНК розходяться. Якщо розчин таких ДНК різко охолодити, то полінуклеотидні ланцюги так і залишаються розділеними, а якщо охолодження такого розчину проводити поступово, то внаслідок рекомбінації відбувається ренатурація (відновлення) подвійної спіралі ДНК.

Ренатурація – це відновлення біологічних та фізико-хімічних властивостей нуклеїнових кислот. Процес ренатурації молекул ДНК залежить від їх розмірів, кількості азотистих пар Г-Ц та інших факторів. Так, ДНК вірусів і бактерій, яка за своєю будовою більш проста, ніж ДНК вищих організмів, піддається ренатурації значно легше.

Полінуклеотидні ланцюги денатурованих ДНК можуть взаємодіяти на основі принципу комплементарності з одноланцюговими РНК або ДНК, які належать іншим організмам. Це процес *молекулярної гібридизації*.

У зв'язку з наявністю в азотистих основах і пентозах нуклеїнових кислот різних функціональних груп вони можуть вступати в різні хімічні реакції. Це призводить до видозміни основ, що впливає на структуру і функції нуклеїнових кислот.

Так, наприклад, аміногрупи азотистих основ можуть взаємодіяти з азотистою кислотою. При цьому замість групи $-NH_2$ утворюється група $-OH$.

Нуклеїнові кислоти під дією кислот піддаються гідролізу. Глікозидні зв'язки в ДНК більш лабільні, ніж в РНК. Нуклеотиди, які містять пуринові основи, піддаються гідролізу легше, ніж нуклеотиди з піримідиновими основами. Отже, ковалентна структура молекул нуклеїнових кислот досить стійка, що дає можливість їм виконувати функцію генетичного матеріалу.

ДНК має властивість виправляти пошкоджені ділянки – здійснюється **репарація**. Репарація здійснюється за участю спеціальних механізмів («ремонтних систем»). Для виправлення пошкоджень ДНК в живих системах існує декілька механізмів, зокрема фотореактивація, ексцизійна і постреплікативна репарації. Фотореактивація відбувається внаслідок дії світла. При цьому відбувається активація фотореактивного ферменту (ДНК-фототази), який розщеплює димери на мономери і відновлює водневі зв'язки між тиміном і аденіном комплементарних полінуклеотидних ланцюгів ДНК. Ексцизійна і постреплікативна репарації не залежать від наявності світла і тому їх ще називають темною репарацією. Ці два види репарації дещо між собою подібні.

Контрольні запитання:

1. Хімічний склад нуклеїнових кислот.
2. Загальна будова нуклеїнових кислот.
3. Первинна структура нуклеїнових кислот.
4. Нуклеотидний склад ДНК і РНК.
5. Правила Е. Чаргаффа.
6. Вторинна структура ДНК.
7. Характеристика В, А, С-форм ДНК.
8. Третинна структура ДНК.
9. Рівні суперспіралізації ДНК в хроматині.
10. Фізико-хімічні властивості ДНК.
11. Структура і властивості транспортних, рибосомальних і матричних РНК у еукаріот і прокаріот.
12. Вторинна і третинна структури рибонуклеїнових кислот.
13. Властивості нуклеїнових кислот.

Тема: СТРУКТУРА ГЕНА І ГЕНОМУ

План

1. Будова гена.
2. Особливості будови вірусних геномів.
3. Структурна організація геному прокаріот.
 - 3.1. Особливості структурної організації геному прокаріот.
 - 3.2. Цитоплазматичні генетичні структури геному прокаріот.
 - 3.3. Мобільні генетичні елементи геному прокаріот (IS-елементи і транспозони).
4. Організація геному еукаріот.
 - 4.1. Структурна організація геному еукаріот
 - 4.2. Повтори в молекулі ДНК еукаріот
 - 4.3. Організація генів на структурі геномів еукаріот
 - 4.4. Геном ДНК-вмісних цитоплазматичних структур
 - 4.6. Геном людини

1. БУДОВА ГЕНА

Термін ген було введено у 1909 р. датським ученим Вільгельмом Йохансенем і відносився до гіпотетичної одиниці інформації, що регулює спадковість індивідуальних ознак живого організму. Пізніше, коли була відкрита хімічна структура генів, даний термін отримав іншу інтерпретацію. Під геном розумілась ділянка ДНК, яка представляє собою послідовність нуклеотидів і в якій закодована інформація про послідовність нуклеотидів в іншій нуклеїновій кислоті (наприклад в РНК) або амінокислотну послідовність в білку.

В ході проекту ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements – енциклопедія елементів ДНК* – відкритий міжнародний науковий проект, спрямований на пошук та систематичне дослідження усіх функціональних елементів геному людини та модельних організмів) були виявлені по всьому геному складні елементи регуляції і транскрипції, які, не дивлячись на велику віддаленість один від одного, здатні взаємодіяти між собою і одночасно кодувати декілька функціональних продуктів (білки і різноманітні типи РНК). В зв'язку з цим з'явилося нове визначення гену.

Ген – це ділянка ДНК, яка є необхідною і достатньою для повноцінного синтезу функціонального продукту.

Ділянка ДНК, яка може вважатися геном, має містити кодуючу послідовність, де записана інформація про продукт, а також певний набір регуляторних елементів послідовності, від яких залежить запуск / блокування процесу транскрипції, шлях зчитування інформації тощо.

Згідно з визначенням міжнародного консорціуму онтології послідовностей (Sequence Ontology Consortium), **ген – це певна визначена зона послідовності ДНК, яка відповідає одиниці спадковості та асоційована з регуляторними ділянками, ділянками, що транскрибуються, та / або іншими функціональними ділянками послідовності.**

Одним із найважливіших типів продуктів транскрипції генів є мРНК, які далі використовуються як матриці в процесі трансляції для синтезу білків. У цьому випадку кінцевим продуктом гена є білок. Велика кількість генів кодує різноманітні молекули РНК, які не піддаються трансляції і є кінцевими

продуктами: рРНК, тРНК, малі ядерні РНК; малі ядерцеві РНК; мікро-РНК, молекули РНК, які є компонентами деяких ферментів; інші види РНК, не для всіх із яких з'ясовано їхні функції.

Кодуючі гени, що транскрибуються, об'єднуються під назвою **структурних генів**. Гени, які регулюють роботу структурних генів, називаються **регуляторними** і, як правило, не транскрибуються.

Кількість регуляторних генів та їх функції до справжнього часу не відомі. Координована робота (експресія) великого числа генів можлива завдяки наявності регуляторних механізмів, що визначають місце, час і рівень експресії конкретного гена або групи генів. Щоб експресія гена була регульованою, він повинен містити індивідуальну (регуляторну) систему. Тому будь-який ген складається з двох основних функціональних частин (послідовностей нуклеотидів) – регуляторної та структурної (кодуючої).

До регуляторної частини відносяться:

- **промотори** – ділянки гена, до яких приєднується РНК-полімераза для початку процесу транскрипції; розташовані на початку гена – 5'-кінці;
- **енхансери** (англ. *enhancer* — підсилювач) – ділянки ДНК, які посилюють процес транскрипції з найближчого до них промотору;
- **сайленсери** (англ. *silencer* — глушник) – ділянки ДНК, які пригнічують процес транскрипції з найближчого до них промотору;
- **інтрони** – некодуючі послідовності нуклеотидів, ділянки ДНК, які розташовані між кодуючими послідовностями нуклеотидів – екзонами;
- **термінатор** – ділянка ДНК, яка термінує (завершує) процес транскрипції; розташована на 3'-кінці гену.
- **інсулятори** (англ. *insulate* – ізолювати) – регуляторні елементи, які блокують взаємодію між енхансером і промотором, якщо знаходяться між ними. Інсулятор блокує здатність енхансеру активувати транскрипцію з даного промотору. У вищих еукаріот енхансер може активувати промотор на відстані, яка досягає декілька сотен тисяч пар нуклеотидів, що є однією з особливостей регуляції транскрипції вищих еукаріотів.

До структурної частини відносяться:

- **екзони** (кодуючі послідовності нуклеотидів);
- **невеликі ділянки інтронів** (в деяких випадках, якщо вони містять в собі гени мікроРНК).

Сукупність генів організму, поряд з іншими послідовностями ДНК становить його **геном**. Термін „геном” було запропоновано Г. Вінклером (1920 р.) для означення всієї сукупності генів у гаплоїдному наборі хромосом, щоб розмежувати його з поняттям „генотип”, оскільки для гаплоїдних клітин і організмів вони, по суті, є синонімами. Отже, **геном – це вся спадкова генетична інформація організму, набір генів, зосереджених на гаплоїдному наборі хромосом**.

Як уже з'ясували вище, геном включає як інформативні (екзони), так і неінформативні (інтрони) ділянки, розміри та кількість яких у різних організмів відрізняється. Так, у вищих організмів відношення між екзонами та інтронами складає 1:9. Наявність неінформативних ділянок зумовлює «надлишковість» геному цих організмів, суть якої в тому, що фізична довжина геномної ДНК

значно перевищує розміри генів, які необхідні для кодування видоспецифічних білків організму. Крім того, ядерна ДНК еукаріот містить велику кількість різних повторів нуклеотидів, мікро- та мінісателітів, диспергованих елементів, ендегенних «реліктових» ретровірусів та інших інтегрованих структур. Це стосується, зокрема, геному людини, в якому загальна довжина неінформативних ділянок більше, ніж на порядок перевищує довжину інформативних, які кодують первинну структуру відповідних генних продуктів. Феномен «надлишковості» геному особливо чітких проявів набув після завершення програми «Геном людини» (секвенування генів та їх картування). Виявилось, що в гапліідному наборі хромосом людини міститься 25-30 тис. генів, що кодують білки, кожен з яких включає в середньому 100-120 тис. нуклеотидних пар. Якщо врахувати загальну кількість нуклеотидних пар у геномі людини (3,2 млрд.), то це складає близько 2% його структури.

Певні структурно-функціональні особливості характерні і для геному представників інших таксономічних груп організмів, а також вірусів та бактеріофагів. Так, геном прокаріотичних клітин і особливо вірусів організований компактніше, має менші розміри, а відношення інформативних ділянок до неінформативних складає 9:1. Молекули ДНК чи РНК, які є основою їх геному, можуть мати не лише лінійну, але і кільцеву форму. У вірусів геном зосереджений як на ДНК, так і на РНК. Клітини вищих організмів містять, як правило, два види нуклеїнових кислот: ДНК і РНК, які виконують специфічні функції збереження, передачі та реалізації генетичної інформації.

У переважній більшості нижчих і вищих організмів генетична інформація зосереджена не лише в структурі ДНК хромосом ядерного апарату чи ядерної зони цитоплазми, але і в позахромосомних генетичних структурах. Так, у бактерій позахромосомні генетичні структури представлені плазмідами та деякими помірними вірусами (бактеріофагами), а у клітинах еукаріот, відповідно, цитоплазматичною ДНК, зосередженою в мітохондріях та пластидах. Отже, у зв'язку з особливостями організації генетичних структур у представників різних таксономічних груп, сформулювати однозначне, загальне визначення геному практично неможливо. Тобто, при визначенні цього поняття слід враховувати цілий ряд особливостей, зумовлених будовою та розмірами геномів, їх структурною організацією, а також рівнем еволюційного розвитку організмів.

Враховуючи велику кількість алельних варіантів генів та чисельні повтори нуклеотидів, які присутні в генофонді більшості популяцій, мова може йти лише про певну генетичну структуру, яка включає не лише гени, а й інші складові компоненти, локалізовані в хромосомах, або в їх аналогах. Це, в першу чергу, некодуючі послідовності, регуляторні ділянки, різні повтори нуклеотидів.

Згідно з сучасними уявленнями, **геном – це сукупність генів, зосереджених в гапліідному наборі хромосом та позахромосомних ДНК-вмісних структурах певної таксономічної групи живих організмів, а також у складі носіїв генетичної інформації (ДНК чи РНК) доклітинних форм органічного світу (вірусів та бактеріофагів).**

У вищих організмів після запліднення проходить об'єднання двох геномів (батьківського і материнського) в диплоїдній зиготі, з якої розвивається зародок і формується новий організм з власним набором генів. Набір генів у

диплоїдному наборі хромосом соматичних клітин організму складає його **генотип**.

Щодо генів, за сучасними уявленнями вони:

- можуть бути локалізовані в структурі ДНК чи РНК (у РНК-геномних вірусів) і включають чергування нуклеотидів, в лінійній послідовності яких, закодована інформація про первинну структуру певних генних продуктів та видоспецифічних білків;
- в структурі хромосом, чи їх аналогів, розміщені лінійно: на одній хромосомі може бути локалізовано кілька генів;
- в клітинах еукаріот транскрибуються з утворенням високомолекулярних попередників, які зазнають специфічної посттранскрипційної модифікації;
- мають мозаїчну будову: на їх структурі інтрони чергуються з екзонами;
- можуть бути розміщені на різних ділянках однієї хромосоми, або навіть на різних хромосомах;
- у вигляді, так званих, рухливих генетичних елементів, виявлених у структурі генів вищих і нижчих організмів, здатні в інтактній формі транслюкуватись з однієї ділянки геному до іншої.

2. ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ВІРУСНИХ ГЕНОМІВ

Віруси містять одну чи декілька молекул одного з видів нуклеїнових кислот (ДНК або РНК), які оточені білковою оболонкою – капсидом (від лат. *capsa* – футляр). Як правило, нуклеїнові кислоти, в яких зосереджений геном вірусів, локалізовані в центрі вірусних часточок, а білкові молекули утворюють специфічні структури, для яких характерна гексагональна, кубічна чи гвинтова симетрія.

Вірусні нуклеїнові кислоти можуть бути організовані у вигляді одно-, дволанцюгових, кільцевих чи лінійних форм. У РНК-геномних вірусів молекули РНК, як правило, мають лінійну форму, є одноланцюговими і значно менші розміри, ніж у ДНК-геномних. Молекулярна маса вірусних ДНК знаходиться в межах від 1×10^6 до 200×10^6 Да, а РНК – від 1×10^6 до 15×10^6 Да. Кількість нуклеотидів у складі ДНК- і РНК-геномних вірусів та бактеріофагів теж різна – від десятків до сотень тисяч. Так, до складу геному бактеріофага Т4 входять 160 тис. нуклеотидних пар. У геномах вірусів гени локалізовані в одній молекулі РНК чи ДНК або в декількох сегментах молекул. Тобто, для них характерний *сегментований геном*, який не зустрічається в представників інших таксономічних груп.

Особливістю геному більшості вірусів є те, що він надзвичайно компактний: містить невелику кількість генів, які необхідні для самовідтворення вірусів в інфікованій клітині. Решту функцій у вірусних часточках виконують генні продукти, що синтезуються в генетичному апараті інфікованої клітини. Так, геном бактеріофага Т4 містить 150 генів, а вірусу віспи (ДНК-геномний) має 250 генів. Геноми дрібніших ДНК-геномних вірусів, зокрема, вірусу приматів SV-40 і бактеріофага ϕ X-174 (читається «фі 10-174») несуть значно менше генетичної інформації і, в більшій мірі, залежать від ферментних систем клітин реципієнтів. Геном бактеріофага Q β (РНК-геномний) містить лише 4 гени, а бактеріофага MS 2 включає 3 гени, які розташовані тандемно і розділені спейсерами. Для цих вірусів важливою є наявність генів, що кодують

ферменти синтезу геномних нуклеїнових кислот, оскільки регуляторні механізми клітин-реципієнтів можуть гальмувати їх реплікацію. Вміст нуклеїнових кислот у геномі різних вірусів, зазвичай, варіює в широких межах, так, вірус грипу містить лише 1% РНК, а вірус поліомієліту – 24%. Одночасно з цим, у деяких бактеріофагів вміст нуклеїнових кислот сягає 50%.

Отже, геном вірусів має такі специфічні структурно-функціональні особливості:

- геном вірусів зосереджений в одному з видів нуклеїнових кислот: ДНК чи РНК;
- при невеликих розмірах, вірусні геноми несуть інформацію про значну кількість різних білків, тобто існує невідповідність між об'ємом інформації та обмеженими розмірами геномів. Така невідповідність нівелюється особливістю зчитування генетичної інформації внаслідок «зсуву рамки зчитування»: одна і та ж ділянка вірусного геному може містити різну інформацію, а також локалізацією генів всередині інших генів. Крім того, один і той же ген може зчитуватися з різних *точок початку реплікації (ori)* і, відповідно, кодувати різні іРНК, які виконують роль матриць для синтезу специфічних білків.
- на структурі геному практично відсутні некодуючі послідовності нуклеотидів;
- РНК-геноми можуть бути сегментовані і несегментовані;
- геномні РНК чи ДНК вірусів можуть мати лінійну або кільцеву форму;
- для геному вірусів характерне явище перекривання генів (гени в генах);
- у РНК-геномних вірусів молекули РНК процесовані і можуть бути як носіями генетичної інформації, так і матрицями для синтезу вірусних білків;
- для деяких ДНК- та РНК-геномних вірусів еукаріотичних клітин (саркоми Рауса, SV 40) характерна мозаїчна інтрон-екзонна структура генів;
- генетична інформація ДНК-геномних вірусів може бути закодована в обох ланцюгах ДНК. В цьому випадку, ланцюги транскрибуються у протилежних напрямках;
- геном бактеріофагів інколи має оперонну організацію. Гени в опероні згруповані в тандемні блоки і мають спільні механізми регуляції;
- для регуляції функцій геному бактеріофагів характерне явище антитермінації;
- у зв'язку з невеликими розмірами геномів для деяких вірусів і бактеріофагів характерна транскрипція із зсувом рамки зчитування.

3. СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМУ ПРОКАРІОТ

3.1. Особливості структурної організації геному прокаріот

Генетичний матеріал клітин прокаріот зосереджений на структурі ДНК – нуклеоїді (аналог ядра еукаріотичних клітин). Крім ДНК нуклеоїду, у клітинах бактерій може бути присутня також цитоплазматична ДНК, що входить до

складу плазмід – невеликих за розміром, кільцевих або лінійних дволанцюгових молекул, які реплікуються незалежно від хромосомної ДНК і забезпечують цитоплазматичну спадковість.

Отже, геном бактерій являє собою сукупність генів, зосереджених в нуклеоїді та цитоплазматичних ДНК-вмісних структурах.

Порівняно проста будова геному бактерій зумовлена особливостями їх життєвого циклу, який, у значній мірі, залежить від функціонування геному клітини-хазяїна.

Особливістю геному бактерій є те, що їх геномна ДНК не асоційована з білками і не має нуклеосомного рівня організації. Компактизація бактеріальної ДНК відбувається внаслідок спіралізації полінуклеотидного ланцюга та утворення петлеподібних структур, кількість яких може складати до 80 на одну молекулу.

Бактеріальні геноми можуть бути різні за розміром, який виражають кількістю нуклеотидних пар чи нуклеотидів. У бактерії *E. coli* в геномі налічується $3,2 \times 10^6$ нуклеотидних пар. Молекулярна маса дволанцюгової кільцевої молекули ДНК бактерії *E. coli* $2,5 \times 10^9$ Да. Геномна ДНК *Mycoplasma genitalium*, однієї з найдрібніших прокаріотичних клітин, містить 580 000 нуклеотидних пар.

Важливою особливістю геномів прокаріот є їх висока інформативність: відношення інформативних ділянок до неінформативних складає 9:1. В структурі геному бактерії *Mycoplasma genitalium* (580 тис. нуклеотидних пар) близько 90% складають кодуючі чергування нуклеотидів, які входять до складу 479 генів, локалізованих на, так званих, відкритих рамках читування (ORF, від англ. *open reading frame*), де закодована інформація про первинну структуру генних продуктів. У *E. coli* кодуючі послідовності нуклеотидів складають більше 88% геному бактерії.

Набір генів, які входять до складу геномів бактеріальних клітин, контролюють всі процеси їх життєдіяльності: самовідтворення структури, енергообмін, транспорт метаболітів та іонів, перебіг процесів транскрипції і трансляції. Існує поняття про, так званий, *консервативний або мінімальний набір генів* прокаріотичних клітин, необхідних для забезпечення цих процесів.

Особливістю геному прокаріот є його оперонна організація. Тобто, генетична інформація у клітинах прокаріот зосереджена на структурно-функціональних ділянках геному, які мають назву **оперонів**. **Оперон являє собою групу функціонально пов'язаних, скоординовано експресованих генів, об'єднаних у структурно-функціональні одиниці та обмежені з обох боків специфічними регуляторними ділянками.**

Оперон являє собою транскрипційну одиницю, тому його інколи називають **транскриптомом або одиницею транскрипції**.

Транскриптон – це генетична структура прокаріотичних клітин, що контролює прояви фенотипових ознак і містить чергування нуклеотидів, які визначають первинну структуру певних генних продуктів. У клітинах прокаріот функціонують оперони, що кодуєть тРНК, рРНК, а також змішані оперони, які містять гени тРНК та іРНК. Оперони прокаріотичних клітин є **поліцистронними** (цитрон – термін, який є синонімом гена, що означає ділянку ДНК, яка відповідає за синтез певного білка; не використовується для

еукаріот) і кодуєть не один, а кілька генних продуктів: включають кілька кодуєчих ділянок.

Оперон прокаріот включає: промотор, ген-оператор, цистрони (кодуєчі послідовності нуклеотидів) та термінатор, які знаходяться під регуляторним контролем гена-регулятора. На гені-регуляторі транскрибуються іРНК специфічних регуляторних білків, що контролюють функціонування гена-оператора. Ген-регулятор локалізований на 5'-кінці ДНК та відокремлений від оперону 5'-нетранслюєчою послідовністю нуклеотидів (5'-НП). На 3'-кінці оперону міститься термінуюча ділянка, необхідна для завершення транскрипції. Ця ділянка транскрибується, але не транслюється. Завершує оперон 3'-нетранслюєча послідовність нуклеотидів. Таким чином, оперон з двох боків обмежений 5'- і 3'-нетранслюєчими послідовностями нуклеотидів (рис. 5).



Рис. 5. Будова оперону прокаріот: ГР – ген-регулятор, 5'-НП – 5'-нетранслюєчі послідовності, П – промотор, ГО – ген-оператор, КП – кодуєчі послідовності, Т – термінатор, 3'-НП – 3'-нетранслюєчі послідовності

Важливою ділянкою оперону прокаріот є **промотор**, необхідний для ініціації транскрипції генів. На структурі промотора знаходяться дві специфічні послідовності нуклеотидів: мінус 35 (-35) та мінус 10 (-10) послідовності, а також стартовий кодон (+1). Перша, (-35) послідовність, розташована на відстані 35 нуклеотидних пар від стартової точки транскрипції (+1) і забезпечує зв'язування ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази, який пізнає місце початку транскрипції. До складу (-35) послідовності входить 9 пар нуклеотидів. Друга (-10) послідовність, або **бокс Прибнова**, знаходиться на відстані 10 нуклеотидних пар від точки старту транскрипції і містить 6-9 пар нуклеотидів (так званий ТАТА-мотив – містить послідовність 5'-ТАТААА-3'). Його функція – локальне розкручування хеліксу ДНК та створення умов для початку транскрипції – утворення відкритого промоторного комплексу.

Після промоторної ділянки на структурі оперону розміщений **ген-оператор**, який контролює функціонування цистронів і регулюється білками-репресорами, синтез яких відбувається на гені-регуляторі. Ці білки можуть контролювати функціонування одного чи кількох оперонів. Залежно від того, в якому стані синтезується білок-репресор, існують **індуцибельні і репресибельні оперони** прокаріот, що відрізняються механізмом регуляції їх функціональної активності.

Далі, в опероні прокаріот розміщені **кодуєчі послідовності нуклеотидів**, або **цистрони**, які несуть інформацію про первинну структуру генних продуктів:



Цистрони в поліцистронних геномах бактерій, що кодують деякі види РНК, можуть бути розмежовані *спейсерами*. **Спейсери** (від англ. *space* – проміжок) – беззмістовні, некодуючі чергування нуклеотидів, які розділяють цистрони. Вони можуть зв'язувати регуляторні білки і забезпечувати спіралізацію молекул геномної ДНК. Завершує оперон прокариот ділянка, яка необхідна для термінації транскрипції – **термінатор**. Ця ділянка містить чергування нуклеотидів, що є сигналами закінчення транскрипції генів оперону. Транскрипційні термінатори містять *поліндромні чергування нуклеотидів* (читаються однаково в обох напрямках), які на транскрибованій РНК зумовлюють формування специфічних структур (шпильок). Після цих структур в РНК-транскрипті розміщені 5-6 залишків уридилових нуклеотидів, комплементарних до аденилових нуклеотидів ДНК-матриці. Оскільки водневі зв'язки між АУ-парами значно слабші, порівняно із зв'язками в АТ-парах, вони легко руйнуються, що і зумовлює відокремлення іРНК від матриці та термінацію транскрипції.

Кілька оперонів в структурі геному прокариот можуть утворювати модулі, які містять кластери генів, що кодують генні продукти із специфічними функціями. Зчеплені гени, або цистрони, які входять до складу цих оперонів, транскрибуються у вигляді полігенного або поліцистронного транскрипту. Оперони, що контролюють синтез генних продуктів, які забезпечують виконання у клітині споріднених функцій, мають однотипні регуляторні ділянки та подібним чином реагують на специфічні сигнали регуляції.

У деяких випадках гени, які контролюють синтез споріднених генних продуктів, можуть бути локалізовані не в одному, а в кількох оперонах. Зокрема, гени, що кодують білки рибосом, як правило, організовані у *множинні оперони*, до складу яких можуть входити також гени, що кодують інші білки, які забезпечують перебіг окремих етапів транскрипції і трансляції.

Оперонна організація геному бактеріальних клітин забезпечує скоординовану експресію і узгоджену регуляцію генів та можливість їх транслокації (переміщення) в геномі внаслідок горизонтального перенесення між спорідненими і неспорідненими бактеріями, а також клітинами про- та еукаріот, що є важливим чинником еволюції. Гени, що з'являються в геномі внаслідок горизонтального перенесення, мають назву *ксенологів*.

Структуру геному прокариот можна розглянути на прикладі бактерії *E.coli*. У геномі бактерії функціонує кілька оперонів: лактозний, арабінозний, триптофановий та інші, кожен з яких забезпечує синтез певних генних продуктів, необхідних для функціонування бактеріальних клітин.

Лактозний оперон (*lac*-оперон) зосереджений на окремому фрагменті хромосоми та містить гени, під контролем яких знаходиться синтез іРНК трьох ферментів, необхідних для метаболізму лактози (молочного цукру): β -галактозидази (ген *lacZ*), β -галактозидпермеази (ген *lacY*) і β -

галактозидтранс ацетилази (ген *lacA*). *Lac*-оперон включає промоторну ділянку (84 нуклеотидних пар), оператор (38 нуклеотидних пар) та гени вказаних ферментів, які відповідно містять 3700 та по 900 нуклеотидних пар, тобто всього близько 5600 нуклеотидних пар:

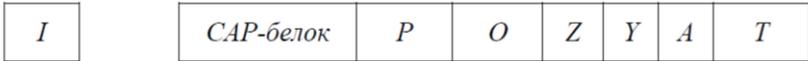


Рис. 6. Основні компоненти оперону: *I* — ген-регулятор; *SAP-білок* — білок, що здійснює позитивну регуляцію, необхідний для ініціації транскрипції оперону, *P* — промотор; *O* — оператор; *Z*, *Y*, *A* — структурні гени; *T* — ген-термінатор

3.2. Цитоплазматичні генетичні структури геному прокаріот

Геном бактерій, крім геномної ДНК, включає також цитоплазматичні ДНК-вмісні структури, здатні до автономної реплікації – **плазмід**и. Плазмід

містять власні гени, які є необов'язковими для бактерій, а також гени, необхідні лише при існуванні їх за певних умов чи в певному середовищі. Геном багатьох плазмід містить гени, організовані у специфічні модулі: кон'югації, реплікації, стійкості до певних антибіотиків та інші. Типи плазмід різняться між собою за структурою та специфічними функціями, наявністю певних модулів, а також особливостями реплікації і транслокації – перенесення від клітин донора до клітин реципієнта.

Зокрема, поширеними є плазмід

и, які містять модулі, що зумовлюють стійкість бактерій до одного чи кількох антибіотиків (так звані, фактори резистентності або R-фактори). Ці плазмід

и порівняно великих розмірів і можуть стимулювати кон'югацію бактерій та поширюватися в бактеріальних популяціях. Молекулярна маса ДНК плазмід знаходиться в межах $2 \times 10^4 - 3,2 \times 10^5$ Да. Як правило, у клітині присутні плазмід

и одного виду. Геном типової кон'югативної R-плазмід

и містить ДНК довжиною 100 тис. нуклеотидних пар, яка організована в вигляді замкненого кільця. Більше 50% нуклеотидних послідовностей геному R-плазмід складають гени кон'югації і реплікації, а також гени, що визначають стійкість до антибіотиків.

У багатьох видів бактерій зустрічаються **бактеріоцинні плазмід**и, які продукують специфічні білки бактеріоцини (коліцини). Бактеріоцини знищують бактерії того ж або близького виду, що не містять плазмід (коліцини бактерії *E. coli*). Плазмід

и, що продукують білки-коліцини, містять специфічні Col-модулі, на яких закодовано один чи декілька білків, які забезпечують резистентність до дії коліцину, і тим самим захищають клітину-продуцент від ушкоджень, які може викликати її власний засіб захисту.

За способом розмноження розрізняють **кон'югативні** і **некон'югативні плазмід**и.

Кон'югативні або самотрансмисивні плазміди мають кон'югативні модулі, структурні гени і регуляторні ділянки, необхідні для перенесення плазмід з однієї клітини до іншої. Гени **самотрансмисивних плазмід** кодуують білки **статевих пілі**, при скороченні яких проходить зближення плазмід між собою, утворення містка, через який ДНК однієї плазмід

Некон'югативні плазміди не здатні до самотрансмісивності, однак за присутності трансмісивних плазмід, можуть використовувати для цього їх кон'югативний апарат. Ці плазміди отримали назву *мобілізуєчих*.

Таким чином, для плазмід характерні специфічні спільні риси:

- автономна реплікація та стабільне успадкування;
- несумісність (дві, навіть близько споріднені плазміди, не можуть існувати в одній клітині);
- здатність до кон'югації та переходу в реципієнтні клітини (функція перенесення);
- здатність надавати реципієнтним клітинам певних специфічних ознак: стійкості до дії одного чи кількох антибіотиків (тетрацикліну, пеніциліну, стрептоміцину) та використовувати для росту нетрадиційні джерела Карбону.

Іноколи плазміди можуть включатися до складу хромосом бактерій. В цьому випадку вони мають назву **епісом**. Після вбудовування в геном клітини-реципієнта, епісоми можуть ініціювати генетичну рекомбінацію та зумовлювати зміни в ланцюгу процесів ген → білок → ознака, внаслідок включення чи блокування певних ділянок геному.

Присутність плазмід у клітинах бактерій надає їм певних переваг: забезпечує пристосування до зміни умов середовища, впливає на прояви патогенності бактерій тощо. Зокрема, на геномі плазмід може бути закодована інформація про структуру ентеротоксинів, гемолізінів, антигенів, розміщених на поверхні бактеріальних клітин. Крім бактерій, плазміди містяться у клітинах синьо-зелених водоростей, а також в деяких еукаріотичних клітинах.

Плазміди, виділені з різних бактеріальних клітин, можуть містити подібні модулі, тому є припущення, що між геномами плазмід постійно проходить обмін ними в вигляді інтактних фрагментів ДНК. Цим пояснюється значне поширення плазмід, які зумовлюють резистентність бактеріальних клітин до антибіотиків. Вивчення цих особливостей плазмід стало передумовою для ідентифікації мобільних генетичних елементів, які поширюються не лише між плазмідами, але і плазмідами та клітинними геномами, а також у межах бактеріальних геномів.

3.3. Мобільні генетичні елементи геному прокариот (IS-елементи і транспозони)

IS-елементи (від англ. *insertion segments* – вбудований сегмент) – це фрагменти ДНК, довжиною 750-1500 нуклеотидних пар, здатні до транслокації (перенесення) з однієї ділянки геному до іншої. IS-елементи містять лише ті гени, які необхідні для їх власної транспозиції. Ці елементи виявлені в бактеріальних хромосомах у вигляді чисельних повторів нуклеотидів. На кінцях IS-елементів локалізовані прямі чи інвертовані повтори нуклеотидів, довжиною від 5 до 40 нуклеотидних пар.

Інтегрування IS-елементів у ту чи іншу ділянку геному (інсерція) являє собою, свого роду, мутацію, яка послаблює транскрипцію генів, відмежованих від регуляторних ділянок IS-елементом, або навпаки посилює прояви генів. Тобто, IS-елементи можуть виявляти як позитивний, так і негативний вплив на експресію окремих генів. Інсерція IS-елементів забезпечується за участю кінцевих інвертованих повторів, що викликають дублікацію ділянок ДНК, в які вбудовується IS-елемент та фланкують його з двох боків. Зокрема, F-фактор

плазмід може включатися в бактеріальну хромосому і забезпечувати перенесення її частини або всієї хромосоми в реципієнтний штам бактерії *E. coli*. Із клітини донора у клітину реципієнта переноситься, як правило, один ланцюг ДНК, на якому добудовується комплементарний.

Транспозони (Тп-елементи) – це мобільні генетичні елементи бактеріальних клітин, які являють собою фрагменти ДНК, подібні до IS-елементів, однак мають значно складнішу будову. В складі транспозонів транслюються не лише окремі гени, але і ділянки геному, які безпосередньо до них прилягають: гени токсинів, стійкості до антибіотиків, певних ферментів метаболізму.

Іноколи транспозони можуть захоплювати два IS-елементи, розташовані поруч разом з фрагментом ДНК, який їх розділяє. У складі транспозонів між різними геномами можуть мігрувати також гени стійкості до певних лікарських препаратів за схемою: плазміда → геном бактеріофага → геном бактерій → плазміда. В деяких випадках може відбуватися ексцизія (вирізання) вбудованого мобільного елемента, тобто його звільнення з геному. За цих умов фрагмент або втрачається, або вбудовується в іншу ділянку геному. Інсерцію та ексцизію транспозонів контролюють специфічні білкові фактори.

Кожен транспозон може містити один чи кілька сайтів вбудовування в певні ділянки геному. Ефекти інтегрування IS-елементів і транспозонів до складу геному залежать від того, де буде проходити їх включення в геном, які ділянки ДНК вони захоплюють з собою та яким чином проходить їх вбудовування. Інтегрування мобільних елементів в будь-який ген може зумовлювати його інактивність або генетичну перебудову, рекомбінацію.

Важливою особливістю мобільних елементів бактеріальних клітин є те, що вони можуть не лише мігрувати з однієї ділянки геному до іншої, але і зумовлювати злиття окремих репліконів, внаслідок чого утворюються їх коінтеграції, розділені фрагментами мобільного елемента.

Мобільні елементи, подібні до транспозонів та IS-елементів, виявлено у клітинах всіх нижчих та вищих організмів. Вони можуть складати до 5% структури геномної ДНК. IS-елементи та транспозони подібні до мобільно диспергованих генів (МДГ) вищих організмів.

Отже, геном прокаріот має такі специфічні структурно-функціональні особливості:

- геном не укладений в ядро, яке обмежене ядерною мембраною, його редуплікація не супроводжується мітозом,
- геном побудований компактно,
- кількість послідовностей нуклеотидів, які не кодують, мінімальна, інтрони рідкісні,
- для кодування білків часто використовуються дві або всі три рамки читування однієї і тієї ж послідовності нуклеотидів гена, що підвищує потенціал геному прокаріотів без збільшення його розміру,
- багато механізмів регуляції експресії генів, що використовуються у еукаріотів, ніколи не зустрічаються у прокаріотів,
- функціонально пов'язані гени у прокаріотів, як правило, утворюють структури, які мають назву **оперон**.

4. ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМУ ЕУКАРІОТ

4.1. Структурна організація геному еукаріот

Еукаріоти (від *eu* – істинний, *carion* – ядро) – це одно- та багатоклітинні організми, для яких характерно морфологічно сформоване ядро і наявність у клітинах чисельних мембранних структур із специфічними функціями. Клітини еукаріот, на відміну від прокаріот, містять ядро, відмежоване від решти цитоплазми подвійною ядерною оболонкою.

Геноми еукаріотичних клітин представлені: ядерним геномом, локалізованим на структурі ядерної ДНК, а також мітохондріальним та пластидним геномами. У деяких водоростей геном локалізований на нуклеоморфі – невеликих за розміром структурах, розташованих між оболонкою пластид та хлоропластним ендоплазматичним ретикулумом. Відомі дві групи організмів, що містять нуклеоморф: криптофіти і хлорарахніофіти. Клітини цих організмів містять два бактеріальні геноми (геном мітохондрій і пластид зелених/червоних водоростей) і два еукаріотичних (ядерний геном та геном нуклеоморфу).

Таким чином, для клітин еукаріот характерні *двохкомпонентні геноми*, представлені ядерною та мітохондріальною ДНК (гриби, вищі тваринні організми), *трьохкомпонентні*, які включають ядерну, мітохондріальну і пластидну ДНК (вищі рослинні організми) і *чотирьохкомпонентні* – містять ядерну, мітохондріальну, пластидну та нуклеоморфну ДНК.

Враховуючи це, **геном еукаріот** – це сукупність генів, зосереджених у гаплоїдному наборі хромосом клітин зародкового типу та в позахромосомних генетичних структурах, які містяться у клітинах організму.

В ядрі диплоїдних клітин людини зосереджено 46 хромосом (22 пари аутомосом і 2 статеві хромосоми). Оскільки у всіх соматичних клітинах організму міститься один і той же набір хромосом, на яких зосереджений ядерний геном, всі вони несуть однотипну генетичну інформацію, тобто для соматичних клітин організму людини характерна *генетична еквівалентність*. У пресинтетичній фазі клітинного циклу (напередодні поділу), а також постійно у клітинах, які втратили здатність до поділу, кожна хромосома містить одну молекулу ДНК, довжина якої в неспіралізованому вигляді складає близько 5 см. Тобто, довжина ДНК всіх 46 хромосом клітини людини близько 2,3 м. У кожній соматичній клітині організму людини міститься 3 мільярди нуклеотидних пар. Загальна довжина ДНК всіх клітин організму, кількість яких 60×10^{12} , складає 100 мільярдів км, що в 600 разів перевищує відстань від Землі до Сонця. У складі хроматину молекула ДНК має високий ступінь компактизації, що забезпечує її локалізацію в ядерному апараті клітини.

Існує декілька рівнів рівня компактизації ДНК у хромосомі, що зменшує загальну довжину ДНК всіх 46 метафазних хромосом у 100 тис. разів, порівняно з її довжиною в некомпактизованому вигляді.

Гаплоїдний набір хромосом людини містить біля 30 тис. генів, що кодують білки. Решта ДНК включає регуляторні ділянки, інтрони, екзони та різні повтори нуклеотидів. До 8% геному складають ділянки ДНК, в яких закодовані ретровіруси HERV (Human endogenous retrovirus), „наймолодшому” з яких HERV-K біля 5 млн. років.

Сумарну кількість ДНК геному позначають символом *C*. Вона вимірюється пікограмами (пкг), дальтонами або кількістю нуклеотидних пар

(1 пкг = $0,965 \times 10^9$ нуклеотидних пар = $6,1 \times 10^9$ Да). Довжину геномної ДНК клітини виражають в сантиморганідах (сМ). Сантиморганіда дорівнює довжині одного млн. нуклеотидних пар, або одній Мб (мегабазі). Довжина молекули ДНК всіх хромосом однієї клітини людини складає більше 5980 сМ (130 сМ на одну хромосому). Загальний розмір геному еукаріот на кілька порядків більший, ніж у прокаріот, зокрема, геном комах включає $2,3 \times 10^9$ нуклеотидних пар, рептилій – $1,5 \times 10^9$ нуклеотидних пар, ссавців – $2,6 \times 10^9$ нуклеотидних пар, людини – $3,2 \times 10^{11}$ нуклеотидних пар.

4.2. Повтори в молекулі ДНК еукаріот

У структурному відношенні геном еукаріот характеризується наявністю унікальних послідовностей нуклеотидів, які знаходяться в єдиному екземплярі, та повторів – ділянок ДНК, які повторюються в складі геному кілька разів. Вміст унікальних послідовностей в геномі еукаріотів варіює у різних організмів, і їх доля складає 15–98% від всієї ДНК (геном прокаріотів містить тільки унікальні послідовності ДНК).

Повтори ДНК складаються з нуклеотидних послідовностей різної довжини і складу, які зустрічаються в геномі кілька разів або в тандемно-повтореному (одним за одним), або в диспергованому (подрібненому) вигляді. Розмір частини геному, зайнятої повторюваними послідовностями, широко варіює між таксонами. У дріжджів він досягає 20%, у ссавців до 60% всієї ДНК повторюється. У рослин відсоток повторених послідовностей може перевищувати 80%.

Різноманіття ДНК, що повторюється, важко піддається систематизації.

За взаємною орієнтацією в структурі ДНК розрізняються *прямі*, *інвертовані*, *симетричні повтори*, *паліндроми* (однаково читається вперед і назад), *комплементарні паліндроми* і т.п. За ступенем повторюваності розрізняють *часто повторювані послідовності*, число яких перевищує 10^5 на гаплоїдний геном, і *помірно повторювані*, представлені $10-10^4$ копіями. За характером розподілу повторюваностей виділяють *тандемні* і *дисперговані повтори*.

До **часто повтореної ДНК** (highly repetitive DNA) відносять:

- сателітну ДНК (satellite DNA) – фракцію геному еукаріот, що складається з високоповторюваних (від сотень тисяч до мільйонів) коротких (2-200 пар нуклеотидів) нуклеотидних послідовностей ДНК, які розташовані тандемно один за одним. Сателітна ДНК не кодує білки і локалізована в конститутивному гетерохроматині хромосом. Сателітна ДНК характерна для теломерних і центромерних областей хромосом;
- мікросателіти, або короткі тандемні (прості) повтори, які складаються з тандемно повторюваних мономерів довжиною менше 9 пар основ і утворюють поля менше 1 тисячі пар основ.
- мінісателіти – чисельні сегменти, складаються з повторюваних мономерів, переважно з варіантів гуанін-цитозин, довжиною від 10 до 100 пар основ;
- теломери – короткі повтори, як правило, 6 нуклеотидів, від 250 до 1000 копій на теломеру, розміщені в кінцевих ділянках кожної хромосоми.

До **помірно повторюваної ДНК** (middle repetitive DNA) відносять:

- дисперговані мобільні LINE і SINE. Це послідовності що, здатні до переміщення та розмноження в межах геному (~44 % у геномі людини). Вони не організовані в блоки, а розсіяні по всьому геномі. Мобільні елементи LINE (Long INterspersed Elements, 20 %) – довгі дисперговані повтори, 1000–5000 пар основ. Мобільні елементи SINE (Short INterspersed Elements, 13 %) – короткі, по 200–300 пар основ. До цього класу належить Alu-повтори, що мають 300 000 копій на геном та впливають на активність генів;
- унікальні послідовності (single-copy DNA);
- псевдогени (послідовність нуклеотидів дуже близька до генів, але функція втрачена) – від 1 до кількох тисяч у геномі людини

4.3. Організація генів на структурі геномів еукаріот

На відміну від прокаріот, гени еукаріотичних клітин не організовані в оперони і являють собою транскрипційну одиницю, до складу якої входять структурні та регуляторні ділянки, що визначають початок і закінчення транскрипції різних видів РНК клітини (іРНК, тРНК, рРНК). Ці РНК виконують роль матриць для синтезу специфічних білків (іРНК) або забезпечують формування апарату білкового синтезу та перебіг процесу трансляції (рРНК та тРНК).

Транскрипційна одиниця геному еукаріот відповідає за синтез однієї молекули *іРНК*, які є *моноцистронними*. Особливістю транскрипційних одиниць геному еукаріот є те, що в структурі деяких з них виявлено «розірвані гени» (гени, що кодують іРНК) та містять інформативні ділянки екзони та неінформативні інтрони.

Кількість і довжина інтронів та екзонів у геномах різних організмів значно варіює – від 1,5 до 18 тис. нуклеотидних пар. Інколи довжина інтронів значно перевищує довжину екзонів. Одночасно з цим, в структурі деяких генів містяться лише кілька інтронів або вони взагалі відсутні.

Гени, які забезпечують синтез рРНК, не містять інтронів, а включають кодуючі послідовності і спейсери (проміжні послідовності, що розділяють окремі гени).

Регуляторні ділянки, які визначають початок та закінчення синтезу молекул РНК, включають селекторну зону (ТАТА-мотив або бокс Хогнеса – розташований в положенні -20 – -30 відносно місця початку транскрипції, функціонально еквівалентний боксу Прибнова у прокаріот), ініціюючий кодон і термінатор. Ділянка гену, на якій закодована структура відповідних РНК, що забезпечує синтез білкових молекул чи інших генних продуктів, фланкована з двох боків 5'- і 3'-нетранслюючими чергуваннями нуклеотидів:

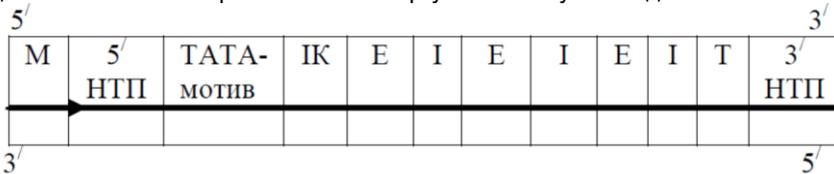


Рис. 7. Будова транскрипційної одиниці еукаріот

М – модулятор (регулятор частоти транскрипції), 5'-НТП – 5'-нетрансляюча послідовність, ТАТА-мотив – ділянка ініціації транскрипції, ІК – ініціюючий кодон, Е – екзон, І – інтрон, Т – термінатор, 3'-НТП – 3'-нетрансляюча послідовність

Тобто, транскрипційна одиниця еукаріот включає регуляторні та структурні ділянки. На певній відстані від структурних ділянок розміщений *модулятор*, який забезпечує регуляцію частоти ініціації транскрипції. Модулятор, у свою чергу, містить специфічні регуляторні елементи, які являють собою набір коротких нуклеотидних блоків, де зосереджено центри зв'язування специфічних білкових факторів. Залежно від білкових факторів, які зв'язують ці регуляторні ділянки, модулятор може виступати в ролі *енхансера* (підсилювача) чи *сайленсера* (пригнічувача) транскрипції.

На основі робіт по секвенуванню окремих еукаріотичних геномів, проведених Міжнародним Консорціумом, встановлено, що до складу геному людини входить 31780 генів, дрозозфіли – 13601, дріжджів – 5885 генів. Раніше вважали, що геном людини містить від 60 до 100 тис. генів, кожен з яких вкладає в середньому від 1 000 до 1 500 нуклеотидних пар. Як видно з наведених прикладів, до складу геному людини входить, в середньому, лише у два рази більше генів, ніж до складу геномів інших організмів, однак структурна організація їх набагато складніша.

Гени інформаційних РНК. Ці гени локалізовані на *унікальних повторах нуклеотидів ДНК* і кодують іРНК, що виконують роль матриць при синтезі білків у процесі трансляції. Для них характерна мозаїчна будова: кодуючі чергування нуклеотидів (екзони) в їх структурі чергуються з некодуючими (інтронами). Не містять інтронів лише деякі гени, що кодують гістонові білки та гени α - і β -інтерферону. Інтронні ділянки присутні також у генах іРНК геному рослин та хребетних тварин. Довжина інтронних ділянок в структурі генів та їх нуклеотидний склад може значно варіювати в різних видів організмів. Гомологічні гени можуть містити однакову кількість інтронів, які локалізовані на одних і тих же ділянках геному. Кількість інтронів, які входять до складу генів, як правило, різна, що залежить від довжини ділянок, які кодують іРНК. У складі генів загальна довжина інтронних ділянок перевищує довжину екзонів у декілька разів. Екзонні ділянки включають в середньому до 300 нуклеотидних пар.

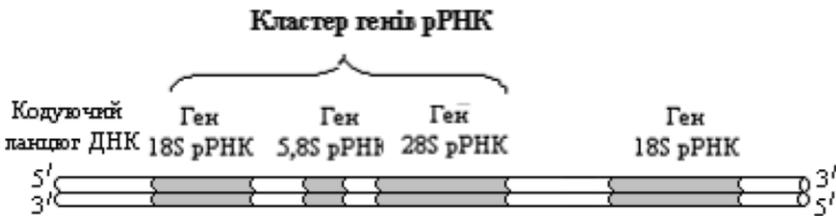
У генах, що кодують білки, інтрони розташовані між ділянками, які несуть інформацію про окремі структурні і функціональні домени. Інтрон-екзонна, мозаїчна структура генів іРНК еукаріот, на думку В. Гілберта (1977 р.), яка формувалася у процесі еволюційного розвитку багатоклітинних організмів, забезпечила можливість обміну екзонами між неспорідненими генами. Внаслідок такого „перетасування генів” відбувався синтез нових білків-ферментів із специфічними функціями, молекули яких включали функціональні модулі, або домени, які раніше належали іншим білкам. Це зумовило перебудову геномів організмів та сприяло їх еволюційному розвитку (гіпотеза пізнього виникнення інтронів). Згідно з іншим припущенням (Дж. Дарнел, 1978 р.), інтрони являють собою *еволюційні релікти*, які раніше були частиною гігантських генів. Тобто, мозаїчна будова генів іРНК еукаріот, у значній мірі, сприяла еволюції геномів вищих організмів, оскільки найбільших змін за цих умов зазнавали саме інтронні ділянки генів. Ці зміни були зумовлені

мутаціями: інсерціями, вставками, делеціями, інверсіями. Екзонні ділянки, на відміну від інтронів, у процесі еволюції змінювалися в меншій мірі, тобто були більш консервативними. Враховуючи це, припускають, що геном прокариот, який не містить інтронів, втратив і здатність до еволюційних змін.

Для еукаріот характерні *моноцистронні одиниці транскрипції*: один ген забезпечує синтез однієї молекули іРНК. Враховуючи «надлишковість» ДНК геному еукаріот, зумовлену відношенням інформативних ділянок до неінформативних (як 1: 9), при транскрипції утворюється первинний транскрипт, з якого внаслідок посттранскрипційної модифікації (процесінгу, або дозрівання) утворюється молекула зрілої іРНК, яка містить лише кодуючі послідовності нуклеотидів.

Гени рибосомних РНК. Ці гени кодують різні види рРНК, необхідні для формування субодиноць рибосом та утворення на їх структурі функціонально активного центру під час трансляції генетичної інформації. Кількість цих генів у складі геному різних видів еукаріот, як правило, сягає від сотень до кількох тисяч. Гени рРНК можуть знаходитися в структурі однієї чи кількох хромосом. Зокрема, в геномі людини міститься близько 200 генів рРНК, які локалізовані на структурі 13, 15, 21, 22 хромосом. Сайти геномної ДНК, де локалізовані гени рРНК, мають специфічну структурну організацію і одержали назву *ядерцевих організаторів*.

Гени рРНК – це *тандемні повтори нуклеотидів*, організовані в вигляді кластерів, які утворюють одну транскрипційну одиницю. На структурі цих кластерів може бути закодовано кілька видів РНК (18S, 5,8S, 28S рРНК). Довжина кластерів трьох генів, які кодують різні види рРНК, близько 8 тис. нуклеотидних пар. У кластері гени розділені двома спейсерами:



Крім того, спейсери містяться між сусідніми кластерами і можуть включати до 5 тис. нуклеотидних пар.

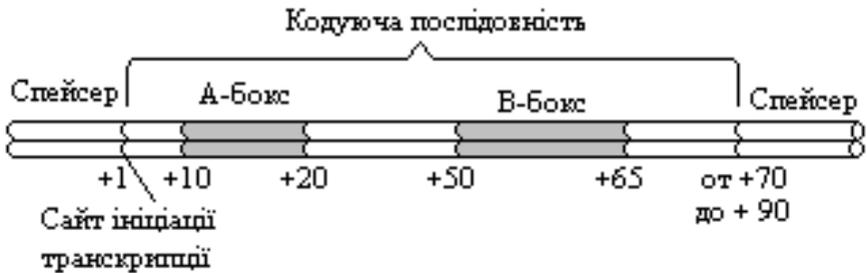
На генах рибосомних РНК синтезуються високомолекулярні попередники рРНК (пре-рРНК), з яких, внаслідок посттранскрипційної модифікації, утворюються різні клітинні рРНК. Довжина кластерних ділянок та міжгенних спейсерів може варіювати в різних видів організмів. Особливістю цих ділянок є те, що вони містять прямі *тандемні повтори* нуклеотидів, подібні до сигнальних послідовностей сайту початку транскрипції. Між тандемними повторами, які локалізовані на структурі міжгенних спейсерів, може проходити кросингвер, внаслідок чого змінюється як кількість міжгенних спейсерів, так і в цілому генів рРНК.

Одиниця транскрипції рРНК у геномі людини має довжину 14 тис. нуклеотидних пар і кодує всі види рРНК. На цій ділянці розташований кластер генів, який кодує 18S, 5,8S і 28S.

Гени всіх рРНК знаходяться на ділянках хромосом, які асоційовані з ядерцем. Гени 5S рРНК розміщені окремо від решти генів. Вони не містять інтронів і включають в середньому 120 нуклеотидних пар. Кількість копій гену 5S рРНК може сягати до 2 тис. Промоторна ділянка в генах 5S рРНК розміщена серед кодуючої ділянки гену і включає 55-80 нуклеотидних пар.

Гени рРНК представлені великою кількістю копій. У людини, в розрахунку на гаплоїдний набір генів, кількість їх копій може складати близько 100, в соматичних клітинах земноводних – близько 900. Особливістю генів рРНК є те, що в них відсутні інтрони. Крім того ці гени, порівняно з іншими, містять велику кількість ГЦ-пар.

Гени транспортних РНК. На структурі геному еукаріот містяться гени, в яких закодовано близько 100 видів тРНК, що забезпечують транспорт аміноацил-тРНК до рибосом під час трансляції генетичної інформації. Гени тРНК розміщені на **помірних повторах** нуклеотидів і утворюють кластери, які локалізовані на різних ділянках геному. Всього в гаплоїдному наборі хромосом людини міститься близько 1300 генів тРНК. На кожен вид тРНК припадає по 10-20 копій генів. Організація генів тРНК у складі кластерів варіює в різних видів організмів. Гени можуть бути розділені спейсерами довжиною від ста до кількох тисяч нуклеотидних пар. На структурі генів, як правило, присутній один інтрон, до складу якого входить від 14 до 60 нуклеотидних пар:



Інтрон локалізований поблизу ділянки, яка при транскрипції утворює 3'-кінець антикодону. Регуляторна ділянка гену тРНК розміщена посеред кодуючих послідовностей і включає два бокси: А та В. Така будова регуляторної ділянки генів забезпечує їх ефективну транскрипцію. А-бокс розташований на кодуючій ділянці гену тРНК на відстані від 10 до 20 нуклеотидних пар від стартової точки, а В-бокс, відповідно, на відстані 50-65 нуклеотидних пар. Тобто, А- та В-боксы регуляторної ділянки розділені кодуючими послідовностями нуклеотидів та є найбільш консервативними ділянками генів. Ці бокси локалізовані на дигідроуридиліній і псевдоуридиліній петлях транскрибованих тРНК. На цих ділянках знаходиться велика кількість інвертованих чергувань нуклеотидів, які під час трансляції генетичної інформації забезпечують зв'язування тРНК з рибосомним апаратом клітини і відповідним ферментом – аміноацил-тРНК-синтетазою.

4.4. Геном ДНК-вмісних цитоплазматичних структур

Геном мітохондрій

Мітохондрії – це клітинні органели, округлі чи еліпсоїдні двомембранні структури, локалізовані в цитоплазмі клітин еукаріот, які забезпечують процеси біоенергетики і є, свого роду, „енергетичними станціями” клітин.

Мітохондріальна ДНК, в структурі якої локалізований генوم цих органел, складає менше 1% всієї ДНК клітини. Розмір мітохондріальних геномів варіює в різних видів організмів. Так, у найпростіших до його складу входить близько 40 тис. нуклеотидних пар, у вищих організмів – від 16 до 20 тис. нуклеотидних пар. У мітохондріальному геномі дріжджових клітин налічується до 80 тис. нуклеотидних пар, тобто практично втричі більше, ніж у мітохондріальному геномі вищих тварин і людини. Значну частину мітохондріального геному дріжджів складають інтрони та ділянки багаті АТ-парами, функції яких ще не з'ясовано. На структурі геному мітохондрій людини, який організований надзвичайно компактно, некодуючі послідовності відсутні.

Переважає більшість білків мітохондрій синтезується на рибосомному апараті клітини. Одночасно з цим, мітохондрії містять і власний набір генів, транскрипти яких забезпечують функціонування мітохондріального апарату білкового синтезу та формування структури реплікативного апарату мітохондрій, оскільки ДНК мітохондрій реплікуються незалежно від ядерної ДНК.

На сьогодні розшифровано структуру багатьох мітохондріальних геномів та створено генетичні карти, які дають уяву про локалізацію окремих генів. Було встановлено, що подібні за нуклеотидним складом ділянки ДНК в мітохондріальних геномах різних видів організмів виконують специфічні функції. Набір генів мітохондрій людини локалізований на кільцевій молекулі ДНК, яка містить важкий (H) та легкий (L) ланцюги.

Гени мітохондріальної ДНК людини несуть інформацію про первинну структуру 13 білків, всі види тРНК та два види рРНК. Майже 60% генів мітохондріальної ДНК кодують компоненти НАД-дегідрогеназного комплексу, білкові субодиниці АТФ-синтетази, цитохромоксидази та цитохрому „с”. Практично всі ці гени, крім одного, а також гени двох рРНК та шести тРНК локалізовані на H-ланцюгу ДНК, гени решти тРНК і одного білка, відповідно, знаходяться на L-ланцюгу. В геномі мітохондрій людини практично відсутні некодуючі послідовності нуклеотидів, а кодуючі тісно прилягають одні до одних. Інколи вони можуть перекриватися, що характерно, зокрема, для генів тРНК-іле і тРНК-глу, а також окремих субодиниць АТФ-синтетази. Кількість регуляторних ділянок на структурі мітохондріального геному людини незначна, міжгенні ділянки містять від 3 до 25 нуклеотидних пар.

Для геному мітохондрій людини характерний високий ступінь варіабельності за нуклеотидним складом, що зумовлено великою кількістю інсерцій і делецій.

Для тварин, зокрема ссавців, характерні спільні закономірності будови мітохондріального геному.

У клітинах рослин, як правило, міститься від 50 до 2 тис. мітохондрій, в кожній з яких може бути локалізовано до ста копій геному. Мітохондріальний генوم рослин об'ємніший і включає до 2500 нуклеотидних пар. Ця величина

значно варіює навіть в одній родині рослин. Так, у різних представників родини гарбузових ДНК мітохондріального геному може містити від трьох до 850 тис. нуклеотидних пар. Зокрема, в геномі дини міститься близько 2400 нуклеотидних пар. Такий геном кодує три рРНК, 16 тРНК, 10 рибосомних білків, частину білків електронно-транспортного ланцюга, три субодиниці АТФ-синтети та чотири субодиниці цитохрому „с”.

Геном хлоропластів

Хлоропласти – це один з видів пластид рослинних клітин, яким належить важлива роль у перебігу процесу фотосинтезу.

Вони являють собою плоскі диски, діаметром 2-10 мкм і товщиною 1 мкм, обмежені внутрішньою і зовнішньою мембранами, які розділені міжмембранним простором. Внутрішній вміст хлоропластів – *stroma*, подібний до цитозолу клітин бактерій і містить кільцеву ДНК та рибосоми, на яких проходить синтез білків, необхідних для забезпечення метаболізму цих органел.

Одночасно з цим, більшість білків хлоропластів кодується ядерними генами клітини. Як і мітохондрії, хлоропласти мають власний геном, представлений великою кількістю копій кільцевої ковалентно з'єднаної дволанцюгової молекули ДНК, розміри якої варіюють у різних видів рослин в межах 130-160 тис. нуклеотидних пар. На молекулі ДНК зосереджено близько 130 генів. На сьогодні, повністю розшифровано чергування нуклеотидів хлДНК багатьох видів рослин. Це дало можливість виявити загальні закономірності її структурної організації та консервативність в ході еволюції. Серед генів, локалізованих на хлДНК, гени 4 типів рРНК (4S, 5S, 16S, 23S), 30 видів тРНК, 20 видів рибосомних білків та гени двох субодиниць ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази.

При дослідженні структури геному хлоропластів тютюну вивчено локалізацію 79 генів. Значна частина транскриптів цих генів перед ініціюючим кодоном містять SD-подібні чергування нуклеотидів (послідовності Шайна-Дальгарно), до складу яких входить 20 нуклеотидів. Інші транскрипти також містять такі послідовності, однак їх локалізація не фіксована на матриці, хоч вони суттєво впливають на інтенсивність транскрипції іРНК. Хлоропластний геном кодує близько 40 білків тилакоїдної мембрани, які необхідні для формування комплексів електронно-транспортного ланцюга. Це складає близько половини білків, що входять до його складу. Решта білків тилакоїдів закодовані на генах ядерної ДНК. Структурна організація окремих ділянок ДНК хлоропластів подібна до генів бактеріальних клітин. Деякі гени хлоропластів об'єднані в оперони.

У пластидах рослин виявлено такий важливий процес як *РНК-редагування*, суть якого в модифікації всіх кодуючих ділянок іРНК, елімінації ініціюючих та термінуючих кодонів. Було встановлено, що білки, для яких характерні нативні властивості, синтезуються лише на відредагованих молекулах іРНК. Тобто, у пластидах на одній і тій же ділянці геному можливе утворення різних за будовою генних продуктів, які забезпечують диференціювання клітин і тканин.

Незважаючи на відносну автономію геномів цитоплазматичних ДНК-вмісних структур (мітохондрій та хлоропластів), вони, разом з ядерним геномом, складають єдину систему і функціонують синхронно та узгоджено.

4.5. Мобільні генетичні елементи геному еукаріот

У геномі еукаріот, залежно від особливостей структурної організації і молекулярних механізмів транслокації та інтегрування, виділяють такі види мобільних генетичних елементів: *транспозони*, *ретротранспозони* і *ретропозони*.

Значний внесок у вивчення мобільних генетичних елементів геному еукаріот було зроблено працями Г. Георгієва, який встановив, що мобільні генетичні елементи, або, так звані, *мобільно дисперговані гени (МДГ)* можуть виявляти вплив як на структуру, так і на експресію інших генів і, як наслідок, на властивості генних продуктів. Крім того, дослідженнями Г. Теміна (1972 р.) було виявлено подібність транспозонів, мобільно диспергованих генів та онкогенів провірусів, які можуть вступати в рекомбінантну взаємодію з окремими клітинними генами та зумовлювати онкотрансформацію клітин.

Транспозони. Цей вид мобільних генетичних елементів геному еукаріот подібний до транспозонів прокариот, однак має певні специфічні риси:

- до складу транспозонів крім генів, здатних до транспозиції, входять ділянки ДНК, які розміщені поруч, або фрагменти інших генів, локалізовані на певній відстані;
- кожен транспозон містить чергування нуклеотидів, які забезпечують вбудовування його в геном. Екцизія та транслокація транспозонів відбувається за участю специфічних ферментів (*рестриктаз та транслоказ*), а також внаслідок утворення їх копій, які вбудовуються в інші ділянки геному. В першому випадку відбувається поширення їх у геномі, а у другому – ампліфікація (значне збільшення копій);
- при екцизії транспозони інколи видаляються не повністю, внаслідок чого відбувається індукція хромосомних перебудов. Це зумовлює нестабільність геномів та є важливим фактором еволюції. Вбудовування та екцизію транспозонів контролюють специфічні білки;
- на кінцях транспозонів містяться інвертовані (спрямовані назустріч одні одним) повтори нуклеотидів. Транспозони в геномі можуть бути присутні в вигляді 30-50 копій;
- повні копії транспозонів містять відкриті рамки зчитування (ORF), які кодуєть фермент *транслоказу*, необхідний для перенесення мобільних генетичних елементів. Перед транслокацією цих елементів проходить зближення інвертованих послідовностей та вирізання їх з певних сайтів ДНК з наступним перенесенням та вбудовуванням в інші. Прикладом транспозонів еукаріот можуть бути Р-елементи геному дрозофіли та Ас-елементи геному кукурудзи.

Ретропозони. За структурою ретропозони подібні до проретровірусів, які вбудовуються в геном за участю ферменту зворотної транскриптази. Вони містять структурні ділянки, що включають 5-8 тис. нуклеотидних пар, і з двох боків фланковані довгими прямими кінцевими послідовностями (ДКП або LTR від англ. *long terminal replats*), до складу яких входять 300-400 нуклеотидних пар. Для ретропозонів характерні наступні особливості:

- на структурних ділянках знаходяться відкриті рамки зчитування (ORF), які кодують ферменти (*зворотну транскриптазу та інтегразу*);
- число копій ретротранспозонів, що належать до однієї родини, є стабільним для кожного окремого виду організму і може варіювати в межах від кількох десятків до сотень тисяч копій;
- окремі родини ретротранспозонів різняться за нуклеотидним складом на структурних ділянках та в ДКП-послідовностях;
- ретротранспозони виявлено в геномі дрозофіли, дріжджів, хребетних тварин і рослин.

Ефект інтегрування ретротранспозонів залежить від структури і функцій ділянки геному, в яку вони інтегруються. Якщо ретротранспозони вбудовуються поблизу генів, вони можуть виявляти як позитивний, так і негативний ефект на їх експресію. Зокрема, в деяких випадках проходить пригнічення функціональної активності гену та порушується утворення генних продуктів внаслідок термінації поблизу сайтів поліаденілування в одних ДКП, або навпаки ініціації цих сайтів в інших ДКП.

Інколи інтеграція ретротранспозонів супроводжується мутаціями, які зумовлюють пригнічення чи гіперпродукцію генних продуктів, що впливає на появу специфічних фенотипових ознак. За певних умов спостерігається також повна або часткова реверсія мутацій до норми внаслідок ексцизії мобільного генетичного елемента при збереженні у складі хромосоми лише одного ДКП. Інтеграція ретротранспозону поруч з проонкогеном може індукувати його функціонування та зумовлює розвиток злоякісних пухлин.

Для ретротранспозонів, що не містять ДКП, можливий інший вид інтегрування, який реалізується за участю ферменту зворотної транскриптази. За цих умов ретротранспозони транслюються до певних ділянок одного з ланцюгів ДНК-акцептора і включаються до його складу. Роль затравки для синтезу ДНК-копій ретротранспозону виконує комплементарний ланцюг ДНК. У цьому процесі задіяний фермент зворотна транскриптаза. Фермент спочатку синтезує невеликий фрагмент ДНК-мішені, після чого змінює матрицю і копіює РНК, яка далі видаляється, та добудовується комплементарний ланцюг ДНК. Тобто, ці ретротранспозони діють подібно до ферменту теломерази, який запобігає недореплікації 5'-кінців ДНК у процесі клітинного поділу.

Ретропозони. Цей вид мобільних генетичних елементів являє собою вбудовані в геном еукаріот ДНК-копії, які синтезуються на різних видах клітинних РНК за участю ферменту зворотної транскриптази. Відкриття ретропозонів стало передумовою для припущення про можливість перенесення інформації у клітині в напрямку РНК → ДНК та повернення її до геному в вигляді ретропозонів. Ретропозони можуть складати до 10% геномної ДНК ссавців. Таким чином, зворотний потік інформації від РНК до ДНК у клітинах еукаріот в еволюційному масштабі може бути суттєвим.

Розрізняють різні види ретропозонів, зокрема, в геномі ссавців поблизу генів, які містять інтрони та транскрибуються РНК-полімеразою II, було виявлено, так звані, *псевдогени*, що являють собою дефектні копії генів, які містять дА-полі і дТ-полі чергування нуклеотидів на 3'-кінцях молекули. Тобто, роль матриці для їх транскрипції, по суті, виконує „процесована” поліаденілована іРНК. Псевдогени, які є продуктом зворотної транскрипції іРНК, складають лише невелику частину геномних ретропозонів. Значна

кількість повторів нуклеотидів, що містяться в геномі хребетних тварин, утворюється внаслідок ретропозиції ДНК-копій інших видів клітинних РНК і являє собою аномально процесовані їх клітинні транскрипти. Число копій таких повторів у складі геному еукаріот сягає до 30 тис. В довгих повторах нуклеотидів може знаходитися кілька відкритих рамок зчитування, для яких характерна гомологія за нуклеотидним складом з генами, що кодують фермент ревертазу в ретровірусів.

Отже, позахромосомні цитоплазматичні структури можуть виконувати роль матриць для нуклеотидних послідовностей, які включаються в геном у вигляді псевдогенів, причому характер їх процесінгу може визначати особливості структури новоутворених генів.

Таким чином, **структурна організація геному еукаріот має такі особливості:**

- геном еукаріот локалізований на хромосомній ДНК та позахромосомних ДНК-вмісних структурах (мітохондріях, пластидах);
- для клітин еукаріот характерні дво-, три- і чотирикомпонентні геноми;
- геномна ядерна ДНК еукаріот асоційована з білками гістонового і негістонового типу і локалізована в ядерному апараті клітини;
- відношення інформативних ділянок до неінформативних на структурі геному еукаріот складає 1:9 і лише 0,4% закодованої інформації використовує клітина протягом життєвого циклу. У зв'язку з цим порушується принцип колінійності – відповідності первинної структури ДНК первинній структурі білків, які синтезуються на рибосомному апараті клітини за участю транскрибованих на структурі ДНК специфічних іРНК. Синтезовані первинні генні транскрипти відповідних РНК перед трансляцією, зазнають специфічної посттранскрипційної модифікації (процесінгу і сплайсінгу). Крім того, гени або їх кластери, які кодують субодиниці олігомерних білків можуть знаходитися на різних ділянках хромосоми або навіть на різних хромосомах. Тому такий важливий постулат молекулярної генетики як один ген – один білок для еукаріот формулюється як: один ген – кілька поліпептидних ланцюгів, один поліпептидний ланцюг – кілька генів;
- для генів ядерного геному еукаріот не характерна оперонна організація як і поняття «промотор». У цьому випадку мова може йти лише про наявність промоторної ділянки на структурі ДНК, функціонування якої знаходиться під впливом складних регуляторних механізмів. Ця ділянка може впливати як на окремі гени, так і на групу генів, локалізованих на значній відстані від неї;
- переважна більшість генів на структурі геному еукаріот представлена великою кількістю копій, які утворюють мультигенні родини (множинні гени). Наявність чисельних копій генів у мультигенних родин забезпечує варіативність структури первинних транскриптів та посилює їх експресію. Така множинність, у першу чергу, характерна для генів, які кодують первинні транскрипти, необхідні для формування апарату

білкового синтезу (тРНК, рРНК) та для формування вищих рівнів структурної організації ДНК;

- гени, продуктами транскрипції яких є гомологічні білки, що виконують подібні функції, на структурі геному утворюють кластери, розмір та кількість яких може варіювати;
- гени, що кодують іРНК можуть мати *мозаїчну будову*. На структурі цих генів інформативні ділянки (екзони) чергуються з неінформативними (інтронами). Кількість інтронів у складі генів, а також їх довжина різні. Як правило, загальна довжина інтронних ділянок перевищує довжину екзонів у кілька разів;
- всього в геномі людини зосереджено більше 30 тисяч генів, кожен з яких містить 1000-1500 нуклеотидних пар;
- інформаційні РНК геному еукаріот є моноцистронними;
- гени іРНК локалізовані на унікальних повторах нуклеотидів, для них характерна «мозаїчна» інтрон-екзонна структура;
- гени рРНК зосереджені на ділянках ДНК, які мають назву ядерцевих організаторів, де локалізовані тандемні повтори нуклеотидів. Кластери генів рРНК утворюють транскрипційну одиницю, на якій закодовано 18S, 16S, 28S РНК. Ці гени розділено двома спейсерами. Гени рРНК не містять інтронів і багаті ГЦ-парами нуклеотидів;
- на структурі геному еукаріот закодовано близько 100 видів тРНК. Вони розміщені на помірних повторах нуклеотидів, утворюють кластери і можуть бути розділені спейсерами та містять один інтрон, локалізований на ділянці, яка при транскрипції утворює 3' кінець антикодону;
- геном еукаріот містить велику кількість міні- та мікросателітів, мобільно диспергованих елементів, які складають від 10 до 30% геному у тварин і до 50% геному рослин. Ці елементи можуть транслокуватися як в межах однієї хромосоми, так і між різними хромосомами. Мобільні елементи, як правило, розсіяні по всьому геному, або локалізуються на певних ділянках хромосом;
- до 35% генів геному можуть транскрибуватися з різних рамок зчитування, а близько 40% первинних транскриптів зазнають альтернативного сплайсінгу;
- в геномі людини, порівняно з геномами інших організмів, міститься значно більше генів, транскрипти яких забезпечують такі важливі функції, як підтримання показників гомеостазу та стану імунного захисту, перебігу процесів транскрипції і трансляції;
- гени, які кодують білки, складають, в середньому, 2% геному, гени різних видів РНК – близько 20%. До 50% геному людини складають різні повтори нуклеотидів, значна кількість яких за будовою подібна до структури РНК інтегрованих форм інфекційних ретровірусів птахів і ссавців. Це, так звані, ендегенні ретровіруси геному, яких на даний час виявлено близько 30 тис.

4.6. Геном людини

У геномі диплоїдної клітини людини з 46 хромосомами міститься близько 6 пікограм ДНК, а загальна довжина гаплоїдного набору з 23 хромосом становить близько 2,85 млрд. нуклеотидних пар. Цієї кількості ДНК достатньо для кодування декількох мільйонів генів. Але після завершення основної частини міжнародної програми «Геном людини» було припущено, що справжня кількість генів може складати від 20000 до 25000. Початкова оцінка була більш ніж 100000 генів. У зв'язку з удосконаленням методів пошуку генів (проорокування генів) передбачається подальше зменшення кількості генів. Гени людини складають не більше 3% від всієї ДНК.

Проект «Геном людини» (англ. The Human Genome Project – HGP)

– це міжнародний науково-дослідний проект, з розшифровки геному людини. Його головною метою було визначення послідовності нуклеотидів, які складають ДНК та ідентифікування 20000-25000 генів у людському геномі. Проект розроблявся з 1984 р., а розпочався у 1990 р., під егідою Департаменту енергетики США (United States Department of Energy – DOE) і Національного інституту здоров'я США (National Institutes of Health – NIH). Очолив проект Джеймс Уотсон, який був головою Національного Центру Досліджень Людського Геному, починаючи з 1988 р. У квітні 1993 р. його замінив американський генетик Френсіс Коллінз, а у 1997 р. назва центру була змінена на Національний Інститут Досліджень Людського Геному (англ. National Human Genome Research Institute – NHGRI). Основний обсяг секвенування був виконаний в університетах і дослідницьких центрах США, Канади, Великобританії, Німеччині, Франції, Японії та Китаю. Ці країни склали Міжнародний консорціум.

Приватною компанією «Celera Genomics», якою керував Крейг Вентер був запущений аналогічний паралельний проект, завершений дещо раніше міжнародного.

У 2000 р. була випущена робоча чернетка структури геному. Дані по повногеномному секвенуванню ДНК людини вчені почали публікувати з 2001 р. Перші дані про геном людини були опубліковані міжнародним консорціумом і групою Крейга Вентера в наукових журналах «Nature» та «Science» 15 і 16 лютого 2001 р., відповідно. Повний геном був опублікований у 2003 р. Публікування було закінчено у 2006 р. Однак і сьогодні додатковий аналіз деяких ділянок ще не закінчений.

Повністю вирішити проблеми повногеномного дослідження тільки прямим секвенуванням навряд чи можливо, оскільки в геномах є локуси, недоступні для клонування, визначення первинної структури ДНК або однозначної реконструкції протяжних фрагментів через наявність великої кількості гомопослідовностей, GC-багатих ділянок та/або повторів. Тому на даний момент технічно не представляється можливим секвенування кількох десятків ділянок геному людини. Разом з тим сучасні технології дозволяють секвенувати геном людини значно більш ефективніше, швидче і економічніше. Першими людьми з індивідуально прочитаними геномами стали Джеймс Уотсон і Крейг Вентер.

Хоча метою проекту з розшифровки геному людини було розуміння будови геному людського виду, проект також фокусувався і на кількох інших організмах, серед яких бактерії, зокрема, кишкова паличка, комахи, такі як муха дрозофіла і свавці, наприклад, миша.

Незважаючи на майже стовідсоткову розшифровку структури геному людини, у функціональному плані геном розшифрований не більше ніж на 1-2%, що свідчить про наше відносне розуміння влаштування, принципів роботи і функцій елементів геному. Наявність в клітинах людини понад 100000 різних типів білків і молекул РНК припускає, що в середньому в одному гені закладена інформація про п'ять функціональних продуктів.

Гени людини віддалені один від одного протяжними проміжками – спейсерами, які мають у своєму складі велику кількість повторюваних послідовностей ДНК. Ці ділянки ДНК (97% від усієї ДНК), мабуть, беруть участь у регуляції експресії генів (під час ембріогенезу, при диференціюванні тканин і т.д.) і в процесингу РНК; виконують структурні функції; підвищують точність гомологічного спаровування і рекомбінації; сприяють успішній реплікації ДНК.

Крім генів в ДНК людини виявлено безліч інших базових елементів геному. Близько 50% всього геному людини складається з повторюваних послідовностей, які включають в себе: сателітні ДНК, інвертовані повтори, помірні і низькокопійні повтори, міні- і мікросателітні послідовності ДНК, а також різні класи транспозонів.

Деякі гени людини повторюються в геномі від декількох одиниць до декількох сотен разів і утворюють мультигенні сімейства. Ці гени зазвичай згруповані в кластери (групи повторів одного і того ж або споріднених генів, розташованих поруч на хромосомі, що входять до складу мультигенного сімейства) в певних районах однієї або декількох хромосом (гени р-, т- і ядерних РНК, гени α - і β -глобінів, тубулінів, міоглобіну, актину, інтерферону та ін.).

Особливе місце серед мультигенних сімейств займають **супергени** – дуже великі кластери із сотень функціонально і структурно родинних генів (наприклад, комплекс, який контролює головні антигени гістосумісності, комплекси, які контролюють синтез важких та легких ланцюгів імуноглобулінів).

В багатьох мультигенних сімействах поряд з функціонально активними генами містяться **псевдогени** – мутаційно змінені послідовності, дуже схожі за своєю структурою з певними нормальними генами. Незважаючи на те, що псевдогени можуть транскрибувати, їх функціональне призначення в геномі вивчено погано. Деякі з них можуть брати участь в регуляції експресії за допомогою кодування малих інтерферуючих РНК (міРНК і siRNA), або через трансрегуляцію експресії гомологічних генів.

В геномі людини присутні також нуклеотидні послідовності, гомологічні генам деяких вірусів.

Контрольні запитання:

1. Будова гена. Структурні та регуляторні частини гена.
2. Особливості будови вірусних геномів.
3. Особливості структурної організації геному прокариот.
4. Будова оперону.
5. Плазмиди, їх функції, типи, будова.
6. IS-елементи геному прокариот.
7. Транспозони геному прокариот.
8. Будова геному еукаріот.
9. Повтори в молекулі ДНК.
10. Гени інформаційних РНК.

11. Гени рибосомних РНК.
12. Гени транспортних РНК.
13. Геном мітохондрій.
14. Геном хлоропластів.
15. Транспозони еукаріот.
16. Ретротранспозони.
17. Ретропозони.
18. Особливості будови геному людини.

Тема: МАТРИЧНИЙ СИНТЕЗ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ

РЕПЛІКАЦІЯ

План

1. Загальні закономірності реплікації.
2. Реплікація в клітинах прокаріот.
3. Реплікація ДНК у клітинах еукаріот.
4. Постреплікативна модифікація ДНК.

1. ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ РЕПЛІКАЦІЇ

Реплікація тісно пов'язана з поділом клітин (клітинним циклом). В еукаріотичних клітинах реплікація передуює їх поділу і відбувається в S-фазі клітинного циклу, коли проходить *дезінтеграція гетерохроматину*, втрата ним конденсованої суперспіралізованої структури і формування активного розрихленого *еухроматину*. У прокаріот цей процес триває протягом всієї інтерфази.

Внаслідок реплікації наступне покоління клітин отримує генетичну інформацію, закодowaną в чергуванні триплетів в структурі ДНК.

Для реплікації ДНК характерний *напівконсервативний механізм*, суть якого в тому, що кожне наступне покоління дочірніх молекул, яке отримало інформацію від вихідної (батьківської) молекули ДНК, містить у своєму складі елементи матриці. Тобто, в кожному наступному поколінні молекул один з ланцюгів (батьківський) отриманий від вихідної молекули ДНК, а другий (дочірній) є його комплементарною копією.

Вперше реплікацію було вивчено у клітинах прокаріот, однак пізніше було з'ясовано, що **загальні закономірності цього процесу є спільними для всіх живих організмів та неклітинних форм живого:**

- вихідними сполуками або субстратами для реплікації є дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфати аденіну, гуаніну, цитозину і тиміну, які за участю специфічних ферментів та білкових факторів сполучаються між собою і утворюють наступне покоління молекул. За цих умов, проходить утворення дезоксиполінуклеотидних ланцюгів (схема А. Коренберга):



- для перебігу реплікації необхідна наявність матриці – двох взаємокомплементарних ланцюгів ДНК, при розходженні яких утворюється дві одноланцюгові матриці;

- у процесі реплікації реалізується принцип комплементарності: до складу реплікованого ланцюга включаються дезоксирибонуклеозид-монофосфати, комплементарні до матричного ланцюга;
- новий ланцюг ДНК синтезується в напрямку $5' \rightarrow 3'$;
- реплікативна вилка, яка утворюється при розходженні ланцюгів може мати різну форму, що залежить від особливостей організації генетичного матеріалу у складі геному;
- реплікація асиметричний процес – один з ланцюгів ДНК синтезується в напрямку руху реплікативної вилки (ведучий ланцюг), а інший – від реплікативної вилки (запізнюючий ланцюг), однак синтез кожного з них проходить лише в напрямку $5' \rightarrow 3'$;
- ділянка ДНК, яка повністю самовідтворюється у процесі реплікації має назву *реплікону*. У клітинах прокариот реплікон є аналогом хромосоми і являє собою *монорепліконну* систему, а в еукаріотичних клітинах кожна хромосома є *полірепліконною* системою;
- реплікон містить специфічні сигнали початку та закінчення реплікації (точки *ori* і *ter*);
- процес реплікації забезпечує складний реплікативний комплекс, який включає велику кількість факторів і має назву *реплісоми*.

Для перебігу реплікації необхідна наявність:

- 4 видів рибо- і дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатів (АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ та дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дУТФ) ;
- затравного ланцюга РНК-кової структури – *праймера (затравки)*, що зумовлено особливістю функціонування ферменту ДНК-залежної ДНК-полімерази III;
- білкових факторів, які забезпечують початок реплікації, формування дочірніх ланцюгів ДНК, завершення реплікації та постреплікативну модифікацію і репаративні процеси;
- комплексу ферментів, необхідних для перебігу реплікації: ініціації, елонгації, термінації;
- іонів Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , які виконують роль кофакторів ряду ферментів, забезпечують іонізацію азотистих основ нуклеотидів та утворюють реакційно здатні хелатні комплекси.

Білкові фактори необхідні для:

- пізнавання сайту початку реплікації (точки *ori*) відповідними ферментами та зв'язування їх з ДНК;
- утворення реплікативної вилки з вивільненням одноланцюгових матриць;
- стабілізації утвореної структури;
- синтезу затравних ланцюгів на структурі матриці;
- перебігу полімеразної реакції;
- транслокації праймосоми в межах реплікону;
- енергозабезпечення процесу реплікації;
- завершення реплікації;
- поновлення структури матриці.

Вказані процеси забезпечують специфічні ДНК-розкручуючі, ДНК-зв'язуючі та ДНК-дестабілізуючі білки (топоізомерази, свівелази, хелікази, гірази), білки активатори праймази, β -білок, η -білок та інші.

Значна кількість білкових факторів задіяна також у завершенні реплікації та наступному поновленні спіралізованої структури ДНК.

Ферментні системи забезпечують:

- початок реплікації (ініціацію);
- синтез праймера на ведучому ланцюгу та фрагментів Оказаки на запізнюючому;
- перебіг полімеразної реакції – синтез ведучого і запізнюючого ланцюгів;
- вирізання РНК-ових фрагментів та забудову утворених прогалин;
- формування нативних дочірніх ланцюгів, комплементарних до матриці, завершення реплікації та репарацію можливих помилок реплікації.

Характерною особливістю ферментів реплікації є те, що вони мають олігомерну структуру і володіють кількома видами ферментативної активності.

Білкові фактори і ферменти реплікації входять до складу реплікативного комплексу, який забезпечує перебіг цього процесу на ведучому та запізнюючому ланцюгах.

Склад реплікативних комплексів та їх функції у клітинах про- і еукаріот подібні, хоч існують певні особливості, зумовлені організацією їх генетичних структур.

2. РЕПЛІКАЦІЯ В КЛІТИНАХ ПРОКАРІОТ

Цей процес у клітинах прокаріот має певні особливості, зумовлені тим, що їх геномна ДНК не асоційована з білками і має специфічну організацію у вигляді лінійних чи кільцевих одно- або дволанцюгових форм, які можуть знаходитися у спіралізованому стані (закручені самі на себе), без участі гістонових білків.

Специфічною особливістю реплікації в бактеріальних клітинах є те, що перед її початком проходить суперспіралізація ДНК, яка необхідна для перевірки цілісності ДНК, що є важливим для наступного перебігу реплікації. Крім того, в суперспіралійній формі легше, ніж у кільцевій, розходяться комплементарні ланцюги ДНК та утворюється реплікативна вилка. Молекула ДНК, здатна до автономної реплікації, отримала назву **реплікону**. Реплікон містить всі необхідні гени і регулятор послідовності, які забезпечують регульоване подвоєння його ДНК. Ділянка реплікона, в якій починається реплікація, називається **реплікатором** або точкою **ori** (від англ. origin - початок), у *E. coli* – *ori C*.

При ініціації реплікації ініціатор, який кодується репліконом (у *E. coli* – білок Dna A), взаємодіє з реплікатором. У *E. coli* ціла хромосома є репліконом (у еукаріот репліконом називають відрізок ДНК, реплікація якого протікає під контролем єдиної точки початку реплікації.) Реплікатор містить специфічне чергування нуклеотидів (ділянку багату АТ-парами), що полегшує розходження ланцюгів. Реплікація в клітинах прокаріот відбувається за участю білкових факторів і ферментів, що входять до складу реплікативного комплексу:

<i>Білкові фактори (активність, функції)</i>	<i>Ферменти (активність, функції)</i>
Dna A (АТФ-азна) розпізнавання сайту реплікації	ДНК-залежна ДНК полімераза I (екзонуклеазна 5'→3' та 3'→5', 5'→3' полімеразна)
Dna B (хеліказна) утворення одноланцюгової ДНК-матриці	ДНК-залежна ДНК полімераза II, (3'→5' та 5'→3', екзонуклеазна) видалення праймерів
Dna C (лігазна) об'єднання факторів реплікації	ДНК-залежна ДНК полімераза III, (5'→3' - полімеразна, 3'→5' - екзонуклеазна) реплікація ДНК
Dna G (праймазна) синтез праймера	Праймаза (ДНК-залежна-РНК-полімеразна) синтез праймерів
β-білок, білки γ – комплексу (полімеразна) реплікація ведучого і запізнюючого ланцюгів	ДНК-ліаза (ліазна) видалення праймерів
білок π (АТФ-азна) енергозабезпечення руху праймосоми	ДНК-лігаза (лігазна) з'єднання мононуклеотидів після вирізання праймерів
білок τ забезпечує синхронність реплікації ведучого і запізнюючого ланцюга	АТФ-аза (АТФ-азна) гідроліз АТФ та енергозабезпечення процесу реплікації

Ферменти, що забезпечують реплікацію в клітинах прокаріот мають певні особливості:

- ДНК-залежні ДНК-полімерази I, II і III складаються з кількох субодиноць та володіють кількома видами ферментативної активності;
- ДНК-залежна РНК-полімераза, або праймаза, у вигляді субстратів для синтезу використовує рибонуклеозид-5'-трифосфати, а як матрицю – один з ланцюгів ДНК і проводить синтез коротких затравних фрагментів з РНК-овою структурою (праймером);
- ДНК-лігази необхідні для з'єднання мононуклеотидів після вирізання праймерів та формування запізнюючого полінуклеотидного ланцюга;
- ДНК-ліази забезпечують видалення праймерів;
- АТФ-аза необхідна для вилучення енергії та забезпечення перебігу лігазної реакції.

Головним ферментом реплікації у клітинах прокаріот є *ДНК-полімераза III*. Фермент має олігомерну природу і складається з 10 субодиноць (α, β, γ, δ, δ', ε (епсілон), θ (тета), τ (тау), χ (чі), ψ (пси)). Для реплікації необхідна повна форма ферменту (холоензим), який містить набір всіх субодиноць.

Субодиноці ферменту утворюють два протомери, тобто фермент є димером, який фіксує комплекс інших полімераз на певній ділянці ДНК і запобігає їх дисоціації. Для ДНК-полімерази III характерні два види ферментативної активності: *5'→3'-полімеразна (проводить нарощування*

ланцюга, комплементарного до матриці 5'→3') і 3'→5'-екзонуклеаза (корегує помилки реплікації).

Для ДНК-полімерази II характерні два види ферментативної активності: 3'→5'- та 5'→3'-екзонуклеаза. За участю цього ферменту проходить видалення праймерів на запізнюючому ланцюгу ДНК.

ДНК-полімераза I характеризується трьома видами ферментативної активності: 5'→3'-екзонуклеазною (відщеплює нуклеотиди від 5'-кінця РНК-затравки кожного попереднього фрагменту Оказакі), 3'→5'-екзонуклеазною (корегує можливі помилки на подовженому фрагменті ДНК) та 5'→3'-полімеразною (приєднує дезоксирибонуклеотиди до 3'-кінців фрагментів).

Для перебігу реплікації важливими є також білкові фактори, за участю яких проходять всі етапи реплікації: ініціація, елонгація та термінація.

- ініціаторний білок Dna A розпізнає сайт початку реплікації та сприяє об'єднанню решти білкових факторів, які приймають участь в ініціації реплікації, так званих, допоміжних білків;
- білок Dna B, для якого характерна хеліказна активність, бере участь у розкручуванні хеліксу ДНК;
- білок Dna C забезпечує взаємодію праймази з матричним ланцюгом ДНК;
- білок Dna G неохідний для синтезу праймера на запізнюючому ланцюгу ДНК і відіграє важливу роль в ініціації реплікації;
- білок ν' володіє АТФ-азною активністю та постачає енергію для руху праймосоми;
- білки γ -комплексу необхідні для розпізнавання праймерів на матричних ланцюгах ДНК;
- білок τ забезпечує синхронність реплікації ведучого і запізнюючого ланцюга, збірку і димеризацію холоферменту ДНК-полімерази;
- β -білок стимулює активність білків γ -комплексу;
- tus -білок гальмує активність хелікази та зумовлює термінацію реплікації.

Реплікацію в клітинах прокариот можна розглянути на прикладі перебігу цього процесу в клітинах бактерії *E. coli*, геном якої являє собою дволанцюгову кільцеву молекулу ДНК. Реплікація включає: ініціацію, елонгацію та термінацію.

Ініціація реплікації. Суть процесу в утворенні реплікативної вилки та синтезі праймера. Оскільки для забезпечення напівконсервативного механізму реплікації ДНК необхідна наявність одноланцюгової матриці, важливою умовою початку ініціації є дестабілізація структури ДНК та розкручування дуплексу з утворенням реплікативної вилки.

У бактерії *E. coli* реплікація розпочинається із специфічного сайту початку реплікації – точки *ori C*. На репліконі хромосоми *E. coli* є одна ділянка початку реплікації (*ori C*), яка включає 258 нуклеотидних пар і містить специфічні чергування нуклеотидів, що зв'язують білкові фактори (Dna B, Dna C, Dna G), які забезпечують розкручування дуплексу ДНК та синтез праймера. Для них характерна хеліказна, топоізомеразна (руйнування спіралізованої структури ДНК), гіразна (стабілізація утвореної структури), АТФ-азна та праймазна активність.

Праймери являють собою олігонуклеотидні фрагменти РНК, які включають 8-10 нуклеотидів і містять на 3' кінці вільну ОН-групу.

Синтез праймерів каталізує мультиферментний комплекс – *праймосома*. Праймосома, у свою чергу, є компонентом складнішого комплексу – *реплісоми*, до складу якого входить цілий ряд ферментів та білкових факторів. За участю реплісоми проходить АТФ-залежне формування димерного комплексу холоферменту ДНК-полімерази III, зв'язаного з 3'-кінцями праймерів. Розпочинається синтез праймера із приєднання ДНК-зв'язуючого білка до стартової точки ведучого полінуклеотидного ланцюга матриці. Далі, за участю праймази, синтезується затравний ланцюг РНК, який комплементарний до матриці ДНК. Після закінчення синтезу на ведучому ланцюгу, праймосома приєднується до ланцюга, що запізнюється та за участю β -білка ініціює синтез на ньому не одного, а кількох праймерів. По ланцюгу ДНК, що запізнюється, праймосома рухається до наступного місця ініціації в напрямку, протилежному напрямку синтезу ДНК (3'→5'), але однонапрямленому з реплікативною вилкою, синтезує затравку і знову переміщується вперед. Враховуючи це, β -білок називають мобільним промоутором реплікації. Енергія для руху праймосоми забезпечується АТФ-азною активністю білка n'.

Тобто синтез праймера проходить як на ведучому, так і на запізнюючому ланцюгах. Для кільцевих молекул ДНК прокаріот характерна двоспрямована реплікація: реплікативні вилки від точки *ori* рухаються у двох напрямках. За участю хеліказної і праймазної активності білкових факторів проходить їх спржене функціонування: хелікази розплітають дуплекс ДНК, а праймази забезпечують синтез праймерів (рис. 8).



Рис. 8. Ініціація реплікації

Необхідність такого механізму ініціації зумовлена тим, що ДНК-полімераза III не може самостійно розпочати синтез ДНК на структурі матриці з використанням вільних нуклеозид-5'-трифосфатів. Тому для початку синтезу ДНК (ініціації дії ДНК-полімерази III) необхідна затравка, яка б містила вільну 3'-ОН-групу, за допомогою якої може відбуватися полімеразна реакція – подовження полінуклеотидного ланцюга ДНК.

Елонгація реплікації. Включає процеси подовження полінуклеотидних ланцюгів ДНК та сполучення синтезованих фрагментів з

утворенням комплементарних копій (дочірніх ланцюгів). У цьому процесі задіяний реплікативний комплекс, до складу якого входить ДНК-залежна-ДНК-полімераза III, β -білок і білки γ -комплексу, необхідні для розпізнавання праймерів на матричних ланцюгах ДНК.

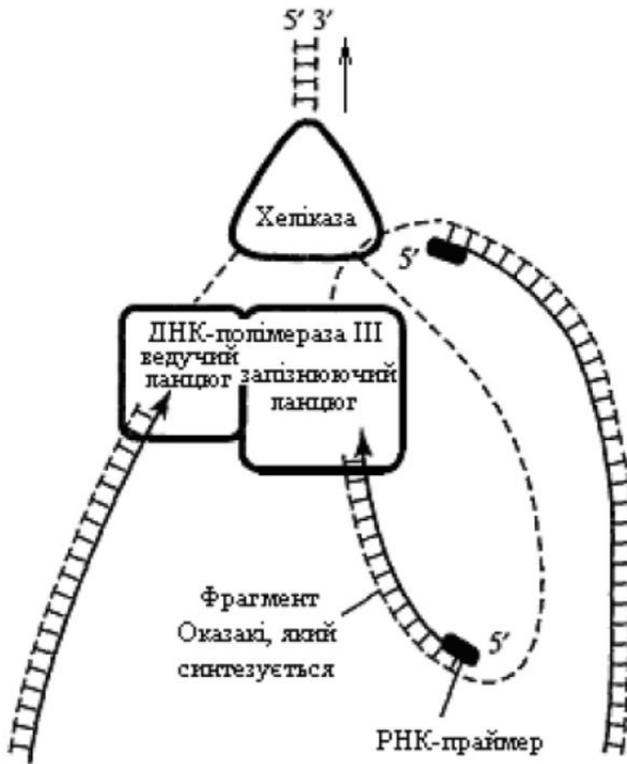
Білки γ -комплексу зв'язуються з єдиним праймером на ведучому ланцюгу, а також з кожним із праймерів на запізнюючому. Далі, за участю β -білка, до праймерів приєднується ДНК-залежна ДНК-полімераза III. Димер β -білка утворює кільце навколо ланцюгів ДНК, що реплікуються, і стимулює АТФ-азну активність білків γ -комплексу. Це зумовлює доступність 3'-кінця праймера для ферменту ДНК-полімерази III.

Білки γ -комплексу та β -білок, як правило, зв'язані з системою праймер – матриця, що сприяє перебігу реплікації за участю ДНК-залежної ДНК-полімерази III, для якої характерна ДНК-полімеразна та нуклеотидилтрансферазна активність. Тобто, ДНК-полімераза III активує два субстрати: з'єднаний за принципом комплементарності з матрицею кінець затравки, яка містить вільну 3'-ОН-групу рибози, та дезоксирибонуклеозид-5-трифосфати (дНТФ), що надходять з середовища. За участю ферменту дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфат приєднується до атома Оксигену 3'-ОН-групи рибози. Результатом цього є утворення 5'→3'-фосфодиефірного зв'язку та вивільнення пірофосфату. Продукт реакції містить вільну 3'-ОН-групу, по якій знову повторюється полімеразна реакція, що дістала назву „ріст з хвоста“:

У результаті багаторазового повторення цієї реакції відбувається поступове комплементарне нарощування дочірнього ланцюга. Дослідженнями японського вченого Р. Оказакі (1968 р.) встановлено, що реплікація запізнюючого ланцюга відбувається не безперервно, як ведучого, а фрагментарно, оскільки на цьому ланцюгу ініціюється синтез не одного праймера, а їх великої кількості, внаслідок подовження яких по 3'-ОН-групи утворюються фрагменти, які дістали назву *“фрагментів Оказакі”*. Чергування дезоксирибонуклеотидів на синтезованих фрагментах комплементарні до відповідної ділянки матричного ланцюга.

Поступове нарощування фрагментів Оказакі ферментом ДНК-залежною-ДНК-полімеразою триває доки не досягне місця локалізації наступної затравки, з якої розпочинається ріст нового фрагменту. Ведучий і запізнюючий ланцюги ДНК реплікуються синхронно завдяки участі в цьому процесі димерного ДНК-полімеразного комплексу.

Утворення цього комплексу відбувається за участю білка τ (однієї з субодиниць олігомерного комплексу ДНК-полімерази III). На структурі реплікативної вилки один і той же димерний комплекс проводить як високопроцесивний безперервний синтез ведучого ланцюга, так і фрагментарний синтез запізнюючого:



Мірою процесивності є довжина фрагменту, який синтезується в одному циклі реплікації без від'єднання димера від матриці.

Для з'єднання фрагментів Оказаки необхідне видалення праймерів. Це відбувається внаслідок дії 5'→3'-екзонуклеазної активності ДНК-полімерази I. Після видалення рибонуклеотидів праймера проходить їх заміна на відповідні дезоксирибонуклеотиди. Далі, кінці прогалин, за участю ферменту ДНК-лігази, з'єднуються між собою, внаслідок чого формується суцільний запізнюючий дочірній ланцюг ДНК. Репліковані ланцюги утворюють дві дочірні молекули ДНК, кожна з яких містить один батьківський та один дочірній ланцюги і є точною копією вихідної молекули.

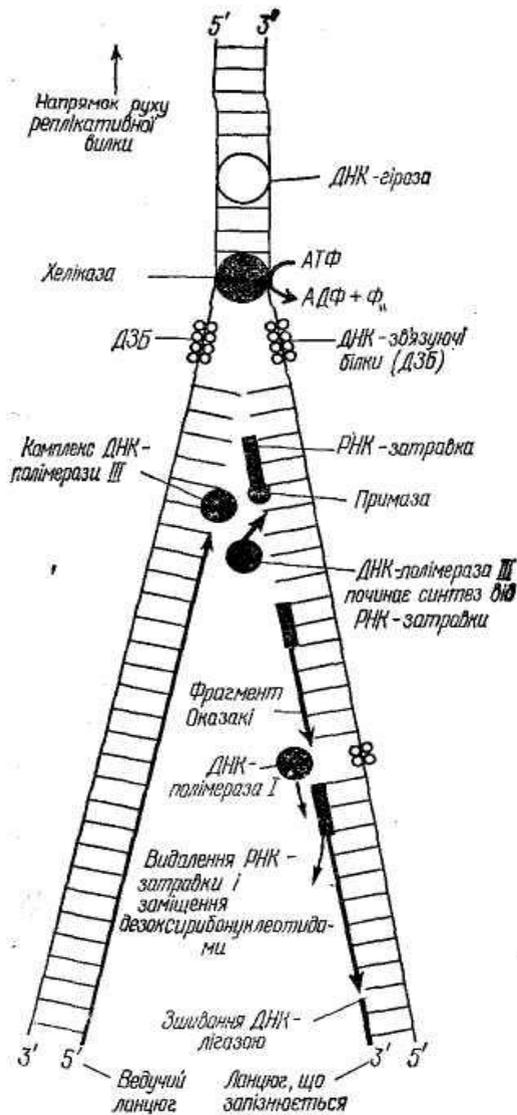


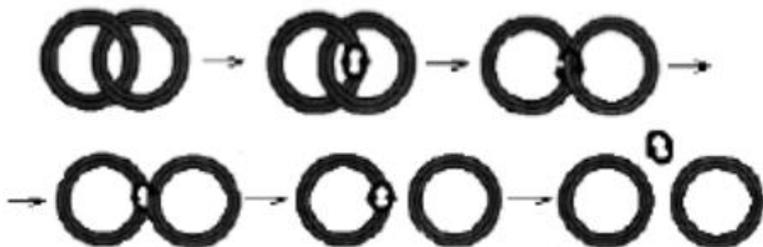
Рис. 9. Реплікативна вилка

Термінація реплікації. Механізм термінації реплікації, або завершення синтезу ДНК, має свої особливості. В геномі деяких бактерій термінація відбувається за участю специфічного термінатора, в інших геномах

такий термінатор відсутній. Тому припускають, що реплікація у прокаріот завершується після того, як вичерпується матриця (у бактерій, які містять лінійні дволанцюгові ДНК) або коли при подвоєнні кільцевих молекул ДНК зустрічаються дві реплікативні вилки. Закінчення процесу реплікації у клітинах бактерії *E. coli* відбувається на сайті *ter*, розміщеному на протилежній до точки *ori* ділянці кільцевої молекули.

На структурі хромосоми *E. coli* міститься 6 *ter*-сайтів. Вважають, що специфічний білок *tus* зв'язується з *ter*-сайтами і припиняє дію хелікази (білка Dna B). Синтез ведучого ланцюга завершується на першому нуклеотиді, розміщеному біля місця зв'язування цього білка. Сайти термінації спрацьовують лише в одному напрямку. Для кожного циклу реплікації використовується лише один сайт термінації. Реплікативна вилка, яка зупиняється на цьому сайті, зустрічається з іншою, що наближається з протилежного кінця.

Внаслідок росту ведучого і запізнюючого ланцюгів вздовж кільцевої матриці проходить зближення 3'- і 5'-кінців одного ланцюга або в точці початку реплікації (при однонаправленій реплікації), або посередині кільця (при двонаправленій реплікації). В цьому випадку, кільця зв'язуються ДНК-лігазою, внаслідок чого утворюються дві зчеплені одна з одною кільцеві молекули ДНК – *катенани* – циклічні структури, об'єднані між собою подібно до окремих ланок у ланцюгу. Утворені катенани за участю ферменту топоізомерази IV розділяються, внаслідок тимчасового дволанцюгового розриву, результатом чого є утворення двох дочірніх дволанцюгових кільцевих молекул ДНК та повне розділення утворених бактеріальних хромосом до початку поділу клітини:



Процес реплікації проходить з досить високою швидкістю: 1000—2000 нуклеотидів за секунду у прокаріот і близько 100 нуклеотидів у еукаріот. Для цього процесу характерна велика точність. Так, у процесі реплікації на 10^{10} пар нуклеотидів трапляється лише одна помилка. Вилучення помилково включеного нуклеотиду (наприклад, урацилу замість тиміну), зумовлює миттєве його видалення із синтезованого полінуклеотидного ланцюга, і на його місце вводиться тимін. Забезпечення точності реплікації є одним з важливих етапів передачі спадкової інформації від одного покоління до іншого. Вважається, що важливу роль у «ремонтних» роботах відіграє фермент ДНК-полімераза II.

3. РЕПЛІКАЦІЯ ДНК У КЛІТИНАХ ЕУКАРІОТ

Основні риси реплікації у клітинах про- і еукаріот подібні: це стосується механізму ініціації, фрагментарного синтезу на запізнюючому ланцюгу, РНК-праймерного початку реплікації. Різниця стосується, як правило,

складу ферментних систем, білкових факторів, що забезпечують перебіг цього процесу та окремих механізмів його регуляції.

Реплікативна вилка в клітинах еукаріот також асиметрична і має Y-подібну форму, тому реплікація ДНК одного ланцюга дещо випереджає реплікацію іншого. Перший ланцюг, який рухається до реплікативної вилки, має назву ведучого, а другий – запізнюючого. Ведучий і запізнюючий ланцюги синтезуються в напрямку $5' \rightarrow 3'$.

Перебіг реплікації у клітинах еукаріот відбувається за участю ферментів і білкових факторів.

Ферменти реплікації – ДНК-залежні ДНК-полімерази α , β , γ , δ , ϵ і ζ (дзета) утворюють мультиферментний реплікативний комплекс у складі якого кожен з них виконує специфічні функції:

- α , σ і ϵ (реплікативні ДНК-полімерази) забезпечують синтез ведучого і запізнюючого ланцюгів;
- ДНК-полімераза β необхідна для репарації помилок реплікації;
- ζ -полімераза проводить SOS-репарацію;
- γ -полімераза забезпечує реплікацію мітохондріальної ДНК. Тобто, функції окремих компонентів реплікативного комплексу різні.

Тобто, для кожного із вказаних компонентів мультиферментного комплексу характерна специфічна ферментативна активність:

Білкові фактори та ферменти реплікації клітин еукаріот

<i>Ферменти (активність, функції)</i>	<i>Білкові фактори (активність функції)</i>
ДНК-полімераза α (полімеразна) синтез праймерів на ланцюгах ДНК, приєднання праймази	PCNA (лігазна) білок утворення комплексу з ДНК-полімеразою σ , фактор процесивності
ДНК-полімераза β (полімеразна) процесінг фрагментів Оказакі	RFC (полімеразна) реплікативний фактор, активація ферменту ДНК-полімерази 2
ДНК-полімераза σ (полімеразна, $3' \rightarrow 5'$ -екзонуклеазна) синтез ведучого ланцюга	білок FEN1 (ліаза) фактор дозрівання, видалення праймерів
ДНК-полімераза γ ($3' \rightarrow 5'$ -екзонуклеазна, полімеразна) реплікація і репарація мітохондріальної ДНК	MF1 (ліаза) видалення праймерів
ДНК-полімераза ϵ (полімеразна) синтез запізнюючого ланцюга	білок Rev 3 (ліаза) фактор репарації, репарація помилок реплікації
ДНК-полімераза ζ (полімеразна) SOS-репарація	білок Rev 7 (лігазна) фактор репарації
ДНК-лігаза S (лігазна) з'єднання фрагментів Оказакі	
РНК-аза H1 (ліаза) видалення праймерів	

В активних центрах ДНК- і РНК-полімераз містяться йони Zn^{2+} , та Mg^{2+} , які з іонізованими функціональними групами азотистих основ нуклеотидів утворюють функціонально-активні хелатні комплекси.

Білкові фактори реплікативного комплексу клітин еукаріот також виконують специфічні функції. Зокрема, білок PCNA (фактор процесивності реплікації) і RFC (фактор реплікації C) утворюють стабільний комплекс з ДНК-полімеразою δ і стимулюють активність ДНК-полімерази ϵ . При реплікації у клітинах еукаріот вони виконують роль, подібну до β -білка і білків γ -комплексу *E. coli* – забезпечують реплікацію ведучого та запізнюючого ланцюгів ДНК. Білок FEN1 та MF1 (фактори дозрівання) разом з РНК-азою H1 видаляють праймери на дочірніх ланцюгах ДНК. Білки Rev3 і Rev7 необхідні для репарації помилок реплікації.

Реплікація у клітинах еукаріот, як і у прокариот, також включає: ініціацію, елонгацію і термінацію. Ці процеси відбуваються подібно до відповідних етапів реплікації у клітинах прокариот.

Одночасно з цим, реплікація у клітинах еукаріот має і певні специфічні риси:

- для вищих організмів характерний складніший механізм ініціації: множинність репліконів, жорсткий порядок включення їх протягом S-фази клітинного циклу – на початку, посередині і наприкінці, часова узгодженість наступних актів лігування ДНК по фланкуючих реплікони кінцях, складний зв'язок реплісом з ядерним матриксом та своєрідний механізм реплікації теломерних ділянок еукаріотичних хромосом;
- реплікація ДНК в клітинах еукаріот відбувається лише в S-фазі клітинного циклу і проходить на специфічних структурах, асоційованих з дифузним ядерним матриксом. В їх складі виявлено *синтесоми*, які включають більше 30 білкових факторів (мультибілковий 21S комплекс);
- кластери реплікативних вилок активуються одночасно в усіх хромосомах;
- самостійні одиниці реплікації ДНК мають назву *репліконів*. Їх реплікація проходить незалежно один від одного;
- ДНК еукаріот являє собою полірепліконну систему, що містить велику кількість репліконів, з середини яких у двох напрямках рухаються реплікативні вилки;
- реплікативні вилки на структурі ДНК зосереджені нерівномірно: на одних ділянках міститься їх велика кількість, а на інших вони менш чисельні. На хромосомах еукаріот реплікативні вилки згруповані у специфічні реплікативні одиниці, які можуть включати від 20 до 80 сайтів початку реплікації;
- утворення нових реплікативних вилок проходить поступово під час S-фази клітинного циклу до того часу, доки не завершиться реплікація всієї хромосомної ДНК;
- реплікативні вилки рухаються із швидкістю 100 нуклеотидів за секунду. Тобто в 10 разів повільніше, ніж у прокариот, що, очевидно, зумовлене суперспіралізацією хроматину;

- сайти початку і закінчення реплікації локалізовані на певних ділянках геному, які містять специфічні чергування нуклеотидів;
- відстань між точками *ori* приблизно дорівнює відстані між сусідніми доменними структурами хроматину. На кожній доменній структурі є лише один сайт початку реплікації;
- на структурі хромосом еукаріот утворюється велика кількість стартових точок реплікації *ori* (оріджинів) – від 10 до 100 тисяч, розміщених на певних ділянках полінуклеотидного ланцюга ДНК;
- синтез ведучого і запізнюючого ланцюга каталізують різні ДНК-полімерази, відповідно α і δ , тоді як у прокаріотичних клітинах, зокрема, у клітинах бактерії *E. coli* обидва ланцюги синтезуються за участю димерів ДНК-полімерази III;
- у клітинах еукаріот ДНК-полімераза α забезпечує ініціацію реплікації на ведучому ланцюгу в точках початку реплікації, а ДНК-полімераза δ – циклічну реініціацію синтезу фрагментів Оказакі на запізнюючому;
- видалення праймерів з РНК-овою структурою у клітинах еукаріот відбувається за участю $5' \rightarrow 3'$ -екзонуклеази і РНК-ази H, а з'єднання кінців, забудованих прогалин, – за участю ДНК-лігази I;
- реплікація у клітинах еукаріот відбувається за принципом „все або нічого” тобто, якщо процес розпочався в S-фазі, він продовжується до повного його завершення. Такий перебіг реплікації реалізується внаслідок специфічного пізнавання певних ділянок хромосом, деконденсації їх, що створює рівні умови для пізнавання сайтів реплікації за участю специфічних білкових факторів. Це, у свою чергу, ініціює зміну структури решти хроматину та сприяє перебігу реплікації на інших ділянках хроматину.

Ініціація реплікації у еукаріот. Швидкість синтезу ДНК у еукаріот істотно нижче, ніж у прокаріот (приблизно 50 нуклеотидів за 1 с у людини). Мабуть, з цієї причини ініціація синтезу ДНК еукаріот відбувається в багатьох точках хромосоми, тобто еукаріотичні хромосоми мають полірепліконну організацію.

Ініціація реплікації у еукаріот відбувається на специфічних множинних послідовностях нуклеотидів – реплікаторах, або оріджінах реплікації. Найбільш вивчені реплікатори дріжджів, вперше ідентифіковані як послідовності, що автономно реплікуються (ARS - *autonomously replicating sequences*). У дріжджів на ділянці ДНК довжиною 5 тис. нуклеотидних пар знаходиться три окремих реплікатора (ARS). У ссавців області початку реплікації розташовуються на відстані ~ 100 тис. нуклеотидних пар один від одного. Встановлено, що синтез ДНК в окремих репліконах відбувається в двох напрямках, причому переміщення реплікативної вилки здійснюється переважно в одному напрямку, яке може змінюватися в залежності від стадії розвитку організму. Частота використання окремих реплікаторів змінюється в онтогенезі, зменшуючись в клітинах дорослого організму. Реплікатори еукаріот відрізняються між собою за послідовністю, але мають кілька ділянок гомології: ДНК-розплітаючі елементи, ділянки прикріплення до ядерного матриксу, піримідинові тракти, канонічні послідовності, які взаємодіють з білками реплікативного комплексу, АТ-багаті

послідовності, ділянки вигинів ДНК і інші, в більшості своїй місця впізнання відповідальних за ініціацію реплікації ядерних білків.

Ініціація реплікації строго регулюється. Полірепліконна організація вимагає, щоб в кожному циклі клітинного ділення кожен реплікатор «спрацював» тільки один раз, в іншому випадку на хромосомі утворюються розгалужені структури. Для дждржових ARS-послідовностей ініціація відбувається один раз в кожній S-фазі клітинного циклу. У вищих еукаріот досить довгі ділянки хромосом, що містять кілька сусідніх репліконів, починають синтез ДНК в S-фазі приблизно одночасно, але кожна така ділянка має характерний для нього час ініціації реплікації: одні активуються на початку S-фази, інші - пізніше, а треті - в кінці. Таким чином, існує заборона на повторну ініціацію реплікації в тому ж циклі клітинного ділення, хоча одночасно може відбуватися ініціація на інших, які не спрацювали раніше реплікаторах. Деякі дані вказують на те, що подібна заборона знімається в ході мітозу, коли ядерна оболонка розпадається. Це призводить до ампліфікації (появи множинних копій) тієї чи іншої ділянки хромосоми, де сталася «зайва» ініціація реплікації.

Елонгація реплікації. Чотирьохсубодинична ДНК-полімераза α утворює функціональні комплекси з низкою ферментів і допоміжних білків. У комплексі, що здійснює реплікацію ведучого ланцюга, ДНК-полімераза α зв'язана з ДНК-полімеразою δ , а в комплексі, що синтезує відстаючий ланцюг, - з ДНК-полімеразою ϵ . У еукаріот обидва комплекси зв'язані, ймовірно, одним з одним в реплікативній вилці подібно до того, як зв'язані холоферменти синтезу лідируючого і відстаючого ланцюгів у прокаріот.

Еукаріотична ДНК-праймаза на відміну від аналогічного білка прокаріотів утворює постійний комплекс з ДНК-полімеразою α , роль якого обмежується синтезом праймерів при реплікації обох ланцюгів ДНК.

Білок PCNA і фактор реплікації C (RFC) також утворюють стабільний комплекс з ДНК-полімеразою δ , а в певних умовах стимулюють і активність ДНК-полімерази ϵ . У багатьох відношеннях PCNA і RFC є функціональними аналогами відповідно β -білка і білків γ -комплексу *E. coli*. Механізми реплікації ДНК про- і еукаріот істотно відрізняються в тому відношенні, що в другому випадку синтез ведучого і відстаючого ланцюгів ДНК здійснюють різні ДНК-полімерази (δ і ϵ відповідно), тоді як у *E. coli* обидва ланцюга ДНК синтезуються димером ДНК-полімерази III.

Дозрівання фрагментів Оказаки у еукаріот вимагає видалення РНК-затравок за допомогою 5' \rightarrow 3'-екзонуклеази (білкові фактори FEN1 або MF1) і РНКазы H1. ДНК-полімераза β заповнює проломи, рівні вирізанним праймерів, а ДНК-лігаза I з'єднує фрагменти відстаючого ланцюга.

Термінація реплікації. Просування реплікативної вилки припиняється тільки при зіткненні з іншого вилкою, що рухається в протилежному напрямку, або при досягненні кінця хромосоми. Після збірки на молекулі ДНК хромосомних білків кожна пара хромосом в процесі мітозу впорядковано розділяється по дочірнім клітинам. Реплікація відбувається в S-фазу клітинного циклу. Відомо, що в регуляції клітинного циклу беруть участь білки цикліни (A, B, D, E). Вони активують циклінзалежні протеїнкінази, і ті можуть фосфорилувати специфічні білки, які беруть участь в підготовці клітини до поділу. Так, циклін D регулює перехід клітини з G1-фази в S-фазу; цикліни A і E

- активують синтез ДНК на початковій стадії S-фази; циклін В регулює перехід клітини з G 2-фази в M-фазу.

4. ПОСТРЕПЛІКАТИВНА МОДИФІКАЦІЯ ДНК

Після реплікації молекули ДНК зазнають специфічної постреплікативної модифікації, яка є необхідною умовою функціонування їх у клітинах.

Одним з важливих механізмів постреплікативної модифікації ДНК є метилювання азотистих основ нуклеотидів. Цей процес відбувається відразу по закінченню реплікації, або через певний проміжок часу після її завершення, за участю ферментів метилаз, які функціонують в ядрі та мітохондріях. Кофактором цих ферментів є S-аденозилметіонін. Метилюються не всі азотисті основи нуклеотидів, а переважно залишки цитозину (близько 5%).

Метилювані залишки розміщені на структурі ДНК нерівномірно. Вони локалізовані лише на окремих локусах – промоуторних ділянках та в центромерному гетерохроматині еукаріот, а також на спейсерних послідовностях у прокаріот. Відомо, що в комплементарних парах азотистих основ нуклеотидів зв'язок між АТ-парами міцніший, ніж між АУ: додаткова метильна група тиміну посилює гідрофобні властивості азотистої основи і, разом з наявністю дезоксирибози, сприяє формуванню дволанцюгової молекули ДНК. Метилювання цитозину в С5-положенні піримідинового циклу виявляє подібний ефект: стабілізує і зміцнює зв'язки між ГЦ-парами та з'єднує ланцюги ДНК на певних локусах. Під час старіння клітин знижується як активність метилаз, так і кількість 5-метилцитозину в структурі ДНК, що, очевидно, є одним з проявів старіння клітин на рівні геному.

Одночасно з цим, у пухлинних клітинах активність ДНК-метилаз підвищується, внаслідок чого зростає вміст 5-метилцитозину. Цей ефект спостерігається в іморталізованих клітинах як *in vivo*, так і *in vitro*. Підвищення рівня 5-метилцитозину є необхідною, однак не єдиною причиною пухлинного росту.

Метилювання цитозину, очевидно, забезпечує регуляцію активності генів, оскільки існує позитивна кореляція між функціональною активністю клітин і вмістом 5-метилцитозину. Непрямим доказом цього є також те, що інтенсивно метилюються переважно промоуторні ділянки генів, яким належить важлива роль у регуляції транскрипції та синтезі генних продуктів. Ще одним важливим наслідком метилювання ДНК є те, що посилення цього процесу на центромерних ділянках запобігає передчасній їх реплікації, яка повинна проходити не в S-фазі хромосом, а перед розходженням хроматид – в анафазі.

На відміну від клітин еукаріот, роль метилювання азотистих основ ДНК у прокаріот була з'ясована значно пізніше. Виявилось, що бактеріальні ДНК-метилази, переважно, входять до складу системи модифікації і рестрикції. Крім ДНК-метилаз ця система включає і ендонуклеази (рестриктази), здатні вирізати певні чергування нуклеотидів.

Метилювання сайтів на структурі ДНК запобігає дії ферментів рестриктаз з тією ж сайт-специфічністю. У зв'язку з цим, метилювана молекула ДНК бактеріальних клітин не руйнується рестриктазами, на відміну від чужерідної ДНК, яка проникає у клітину. В цьому випадку система рестрикції і модифікації захищає бактеріальні клітини від вірусів та бактеріофагів.

У клітинах про- і еукаріот присутній також інший вид метилювання, пов'язаний з репарацією помилок реплікації. Роль акцептора метильної групи, в цьому випадку, в структурі ДНК бактерій виконує аденін, а в еукаріотичних клітинах – гуанін. Метильовані азотисті основи нуклеотидів (6-N-метиладенін і 6-O-метилгуанін) є специфічними мітками на батьківському ланцюгу ДНК, які пізнають системи репарації та забезпечують корегування помилок реплікації.

Контрольні запитання:

1. Закономірності матричного синтезу ДНК.
2. Необхідні умови та фактори для проходження реплікації.
3. Особливості проходження реплікації у прокаріот.
4. Ферменти, що забезпечують реплікацію у прокаріот.
5. Ініціація реплікації у прокаріот.
6. Елонгація реплікації у прокаріот.
7. Термінація реплікації у прокаріот.
8. Білкові фактори та ферменти реплікації в еукаріот.
9. Етапи проходження реплікації в еукаріот.
10. Постреплікативна модифікація ДНК.

Тема: ПЕРЕДАЧА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ. ПРЯМА ТА ЗВОРОТНА ТРАНСКРИПЦІЯ

План

1. Загальні закономірності передачі генетичної інформації.
2. Транскрипція у клітинах прокариот.
 - 2.1. Ініціація транскрипції.
 - 2.2. Елонгація транскрипції.
 - 2.3. Термінація транскрипції.
3. РНК-залежний синтез ДНК (зворотна транскрипція).
4. Транскрипція в клітинах вищих еукаріот
 - 4.1. Особливості транскрипції в клітинах вищих еукаріот.
 - 4.2. Посттранскрипційна модифікація первинних транскриптів (процесінг РНК).
 - 4.3. Регуляція транскрипції генів у клітинах еукаріот.

1. ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ПЕРЕДАЧІ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ

Транскрипція (від грецького *transkriptio* – переписування) – другий вид матричного синтезу та перший етап експресії генів у представників різних таксономічних груп. Результатом транскрипції є передача видоспецифічної генетичної інформації між різними видами нуклеїнових кислот ДНК → РНК (пряма транскрипція) або РНК → ДНК (зворотна транскрипція в РНК-геномних вірусів).

На відміну від реплікації, яка тісно пов'язана з поділом клітини, транскрипція відбувається в усіх клітинах незалежно від їх поділу, під час будь-якої фази мітотичного циклу в еукаріот, крім періоду реплікації. У прокариот, в яких клітинний цикл нетривалий, реплікація і транскрипція можуть відбуватися одночасно, однак на різних ділянках кільцевої молекули ДНК. Транскрипція окремих генів може проходити багаторазово, залежно від потреб клітини.

Внаслідок транскрипції синтезуються всі види РНК: іРНК, тРНК, рРНК, які виконують специфічні функції в забезпеченні метаболізму клітини. Основою транскрипції, як і реплікації, є фундаментальний принцип комплементарності азотистих основ нуклеотидів, що входять до складу полінуклеотидних ланцюгів РНК і ДНК. Під час транскрипції матриця переписується за принципом комплементарності: кожна синтезована молекула РНК комплементарна лише певній ділянці матричного ланцюга ДНК.

У більшості видів вищих організмів, ДНК це дволанцюгова молекула, яка складається із взаємокомплементарних антипаралельних ланцюгів, що мають напрям $3' \rightarrow 5'$ та $5' \rightarrow 3'$. Одночасно з цим, транскрибується, як правило, один з них – матричний ланцюг.

Фермент, який забезпечує транскрипцію – ДНК-залежна РНК-полімераза, каталізує цей процес синтезу нового ланцюга в напрямку $3' \rightarrow 5'$. Тобто, матричний ланцюг ДНК має напрям $3' \rightarrow 5'$ і є комплементарним до транскрибованої іРНК, напрям якої $5' \rightarrow 3'$.



Внаслідок транскрипції в структурі РНК комплементарно відтворюється генетична інформація, закодована в змістовому, кодуєчому ланцюгу ДНК.

Тобто, синтезована молекула іРНК комплементарна до матричного ланцюга ДНК і є точною копією другого ланцюга, лише відрізняється за нуклеотидним складом: замість тимінових нуклеотидів містить уридилові. Різні види РНК, як правило, транскрибуються на певних ділянках геномної ДНК.

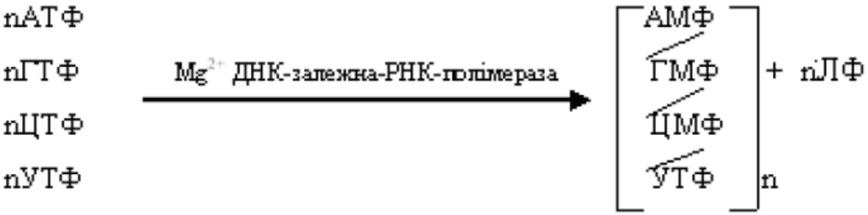
На відміну від реплікації, під час транскрипції транскрибується не вся молекула ДНК, а лише окремі її сайти, тобто використовується локально розкручена матриця.

Сайти ДНК, які зчитуються за принципом комплементарності у процесі транскрипції і несуть інформацію про одну (в еукаріот) чи кілька (у прокаріот) іРНК, включають цистрони або структурні гени і мають назву *одиниці транскрипції (транскриптону)*.

Як правило, він включає ділянки ДНК, які містять регуляторні сигнали початку транскрипції (ініціації) та її закінчення (термінації). У прокаріот ці сигнали знаходяться в межах одного оперону, а у клітинах еукаріот, геном яких не має оперонної організації, вони можуть бути розміщені на різних ділянках геному.

Загальну схему транскрипції було запропоновано А. Коренбергом (1958 р.).

Субстратами, що використовуються для синтезу РНК, є рибонуклеозид-5'-трифосфати, які у процесі полімеризації втрачають пірофосфатні залишки і утворюється полінуклеотид:



Для перебігу транскрипції необхідна наявність:

- локально розкрученої односторонньої матриці;
- ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази;
- чотирьох видів рибонуклеозидтрифосфатів (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ);
- йонів Mg^{2+} , оскільки ДНК-залежна РНК-полімераза активна лише за їх присутності.

Транскрипція має певні особливості, якими вона відрізняється від реплікації:

- синтез всіх трьох видів РНК (іРНК, тРНК, рРНК) забезпечує фермент ДНК-залежна РНК-полімераза для якого характерна нуклеотидилтрансферазна активність;
- *консервативний механізм*: у транскрибованому ланцюгу РНК відсутні елементи матриці;
- для перебігу транскрипції *не потрібна одноланцюгова матриця*: проходить локальне розкручування певних ділянок ДНК, навіть без порушення структури нуклеосом (в еукаріот);
- для початку транскрипції *не використовується РНК-затравка* (полімеризація без затрайвки) *та білкові фактори*;
- на відміну від реплікації, яка проходить лише під час поділу клітин (в інтерфазі), транскрипція відбувається постійно, протягом клітинного циклу;
- інтенсивність транскрипції регулюється за участю специфічних молекулярних механізмів.

2. ТРАНСКРИПЦІЯ У КЛІТИНАХ ПРОКАРІОТ

Вперше процес транскрипції було вивчено у клітинах прокаріот. Деякі дослідження показали, що загальні закономірності цього процесу характерні і для еукаріотичних клітин, хоч і мають певні особливості. Так, у клітинах прокаріот транскрипція відбувається на ділянках ДНК, які мають назву *оперону* або *транскриптону*. Транскриптони у прокаріот обмежені двома ділянками: промотором і термінатором. У бактерій транскрипція проходить на генах оперону, які кодуєть різні РНК. Оперони, як правило, включають чергування нуклеотидів, що визначають структуру кількох іРНК, які є поліцистронними.

Транскрипція включає кілька етапів:

- ініціація транскрипції;
- елонгація транскрипції;
- термінація транскрипції.

2.1. Ініціація транскрипції

Суть ініціації транскрипції полягає у приєднанні до матричного ланцюга ДНК ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази та утворенні відкритого промоторного комплексу.

Фермент ДНК-залежна РНК-полімераза являє собою складний олігомерний комплекс з молекулярною масою 480 тис. Да, який складається з кількох протомерів, що містять дві субодиниці типу α , по одній β і β' та γ субодиницю. Вони виконують структурну функцію, тому мають назву *конститутивних*, і формують основу ферменту (кор), який виявляє каталітичну активність лише після приєднання до нього σ (сігма)-фактора. За цих умов, утворюється активна форма ферменту – холоензим, що володіє специфічними ферментативними властивостями. Всі субодиниці холоензиму зв'язані між собою силами слабкої взаємодії і кожна із них, під час транскрипції, виконує певні функції. Зокрема, β -субодиниця каталізує зв'язування рибонуклеозид-5'-трифосфатів та формування ланцюга

синтезованої РНК, β' -субодиниця забезпечує приєднання ферменту до певних ділянок ДНК, а комплекс субодиниць α і β' необхідний для специфічної взаємодії з промоторною ділянкою ДНК, де проходить ініціація транскрипції. В цих процесах задіяна також і γ -субодиниця ферменту. Слід підкреслити, що таку будову ферменту мають не всі нижчі організми, зокрема, в деяких бактеріофагів він не має олігомерної будови і складається з одного поліпептидного ланцюга, з молекулярною масою 100 кДа.

У прокаріот, геном яких має оперонну організацію, приєднання ферменту до матриці відбувається на ділянці промотора, для якої характерне специфічне чергування мононуклеотидів. На промоторній ділянці прокаріот міститься дві специфічні послідовності нуклеотидів: мінус 35 (-35) та мінус 10 (-10) послідовності, а також стартовий кодон (+1). Перша, (-10) послідовність, або *бокс Прибнова*, знаходиться на відстані 10 нуклеотидних пар від точки старту транскрипції і містить 6-9 пар нуклеотидів (так званий ТАТА-мотив – містить послідовність 5'-ТАТААА-3'). Його функція – локальне розкручування дуплексу ДНК та створення умов для початку транскрипції. Друга, (-35) послідовність (5'-ТТГАГА-3'), розташована на відстані 35 нуклеотидних пар від стартової точки транскрипції (+1) і забезпечує зв'язування ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази, який пізнає місце початку транскрипції.



Після приєднання ферменту до матриці, утворюється *закритий промоторний комплекс*. Далі фермент рухається по матриці і поступово розкручує її перед сайтом транскрипції, внаслідок чого утворюється *лабільний відкритий промоторний комплекс*.

Утворення відкритого промоторного комплексу та локальне розкручування дуплексу внаслідок руйнування водневих зв'язків між комплементарними АТ-парами азотистих основ нуклеотидів відбувається на ділянці ТАТА-боксу (бокс Прибнова). На структурі комплексу проходить транскрипція ділянки ДНК довжиною до 20 мононуклеотидів. Після цього, фермент поновлює структуру ДНК до транскрибованої ділянки, а РНК-транскрипт звільняється з фермент-субстратного комплексу. Швидкість транскрипції РНК бактерії *E.coli* 30 нуклеотидів за секунду, хоч вона може змінюватися (паузи транскрипції).

Ділянки ДНК, на яких проходить утворення відкритих промоторних комплексів, мають вигляд потовщень (кілець Бальбіані), які можна спостерігати в електронному мікроскопі. Утворення цих потовщень є функціональним вираженням активності генів певної ділянки хромосоми.

Встановлено, що у зв'язуванні ферменту з певною ділянкою промотора задіяні 60 нуклеотидів на структурі ДНК. Вибір ланцюга ДНК в ролі матриці визначається напрямом руху ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази, який залежить від нуклеотидної послідовності промоторної

ділянки. Промоутор орієнтований таким чином, що РНК-полімераза може проводити транскрипцію лише в одному напрямку $3' \rightarrow 5'$, а синтезовані транскрипти РНК відповідно мають напрям $5' \rightarrow 3'$.

Після завершення ініціації транскрипції σ -фактор відокремлюється від кор-ферменту і замінюється на фактор елонгації. Наступні етапи синтезу проходять без його участі.

2.2. Елонгація транскрипції

В елонгації транскрипції задіяні два активні центри ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази (Т і Р), які забезпечують комплементарне приєднання рибонуклеозидтрифосфатів, що надходять із середовища, до мононуклеотидів ДНК матриці.

Спочатку Т-центр ферменту зв'язує $3'$ -ОН групу нуклеозидтрифосфату, захопленого з середовища, який є комплементарним до першого нуклеотиду стартового кодону матричного ланцюга ДНК, та приєднує його водневим зв'язком до комплементарної азотистої основи нуклеотиду, що міститься на матриці (сайті ініціації) без виділення пірофосфату. Тобто, перший нуклеотид транскрибованої іРНК на $5'$ -кінці містить трифосфатне угруповання. Оскільки сигналом початку ініціації в стартовій точці транскрипції (+1) є триплет ТАЦ на структурі матричного ланцюга ДНК, то першим нуклеотидом, який приєднується до матриці, буде комплементарний до тимідин- $5'$ -монофосфату аденозин- $5'$ -трифосфат.

Таким чином, на цьому етапі транскрипції, Т-центр ферменту зв'язаний з $3'$ -ОН групою першого нуклеозид- $5'$ -трифосфату, а Р-центр вільний. Далі Р-центр ферменту захоплює з середовища наступний нуклеозид- $5'$ -трифосфат, який є комплементарним до другого нуклеотиду ініціюючого кодону. За цих умов проходить нуклеофільна атака α -фосфату, принесеного нуклеозид- $5'$ -трифосфату, $3'$ -ОН групою першого нуклеотиду, зв'язаного з Т-центром ферменту, внаслідок чого утворюється $3' \rightarrow 5'$ -міжнуклеотидний зв'язок, виділяється пірофосфат та звільняються Т- і Р-центри ферменту.

РНК-полімераза транслокується по матриці в напрямку $3' \rightarrow 5'$. Т-центр ферменту зв'язує $3'$ -ОН групу кінцевого нуклеозид- $5'$ -монофосфату, а Р-центр з середовища захоплює наступний нуклеозид- $5'$ -трифосфат і цикл елонгації повторюється.

У кожному циклі до зростаючого полінуклеотидного ланцюга додається по одному нуклеозидмонофосфату, внаслідок чого ланцюг РНК подовжується в напрямку $5' \rightarrow 3'$. Ріст ланцюга продовжується доки на ділянці оперону не з'являться сигнали термінації, які визначають закінчення синтезу РНК.

Швидкість елонгації складає 30-40 нуклеотидів за секунду і проходить з великою точністю, частота помилок складає $2 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-4}$, тобто на 20 тис. нуклеотидів може включитись один некомплементарний нуклеотид. Кожна транскрибована молекула РНК – це одноланцюгова комплементарна копія порівняно невеликої ділянки плюс-ланцюга ДНК.

2.3. Термінація транскрипції

Завершення транскрипції відбувається за участю специфічних термінуючих чергувань нуклеотидів, „стоп-сигналів”, розміщених на $3'$ -кінці бактеріальних оперонів. Ділянки термінації багаті ГЦ-парами, для яких

характерна центральна вісь симетрії, а тому вони являють собою самокомплементарні паліндромні (*вперед і знову назад*) послідовності. За цими ділянками на матричному ланцюгу ДНК локалізовані оліго-А-послідовності (4-8 аденілових нуклеотидів).

Транскрипція оліго-А-послідовностей на структурі матричної ДНК призводить до утворення ділянки РНК/ДНК дуплексу, стабілізованого неміцними АУ-парами, що зумовлює руйнування зв'язків між матричним ланцюгом ДНК і молекулою РНК, що транскрибується.

В свою чергу, перед завершенням транскрипції на РНК-транскрипті утворюються елементи вторинної структури у вигляді шпильок, які порушують міцність ДНК/РНК-транскрипту у відкритому промоторному комплексі і видаляють з нього РНК-полімеразу.

Вважають, що в розпізнаванні термінаторів важлива роль належить *білковим факторам термінації (Rho (ρ)-факторам)*, які зв'язуються з ділянкою термінації і приєднуються до РНК-транскрипту перед термінатором. Для ρ-фактору характерна АТФ-азна активність, внаслідок чого він може змінювати конформацію ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази та сприяти видаленню його з промоторного комплексу.

Характерним для транскрипції у прокариот є те, що цей процес відбувається в ядерній зоні клітини і після його закінчення до іРНК приєднуються рибосоми та розпочинається процес трансляції. Тобто, для них характерним є утворення *транскрипційно-трансляційного комплексу*.

3. РНК-ЗАЛЕЖНИЙ СИНТЕЗ ДНК (ЗВОРОТНА ТРАНСКРИПЦІЯ)

Крім прямої транскрипції, характерної для клітин вищих організмів, внаслідок якої проходить передача генетичної інформації в напрямку ДНК → РНК, в деяких РНК-геномних онкогенних вірусів може відбуватися зворотний процес: передача інформації від РНК до ДНК. Оскільки в цьому випадку, передача інформації відбувається в напрямку протилежному до прямої транскрипції, він дістав назву *зворотної транскрипції*.

Вперше експериментальне підтвердження можливості такого процесу було отримано Г. Темінім і Д. Балтимором (США, 1970 р.). Для перебігу зворотної транскрипції необхідна наявність специфічного ферменту РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази, або ревертази). Цей фермент було виділено з вірусу пташиного мієлобластозу та саркоми Рауса, так званих, ретровірусів, які містять (+) РНК-геноми.

Геномна РНК цих вірусів за будовою нагадує іРНК еукаріотичних клітин: на 5'-кінці міститься „кеп”, а на 3'-кінці – поліаденілова послідовність нуклеотидів. Оскільки в кожному вібріоні присутні дві копії геномної РНК, вірусна часточка є, по суті, диплоідною. На кодуючій ділянці геному локалізовано три гени: *gag, pol, env*, які обмежені прямими кінцевими повторами (R), довжиною 20-70 нуклеотидів (залежно від типу вірусу). Поруч з цими повторами на 5' і 3'-кінцях РНК знаходяться поліуридилові чергування нуклеотидів, відповідно на 5'-кінці – 80-100, а на 3'-кінці – 150-1250.

Фермент зворотна транскриптаза закодована на гені *pol*: дві його субодиниці формуються внаслідок альтернативного сплайсінгу. Для ферменту характерні два види ферментативної активності: полімеразна (синтез ДНК на матриці РНК) та ендонуклеазна (РНК-азна), що забезпечує руйнування

молекули РНК у складі РНК/ДНК-гібриду, який утворюється внаслідок полімеразної реакції.

Для ініціації дії ревертази необхідна присутність затравки, або праймера, роль якого виконує один з видів клітинних тРНК. Ця тРНК на 3'-кінці містить нуклеотидну послідовність комплементарну до 5'-кінця вірусної РНК. За принципом комплементарності, ця ділянка зв'язує тРНК, яка разом з ревертазою міститься у складі віріону та надходить до інфікованої клітини.

Після інфікування клітини ретровірусом, на структурі вірусної (+) РНК синтезується (-) ланцюг ДНК (кДНК). Молекула кДНК переписує інформацію із структурованої (+) РНК вірусу, яка містить, так звані, довгі кінцеві повтори, u3' та u5'-послідовності нуклеотидів.

Синтез кДНК на структурі матриці, за участю ферменту ревертази, включає кілька етапів. Спочатку за участю тРНК-затравки синтезується короткий фрагмент кДНК. Цей фрагмент являє собою транскрипт, комплементарний до прямих кінцевих повторів (R) u3 і u5 вірусної РНК.

Утворений на 5'-кінці РНК/ДНК-фрагмент руйнується за участю ендонуклеазної активності ревертази, у зв'язку з чим одноланцюговий 3'-кінець синтезованого фрагменту кДНК може вступати в комплементарну взаємодію з молекулою вірусної РНК, в якій на 3'- і 5'-кінцях містяться аналогічні нуклеотидні послідовності (R).

На наступному етапі РНК-залежного синтезу ДНК роль матриці виконує 3'-кінець синтезованого фрагменту кДНК (-) ланцюга, який приєднаний до R-послідовності на 3'-кінці вірусної РНК.

Ця матриця використовується для транскрибування вірусного (+) ланцюга РНК та утворення (-) ланцюга кДНК, на структурі якого закодowana інформація, отримана від (+) РНК вірусу. Синтезований (-) ланцюг ДНК виконує роль матриці для синтезу матричного (+) ланцюга ДНК. Далі ланцюг РНК-ової структури (вірусної РНК), як і тРНК-затравка, руйнуються внаслідок ендонуклеазної активності ревертази.

Синтезована за участю ревертази дволанцюгова молекула ДНК, що містить плюс- і мінус-ланцюги, потрапляє до ядерного апарату клітини-реципієнта, де за участю комплементарних сайтів ДНК та ферменту інтегрази вірусної часточки формується кільцева форма ДНК.

Фермент інтеграза забезпечує включення ДНК, яка несе інформацію про вірусний геном, до ДНК інфікованої клітини. Інтегрована ДНК може тривалий час знаходитися у складі хромосоми клітини-реципієнта у вигляді провірусу без будь-яких проявів патогенності.

У випадку транскрипції ділянки ДНК клітини-хазяїна, до складу якої була інтегрована ДНК-ова копія вірусного геному та наступної трансляції, можливий розвиток вірусної інфекції.

Первинні транскрипти вірусу, як і транскрибована РНК клітини-реципієнта, зазнають посттранскрипційної модифікації (процесінгу і сплайсінгу), крім РНК, яка включається до складу віріону.

У геномі людини і вищих хребетних міститься велика кількість інтегрованих вірусів (SV40, аденовіруси, вірус герпесу, гепатиту В і С та інші), які за певних умов можуть провокувати розвиток захворювань.

Дослідженнями останніх років було встановлено, що для знешкодження особливо небезпечних інтегрованих вірусів, зокрема, вірусу простого герпесу, який паразитує в нервових клітинах, важливим є

„провокування” його функціонування у клітині, оскільки саме в цей час вірусна інфекція найкраще піддається лікуванню.

На структурі геномної ДНК вищих організмів виявлено специфічні онкогени (*ons*-гени), що являють собою геноми вірусів. Гени інтегрованих ретровірусів дістали назву *V-ons*. Сайти ДНК в геномах еукаріот, що містять гомологічні нуклеотидні послідовності до *V-ons*, дістали назву *C-ons*-генів.

4. ТРАНСКРИПЦІЯ В КЛІТИНАХ ВИЩИХ ЕУКАРІОТ

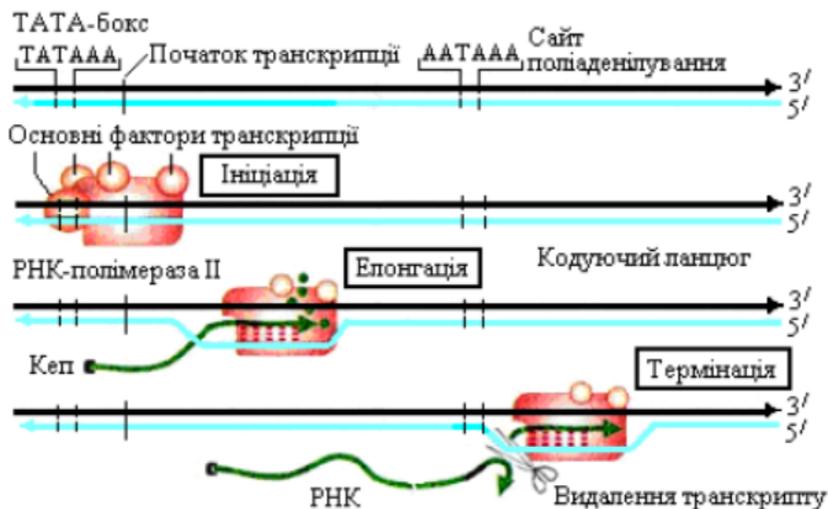
4.1. Особливості транскрипції в клітинах вищих еукаріот

Загальний механізм транскрипції у клітинах вищих еукаріот подібний до цього процесу в клітинах інших організмів. Одночасно з цим, існують специфічні особливості цього процесу, зумовлені організацією геному, специфічною будовою генів та механізмів їх регуляції:

- для геному вищих еукаріот не характерна оперонна організація генів, а поняття „оперон” для них має відносне значення, у зв’язку з чим, існують певні особливості початку і перебігу окремих етапів транскрипції та її закінчення, а також регуляції функціональної активності генів;
- транскрипція розпочинається на сайтах ДНК, які містять специфічні чергування нуклеотидів (ТАТА мотиви) та ініціюючий кодон ТАЦ. Для рРНК такими сайтами є ділянки ДНК ядерцевих організаторів, для іРНК і тРНК, відповідно, унікальні та помірні повтори нуклеотидів;
- для зв’язування ферменту ДНК-залежної полімерази, який розпочинає транскрипцію, використовуються короткі послідовності нуклеотидів (мотиви), які знаходяться на певній відстані від стартового ініціюючого кодону;
- транскрипція у клітинах еукаріот проходить за участю не одного ферменту, як у прокаріот, а трьох різних ДНК-залежних РНК-полімераз: I(A), II(B), III(C). Перший фермент забезпечує синтез 25S і 18S рРНК, другий – іРНК, а третій – тРНК і 5S рРНК. Кожен із вказаних ферментів транскрибує різні сайти ДНК, на яких закодована специфічна генетична інформація;
- жоден із вказаних ферментів не може самостійно зв’язуватися з відповідними сайтами початку транскрипції, для цього використовуються специфічні для кожного з них білкові фактори (TF-фактори): TF-I, TF-II, TF-III, які одночасно забезпечують і її регуляцію;
- безпосередні генні транскрипти клітин еукаріот моноцистронні і є продуктом не одного, а кількох генів, які можуть бути локалізовані на різних ділянках однієї хромосоми, чи на різних хромосомах. Це, зокрема, характерне для транскриптів іРНК олігомерних білків;
- в геномі еукаріот наявні “розірвані гени”, які містять інформативні ділянки – екзони та неінформативні – інтрони, що характерно для іРНК та тРНК;
- внаслідок транскрипції утворюється гетерогенна ядерна РНК, яка включає суму всіх первинних транскриптів;

- первинні транскрипти іРНК еукаріот являють собою комплементарні копії матричного ланцюга, які не можуть бути безпосередньо використані для трансляції генетичної інформації. У зв'язку з цим, вона зазнає специфічної постреплікативної модифікації – процесінгу або дозрівання;
- процесінг включає: рестрикцію, сплайсінг і модифікацію, які відбуваються за участю специфічних ферментів. Внаслідок цього, утворюються зрілі молекули РНК, здатні до виконання специфічних функцій;
- перебіг процесінгу різних генних продуктів (іРНК, тРНК, рРНК) має певні особливості, зумовлені їх структурно-функціональними особливостями;
- після дозрівання, молекули РНК в складі рибонуклеопroteїнових комплексів (інформосом) надходять до цитоплазми клітин де виконують специфічні функції в процесі трансляції генетичної інформації;
- для ініціації транскрипції необхідна присутність специфічних білкових факторів.

Транскрипція у клітинах еукаріот, як і у прокаріот, також включає: ініціацію, елонгацію і термінацію. Ці процеси відбуваються за схемою, подібною до відповідних етапів транскрипції у клітинах прокаріот:



Суть ініціації транскрипції полягає у приєднанні відповідного ферменту до сайту початку транскрипції на матричному ланцюгу ДНК та утворенні відкритого промоторного комплексу.

На етапі елонгації транскрипції проходить подовження ланцюга молекули РНК і завершується після досягнення сайту термінації, що містить специфічні паліндромні послідовності нуклеотидів.

4.2. Посттранскрипційна модифікація первинних транскриптів (процесінг РНК)

Для утворення інформативних молекул РНК, здатних виконувати специфічні функції, необхідним є перетворення первинних транскриптів у функціонально зрілі молекули, що відбувається в результаті *процесінгу* або *дозрівання*. Як вказувалося раніше, суть цього процесу в модифікації певних залишків нуклеотидів на 3'- і 5'-кінцях молекули, рестрикції, сплайсінгу. У прокаріот дозрівання характерне лише для первинних транскриптів рРНК і тРНК, оскільки поліцистронні іРНК цих організмів не містять інтронів, і можуть безпосередньо використовуватися для трансляції, оскільки ці процеси не розділені у просторі і часі та можуть відбуватися одночасно.

Тобто, в клітинах прокаріот іРНК без попередньої посттранскрипційної модифікації транлюється з утворенням відповідних генних продуктів.

В клітинах еукаріот, враховуючи особливості організації їх геному, всі види первинних транскриптів, які утворюються в ядерному апараті, повинні зазнавати посттранскрипційної модифікації. Перебіг цих процесів має певні особливості для кожного з видів РНК клітини.

Процесінг пре-іРНК

Для формування функціонально зрілих молекул іРНК необхідним є видалення інтронів та з'єднання екзонних ділянок, а також проведення специфічної модифікації окремих нуклеотидних залишків на 5'- і 3'-кінцях молекул. Це забезпечує функціонування зрілої іРНК в цитоплазмі та виконання нею специфічних функцій.

Тобто, функціонально зріла молекула іРНК, яка у клітинах еукаріот є моноцистронною, повинна містити лише інформативні та регуляторні ділянки, які під час трансляції забезпечують синтез специфічних генних продуктів. Регуляторні ділянки транскрибуються але не транлюються.

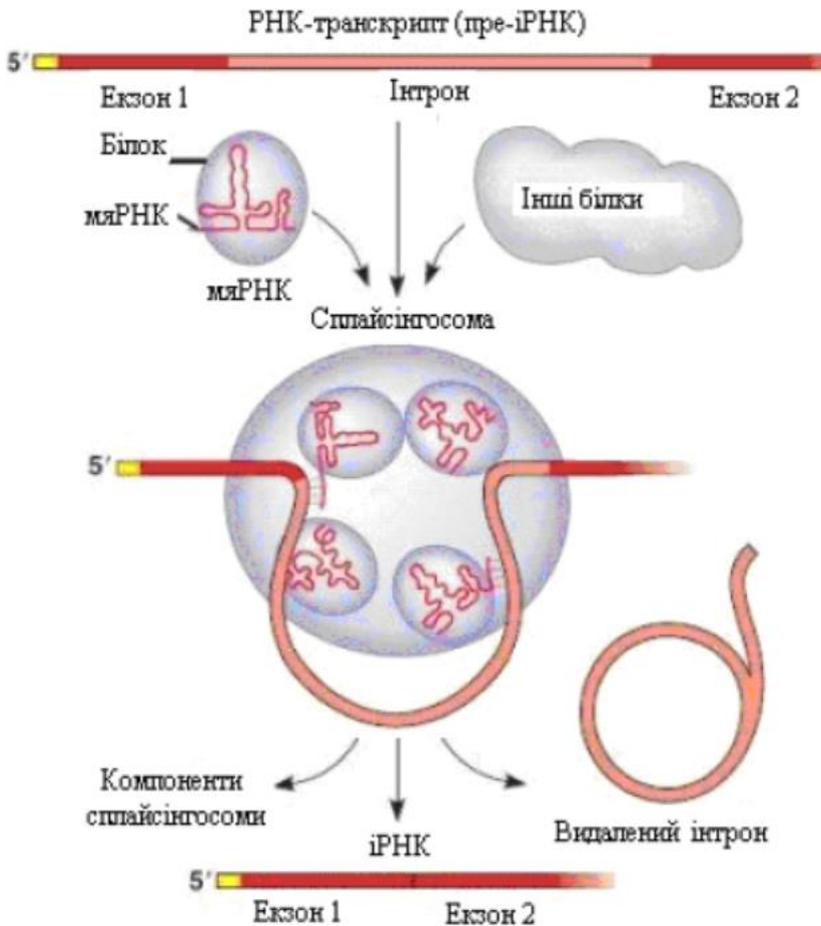
У цих процесах посттранскрипційної модифікації пре-іРНК еукаріот задіяні специфічні ферменти, для яких характерні різні види ферментативної активності (рестриктазна, лігазна, АТФ-азна, ендо- і екзонуклеаза), а також особливий вид РНК, локалізований в ядерному матриксі – *малі ядерні РНК* (мяРНК). Ці РНК мають специфічну первинну структуру (багаті уридиловими нуклеотидами), у зв'язку з цим їх позначають U-РНК. Кількість U-РНК у клітинах еукаріот може бути різною. Зокрема, у дріжджових клітинах присутні 25 різних видів U-РНК. У клітинах вищих організмів міститься близько 15 видів U-РНК. U-РНК містять від 5 до 1 000 нуклеотидів.

В ядерному апараті клітин еукаріот мяРНК утворюють комплекси із специфічними фібриляринами білками, тобто існують у вигляді рибонуклеопротейнових комплексів (мяРНП). Ці комплекси дістали назву *сплайсінгосом*. Окремі сплайсінгосоми – це еліпсоїдні часточки, до складу яких входять кілька видів мяРНК. У ссавців до складу сплайсінгосом входять РНК U1, U2, U4, U5, U6.

За участю сплайсінгосом відбувається рестрикція і сплайсінг – вирізання інтронів та зшивання екзонів з первинних транскриптів пре-іРНК. Внаслідок комплементарної взаємодії мяРНК з інтронними ділянками пре-іРНК проходить зближення кінців екзонів та формування петлеподібних структур типу „ласо”, на структурі яких можуть бути присутні неканонічні зв'язки між парами азотистих основ нуклеотидів: двома гуаніловими нуклеотидами, що містяться на 5'- і 3'-ділянках сплайсінгу.

При зближенні екзонів відбувається розрив фосфодієфірного зв'язку між першим екзоном і 5'-кінцем інтрону, який далі взаємодіє з аденіновим нуклеотидом і утворює на інтроні специфічну петлю. Звільнений за цих умов 3'-ОН кінець першого екзону розрізає 3'-ділянку сплайсінгу, видаляє інтрон і з'єднує екзони. Внаслідок цього утворюється зріла молекула іРНК.

Загальна схема процесінгу пре-іРНК за участю сплайсінгосоми має такий вигляд:



Для пре-іРНК характерний також *альтернативний сплайсінг*, суть якого в утворенні іРНК, різних за первинною структурою, з однієї і тієї ж пре-іРНК, яка є продуктом одного гену, внаслідок комбінування локалізації та кількості екзонів.

За механізмом перебігу альтернативний сплайсінг може бути: касетний, взаємовиключаючий, із внутрішнім акцепторним сайтом та з використанням альтернативних промоторів.

У клітинах еукаріот альтернативний сплайсінг сприяє ефективній регуляції активності генів та є одним з механізмів синтезу ізоформ ферментів, оскільки дає змогу синтезувати на одному гені різні білки за первинною структурою і властивостями. Такі гени кодують білки із специфічними функціями (імуноглобуліни, пептидні гормони, ряд фібрилярних білків, тощо).

Сплайсінг первинних транскриптів може проходити і без участі сплайсінгосом. Цей вид сплайсінгу дістав назву *аутосплайсінгу*, який відбувається за принципом „сам себе модифікую”, тобто внаслідок власної ферментативної активності молекул РНК (рибозимаз). Суть цього виду сплайсінгу в тому, що інтронні ділянки кодують рибозимази – РНК-ферменти, які проводять сплайсінг і виконують роль сплайсінгосом. Існує три групи інтронів, що кодують рибозимази (I, II і III). Рибозимази II і III групи виконують роль сплайсінгосом без залучення інших білків.

Аутосплайсінг було відкрито Т. Чеком (1982 р.), який досліджував процесінг первинних транскриптів в інфузорії *Tetrachymena thermophyla*.

Описані вище види сплайсінгу, як правило, стосуються процесінгу однієї молекули іРНК. Одночасно з цим, було встановлено наявність у клітинах еукаріот *транс-сплайсінгу*, суть якого в утворенні зрілих молекул іРНК внаслідок з'єднання фрагментів, транскрибованих на різних генах. Ці гени можуть знаходитися поруч, або на різних ділянках ДНК і навіть на різних хромосомах.

Цей вид сплайсінгу було виявлено в одноклітинних еукаріотичних організмів – трипанозом. іРНК трипанозом, які кодують білки цитоскелету (тубуліни), утворюються внаслідок сплайсінгу фрагментів іРНК, транскрибованих з „мініекзонів”, що включають до 35 н.п., з екзонами центральної ділянки іРНК, розміщеними на різних хромосомах.

Наявність різних видів сплайсінгу, характерних для генних продуктів еукаріот, створює можливість утворення різноманітних популяцій клітинних іРНК, які транскрибуються з обмеженої кількості генів. Після сплайсінгу пре-іРНК проходить модифікація 5' та 3'-кінців зрілих транскриптів: кепування і метилювання 5'-кінця та поліаденілування 3'-кінця.

„Кеп” (*Catabolic gene activite protein* – активатор катаболічного гену) містить три метильованих нуклеотиди, першим з яких є 7-метилгуанозинтрифосфат, з'єднаний з рештою нуклеотидів не 5' → 3', а 5' → 5' фосфодиефірним зв'язком.

Функція „кепу” полягає у захисті іРНК від дії цитоплазматичних ферментів та забезпеченні утворення комплексу з певною ділянкою рибосоми під час трансляції.

Суть поліаденілування в тому, що до 3'-кінця іРНК приєднується поліаденілова послідовність – фрагмент, що містить 150-200 залишків аденілової кислоти внаслідок нематричного синтезу з використанням рибонуклеозиддифосфатів. Цей фрагмент необхідний для зв'язування із специфічним білком, який забезпечує перенесення іРНК в цитоплазму у вигляді інформосоми, а також підвищує стійкість іРНК.

Крім того, поліА-послідовність визначає тривалість функціонування іРНК у цитоплазмі, де вона виконує роль матриці під час трансляції генетичної інформації. Тобто, визначає кількість циклів транслокації іРНК через рибосомний апарат у процесі білкового синтезу. Поліаденілування не характерне для гістонової іРНК.

Процесінг пре-рРНК

У клітинах прокариот всі три види рРНК 23S, 16S і 5S утворюються з одного первинного транскрипту – 30S рРНК ($M = 2 \times 10^6$ Да). Процесінг пре-рРНК включає секвенування первинного транскрипту та утворення зрілих рРНК, а також метилювання окремих азотистих основ нуклеотидів.

Під час процесінгу рРНК у прокариот спочатку утворюються два транскрипти - 17S і 25S, від яких, далі, за участю нуклеаз, відщеплюється ще певна кількість нуклеотидів, внаслідок чого формуються зрілі молекули 16S і 23S рРНК. Низькомолекулярна 5S рРНК формується окремо на 3'-кінцевій ділянці пре-рРНК.

У еукариот пре-рРНК є продуктом транскрипції чисельних генів, що локалізовані в структурі ДНК ядерцевих організаторів у вигляді кластерів (тандемних повторів), які транскрибуються синхронно. Внаслідок транскрипції цих ділянок ДНК, утворюються різні види рРНК, що використовуються для формування рибосом.

Первинний транскрипт рРНК еукариот являє собою 45S рРНК і містить нуклеотидні послідовності 18S, 28S, 5,8S рРНК, які розділені спейсерними ділянками. Зрілі рРНК утворюються внаслідок відщеплення фрагментів від 3' і 5'-кінців первинного транскрипту.

У нижчих еукариот, а також у генах рРНК мітохондрій, хлоропластів, дріжджів, гени рРНК містять специфічні інтрони (інтрони групи 1), які можуть забезпечувати аутокаталітичний сплайсінг, тобто виконують роль РНК-ферментів рибозимаз.

Процесінг пре-тРНК

Пре-тРНК в еукариот є продуктом транскрипції генів, локалізованих на помірних повторах нуклеотидів, за участю РНК-полімерази III. Молекула пре-тРНК містить інтронну ділянку поблизу антикодону, яка видаляється за участю специфічного ферменту, для якого характерні кілька видів ферментативної активності: нуклеазна, лігазна та кіназна. Фермент забезпечує вирізання інтрону і з'єднання кінців екзону та формування зрілої молекули тРНК.

Тобто, зріла молекула тРНК утворюється з полінуклеотидних ланцюгів пре-тРНК шляхом ферментативного вирізання та видалення зайвих нуклеотидів з 5'- і 3'-кінців молекули. У багатьох випадках з однієї молекули пре-тРНК утворюється дві і більше молекул тРНК.

Далі проходить модифікація 3'-кінця (акцепторного стебла) молекул тРНК внаслідок приєднання ЦЦА-послідовностей нуклеотидів за участю ферменту полінуклеотидилдифосфаттрансферази, або термінальної РНК-синтетази. Цей фермент, який було виділено М. Грюнберг-Маного і С. Очоа (1955 р.) із азотобактера, забезпечує нематричний синтез полірибонуклеотидів з нуклеозид-5'-дифосфатів.

Фермент не володіє абсолютною субстратною специфічністю, що дає можливість отримати полінуклеотиди будь-якої первинної структури. За участю цього ферменту, до 3'-кінця тРНК (акцепторного стебла) приєднується ЦЦА-послідовність, яка присутня на 3'-кінці всіх видів тРНК. До кінцевого аденілового нуклеотиду ЦЦА-послідовності приєднуються амінокислоти під час рекогніції.

Процесінг тРНК включає також такий важливий процес як *редакування*, суть якого в модифікації азотистих основ нуклеотидів (метилюванні, дезамінуванні, відновленні, тощо).

Редакування забезпечує модифікацію азотистих основ у складі дигідроуридилової та псевдоуридилової петлі молекул тРНК, яким належить важлива роль у забезпеченні специфічних функцій у процесі трансляції.

4.3. Регуляція транскрипції генів у клітинах еукаріот

Регуляція транскрипції генів у клітинах еукаріот може реалізуватися як на рівні хроматину (загальна, або тотальна регуляція транскрипції), так і на рівні окремих сайтів ДНК.

Регуляція транскрипції на рівні ДНК

Важливим фактором регуляції транскрипції у клітинах еукаріот є компактизація ДНК – укладання її у складі хроматину, який може бути: конденсованим (гетерохроматин) і розрихленим (еухроматин). Конденсований хроматин, як правило, не транскрибується, в той час як для еухроматину характерна висока інтенсивність транскрипції. В еухроматині еукаріот гени локалізовані на петлеподібних доменах, довжиною від 20 до 200 тис. нуклеотидних пар, які є самостійними функціонально незалежними ділянками і можуть включати один або декілька генів. Між окремими петлями хроматину розміщені специфічні чергування нуклеотидів, які отримали назву *інсуляторів* (він англ. *insulate* – ізолювати). З інсуляторами можуть зв'язуватися специфічні білки, що зумовлює посилення чи послаблення впливу регуляторних ділянок однієї петлі хроматину на експресію генів іншої.

У регуляції транскрипції важливою є також локальна деконденсація окремих ділянок хроматину під впливом специфічних ферментів (ДНК-аз I), які можуть зв'язуватися з ДНК і сприяти перебігу транскрипції. В окремих генах виявлено декілька сайтів, чутливих до дії ДНК-ази I, які утворюють, так звані, активний еухроматин. При порушенні суперспіральної структури хроматину проходить його декомпактизація та послаблюється зв'язок ДНК з Н1. Звільнені від Н1 ділянки ДНК можуть інтенсивно транскрибуватися, оскільки значно зростає можливість зв'язування їх з ферментом ДНК-залежною РНК-полімеразою.

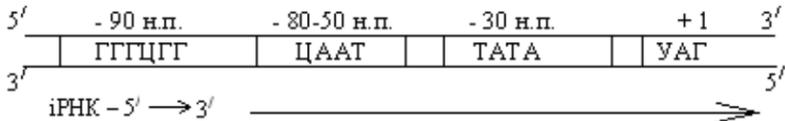
Крім Н1 у регуляції транскрипції задіяні також інші білки, які утворюють гістоновий кор та регулюють ініціацію транскрипції: вибіркове включення ТАТА-боксів, що блокує функціонування ДНК-залежної РНК-полімерази. Якщо утворення нуклеосом проходить на кодуючих ділянках генів, то транскрипція не блокується, оскільки гістони порушують зв'язування основних білкових факторів транскрипції (базальних факторів) з ДНК.

Білки, які є активаторами транскрипції конкурують з гістонами за зв'язок з ДНК. Послаблення зв'язування гістонів з ДНК відбувається за участю білків активаторів одного із доменів гістону Н4, який має ацетильований N-кінець, що знижує його позитивний заряд та сприяє зміні конформації. Це, у свою чергу, послаблює його зв'язок з Н2А і Н2В та дестабілізує нуклеосому. ДНК за цих умов стає доступною для зв'язування з базальними факторами транскрипції.

Регуляція транскрипції на рівні генів

Для еукаріотичних генів, що кодують білки, характерна складна структура регуляторних ділянок, які впливають на процес транскрипції. Ці ділянки містять специфічні короткі нуклеотидні послідовності, так звані, *мотиви*. Так, на відстані 27-30 нуклеотидних пар від старту транскрипції (+1) міститься ТАТА-мотив, який визначає місце початку транскрипції (5'-кінець транскрипту). Крім цього мотиву присутні ще два: ЦЦААТ і ГГЦГГ. Перший,

ЦА-мотив знаходиться на відстані 50-80 нуклеотидних пар від точки ініціації, а другий, ГЦ-мотив – на відстані 90 нуклеотидних пар. Ці мотиви необхідні для зв'язування ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази та ініціації транскрипції структурних генів:

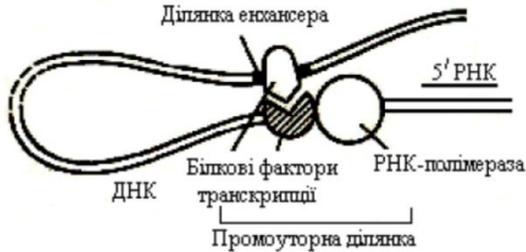


ЦА-мотиви зустрічаються на регуляторних ділянках різних тканинно-специфічних білків (глобінів, актину, тиреоглобуліну), а ГЦ-мотиви – на ділянках генів, що забезпечують синтез специфічних білків-ферментів. Кількість вказаних мотивів у складі регуляторних ділянок різних генів може складати від 2 до 9. У генах, що кодують адаптивні білки, синтез яких посилюється під впливом різних факторів, у складі регуляторних ділянок містяться характерні короткі послідовності, що включають від 4 до 9 нуклеотидів. Так, у гені білків теплового шоку (шаперонів) дрозоді наявні ЦТЦГ- і ГТТГ-мотиви, а в генах металопротеїнів відповідно ТГЦГЦТЦГГ-мотив. Регуляторні ділянки еукаріотичних генів забезпечують синтез специфічних транскрипційних факторів, які пізнають специфічні сайти зв'язування і взаємодіють як один з одним, так із ДНК-залежною РНК-полімеразою.

Регуляцію транскрипції у клітинах еукаріот на рівні промоуторних ділянок генів можуть забезпечувати білки активатори транскрипції, або транскрипційні фактори. До них належать, в першу чергу, загальні фактори транскрипції ІF-I, ІF-II, ІF-III, які необхідні для зв'язування ДНК-залежної РНК-полімерази з сайтом ініціації промоуторної ділянки багатой АТ-парами. Ці фактори необхідні для перебігу транскрипції будь-якого функціонуючого гену. Інші транскрипційні фактори підвищують активність лише окремих генів.

У промоуторній ділянці генів виявлено специфічні чергування нуклеотидів, які можуть посилювати або послаблювати транскрипцію, незалежно від їх орієнтації по відношенню до сайту ініціації транскрипції та зберігати цей вплив на певній відстані від нього. Ці регуляторні елементи отримали назву *енхансерів* (підсилювачів) та *сейленсерів* (послаблювачів). Тобто, енхансери і сейленсери – це специфічні сайти на структурі геномної ДНК, які являють собою чергування нуклеотидів (модулі), що виявляють дистантну дію на процес транскрипції. Вони можуть бути локалізовані на різних ділянках геному і включають декілька десятків нуклеотидних пар. Особливістю енхансерів і сейленсерів є те, що вони можуть знаходитися на інтронних ділянках окремих генів (імуноглобулінів, колагену) та перед промоуторною ділянкою (алкогольдегідрогеназа дрозоді).

Регуляторний вплив енхансерів і сейленсерів на функціонування генів може реалізовуватися різними шляхами. Найчастіше це відбувається внаслідок зміни конформації суперспіралізованих петель хроматину та порушення локальної структури фрагментів ДНК, на яких локалізовані окремі гени. В цьому випадку енхансери зв'язують специфічні білкові фактори (топоізомерази) та посилюють їх вплив на певні ділянки хроматину. Контакт енхансера з промоуторною ділянкою гену відбувається внаслідок утворення петлеподібних структур:

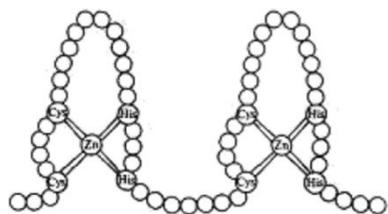


Регуляція транскрипції за участю специфічних ферментів та білкових факторів. Цей вид регуляції в клітинах еукаріот має важливе значення, оскільки забезпечує безпосередній вплив на ініціацію транскрипції і може як посилювати, так і послаблювати її перебіг. Як правило, це відбувається внаслідок зв'язування енансерів та сейленсерів з факторами ініціації транскрипції, в першу чергу, ферментом ДНК-залежно-РНК-полімеразою на промоуторній ділянці генів. За участю ДНК-залежних РНК-полімераз у клітинах еукаріот може проходити регуляція трьох груп генів, при транскрипції яких утворюються різні генні продукти – іРНК, рРНК та тРНК. Транскрипція цих генів відбувається різними ДНК-залежними РНК-полімеразами за участю специфічних білкових факторів, які взаємодіють з характерними для кожної групи генів регуляторними елементами ДНК. Тандемна організація рибосомних генів, які розділені спейсерами, де локалізовані регуляторні сайти транскрипції, забезпечує їх ефективне зчитування, оскільки, всі компоненти системи регуляції зосереджені на одній структурі – ядерцевому організаторі.

Транскрипція генів тРНК і 5S рРНК за участю РНК-полімерази III також регулюється специфічними транскрипційними елементами, локалізованими серед генів. Ці елементи зв'язують білки-регулятори транскрипції. Найкраще вивченим є білковий фактор транскрипції TFIIIA. Цей фактор зв'язується з внутрішньою ділянкою гену 5S рРНК та приєднує ще два регуляторних білки і ДНК-залежну-РНК-полімеразу.

Фактор транскрипції TFIIIA має доменну структуру: молекула містить 9 доменів (пальців), що включають інваріантні послідовності амінокислот, до складу яких входять по два залишки цистеїну і гістидину, зв'язаних з йонами Цинку (*цинкові пальці*).

Кількість цих структур у різних білків може варіювати від 3-4 до кількох десятків. Такі регуляторні структури характерні для великої кількості рецепторних білків, зокрема, рецепторів стероїдних гормонів. Після зв'язування з гормоном рецептор за допомогою цинкових пальців взаємодіє з певними енансерами на структурі ДНК, внаслідок чого змінюється транскрипційна активність окремих генів.



"Цинкові пальці"

регуляторними білками мають специфічну просторову структуру, яка забезпечує утворення комплексів з білками регуляторами транскрипції, що містять *гомеодомени*. Вони є продуктом генів, що відповідають за ембріональний розвиток (гомейотичних генів). Ці білки регулюють розвиток організму внаслідок включення одних і виключення інших генів.

Відомо, що *домени* – це *фрагменти структури білкових молекул, для яких характерна певна структурна та функціональна автономія, і, одночасно з цим, вони володіють властивостями всієї молекули*. Доменні структури, як правило, сполучені між собою лінкерними зонами.

Окремі домени, що кодуються на структурі ДНК, розділені інтронами.

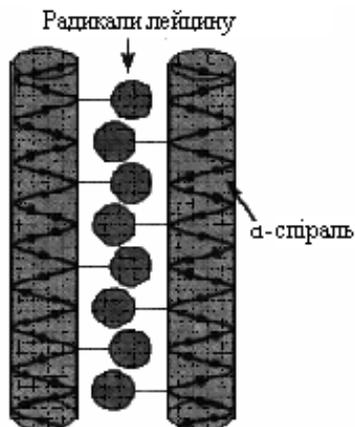
Екзони гомейотичних генів, в яких закована інформація про гомеодомени, мають назву *гомеобоксів*. До складу гомеодоменив входить 50-60 амінокислотних залишків, які організовані в вигляді мотиву (α -спіраль-поворот- α -спіраль). Саме одна з α -спіралей взаємодіє з певними ділянками ДНК гетерохроматину. Гомеодомени цих білків, як правило, виявляють вплив на активність певної групи генів еукаріотичних клітин: можуть змінювати просторову структуру хроматину хромосом (перехід із стану гетерохроматину в еухроматин).

Ще одна група білків, які регулюють транскрипцію, має назву *коактиваторів CBP і P300*. Комплекс цих білків забезпечує регуляцію транскрипції внаслідок ацетилювання октету гістонів у складі нуклеосом, що зумовлює їх часткову дестабілізацію та формування нативного ініціаторного комплексу.

Вважають, що суттєвіший вплив на регуляцію транскрипції виявляють специфічні коактиватори, дія яких реалізується внаслідок зв'язування з

Подібну функцію виконують також білки, молекули яких містять „лейцинові блискавки”.

Молекули цих білків складаються з двох субодиниць, стабілізованих силами Ван-дер-Ваальса (гідрофобною взаємодією між радикалами лейцину). Зв'язування цих білків з окремими ділянками ДНК відбувається внаслідок іонної взаємодії діаміномонокарбонових кислот (лізину і аргініну) з сахарофосфатним остовом ДНК. Локуси ДНК, які розпізнаються



"Лейцинова застібка-блискавка"

енхансерами. Зміна активності генів за участю енхансерів, сайленсерів, ЦААТ і ТАТА-боксів промоторних ділянок (адапторних елементів) дістала назву *адапторного механізму регуляції*. Адапторні елементи можуть знаходитися на різній відстані від промоторної ділянки генів. Вони чутливі до дії стероїдних гормонів, глюкокортикоїдів, реагують на тепловий шок, дію йонів металів та хімічних сполук (діоксинів).

Таким чином, порівняно з прокаріотами, регуляторні механізми транскрипції в еукаріот значно складніші і різноманітніші, що зумовлено особливостями структурної організації геномної ДНК еукаріотичних клітин.

Контрольні запитання:

1. Загальні закономірності передачі генетичної інформації.
2. Особливості проходження транскрипції.
3. Транскрипція у клітинах прокаріот. Ініціація, елонгація та термінація транскрипції у прокаріот
4. РНК-залежний синтез ДНК (зворотна транскрипція).
5. Особливості транскрипції в клітинах вищих еукаріот.
6. Посттранскрипційна модифікація первинних транскриптів.
7. Процесінг пре-іРНК.
8. Процесінг пре-рРНК.
9. Процесінг пре-тРНК.
10. Регуляція транскрипції генів у клітинах еукаріот.
11. Регуляція транскрипції на рівні ДНК.
12. Регуляція транскрипції на рівні генів.
13. Регуляція транскрипції за участю специфічних ферментів та білкових факторів.

ТЕМА: РЕАЛІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ. МАТРИЧНИЙ СИНТЕЗ БІЛКА

План

1. Молекулярні механізми передачі та реалізації генетичної інформації (генетичний код).
2. Характеристика компонентів білоксинтезуючої системи.
3. Основні етапи трансляції.
4. Регуляція інтенсивності трансляції у клітинах про- і еукаріот.
5. Посттрансляційна модифікація білків.

1. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ПЕРЕДАЧІ ТА РЕАЛІЗАЦІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ (ГЕНЕТИЧНИЙ КОД)

Різні білки організму людини чи тварини відрізняються один від одного, насамперед, хімічною природою та послідовністю розташування залишків амінокислот у поліпептидних ланцюгах, тобто первинною структурою. Інформація про те, яким повинен бути білок, закладена в ДНК у вигляді певної послідовності нуклеотидних залишків у полінуклеотидному ланцюгу. Оскільки ДНК знаходиться в ядрі, а біосинтез білка відбувається на рибосомах, то ДНК передає інформацію щодо процесу синтезу білка через іРНК, яка синтезується на певній ділянці (гені) одного з нуклеотидних ланцюгів ДНК. Спочатку відбувається процес транскрипції – копіювання інформації з ДНК на іРНК, що відбувається в ядрі. Далі іРНК виходить з ядра і переміщується до рибосом. На рибосомах іРНК реалізує цю інформацію в процесі синтезу білка.

Процес передачі інформації з іРНК, яка полягає в певній послідовності нуклеотидів в її молекулі, на процес розміщення залишків амінокислот у білкових молекулах називається трансляцією.

Отже, передачу інформації від ДНК на синтез-білка можна подати схемою:

ДНК $\xrightarrow{\text{Транскрипція}}$ іРНК $\xrightarrow{\text{Трансляція}}$ Білок.

Біосинтез білка (трансляція) — найважливіший етап реалізації генетичної програми клітин, у процесі якого інформація, закодована в первинній структурі нуклеїнових кислот, переводиться в амінокислотну послідовність синтезованих білків. Іншими словами, трансляція — це переклад чотирьохбуквенної (за кількістю нуклеотидів) «мови» нуклеїнових кислот на двадцятибуквенну (за кількістю протейногенних амінокислот) «мову» білків. Переклад здійснюється у відповідності з правилами генетичного коду. Особливості молекулярного апарату та механізм трансляції вивчені в основному на прокаріотичних об'єктах, однак є всі підстави вважати, що основні принципи трансляції реалізуються і в еукаріотичних клітинах, в яких в той же час більш розвинені механізми регуляції білоксинтезуючої системи.

У прокаріотів, оскільки в них немає відділеного мембраною від цитоплазми ядра, процеси транскрипції та трансляції у часі не відокремлені. Рибосома може приєднуватись до 5'-кінця мРНК, яка ще синтезується, і таким

чином розпочинати синтез білка. У еукаріотів процеси транскрипції і трансляції у часі відокремлені. Синтез білка не розпочнеться доки до цитоплазми з ядра не надійде мРНК.

Переписування інформації про білок з послідовності нуклеотидів у іРНК на послідовність розташування амінокислот у білку здійснюється за кодом, який називають *генетичним*.

Генетичний код – це послідовність розташування триплетів нуклеотидів у молекулі іРНК, що забезпечує певний порядок розташування амінокислот у молекулі білка.

Одиницею генетичного коду є *триплет* на структурі ДНК та *кодон* – чергування трьох нуклеотидів на структурі іРНК. Ці кодони є комплементарними до триплетів, які локалізовані на матричному (+) ланцюгу ДНК і точною копією триплетів кодуємого (-) ланцюга ДНК.

Ще на початку 50-х років Г. Гамов припустив, що генетичний код є триплетним: три сусідніх нуклеотиди в полінуклеотидному ланцюзі програмуєть включення однієї амінокислоти в поліпептидний ланцюг білка. В середині 60-х років в серії оригінальних експериментів Ф. Крік, С. Бреннер, Г. Віттман і інші дослідники дійсно встановили, що код є триплетним і безперервним, тобто в процесі синтезу білка послідовність мРНК зчитується послідовно групами по три нуклеотиди. Повна розшифровка генетичного коду, проведена М. Ніренбсргом, С. Очоа і Н. Г. Корану була завершена в 1966 р. Було показано, що 61 з 64 можливих поєднань трьох нуклеотидів чотирьох типів (4x4x4) кодуєть одну з двадцяти протейіногенних амінокислот. Решта три кодони (з 64) – УАА, УГА, УАГ – не кодуєть жодну з амінокислот. Ці кодони є сигналами зупинки (термінації) трансляції і тому називається *стоп-кодонами*, або *термінуючими кодонами*. Два кодони АУГ і ГУГ одночасно забезпечуєть включення до складу поліпептидного ланцюга таких амінокислот як метіонін і валін, а також виконуєть роль сигналів початку трансляції іРНК. Ці кодони одержали назву *ініціюючих*.

Генетичний код має певні специфічні особливості:

Універсальність, суть якої в тому, що кодони, які кодуєть амінокислотний склад білків та визначаєть певні фенотипові ознаки, ідентичні в різних видів організмів. Одночасно з тим, в деяких випадках окремі організми можуть надавати перевагу певним чергуванням нуклеотидів.

Надлишковість коду: одна амінокислота може бути закодована кількома кодонами, але жодний з кодонів не кодує більше, ніж одну амінокислоту. Для однієї амінокислоти існує кілька специфічних тРНК, які маюь назву *ізоакцепторних*. Разом з тим, одна молекула тРНК, що переносить певну амінокислоту, може взаємодіяти більше, ніж з одним кодоном на структурі іРНК.

Виродженість (двозмістовність) коду зумовлена тим, що в реалізації кодон-антикодонової взаємодії при утворенні комплементарних пар між кодонами іРНК і антикодонами тРНК суттєве значення маюь два перші нуклеотиди кодону. Тобто, ці нуклеотиди несуть основне змістове навантаження, тоді як третій має менше значення. Наприклад, кодування

аланіну здійснюється кодонами ГЦУ, ГЦЦ, ГЦА, ГЦГ, які відрізняються між собою третім нуклеотидом. Ця особливість коду була сформульована Ф. Кріком і одержала назву *теорії неоднозначної відповідності або виродженості коду*. З неї випливає, що головне значення при «впізнаванні» кодону антикодоном на рибосомі мають перші два нуклеотиди. Вони повністю підпорядковані комплементарному принципу взаємодії азотистих основ. Що стосується третього нуклеотиду кодону, то він неоднозначно може вступати у взаємодію більш, ніж з одним типом нуклеотидів антикодону. Це сприяє підвищенню стійкості генетичної інформації при пошкодженні ДНК.

Консервативність коду. Генетичний код майже не змінювався протягом тривалої еволюції живих організмів і використовується для кодування амінокислот у складі білкових молекул більше 3 млрд. років. Якщо в ході еволюції один з кодонів змінить зміст, то до складу білків будуть включені інші амінокислоти, що зумовить порушення їх структури і функцій.

Безперервність коду: між окремими кодонами немає розділових знаків, як у звичайному тексті. Роль таких знаків виконують певні чергування нуклеотидів, які є специфічними сигналами початку і закінчення синтезу поліпептидного ланцюга.

Код не перекривається. Нуклеотиди одного кодону не можуть входити до складу іншого і транслюються в напрямку $5' \rightarrow 3'$. Якщо б код перекривався, то внаслідок накладання сусідніх нуклеотидів, змінювався б зміст кодонів та первинна структура генних продуктів.

Код несе одновимірну інформацію – забезпечує переведення лінійної послідовності триплетів ДНК в лінійну послідовність амінокислотних залишків в структурі білка.

Розшифрування генетичного коду було важливим досягненням біологічної науки, оскільки дало можливість з'ясувати шляхи, напрямки та механізми реалізації генетичної інформації у клітині. До середини 70-х років минулого століття, практично, було з'ясовано всі ці питання і склалося враження, що не вирішених проблем вже не існує. Однак, починаючи з другої половини 70-х років ХХ століття, в молекулярній біології почали з'являтися факти, які не можна було пояснити з точки зору усталених, на той час, істин. *Так, було виявлено порушення деяких особливостей генетичного коду:*

- поставлено під сумнів поняття про стабільність геномів (виявлено мобільно дисперговані “стрибаючі гени”, які можуть бути перенесені з однієї ділянки геному на іншу);
- встановлено можливість передачі генетичної інформації в напрямку РНК \rightarrow ДНК;
- виявлено відхилення від універсальності генетичного коду: у структурі іРНК мітохондрій людини і дріжджових клітин у процесі еволюції деякі кодони змінили зміст. Так, кодон УГА кодує триптофан, АУА – метіонін, а АГА і АГТ є термінуючими. Крім того, у клітинах дріжджів всі чотири кодони лейцину, що містять нуклеотиди ЦУ, кодуєть тріонін, тому для кодування лейцину використовується 2 кодони, а тріоніну – 8. Це вказує на певну

еволюцію не лише живих організмів, але і механізмів передачі і реалізації генетичної інформації;

- виявлено явище переривання коду у вірусів і прокариот. Тобто, одна і та ж ділянка ДНК може кодувати різні білки внаслідок «зсуву рамки читування». Таке явище «гени в генах» характерне для деяких вірусів, бактерій і бактеріофагів;

Одночасно з цим, всі вищевказані відхилення не спростовують загальних закономірностей реалізації генетичної інформації та важливого значення генетичного коду як механізму забезпечення матричного синтезу білків.

Код білкового синтезу

Перший нуклеотид	Другий нуклеотид				Третій нуклеотид
	У	Ц	А	Г	
У	УУУ фен	УЦУ сер	УАУ тир	УГУ цис	У
	УУЦ фен	УЦЦ сер	УАЦ тир	УГЦ цис	Ц
	УУА лей	УЦА сер	УАА*	УГА*	А
	УУГ лей	УЦГ сер	УАГ*	УГГ три	Г
Ц	ЦУУ лей	ЦЦУ про	ЦАУ гис	ЦГУ арг	У
	ЦУЦ лей	ЦЦЦ про	ЦАЦ гис	ЦГЦ арг	Ц
	ЦУА лей	ЦЦА про	ЦАА глн	ЦГА арг	А
	ЦУГ лей	ЦЦГ про	ЦАГ глн	ЦГГ арг	Г
А	АУУ іле	АЦУ тре	ААУ асн	АГУ сер	У
	АУЦ іле	АЦЦ тре	ААЦ асн	АГЦ сер	Ц
	АУА іле	АЦА тре	ААА ліз	АГА арг	А
	АУГ мет	АЦГ тре	ААГ ліз	АГГ арг	Г
Г	ГУУ вал	ГЦУ ала	ГАУ асп	ГГУ глі	У
	ГУЦ вал	ГЦЦ ала	ГАЦ асп	ГГЦ глі	Ц
	ГУА вал	ГЦА ала	ГАА глн	ГГА глі	А
	ГУГ вал	ГЦГ ала	ГАГ глн	ГГГ глі	Г

* - кодони, які не кодують жодної амінокислоти (термінуючі або нонсенс кодони)

2. ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПОНЕНТІВ БІЛОКСИНТЕЗУЮЧОЇ СИСТЕМИ

Встановлено, що для перебігу процесу трансляції необхідна наявність певних факторів, які складають білоксинтезуючу систему, що містить:

- рибосомний апарат клітини, або вільні рибосоми;
- 20 протеїногенних активованих амінокислот;
- тРНК, що володіють специфічністю до певного ферменту і кожної окремої амінокислоти;
- ферменти аміноацил-тРНК-синтетази, які забезпечують активування амінокислот та утворення аміноациладенілатів;
- формілметіонін-тРНК (тРНК_{фмет});
- іРНК, які використовуються у вигляді матриці;
- ГТФ – джерело енергії для забезпечення певних етапів білкового синтезу;
- йони Mg^{2+} в концентрації 0,005 до 0,008 М;
- фактори ініціації, елонгації та термінації.

Всього у процесі синтезу білка задіяно більше 50 факторів, кожен з яких виконує специфічні функції на окремих етапах білкового синтезу. Синтез білкових молекул відбувається в цитоплазмі клітини за участю цитоплазматичних органел – рибосом.

Рибосоми – це рибонуклеопротеїнові комплекси, до складу яких входять рРНК (50-60%) і білки (35-50%). Рибосоми займають значну частину об'єму клітин. Величина рибосом характеризується константами седиментації (швидкістю осадження їх при центрифугуванні) і виражається в одиницях Сведберга, або коефіцієнтах седиментації. Цей коефіцієнт позначається буквою S і має часове вираження (1×10^{-13} с).

Для прокариот характерні 70S рибосоми, які складаються з двох субодиниць – малої 30S і великої 50S, а для еукаріот – 80S рибосоми, що містять відповідно 40S і 60S субодиниці. До складу 80S рибосоми входять білки та РНК у співвідношенні 1:1, а у складі 70S рибосоми це співвідношення складає 1: 2.

Функції малої і великої субодиниць рибосом різні. Малі субодиниці забезпечують процес ініціації та відповідають за розшифрування генетичної інформації (генетична функція), а великі – забезпечують утворення пептидних зв'язків під час елонгації (ензиматична функція).

У цитоплазмі рибосоми знаходяться у дисоційованому стані у вигляді окремих субодиниць, асоціація їх відбувається після зв'язування з іРНК або з мембранами гранулярного ендоплазматичного ретикулу. 70S і 80S рибосоми різняться за окремими параметрами та молекулярною масою. Молекулярна маса 70S рибосоми 2,8 млн. Да, а розміри 29 x 21 нм. 80S рибосома еукаріот має близькі параметри 32 x 22 нм, однак значно вищу молекулярну масу – 4,5 млн. Да. Рибосоми про- і еукаріот мають подібний компонентний склад, що є підтвердженням закону біохімічної єдності живих організмів.

Інформаційні РНК (іРНК) – другий важливий компонент білоксинтезуючої системи. Вони виконують роль безпосередньої матриці для синтезу видоспецифічних білків: містять генетично запрограмовану

інформацію про їх первинну структуру – якісний склад, кількісний вміст та порядок чергування амінокислотних залишків у поліпептидних ланцюгах.

Генетична інформація закодована на структурі ДНК у вигляді чергування трьох мононуклеотидів – триплетів. Чергування нуклеотидів на структурі іРНК має назву кодонів і визначається триплетами ДНК на структурі кодуєчого ланцюга. Триплети згруповані в функціонально активні, регульовані ділянки – оперони (у прокаріот). іРНК прокаріот, як правило, поліцистронні і містять на 5' та 3' кінці, а також в міжцистронних ділянках нетранслюючі послідовності нуклеотидів (спейсери), яким належить регуляторна функція.

Дж. Шайно і Л. Дальгарно (1974 р.) було висловлено припущення, згідно з яким на рибосомах прокаріот знаходяться ділянки, де проходить фіксування іРНК: комплекс іРНК з 16S РНК рибосоми утворюється внаслідок приєднання до рибосоми послідовності нуклеотидів на структурі іРНК, яка локалізована на 5-кінці молекули перед ініціюючим кодоном (точкою +1 оперону прокаріот). Ця ділянка іРНК дістала назву *послідовності Шайно-Дальгарно* (SD) і є комплементарною до 3'-кінця 16S РНК. На 5'-кінці іРНК еукаріот локалізовані кеп-структури та ініціюючий кодон АУГ, а на 3'-кінці – термінуючі кодони УАА, УГА та поліаденілова послідовність нуклеотидів. Кеп-структури разом з δ -фактором стимулюють ініціацію в межах промоуторної ділянки: 40S субчастинка рибосоми зв'язується з 5'-кінцем іРНК та рухається в напрямку 3'-кінця доки не „зустріне” сигнал ініціації. Далі приєднується 60S субчастинка і розпочинається трансляція іРНК. Цей механізм дістав назву *кеп-залежної скануючої моделі ініціації трансляції*.

Транспортні РНК (тРНК) – важливі складові блоксинтезуючої системи, які є продуктами генів, що локалізовані на помірних повторах нуклеотидів. Встановлено, що у клітині існує в середньому більше 70 різних видів тРНК. Вони забезпечують транспорт активованих амінокислот до місця біосинтезу білка та переведення генетичного коду під час трансляції внаслідок кодон-антикодонової взаємодії. Кожна протеїногенна амінокислота переноситься відповідною тРНК. Якщо амінокислота кодується не одним, а кількома кодонами, то транспорт її до місця синтезу білка проходить за участю кількох тРНК, що мають назву *ізоаццепторних*.

Формілметіонін-тРНК (тРНК^{фмет}). Дослідженнями було виявлено, що білкові молекули, синтезовані на рибосомах прокаріот, на N-кінці містять формільовані залишки метіоніну. Тобто, крім звичайних тРНК, які забезпечують транспорт протеїногенних амінокислот, в клітинах прокаріот присутня тРНК, що переносить формілметіонін і пізнає на структурі іРНК кодон АУГ в тому випадку, коли він знаходиться на 5'-кінці молекули іРНК (ініціюючий кодон). Якщо кодон АУГ знаходиться на інших ділянках іРНК, він кодує звичайну тРНК^{фмет}. Кодон, що кодує формілметіонін, на структурі деяких іРНК прокаріот може бути розміщений після лідерної послідовності Шайно-Дальгарно. Враховуючи це, цей кодон дістав назву *сигналу ініціації*, а комплекс, що утворюється при цьому, ініціюючого. Формілювання метіоніну проходить після приєднання його до відповідної тРНК, за участю специфічного ферменту – трансформілази, який переносить формільну групу від 10-формілтетрагідрофолієвої кислоти на метіонін. Цей фермент специфічний лише для тРНК^{фмет}.

Внаслідок формілювання NH₂-групи метіоніну проходить її блокування і вона втрачає здатність до утворення пептидного зв'язку, що забезпечує

нарощування поліпептидного ланцюга в напрямку від N- до C-кінця. Тобто, перший пептидний зв'язок буде утворюватись внаслідок конденсації карбоксильної групи N-кінцевої амінокислоти з аміногрупою наступної. У клітинах еукаріот процес формілювання відсутній, оскільки ініціація синтезу білка відбувається внаслідок приєднання тРНК до кеп-структури, локалізованої на 5'-кінці іРНК.

Ферменти та білкові фактори

Важливим компонентом білоксинтезуючої системи є фермент **аміноацил-тРНК-синтетаза**, для якого характерні два види специфічності: по відношенню до субстратів (протеїногенних амінокислот) і відповідних тРНК. У зв'язку з цим він містить два активних центри, які зв'язують вказані субстрати одночасно. Процес є енергозалежним і вимагає присутності АТФ. Молекули тРНК, які переносять різні протеїногенні амінокислоти, відрізняються елементами первинної структури, тому відповідні аміноацил-тРНК-синтетази легко розпізнають їх. Якщо амінокислоти мають подібні радикали, наприклад, Вал і Іле, що різняться наявністю в радикалі Іле ще однієї метиленової групи (CH_2), то додаткова стерична взаємодія, яку вносить ця група, сприяє інтенсивнішій активації Іле порівняно з Вал. Одночасно з цим, оскільки концентрація Вал у клітині в 5 разів вища, ніж Іле, то по суті, він повинен би значно частіше включатись до складу білків, але цього не відбувається, оскільки існує специфічна система репарації: Вал помилково активований ферментом замість Іле, не переноситься на відповідну тРНК: проходить гідроліз зв'язку валін-АМФ на стадії утворення аміноациладенілату.

Білкові фактори. На рибосомному апараті клітини ці фактори забезпечують окремі етапи трансляції: її початок (ініціацію), подовження ланцюга (елонгацію) та закінчення синтезу (термінацію). У прокаріот є кілька ініціюючих факторів **IF1, IF2, IF3** (в еукаріот – **eIF1, eIF2, eIF3**), кожен з яких виконує певну роль у забезпеченні цього процесу. За участю факторів елонгації **EF-Tu, EF-G, EF-Ts** відбувається нарощування поліпептидного ланцюга під час елонгації. Термінацію трансляції забезпечують специфічні фактори: у прокаріот **RF1 і RF2**, в еукаріот відповідно фактор **R**.

Для матричного синтезу білка необхідні також йони Mg^{2+} та енергія ГТФ.

3. ОСНОВНІ ЕТАПИ ТРАНСЛЯЦІЇ

Безпосередній синтез білкових молекул включає 2 етапи: *рекогніцію та трансляцію*. Трансляцію, в свою чергу, поділяють на *ініціацію, елонгацію та термінацію*.

Рекогніція відбувається у цитоплазмі, а трансляція на вільних рибосомах, полісомах або рибосомному апараті, який формується при зв'язуванні субчастинок рибосом з мембранами гранулярного ендоплазматичного ретикулулу.

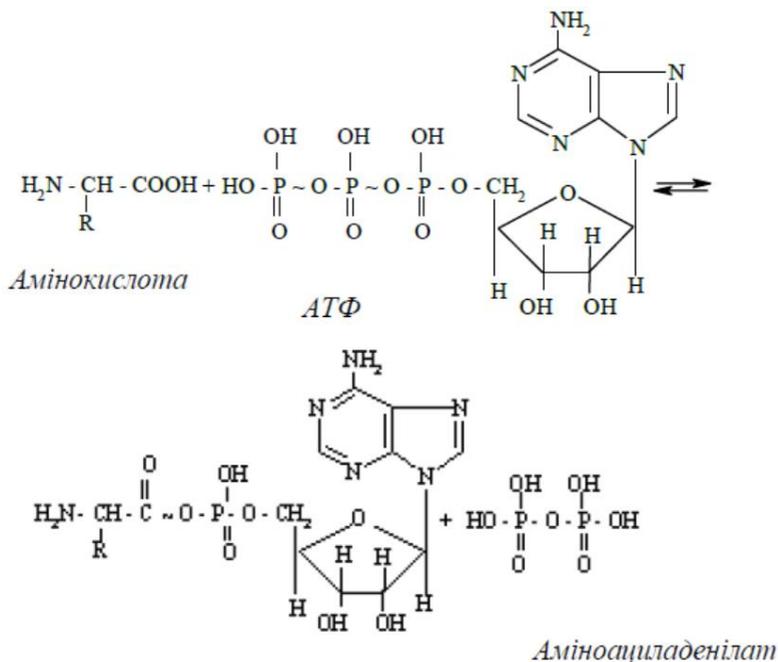
На вільних рибосомах синтезуються прості білки, необхідні для забезпечення метаболізму клітини, а на рибосомах, зв'язаних з ЕПР (полісомах), так звані, „експортні” білки, які входять до складу мембранних структур клітини та виконують різні специфічні функції в позаклітинному просторі.

1. Рекогніція (пізнання)

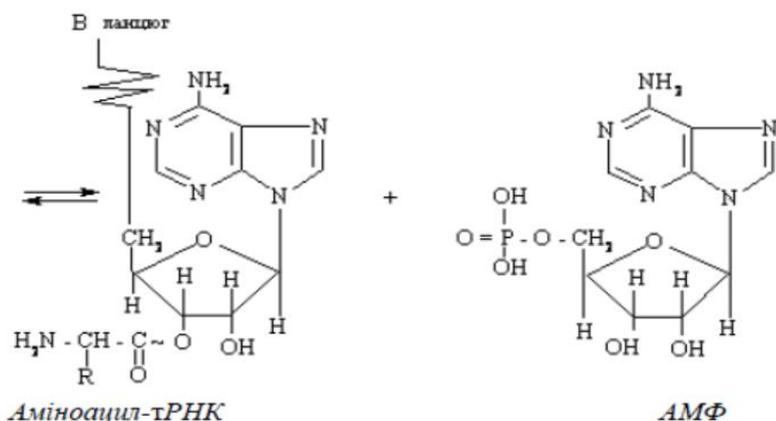
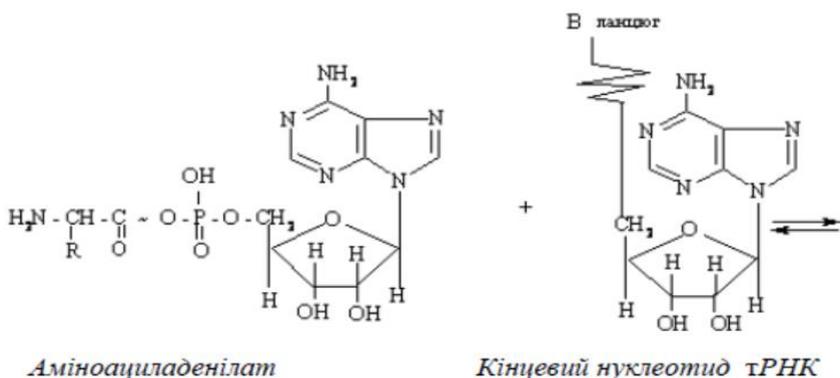
Рекогніція (від англ. recognise — пізнавати) — це перший етап білкового синтезу, який відбувається в цитоплазмі. Суть цього процесу у пізнанні протеїногенних амінокислот відповідними тРНК, їх АТФ-залежній активації, забезпеченні певним запасом енергії, необхідної для перебігу наступних етапів синтезу.

При рекогніції амінокислоти сполучаються з відповідними тРНК, внаслідок чого проходить їх відбір і вони надходять до місця синтезу білка в певний час та у чітко визначеному порядку згідно з генетичною інформацією, закованою на структурі іРНК.

Активация амінокислот відбувається за участю високоенергетичної сполуки — АТФ і ферментів — аміноацил-тРНК-синтетаз (аміноацилсинтетаз).



На наступному етапі комплекс аміноациладенілату з ферментом взаємодіє з тРНК, специфічною для кожної амінокислоти. При цьому аміноацильна група з аміноациладенілату переходить до тРНК з утворенням нового комплексу — аміноацил-тРНК і виділяються АМФ та фермент.



Трансляція включає три основні етапи — ініціацію, елонгацію і термінацію.

Ініціація синтезу поліпептидного ланцюга — це утворення ініціюючого комплексу і формування функціонально активної рибосоми. *Рибосоми*, як уже згадували, — складні рибонуклеопротеїдні комплекси, що складаються з білка і р-РНК. Рибосоми здатні сполучатися одна з одною і утворювати полірибосоми (полісоми).

Рибосоми прокариот характеризуються константою седиментації 70S, еукариот — 80S. Кожна рибосома складається з двох субодиниць — малої і великої. На субодиницях рибосом знаходиться система зон і ділянок для контакту і зв'язування іРНК, тРНК та ряду інших компонентів, необхідних для синтезу білка.

За певних умов рибосоми можуть розщеплюватись на субодиниці, тобто дисоціювати, а потім знову сполучатися — асоціювати, що має велике значення в процесі синтезу білка.

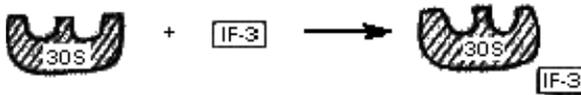
Функціонально-активна рибосома має функціонально-активний центр (ФАЦ), де проходить синтез поліпептидного ланцюга. На структурі ФАЦ локалізовані дві ділянки: аміноацильна (А-сайт) і пептидильна (П-сайт).

До складу ініціюючого комплексу входять:

- 80S рибосома – в еукаріот, 70S – в прокариот;
- м-РНК (і-РНК);
- в еукаріотів *т-РНКметіонін* – особливий тип т-РНК, що постачає в рибосому першу, ініціюючу амінокислоту – метіонін; у прокариотів – *т-РНКформілметіоніл*, що постачає модифікований метіонін – формілметіонін;
- білкові фактори ініціації (eIF1, eIF2, eIF3 – в еукаріот; IF1, IF2, IF3 – у прокариот), яких сьогодні відомо близько 10;
- коферменти ГТФ та АТФ, що забезпечують енергією різні етапи ініціації.

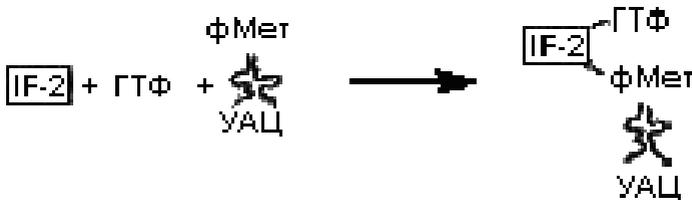
3.1. Особливості трансляції в клітинах прокариот

Ініціацію трансляції у прокариот забезпечують три білкові фактори: IF1, IF2 та IF3 (від англ. *Initiation factors*). Цей процес включає кілька етапів. Спочатку IF3 взаємодіє з 30S субодиноцею рибосоми, внаслідок чого утворюється двохкомпонентний комплекс (IF3 · 30S):

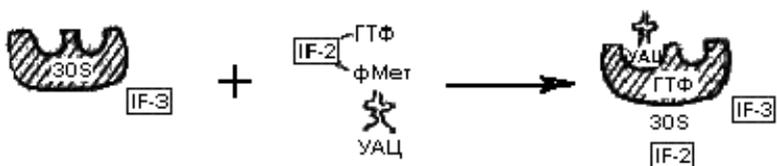


IF3 забезпечує пізнавання на іРНК кодону, до якого приєднується антикодон т-РНКфмет (*т-РНКформілметіонін*).

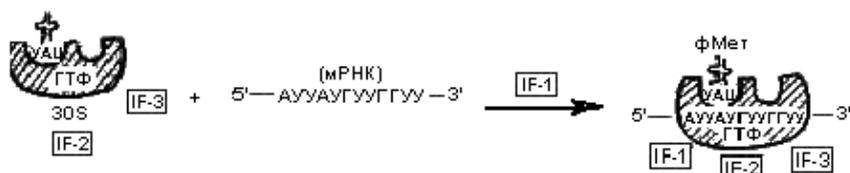
Комплекс 30S з IF3 запобігає приєднанню до нього 50S субодиноці до того часу, доки за участю IF1 не приєднається іРНК. Крім того, цей комплекс розпізнає на іРНК певні чергування нуклеотидів (RBS-послідовності), що містять ініціюючий кодон та SD-послідовності (Шайна-Дальгарно) на лідерній зоні іРНК, за допомогою яких іРНК приєднується до 16S РНК рибосоми. Наявність ініціюючого кодону, який визначає початок переведення інформації закодованої на структурі іРНК, є важливим, оскільки для ініціації трансляції необхідне точне фіксування рибосоми на стартовому кодоні. На наступному етапі ініціації IF2 взаємодіє з ГТФ та тРНКфмет, внаслідок чого утворюється трьохкомпонентний комплекс (IF2 · ГТФ · тРНКфмет):



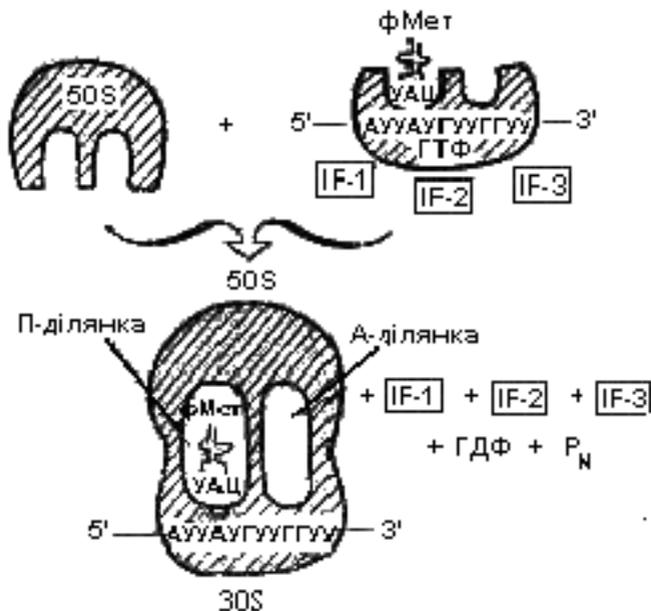
Цей комплекс взаємодіє з попереднім:



До утвореного п'ятикомпонентного комплексу за участю IF1 приєднується іРНК і формується ініціюючий комплекс, який включає фактори ініціації, 30S субодиниці рибосоми, іРНК та тРНКфмет:



Далі, ініціюючий комплекс взаємодіє з 50S субодиницею рибосоми за допомогою дигідроуридилової петлі тРНК. За цих умов проходить видалення факторів ініціації, гідроліз ГТФ до ГДФ та формування функціонально активної рибосоми, яка містить комплекс 70S · іРНК · тРНКфмет:

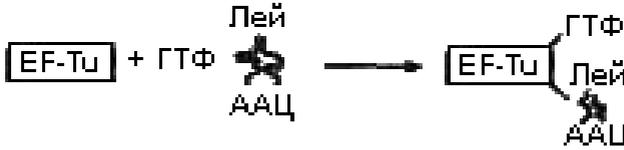


Елонгація (від англ. *elongatio* – подовження). Суть елонгації в поступовому нарощуванні поліпептидного ланцюга від N до С-кінця.

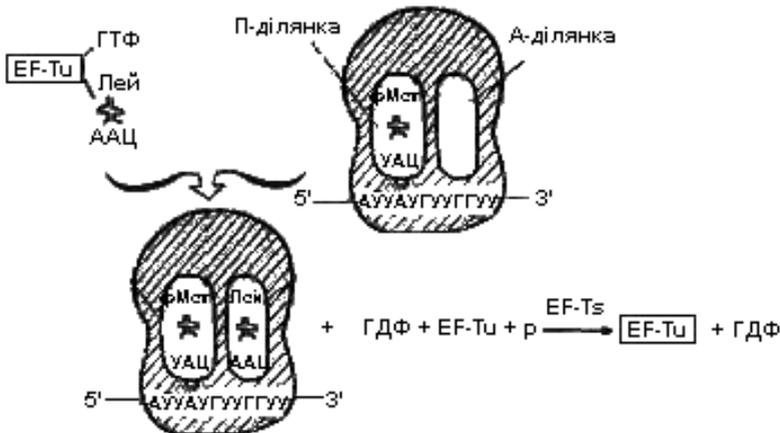
Цей процес включає:

- перенесення до рибосоми наступної аміноацил-тРНК, яка визначається кодоном іРНК, розміщеним після ініціюючого, та зв'язування її в А-ділянці рибосоми;
- транслокацію тРНК_{фмет} з Р-ділянки рибосоми в А-ділянку;
- утворення пептидного зв'язку (ГТФ-залежна реакція);
- перенесення утвореного дипептиду в Р-ділянку рибосоми за участю білкового фактору 50S субодиниці рибосоми – транслокази та видалення вільної тРНК.

Для перебігу елонгації необхідна наявність білкових факторів (EFTs, EFTu, EFG), ГТФ у вигляді джерела енергії та відповідних аміноацил-тРНК. Розпочинається елонгація з утворення комплексу EFTu · ГТФ · аміноацил-тРНК:



Утворений комплекс надходить до А-ділянки ФАЦ рибосоми, де відбувається його зв'язування з кодоном іРНК. ГТФ, за цих умов, гідролізує до ГДФ і в комплексі з EFTu видаляється з рибосоми. Під впливом EFTs комплекс руйнується з утворенням ГДФ і EFTu:

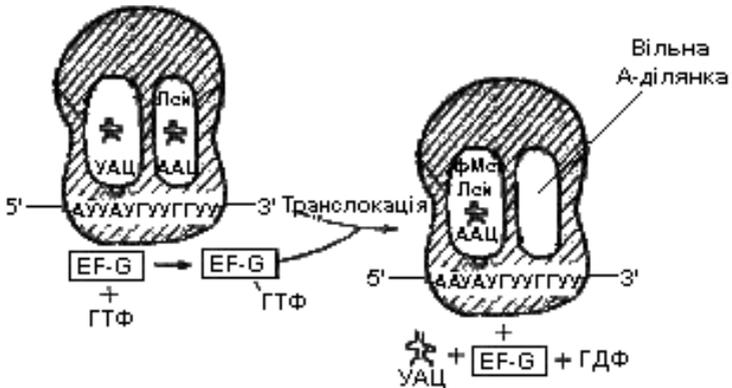


Далі, за участю фактору транслокації (EFG), з П до А-ділянки рибосоми переноситься тРНК_{фмет} та утворюється перший пептидний зв'язок

(пептидил-тРНК), внаслідок взаємодії карбоксильної групи тРНКфмет і аміногрупи наступної аміноацил-тРНК, принесеної до рибосоми.

В утворенні пептидного зв'язку задіяний фермент пептидилтрансфераза, рибозимазна активність якого характерна для 23S рРНК, що входить до складу великої (50S) субодиниці рибосоми.

Після утворення зв'язку, вільна ОН-тРНК видаляється з рибосоми за участю ферменту пептидил-трансферази. На цьому етапі елонгації пептидил тРНК знаходиться в А-ділянці рибосоми, а в П-ділянці, після видалення вільної РНК, залишиться антикодон тРНКфмет:



Наступний етап елонгації – транслокація пептидил-тРНК з А- в П-ділянку рибосом, після чого цикл повторюється. У забезпеченні перебігу елонгації важлива роль належить ферменту гуанозинтрифосфатазі, який звільняє енергію внаслідок гідролізу ГТФ.

Швидкість нарощування поліпептидного ланцюга, в середньому, складає 10 амінокислотних залишків за секунду. Тобто, молекула білка, яка містить 200 амінокислотних залишків, синтезується на рибосомі за 1-3 хв. Процес елонгації поліпептидного ланцюга повторюється багато разів, залежно від кількості кодонів на структурі іРНК (інформації, яка закодована на матриці).

Завершальним етапом трансляції є **термінація** або закінчення синтезу поліпептидного ланцюга. Як вказувалося раніше, кодони УАА, УАГ, УГА на структурі іРНК є сигналами закінчення синтезу білка, або сигналами термінації. Ці триплети часто називають беззмисливими, термінаторними або нонсенс-триплетами. В пізнаванні цих кодонів на структурі іРНК у прокаріот задіяні фактори термінації RF1, RF2, RF3. Фактор RF1 реагує на появу кодону УАГ і УАА, а RF2 – на УАА і УГА. Після того, як термінуючий кодон потрапляє в А-ділянку ФАЦ рибосоми, до нього приєднується один з факторів термінації.

Термінація включає такі процеси:

- транслокацію синтезованого поліпептиду з А-ділянки в П-ділянку рибосоми;
- розрив зв'язку між С-кінцевою амінокислотою та її тРНК;
- вихід білка з рибосоми;
- дисоціацію рибосоми на субчастинки.

У прокариот іРНК поліцистронна, тому зчитування інформації відбувається за участю комплексу рибосом, тобто, на полісомі. Це забезпечує більшу ефективність трансляції, оскільки кожна рибосома проводить всі етапи – ініціацію, елонгацію і термінацію, тобто синтез окремого поліпептидного ланцюга. Розміри полісомних комплексів залежать від параметрів іРНК. Якщо іРНК містить кілька тисяч нуклеотидів, то вона може транслюватися комплексом з 50-100 рибосом. Як правило, найчастіше утворюються комплекси з 10-20 рибосом.

Таким чином, для трансляції в клітинах прокариот характерне:

- поєднання трансляції з транскрипцією, тобто ці процеси не розділені у просторі і часі та відбуваються одночасно (*скануюча модель трансляції*);
- одночасний синтез кількох поліпептидних ланцюгів на структурі іРНК, яка є поліцистронною;
- кожен окремий цистрон іРНК містить ініціюючий і термінуючий кодон;
- перед ініціюючим кодоном розміщена специфічна SD-послідовність нуклеотидів, що є аналогом 5'-нетранслюючої послідовності нуклеотидів на структурі іРНК еукаріот;
- всі цистрони поліцистронної іРНК прокариот транслюються одночасно і незалежно один від одного. Тобто, окрема рибосома у складі полісоми зв'язується з SD-послідовністю одного із цистронів та звільняється після його зчитування. Інші рибосоми можуть зв'язуватися з наступними цистронами цієї ж іРНК, що значно підвищує ефективність трансляції;
- кеп-незалежний механізм ініціації трансляції;
- наявність ініціюючого кодону, який визначає початок синтезу поліпептидного ланцюга;
- ініціюючий кодон кодує тРНК^{фмет}. Після закінчення трансляції формільований залишок метіоніну може залишатися на структурі генних продуктів, або видаляється.

3.2. Особливості трансляції в клітинах еукаріот

Цей процес в еукаріотичних клітинах практично не відрізняється від трансляції у клітинах прокариот. Виключенням є лише окремі деталі, які пов'язані з посттрансляційною модифікацією молекули білка та структурою зрілої іРНК, яка містить модифіковані 5' і 3'-кінці («кеп» і поліаденілову послідовність).

У першу чергу, для трансляції в еукаріот характерна *кеп-залежна ініціація*, суть якої в тому, що приєднання іРНК до рибосоми відбувається за участю специфічного еукаріотичного фактора ініціації (eIF4E), з яким зв'язується кеп-структура, що міститься на 5'-кінці іРНК (7-метилгуанозинтрифосфат).

У цьому процесі задіяний білковий фактор eIF3. Інші еукаріотичні фактори ініціації eIF4B і eIF4A, для яких характерна АТФ-азна активність, забезпечують рух іРНК в напрямку від 5' до 3'-кінця. Цей процес є енергозалежним, тому відбувається за участю ГТФ.

В ініціації трансляції задіяний також фактор eIF4G, необхідний для формування ініціюючого комплексу та функціонально активного центру рибосоми (ФАЦ).

Під час ініціації за участю eIF4A 40S субодиниця звільняється від eIF4G і eIF4E і в комплексі з 60S субодиницею зв'язує ініціюючий кодон АУГ. Після цього відбувається звільнення решти факторів ініціації та завершується формування функціонально активного центру 80S рибосоми.

У деяких еукаріотичних клітинах може мати місце і кеп-незалежна ініціація трансляції, за участю специфічних внутрішніх ділянок рибосоми – IRES (від англ. *Internal Ribosome Entry Site*). Ці ділянки пізнають специфічні чергування нуклеотидів на структурі іРНК. Кеп-незалежний механізм ініціації трансляції було виявлено у клітинах еукаріот за умов негативного впливу різних факторів, які знижують ефективність трансляції.

Елонгація трансляції в еукаріот подібна до цього процесу у прокаріотичних клітинах. Однак, її перебіг забезпечують два фактори: еукаріотичний фактор елонгації 1 (eEF1), до складу якого входять α , β і γ -субодиниці, та eEF2. Субодиниці eEF1 виконують функції EF-Tu та EF-Ts прокаріотичних клітин, а eEF2 – прокаріотичного фактора EF-G.

Термінація трансляції у клітинах еукаріот, на відміну від прокаріот, відбувається за участю єдиного фактора RF.

Білки, що синтезуються в клітинах еукаріот відрізняються своїми функціями і місцем їх функціонування. Тому розрізняють білки, що призначені для виведення з клітини – **білки на «експорт»** а також білки, що входять до складу ЕПС, апарату Гольджі, лізосом чи плазматичної мембрани, і **білки, що залишаються в клітині** – в цитоплазмі, мітохондріях, пластидах, пероксисомах, ядрі. Синтез цих білків відрізняється: білки на експорт синтезуються на рибосомах зв'язаних з ЕПС, а білки, що залишаються в клітині – на вільних рибосомах.

Синтез білків на рибосомах, зв'язаних з мембранами ЕПР, має певні особливості. Так, кожен з видів експортних білків синтезується на певних ділянках ЕПР. Перед початком трансляції експортних білків у цитоплазмі формується ініціюючий комплекс, до складу якого входять іРНК певного білка, що транслюється, субодиниці рибосом, а також аміноацил-тРНК. Цей комплекс забезпечує трансляцію **сигнального пептиду** (чергування амінокислот, які містяться на N-кінці молекул багатьох білків), що необхідний для зв'язування рибосом з мембранами ЕПР та проникнення білка в його внутрішній простір.

Сигнальні пептиди включають до 35 залишків амінокислот з полярними і неполярними радикалами, що є необхідним для зв'язування їх з гідрофобними та гідрофільними ділянками мембран ЕПР.

Сигнальні чергування амінокислот можуть розпізнаватися специфічними рибонуклеопротеїновими комплексами, які сприяють фіксації іРНК на поверхні мембран за участю специфічних докінг-білків. Результатом цього є зв'язування рибосоми з певним локусом на структурі мембрани ЕПР, а також визначення ділянки іРНК, яка буде зазнавати трансляції. Після закінчення трансляції і проникнення білків у внутрішній простір ЕПР, сигнальні пептиди видаляються за участю специфічних пептидаз і не входять до складу синтезованих білків.

Синтезовані на рибосомах, зв'язаних з ЕПР, поліпептидні ланцюги, завдяки наявності на N-кінцях специфічних сигнальних чергувань амінокислот, легко проникають всередину мембран ендоплазматичного ретикулу.

У мембранах ЕПР формуються поліпептидтрансформуючі пори або *транслокони*, які полегшують проникнення білків у внутрішній простір ЕПР, де можуть проходити процеси їх посттранскрипційної модифікації.

Білки, що залишаються в клітині на її потреби, а саме білки мітохондрій, пластид, ядра, пероксисом синтезуються вільними рибосомами. Після їх синтезу для подальшого транспорту в мітохондрії, ядро або пероксисоми (для проходження через мембрану) білки повинні мати **спеціальні сигнальні послідовності (СП)**.

Мітохондріальні білки, що імпортуються в мітохондріальний матрикс, зазвичай поступають з цитозолу протягом 1-2 хв після їх відділення від полірибосом. Ці білки мають сигнальний пептид завдовжки від 20 до 80 амінокислотних залишків. Особливістю транспорту білків у мітохондрії є те, що вони після надходження у матрикс органели, втрачають відповідну СП. Однак, якщо білки призначені для міжмембранного простору мітохондрій, то вони містять ще одну СП, за допомогою якої і проникають у міжмембранний простір. Для транспорту білків у мітохондрії необхідна енергія у формі АТФ. Крім того, потрібна ще наявність електрохімічного градієнту на внутрішній мітохондріальній мембрані. Цей градієнт утворюється в процесі транспорту електронів у міру того, як протони відкачуються з матриксу в міжмембранний простір. Поліпептидний ланцюг до закінчення всіх цих транспортних процесів залишається в розгорнутому стані, що забезпечується спеціальними *білками-шалперонами*.

Ядерні білки з цитоплазми в ядро потрапляють через поріновий комплекс. Білки не можуть синтезуватися в ядрі, і тому всі ядерні білки повинні бути імпортовані з цитоплазми. Пептиди і невеликі білки, наприклад гістони, здатні легко проникати в ядро. Крупніші білки (понад 40 кДа) можуть пройти через ядерну мембрану, тільки якщо вони несуть специфічну сигнальну послідовність – *сигнали ядерного імпорту*. Ці сигнали можуть знаходитися в будь-якій частині молекули білка, складаються з короткого пептиду (зазвичай від чотирьох до восьми амінокислотних залишків), збагаченого позитивно зарядженими амінокислотами лізином і аргініном і, зазвичай, містять пролін.

Транспорт білків через поріновий комплекс енергозалежний і тому може регулюватися. Ядерні білки несуть одну або декілька сигнальних послідовностей, за допомогою яких вони зв'язуються з поріновим комплексом та імпортуються із збереженням третинної структури. Особливістю ядерних білків є те, що їх сигнальна послідовність при перенесенні в ядро, не відщеплюється.

Транспорт **білків в хлоропласти** у багатьох відношеннях нагадує транспорт в мітохондрії: відбувається після трансляції, потребує енергії, використовуються певні сигнальні послідовності, які потім відділяються. Подібно до деяких мітохондріальних білків, білки хлоропластів доставляються до місця призначення в два етапи. Спочатку вони проникають через двомембранну оболонку в матрикс хлоропласту (у строму), а потім переносяться в мембрану тилакоїда або крізь неї в тилакоїдний простір. Такі білки окрім N-кінцевого сигнального пептиду мають ще тилакоїдний сигнальний пептид. Після того, як білок за допомогою N-кінцевого сигнального

пептиду проникає в строму, цей пептид відділяється стромальною протеазою, в результаті чого відкривається тилакоїдний сигнальний пептид, який потім ініціює транспорт білка через мембрану тилакоїду.

Таким чином, при спільних загальних рисах перебігу процесу трансляції у клітинах про- і еукаріот існують певні відмінності, зумовлені молекулярними механізмами організації їх геномів та специфікою процесів передачі спадкової інформації.

4. РЕГУЛЯЦІЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ТРАНСЛЯЦІЇ У КЛІТИНАХ ПРО- І ЕУКАРІОТ

Необхідною умовою існування живих систем, забезпечення їх життєдіяльності є наявність узгодженої системи регулювання найважливіших процесів, які протікають в них. Це, насамперед, стосується синтезу білка, оскільки оптимальне співвідношення між кількістю і якістю різних білків відіграє важливу роль у забезпеченні ряду життєвоважливих процесів як для одноклітинних, так і для багатоклітинних організмів.

Інтенсивність трансляції у клітинах живих організмів залежить від чисельних регуляторних механізмів, що можуть виявляти безпосередній чи опосередкований вплив на її перебіг. Це стосується, зокрема, індукції та репресії генів у прокаріот, процесів, які регулюються за принципом прямого і зворотного зв'язку та можуть суттєво впливати на синтез іРНК, що виконують роль матриць під час трансляції генетичної інформації. Регуляція трансляції може відбуватися також на рівні антиметаболітів, які впливають на рекогницію в цитоплазмі клітин (утворення аміноацил-тРНК). Прикладом може бути антиметаболіт пуроміцин, який є структурним аналогом аміноацил-тРНК, задіяних у процесі трансляції. У зв'язку з структурною подібністю до тРНК, пуроміцин може зв'язуватися з А-центром як бактеріальної, так і еукаріотичної рибосоми. Це гальмує наступну пептидилтрансферазну реакцію (перенесення пептидилпуроміцину в Р-ділянку рибосоми) і пригнічує один з етапів трансляції – елонгацію (подовження) поліпептидного ланцюга.

Негативний вплив на трансляцію генетичної інформації у клітинах еукаріот виявляють токсини хвороботворних мікроорганізмів. Зокрема, дифтерійний токсин блокує один з факторів елонгації EF-Tu (транслоказу), який забезпечує енергозалежний процес формування комплексу EF-Tu · ГТФ · тРНК та перенесення активованих залишків амінокислот до рибосоми (елонгацію трансляції).

Регуляція інтенсивності трансляції у клітинах про- і еукаріот має певні особливості, зумовлені будовою клітин, специфічними рисами реалізації генетичної інформації та життєвого циклу, який у прокаріот, у значній мірі, залежить від клітини-хазяїна.

Враховуючи це, важливими чинниками, які впливають на перебіг трансляції у клітинах прокаріот є, в першу чергу, антибіотики, речовини, що продукуються нижчими організмами, грибами, деякими бактеріальними клітинами, які містять специфічні плазміди. Характерним є те, що вони суттєво не впливають на трансляцію у клітинах еукаріот, що створює можливість боротьби вищих організмів із збудниками інфекційних захворювань.

Найчастіше інгібіторами трансляції у клітинах прокаріот, які діють на рівні рибосомного апарату клітини, є такі антибіотики, як еритроміцин, стрептоміцин, левоміцетин. Механізм їх гальмівної дії ґрунтується на

блокуванні зв'язування аміноациладенілатів в А-центрі 30S субодиноці рибосоми (під час ініціації трансляції) або блокуванні окремих ділянок 50S субодиноці (під час елонгації трансляції). Так, стрептоміцин блокує зв'язування формілметіонін-тРНК з ініціюючим кодоном іРНК, а тетрациклін з Р-центром 70S рибосоми, що значно пригнічує синтез поліпептидних ланцюгів. Антибіотик хлорамфенікол (левоміцетин) гальмує пептидилтрансферазний цикл, а еритроміцин – 50S субодиноці рибосоми, в якій відбувається зв'язування специфічних факторів елонгації трансляції. Внаслідок цього утворена пептидил-тРНК не транслокується з А-ділянки рибосоми в Р-ділянку, що негативно впливає на функціонування рибосомного апарату та перебіг трансляції. Тобто, механізм дії інгібіторів трансляції у клітинах прокариот реалізується переважно на рівні її окремих етапів – ініціації та елонгації, що негативно впливає на процес в цілому.

Слід підкреслити, що шкідливий вплив надмірного, неконтрольованого застосування антибіотиків при лікуванні захворювань, як правило, реалізується не внаслідок пригнічення трансляції, оскільки ці антибіотики, в меншій мірі, впливають на клітини вищих організмів, а за рахунок інших механізмів. В першу чергу, це стосується пригнічення мікрофлори шлунково-кишкового тракту та розвитку дисбактеріозів, а також впливу на гемопоез.

На трансляцію у прокариот негативно впливають також тваринні і рослинні токсини та інтерферони. Інтерферони являють собою специфічні позаклітинні регулятори метаболізму. Вони не проникають до клітини, а зв'язуються із специфічними рецепторами цитоплазматичної мембрани, внаслідок чого у клітині індукується ряд ефектів: пригнічення трансляції, посилюється фрагментація та руйнування іРНК за участю ендонуклеаз та 3'-РНКаз. За цих умов порушується синтез білків як інфікованого вірусами організму, так і вірусних білків, оскільки вони для власних потреб використовують рибосомний апарат клітини-хазяїна. Тобто інтерферони гальмують метаболічну активність клітини і запобігають надмірному розмноженню вірусних часточок та захищають від поширення інфекції на інші клітини.

Гальмування трансляції у клітинах про- та еукаріот за участю інтерферонів може відбуватися також внаслідок підвищення активності протеїнази, які задіяні в посттрансляційній модифікації певних факторів, необхідних для забезпечення трансляції, зокрема IF2, внаслідок чого він втрачає здатність виконувати специфічні функції – ініціацію цього процесу.

Регуляція трансляції в еукаріот може відбуватися також на рівні макромолекул (при синтезі ДНК і різних видів РНК) формуванні рибосом та інших субклітинних структур клітини. Це стосується, зокрема, ядерно-цитоплазматичних відносин, специфічних функцій гормонів, які є універсальними регуляторами метаболічних процесів в організмі і діють узгоджено з нервовою системою.

З'ясування суті механізму регуляції синтезу білка є досить складною проблемою, яка ще не повністю розв'язана і в наш час. Над вирішенням цієї проблеми протягом кількох десятиріч працювала велика група дослідників-генетиків, біохіміків, молекулярних біологів. Логічним розвитком даних досліджень стала **концепція регуляції синтезу білка**, розроблена в 1961 р. лауреатами Нобелівської премії французькими вченими Ф. Жакобо і Ж. Моно.

Ґрунтується вона на даних спостережень за індукцією і репресією утворення ферментів у клітинах бактерій *E. coli*.

Дослідженнями виявлено збільшення концентрації деяких ферментів бактерій при добавлянні в середовище субстратів, на які вони діють, і зниження концентрації ферментів при наявності кінцевих продуктів реакцій, що каталізуються даними ферментами. Отже, між цими процесами встановлено тісний взаємозв'язок.

Концепція Ф. Жакобо і Ж. Моно, сформульована в дослідях на прокаріотах, дістала широке визнання і в наш час вважається загальноприйнятною. Згідно з цією концепцією, регуляція синтезу білка здійснюється на рівні ДНК, молекула якої складається з певних функціональних ділянок — генів, згрупованих залежно від функцій, які вони виконують. Одна група таких функціональних ділянок названа *структурними генами*, або *цистронами*. Вони містять інформацію про синтез певних поліпептидних ланцюгів білка. Початок синтезу іРНК, тобто зчитування генетичної інформації, розпочинається з функціональної ділянки ДНК, яка має назву промотора і є точкою ініціації її синтезу.

Іншу групу функціональних ділянок ДНК становлять регуляторні гени, які регулюють активність структурних генів шляхом їх «включення» та «виключення». Регуляторні гени представлені геном-оператором, що знаходиться безпосередньо біля групи структурних генів, і геном-регулятором, що знаходиться від них на деякій відстані.

Ген-оператор є ніби пусковим механізмом, який, залежно від умов, дозволяє або гальмує синтез іРНК на структурних генах ДНК. Вважають, що ген-оператор локалізований на крайньому відрізку цистронів і є, очевидно, вихідним пунктом дії ДНК-залежної-РНКполімеразі.

Гени-оператори разом з групами структурних генів, промотором та термінатором, утворюють групи узгоджено діючих блоків — оперонів, кожен з яких відповідає за взаємозв'язаний синтез ряду специфічних білків, тобто оперон є одиницею транскрипції.

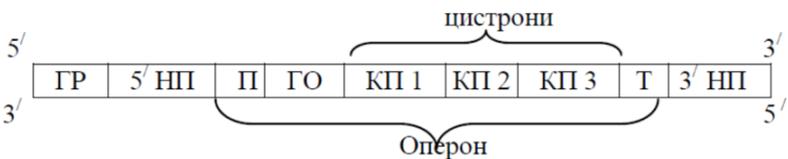


Рис. 10. Будова оперону прокаріот: ГР – ген-регулятор, 5'-НП – 5'-нетрансляційні послідовності, П – промотор, ГО – ген-оператор, КП – кодуючі послідовності, Т – термінатор, 3'-НП – 3'-нетрансляційні послідовності

Діяльність гена-оператора регулюється геном-регулятором. Оскільки ген регулятор і структурні гени оперону розташовані на різних ділянках ДНК, то зв'язок між ними забезпечують речовини-посередники — білки-репресори, що утворюються в рибосомах на матриці іРНК, яка синтезується на гені-регуляторі.

Свою назву білок-репресор дістав завдяки тому, що його дія на ген оператор гальмує (репресує) діяльність останнього, внаслідок чого

припиняється функціонування всієї групи структурних генів. Білки-репресори проявляють спорідненість до гена-оператора і здатність до зворотнього зв'язування з ним. Крім того, білок-репресор здатний до специфічного зв'язування з певними низькомолекулярними речовинами, так званими індукторами, або ефекторами.

За звичайних фізіологічних умов репресори можуть перебувати в активному або пасивному стані. Перехід з одного стану в інший регулюється продуктами внутріклітинного обміну або речовинами, що надходять із зовнішнього середовища.

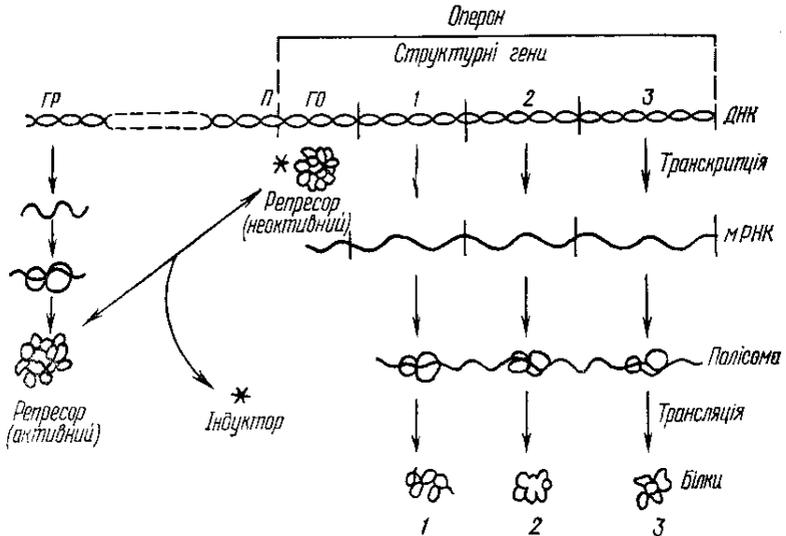
Залежно від стану білка-репресора розрізняють індукцибельну і репресибельну системи генної регуляції синтезу білка.

При **індуцибельній системі регуляції** білок-репресор, що утворюється на гені-регуляторі, перебуває в активному стані. Його вплив на ген-оператор призводить до блокування діяльності оперону і припинення синтезу іРНК і певних білків-ферментів. Синтез їх може відновлюватися лише в тому випадку, коли в клітині з'являються продукти, для утилізації яких необхідні дані ферменти. Білок-репресор, сполучаючись з цими продуктами (індукторами), втрачає здатність контролювати ген-оператор, внаслідок чого відновлюється синтез іРНК.

Вважають, що індуктор, сполучаючись з білком-репресором, зумовлює зміну його третинної структури, внаслідок чого останній втрачає здатність до зв'язування з субстратом — геном-регулятором. Разом з тим оператор, який виходить з-під контролю гена-регулятора, набуває активності і приводить в дію блок структурних генів, на яких здійснюється синтез іРНК, необхідних для утворення певних ферментів. Оскільки дані ферменти спрямовані на утилізацію індуктора, білок-репресор буде пасивним до того часу, поки під впливом ферментів відбудеться повне розщеплення індуктора. Після цього білок-репресор вивільнюється, переходить в активний стан і блокує оперон, внаслідок чого синтез іРНК, що кодує первинну структуру даних ферментів, припиняється.

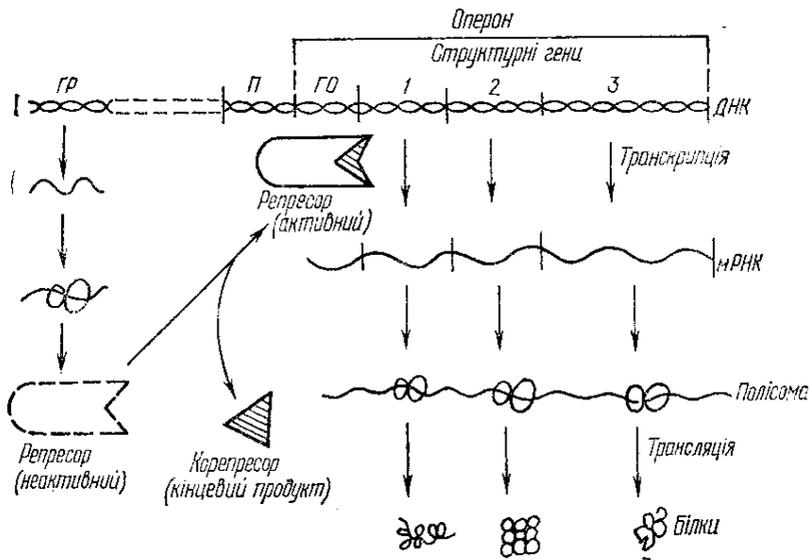
Прикладом індукцибельної регуляції синтезу білка може бути синтез у клітинах бактерій *E. coli* ферменту галактозидази, який зумовлює гідроліз молочного цукру (лактози) на глюкозу і галактозу. Штами бактерій не здатні до розвитку, якщо їх помістити в середовище, що містить замість глюкози лактозу до того часу, поки не закінчиться синтез відповідних ферментів, здатних утилізувати даний субстрат і використовувати його як джерело енергії, тобто, поки не здійсниться так званий адаптивний синтез необхідних ферментів.

Лактоза, що потрапляє в середовище, виконує роль індуктора, який сполучається з білком-репресором і блокує його зв'язок з геном-оператором. Ген-оператор і структурні гени вивільнюються і починають синтез іРНК, яка кодує первинну структуру ферменту галактозидази і забезпечує синтез даного ферменту на рибосомах. Оскільки синтез даного ферменту здійснюється під впливом речовини-індуктора, він має назву індукованого ферменту, а система, в якій проходить синтез, називається індукцибельною, оскільки має місце стимуляція (індукція) діяльності генів.



Крім індукції генів у клітинах відбувається їх репресія. Особливо часто цей процес спостерігається при процесах синтезу, коли концентрація багатьох ферментів значно знижується при збільшенні концентрації кінцевих продуктів реакцій, що каталізуються даними ферментами. При **репресибельній системі регуляції** синтезу білка білок-репресор, що синтезується на рибосомах ядра клітини, перебуває в пасивному стані і не може пригнічувати діяльність гена-оператора, а отже, і не контролює діяльність оперона, на якому проходить синтез іРНК. Активація білка-репресора, блокування оперона і припинення синтезу іРНК відбуваються під впливом корепресора, який утворює комплекс з опероном. Корепресорами є кінцеві продукти реакції синтезу, або один з цих продуктів. Є дані, що корепресором у процесі синтезу ферментів обміну амінокислот може бути не вільна амінокислота, як кінцевий продукт реакції біосинтезу, а її комплекс з тРНК (аміноацил-тРНК).

Блокування гена-оператора припиняється тоді, коли вичерпується весь корепресор. Внаслідок цього за відсутності активатора (корепресора) білок-репресор переходить у свій звичайний пасивний стан, вивільнює ген-оператор і групу структурних генів, на яких відновлюється синтез білків-ферментів.



Як зазначалось раніше, концепція Ф. Жакобо і Ж. Моно відносно регуляції синтезу білка стосується нижчих організмів — прокаріот, механізм регуляції цих процесів у клітинах високоорганізованих організмів — еукаріот — значно складніший. Певний внесок у розв'язання цієї проблеми зробили праці радянського вченого Г. П. Георгієва.

Згідно з його гіпотезою, в клітинах вищих організмів гени також згруповані в оперони, однак їхній склад не такий простий, як у мікроорганізмів. Основна відмінність полягає в тому, що оперон має ряд генів-операторів і кожен з них реагує з іншим білком-репресором. Блокування будь-якого гена-оператора перешкоджає просуванню ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази. Як результат цього синтез іРНК на структурних генах сповільнюється або припиняється зовсім.

Із-за наявності кількох генів-операторів на активність оперона впливає кілька різних факторів. Наприклад, один ген-оператор може блокуватися з підвищенням концентрації певного гормону, інший — з нагромадженням у клітині певного продукту обміну і т.д. Крім цього, один і той самий ген-оператор входить до складу різних оперонів. Тому ці оперони реагують на один і той самий фактор. Це свідчить про те, що будь-який один фактор може регулювати відразу кілька оперонів, а активність одного оперона може залежати від кількох різних факторів. Це створює досить точну і разом з тим гнучку систему саморегуляції.

Слід зазначити, що ряд питань, які стосуються механізмів, що зумовлюють специфічність біосинтезу білків, а також регуляції синтезу білків, вивчено ще недостатньо.

Тобто, трансляція генетичної інформації регулюється за участю різних специфічних механізмів, що можуть включатися залежно від потреб організму і

забезпечують оптимальні умови для реалізації життєвоважливих функцій видоспецифічних білків.

5. ПОСТТРАНСЛЯЦІЙНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ

Більшість простих білків, які синтезуються при трансляції, функціонує в такому вигляді як вони були синтезовані. Одночасно з цим, частина білків зазнає певних змін внаслідок *посттрансляційної модифікації*. Результатом цього є те, що до певної міри змінюється структура білків, а отже і їх біологічна активність та функції. Різні види посттрансляційної модифікації переважно стосуються експортних, а також складних білків, молекули яких містять простетичні групи. Синтез таких білків контролюється кількома генами: структурні гени кодуєть поліпептидні ланцюги, а наступну модифікацію забезпечують специфічні генні продукти, так звані, *модифікуючі білки*.

У клітинах еукаріот посттрансляційна модифікація білків являє собою:

- приєднання простетичних груп до синтезованих поліпептидних ланцюгів (фосфорилування, глікозилювання), внаслідок чого утворюються складні білки;
- формування вищих рівнів структурної організації внаслідок утворення внутрішньоланцюгових і міжланцюгових дисульфідних зв'язків;
- гідроксилування функціональних груп у молекулах білків (залишків лізину та проліну в колагені);
- модифікація N- і C-кінців молекул (амідування, ацетилювання і формілювання);
- метилювання залишків окремих амінокислот;
- взаємна заміна окремих амінокислотних залишків: пролін → оксипролін, цистеїн → цистин, лізин → метиллізин, серин → фосфосерин;
- приєднання кофакторів до ферментів;
- частковий протеоліз білкових молекул і утворення біологічно активних форм ферментів;
- асоціація мономерів в олігомери.

Ці процеси відбуваються в різних компартментах клітини – на мембранах ЕПР та апараті Гольджі. Зокрема, на мембранах ендоплазматичного ретикулулу проходить ферментативне глікозилювання білків – синтез складних білків глікопротеїнів, внаслідок приєднання до білкових молекул олігоцукридних фрагментів – глюканів.

В ЕПР модифікуються також лізосомні білки-ферменти, які мають глікопротеїнову природу. Мембранам ендоплазматичного ретикулулу належить важлива роль у посттрансляційній модифікації експортних білків, які функціонують у позаклітинному просторі. На цих мембранних структурах клітини, крім трансляції та фолдингу, проходить і специфічне сортування білкових молекул залежно від їх будови і функцій, а також цілеспрямований транспорт до різних компартментів клітини чи назовні. Модифіковані білки в мембранах ЕПР упаковуються у специфічні транспортні міхурці, які відокремлюються від них і дифундують до цистерн апарату Гольджі, де

проходить перебудова поліпептидних ланцюгів та включення до складу білкових молекул різних функціональних груп.

Внутрішньоклітинні білки, які синтезуються на вільних рибосомах або полісомах не зв'язаних з мембранами ендоплазматичного ретикулу, зокрема, мітохондріальні та ядерні білки, переносяться до відповідних органел, де відбувається формування їх вищих рівнів структури – фолдінг. Ці білки на N-кінцевих ділянках також містять сигнальні послідовності амінокислотних залишків, які сприяють проникненню їх через білково-ліпідний шар мембранних структур ядерного апарату та мітохондрій. Сигнальних послідовностей не містять лише гістонові білки, які мають невеликі розміри та значні гідрофобні ділянки, що полегшує їх трансмембранне перенесення.

Всі наведені види посттрансляційної модифікації білків відбуваються всередині клітини. Одночасно з цим, частина білків зазнає модифікації після секреції в позаклітинному просторі. Це стосується протеолітичних ферментів (пепсину, трипсину, хімотрипсину), а також деяких гормонів білкової природи, які виділяються в вигляді неактивних попередників (проферментів і прогормонів). Утворення активних форм відбувається внаслідок протеолізу частини молекули за участю специфічних ферментів, або аутокаталітично.

Контрольні запитання:

1. Генетичний код, його особливості.
2. Складові білок синтезуючої системи.
3. Ферменти та білкові фактори трансляції.
4. Етапи трансляції. Рекогніція.
5. Ініціація трансляції.
6. Особливості трансляції у прокариот.
7. Особливості трансляції у еукариот.
8. Білки на «експорт».
9. Білки, що залишаються в клітині.
10. Регуляція трансляції у клітинах прокариот та еукариот.
11. Індуцибельна система регуляції синтезу білків.
12. Репресибельна система регуляції синтезу білків.
13. Посттрансляційна модифікація білків.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Основна

1. Біологічна хімія: Підручник / Л.В. Левандовський, В.Г. Дрюк, О.І. Семенова та ін. — К.: НУХТ, 2012. — 386 с.
2. Боечко Ф.Ф. Основи молекулярної біології (курс лекцій) / Ф.Ф. Боечко, Л.О. Боечко, І.В. Шмиголь. — Черкаси: Вид. від ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. — 255 с.
3. Губський Ю.І. Біохімія: Підручник / Ю.І. Губський. — Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. — 508 с.
4. Кучеренко М.Є. Біохімія: підручник / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, О.М. Васильєв та ін. — К.: ВПЦ “Київ. ун-т”, 2002. — 480 с.
5. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. — К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. — 384 с.

Додаткова

1. Біологічна хімія: Підручник [Л.М. Вороніна, В.Ф. Десенко, Мадієвська Н.М. та ін.]; За ред. проф. Л.М. Вороніної. — Х.: Основа; Видавництво НФАУ, 2000. — 608 с.
2. Біохімія: практикум / Д.О. Мельничук, С.Д. Мельничук, Л.Г. Калачнюк та ін. — К.: НУБіП України, 2012. — 528 с.
3. Бойків Д.П. Клінічна біохімія / Д.П. Бойків, Т.І. Бондарчук, О.Л. Іванків; за ред. О.Я. Склярєва. — К.: Медицина, 2006. — 430 с.
4. Боечко Л.О. Основи біохімії вітамінів і гормонів / Л.О. Боечко. — Черкаси: Вид-во ЧНУ, 2005. — 294 с.
5. Боечко Ф.Ф. Біологічна хімія / Ф.Ф. Боечко. — К.: Вища школа, 1995. — 536 с.
6. Боечко Ф.Ф. Лабораторний практикум з біохімії: навчально-методичний посібник / Ф.Ф. Боечко, Л.О. Боечко, І.В. Шмиголь. — Черкаси: Вид. від ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2012. — 196 с.
7. Кучеренко М.Є. Сучасні методи біохімічних досліджень: Учбовий посібник / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 424 с.
8. Практикум з біологічної хімії / За ред. О.Я. Склярєва. — К.: Здоров'я, 2002. — 298 с.

Навчальне видання

Григорчук Інна Дмитрівна

**МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ
(курс лекцій)**

Оригінал-макет – Григорчук А.А.
Дизайн обкладинки – Григорчук А.А.