

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

Іншина Н. М.

ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Навчальний посібник

Видання друге, доповнене

Рекомендовано вченою радою Сумського державного університету

Суми
Сумський державний університет
2026

УДК 577.2(075.8)

I-74

Рецензенти:

В. Ю. Гарбузова – докторка біологічних наук, професорка, завідувачка кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету;
В. М. Торяник – кандидатка біологічних наук, доцентка, доцентка кафедри біології та методики навчання біології Сумського державного педагогічного університету імені А. С. Макаренка

*Рекомендовано до видання
вченою радою Сумського державного університету
як навчальний посібник
(протокол № 1 від 12 лютого 2026 року)*

Іншина Н. М.

I-74 Основи молекулярної біології : навчальний посібник / Н. М. Іншина. – Видання друге, доповнене. – Суми : Сумський державний університет, 2026. – 124 с.

ISBN 978-966-446-067-2

У навчальному посібнику викладено сучасні уявлення про молекулярні основи життєдіяльності клітини. Висвітлено питання структурної організації нуклеїнових кислот, біосинтезу ДНК, РНК і білків. Розглянуто особливості регуляції експресії генів у про- та еукаріотів, механізми репарації ДНК. Описано методи генної інженерії, що є основою діагностики й терапії спадкових захворювань. Проаналізовано сучасні технології синтезу фармацевтичних сполук із використанням трансгенних організмів.

Для здобувачів медичних та аграрних закладів вищої освіти.

УДК 577.2(075.8)



Цей твір ліцензовано на умовах
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International
(Із Зазначенням Авторства-Некомерційна-Поширення
на тих самих умовах 4.0 Міжнародна)

ISBN 978-966-446-067-2 © Сумський державний університет, 2026

ЗМІСТ

	С.
ВСТУП	4
Розділ 1. СТРУКТУРА І ВЛАСТИВОСТІ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ	6
1.1. Структурні компоненти нуклеїнових кислот	6
1.2. Рівні структурної організації ДНК	9
1.3. Типи РНК, їхня структура й функції	18
1.4. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот ..	22
Розділ 2. СИНТЕЗ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ І БІЛКІВ	26
2.1. Реплікація	27
2.2. Транскрипція	39
2.3. Трансляція	53
2.4. Посттрансляційна модифікація білків	66
Розділ 3. РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ. РЕПАРАЦІЯ ДНК	71
3.1. Регуляція транскрипції у прокаріотів	72
3.2. Особливості регуляції експресії генів в еукаріотів ...	76
3.3. Репарація ДНК	84
Розділ 4. ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ	93
4.1. Технологія рекомбінантної ДНК	93
4.2. Клонування генів. Клонотеки генів	95
4.3. Полімеразна ланцюгова реакція	98
4.4. Генна діагностика	100
4.5. Генна терапія	102
4.6. Біофармацевтика	110
СЛОВНИК ТЕРМІНІВ	115
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	122

ВСТУП

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

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

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

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

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

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

У 2012 р. в межах досліджень міжнародного проєкту Енциклопедія елементів ДНК ENCODE (Encyclopedia of

DNA elements) було з'ясовано, що 80 % геному людини активні й виконують важливі біохімічні функції [3]. Було виявлено 4 млн сайтів – регуляторів експресії генів. На сьогодні триває робота над секвенуванням геномів 147 типів клітин людини [16].

У 2012 р. була розроблена технологія CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), що дозволяє здійснювати спрямоване редагування геномів еукаріотичних клітин. Це відкрило нові можливості для вдосконалення методів створення високопродуктивних трансгенних організмів і розвитку генної терапії. Генотерапевтичні препарати дозволяють здійснювати корекцію метаболічних порушень за спадкових захворювань та онкологічних новоутворень.

У 2019 р. в США було схвалено клінічне застосування генотерапевтичного препарату Zolgensma для дітей зі спінальною м'язовою атрофією. Це приклад найдорожчих ліків у світі, вартість однієї інфузії становить близько 2,1 млн доларів.

Сучасні досягнення молекулярної біології використовують для розроблення інноваційних технологій синтезу фармацевтичних сполук на основі генетично модифікованих організмів або клітин.

Навчальний посібник «Основи молекулярної біології» спрямований на висвітлення структури й функцій нуклеїнових кислот, їхні ролі в реалізації генетичної інформації, регуляції експресії генів. Матеріал посібника допоможе здобувачам вищої освіти зрозуміти базові принципи, що є основою сучасних методів генної діагностики й терапії.

Розділ 1

СТРУКТУРА І ВЛАСТИВОСТІ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

1.1. Структурні компоненти нуклеїнових кислот

Біологічна роль нуклеїнових кислот полягає у зберіганні, передаванні й реалізації генетичної інформації.

Нуклеїнові кислоти – це біополімери, побудовані з моонуклеотидів.

Нуклеотиди складаються із трьох компонентів:

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

Азотисті основи залежно від хімічної будови поділяють на два класи:

1) пуринові – аденін (А), гуанін (Г);

2) піримідинові – цитозин (Ц), тимін (Т), урацил (У)

(рис. 1.1).

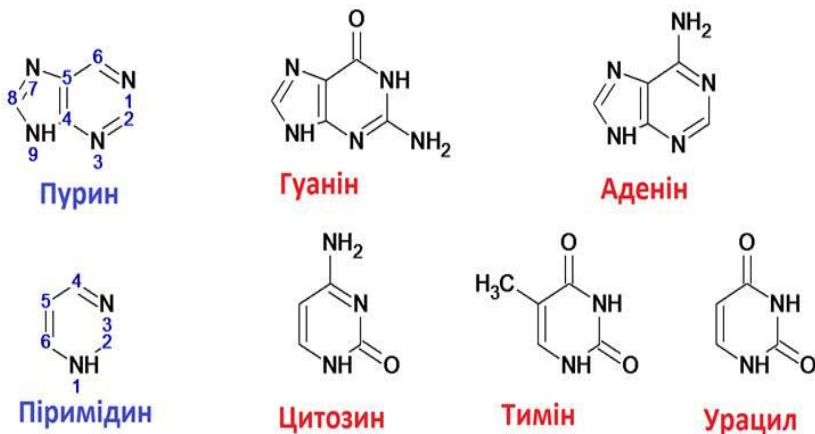


Рисунок 1.1 – Структурні формули азотистих основ

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

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

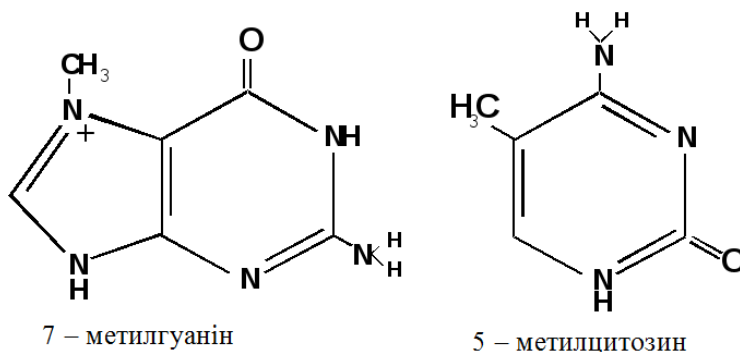


Рисунок 1.2 – Структурні формули мінорних азотистих основ

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

Пентози у складі нуклеїнових кислот подані рибозою й дезоксирибозою (рис. 1.3).

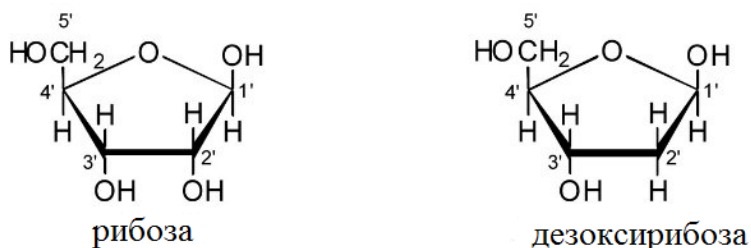


Рисунок 1.3 – Структурні формули пентоз

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

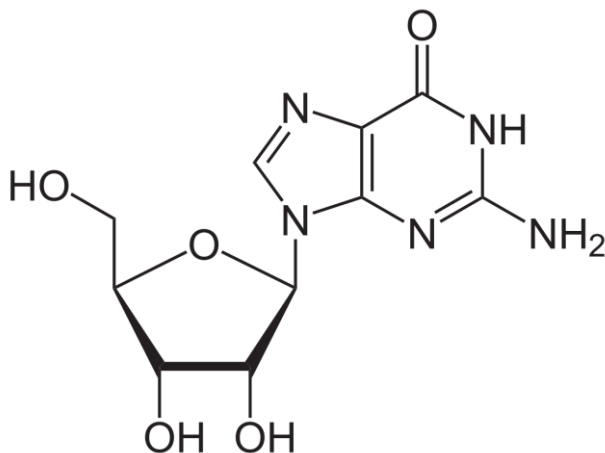


Рисунок 1.4 – Структурна формула нуклеозиду

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

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

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

Нуклеотиди – це фосфатні ефіри нуклеозидів.

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

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

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

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

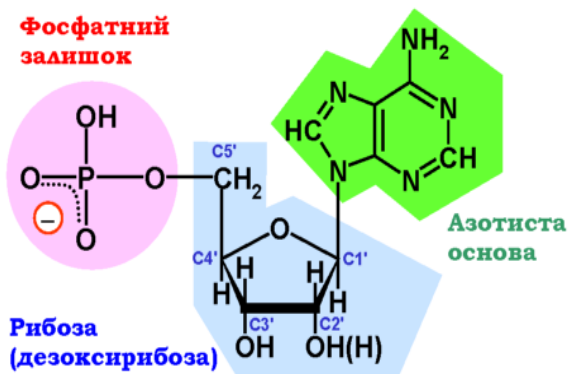


Рисунок 1.5 – Структурна формула АМФ [2]

Біохімічні функції нуклеотидів:

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

1.2. Рівні структурної організації ДНК

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

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

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

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

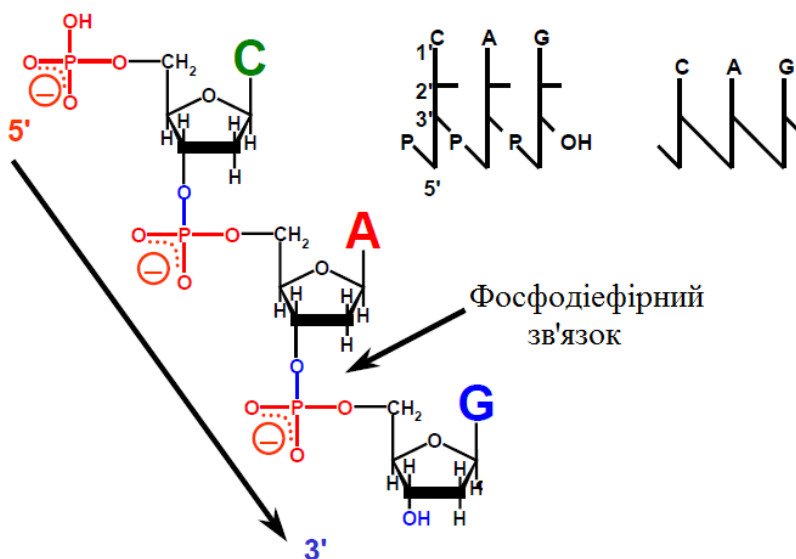


Рисунок 1.6 – Полінуклеотидний ланцюг [7]

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

У 1953 р. Френсіс Крік і Джеймс Уотсон отримали Нобелівську премію за відкриття вторинної структури ДНК [9]. Учені використали дані рентгеноструктурного

аналізу, одержані Морісом Вілкінсом і Розаліндою Франклін (рис. 1.7).

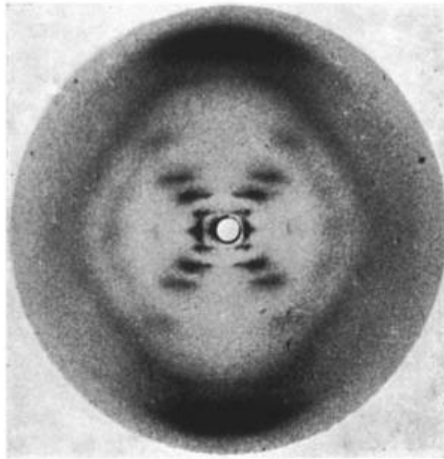


Рисунок 1.7 – Дифракційна картина з ниток ДНК, отримана Р. Франклін [1]

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

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

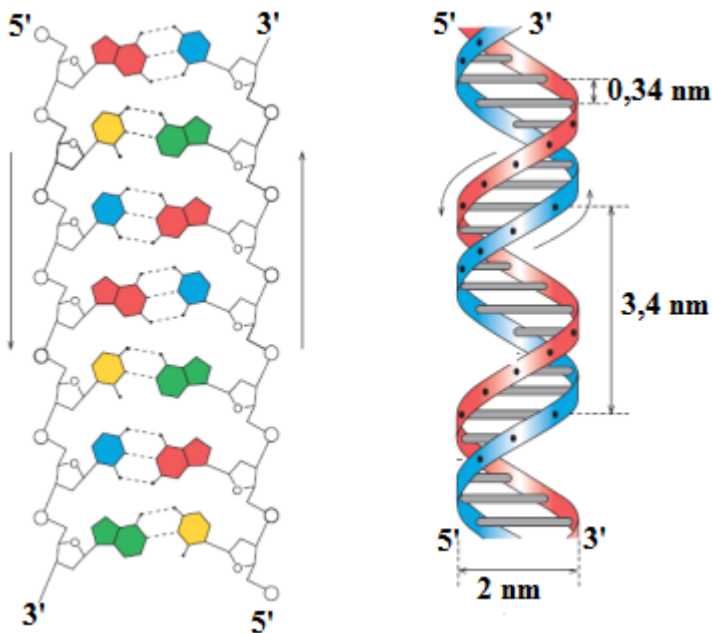


Рисунок 1.8 – Схематична будова хеліксу
за моделлю Уотсона – Кріка [1]

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

ДНК може змінювати свою конфігурацію залежно від умов. Відомо, що в разі зниження вологості в спорах бактерій ДНК є в А-формі. Було встановлено, що А-ДНК приблизно в 10 разів стійкіша до пошкоджувального впливу ультрафіолету, ніж В-ДНК. Отже, структура ДНК динамічна й може мати різноманітні форми.

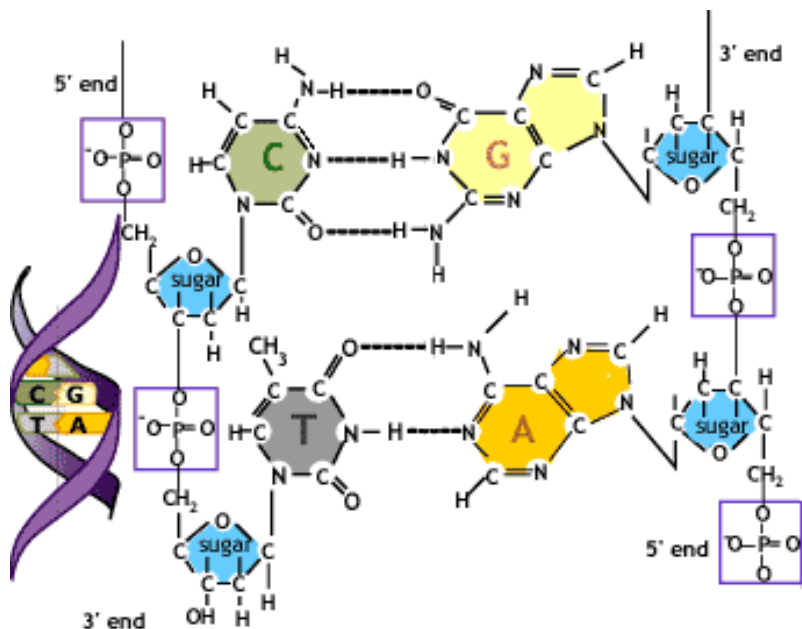


Рисунок 1.9 – Комплементарні пари основ у складі ДНК із водневими зв'язками між основами

У 2012 р. вчені з італійського Інституту технології в Генуї за допомогою електронного мікроскопа вперше отримали фотографію подвійної спіралі ДНК (рис. 1.10). Вміст пуринових і піримідинових азотистих основ у молекулі ДНК підпорядковується чітким закономірностям, установленим Е. Чаргаффом.

Правила Чаргаффа:

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

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

Коефіцієнт специфічності є сталою величиною для кожного виду організмів.

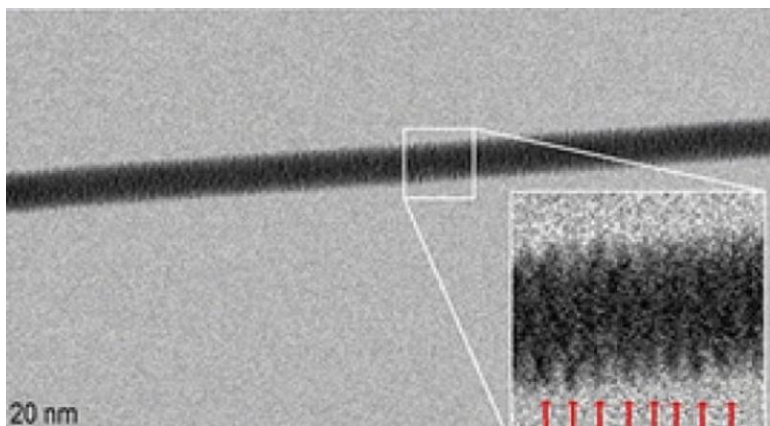


Рисунок 1.10 – Фотографія ДНК (Енцо ді Фабриціо, Інститут технології, Генуя, Італія) [3]

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

Формування суперспіралі здійснюється завдяки зв'язуванню ДНК зі специфічними білками. У складі хроматину розрізняють білки-гістони й негістонові білки. Гістони – основні білки з високим умістом аргініну й лізину. Завдяки наявності «+» заряду гістони утворюють іонні зв'язки з «-»-зарядженими фосфатними залишками ДНК. Залежно від співвідношення вмісту аргініну й лізину розрізняють п'ять фракцій гістонів: Н1, Н2А, Н2В, Н3, Н4.

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

На першому етапі суперспіралізації ДНК формується октамер – частинка з 8 молекул гістонів (Н2А, Н2В, Н3, Н4 – по 2 молекули кожного). Навколо октамера молекула ДНК робить приблизно 2 оберти – утворюється **нуклеосо-**

ма (рис. 1.11). Лінійні ділянки ДНК між нуклеосомами називаються лінкери. У лінкерних ділянках ДНК зв'язана з гістоном H1.

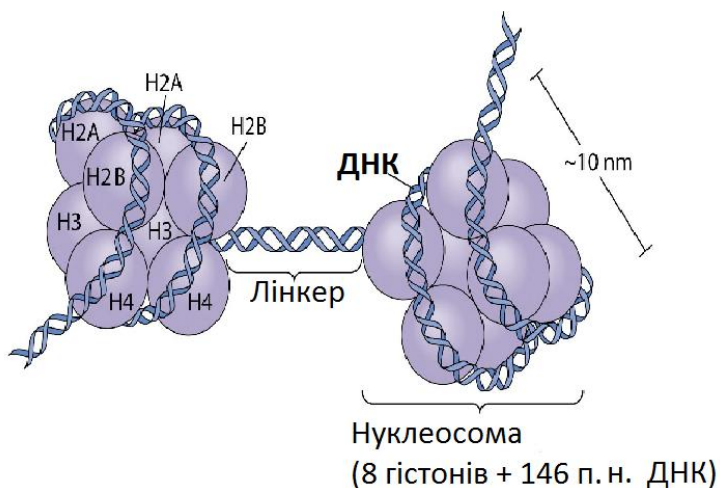


Рисунок 1.11 – Нуклеосоми

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

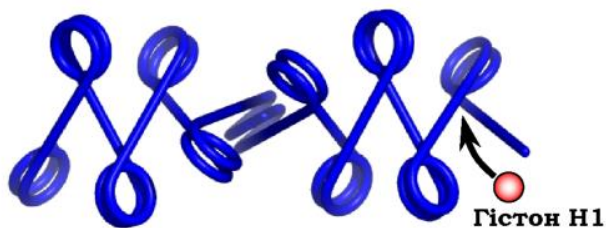


Рисунок 1.12. – Зигзагоподібна конфігурація полінуклеосомної нитки [2]

На третьому етапі суперспіралізації ДНК із ниток формуються петлі довжиною декілька тисяч нуклеосом. Петлі прикріплюються до центральної структури – негістонового білка (рис. 1.13).



Рисунок 1.13 – Схема петельної організації хроматину [6]

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

У прокаріотів ДНК є у вільному від білків стані й має кільцеву структуру. Кільцеву структуру має також мітохондріальна ДНК. Вона містить 37 генів і кодує 2 рРНК, 22 тРНК і 13 білків.

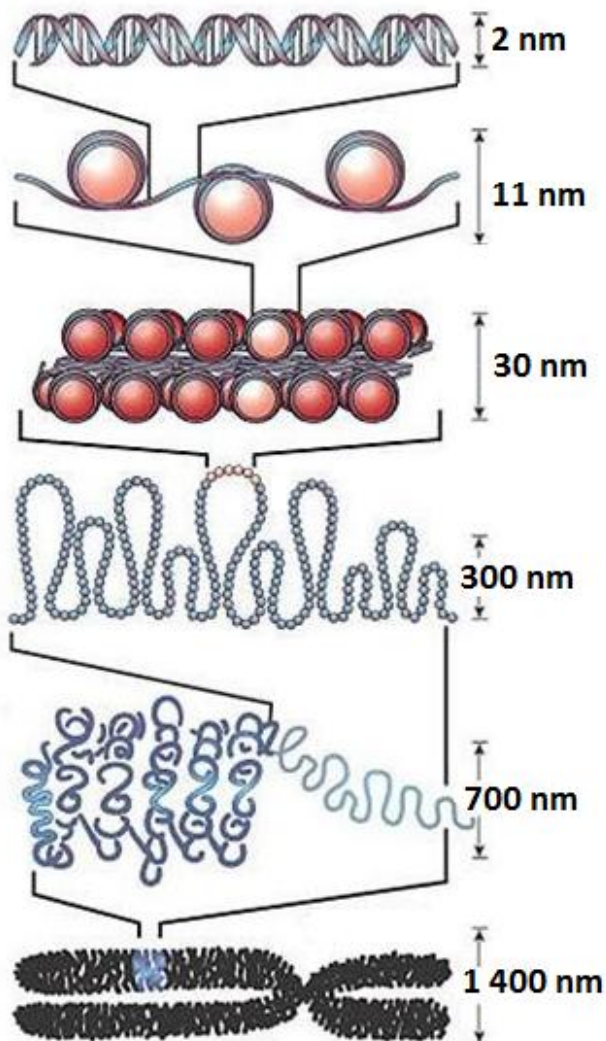


Рисунок 1.14 – Схема конденсації ДНК хроматину до хромосоми [1]

Мітохондріальна ДНК кодує білки, що забезпечують процеси тканинного дихання й окисного фосфорилювання.

1.3. Типи РНК, їхня структура й функції

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

Вміст РНК у клітині в 5–10 разів вищий, ніж ДНК. На рисунку 1.15 зображені функції основних типів РНК: рРНК, мРНК, тРНК.

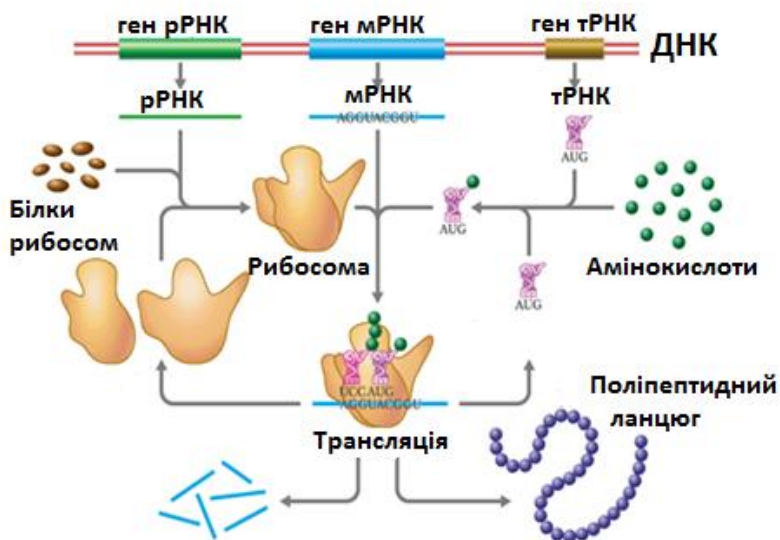


Рисунок 1.15 – Функції рРНК, мРНК, тРНК [1]

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

Транспортна РНК (тРНК) здійснює транспорт амінокислот до рибосом. Вміст тРНК становить 10–15 % від загальної РНК у клітині. У клітині *E.coli* міститься 45 різ-

них тРНК, у клітинах еукаріотів – 65 тРНК. У бактерій тРНК кодують 48 генів, у дріжджів – 400, у дрозофіли – 750, у людини – 1300.

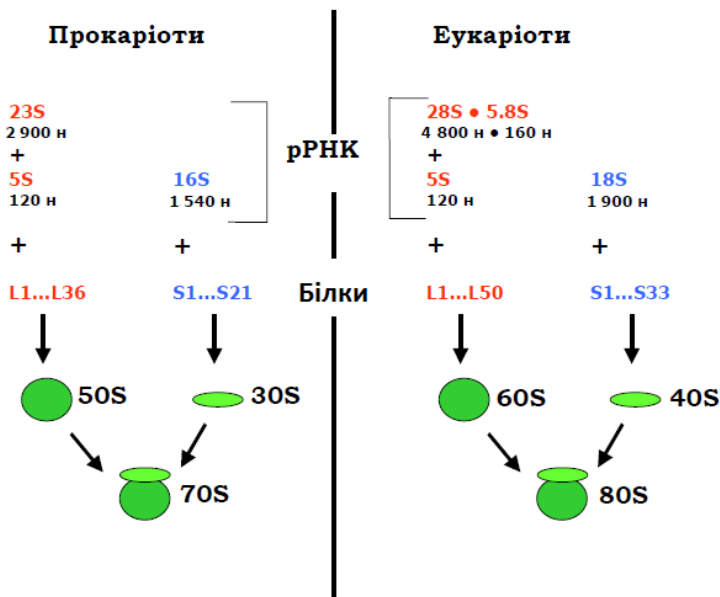


Рисунок 1.16 – Склад рибосом прокаріотів та еукаріотів [6]

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

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

МікроРНК, що об'єднує такі типи:

– мцРНК – мала цитоплазматична;

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

За даними проєкту Енциклопедії елементів ДНК (ENCODE), 60 % генів людини регулюються за допомогою мікроРНК [16]. Один тип мікроРНК може регулювати трансляцію мРНК більше ніж 100 генів.

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

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

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

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

Вторинна структура РНК – просторова конфігурація полінуклеотидного ланцюга, що формується завдяки утворенню водневих хімічних зв'язків.

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

У 1974 р. за допомогою рентгеноструктурного аналізу було досліджено просторову структуру аланінової тРНК дріжджів. Вторинна структура тРНК має форму листка коношини (рис. 1.17).

У молекулі тРНК виділяють чотири петлі:

– дигідроуридинову петлю (D arm) – ділянку зв'язування з ферментом аміноацил-тРНК-синтетазою;

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

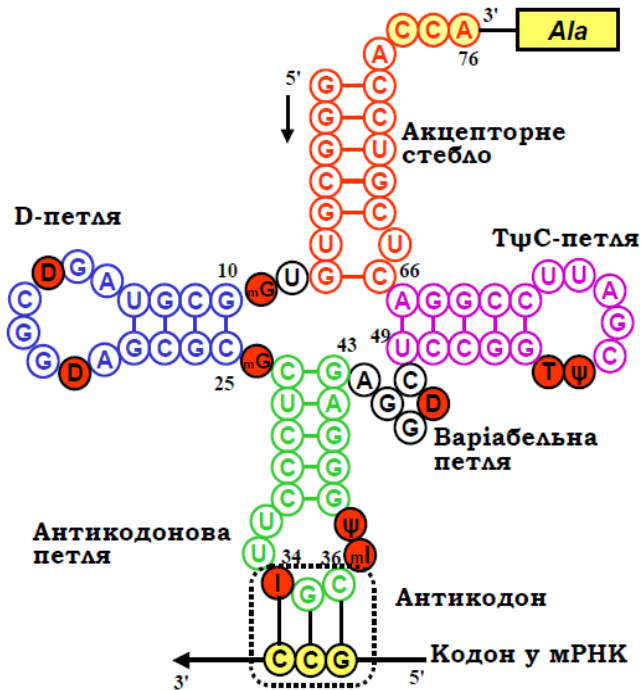


Рисунок 1.17 – Вторинна структура тРНК [7]

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

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

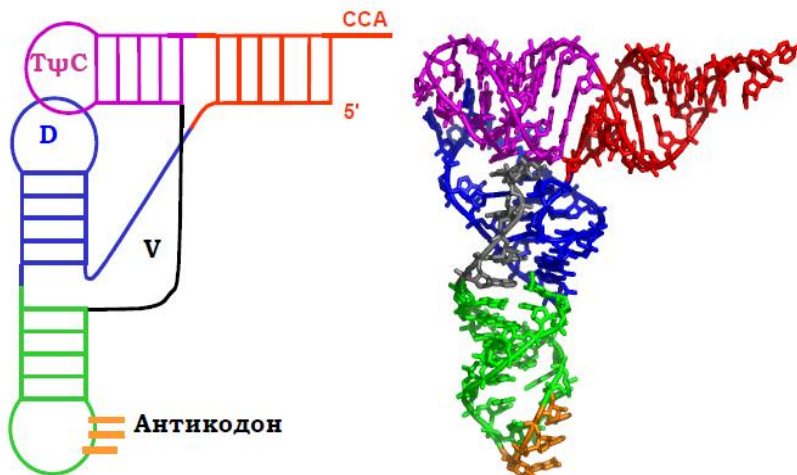


Рисунок 1.18 – Третинна структура тРНК [2]

тРНК не зв'язана із клітинними структурами і є в клітинах у вільному стані.

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

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

1.4. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот

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

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

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

Водні розчини нуклеїнових кислот мають високу в'язкість.

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

Унаслідок денатурації ДНК подвійна спіраль розпадається на одинарні полінуклеотидні ланцюги. Первинна структура нуклеїнових кислот за денатурації зберігається.

Процес термічної денатурації ДНК називають **плавленням**.

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

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

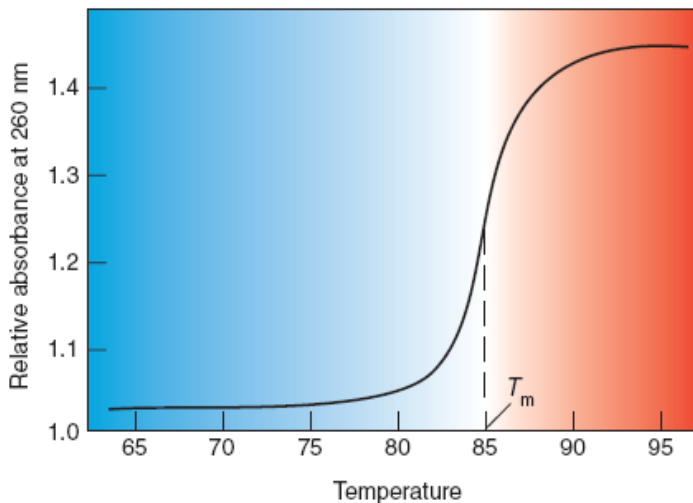


Рисунок 1.19 – Крива плавлення ДНК із бактерії роду *Streptococcus* ($t = 0$ °C, відносне оптичне поглинання за 260 нм [1])

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

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

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

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

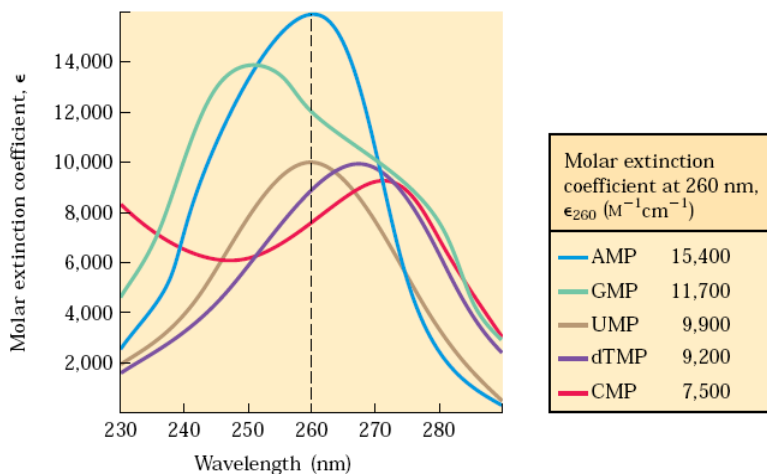


Рисунок 1.20 – Спектр поглинання й коефіцієнти молярної екстинції нуклеотидів [1]

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

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

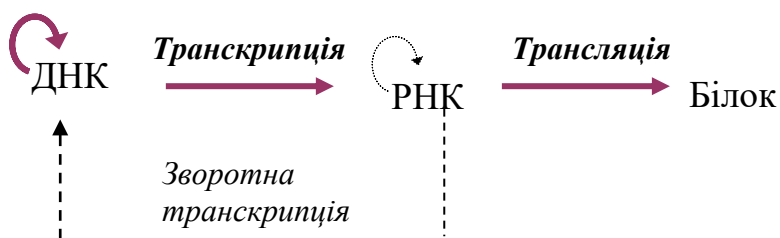
Процес відновлення пошкодженої просторової структури нуклеїнових кислот називається **ренатурацією**.

Розділ 2

СИНТЕЗ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ І БІЛКІВ

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

Реалізація генетичної інформації в живих організмах здійснюється за такою схемою.



Процес подвоєння ДНК називають **реплікацією** (ДНК $\rightarrow$ 2 ДНК). Реплікація відбувається перед поділом клітини й забезпечує рівномірний розподіл генетичного матеріалу між дочірніми клітинами.

Процес синтезу РНК на матриці ДНК називають **транскрипцією** (ДНК $\rightarrow$ РНК).

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

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

Для деяких вірусів характерний процес реплікації РНК – подвоєння вірусної РНК (РНК $\rightarrow$ 2 РНК).

2.1. Реплікація

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

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

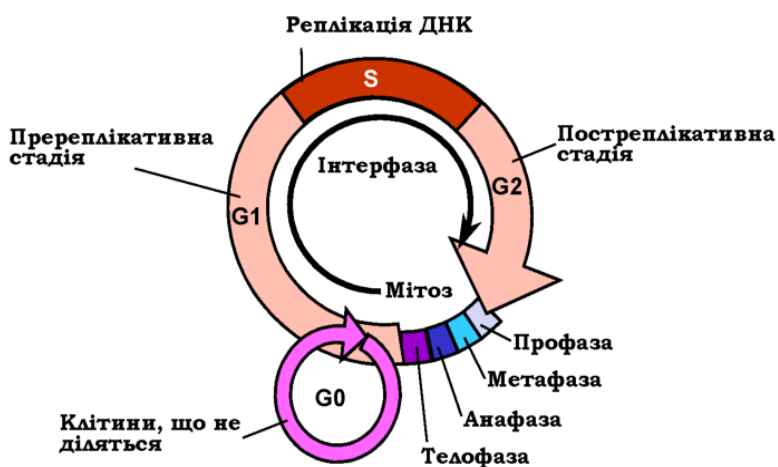


Рисунок 2.1 – Схема клітинного циклу [2]

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

Суть експерименту М. Мезельсона і Ф. Сталя: культуру клітин *E.coli* вирощували на середовищі з ізотопом N^{15} , відповідно, молекули ДНК містили N^{15} . Під час перенесення культури *E.coli* на середовище з N^{14} було встановлено, що в першому поколінні клітин у молекулах ДНК один із

ланцюгів містить N^{15} , а інший – N^{14} . Отже, дочірні молекули ДНК містили один ланцюг материнський, а інший – новий синтезований. Учені зробили висновок, що від одного покоління до іншого передається один із ланцюгів материнської молекули ДНК.

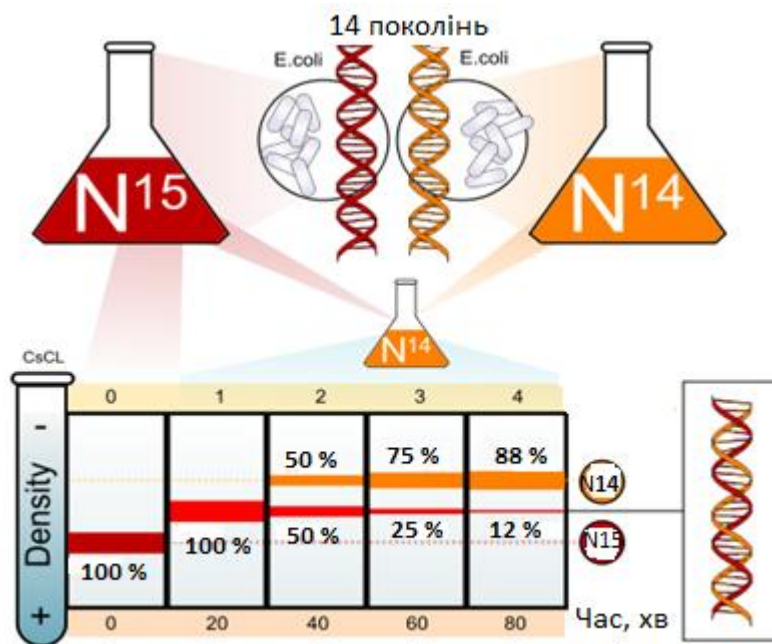


Рисунок 2.2 – Схема експерименту М. Мезельсона й Ф. Сталя [9]

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

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

Реплікація здійснюється за три етапи:

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

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

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

У прокаріотів молекула ДНК має кільцеву форму й містить одну точку початку реплікації. Отже, молекула ДНК прокаріотів являє собою один реплікон.

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

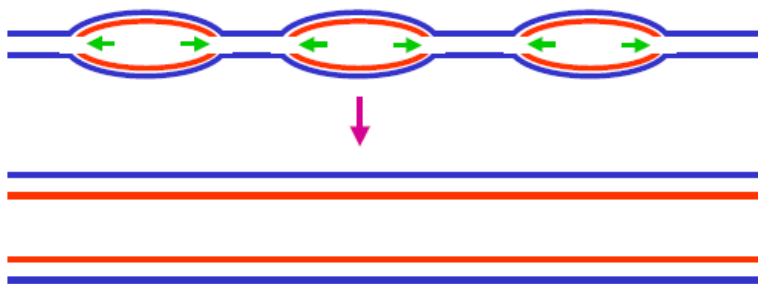


Рисунок 2.3 – Реплікація еукаріотичної хромосоми [6]

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

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

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

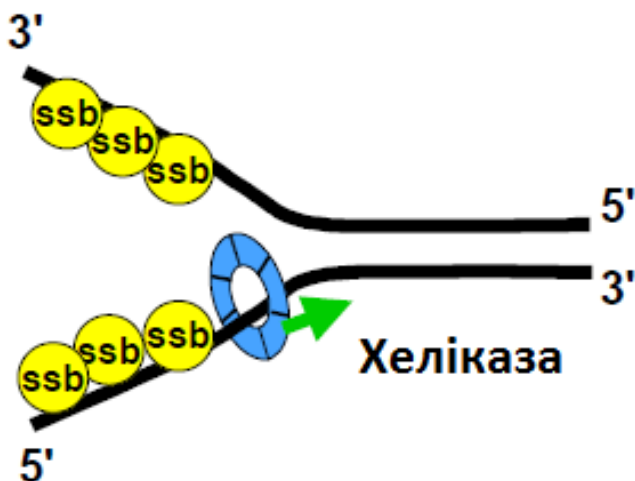


Рисунок 2.4 – Формування реплікативної вилки [6]

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

Хеліказа руйнує водневі зв'язки між комплементарними парами азотистих основ, розкручує подвійну спіраль ДНК на одинарні ланцюги. Хеліказа переміщується вздовж ДНК завдяки енергії гідролізу АТФ [10].

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

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

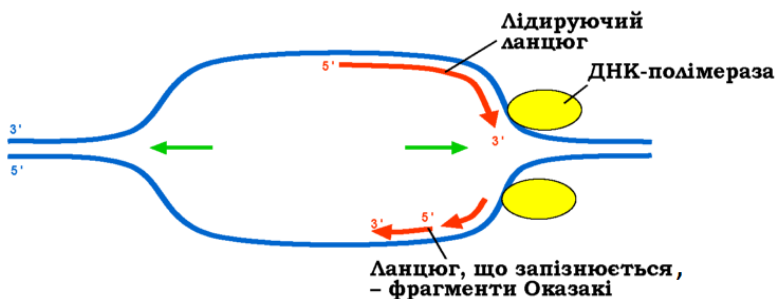


Рисунок 2.5 – Напрямок синтезу дочірніх ланцюгів ДНК [2]

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

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

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

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

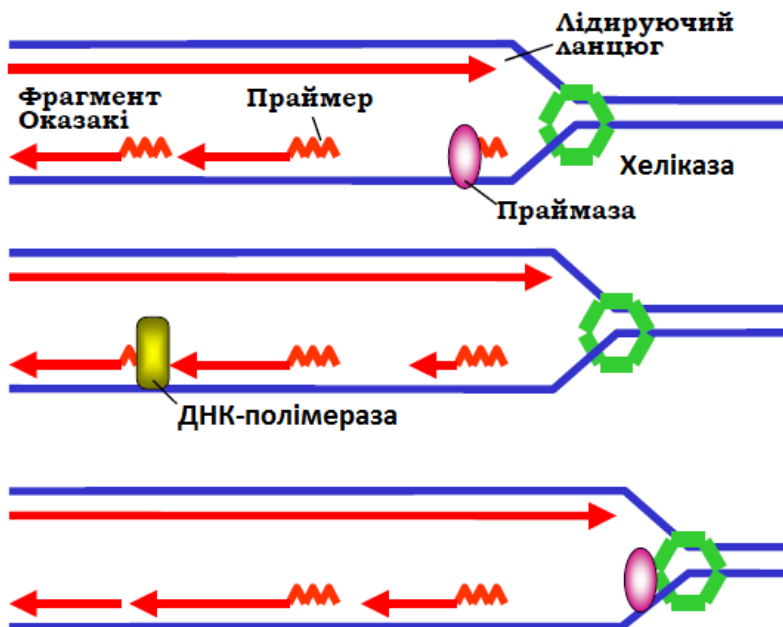
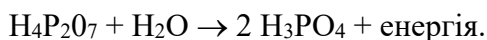


Рисунок 2.6 – Робота праймази й ДНК-полімерази під час руху реплікативної вилки [6]

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

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



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

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

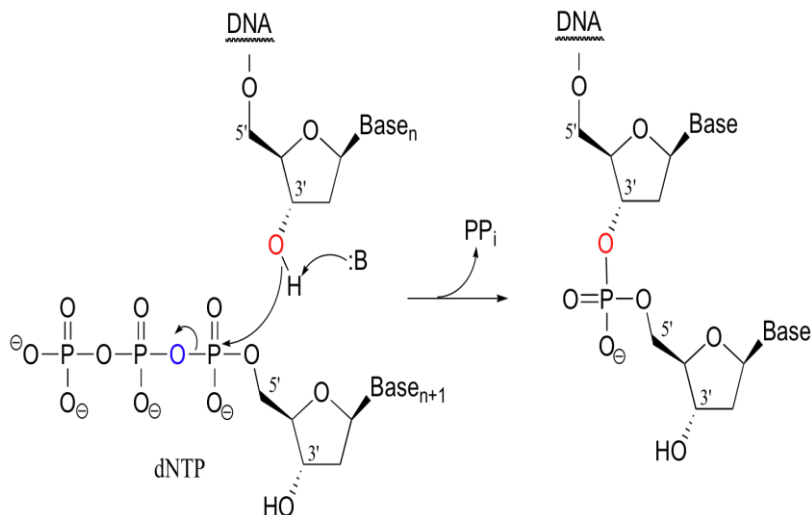


Рисунок 2.7 – Схема ДНК-полімеразної реакції

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

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

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

Кожен із дочірніх ланцюгів ДНК синтезує окрема молекула ДНК-полімерази, отже, у реплікативній вилці *E. coli* міститься дві молекули ДНК-полімерази III (рис. 2.8).

Під час синтезу ланцюга, що відстає, ДНК-полімераза I видаляє праймери із фрагментів Оказакі й добудовує утворені проміжки дезоксирибонуклеотидами.

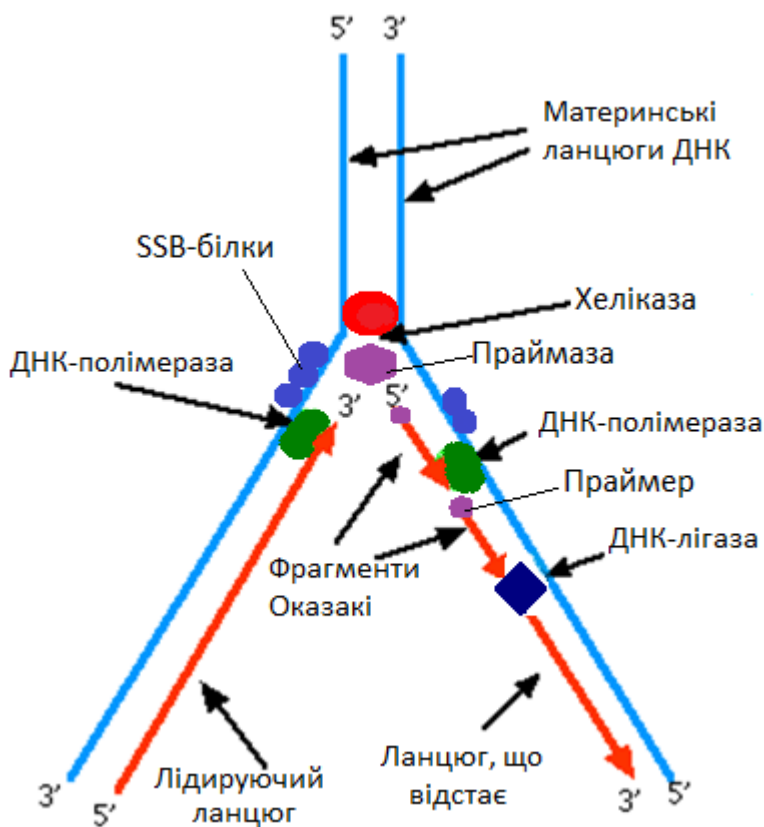


Рисунок 2.8 – Структура реплікативної вилки *E.coli*

ДНК-лігаза каталізує з'єднання фрагментів ДНК завдяки утворенню 3', 5'-фосфодієфірних зв'язків (рис. 2.9). Більшість ДНК-лігаз прокаріотів та еукаріотів використовують АТФ, а ДНК-лігаза *E.coli* – НАД⁺ [10].

Після завершення синтезу дочірніх ланцюгів ДНК відбувається їхнє метилювання. Ферменти метилази приєднують метильну групу до аденінів у послідовностях ГАТЦ [10].

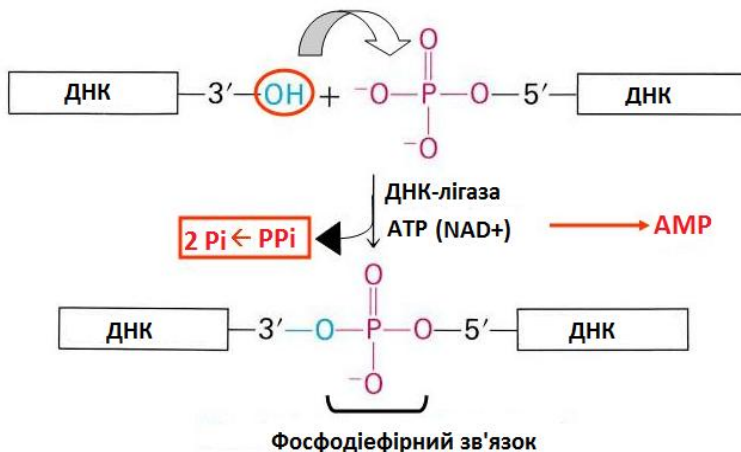


Рисунок 2.9 – Схема реакції за участю ДНК-лігази

У процесі реплікації ДНК трапляються помилки – приєднання некомплементарного нуклеотида.

Корекція неправильного спарювання азотистих основ за участі ДНК-полімерази III

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

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

У разі помилки ДНК-полімераза III вирізає неправильний нуклеотид і замінює його на правильний.

Механізм, за допомогою якого ДНК-полімераза III вибирає правильний нуклеотид, ґрунтується на моделі Уотсона – Кріка: пари комплементарних азотистих основ мають певну просторову конфігурацію, що розпізнається ферментом (рис. 2.10).

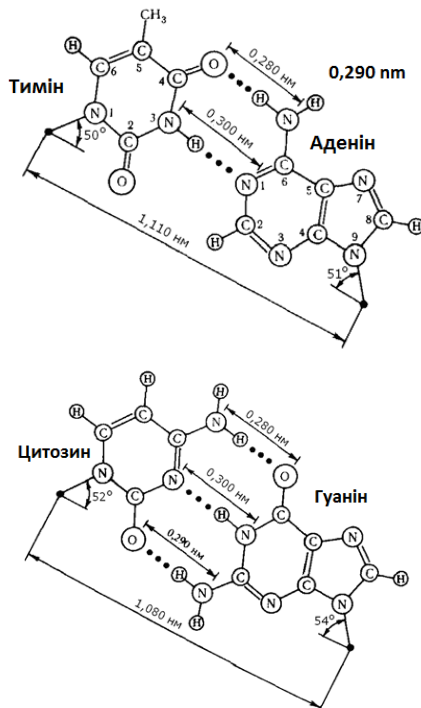


Рисунок 2.10 – Геометричні характеристики пари азотистих основ Уотсона – Кріка

Наявність некомплементарного нуклеотиду спричиняє деформацію подвійної спіралі ДНК.

Особливості реплікації в еукаріотів

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

Еукаріоти мають **п'ять типів ДНК-полімераз**: α -, β -, γ -, δ -, ε -полімерази. ДНК-полімерази α і δ каталізують реплікацію ядерної ДНК. ДНК-полімераза γ здійснює реплікацію мітохондріальної ДНК. ДНК-полімерази β і ε виконують функцію репарації.

Хромосоми еукаріотів лінійні. За кожної реплікації відбувається вкорочення хромосом (рис. 2.11).

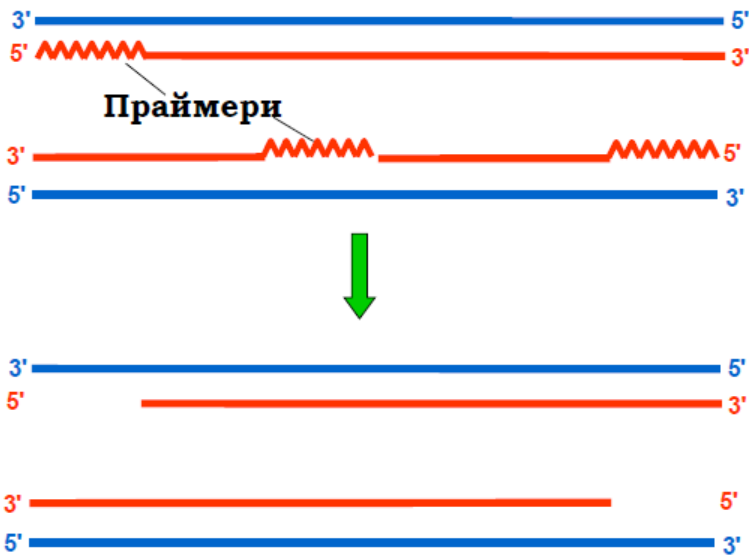


Рисунок 2.11 – Дві дочірні лінійні молекули ДНК після реплікації [6]

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

Кінці хромосом, що містять теломерну ДНК, називаються теломерами.

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

Фермент **теломераза** добудовує послідовності теломерної ДНК і в такий спосіб подовжує її (рис. 2.12). Висока теломеразна активність характерна для статевих клітин, їхні теломери містять найбільшу кількість ДНК-повторів. У нервових і м'язових клітинах найменша довжина теломер. Довжина теломерної ДНК людини становить від 2 до 20 тис. п. н.

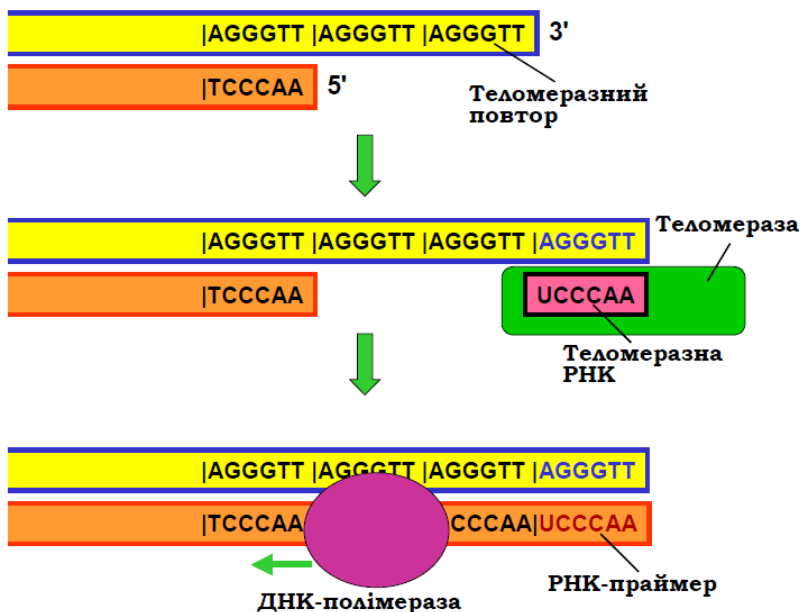


Рисунок 2.12 – Подовження теломерної ДНК [6]

Теломери в більшості клітин укорочуються з віком, це може бути важливим фактором, що визначає тривалість життя. У 60-х рр. XX ст. Леонард Хейфлік установив, що

клітини пухлин в оптимальних умовах можуть ділитися безмежну кількість разів, а соматичні клітини людини – обмежену кількість разів. Так, соматичні клітини новонароджених ділились у культурі 80–90 разів, а клітини людей віком 70 років – 20–30 разів [4]. Кількість можливих поділів клітин у культурі назвали **лімітом Хейфліка**. Для більшості клітин людини ліміт Хейфліка становить 52 поділи. Хейфлік установив, що під час старіння в клітинах порушується процес реплікації, наслідком цього є загибель клітин.

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

2.2. Транскрипція

Транскрипція – це процес синтезу РНК на матриці ДНК.

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

Існують гени, що кодують мРНК, тРНК, рРНК.

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

Промотор – ділянка ДНК, з якої починається транскрипція.

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

У ділянці термінації транскрипція завершується.

Транскриптон – ділянка між промотором і термінатором.

Транскрипт – синтезована молекула РНК.

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

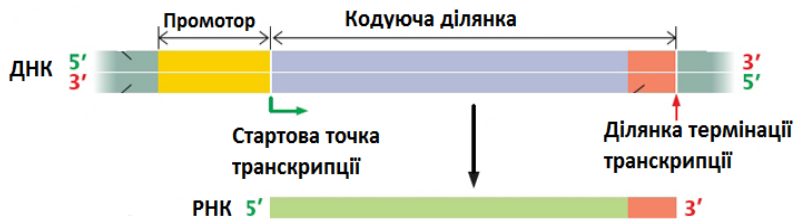


Рисунок 2.13 – Схематична структура гена

Розрізняють **три етапи транскрипції**:

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

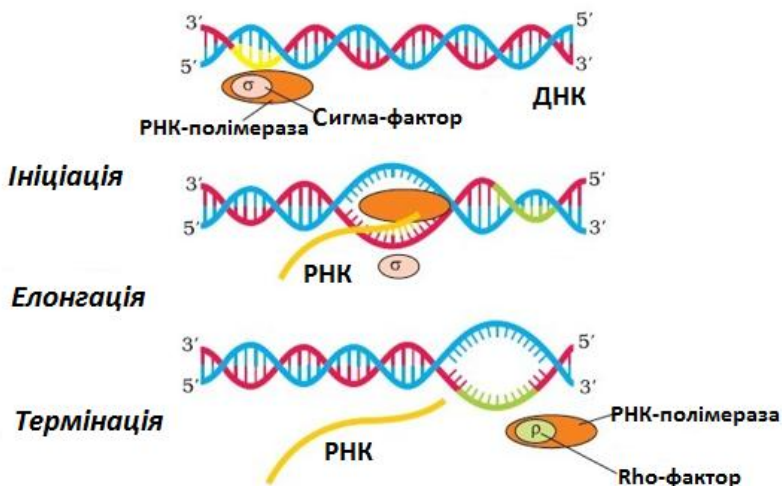


Рисунок 2.14 – Етапи транскрипції

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

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

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

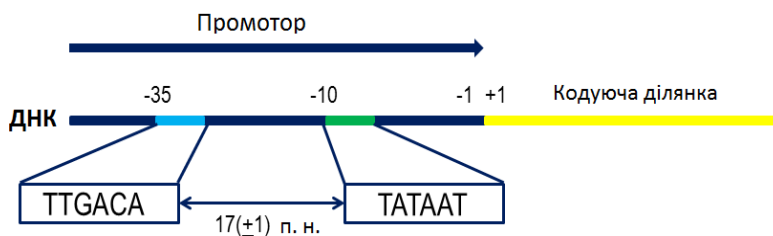


Рисунок 2.15 – Консенсусні послідовності елементів промотору *E.coli*

До консенсусних послідовностей промотору приєднуються білкові фактори транскрипції й РНК-полімераза. У прокаріотів **РНК-полімераза** складається з декількох субодиниць: **2 α , β , β'** (рис. 2.16).

РНК-полімераза не може «самостійно» розпізнавати сайт ініціації транскрипції, оскільки має спорідненість із будь-якою ділянкою ДНК. Під час з'єднання з цитоплазматичним білком – **сигма-фактором (σ)** – РНК-полімераза втрачає спорідненість до випадкових ділянок ДНК, але міцно зв'язується з боксом –35 і боксом Прибнова.

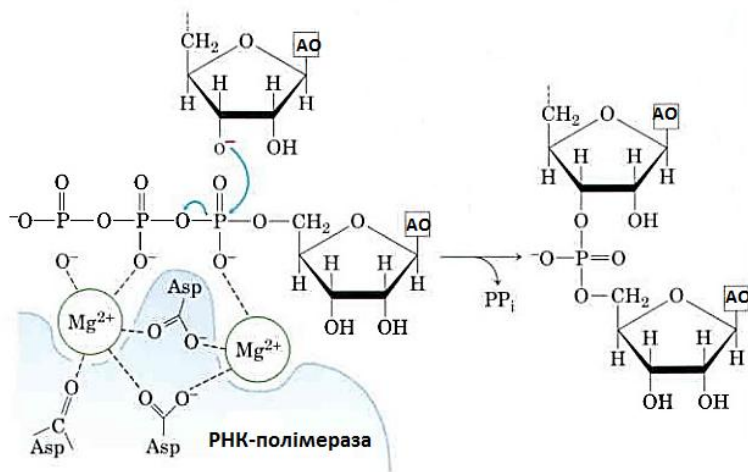


Рисунок 2.17 – Механізм РНК-полімеразної реакції

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

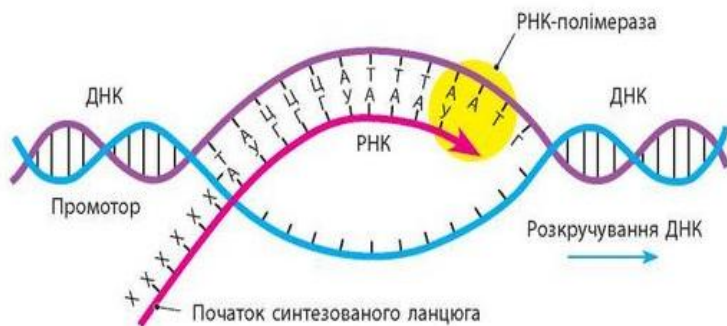


Рисунок 2.18 – Загальна схема механізму транскрипції [1]

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

- завдяки утворенню «шпильки» (рис. 2.19);
- за участі Rho-білка (рис. 2.20).

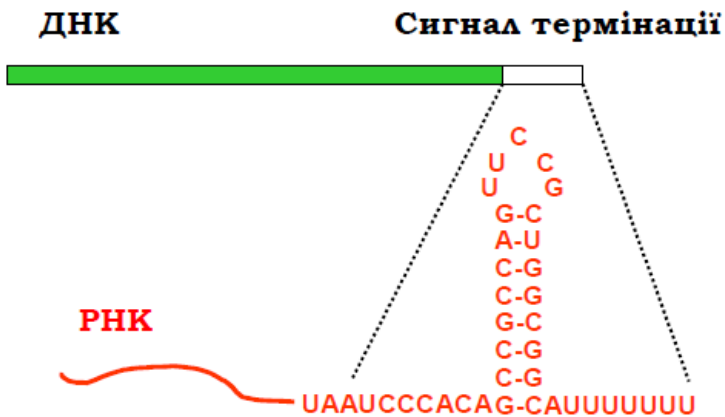


Рисунок 2.19 – Формування структури «шпильки» у транскрипті РНК [6]

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

Термінація транскрипції також може відбуватися за участі спеціальних білків.

Rho-білок (ρ) має хеліказну активність: роз'єднує димер – транскрипт РНК-матрицю ДНК – унаслідок руйнування водневих хімічних зв'язків.

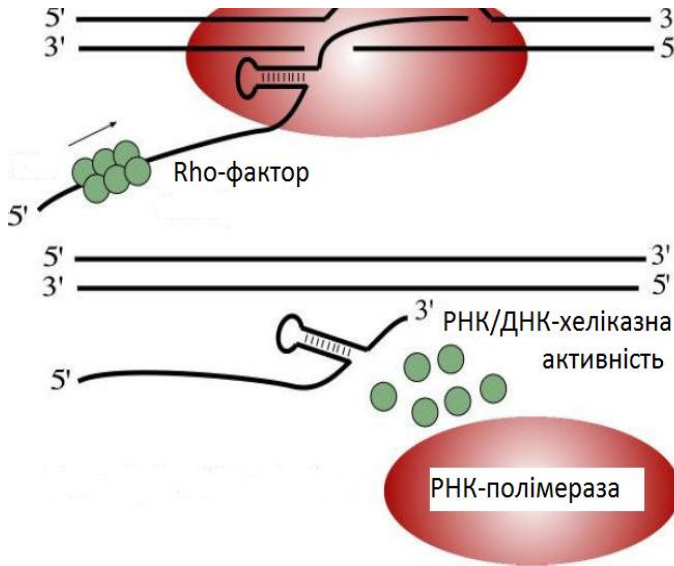


Рисунок 2.20 – Термінація транскрипції за участі Rho-фактора

Rho-білок приєднується до транскрибованої мРНК і рухається вдовж неї позаду РНК-полімерази. На ділянці термінації РНК-полімераза припиняється, Rho-фактор відокремлює РНК-транскрипт від ДНК, завершуючи транскрипцію.

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

Цистрон – ген, що контролює одну функцію.

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

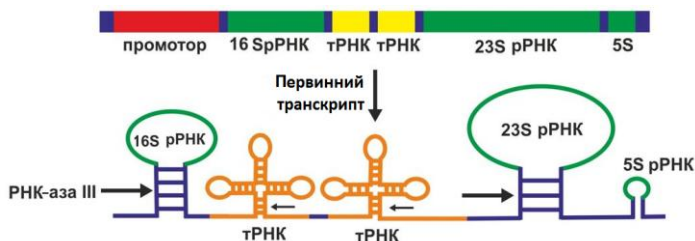


Рисунок 2.21 – Синтез рРНК і тРНК у прокаріотів

Особливості транскрипції генів в еукаріотів

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

Транскрипцію здійснюють три типи ДНК-залежної РНК-полімерази:

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

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

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

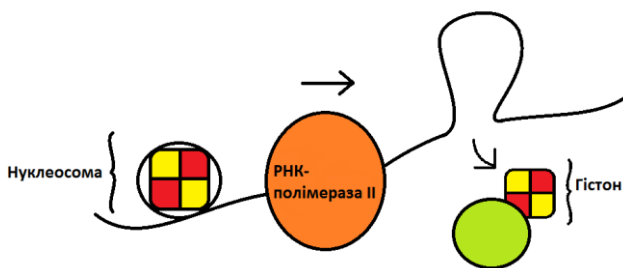
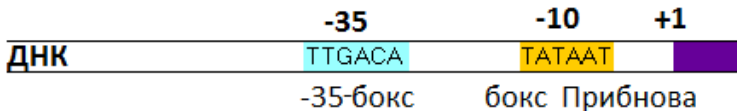


Рисунок 2.22 – Розпакування ДНК еукаріотів на ділянках транскрипції

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

Промотор прокаріотів



Промотор еукаріотів

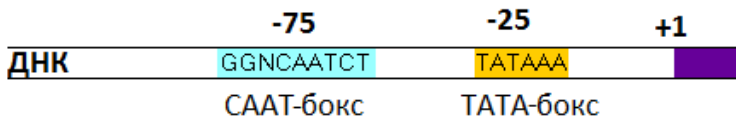


Рисунок 2.23 – Консенсусні послідовності в промоторах прокаріотів та еукаріотів

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

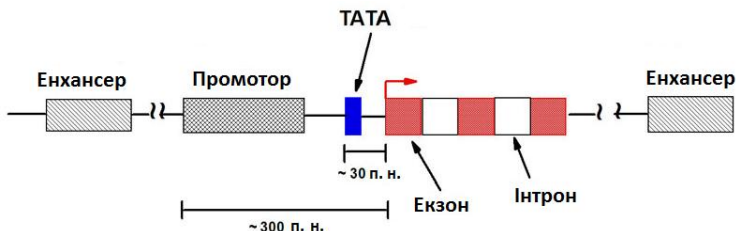


Рисунок 2.24 – Особливості структури генів еукаріотів

У ДНК ссавців лише 2 % нуклеотидних послідовностей є екзонами, а 98 % – інтронами. У гені людини може бути від 2 до 50 інтронів, довжина яких становить

50–20 000 пар основ. Довжина екзонів не перевищує 1000 пар основ.

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

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

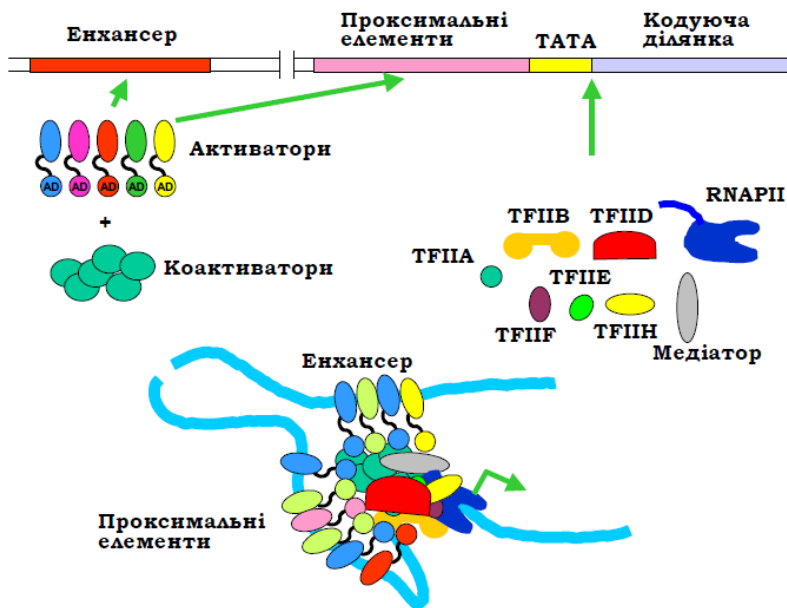


Рисунок 2.25 – Схема збирання комплексу активації транскрипції РНК-полімерази II [2]

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

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

Процесинг передбачає три процеси:

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

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

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

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

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

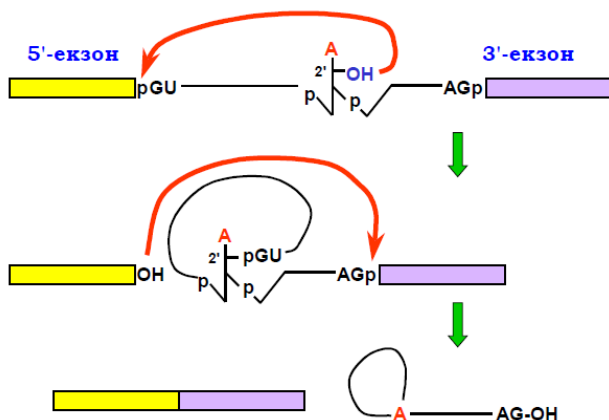


Рисунок 2.26 – Сплайсинг мРНК [6]

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

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

Механізм альтернативного сплайсингу може використовуватися в різних тканинах або в одній тканині, але в різний час. Явище альтернативного сплайсингу наявне у м'язовій тканині, де утворюються подібні за структурою, але відмінні за функціями білки. У нервовій тканині альтернативний сплайсинг використовується для синтезу різноманітних білків оболонки нервових волокон.

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

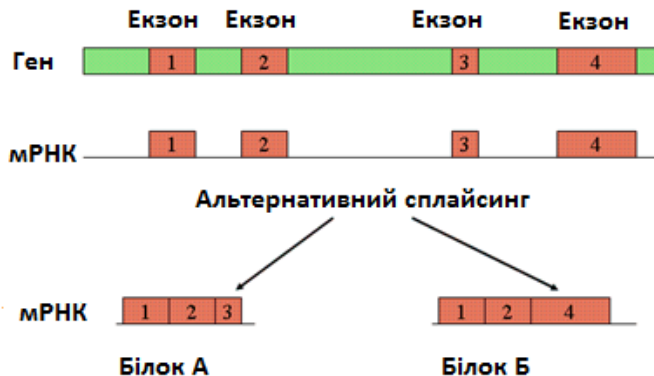


Рисунок 2.27 – Схема альтернативного сплайсингу [1]

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

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

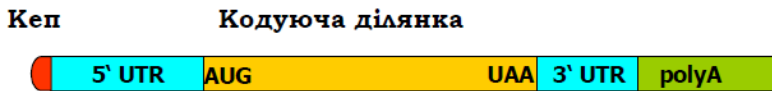


Рисунок 2.28 – Схема будови мРНК еукаріотів [2]

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

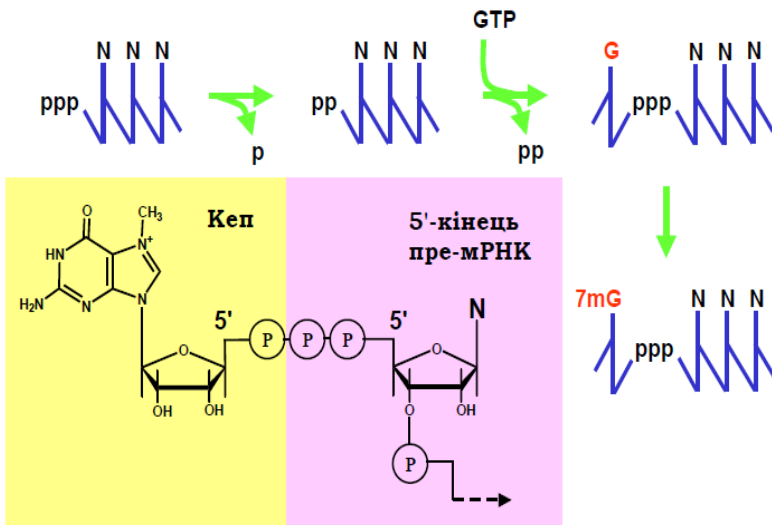


Рисунок 2.29 – Стадії утворення й хімічна структура кепа [7]

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

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

Зворотна транскрипція в ретровірусів

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

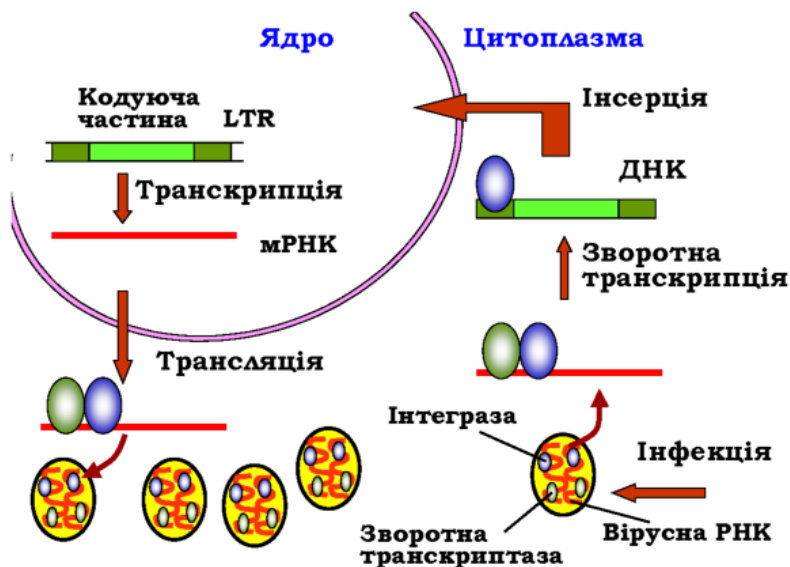


Рисунок 2.30 – Життєвий цикл ретровірусу [2]

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

Реплікація РНК у вірусів

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

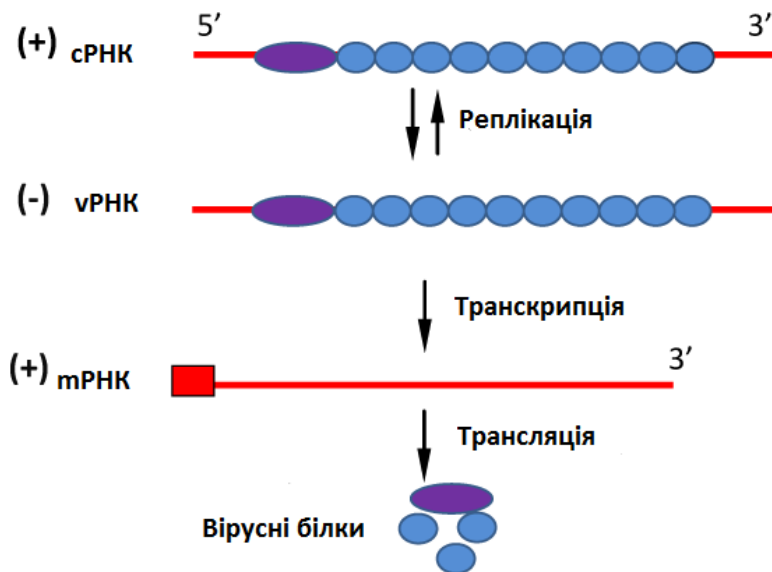


Рисунок 2.31 – Реплікація вірусної РНК

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

2.3. Трансляція

Трансляція – біосинтез білка на рибосомах.

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

У 1954 р. Г. А. Гамов уперше сформулював уявлення про генетичний код як відповідність двох текстів, запи-

саних за допомогою двох різних алфавітів (нуклеотидного та амінокислотного). З арифметичних міркувань Г. А. Гамов дійшов висновку, що одну амінокислоту кодують три нуклеотиди: $4^3 = 64$ (4 – кількість різновидів нуклеотидів).

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

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

Властивості генетичного коду:

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

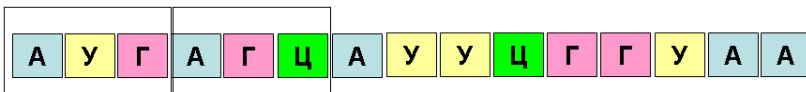
– **триплетність** – три нуклеотиди кодують амінокислоту;

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

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

– **односпрямованість** – кодони транслюються в напрямку $3' \rightarrow 5'$;

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



$5' \rightarrow 3'$

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

Таблиця 2.1 – Таблиця генетичного коду [6]

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

Триплети, що кодують однакову амінокислоту, подібні між собою. Наприклад, ізолейцин кодують AUU, AUC, AUA, що відрізняються лише за третьою основою. Завдяки цьому мутації, що спричиняють заміну азотистої основи, не впливають на структуру синтезованого білка (AUU → AUC → ізолейцин).

Компоненти системи трансляції:

- рибосоми;
- 20 амінокислот;
- тРНК;
- мРНК;
- ферменти (аміноацил-тРНК-синтетаза, пептидил-трансфераза, транслоказа);
- білкові фактори ініціації, елонгації, термінації;

– АТФ, ГТФ;

– Mg^{2+} .

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

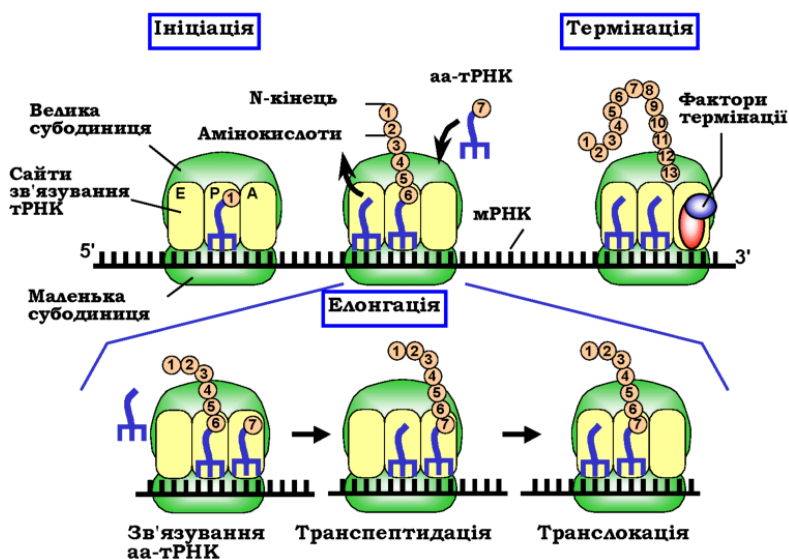


Рисунок 2.32 – Схема трансляції [7]

Трансляція здійснюється за три етапи:

- ініціація;
- елонгація;
- термінація.

На етапі ініціації формується **ініціаторний комплекс**, до складу якого входять мРНК, мала субодиниця рибосоми, ініціаторна аміноацил-тРНК (тРНК^{Met}), білкові фактори ініціації. Приєднання великої субодиниці рибосо-

ми завершує етап ініціації трансляції. Першою амінокислотою, що бере участь у синтезі білка, є форміл-метіонін (f-Met) у прокаріотів або метіонін – в еукаріотів (рис. 2.33). В E.coli фермент трансформілаза добудовує формільну групу до метіоніну. Донором формільної групи є N¹⁰-формілтетрагідрофолат. До завершення синтезу білка формільна група видаляється. тРНК, що приєднує f-Met, називають **ініціаторною**.

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

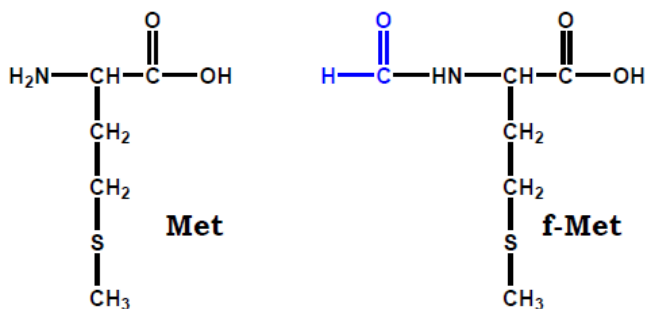


Рисунок 2.33 – Метіонін і N-формілметіонін [6]

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

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

Реакції аміноацилювання здійснюються за два етапи:

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

Сумарне рівняння реакції аміноацилювання

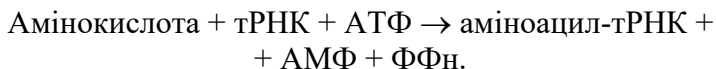
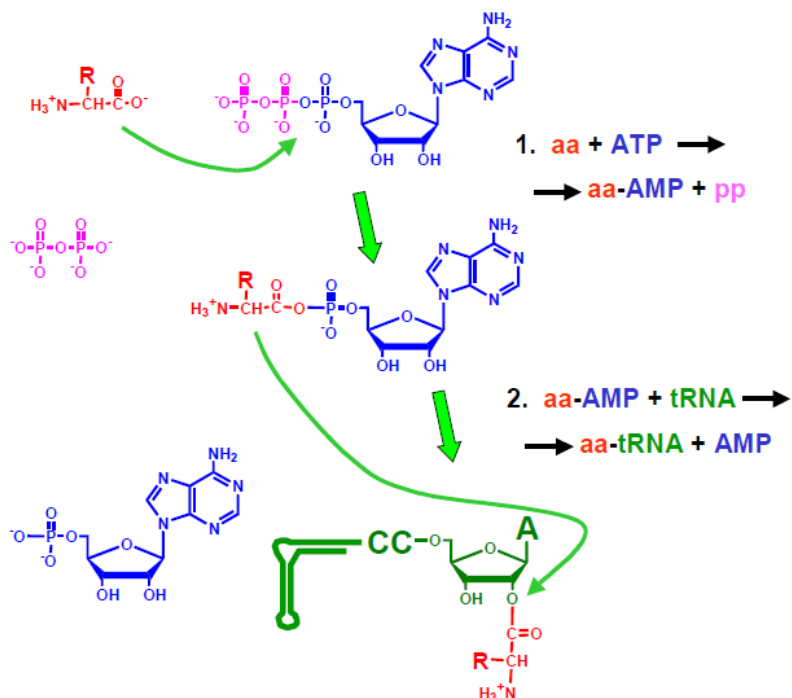


Рисунок 2.34 – Схема реакції аміноацилювання [6]

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

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

Молекула тРНК розпізнає правильне місце приєднання до мРНК завдяки антикодону – триплету, комплементарного кодону мРНК. Деякі тРНК розпізнають декілька

кодонів, що відповідають за одну й ту ж саму амінокислоту. Це досягається завдяки механізму неоднозначної відповідності або «качання». Наприклад, кодон ГЦЦ може приєднуватися до антикодону ЦГУ. Механізм «качання» допускає неправильне спарювання антикодону, що не змінює амінокислотної послідовності синтезованого білка.

Отже, молекули тРНК виконують дві функції: акцепторну – зв’язують амінокислоту, та адапторну – розпізнають кодони мРНК.

Стартовим кодоном трансляції є АУГ, що кодує метіонін. Існують дві різні тРНК, специфічні для метіоніну: одна використовується на етапі ініціації (тРНК^{Met}), інша – на етапі елонгації трансляції.

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

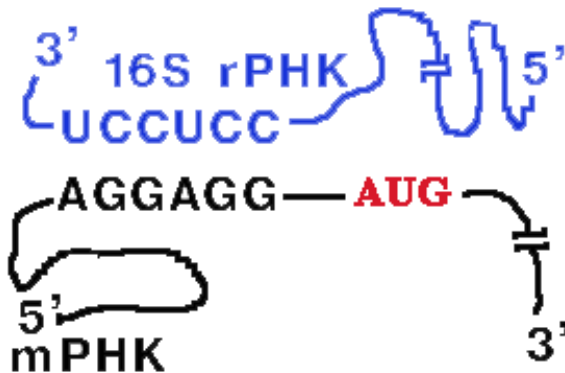


Рисунок 2.35 – Взаємодія комплементарних послідовностей Шайна – Дальгарно мРНК і 16S рРНК

Мала субодиниця рибосоми споріднена з білковими факторами ініціації IF-1, IF-2, IF-3 (IF – initiation factors)

(рис. 2.36). IF-1 та IF-2 забезпечують формування ініціаторного комплексу. Білок IF-2 необхідний для зв'язування формілметіоніну з ініціаторною тРНК (fMet + тРНК^{fMet}).

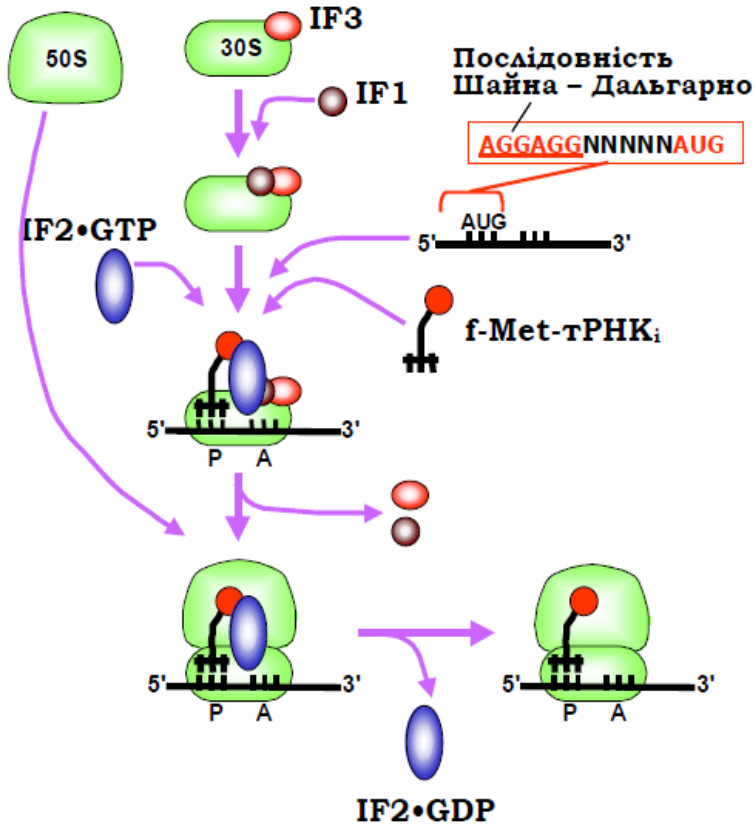


Рисунок 2.36 – Послідовність основних подій за ініціації трансляції в прокаріотів [7]

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

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

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

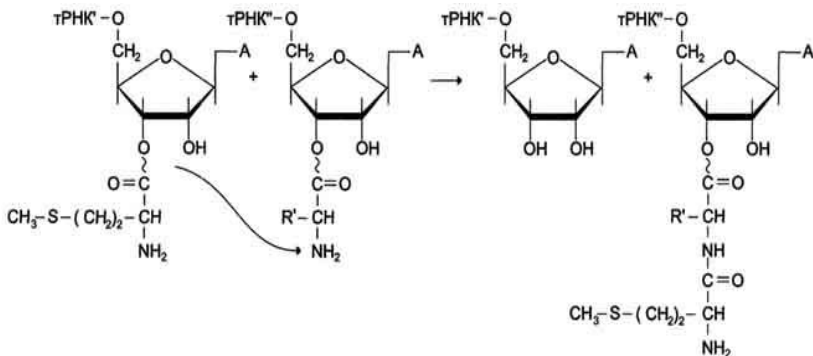


Рисунок 2.37 – Пептидилтрансферазна реакція

Перенесення амінокислотного залишку здійснюється з Р-сайта на А-сайт. Після утворення першого пептидного зв'язку А-сайт містить пептидил-тРНК, а Р-сайт – тРНК без амінокислоти, яка згодом вивільняється (рис. 2.38). Після утворення пептидного зв'язку відбувається транслокація – переміщення рибосоми вдовж молекули мРНК у напрямку

5' → 3' до наступного кодону. Пептидилтрансферазна реакція і транслокація повторюються багато разів, поки рибосома не натрапить на стоп-кодон на 5'-кінці молекули мРНК.

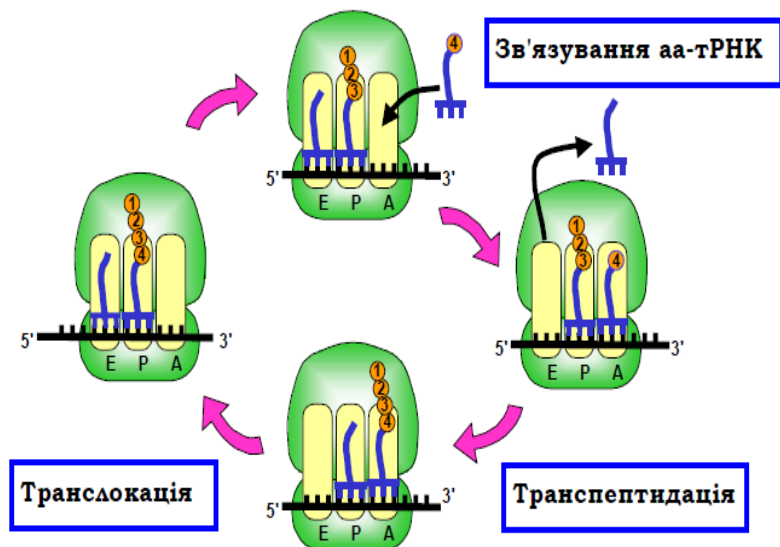


Рисунок 2.38 – Схема елонгаційного циклу [7]

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

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

Після завершення синтезу білка рибосома дисоціює на малу й велику субодиниці (рис. 2.39). У процесі трансляції мала субодиниця рибосом виконує генетичні функції

(мРНК розпізнає стартовий кодон, зчитує генетичну інформацію), а велика – біохімічні (каталізує утворення пептидного зв'язку між амінокислотними залишками).

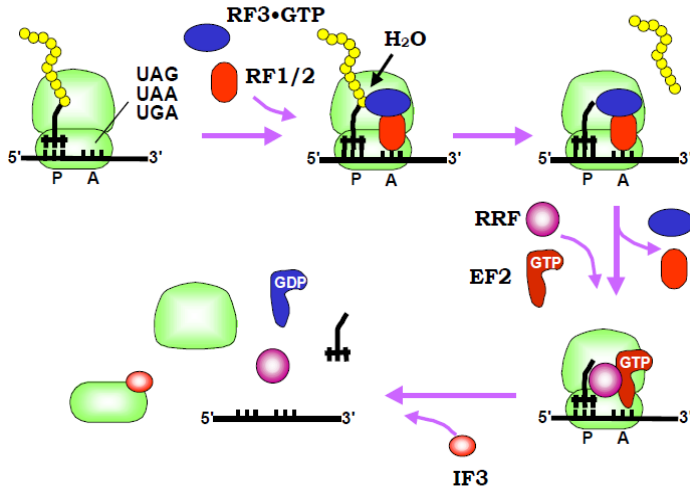


Рисунок 2.39 – Термінація трансляції [6]

Завдяки полісомам забезпечується висока швидкість трансляції (рис. 2.40). Наприклад, в *E. coli* синтез одного білка відбувається приблизно за 20 с. Швидкість трансляції в прокаріотів становить 10–15 амінокислот/с, в еукаріотів – 1–10 амінокислот/с.

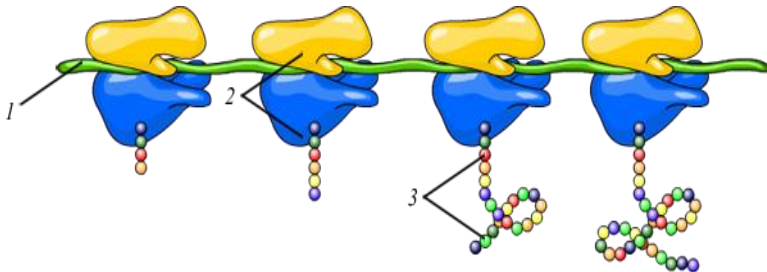


Рисунок 2.40 – Полісома (1 – мРНК, 2 – субодиниці рибосоми, 3 – поліпептид, що синтезується)

Особливості трансляції в еукаріотів

У процесі трансляції в еукаріотів беруть участь численні білкові фактори:

- фактори ініціації eIF (до 10 різних типів);
- фактори елонгації eEF1 α , eEF1 β та eEF-2;
- фактори термінації eRF.

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

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

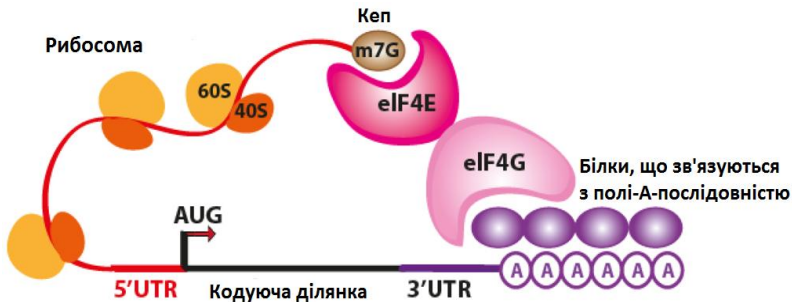


Рисунок 2.41 – Зв'язування eIF4E з кепом та eIF4G з полі-А-хвостом мРНК еукаріотів

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

В еукаріотів розпізнавання стартового кодону AUG на мРНК здійснюється за допомогою **термінальної (сканувальної) ініціації**: фактори ініціації й 40S-субодиниця рибосоми переміщуються вдовж ланцюга мРНК, скануючи його,

поки не досягнуть стартового кодону АУГ. Рух ініціаторного комплексу вздовж мРНК здійснюється завдяки енергії гідролізу АТФ. Ініціація трансляції завершується приєднанням 60S-субодиниці рибосоми й вивільненням факторів ініціації (рис. 2.42).

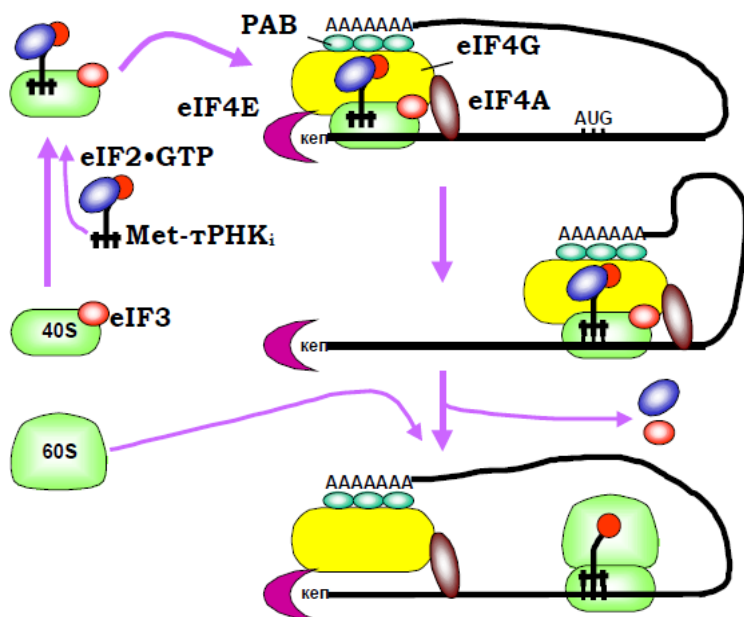


Рисунок 2.42 – Послідовність основних подій під час ініціації трансляції в еукаріотів [6]

На відміну від прокаріотів, еукаріоти мають моноцистронну мРНК, що містить лише одну ініціаторну ділянку на одну молекулу. Тобто на основі молекули мРНК синтезуються поліпептидні ланцюги одного білка.

У прокаріотів одна молекула мРНК може бути матрицею для синтезу різних білків.

2.4. Посттрансляційна модифікація білків

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

Типи хімічних модифікацій білка:

- гідроксильовання – приєднання ОН-групи;
- карбоксильовання – приєднання СОО-групи;
- метильовання – приєднання СН₃-групи;
- ацетильовання – приєднання СН₃-СО-групи;
- фосфорильовання – приєднання фосфатного залишку;
- дефосфорильовання – відщеплення фосфатного залишку;
- глікозильовання – приєднання вуглеводів;
- АДФ-рибозильовання – приєднання АДФ-рибози;
- приєднання небілкових лігандів (металів, кофакторів та ін.).

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

Білки, що синтезуються у вигляді неактивних попередників, активуються за допомогою часткового протеолізу. Такий механізм активації властивий для протеолітичних ферментів ШКТ. **Частковий протеоліз** полягає у відщепленні пептиду з N- або С-кінця молекули білка. Наприклад, неактивний пепсиноген перетворюється на активний пепсин за допомогою відщеплення N-кінцевого пептиду.

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

Після завершення трансляції поліпептидні ланцюги підлягають фолдингу.

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

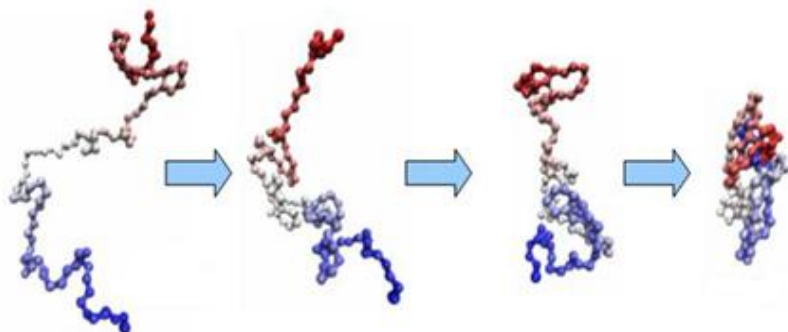


Рисунок 2.43– Фолдинг білків [9]

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

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

Існують два класи білків, що беруть участь у фолдингу:

1) **фолдази** – ферменти, що каталізують утворення -S-S-зв'язків і цис-транс ізомерію пептидних зв'язків проліну;

2) **шаперони** (hsp) – спеціалізовані білки, що стабілізують нестійку форму інших білків і забезпечують формування їхньої правильної просторової структури (рис. 2.44). Крім фолдингу білків, шаперони забезпечують їхній транспорт через мембрани.

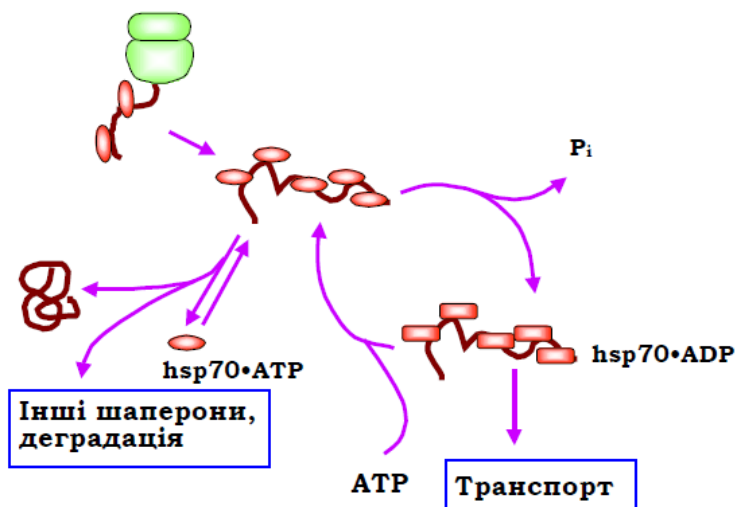


Рисунок 2.44 – АТФ-залежний робочий цикл hsp70 [6]

Порушення процесів фолдингу є механізмом розвитку хвороби Альцгеймера. У мозку хворих накопичується β -амілоїд, що порушує функціонування нервових клітин і спричинює їхню загибель; β -амілоїд – агрегати білків, що втратили α -спіралізацію й набули β -складчастої структури. Такі білки погано розчиняються у воді й майже не підлягають протеолізу.

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

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

Пріони – це білки з аномальною просторовою структурою. Вони є збудниками захворювань нервової системи людини: куру, хвороби Кройцфельда – Якоба, синдрому Герстмана – Штраусслера – Шейнкера та ін. [13].

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

За відкриття механізмів поширення інфекційних захворювань за участі пріонів Данієль Карлтон Гайдузек отримав Нобелівську премію з фізіології й медицини в 1976 р.

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

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

На рисунку 2.45 зображено просторову структуру пріона PrP^{Sc} і його попередника – білка PrP^{C} .

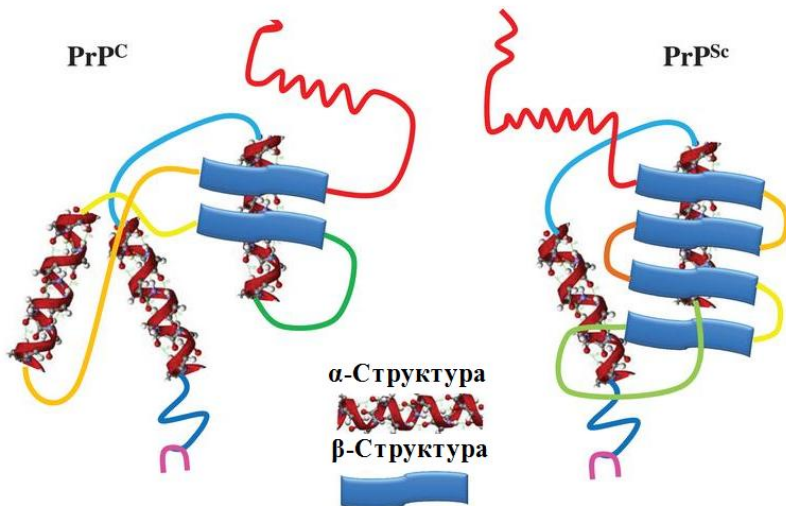


Рисунок 2.45 – Просторова структура пріона PrP^{Sc} і білка PrP^{C}

PrP^{sc} має змінену просторову структуру, що характеризується меншою кількістю α -спіральних доменів у молекулі. Під час потрапляння до організму PrP^{sc} каталізує перехід PrP^{c} у пріонну конформацію. За відсутності інфекції перетворення PrP^{c} на PrP^{sc} відбувається дуже рідко.

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

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

Розділ 3

РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ. РЕПАРАЦІЯ ДНК

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

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

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

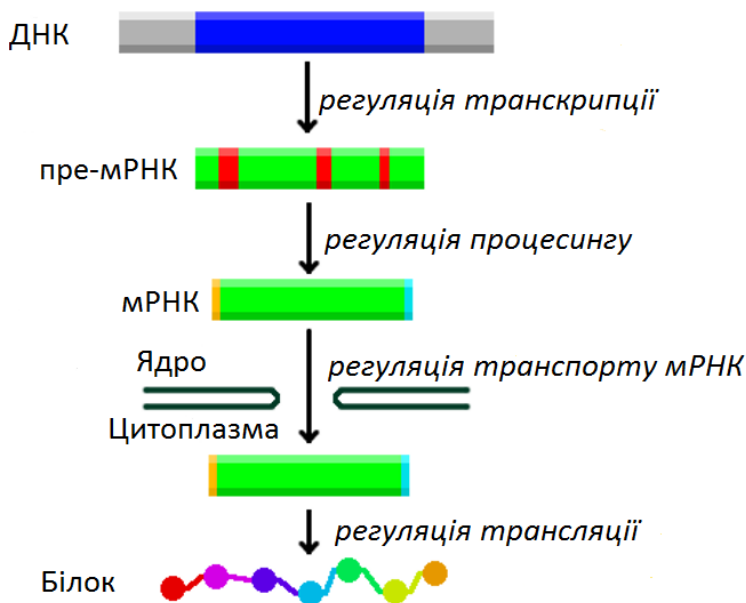


Рисунок 3.1 – Рівні регуляції експресії генів

За типом експресії розрізняють конститутивні та індукцйбельні гени. Експресія **конститутивних генів** здійснюється постійно. Швидкість експресії конститутивних генів не змінюється. Продукти експресії цих генів (РНК або білки) потрібні клітинам завжди. Прикладами консти-

тутивних генів є гени ферментів метаболізму глюкози. Як відомо, глюкоза є основним джерелом енергії для клітин.

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

Посилення експресії генів називають **індукцією**. Речовини, що посилюють експресію генів, дістали назву **індукторів**.

Пригнічення експресії генів називають **репресією**.

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

3.1. Регуляція транскрипції в прокаріотів

У 1965 р. Франсуа Жакоб, Мішель Львов і Жак Люсьєн Моно отримали Нобелівську премію за дослідження механізмів регуляції транскрипції в бактерій. Учені пояснили регуляцію експресії **Лас-оперона E.coli**. Оперон є одиницею транскрипції в прокаріотів.

Оперон – група генів, контрольована одним промотором.

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

Структура Лас-оперона:

- **оператор** – ділянка, до якої приєднується репресор;
- **САР-сайт** – ділянка, до якої приєднується білок-активатор катаболізму (САР – catabolism activated protein);
- **промотор** – ділянка, до якої приєднується РНК-полімераза;
- **регуляторний ген (І-ген)** – ген, що кодує білок-репресор;

– **структурні гени** – гени, що кодують ферменти катаболізму лактози: β -галактозидазу або лактазу, β -галактозидпермеазу, β -галактозидтрансацитилазу.

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

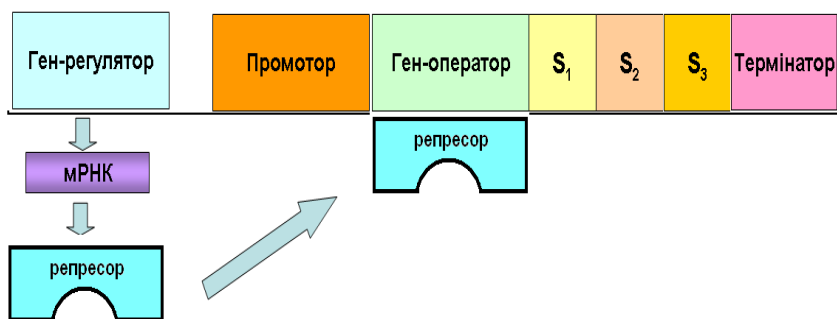


Рисунок 3.2 – Репресія Лас-оперона [8]

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

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

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

Алолактоза приєднується до білка-репресора, унаслідок цього він втрачає спорідненість з оператором. Комплекс «білок-репресор-алолактоза» відокремлюється від оператора, здійснюється транскрипція оперона (рис. 3.3).

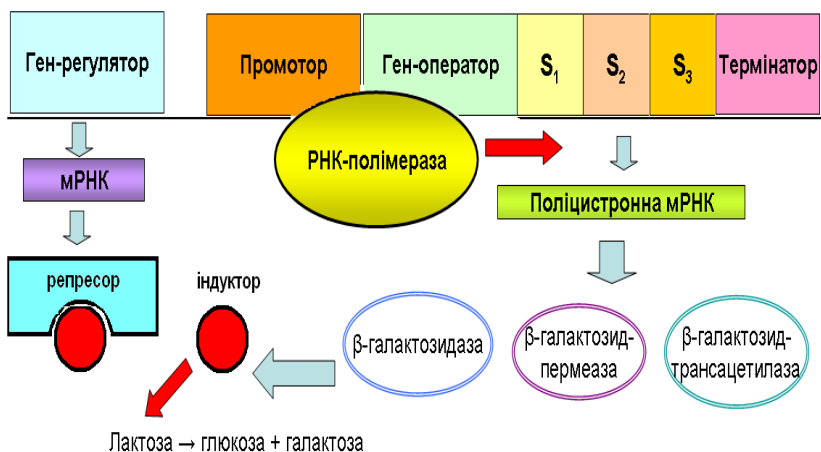


Рисунок 3.3 – Індукція Лас-оперона [8]

Регуляція експресії генів Лас-оперона забезпечує адаптацію *E.coli* до середовища існування з високим вмістом лактози. На прикладі лактозного оперона *E.coli* вперше був розшифрований механізм регуляції експресії генів прокаріотів.

Триптофановий оперон

Триптофановий оперон наявний у багатьох бактерій. Уперше триптофановий оперон був описаний в *E.coli*. Триптофановий оперон *E.coli* містить п'ять структурних генів, необхідних для утворення ферментів, що каталізують синтез триптофану. За високої концентрації триптофану

в клітині відбувається репресія trp-оперона, за низької – індукція. Регуляція експресії trp-оперона здійснюється за допомогою білка-репресора, що активується під час зв'язування з триптофаном. Триптофан відіграє роль корепресора. Комплекс триптофан – білок-репресор приєднується до оператора і блокує транскрипцію структурних генів (рис. 3.4).

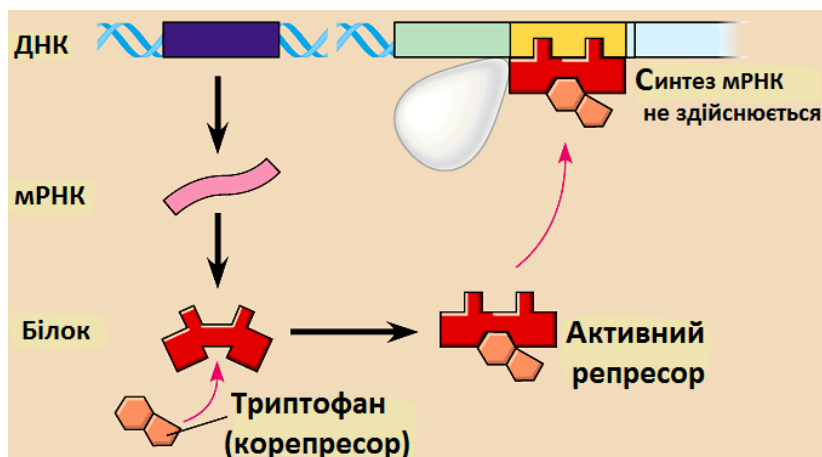


Рисунок 3.4 – Репресія триптофанового оперона

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

Атенюатор містить сигнал про закінчення транскрипції. За високої концентрації триптофану в клітині деякі молекули РНК-полімерази можуть подолати білок-репресор. За цих умов транскрипція завершується на атенюаторній ділянці.

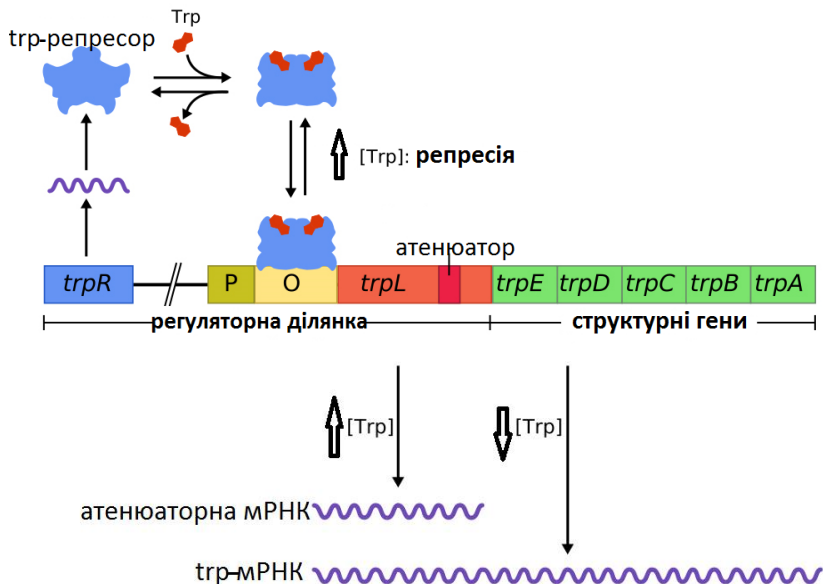


Рисунок 3.5 – Механізм регуляції *trp*-оперона за участі атенюатора

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

3.2. Особливості регуляції експресії генів в еукаріотів

Механізми регуляції експресії генів еукаріотів є більш складними, ніж прокаріотів. Як відомо, лише 1,5 % ДНК людини містять структурні гени (рис. 3.6). На сьогодні тривають дослідження щодо з'ясування функцій усіх елементів геному. За результатами міжнародного проекту Енциклопедія елементів ДНК ENCODE було виявлено 4 млн сайтів – регуляторів генної активності [16].



Рисунок 3.6 – Приблизний відносний вміст послідовностей різних типів в еукаріотичному геномі [2]

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

Ремоделювання хроматину здійснюється завдяки хімічній модифікації гістонів: ацетилювання, метилювання, фосфорилювання (рис. 3.8).

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

Інші модифікації впливають на функціональний стан хроматину складніше: метилювання або фосфорилювання

одного залишку може викликати репресію транскрипції, іншого – супроводжувати активацію.

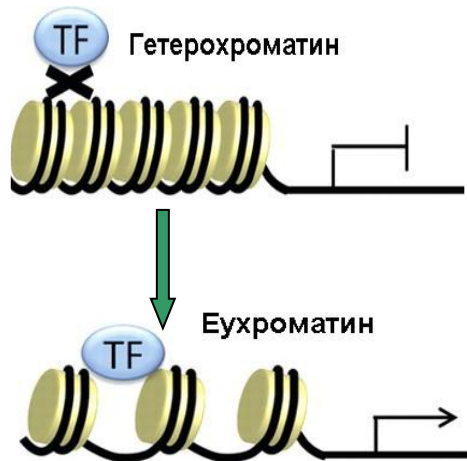


Рисунок 3.7 – Гетерохроматин та еухроматин

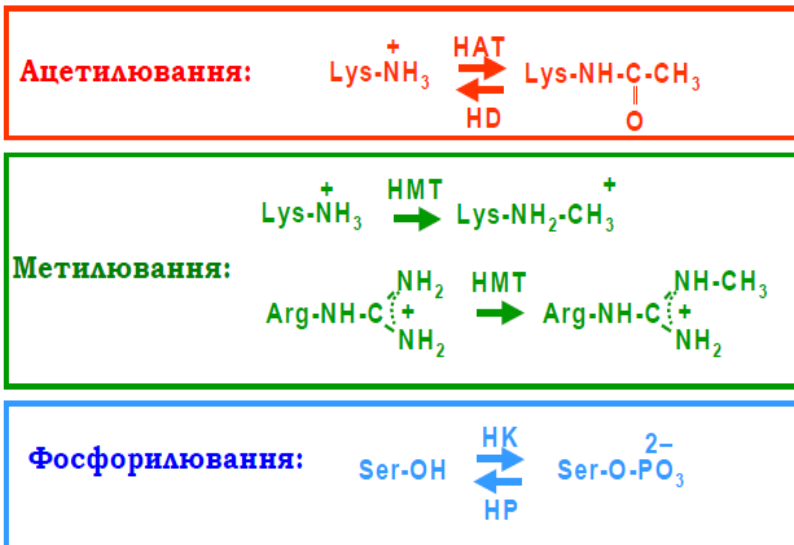


Рисунок 3.8 – Посттрансляційні модифікації амінокислотних залишків у гістонах [6]

У регуляції транскрипції еукаріотів беруть участь численні білкові фактори.

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



Рисунок 3.9 – Множинний контроль транскрипції гена еукаріотів [9]

Енхансери – регуляторні ділянки ДНК, під час з'єднання з якими білкові фактори активують транскрипцію.

Сайленсери – регуляторні ділянки ДНК, під час з'єднання з якими білкові фактори пригнічують транскрипцію.

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

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

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

- білки зі структурами НТН (Helix-Turn-Helix) – «спіраль-поворот-спіраль» (рис. 3.10);

- білки зі структурами «лейциновий зіпер» (рис. 3.11);

- білки зі структурами «цинкові пальці» (див. рис. 3.11).

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

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

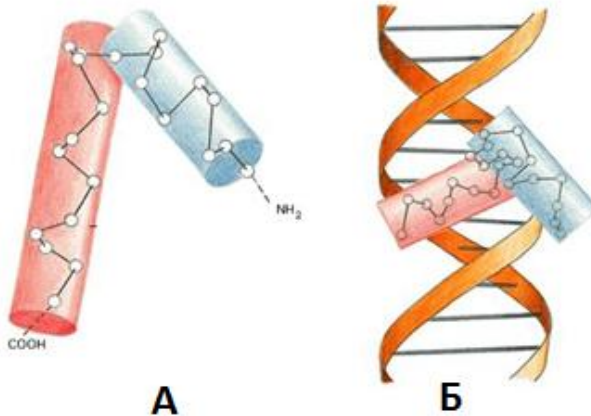


Рисунок 3.10 – Схема структури домену НТН (А) та його взаємодія з ДНК (Б) [1]

Структура «цинкові пальці» характерна для внутрішньоклітинних рецепторів стероїдних гормонів. У ДНК-

зв'язувальному мотиві атом Zn з'єднаний із двома залишками гістидину і двома залишками цистеїну. Чотири такі зв'язки створюють жорсткий каркас, який утримує білкову поверхню, що повинна взаємодіяти з ДНК. Фактори транскрипції можуть містити декілька «цинкових пальців», що зумовлюють множинні контакти з ДНК.

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

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

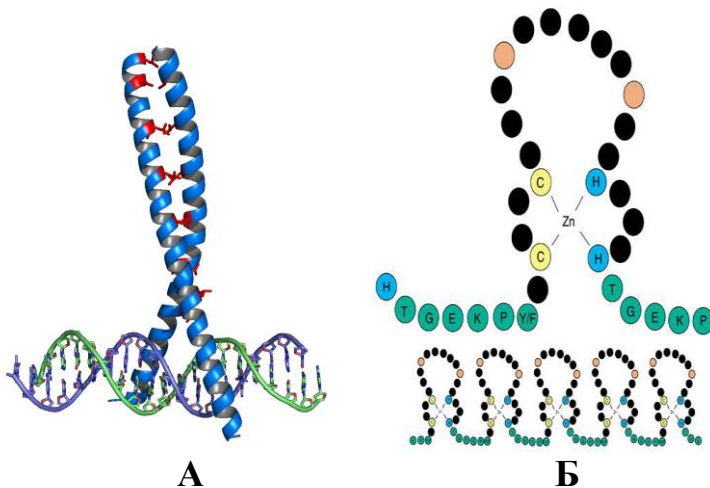


Рисунок 3.11 – Схема структури доменів лейцинового «зіпера» (А) і «цинкових пальців» (Б) [1]

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

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

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

Як відомо, білки крові інтерферони здійснюють протівірусну дію. Механізм їхньої дії полягає в активації протеїнкінази, що каталізує фосфорилування eIF-2. Перехід eIF-2 з активного до неактивного стану спричинює інгібування трансляції мРНК і руйнування клітин, що унеможлиблює розмноження вірусів (рис. 3.12).

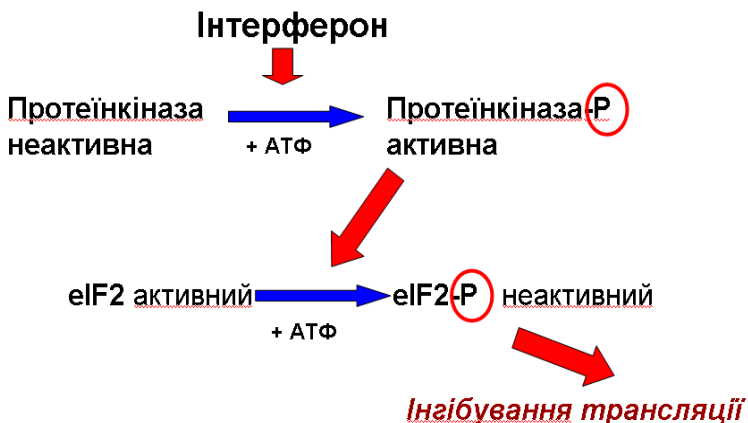


Рисунок 3.12 – Механізм дії інтерферонів [8]

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

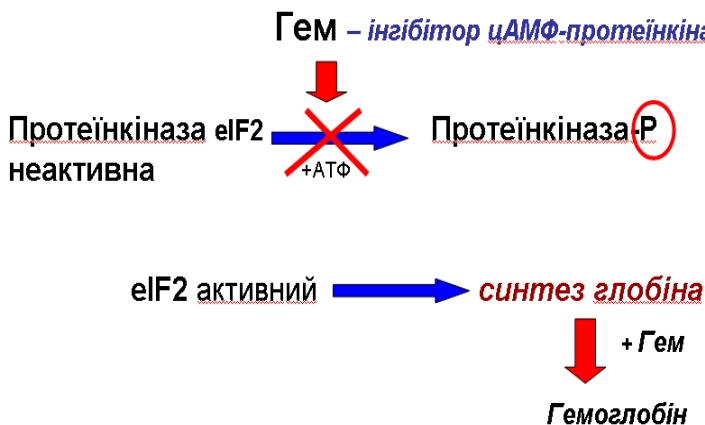


Рисунок 3.13 – Регуляція синтезу глобіну [8]

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

Антибіотики й токсини – інгібітори біосинтезу білків

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

Інгібітори транскрипції:

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

- *антибіотики рифампіцин, рифаміцин, актиноміцин D* убудовуються в подвійну спіраль ДНК і блокують процеси реплікації і транскрипції;

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

Антибіотики – інгібітори трансляції в прокариотів:

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

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

– *еритроміцин* – інгібітор транслокації рибосом.

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

Інгібітори трансляції в еукаріотів:

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

– *дифтерійний токсин* – інгібітор транслокації рибосом. Дифтерійний токсин інгібує eEF-2 транслоказу еукаріотів за допомогою АДФ-рибозилування



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

3.3. Репарація ДНК

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

Зміни структури ДНК є наслідком спонтанних або індукованих мутацій.

Розрізняють такі **типи мутацій**:

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

б) **хромосомні аберації**:

– транспозиція – перенесення генів у межах однієї хромосоми;

– транслокація – перенесення гена в іншу хромосому;

– делеція – втрата ділянки хромосоми;

– дуплікація – подвоєння ділянки хромосоми;

– інверсія – поворот ділянки хромосоми на 180°;

в) генні (точкові) мутації:

– транзиція – заміна комплементарних нуклеотидів
 $T \leftrightarrow C$ або $A \leftrightarrow G$;

– трансверсія – заміна некомплементарних нуклеотидів
 $T(C) \leftrightarrow A(G)$;

– вставка – додавання нуклеотидів;

– делеція – вирізання нуклеотидів.

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

У 2015 р. Нобелівська премія з хімії була присуджена за дослідження механізмів репарації ДНК. Її лауреатами стали Томас Ліндаль, Пол Модрич та Азіз Санджар.

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

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

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



Особливою групою хімічних мутагенів є алкілювальні агенти Ці сполуки здатні вбудовувати алкільні групи ($-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$ та ін.) у молекули пуринових і піримідинових азотистих основ ДНК. Один із найбільш потужних алкілювальних мутагенів – метилнітронітрозогуанідин – здійснює метилування гуаніну. Утворений продукт дістав назву O^6 -метилгуанін (O^6 -метГ). Ферменти репарації **метилтрансфери** відщеплюють метильну групу від модифікованого гуаніну й відновлюють структуру ДНК. Підраховано, що

за 1 хвилину в клітині *E.coli* синтезується 100 молекул метилтрансфераз. Клітини накопичують декілька тисяч молекул метилтрансфераз: для виправлення кожного пошкодження ДНК використовується одна молекула білка. Якщо процес виникнення нових пошкоджень у ДНК здійснюється повільніше, ніж синтез метилтрансфераз, мутації не утворюються.

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

Ексцизійна репарація азотистих основ (Base Excision Repair) забезпечує відновлення структури ДНК під час дезамінування цитозину (рис. 3.15). Унаслідок дезамінування цитозину утворюється урацил.

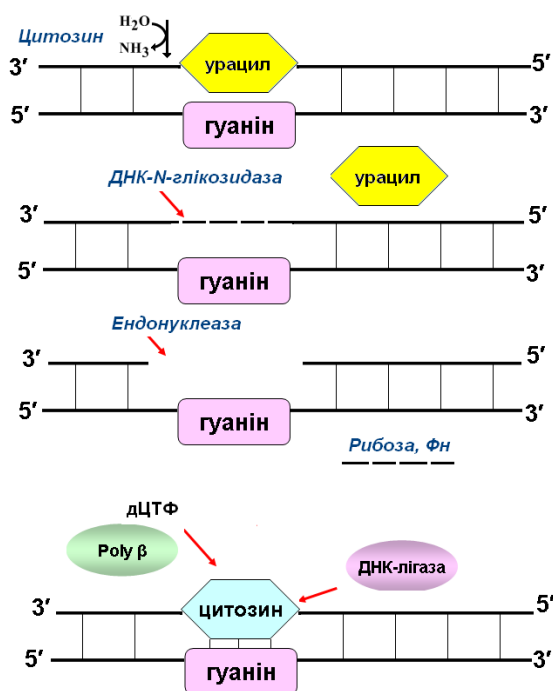


Рисунок 3.15 – Репарація дезамінування цитозину [8]

Репарація дезамінованого цитозину в еукаріотів здійснюється за допомогою таких ферментів:

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

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

3) ДНК-полімерази β – убудовує правильний нуклеотид;

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

Ексцизійна репарація нуклеотидів забезпечує відновлення структури ДНК під час утворення Т-димерів (рис. 3.16).

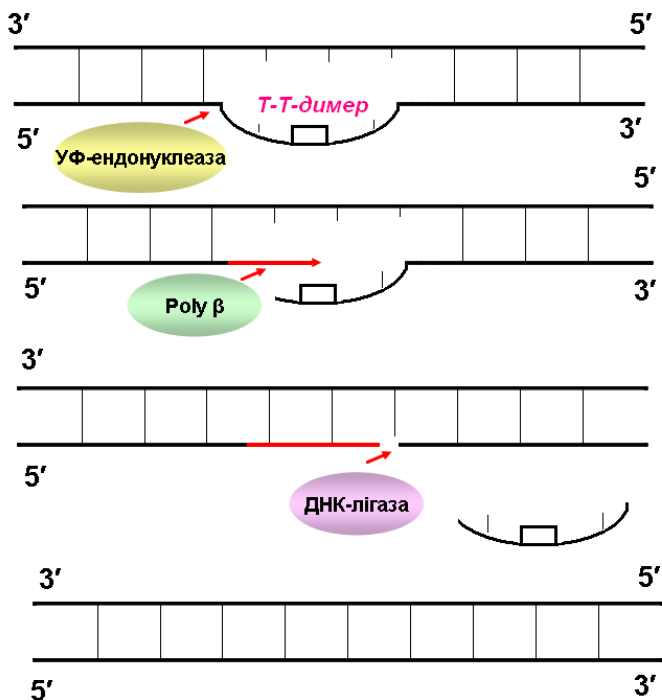


Рисунок 3.16 – Ексцизійна репарація тимінового димеру в еукаріотів [8]

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

- УФ-специфічна ендонуклеаза (розрізає ланцюг ДНК, видаляє пошкоджену ділянку);
- ДНК-полімераза (добудовує правильну послідовність нуклеотидів);
- ДНК-лігаза (з'єднує фрагменти ДНК між собою).

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

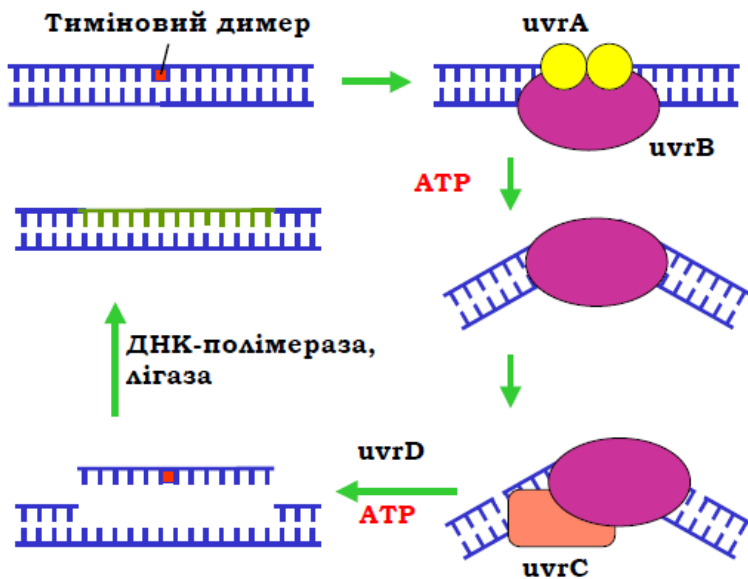


Рисунок 3.17 – Система *uvrABCD* ексцизійної репарації нуклеотидів в *E.coli* [6]

Порушення процесів репарації в організмі людини спричинює низку захворювань: пігментну ксеродерму, трихотіодистрофію, синдром Кокайна, анемію Фанконі та ін. [1].

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

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



Рисунок 3.18 – Пігментна ксеродерма

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

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

Установлено, що в клітинах *E.coli* частота помилок під час реплікації становить 1 на 10 000 пар нуклеотидів,

в еукаріотів помилки виникають частіше. ДНК-полімерази здійснюють корекцію некомплементарних нуклеотидів, проте деякі помилки реплікації залишаються не виправленими.

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

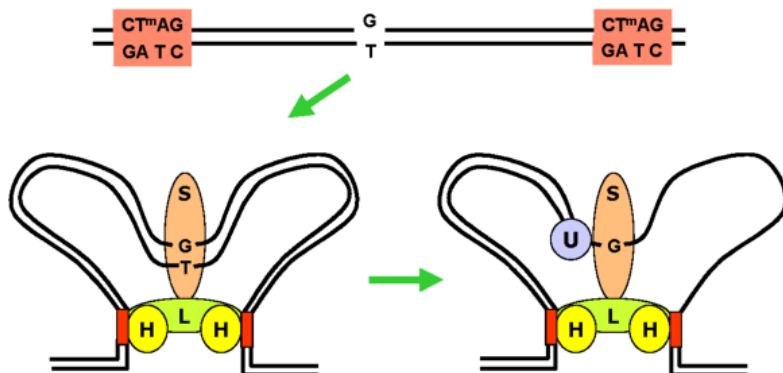


Рисунок 3.19 – Система репарації місметчів MutHLSU [2]

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

Система MutHLSU є консервативною, гомологічні білки наявні також і в еукаріотів (рис. 3.20). Доведено, що за участі подібних білків відбувається репарація ДНК у клітинах людини. Еукаріотичні гомологи бактеріальних білків MutL називають MLH (MutL homolog), а гомологи MutS – MSH (MutS homolog). У людини виявлені 11 MLH і 4 MSH.

У процесі репарації ферменти розпізнають дочірній і материнський ланцюги ДНК за наявності метильної гру-

пи в послідовності GATC. Материнський ланцюг ДНК завжди метильований.

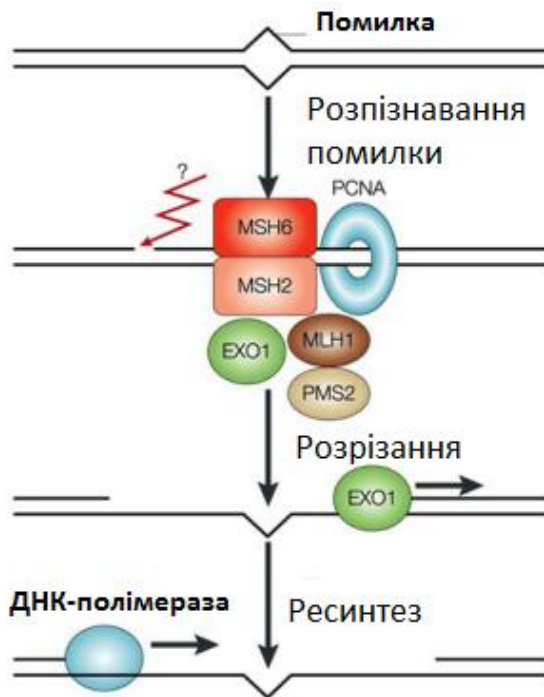


Рисунок 3.20 – Функціонування системи репарації місметчів в еукаріотів [1]

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

Розділ 4

ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ

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

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

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

Методи генної інженерії:

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

4.1. Технологія рекомбінантної ДНК

Рекомбінантна ДНК – молекула ДНК, утворена під час сполучення генів у новій комбінації.

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

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

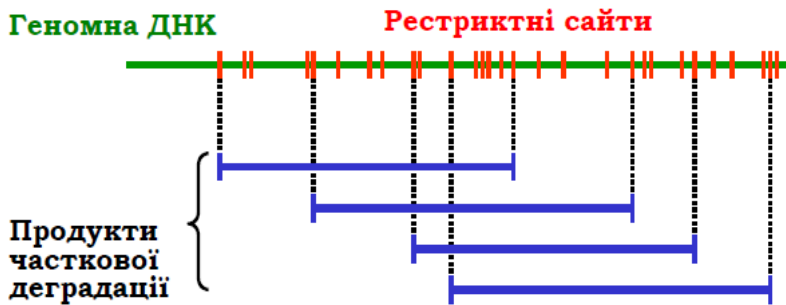


Рисунок 4.1 – Розщеплення ДНК рестриктазами [6]

Рестриктази розщеплюють полінуклеотидний ланцюг у специфічних ділянках – сайтах рестрикції. Зазвичай сайти рестрикції являють собою паліндромні послідовності, у яких спостерігається подвійна симетрія (у напрямку 5'→3' послідовності нуклеотидів ідентичні). Рестриктази здійснюють не прямий розріз через обидва ланцюги ДНК, а ступінчастий, унаслідок якого утворюються «липкі» кінці, що можуть легко з'єднуватися один з одним. Якщо змішати два фрагменти ДНК з ідентичними «липкими» кінцями, вони з'єднуються. Для ковалентного з'єднання розривів використовують фермент ДНК-лігазу бактеріофага Т₄ (рис. 4.2).

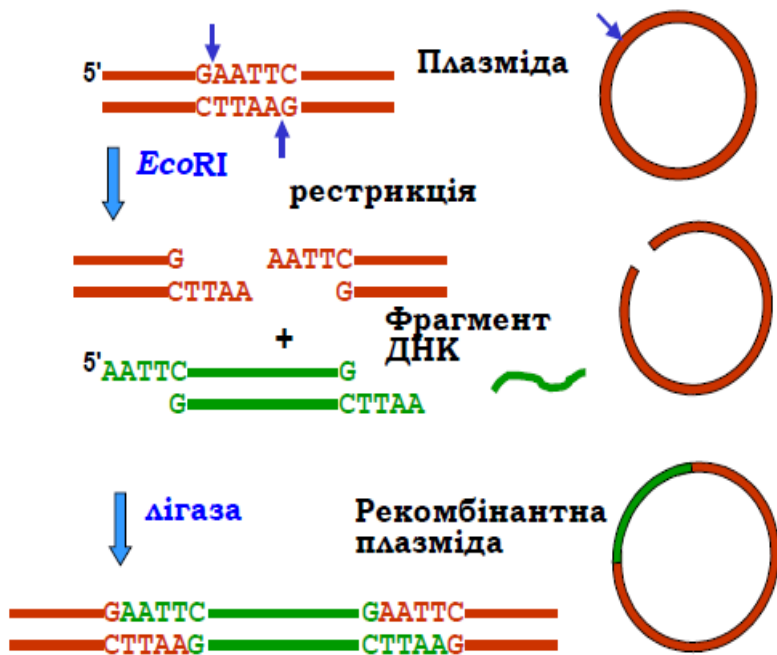


Рисунок 4.2 – Одержання рекомбінантної ДНК на основі плазмідного вектора [7]

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

4.2. Клонування генів. Клонотеки генів

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

Суть клонування полягає у введенні ділянки ДНК у бактеріальну клітину, де вона буде реплікуватися. Одна клі-

тина забезпечує утворення колонії, що містить велику кількість ідентичних клітин: наприклад, під час вирощування на агарі за одну ніч клітина *E.coli* утворює 10^7 клітин в одній колонії. Отже, за допомогою бактеріальних клітин забезпечується синтез значної кількості копій необхідних генів.

Етапи клонування генів:

- розщеплення ДНК рестриктазами;
- оброблення рестриктазами вектора для клонування;
- з'єднання двох фрагментів ДНК за допомогою ДНК-лігази фага Т₄;
- трансформація клітин-реципієнтів;
- ампліфікація ДНК у трансформованих клітинах.

Перенесення генів від організму-донора до організму-реципієнта здійснюють за допомогою векторів.

Як вектори використовують плазміди (рис. 4.3), віруси, фрагменти хромосом еукаріотичних клітин.

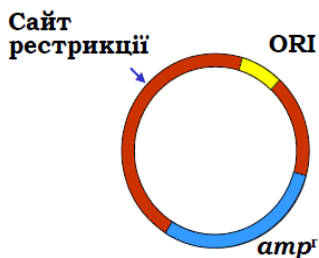


Рисунок 4.3 – Схема організації плазмідного вектора
(ORI – ориджин реплікації, amp^r – ген стійкості до ампіциліну [2])

Існують чотири групи методів введення рекомбінантної ДНК у клітини:

- хімічні (використання ліпосом, іонів металів);
- фізичні (електропорація, лазерне опромінення);

- механічні (мікроін'єкція, бомбардування клітин мікрочастинками, на яких сорбована рекомбінантна ДНК);
- біологічні (перенесення генів у процесі вірусної інфекції– трансфекція).

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

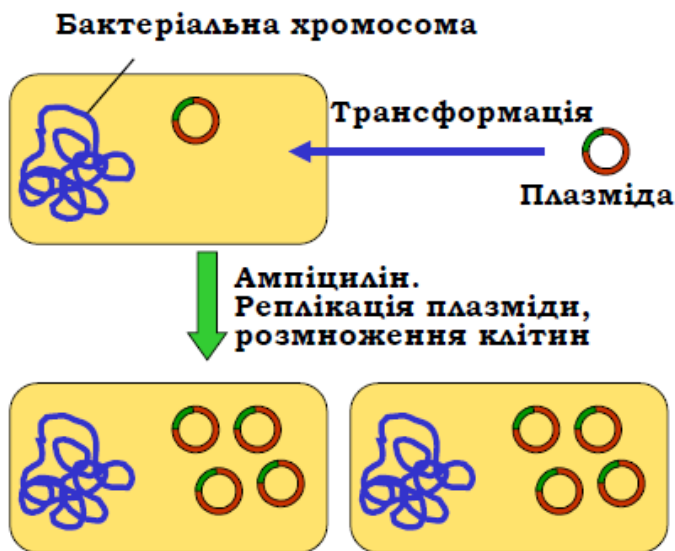


Рисунок 4.4 – Розмноження рекомбінантної плазміди в бактеріальних клітинах [2]

Ефективність трансформації визначають як кількість трансформантів на 1 мкг уведеної ДНК. Сучасні методи трансформації бактеріальних клітин дозволяють одержати до 10^7 – 10^8 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК [4].

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

Для створення клонотеки генів рекомбінантну ДНК упаковують у фаги та інфікують ними бактерії. Що коротші фрагменти ДНК для клонотек генів і що складніший

досліджуваний геном, то більшу кількість клонів необхідно одержати, щоб клонотека була повною. Наприклад, щоб створити геномну клонотеку із фрагментів ДНК довжиною 20 тис. п. н. (будь-яку послідовність подано з імовірністю 99 %), для бактерій необхідно мати 460 клонів, для ссавців – 600 тис., для покритонасінних рослин – у 10 разів більше [4].

Клонотеки, одержані з використанням бактеріальних клітин, зберігають за температури -70°C у вигляді суспензії в 30 % розчині гліцеролу, а суспензії фагових частинок – у диметилсульфоксиді. Це запобігає руйнуванню клітин бактерій і фагів під час заморожування й відтавання.

4.3. Полімеразна ланцюгова реакція

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

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

Схему процесу ПЛР зображено на рисунку 4.5.

ПЛР – циклічний процес, кожен цикл має такі етапи:

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

Першому циклу ПЛР передуює інкубація суміші за $t = 92\text{--}96^{\circ}\text{C}$ упродовж 0,5–10 хв, що супроводжується інактивацією домішок білків. Під час короткочасного нагрівання (упродовж 1–2 хв) відбувається плавлення ДНК. Під час охолодження до температури 60°C праймери з'єднуються з комплементарними ділянками ДНК, Таq-полімераза синтезує нові ланцюги ДНК. Після завершення стадії синтезу

ДНК цикл ПЛР повторюють в автоматичному режимі. Кожний цикл ПЛР триває 3–5 хвилин.

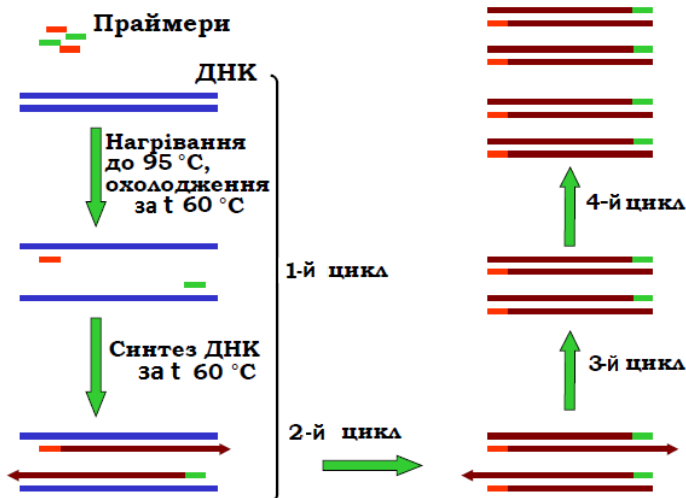


Рисунок 4.5 – Схема ПЛР [6]

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

Метод ПЛР дозволяє збільшувати кількість фрагментів ДНК у мільйон разів. З геномної ДНК 1–2 соматичних клітин можна отримати 10^2 – 10^5 копій ДНК. Сфери застосування ПЛР:

- отримання великої кількості специфічних фрагментів ДНК (ампліфікація);
- синтез генів;
- секвенування ДНК;
- виявлення в генах спонтанних мутацій, що призводять до спадкових захворювань;

– діагностика інфекційних захворювань (виявлення патогенних мікроорганізмів у біологічному матеріалі).

У 1992 р. Т. Сано вперше розробив **метод імуно-ПЛР** – найбільш чутливий метод виявлення білків та інших антигенів. Чутливість цього методу в 1000 разів перевищує чутливість імуноферментного аналізу. Як зонди для виявлення антигенів використовують кон'югати фрагментів ДНК з антитілами. Якщо в біологічному зразку наявний антиген, він з'єднується з антитілом, сигнал передається до ДНК і здійснюється ПЛР. Отже, синтез ДНК свідчить про наявність антигенів.

4.4. Генна діагностика

Відомо, що геном людини містить 3,5 млрд нуклеотидів і більше ніж 30 тис. генів. У геномі людини нуклеотидні послідовності, що кодують білки, становлять лише 1,1–1,4 % від загальної довжини ДНК. Мутації у структурних генах призводять до серйозних порушень на рівні клітин, тканин або органів. Здебільшого внаслідок мутацій змінюється активність певного ферменту, що спричинює накопичення токсичного субстрату або дефіцит сполуки, необхідної для нормального функціонування клітини.

На сьогодні відомо близько 5000 спадкових порушень обміну речовин і лише для 500 із них виявлені молекулярні причини. Розроблені тести, що визначають генетичну схильність до спадкових захворювань, а також методи їхньої молекулярної діагностики.

В основі молекулярної діагностики спадкових захворювань лежать імунологічні підходи або методи виявлення специфічної послідовності ДНК.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.5. Генна терапія

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

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

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

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

- 1) одержання клітин хворого;
- 2) корекції генетичного дефекту за допомогою введення потрібного гена в ізольовані клітини;

- 3) відбору й культивування генетично «виправлених» клітин;
- 4) інфузії або трансплантації цих клітин пацієнтові.



Рисунок 4.6 – Схема генної терапії ex vivo

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

Використання аутологічних клітин попереджує їхнє відторгнення, але обмежує сферу застосування генної терапії ex vivo. Так, кількість клітин тканини-мішені може бути недостатньою для їхнього виділення й культивування in vitro, деякі соматичні клітини неефективно поглинають ДНК, а експресія клонованого гена виявляється короткочасною. Тому розроблені системи, що захищають неаутологічні клітини від імунної відповіді.

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

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

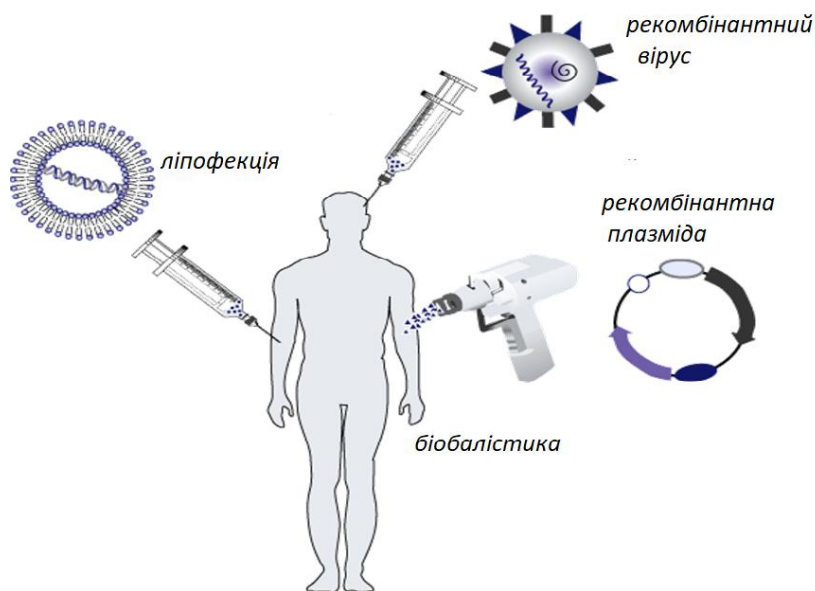


Рисунок 4.7 – Схема генної терапії in vivo

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

Вивчають терапевтичний ефект різних олігонуклеотидів: модифікованих за допомогою генної інженерії рибозимів, що розщеплюють специфічні мРНК; аптамерів, що

зв'язуються зі специфічними білками і блокують їхні функції; олігонуклеотидів, за допомогою яких можна здійснювати корекцію заміни однієї нуклеотидної пари й мутації.

Уперше генна терапія була застосована в 1990 р. для лікування спадкового імунodefіциту. Група вчених США під керівництвом В. Андерсона розпочала лікування 4-річної дівчинки Ашанти де Сільви з тяжкою формою імунodefіциту. Молекулярною причиною захворювання є пошкодження гена білка аденозиндезамінази (АДА). За відсутності АДА лейкоцити гинуть, організм стає беззахисним перед вірусами й бактеріями. Для лікування Ашанти застосували генну терапію *ex vivo*: з організму виділили клітини імунної системи, піддали їх генетичній модифікації і ввели дівчинці. Копії нормального гена були введені в клітини крові Ашанти за допомогою вірусного вектора. У клітинах розпочався синтез АДА, через 6 місяців вміст лейкоцитів в організмі дівчинки досягнув нормального рівня [4].

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

У 2000 р. в США для лікування гемофілії була запропонована процедура введення гена одного з факторів згортання крові. Установлено, що введення цього гена хворим на гемофілію перешкоджає виникненню крововиливів у пацієнтів. Після такого лікування пацієнти з гемо-

філією більше ніж 1 рік не відчують необхідності в додаткових ін'єкціях фактора згортання крові.

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

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

Розроблення технології CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) стала поштовхом для розвитку генної терапії. Ця технологія дозволяє здійснювати спрямоване редагування геномів еукаріотичних клітин. У 2018 р. за технологією CRISPR / Cas9 було здійснено редагування ДНК яйцеклітини людини з метою нокауту гена, що кодує білок, зв'язування з яким дозволяє ВІЛ проникнути в клітину.

У 2019 р. в США, країнах ЄС, Японії і Бразилії було схвалено клінічне застосування генотерапевтичного препарату Zolgensma (Onasemnogene abeparvovec) для дітей зі спінальною м'язовою атрофією (СМА). СМА є найбільш поширеною генетичною причиною смерті дітей. За статистикою, ця хвороба вражає одного-двох немовлят із 10 тис. новонароджених. Генотерапевтичний препарат Zolgensma

призначений для дітей віком до двох років. Він розроблений на основі модифікованого аденовірусу, що вбудовує копію правильного гена SMN 1 у моторні нейрони. Це приклад одних із найдорожчих ліків у світі, вартість однієї інфузії становить близько 2,1 млн доларів (табл. 4.1). Розроблення і клінічні дослідження Zolgensma тривали більше ніж 10 років.

Таблиця 4.1 – Приклади генотерапевтичних препаратів

Препарат	Захворювання	Вартість
Zolgensma	Спінальна м'язова атрофія	2,1 млн дол.
Spinraza	Спінальна м'язова атрофія	100 тис. дол.
Luxturna	Уроджена сліпота	850 тис. дол.
Zynteglo	β -Таласемія	2,8 млн дол.
Kymriah	Гострий лімфобластний лейкоз	475 тис. дол.
Abecma	Множинна мієлома	420 тис. дол.

Крім Zolgensma, для генної терапії спінальної м'язової атрофії також використовують препарати Evrysdi і Spinraza. До складу препарату Evrysdi входить ридиплам, що діє як модифікатор сплайсингу гена SMN 2, підвищуючи вироблення повноцінного функціонального білка SMN для підтримання здорових рухових нейронів. Препарат Evrysdi застосовують перорально, препарат Spinraza – у вигляді ін'єкцій у спинномозкову рідину. Обидва препарати застосовують протягом усього життя.

Для корекції зору в пацієнтів зі спадковою формою сліпоти застосовують препарат Luxturna. Він містить понад 150 млрд копій виправленого гена RPE65, який кодує специфічний протеїн пігментного епітелію сітківки. Для досягнення терапевтичного ефекту достатньо введення однієї дози Luxturna.

Препарат Zynteglo є ефективним у генній терапії β -таласемії, він здатний замінити регулярні переливання крові,

необхідні протягом усього життя пацієнта. Лікування полягає в одноразовому введенні в організм хворого генетично модифікованих гематопоетичних стовбурових клітин, що містять копії правильного гена β -глобіна.

На сьогодні найбільша кількість досліджень у галузі генної терапії спрямована на боротьбу з онкологічними хворобами. Упроваджується декілька напрямів боротьби зі злоякісними захворюваннями:

- генетична модифікація клітин імунної системи для посилення їхньої протипухлинної активності і пригнічення роботи онкогенів (рис. 4.8);

- підвищення чутливості пухлинних клітин до хіміотерапевтичних препаратів.

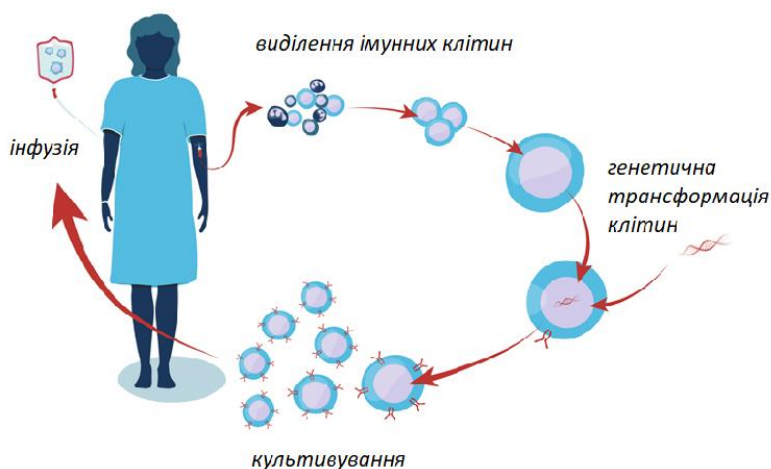


Рисунок 4.8 – Схема генної терапії онкологічних хвороб

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

На основі технології генетичної трансформації імунних клітин створені сучасні генотерапевтичні препарати для боротьби з онкологічними хворобами. Для генної терапії гострого лімфобластного лейкозу використовують препарат Kymriah, для терапії множинної мієломи – препарати Karvukti та Abecma.

Генотерапевтичні препарати дозволяють здійснювати корекцію метаболічних порушень за захворювань, які раніше вважали невиліковними.

Незважаючи на значні досягнення генної терапії в лікуванні спадкових і онкологічних захворювань, вона не набула значного поширення в медичній практиці. Причини цього такі:

- відторгнення чужорідних генів, спричинене імунною реакцією організму;
- перенесені гени існують у клітинах упродовж короткого часу, іноді навіть не встигають напрацювати необхідної кількості лікувального продукту, у зв'язку з цим спостерігається тимчасове виліковування й лише в частини клітин;
- невисока ефективність сучасних методів перенесення генів у клітини хворих;
- убудовування нового генетичного матеріалу в певні ділянки ДНК людини може спричинювати рак. Відомі випадки, коли пацієнти з імунною недостатністю після застосування генної терапії захворіли на лейкемію.

Корекція генетичних дефектів не призведе до погіршення генофонду людської популяції. За даними популяційної генетики, для істотного підвищення частоти шкідливого гена внаслідок ефективного лікування необхідні тисячі років. Так, наприклад, якщо генетичне захворювання трапляється в одного із 100 000 новонароджених, то мине 2000 років після початку застосування ефективної генної терапії, перш ніж частота захворювання подвоїться [4].

Отже, генна терапія людини є безпечною медичною процедурою, що дозволяє покращити стан пацієнтів із генетичними або онкологічними захворюваннями.

4.6. Біофармацевтика

Застосування трансгенних організмів із метою одержання фармацевтичних сполук започаткувало розвиток нової галузі – біофармацевтики, основними продуктами якої є вакцини, моноклональні антитіла, терапевтичні й нутрицевтичні білки.

Генно-інженерні методи дозволяють одержувати унікальні лікарські препарати, основними компонентами яких є білки людини, синтезовані на основі рекомбінантної ДНК [4]. Особливу увагу вчені приділяють розробленню ефективних препаратів для лікування захворювань людей похилого віку: хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, рак, хронічна ниркова недостатність, діабет, остеопороз, серцево-судинні захворювання (інсульт, інфаркти). Приклади білків людини, одержаних із використанням технології рекомбінантної ДНК, наведено в таблиці 4.2.

Здебільшого як біореактори для синтезу фармацевтичних сполук використовують трансгенні мікроорганізми [12]. Так, наприклад, синтез інсуліну здійснюють генетично модифіковані бактерії *Escherichia coli* (рис. 4.9). Для синтезу ферментів переважно використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, для синтезу антибіотиків – бактерії *Streptomyces*.

За допомогою генетично модифікованих бактерій одержують інтерферони – білки, що забезпечують неспецифічний протівірусний імунітет. З 1 л культуральної рідини бактерій одержують таку ж саму кількість інтерферону- α , як із 10 000 літрів донорської крові [4].

Таблиця 4.2 – Приклади рекомбінантних білків людини [4]

Рекомбінантний білок	Дія або застосування
Активатори плазміногена	Розчинення тромбів
α_1 -Антитрипсин	Лікування емфіземи легень
Гемоглобін	Лікування анемії
Глюкоцереб्रोзидаза	Лікування хвороби Гоше
Гормон росту людини	Стимулює зростання кісток
Ендорфіни, енкефаліни	Знеболювальна дія
Еритропоетин	Стимулює утворення еритроцитів
Епідермальний фактор росту (EFG)	Стимулює регенерацію пошкодженої шкіри
Інсулін	Лікування цукрового діабету
Інтерферони (α , β , γ)	Лікування вірусних захворювань
Моноклональні антитіла	Застосування в діагностиці, лікуванні раку, аутоімунних захворювань
Супероксиддисмутаза	Антиоксидант
Фактори згортання крові VII, VIII, IX	Лікування гемофілії
Фактор некрозу пухлин (TNF)	Лікування злоякісних захворювань
Фактор росту В-лімфоцитів, фактор активації макрофагів	Лікування імунних захворювань
Фактор росту нервів	Регенерація пошкодженої нервової тканини
Фактор росту тромбоцитів	Лікування атеросклерозу
Хоріонічний гонадотропін	Лікування жіночого безпліддя

Клітини мікроорганізмів мають обмежену здатність синтезувати біологічно активні білки людини, оскільки не

мають багато механізмів посттрансляційної модифікації поліпептидів. У зв'язку з цим для одержання рекомбінантних білків людини використовують трансгенні рослини і тварини або культури їхніх клітин.

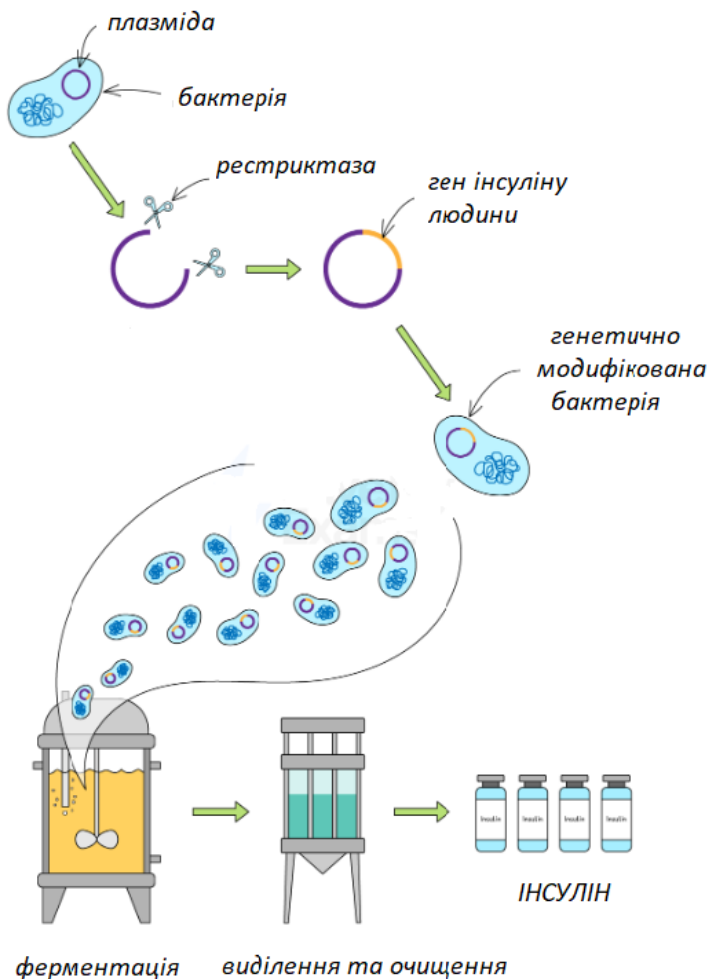


Рисунок 4.9 – Схема одержання інсуліну

На сьогодні трансгенні рослини є найбільш перспективними продуцентами рекомбінантних білків із позицій економічної ефективності й безпеки [11].

Біофармацевтичні препарати рослинного походження дешеві у виробництві і зберіганні, вони не містять вірусів чи пріонів, здатних уражати клітини людини, тому є цілком безпечними. Вартість виробництва рекомбінантних білків у рослинах може бути в 10–50 разів нижчою, ніж виробництво того ж самого білка за допомогою ферментації *Escherichia coli* [5].

У рослинних клітинах здійснюються процеси посттрансляційної модифікації білків, подібні до таких, що відбуваються у клітинах людини, тому синтезовані рекомбінантні білки мають високу біологічну активність та ефективність дії.

За допомогою трансгенних рослин одержують понад 100 рекомбінантних білків людини: колаген, альбумін, фактори згортання крові, антитіла, ферменти, гормони (інсулін, соматотропін, еритропоєтин, кальцитонін), фактори росту, цитокіни, інтерферони та ін.

У 2012 р. був комерціалізований перший фармацевтичний продукт на основі трансгенних рослин «Елелісо» Protalix Biotherapeutics Inc., що використовують для лікування хвороби Гоше. Молекулярною причиною захворювання є спадковий дефіцит ферменту глюкоцереброзидази. Для зменшення клінічних симптомів захворювання здійснюють ферментозамісну терапію. Як джерела глюкоцереброзидази використовували плаценту людини. Препарат глюкоцереброзидази був одним із найдорожчих у світі, оскільки для одного пацієнта із хворобою Гоше I типу необхідно було витратити 10–12 тонн плаценти на рік. Розроблення технології синтезу глюкоцереброзидази в генетично модифікованому тютюні суттєво знизила вартість одержання препарату і зробила його доступним для пацієнтів [5].

Використання системи тимчасової експресії трансгенів у рослинах дозволяє одержувати фармацевтичні спо-

луки у стислі терміни, що має важливе значення під час епідемій і пандемій.

На основі трансгенного тютюну створений фармацевтичний препарат ZMapp проти геморагічної лихоманки Ебола, спалахи якої були у 2014–2016 рр. у країнах Західної Африки та у 2018–2020 рр. у Конго. ZMapp являє собою комплекс із трьох моноклональних антитіл, що діє за допомогою нейтралізації вірусу, запобігаючи його проникненню в клітини. Розроблення технології виробництва ZMapp стала поштовхом для створення ще більш ефективних препаратів у боротьбі з Ебола, таких як PALM trial і REGN-EB3.

Під час пандемії COVID-19 на основі систем тимчасової експресії трансгенів у рослинах були одержані моноклональні антитіла й субодиничні вакцини проти SARS-CoV-2 [15]. Отже, застосування генетично модифікованих рослин для синтезу фармацевтичних сполук забезпечило можливість швидкого реагування медичної й фармацевтичної галузей на появу нових інфекцій.

Перспективним напрямом біофармацевтики є виробництво їстівних вакцин на основі овочів і фруктів [5]. Як продуценти антигенів використовують томати, картоплю, моркву, салат латук, яблука, банани та ін. Під час споживання сирих овочів і фруктів антигени потрапляють до організму людини, активуючи імунний захист. Сучасні методи генетичної інженерії рослин дозволяють створювати багатокomпонентні рослинні вакцини. Рослинні вакцини не містять патогенів, здатних інфікувати клітини людини. Результати наукових досліджень підтверджують можливість використання бананів для розроблення вакцин проти кору, поліомієліту, дифтерії, жовтої лихоманки й деяких типів вірусної діареї [14–15].

Розроблення і впровадження технологій синтезу фармацевтичних сполук у трансгенних рослинах відкриває нові можливості для забезпечення людства ефективними й доступними терапевтичними засобами.

СЛОВНИК ТЕРМІНІВ

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

Алель – одна із двох альтернативних структурних форм гена.

Ампліфікація – утворення додаткових копій нуклеотидних послідовностей ДНК.

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

Антигени – це молекули білків або полісахаридів, здатні спричиняти імунну відповідь, що виявляється в утворенні антитіл.

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

Антитіла (імуноглобуліни) – білки, які виробляє імунна система у відповідь на появу антигенів (чужорідних молекул).

Бактеріофаг – вірус, що інфікує бактерії.

Бактеріофаг λ – бактеріофаг E.coli, який широко використовується як вектор під час клонування ДНК.

Біобалістика (балістична трансфекція) – метод генетичної трансформації клітин унаслідок їхнього бомбардування мікрочастинками золота, на поверхні яких адсорбована рекомбінантна ДНК.

Вакцини – імунобіологічні препарати, які застосовують для активної імунізації людей і тварин.

Вектор – молекула ДНК, що використовується для перенесення генів від одного організму до іншого, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

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

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

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

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

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

Геном – сукупність усієї спадкової генетичної інформації організму.

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

Глікозилювання – ковалентне приєднання вуглеводного залишку до білкової молекули.

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

Дезоксирибоза – пентоза, що входить до складу ДНК.

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

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

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

ДНК-полімераза – фермент, що каталізує реплікацію ДНК.

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

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

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

Експресія генів – це реалізація інформації, задоволеної в послідовності нуклеотидів.

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

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

Енхансери – регуляторні ділянки гена, під час з'єднання з якими білкові фактори активують транскрипцію.

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

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

Індукція – посилення експресії генів.

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

Інтрон – неінформативна ділянка гена еукаріот (некодує послідовність).

Інтерферони – це білки, що синтезуються у відповідь на вірусну інфекцію й забезпечують неспецифічний проти-вірусний імунітет.

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

Клонування генів – система методів, яку використовують для одержання клонованих ДНК: виділення необхідного гена, включення його в плазмід (вектор), введення в клітину організму-хазяїна, багатократна реплікація.

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

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

Ліпофекція – введення рекомбінантної ДНК до клітини за допомогою ліпосом.

«Липкі» кінці – взаємно комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, утворювані під час розриву дволанцюгових ДНК за участі рестриктаз.

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

Метилювання – приєднання до молекули метильної групи.

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

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

Мутагени – фактори, що підвищують частоту виникнення мутацій.

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

Нуклеозид – сполука, що складається з азотистої основи й пентози.

Нуклеїнові кислоти – це біополімери, побудовані з мононуклеотидів.

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

Оперон – група генів, що контролюється одним промотором.

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

Плавлення ДНК – термічна денатурація ДНК.

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

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

Посттрансляційна модифікація – зміна структури білкових молекул після завершення їхнього синтезу.

Праймер – короткий олігорибонуклеотид, з якого починається синтез ДНК.

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

Процесинг – сукупність процесів утворення зрілих молекул РНК у клітині.

Рекомбінантна ДНК – молекула ДНК, утворена за умови сполучення генів у новій комбінації. Створюється *in vitro* за допомогою об'єднання фрагментів ДНК різних організмів.

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

Рекомбінантні вакцини – вакцини, одержані на основі технології рекомбінантної ДНК.

Ренатурація ДНК – процес відновлення нативної структури денатурованої ДНК.

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

Реплікація – процес самоподвоєння ДНК.

Репресія – пригнічення транскрипції або трансляції.

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

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

Рибоза – пентоза, що входить до складу РНК.

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

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

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

Сайленсери – регуляторні ділянки ДНК, під час з'єднання з якими білкові фактори пригнічують транскрипцію.

Секвенування – визначення нуклеотидної послідовності ДНК і РНК.

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

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

Теломераза – фермент, що каталізує добуудовування теломерної ДНК.

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

Транскрипція – процес синтезу РНК на матриці ДНК.

Трансляція – процес синтезу білків на основі мРНК.

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

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

Ферменти – біологічні каталізатори білкової природи.

Фолдинг – процес набування білком просторової структури.

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

Цистрон – ген, що контролює одну функцію.

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біохімія нуклеїнових кислот : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, Д. М. Гребіник. – Київ : Київський університет, 2013. – 290 с.
2. Генетика : підручник / А. В. Сиволоб, С. Р. Рушковський, С. С. Кир'яченко та ін. ; за ред. А. В. Сиволоба. – Київ : Київський університет, 2008. – 320 с.
3. Досягнення і проблеми післягеномної ери / Д. С. Вигнан, О. Д. Оліярник // Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького. – 2013. – Т. 15, № 3 (57). – С. 3–9.
4. Іншина Н. М. Біотехнологія : навч. посіб. / Н. М. Іншина. – Суми : СумДПУ ім. А. С. Макаренка, 2011. – 172 с.
5. Іншина Н. М. Інноваційні технології синтезу фармацевтичних сполук у трансгенних рослинах // Scientific Progress & Innovations. – 2025. – No 28 (2). – С. 126–130. Режим доступу : <https://doi.org/10.31210/spi2025.28.02.19>.
6. Молекулярна біологія : підручник / А. В. Сиволоб. – Київ : Київський університет, 2008. – 384 с.
7. Молекулярна біологія : підручник / Андрій Сиволоб. – 2-ге вид., перероб. і доп. – Київ : Київський університет, 2023. – 511 с.
8. Регуляція експресії генів : презентація лекції для студентів / Н. В. Заїчко. – Вінниця : ВНМУ ім. М. І. Пирогова, 2017. (На правах рукопису). – Режим доступу : <https://dspase.vnmu.edu.ua/123456789/2214>.
9. Реплікація, транскрипція, трансляція : презентація лекції для студентів / Н. В. Заїчко. – Вінниця : ВНМУ ім. М. І. Пирогова, 2017. – На правах рукопису. – Режим доступу : <https://dspase.vnmu.edu.ua/123456789/2159>.
10. DNA replication and recombination / B. Alberts // Nature. – 2003. – Vol. 421. – P. 431–435.
11. Eidenberger, L., Kogelmann, B., & Steinkellner, H. (2023). Plant-based biopharmaceutical engineering. *Nature*

Reviews Bioengineering, 1, 1–14. – Режим доступа : <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00044-6>.

12. Glick B. R., Patten C. L. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. – 6 th ed. – John Wiley & Sons, 2022. – 877 p.

13. Prions, prionoids and protein misfolding disorders / C. Scheckel, A. Aguzzi // *Nature Reviews Genetics*. – 2018. – Vol. 19. – P. 405–418.

14. Stander, J., Mbewana, S., & Meyers, A. E. (2022). Plant-Derived Human Vaccines: Recent Developments. *BioDrugs*, 36. – Режим доступа : <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00544-8>.

15. Su, H., A. van Eerde, E. Rimstad, Bock, R., N. Branza-Nichita, Yakovlev, I., & J. L. Clarke. (2023). Plant-made vaccines against viral diseases in humans and farm animals. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1170815. – Режим доступа : <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1170815>.

16. The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome // *Nature*. – 2012. – Vol. 489. – P. 57–74.

Електронне навчальне видання

Іншина Наталія Миколаївна

ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Навчальний посібник

Видання друге, доповнене

Редакторка І. О. Кругляк
Комп'ютерне верстання Н. М. Іншиної

Формат 60х84/16. Ум. друк. арк. 7,20. Обл.-вид. арк. 6,68.

Видавець і виготовлювач
Сумський державний університет,
вул. Харківська, 116, м. Суми, 40007

Свідоцтво про внесення суб'єкта господарювання до Державного реєстру видавців,
виготовлювачів і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 8193 від 15.10.2024.