

Ніжинський державний університет
імені Миколи Гоголя

**Кучменко О. Б.,
Марченкова А. І.**

МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ КЛІТИНИ

Навчальний посібник

Ніжин
2021

УДК 576.32/.32(075.8)

К96

Рекомендовано Вченою радою
Ніжинського державного університету імені Миколи Гоголя
(НДУ ім. М. Гоголя)
Протокол № 16 від 30.06.2021 р.

Рецензенти:

Калінін І. В. – завідувач кафедри хімії Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова, доктор біологічних наук, професор;

Гавій В. М. – доцент кафедри біології Ніжинського державного університету імені Миколи Гоголя, кандидат біологічних наук

Кучменко О. Б., Марченкова А. І.

К96 Молекулярна біологія клітини: навч. посіб. Ніжин: НДУ ім. М. Гоголя, 2021. 135 с.

Мета навчального посібника забезпечити студентів теоретичним матеріалом для засвоєння молекулярної біології клітини. Даний посібник допоможе засвоїти, самостійно опанувати, систематизувати та узагальнити знання з актуальних і базових розділів молекулярної біології: реплікація ДНК, репарація ДНК, транскрипція, трансляція, фолдинг білка тощо. Посібник також містить завдання для самоконтролю знань. Призначений для студентів біологічних та медичних спеціальностей, для вчителів біології, а також може бути корисним для студентів коледжів, учнів гімназій та ліцеїв.

УДК 576.32/.32(075.8)

© Кучменко О. Б., Марченкова А. І., 2021

© НДУ ім. М. Гоголя, 2021

ЗМІСТ

Вступ	4
1. Хімічна еволюція і біохімічна універсальність	5
2. Структура і властивості нуклеїнових кислот.....	9
3. Структура і властивості білків.....	22
4. Структура та функції інтерфазного ядра	27
5. Реплікація ДНК	33
6. Метилування ДНК	45
7. Репарація пошкоджень ДНК	46
8. Експресія генів і транскрипційні фактори	51
8.1. Організація генетичного матеріалу у прокаріотів та еукаріотів....	51
8.2. Спосіб запису генетичної інформації.....	57
8.3. Транскрипційні фактори і репресори.....	58
8.4. Типи РНК. Їх структура і функції.....	61
8.5. Загальна характеристика та механізм транскрипції ДНК.....	66
8.6. Дозрівання (процесінг) РНК – видалення, приєднання і модифікація тих чи інших, або нових нуклеотидів.....	72
8.7. РНК-синтезна активність вірусів.....	77
8.8. Полінуклеотидфосфорилаза.....	79
8.9. Розпад мРНК.....	79
9. Трансляція мРНК.....	82
9.1. Механізми трансляції мРНК.....	82
9.2. Полісоми.....	90
9.3. Особливості трансляції у прокаріотів і в мітохондріях.....	91
9.4. Інгібітори трансляції.....	92
10. Фолдинг білка.....	94
11. Сортування та модифікація білків.....	98
12. Розпад білків.....	102
13. Епігенетика.....	105
Тестові завдання для самоконтролю знань.....	112
Завдання для самоконтролю знань.....	120
Література.....	135

ВСТУП

Метою навчального посібника є забезпечення студентів новітнім інформаційним матеріалом з теоретичного курсу молекулярної біології клітини. У максимально доступній формі розглядається ряд фундаментальних питань, зокрема поведінка біомолекул у просторі, основні властивості й прояви життя на молекулярному рівні, структурно-функціональна організація генетичного апарату клітин, механізми реалізації спадкової інформації, молекулярні механізми взаємодії вірусів з клітинами тощо.

Навчальний посібник укладено відповідно до навчальної програми курсу «Молекулярна біологія клітини». В результаті опанування навчального курсу у здобувачів вищої освіти розвиватимуться, зокрема, здатність до засвоєння базових уявлень про молекулярні основи життєдіяльності клітини; опанування теоретичних і практичних знань відносно поведінки біомолекул у просторі, основних властивостей й проявів життя на молекулярному рівні, структурно-функціональної організації генетичного апарату клітин, механізмів реалізації спадкової інформації, молекулярних механізмів взаємодії вірусів з клітинами; здатність використовувати основні методи молекулярної біології; здатність поставити й розв'язати проблему з молекулярної біології; здатність застосовувати теоретичні знання для узагальнення, систематизації, прогнозування; вміння користуватися різними джерелами інформації та оцінювати достовірність біологічної інформації.

Даний навчальний посібник містить різноманітні завдання для самоконтролю знань з найважливіших тем курсу.

Навчально посібник є не тільки гарним доповненням на лекційних заняттях, але й посібником при самостійному вивченні основних положень молекулярної біології клітини.

Навчальний посібник адресовано студентам біологічних та медичних спеціальностей, вчителям біології, а також студентам коледжів, учням гімназій та ліцеїв.

1. Хімічна еволюція і біохімічна універсальність

В основі пристосування і вдосконалення організмів лежали: хімічна еволюція, відбір атомів, молекул і структур, які відповідали вимогам функціонування біологічних систем.

Тому з багатьох атомів періодичної системи елементів і багатьох різних молекул в процесі еволюції були відібрані тільки ті, які за своєю електронною структурою, фізичними і хімічними властивостями відповідали виконанню біологічними структурами специфічних функцій.

В ході хімічної еволюції йшов відбір не тільки елементів, але і окремих хімічних сполук.

Вода відповідає всім вимогам універсального дисперсного середовища в біологічній системі. Це пояснюється особливостями електронної структури, фізико-хімічними властивостями H_2O .

Із відомих 150 амінокислот були відібрані тільки 20, які входять до складу білка. Всі вони є *α -амінокислотами*.

З багатьох основ та їх похідних були відібрані тільки *аденін, гуанін, цитозин, тимін і урацил*, а з 70 цукрів – *α -D-глюкоза*.

В процесі хімічної еволюції йшов *відбір сполук, вдосконалення і ускладнення структури їх молекул*, що призвело до більш ефективного протікання того чи іншого процесу, або виконання певної функції.

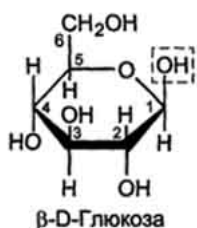
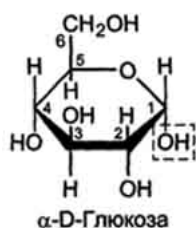
Еволюція *каталізатора розкладу перекису водню*. Перекис водню може розкладатися *3-х валентним Fe*. Коли іон Fe входить до складу *гему*, який складається з *тетрапірольного ядра*, швидкість розкладу перекису водню цією більш складною сполукою зростає на *три порядки*. Але якщо *гем з'єднаний з білком* і є складовою частиною каталази, то константа швидкості каталітичної реакції зростає приблизно ще на *сім порядків*.

Отже, *еволюція біокаталізатора розкладу перекису водню* йшла в напрямку зміни його структури, спрямованої на *підвищення ефективності реакції*.

Молекули, які відбираються в процесі еволюції, повинні мати певну *форму і розмір*, що визначає їх взаємодію на основі структурної відповідності і комплементарності.

Форма і розмір молекул дозволяють взаємодію між простими *низькомолекулярними* сполуками при утворенні полімерів, *макромолекул*, різноманітних органотидів клітини і т. д.

Які фактори визначають відбір молекул? Чому, наприклад, серед багатьох існуючих простих цукрів вибір пав не на 5-, а на 6-вуглецеві цукри, а серед них на *α -D-глюкозу*?



В клітині цей моносахарид є основним джерелом енергії, по тій причині, що цукри взагалі добре розчиняються в воді і відповідають внутрішньоклітинному дисперсному середовищу. Ці сполуки легко

піддаються активації, розщепленню і окисленню. І в результаті вивільняється велика кількість енергії для реакцій обміну речовин.

Крім того, з 6-вуглецевого цукру утворюються 2-х- і 3-х-вуглецеві сполуки, які є дуже важливими *проміжними продуктами*.

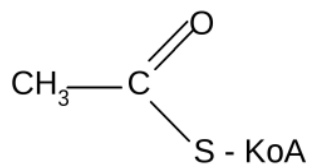
α -D-глюкоза зазвичай зустрічаються в α -формі, але в результаті реакції *мутаротації* перетворюється в δ -форму. *Розпізнавання α - і δ -форм D-глюкози* (має різне положення ОН-групи по відношенню до площини кільця її молекул) можливе лише *на основі специфічності ферментативної реакції*.

Вважають, що *вибір α -D-глюкози був вирішений в еволюції ферментної системи, яка легше окислювала саме цю форму цукру*. Основною відмінністю α -D-глюкози, яка вирішила відбір її в процесі хімічної еволюції, є більш висока стабільність молекули в порівнянні з іншими 6-вуглецевими цукрами. У молекули D-глюкози великі групи мають екваторіальну орієнтацію на відміну від інших 6-вуглецевих цукрів.

В еволюції велике значення мали розмір і форма молекул. Відомо, що між субстратом і активним центром ферменту повинна бути комплементарна відповідність – це основа високої специфічності каталізатора. *Якщо відбудеться зміна форми і розміру молекули навіть на долю ангстрема*, то вона більше не може виступати в ролі субстрату.

Також в живих системах існує *ієрархія молекулярних взаємовідносин*, заснованих на суворій відповідності форми і розміру молекул. Форма і розмір малих молекул повинні відповідати розмірності макромолекули, розмір і форма останніх – формі і розмірності надмолекулярних комплексів і т. д.

Отже, для виконання *відповідної функції* в клітині йшов відбір молекул з певною структурою. Це очевидно на прикладі *кофермента А (КоА-SH)*,



основною функцією якого є перенос ацетильної групи. Активним центром коферменту А є *сульфгідрильна група*. Між сульфгідрильною групою і залишком кислоти утворюється *високореакційноактивний ефір*. Відомо, що для синтезу жирних кислот більш за все підходить оцтова кислота. Еволюційний відбір пішов далі, в напрямку утворення складного ефіру *ацетил-коферменту А*. При цьому виник багатий на енергію хімічний зв'язок між атомом S коферменту А і вуглецем карбоксильної групи оцтової кислоти. Відомо, що *кофермент А виконує свою функцію* за допомогою *тіолової групи (-SH)*. Але багато сполук, в тому числі і *білки*, також містять в своєму складі цю групу, хоча і не можуть виконувати функцію переносу ацетильних залишків.

Щоб стати біологічно активною, молекула повинна володіти відповідною структурою, яка дозволяє їй виконувати певну функцію. Цей принцип діяв і при відборі інших речовин, зокрема жирних кислот. З різноманіття жирних кислот були відібрані ті, які мають в своєму *вуглецевому ланцюзі від 16 до 18 атомів вуглецю*.

Отже, в процесі хімічної еволюції йшов відбір тільки тих молекул, які відповідають *виконанню необхідних функцій*. В результаті сформувалася *біохімічна універсальність* – коли величезна кількість протікаючих в клітині

реакції здійснюється за допомогою невеликого числа універсальних атомів, молекул.

Вся велика кількість реакцій (окислення-відновлення, переносу хімічних груп, гідролітичного розщеплення зв'язків і т. д.) під час багатоступінчатих процесів здійснюється за допомогою невеликого числа універсальних кофакторів і простетичних груп: НАД, НАДФ, ФМН, ФАД, КоА-SH, біотина, тямінпірофосфата, рибофлавіна, гема, піридоксина, АТФ, фолієвої кислоти, убіхінона та інших.

В клітині міститься величезна кількість різних нуклеїнових кислот, полісахаридів, жирів, білків, але всі вони складаються з 4-х нуклеотидів, 20 амінокислот, D-рибози, D-глюкози, гліцерину, холіну, жирної кислоти. Ці сполуки були відібрані не тільки тому, що вони підходили за своєю структурою і фізико-хімічним властивостям, а і тому, що вони здатні до взаємних перетворень. Наприклад, з D-глюкози може утворитися амінокислота, оцтова кислота, гліцерин, жирна кислота.

Реакції в живій клітині здійснюються за допомогою невеликого числа функціональних груп, універсальних для того чи іншого класу сполук.

Участь всіх вуглеводнів здійснюється за допомогою загальної для всіх них функціональної групи $-CH_3$, карбонових кислот – $-COOH$, амінокислот – $-COOH$ і $-NH_2$, вуглеводів – $-COH$, спиртів – $-CH_2OH$, амінів – $-CH_2NH_2$ і т. д.

Всі речовини клітини, можливо, за невеликим виключенням, вступають у взаємодію з іншими сполуками за допомогою всього 10 різних аліфатичних функціональних груп. Всі функціональні групи можуть бути розділені на аліфатичні і ароматичні. Ароматичні сполуки відрізняються більш низькою теплоотою згорання в порівнянні з аліфатичними.

Цілісність молекул підтримується завдяки хімічним зв'язкам. Вони також забезпечують взаємодію різних молекул.

Ковалентний (хімічний) зв'язок – зв'язок, в основі якого лежить узагальнення електронів двох атомів.

Електростатичний (хімічний) зв'язок – взаємодії між двома зарядженими молекулами чи атомами.

Водневий зв'язок – зв'язок між атомом Гідрогену однієї молекули, який ковалентно зв'язаний із електронегативним атомом (N, O, P) та електронегативним атомом іншої молекули.

Ван-дер-ваальсові взаємодії – взаємодії між будь-якими молекулами чи хімічними групами, які виникають на близьких відстанях між ними (енергія взаємодії знижується з відстанню між молекулами r пропорційно $1/r^6$).

Гідрофобні взаємодії – взаємодії, що виникають при зануренні гідрофобних молекул або хімічних груп у полярне середовище, а також при зануренні гідрофільних груп у неполярне середовище.

В процесі хімічної еволюції живі організми набули біохімічну універсальність і в результаті відбору макромолекул.

Носієм генетичної інформації, як правило, є ДНК, в якому тексти інформації складаються з мільйонів пуринових і піримідинових основ в прокаріотичній клітині і з мільярду цих основ в клітині вищих еукаріотів. В

триpletній послідовності цих основ закладена інформація синтезу близько 10 тис. *різноманітних білків*.

Це очевидна біохімічна універсальність в передачі генетичної інформації, біосинтезі білку, а також процесах клітинного розподілу.

В живій клітині нараховується приблизно 40 млн. великих і малих молекул, які приймають участь, приблизно, в 3-х – 4-х тис. хімічних реакцій. Але якщо до цих тисяч реакцій застосувати принцип універсальності, то виявиться, що всі вони у клітин різної складності структурної організації об'єднані в метаболічні цикли.

Відомо, що живі системи відрізняються:

- 1) адекватною і швидкою відповідною реакцією;
- 2) пристосованістю до зовнішніх впливів;
- 3) високими коефіцієнтами використання енергії;
- 4) економністю у витраті різноманітних речовин;
- 5) закономірністю і суворою послідовністю в часі і просторі процесів поділу клітин, росту, диференціації, формоутворення, які лежать в основі індивідуального розвитку.

Все це вказує на наявність в організмах суворої регуляції. В результаті хімічної еволюції виробилася універсальність і в принципах регуляторних механізмів регуляції в клітині. Регуляція метаболізму здійснюється декількома загальними, універсальними для всіх організмів шляхами: *індукцією і репресією синтезу білків-ферментів, зміною їх активності за принципом зворотного зв'язку, алостеричною регуляцією, доступністю субстратів і коферментів*.

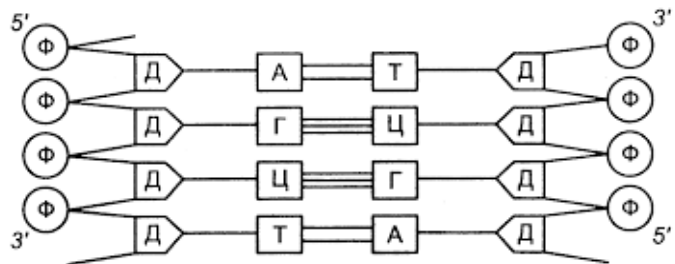
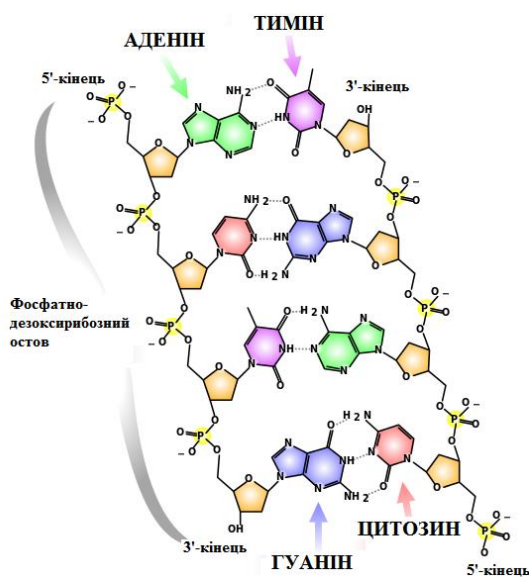
2. Структура і властивості нуклеїнових кислот

Історія відкриття нуклеїнових кислот починається з 1869 року, коли молодий швейцарський лікар Ф. Мішер в Німеччині вивчав хімічний склад клітин тварин. В якості матеріалу він обрав лейкоцити, яких було багато у гною. В процесі роботи він зрозумів, що крім білків в лейкоцитах присутня невідома речовина, яка мітилась в ядрах клітин. Ф. Мішер назвав цю речовину нуклеїном (від лат. nucleus – ядро). Пізніше було встановлено, що бактеріальні клітини, в яких немає ядра, теж містять нуклеїнові кислоти. В результаті експериментів Ф. Гриффіта, а також О. Евері, К. Маклеода і М. Маккарті з трансформації бактерій (1944 р.) було зроблено висновок, що **тільки ДНК визначає спадкові властивості організму**.

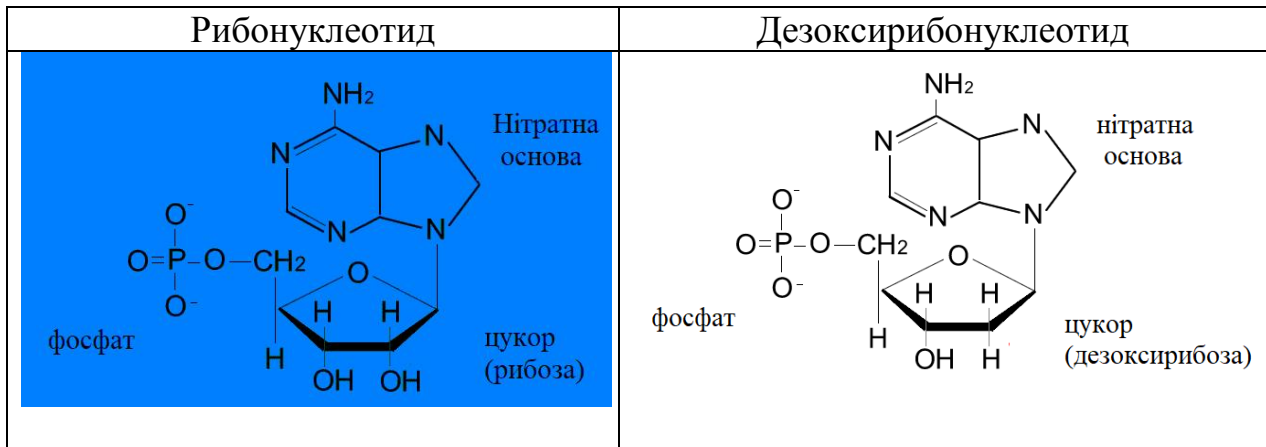
Загальна довжина усіх молекул ДНК в ядрі клітини людини ~ 190 см. Ці молекули в кожній хромосомі відрізняються; довжина складає в середньому 4 см.

Нуклеїнові кислоти – це біологічні полімери, які утворені залишками нуклеотидів.

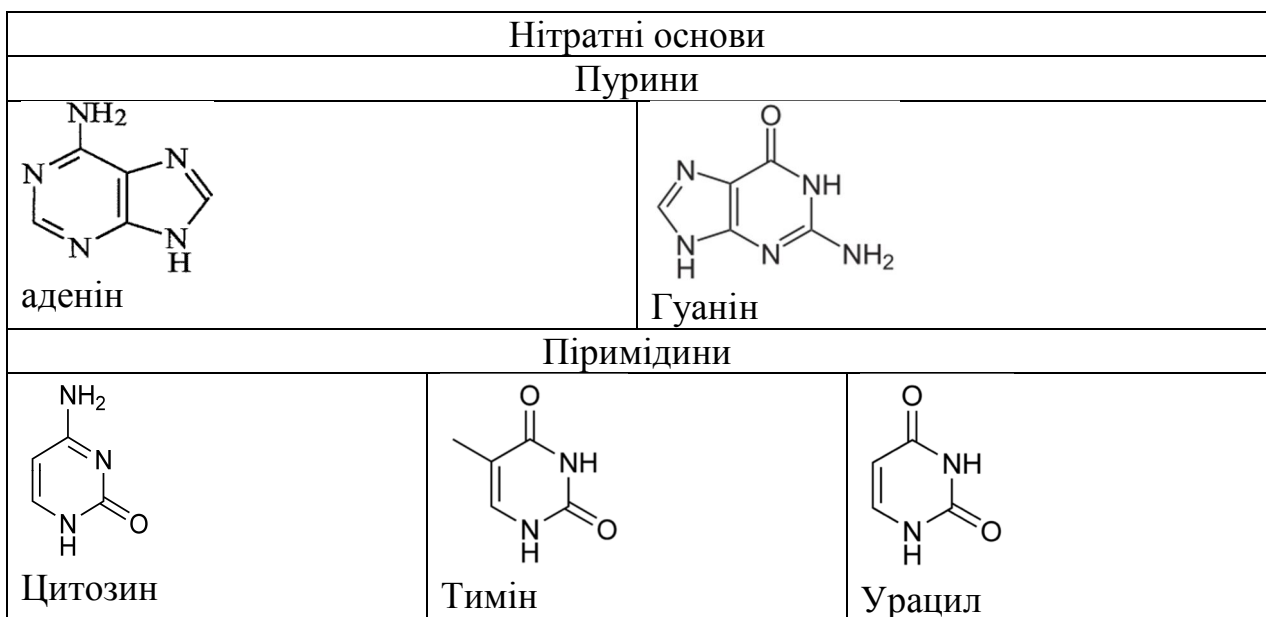
Існує два види нуклеїнових кислот – ДНК і РНК, які присутні в клітинах всіх живих організмів та виконують функції зберігання, передачі та реалізації спадкової інформації.



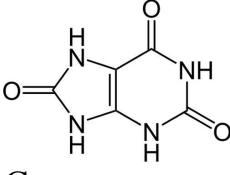
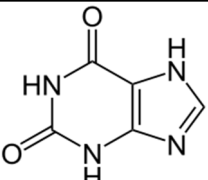
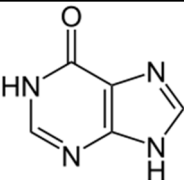
Молекула ДНК утворюється залишками нуклеотидів, які складаються із залишку нітратної основи, пентози і фосфатної кислоти. Залишок нітратної основи і пентози зв'язується N-глікозидним зв'язком.



Скорочення	Нітратна основа	Нуклеозид
A	Аденін	Аденозин
G	Гуанін	Гуанозин
T	Тимін	Тимідин
C	Цитозин	Цитидин
U	Урацил	Уридин

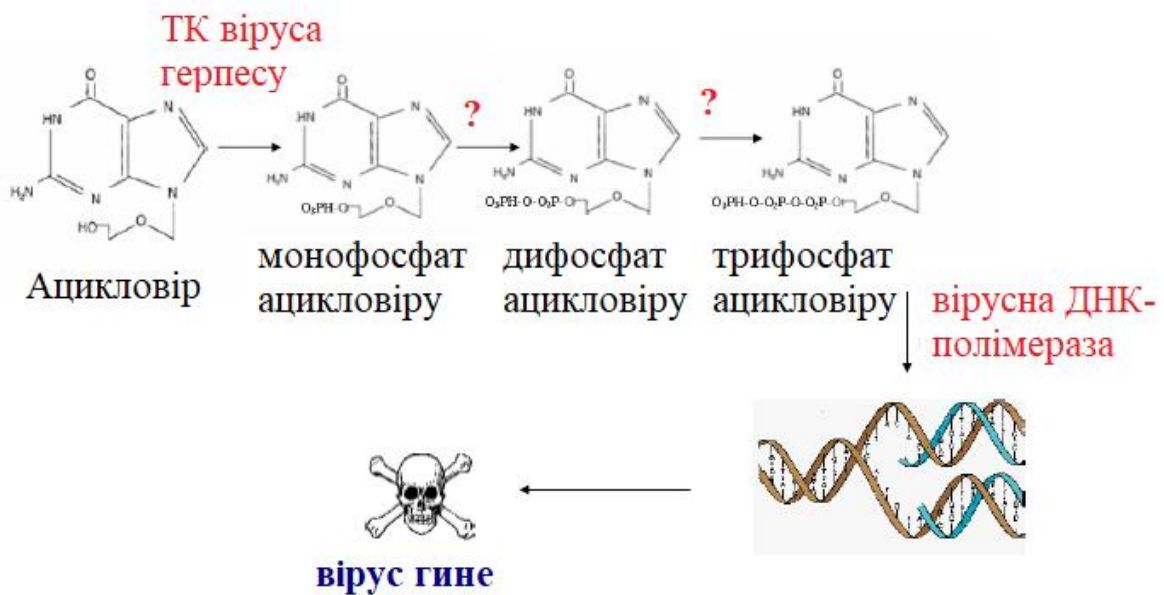


Чому в ДНК тимін, а в РНК урацил? Синтез урацилу енергетично вигідніший, ніж тиміну, так як не потрібно робити зайве метилювання. Це опосередковано підтверджує гіпотезу світу РНК про те, що первинними нуклеїновими кислотами були РНК. При частому спонтанному дезамінуванні цитозину в клітині він перетворюється на урацил. Якщо б у складі ДНК був би урацил, то відрізнити його від урацилу, який утворився із цитозину, було б неможливо. Це могло б призвести до неможливості репарації, і, як наслідок, до інтенсивного накопичення мутацій.

Деякі мінорні нітратні основи, які не входять до складу нуклеїнових кислот		
 <p>Кофеїн (1,3,7-триметилксантин)</p>	 <p>Теобромін</p>	 <p>Сечова кислота</p>
 <p>Ксантин</p>	 <p>Гіпоксантин (входить до складу тРНК)</p>	

Штучні нуклеотиди можуть використовуватись як антибактеріальні речовини, оскільки штучна пара реплікується бактеріальною ДНК-полімеразою і не видаляється в процесі репарації.

В якості лікарських засобів можуть використовуватись модифіковані нуклеозиди. Зокрема, це досить розповсюджений протигерпетичний лікарський засіб ацикловір. Проте слід пам'ятати, що цей засіб не виліковує, а тільки зменшує симптоми хвороби!



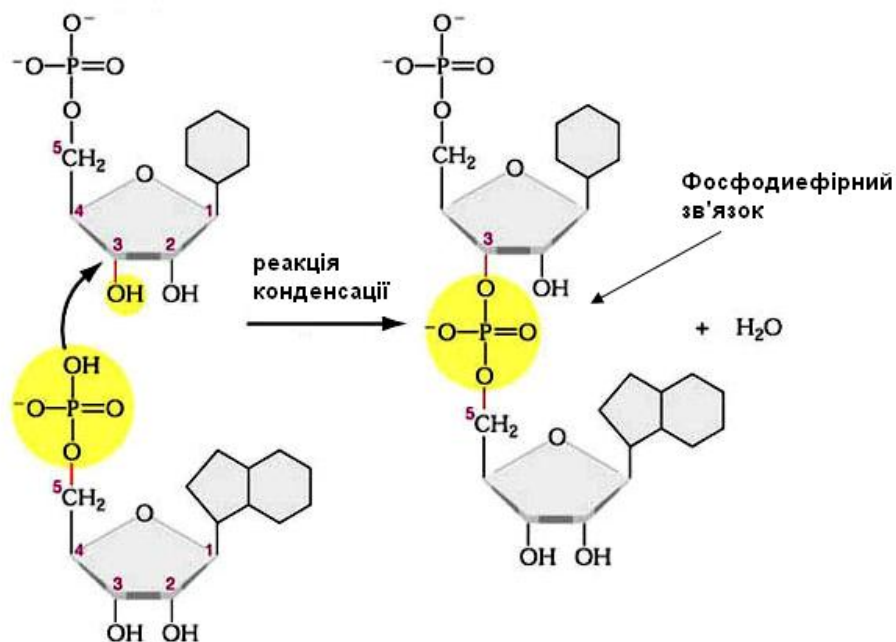
Іншим прикладом модифікованих нуклеозидів є протипухлинний засіб 5-фторурацил. Механізм його дії полягає в наступному: тимідилатсинтетаза каталізує перетворення дезоксиуридина монофосфата на дезокситимідин монофосфат, який є єдиним джерелом синтезу тимідину, початковим попередником для реплікації ДНК. Активні метаболіти 5-фторурацилу – FdUMP, FUTP і FdUTP відповідальні за протипухлинний ефект препарату: FdUMP зв'язується з тимідилатсинтетазою і перешкоджає синтезу тимідин

трифосфата, FdUTP інкорпорується в ДНК та призводить до її розривів, FUTP інкорпорується в РНК і викликає порушення її стабільності і функції.

Два полінуклеотидних ланцюги ДНК утримуються за допомогою водневих зв'язків, які формуються між нітратними основами, за принципом комплементарності.

Правила Чаргаффа	
Кількість аденіну дорівнює кількості тиміну, а гуаніна – цитозину:	A=T, G=Ц
Кількість пуринів дорівнює кількості піримідинів:	A+G=T+Ц
Кількість основ з аміногрупами в положенні б дорівнює кількості основ з кетогрупами в положенні б:	A+Ц=G+T
Співвідношення кількості гуаніну і цитозину до кількості аденіну і тиміну в ДНК є постійним для кожного виду живих організмів:	(G+Ц)/(A+T)=K (K - коефіцієнт специфічності)

В ланцюзі ДНК нуклеотиди зв'язуються за допомогою фосфодієфірного зв'язку. Послідовність нуклеотидів в ланцюзі ДНК або РНК формує їх *первинну структуру*.



Принципове значення для реакцій, що відбуваються на ДНК, має значення *полярність ланцюгів*.

Ланцюги в молекулі ДНК – *антипаралельні*.

(5') ... АТТГА ... (3')

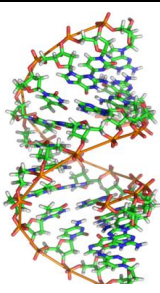
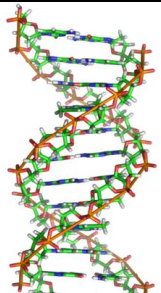

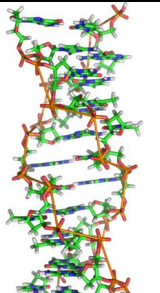
(3') ... ТААЦТ ... (5')

У подвійної спіралі на 1 виток → 10 нуклеотидних пар, між послідовними нуклеотидами → 0,34 нм, діаметр – 2 нм.

Вторинна структура ДНК (подвійна спіраль) визначається наступними типами взаємодій:

- водневими зв'язками між комплементарними основами (два між А і Т, три – між Г і Ц);
- стекінг-взаємодіями – нековалентними взаємодіями між органічними сполуками, що містять ароматичні компоненти; в ДНК паралельний стекінг має місце між сусідніми парами нуклеотидів і підвищує стабільність молекулярної структури.

Сила комплементарних взаємодій основ в ДНК: пурин-пурин > піримідин-пурин > піримідин-піримідин.

Форми ДНК				
				
	A-форма	B-форма	C-форма	Z-форма
Спіраль	вправо-закручена	вправо-закручена	вправо-закручена	вліво-закручена
п.н. на оберт	10,7	10,4	9,3	12
діаметр	25,5Å	23,7Å		18,4Å
обертання/ п.н.	33,6	35,9	38,7	60,2
нахил п.н. до вісі	+19	-1,2		-9
	форма ДНК-РНК гібридів	основний стан ДНК, продемонстрований на кристалах і у водних розчинах	структура подібна до В-форми; форма існує при зниженій концентрації Na і вологості 44-66%, якщо GC=31-72%	Переходу В-форми в Z-форму сприяє наявність GC-5' послідовності, що є місцем метилювання у організмів. Z-форма ідентифікована в між-дисках політенних хромосом <i>D. melanogaster</i>

Будова і види РНК	
Будова	<ul style="list-style-type: none"> - складається з рибонуклеотидів; - містить урацил замість тиміну; - одноланцюгові молекули (як правило); - вміст варіює.
mРНК	<ul style="list-style-type: none"> - 80-100 нуклеотидів, - 10% всієї РНК клітини, - функція – переніс амінокислоти до місця синтезу білку.
rРНК	<ul style="list-style-type: none"> - 3-5 т.п.н., - 90% всієї РНК клітини, - функція – входять до складу рибосоми, синтез білку.
iРНК або мРНК	<ul style="list-style-type: none"> - 1-100 т.п.н., - 0,5-1% всієї РНК клітини, - функція – переніс інформації про структуру білка від ДНК до місця синтезу білка.
Геномна РНК	Деякі віруси мають РНК-геноми

Нуклеїнові кислоти можуть мати каталітичні властивості. РНК з каталітичними функціями називають *рибозимами*. Наявність *дезоксирибозимів* було вперше експериментально продемонстровано в 1994 році. На сьогодні описано велику кількість різних каталітичних молекул ДНК, які здатні розщеплювати, лігувати, фосфорилувати, депуринізувати молекули ДНК, метилувати порфірини, розщеплювати і лігувати молекули РНК. Також продемонстровано можливість використання *in vivo* дезоксирибозимів, що розщеплюють РНК, для пригнічення експресії генів з орієнтуванням на майбутній прикладний потенціал.

Властивості нуклеїнових кислот. ДНК і РНК є слабкими кислотами. Молекули нуклеїнових кислот містять багато від'ємно заряджених фосфатних груп і утворюють комплекси з іонами металів, їх калієва і натрієва сіль добре розчиняється у воді. Наявність 2'-гідроксила робить РНК вразливою до лужного і кислотного гідролізу. Концентровані розчини нуклеїнових кислот дуже в'язкі та злегка опалесцирують, а в твердому стані ці речовини білі. Нуклеїнові кислоти інтенсивно поглинають ультрафіолетове світло, і ця властивість лежить в основі методу визначення їх концентрації. З цією властивістю і пов'язують мутагенний ефект ультрафіолетового світла.

Денатурація або плавлення – розходження ланцюгів ДНК при нагріванні ДНК або при зростанні рН за рахунок руйнування слабких водневих зв'язків і площинних взаємодій між основами. На процес денатурації також впливають іони одно- і двохвалентних металів, білки, які нейтралізують від'ємні заряди фосфатних груп. Температура плавлення GC вища, ніж AT. Денатурація – процес зворотний, наступне відновлення двохланцюгової структури ДНК може відбуватись навіть при повному розходженні ланцюгів. Процес відновлення називається *ренатурацією*, *реасоціацією* або *віджигом* та відбувається при зниженні температури або рН. При різкому зниженні температури або рН

правильне з'єднання комплементарних ланцюгів утруднюється із-за спарювання основ локально комплементарних ділянок в межах однієї або різних ланцюгів. При ренатурації спочатку з'єднуються ділянки ланцюгів з повторною ДНК, а потім з унікальними ділянками. Якщо разом віджигают одноланцюгові ДНК, які походять від різних джерел, то формування двохланцюгової структури ДНК називають *гібридизацією*.

Метод виділення ДНК. Клітини, які попередньо включали ^3H -тимідин в ДНК, лізували в сумішах детергентів, солей і протеолітичних ферментів в спеціально замкнутих камерах, стінки яких зроблені з міліпорових фільтрів. Після того, як пройшов процес лізису, вміст камер осаджують на цих фільтрах, при цьому тільки молекули ДНК із-за великої довжини застрявали і залишались на поверхні фільтрів. Потім висушені фільтри покривались фотоемульсією, експонувались і проявлялись, розглядалися в світловий мікроскоп.

Зерна відновленого срібла дозволяли бачити конфігурацію і довжину молекул ДНК. За цими *ауторадіографічними картинами* було доведено, що молекула ДНК *E. coli* – кільцева гігантська молекула довжиною $\sim 1,2$ мм, мол. масою $2,8 \cdot 10^9$.

Основними методами вивчення нуклеїнових кислот є *електрофорез, рестрикційний аналіз і секвенування*.

Електрофорез – метод розподілу молекул заснований на здатності заряджений молекул рухатись в електричному полі. Молекули ДНК наносять у спеціально приготувану пластинку гелю – застиглий розчин агарози. При полімеризації ця речовина утворює просторову сітку з комірками, розмір яких залежить від концентрації агарози. При пропусканні через гель електричного струму негативно заряджена ДНК рухається в напрямку до аноду, долаючи опір агарози і ніби «протискаючись» у комірки гелю. Чим менша молекулярна вага фрагменту ДНК, тим швидше за певний час він подолає певну відстань. Таким чином, в залежності від розміру фрагменти ДНК розділяються на смуги: великі залишаються неподалік від місця нанесення зразка (старту), менші – віддаляються від нього по мірі зменшення їх розміру. Для візуалізації смуг використовують різні барвники (найчастіше – флуоресцентний барвник бромистий етидій).

Рестрикційний аналіз – дослідження структури ДНК за допомогою рестрикційних ендонуклеаз.

Рестриктази – це ферменти, які здатні руйнувати фосфодієфірні зв'язки у молекулі ДНК у чітко визначених послідовностях (сайтах рестрикції).

Секвенування – визначення послідовності нуклеїнової кислоти. Основним принципом методу є отримання чотирьох наборів мічених фрагментів ДНК.

Порівнюючи кількість ДНК на клітину у еукаріотичних організмів, спостерігається кореляція між ступенем складності організму і кількістю ДНК на ядро. У деяких амфібій в ядрах кількість ДНК більша, ніж в ядрах людини в 10-30 разів, хоч генетична конструкція людини незрівнянно складніша.

Можна припустити, що «збиткова» кількість ДНК у більш низькоорганізованих організмів або не пов'язана з виконанням генетичної ролі або число генів повторюється декілька разів.

Розмір геному людини $3,2 \cdot 10^9$ н.п., із нього тільки біля 1,5% геному кодує білки. А що робить вся інша частина геному? Показано, що із зростанням еволюційної складності організму зростає частина ДНК, яка не кодує білки.

ДНК еукаріотичних клітин гетерогенна за складом, містить декілька класів послідовностей нуклеотидів:

- часто повторювані послідовності $\geq 10^6$ разів, що входять до фракції сателітної ДНК і не транскрибуються (впізнання гомологічних хромосом при мейозі, спейсери);
- фракція помірно повторюваних послідовностей (10^2 - 10^5), які є блоками істинних генів;
- короткі послідовності, які розкидані по всьому геному (акцепторні або регуляторні ділянки різних генів);
- фракція унікальних послідовностей, що несе інформацію про більшість білків клітини.

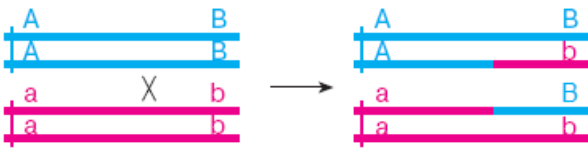

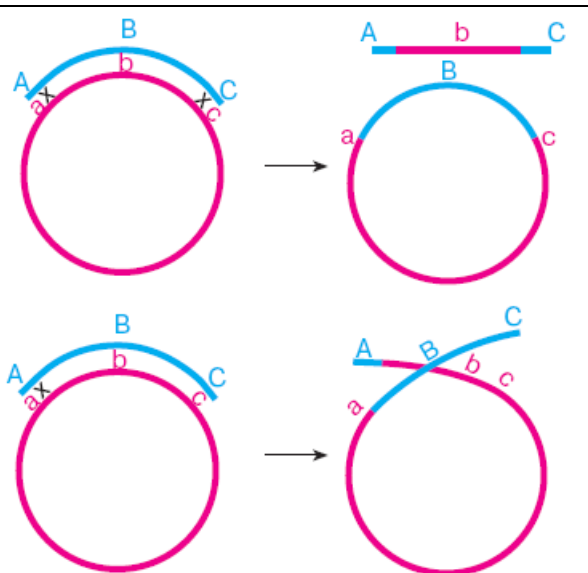
Серед послідовностей ДНК, які повторюються, є так звані *дисперговані повтори*, які поділяються на *транспозони* та *ретротранспозони*. *Транспозони* – це мобільні елементи, реплікація яких включає переміщення своєї ДНК послідовності на нове місце в геномі. Транспозони складають біля 2-3% геному людини. *Ретротранспозони* – це мобільні елементи, які можуть самовідтворюватись в геномі, здійснюючи реакцію зворотної транскрипції. Ретротранспозони складають біля 42% геному людини.

Плазміда – невеликі кільцеві дволанцюгові позахромосомні молекули ДНК.

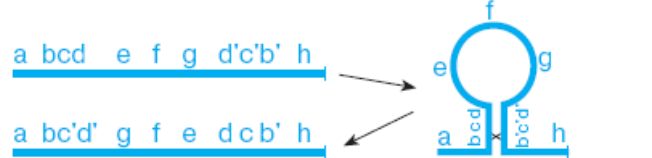

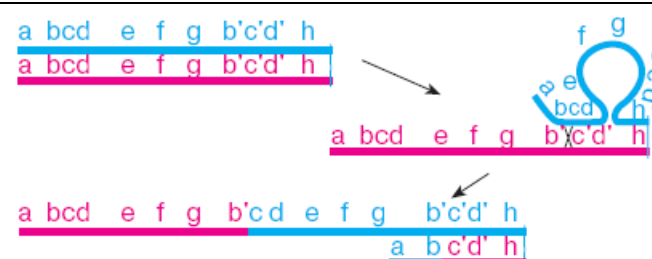
Генетична рекомбінація – це перерозподіл генетичного матеріалу (ДНК), що призводить до виникнення нових комбінацій генів. Осноіними шляхами рекомбінації є обмін клітинними ядрами, обмін цілими молекулами ДНК, обмін частинами молекул ДНК. Для всіх рекомбінаційних процесів характерним є етап, на якому молекули ДНК вступають в контакт на ділянці, де відбудеться обмін полінуклеотидними ланцюгами. Цей етап отримав назву «*синапсис*». За різних типах рекомбінації механізм синапсису різний.

Подвійна спіраль ДНК є *дуплексом*. *Гетеродуплекс* – подвійна спіраль ДНК, яка містить майже комплементарні ланцюги, що утворилися при рекомбінації двох гомологічних молекул.

Гомологічна рекомбінація (кросинговер) – обмін ділянками між гомологічними молекулами ДНК. Застована на спарбванні комплементарних ланцюгів ДНК.

Схеми гомологічної рекомбінації	
Кросинговер в профазі I поділу мейоза	
Кросинговер в соматичній клітині на стадії G1 клітинного циклу	
Кросинговер в клітині кишкової палички <i>E. coli</i>	

Ектопічна рекомбінація – варіант гомологічної рекомбінації; здійснюється між гомологічними послідовностями ДНК, що повторюються, тандемними або диспергованими по геному, що може призводити до різних хромосомних перебудов.

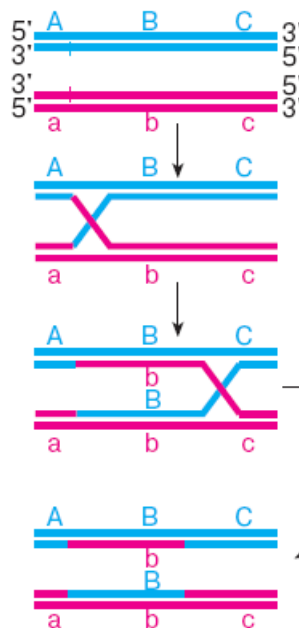
Інверсія	
Делеція	
Дуплікація і делеція	

Структура Холідея – чотириланцюгова структура ДНК з перехрещенням ланцюгів, яка утворюється при рекомбінації. Револьваза – фермент, що упізнає та розрізає структуру Холідея.

Дуплекси ДНК з
одноланцюговими
розривами

гетеродуплекс,
"напівхвізма"
Холідея

міграція
галуження

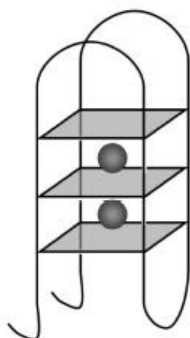
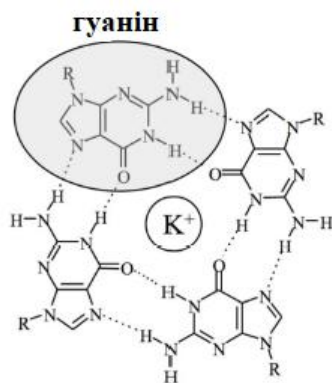


ізомеризація
напівхвізми

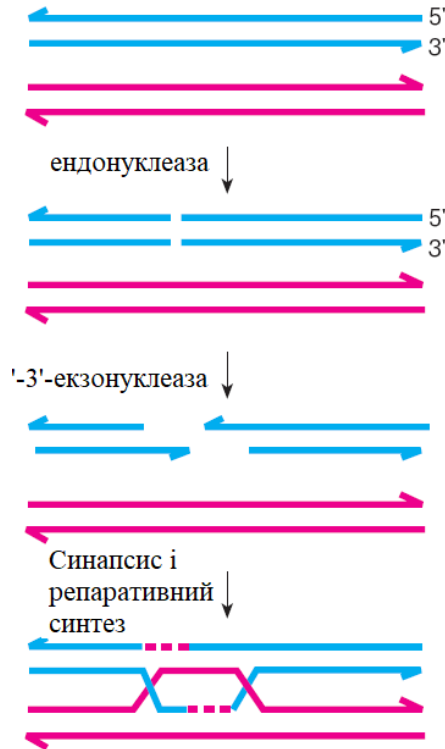
руйнування
напівхвізми

В живих клітинах структури Холідея є важливими проміжними сполуками, які виникають при процесах генетичної рекомбінації та репарації дволанцюгових розривів.

G-квадруплекси – послідовності нуклеїнових кислот, які збагачені на гуанін та здатні утворювати структури із двох, трьох або чотирьох ланцюгів за наявності моновалентного катіону невеликого розміру, частіше калія. Такі мотиви присутні в промоторних регіонах, інтронах, теломерах, 5'-кінцях, що не трансклюються, в сайтах переключення у складі послідовностей генів імуноглобулінів, «гарячих точок» рекомбінації тощо. В геномі людини нараховується біля 350 тисяч послідовностей, які теоретично здатні приймати конфігурацію квадруплексів. Очевидно, квадруплекси знаходяться в динамічній рівновазі з іншими формами ДНК, наприклад, звичайним дуплексом.



У 1983 році Дж. Жостаком була запропонована модель рекомбінації на основі репарації дволанцюгових розривів. Згідно неї, спочатку специфічна ендонуклеаза вводить розриви в обидва ланцюги одного із дуплексів. 5'-кінці ланцюгів в точках розривів гідролізуються екзонуклеазою з утворенням рекомбіногенних 3'-ланцюгів, які потім впроваджуються в інший дуплекс. Відбувається репаративний синтез втрачених ділянок ДНК.

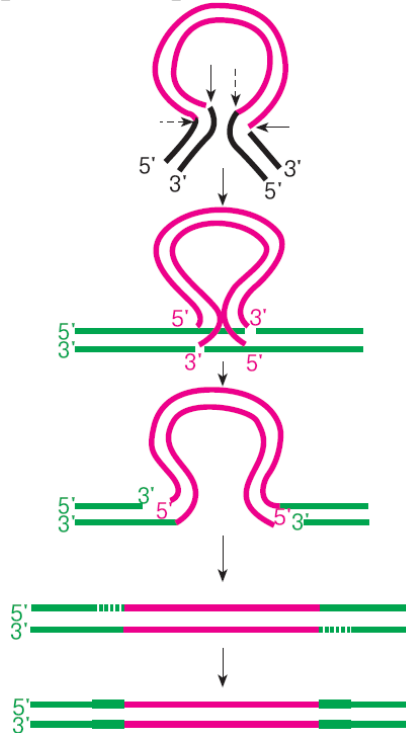


Негомологічна рекомбінація – група рекомбінаційних процесів, які застосовані на дуже обмеженій гомології між ДНК, що рекомбінують, або взагалі відбуваються без гомології. До негомологічної рекомбінації відносять сайт-специфічну рекомбінацію, транспозиції та незаконну рекомбінацію.

Сайт-специфічна рекомбінація – вбудовування однієї молекули ДНК в іншу (або її вирізання), яке здійснюється за рахунок упізнання білками коротких елементів послідовності ДНК – *сайтів рекомбінації*. Відбувається між специфічними послідовностями ДНК в межах дуже коротких ділянок гомології, зазвичай 15-30 п.н. Сайт-специфічна рекомбінація забезпечує інтеграцію (включення) ДНК помірних фагів в хромосоми бактерій, інверсію окремих ділянок ДНК в хромосомах бактерій і бактеріофагів і в плазмідах дріжджів, перебудови в послідовностях ДНК, що кодують іменоглобуліни.

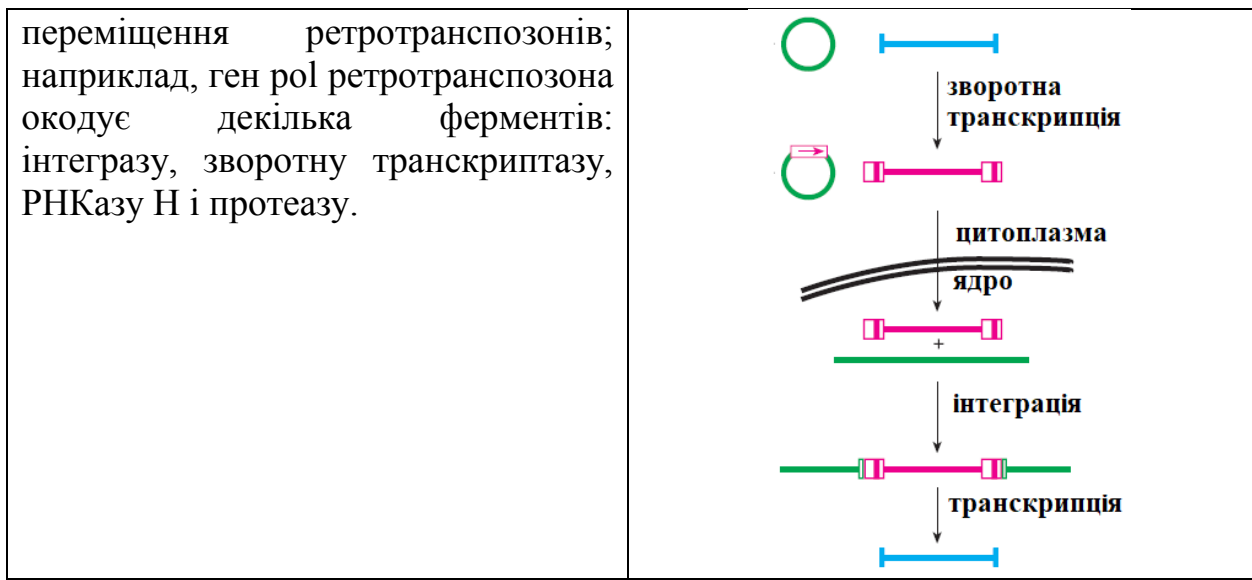
Транспозиції лежать в основі руху мобільних генетичних елементів. *Мобільні елементи* – це особливі послідовності ДНК, які здатні до переміщення із однієї ділянки молекули ДНК (хромосоми або плазмиди) в іншу, або в іншу молекулу в тій же клітині, або навіть в клітині іншого організму. Мобільні елементи, як правило, не існують автономно, а знаходяться у складі хромосом або плазмід. Основний білок транспозиції – *транспозаза*. При транспозиції відбуваються наступні рекомбінаційні реакції. Спершу транспозаза (у ретротранспозонів – інтеграза) зводить разом кінці мобільного елемента і робить розриви точно по цим кінцям. Також

транспозаза зводить в контакт кінці елемента і дуплекс ДНК-мішені. При цьому вона робить в обох ланцюгах ДНК-мішені ступеневі розриви. Далі відбувається обмін ланцюгами, що призводить до рекомбінації між ДНК елемента і мішені. Після цього залишаються незабудовані ділянки, які надалі заповнюються шляхом репаративної реплікації ДНК по матриці ДНК-мішені. В результаті виникають прямі повтори ДНК-мішені на кінцях елемента.



Виділяють три основні механізми рекомбінації при транспозиції:

<p><i>реплікативна транспозиція</i> – мобільний елемент, переміщуючись в іншу молекулу, залишає свою копію у вихідній ДНК; продемонстровано у фага Mu і бактеріальних транспозонів родини Tn3 з короткими зворотними повторами;</p>	
<p><i>нереплікативна транспозиція</i> – полягає у вирізанні елемента та його переміщенні на нове місце; характерна для більшості мобільних елементів бактерій та еукаріотичних елементів з короткими зворотними повторами;</p>	



Незаконна рекомбінація – об’єднання двох негомологічних молекул ДНК. Це група процесів, де рекомбінація відбувається без гомології між молекулами ДНК, і при цьому без участі механізмів сайт-специфічної рекомбінації або транспозиції. Вперше це явище було описане японським дослідником Х. Ікедою та співробітниками у 1982 році. Прикладами незаконної рекомбінації є захоплення ретровірусом деяких клітинних генів при його ексцизії із хромосоми клітини господаря, а також інтеграція фрагментів ДНК, які вводяться в клітини хребетних за допомогою мікроін’єкцій.

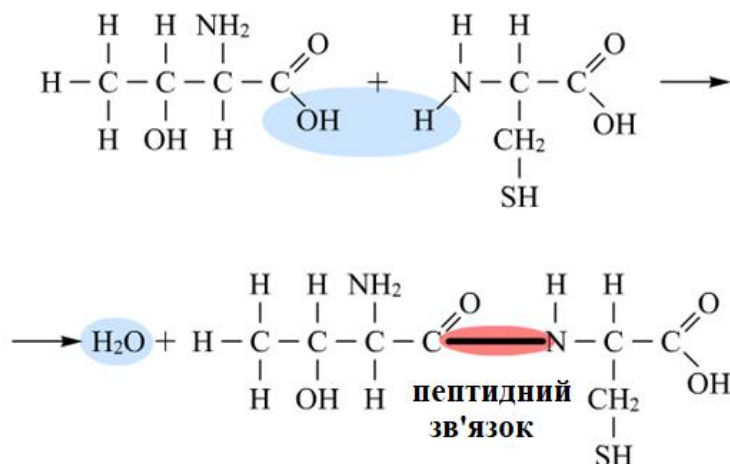
3. Структура і властивості білків

Розрізняють декілька рівнів структури білків: первинну, вторинну, третинну, а для олігомерних білків – четвертинну структури.

Білок – це органічна сполука, яка складається із амінокислот, що з'єднанні пептидним зв'язком. Білки є полімерами, мономерами яких виступають амінокислоти, з'єднанні пептидним зв'язком.

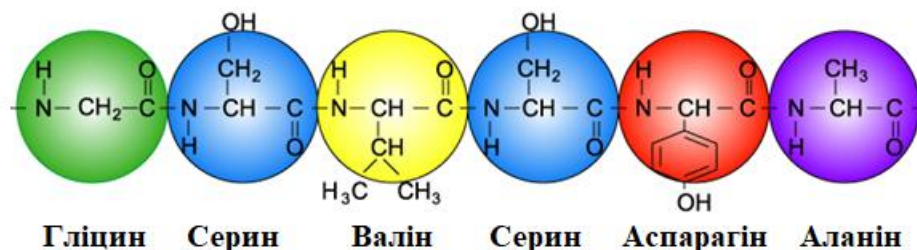
Основними структурними компонентами білків є *амінокислоти*. Існує 20 основних протеїногенних амінокислот, які відрізняються радикалом.

Амінокислоти можуть взаємодіяти одна з одною – карбоксильна група однієї амінокислоти реагує з аміногрупою іншої амінокислоти з утворенням *пептидного зв'язку* і молекули води.



Білкова молекула може утворювати 4 типи структур.

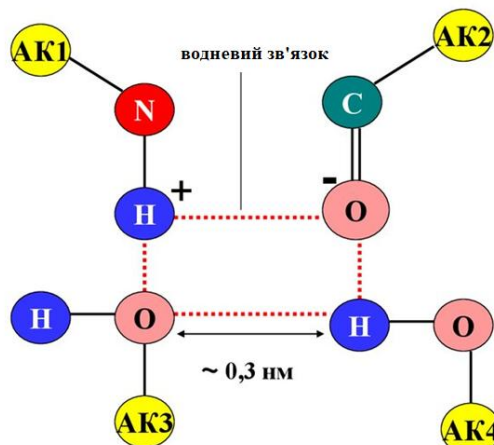
Первинна структура – це послідовність амінокислотних залишків, які зв'язані один з одним пептидними зв'язками. В цій послідовності чергуються три типи зв'язків. Навколо пептидного зв'язку (-CO-NH-) обертання неможливі. Проте навколо інших (-NH-C_αH- і -C_αH-CO-) можливі обертання. Саме це і дозволяє пептидному ланцюгу згинатися та утворювати вторинну і третинну структури.



Первинна структура безпосередньо кодується послідовністю кодонів мРНК і відтворюється при трансляції.

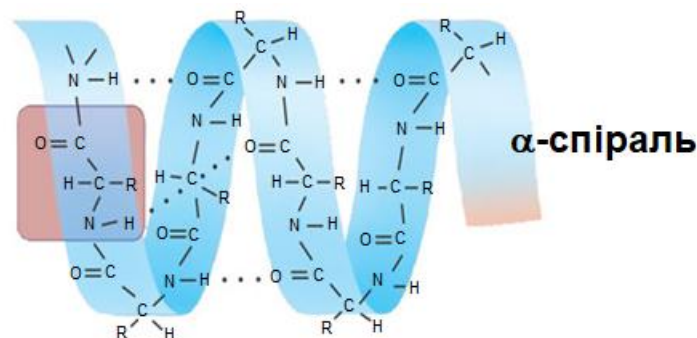
Первинна структура у кожного білка своя і визначає всі його властивості. Первинна структура відіграє вирішальну роль у фолдингу поліпептидного ланцюга, проте не завжди її достатньо для забезпечення фолдингу або його повного закінчення. Для цього часто потрібні додаткові ліганди та/або хімічні модифікації.

Вторинна структура – це впорядковане розташування окремих ділянок поліпептидного ланцюга, що обумовлене водневими зв'язками між різними групами різних амінокислотних залишків, які наближені один з одним. На Гідрогені локалізується частково позитивний заряд, на Оксигені – частково негативний. Завдяки цьому сусідні молекули можуть електростатично притягуватися один до одного. Такий тип електростатичного притягання між частковими зарядами електронейтральних молекул називається *водневим зв'язком*. Енергія, яка необхідна для руйнування одного водневого зв'язку, складає 18,8 кДж/моль, енергія, що необхідна для руйнування одного ковалентного зв'язку Н–О, дорівнює 460 кДж/моль.



В молекулі глобулярного білка можуть зустрічатися різні види вторинної структури, а також безструктурні ділянки. У фібрилярних білках вторинна структура, як правило, одноманітна. Особливий вид вторинної структури зустрічається в білку колагені. Він має схожі риси із α -спіраллю, і з β -структурою і називається *колагеновою спіраллю*.

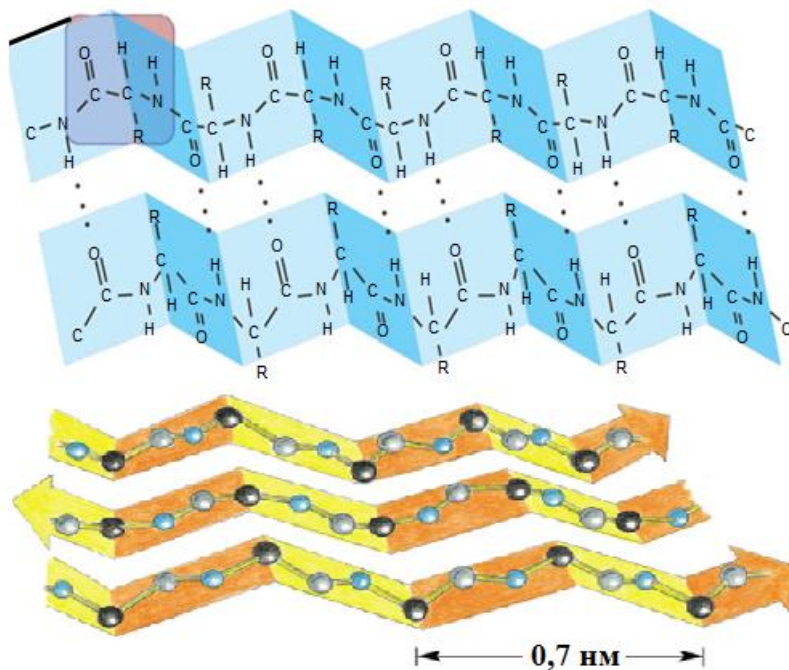
α -Спіраль – остов поліпептидного ланцюга закручується в спіраль (радикали амінокислот звернені назовні від спіралі). Ця структура утримується водневими зв'язками між остовами амінокислот. На один виток α -спіралі припадає біля 3,6 амінокислотних залишки, крок спіралі – 0,544 нм. α -Спіраль (як і β -структура) утворюється тільки тому, що є найбільш термодинамічно вигідним станом для певної ділянки пептидного ланцюга.



β -Структура – основи пептидних ланцюгів мають зигзагоподібну конфігурацію. Така структура також тримується водневими зв'язками.

Ділянки ланцюга в β -структурі, які прилягають одна до одної, можуть бути як паралельними, так і антипаралельними. У фібрилярних білках з β -структурою в утворенні водневих зв'язків беруть участь сусідні, розташовані паралельно пептидні ланцюги.

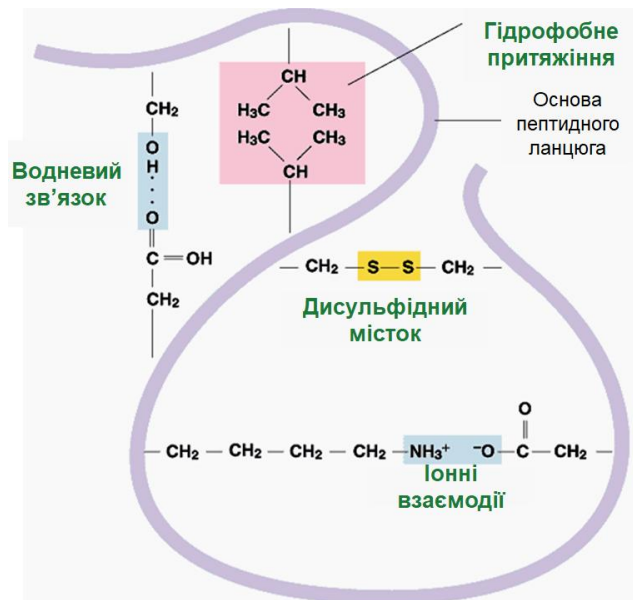
β -шар



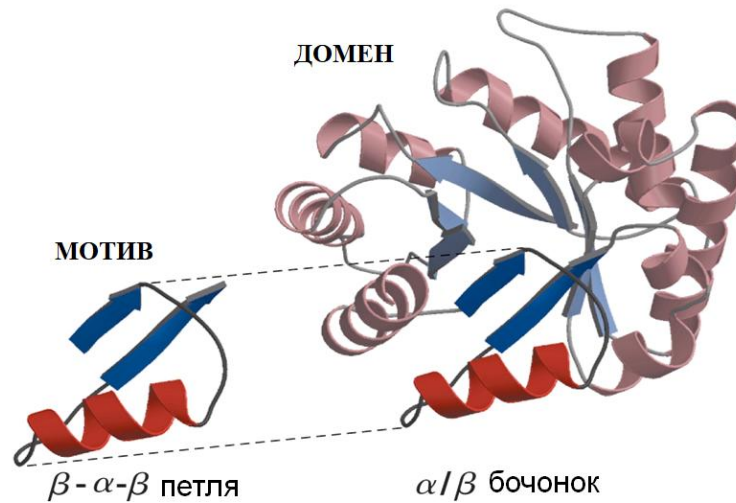
Ділянки білка, що збагачені на амінокислоти пролін та гліцин, не можуть бути залучені до формування вторинних структур. У білках α -спіраль переважно утворюється на ділянках, у яких гідрофобні амінокислотні залишки зустрічаються через 3-4 амінокислоти, а для утворення β -структурних ділянок кожна друга амінокислота у складі поліпептиду повинна бути гідрофобною. Такий характер розміщення амінокислот у поліпептиді гарантує утворення гідрофобних кластерів на поверхні спіралі або β -складки, відповідно.

Вторинна структура білка визначається первинною структурою.

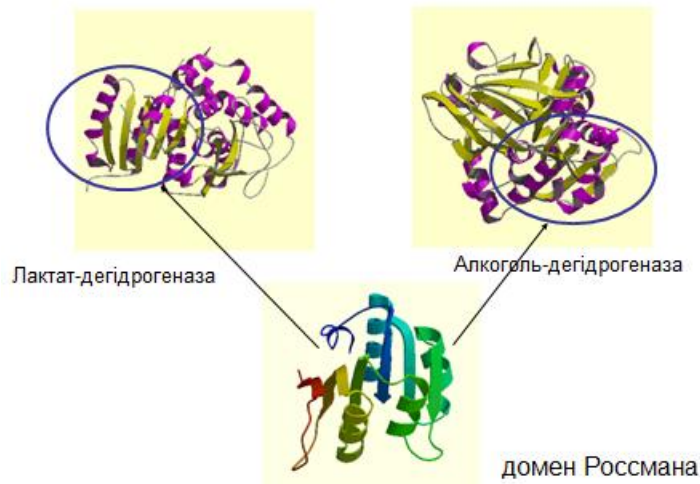
Третинна структура – трьохвимірна конфігурація закрученої в просторі спіралі поліпептидного ланцюга. Третинна структура підтримується зв'язками, які виникають між функціональними групами радикалів: дисульфідними, складноєфірними, іонними, гідрофобними, ван-дер-ваальсовими.



Третинна структура утворюється із елементів вторинної структури.



Домен – просторово обособлена частина білка, яка згортається незалежно і має власну функцію. Це функціональні блоки, з яких будуються нові білки. В 1974 році М. Россман встановив, що одні і той же домен може бути присутнім в різних білках. Такий домен отримав назву *домен Россмана*.



Формування третинної структури відіграє вирішальну роль у набутті білком функціональної активності. Саме на цьому рівні в білку з'являються *активні центри* – групи із декількох радикалів, здатних специфічно взаємодіяти з певними лігандами.

Третинна структура називається глобулою, повністю визначається первинною структурою та унікальна для кожного білка. Третинна структура володіє певною рухливістю залежно від факторів, які впливають на неї – температура, специфічні речовини-регулятори, хімічні модифікації білка, виконання їм функції тощо. *Зміна конформації білка – важливий спосіб зміни їх біологічної активності.*

Четвертинна структура – форма взаємодії між декількома поліпептидними ланцюгами (до 20). Один ланцюг – одна субодиноця. Субодиноці поєднуються за рахунок взаємодій амінокислотних радикалів, які знаходяться на контактуючих поверхнях субодиноць. Ці поверхні за розташуванням даних радикалів є взаємно комплементарними.

4. Структура та функції інтерфазного ядра

Інтерфазне ядро складається з ядерної оболонки, що відокремлює його від цитоплазми, хроматину, ядерця, каріоплазми.

Між зовнішньою і внутрішньою мембранами знаходиться *перинуклеарний* простір шириною 20-60 нм.

Зовнішня ядерна оболонка з боку цитоплазми часто вкрита рибосомами, вона також може безпосередньо переходити в мембрани ЕПР.

З внутрішнього боку внутрішньої мембрани ядра знаходиться тонка пластинка (ядерна ламіна) білкової природи. Ця пластинка (шар) утворена із проміжних філаментів і розглядається як компонент ядерного матрикса.

В матриксі міститься внутрішньоядерна фібрилярна сітка. До ядерної ламіни і внутрішньоядерної сітки прикріплені хромосоми, а також різноманітні білкові компоненти з каталітичними і регуляторними функціями.

Для забезпечення транспорту великих макромолекул (ендоцитоз або екзоцитоз) в ядерної оболонки знаходяться пори. У місці пори внутрішня і зовнішня мембрани зливаються, а в отворі міститься так званий комплекс пори ядра.

Одним із компонентів цього комплексу є тонка діафрагма, яка закриває пору. Із внутрішнього і зовнішнього боків від діафрагми розташовані білкові гранули, їх розмір більший за рибосоми. В центрі пори міститься центральна гранула, яка фібрилами зв'язана з периферичними гранулами. Комплекс пор ядра нагадує колесо велосипеда. В діафрагмі, що закриває пору, тимчасово утворюються циліндричні канали, через які відбувається транспорт речовин. Кількість пор в ядерної оболонки збільшується під час активації синтетичних процесів.

Хромосоми. В ядрі диплоїдної клітини людини міститься 46 хромосом (22 пари аутомосом і 2 статевих хромосоми).

Кожна хромосома містить тільки 1 молекулу ДНК.

Молекула ДНК зв'язана з лужними (гістоновими) і кислими (негістоновими) білками.

Також у хромосомах міститься РНК, яка є незакінченими продуктами транскрипції, або виконує регуляторні, структурні або інші функції.

Хроматин. При спостереженні клітин після фіксації і фарбування всередині ядра виявляються *зони щільної речовини*, яка добре сприймає різні барвники, особливо основні. Завдяки такій здатності добре фарбуватись цей компонент ядра одержав назву хроматин. *Хроматин* – це комплекс білків та ДНК, що знаходиться в ядрі.

Білки хроматину. Фракція білків хроматину складає 60-70% сухої маси. До білків хроматину відносяться гістони (60-80% всіх білків хроматину) і негістонові білки.

Гістони – сильно основні білки, екстраговані з очищеного хроматину за допомогою кислих розчинів або міцних розчинів солей.

Лужність цих білків пов'язана із значним вмістом в них основних (головним чином, лізину і аргініну) і гідрофобних (валіну) амінокислот. Ці білки не містять триптофан.

За рахунок наявності основних радикалів гістони взаємодіють з ДНК, завдяки гідрофобними радикалами гістони взаємодіють один з одним.

Типи гістонів:

- Н₁ – багатий на лізин, м. вага 2100;
- Н_{2a} – помірно багатий на лізин, м. в. 14500;
- Н_{2б} – помірно багатий на лізин, м. в. 13700;
- Н₃ – багатий на аргінін, м. в. 15300.
- Н₄ – багатий на аргінін, м. в. 11300;

Гістони піддаються різним посттрансляційним модифікаціям, завдяки чому набувають здатність тонко регулювати стан хроматину.

	<p>Сайти модифікації гістонів Н_{2a}, Н₃ і Н₄. <i>Скорочення:</i> Ac – ацетат; B – біотин; M – метил; P – фосфат; U – убіквітин.</p>
	<p><i>Лізин (K):</i> метилювання (Me), ацетилювання (Ac), убіквітинування (Ub), сумоїмування (Sumo), рибозилування (Rib). <i>Аргінін (R):</i> метилювання. <i>Серин (S), треонін (T), цистеїн (C):</i> фосфорилування (P).</p>

Гістон Н₁ виявляється в 2 рази рідше, ніж інші. Ці 5 фракцій гістонів присутні практично в усіх клітинах ссавців, рептилій, риб, птахів і рослин. В еритроцитах птахів та плазунів в неактивному хроматині замість гістону Н₁ присутній близькоспоріднений до нього гістон Н₅. Гістони, крім Н₁, схожі за

своєю первинною структурою (послідовністю амінокислот в поліпептидному ланцюгу) незалежно від виду об'єкта.

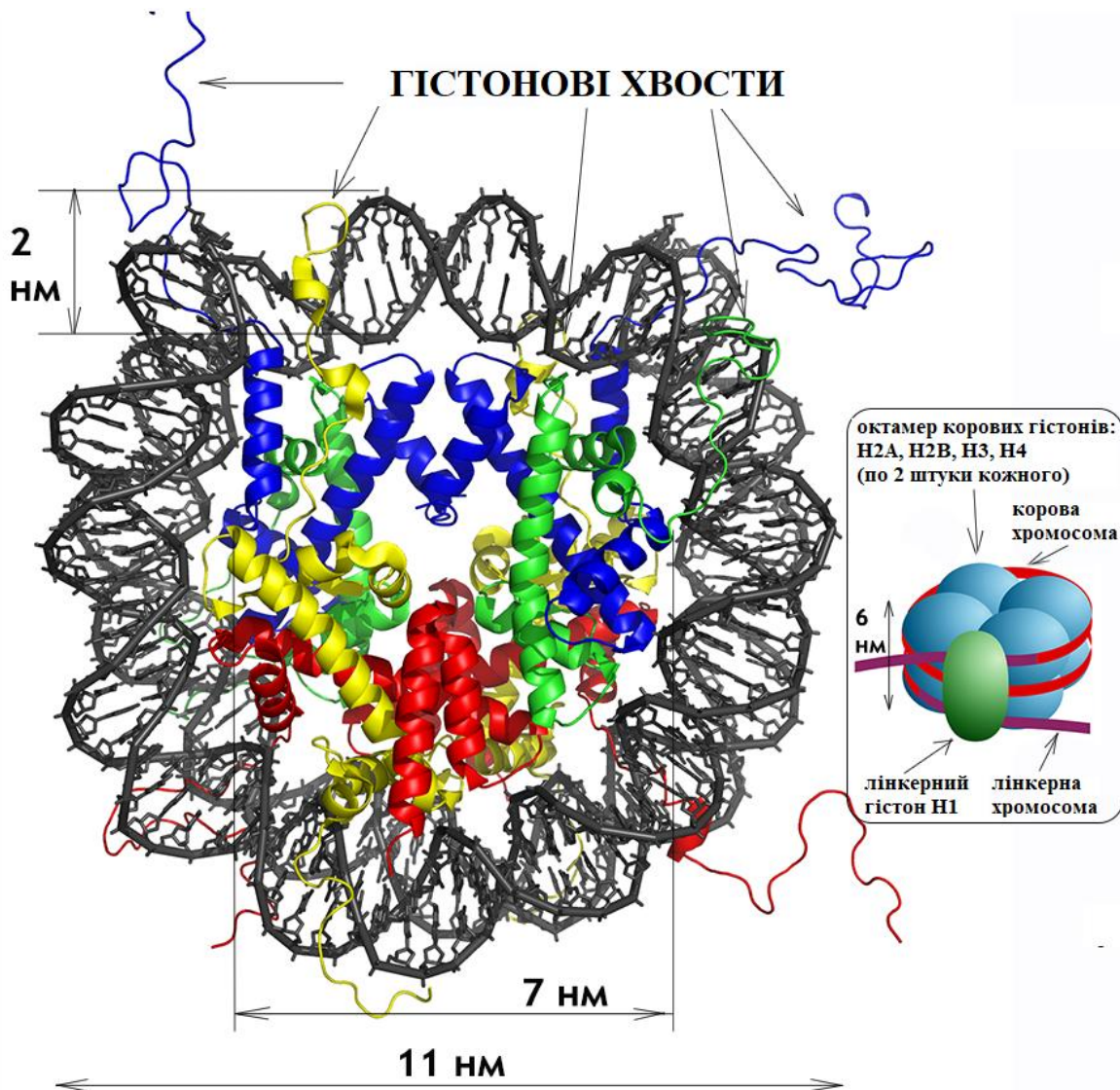
Гістони (за винятком H_1) демонструють надзвичайну еволюційну стійкість; мутації в генах гістонів призводять до загибелі організмів.

Гістони синтезуються на полісомах в цитоплазмі, цей синтез починається дещо раніше реплікації ДНК. Синтезовані гістони мігрують з цитоплазми в ядро, де і зв'язуються з ділянками ДНК.

Роль гістонів – забезпечення специфічної укладки хромосомної ДНК і участь в регуляції транскрипції.

Взаємодія гістонів з ДНК призводить до утворення *нуклеосом*.

Основа нуклеосоми – глобула із 8 молекул білків гістонів (октамер). Нуклеосома містить по 2 молекули гістонів (H_{2a} , H_{2b} , H_3 , H_4), утворюючи білкову серцевину, яку окружує молекула ДНК, яка укладена спіралью у вигляді 1,75 витка. Ця ділянка ДНК складає довжину, що дорівнює 140 парам нуклеотидів.



Ділянки ДНК, що «намотані» на гістонові октамери, мають назву «корові» (core-ДНК або nDNA).

Лінкерні ділянки ДНК вільні від білків та дорівнюють довжині 60 пар нуклеотидів (iDNA). З кожною лінкерною ділянкою зв'язана 1 молекула гістонового білка H₁.

Нуклеосомна фібрила товщиною в 10 нм спіралізується і утворює фібрилу другого порядку товщиною 20-30 нм (*соленоїдна структура*). 8-10 нуклеосом компонуються в глобули – *нуклеомери*.

Негістонові білки (кислі білки) – це ферменти, що відповідають за репарацію, реплікацію, транскрипцію і модифікацію ДНК. Ці білки дуже різноманітні (їх біля декількох сотень). Негістонові білки виконують також структурну роль, забезпечуючи різні рівні укладення хромосом.

Сама велика група білків хроматину – це *білки-регулятори*.

Розмір мітотичних хромосом дуже малий – декілька мкм в довжину при товщині 0,5-1 мкм. ДНК в таких хромосомах укладена з коефіцієнтом компактизації 10000. Щільна упаковка необхідна для збереження хромосомного матеріалу при русі хромосом під час мітозу.

Хромосомний аналіз, метод диференціального фарбування хромосом. Вперше цей метод був запропонований Касперсоном, який обробляв препарати мітотичних хромосом флуорохромом акрихініпритом з подальшим дослідженням цих препаратів із застосуванням флуоресцентного мікроскопа. Була виявлена смугастість по довжині хромосом – були виявлені поперечні смуги, що світяться. Розташування смуг характерно для кожної хромосоми.

Вибіркове фарбування пов'язане з локалізацією *гетерохроматину*. Гетерохроматин – це ділянки хромосом, що інтенсивно зв'язуються з барвниками. Ділянки гетерохроматину розташовуються в теломерних, центромерних, навколяядерцевих районах хромосом. Втрата значної кількості ділянок гетерохроматину не приводить до загибелі клітини.

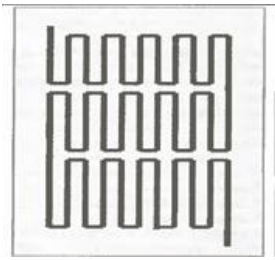
Гетерохроматин є конститутивний і факультативний. *Конститутивний гетерохроматин* – це ділянки хроматину, які постійно знаходяться в конденсованому стані. *Факультативний гетерохроматин* – це ділянка хроматину, яка тимчасово переходить в конденсований стан.

Еухроматин – це функціонально активні, практично деконденсовані і тому світлі ділянки хромосом, розташовані між глибокими гетерохроматину.

Під час реплікації, репарації або транскрипції ДНК втрачає зв'язок з гістонами, тобто нуклеосомна організація тимчасово зникає, а потім знову відновлюється.

Хроматинова нитка (d=30 нм) коротша за нуклеосому в ~ 18 разів.

Хроматинова нитка утворює петлю, яка збирається в розетки, де основа петель кріпиться до білків ядерного матрикса. В гетерохроматині такі групи петель щільно прилягають одна до одної.



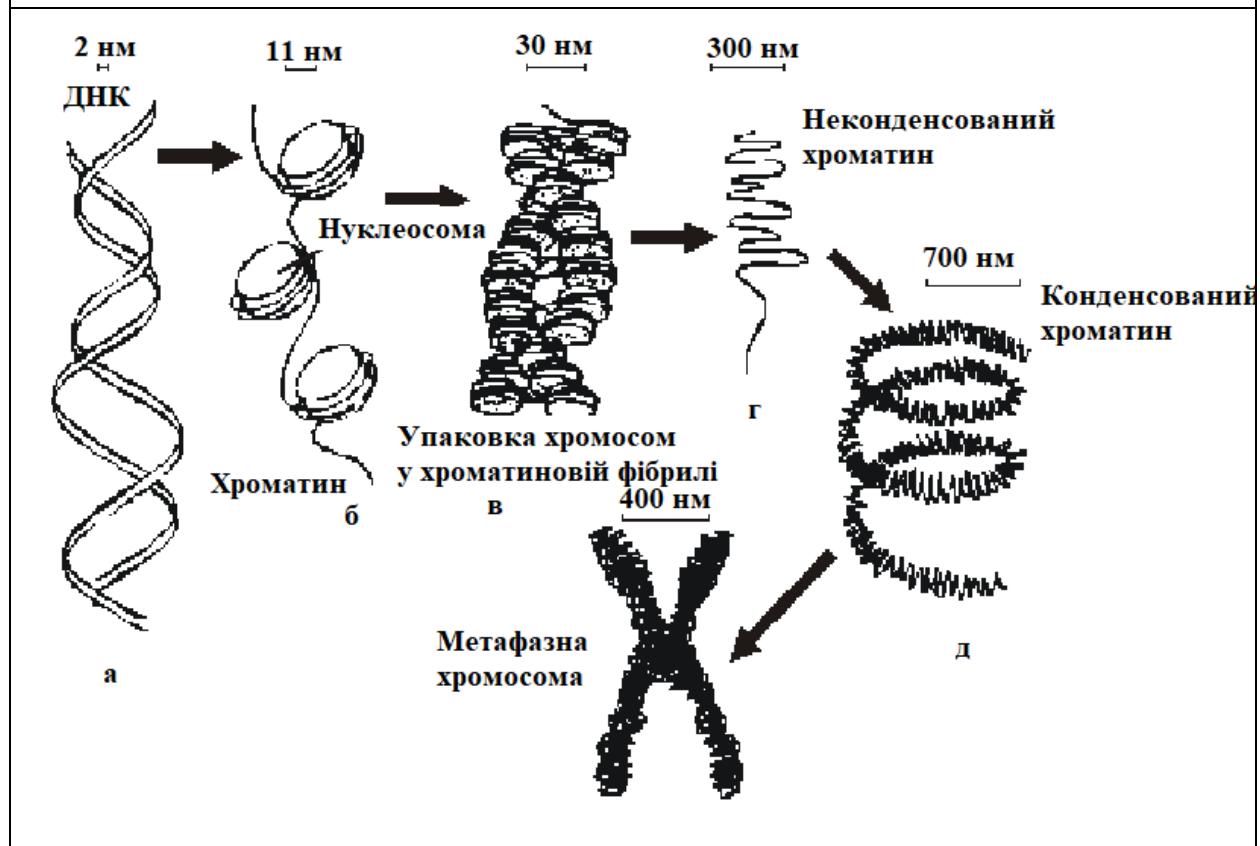
Модель складання хроматинової нитки.

Рівні компактизації ДНК: 1) нуклеосомна фібрила, 2) соленоїдна структура, 3) петлеподібна структура.

Багато негістонових білків хроматину беруть участь в утворенні ядерного матрикса, до якого входять ядерна мембрана і внутрішній ядерний матрикс. До цих скелетних утворень прикріплюються теломерні ділянки хромосом. Прикріплення ДНК, що упакована як соленоїд, спричинює утворення петлеподібних структур. Стабільні райони прикріплення є ділянками ініціації реплікації.

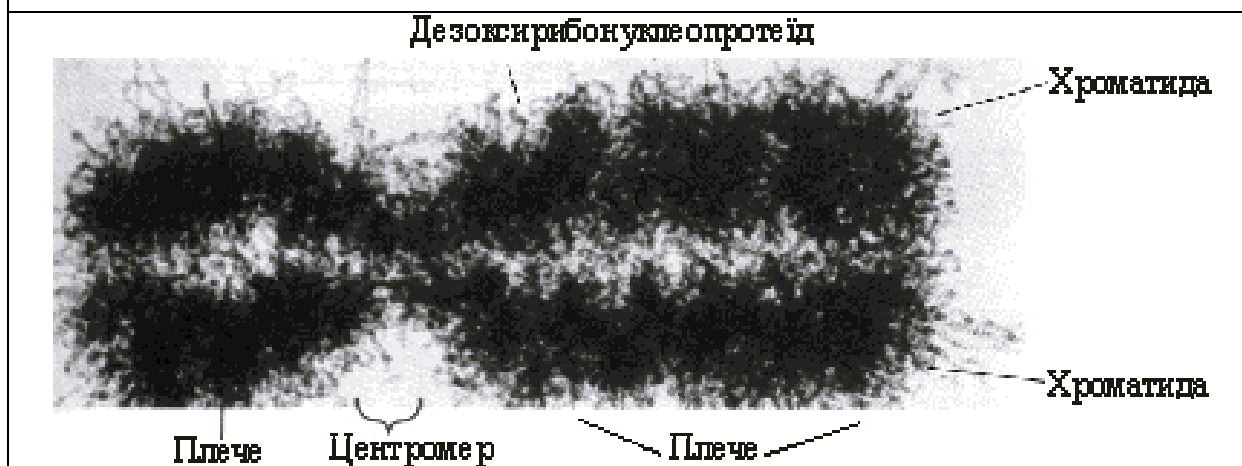
Різні стадії конденсації (а) ДНК і (б–д) хроматину при формуванні хромосом.

Вказано ширину проміжних структур, але деталі структури є децю умовні



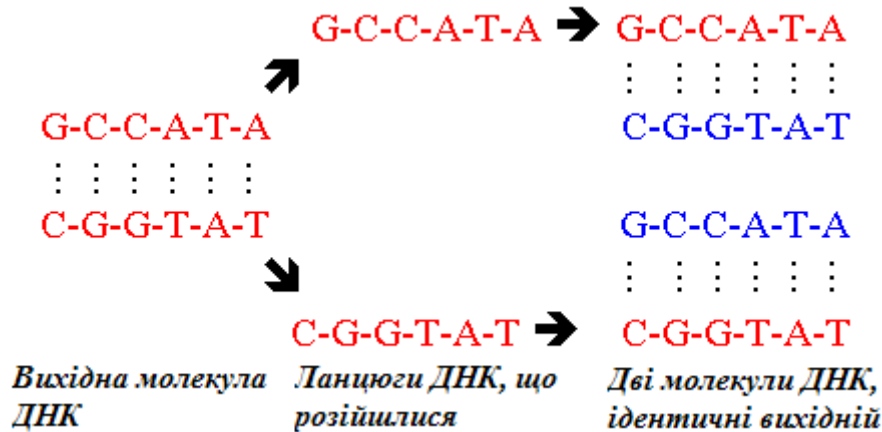
Структура метафазної хромосоми.

Одна хромосома з двома ідентичними половинами (дві хроматиди). Під час поділу в метафазі хромосоми стають добре видимими у світловому мікроскопі. На рисунку видні дві хроматиди, з'єднані в ділянці центромери



5. Реплікація ДНК

Редуплікація (реплікація) – подвоєння хромосом, процес синтезу ДНК на матриці ДНК, відбувається за напівконсервативним механізмом. Це було продемонстровано Тейлером (1963 р.) за допомогою метода ауторадіографії.



Корінці бобів *V. faba* на короткий час поміщали в середовище, що містить попередник ДНК – мічений ^3H -тимідин. Потім корінці переносили в середовище, що не містить міченого попередника, і через різні проміжки часу після цього спостерігали за розподілом мітки в хромосомах. Перебуваючи в середовищі без ^3H -тимідину, клітини починали ділення. При цьому в хромосомах при першому поділі клітин мітка виявлялась в обох сестринських хромосомах. При другому клітинному поділі мітку ^3H -тимідину, який включався перед першим діленням, містить тільки одна з сестринських хроматид.

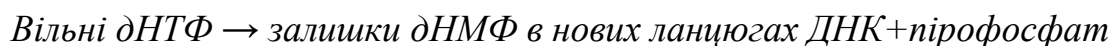
Тейлор зробив висновок, що редуплікація хромосом аналогічна напівконсервативній реплікації ДНК, тобто хромосомна ДНК відновлюється так, як би в складі хромосом буда 1 молекула ДНК.

Місце реплікації ДНК в клітинному циклі.

Реплікативний синтез ДНК зв'язаний з поділом клітини. В клітинах, що діляться мітозом, ДНК реплікується в S-періоді інтерфази. В сперматогоніях S-період триває біля 15 годин.

Загальна характеристика реплікації ДНК.

Субстратами, із яких синтезуються нові ланцюги ДНК, є дезоксирибонуклеозидтрифосфати (дНТФ), а не дезоксирибонуклеозидмонофосфати (дНМФ), які входять до складу ДНК. Тому під час включення в ланцюг ДНК від кожного нуклеотида відщеплюється 2 фосфатних залишки (у вигляді пірофосфатів, які гідролізуються потім до фосфатів):

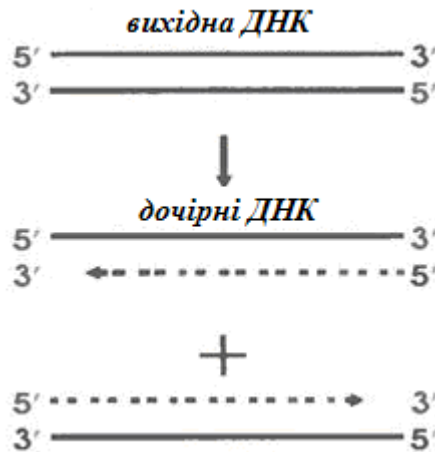


Використання дНТФ пояснюється енергетичними причинами: утворення міжнуклеотидного зв'язку потребує енергії, яка вивільнюється при гідролізі.

Реплікація ДНК – матричний процес: кожний дочірній ланцюг, що синтезується, використовує як матрицю один із ланцюгів батьківської (вихідної) ДНК.

Новий ланцюг (дочірній) синтезується за принципом комплементарності: А-Т, Г-Ц.

Процес реплікації ДНК є симетричним. Матрицями є обидва ланцюга батьківської ДНК:



По закінченню реплікації ДНК вихідна молекула ДНК є напівпоновленою, а у нових молекулах ДНК – один із ланцюгів батьківський, а другий – новосинтезований.

Важливо – напрямок росту і полярності ланцюгів ДНК.

Збільшення ланцюга ДНК (або окремого її фрагмента) завжди відбувається в напрямку *від 5'-кінця до 3'-кінця*. Це означає, що черговий новий нуклеотид приєднується до 3'-кінця ланцюга, що росте.

В будь-якій молекулі ДНК комплементарні ланцюги антипаралельні, тому і ланцюг, що росте, антипаралельний матричному ланцюгу.

Особливості механізму реплікації ДНК.

Молекула ДНК еукаріотичних хромосом – це лінійні молекули, які складаються з тандемно (одна за одною) розташованих репліконів різного розміру. Середній розмір реплікону ~30 мкм. Геном людини складається з більш як 50 000 репліконів.

Процес реплікації забезпечується складним ферментним комплексом (біля 15-20 різних білків).

У еукаріотів на кожній хромосомі працює одночасно велика кількість ферментних комплексів; тобто, існує багато точок початку реплікації ДНК (поліреплікон).

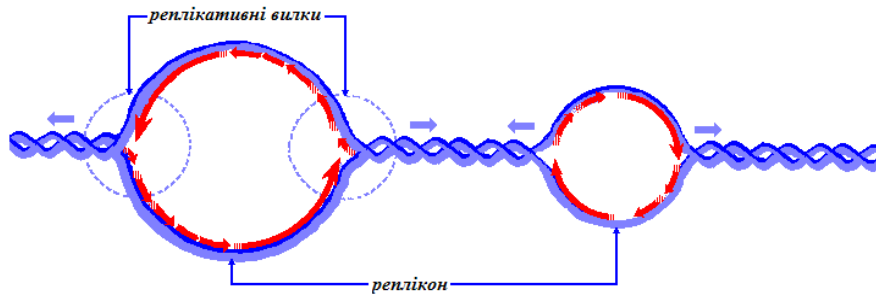
Ориджен – геномна ділянка, з якої розпочинається синтез ДНК.

В кожній точці починають працювати 2 ферментних комплекси: один переміщується в одному напрямку вздовж молекули ДНК, інший – в протилежному. При цьому кожний комплекс реплікує не тільки один ланцюг ДНК, а і другий.

Реплікація розповсюджується в обох напрямках від кожної точки початку реплікації. При цьому утворюється 2 реплікативних вилки, які

рухаються в протилежних напрямках. Між цими вилками з'являється та поступово розширюється «вздуття» або «глазок» (вічко).

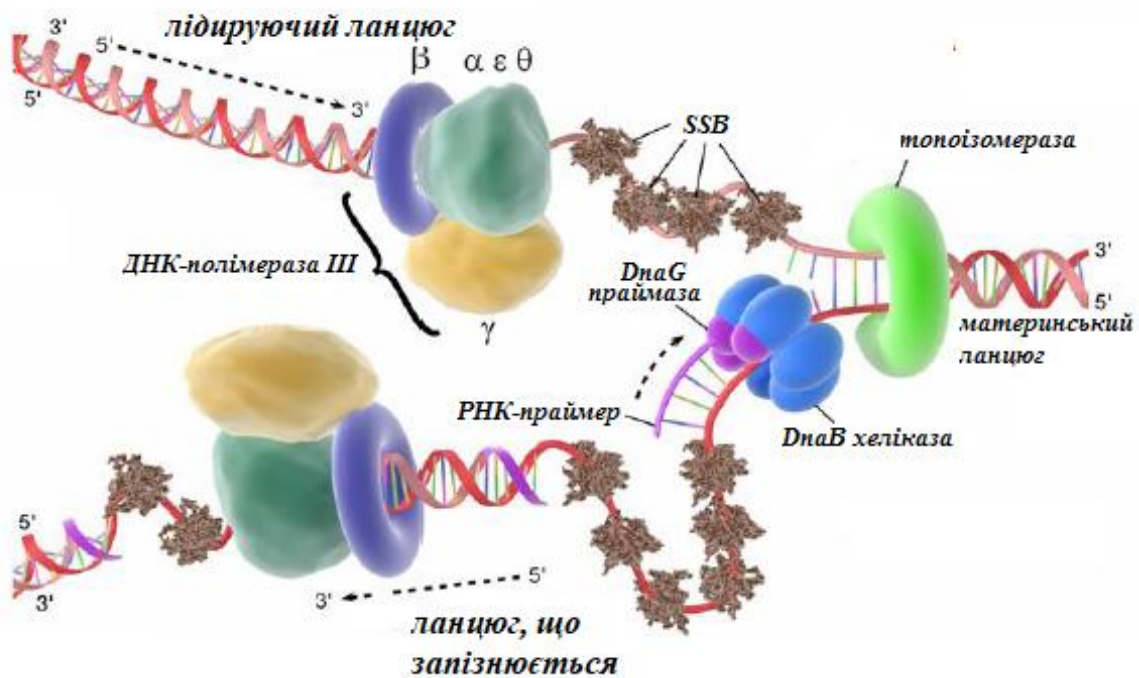
Реплікативна вилка – район, в якому подвійна спіраль розплетена і ведеться синтез нового ланцюга ДНК.



Потім ділянки реплікації, де є «вздуття», зливаються і уся молекула ДНК стає подвоєною.

Ферментний комплекс функціонує таким чином, що один із ланцюгів, який синтезується, росте швидше в порівнянні з другим. Ланцюг, що росте швидше, називають *лідуючим*, а другий – *ланцюгом, що запізнюється*.

Цікаво, що лідируючий ланцюг утворюється ферментним комплексом у вигляді безперервного дуже довгого фрагмента. Його довжина дорівнює $\frac{1}{2}$ відстані між сусідніми точками початку реплікації. Для сперматогоній це 1 600 000 нуклеотидів.



Механізм реплікації у E.coli.

Ланцюг, що запізнюється, утворюється у вигляді серії відносно коротких фрагментів: довжина у *E. coli* біля 1 500 нуклеотидів. Це так названі *фрагменти Оказакі* (у еукаріотів їх довжина біля 100-200 нуклеотидів).

Утворенню кожного фрагмента ДНК (як довгого, так і кожного із фрагментів Оказакі) передуює синтез короткої послідовності, що складається із 10-15 нуклеотидів – *РНК-затравки (праймера)*.

Основний фермент ДНК-полімераза, що синтезує ДНК, не може починати процес «з нуля», коли відсутня олігонуклеотидна послідовність. А фермент синтезу РНК – РНК-полімераза – має таку здатність.

Для синтезу РНК-затравки потрібні рибонуклеозидтрифосфати (рНТФ), їх включення відбувається також за принципом комплементарності відповідно певній ділянці ДНК.

Особливості РНК: в нуклеотидах пептоза містить у положенні 2' -ОН групу, замість тиміну – урацил (не містить -CH₃ групу). Тому РНК не може утворювати 2-х ланцюгову структуру.

РНК-затравки після завершення синтезу фрагментів ДНК видаляються, а їх місця добуваються.

Компоненти ферментного комплексу - 15-20 ферментів, об'єднують у III групи:

1. Білки, що готують батьківську ДНК до реплікації

а) Точка ініціації реплікації на молекулі ДНК має специфічну послідовність, багату на пари АТ. З кожною точкою зв'язуються декілька молекул спеціальних білків. У бактерій такі білки називають *Dna A* (як перші білки, що ініціюють реплікацію; позначають А). Білки-ініціатори з'являються в ядрі клітин, їх концентрація досягає критичного рівня. Ці білки забезпечують зв'язування ДНК-реплікуючого комплексу.

б) Фермент *хеліказа* (від *helix* – спіраль). В молекулі розривається фосфодієфірний зв'язок, відбувається розплітання дволанцюгової ДНК і локальне розділення її ланцюгів. Утворюється Y-подібна структура – *реплікативна вилка*. При цьому використовується енергія гідролізу АТФ – по 2 молекули АТФ на роз'єднання 1 пари нуклеотидів. Одночасно з цієї ділянки ДНК звільнюються білки-гістони та інші.

в) Розплітання спіралі на деякій ділянці створює суперспіралізацію перед цією ділянкою. ДНК в деяких місцях зафіксована в ядерному матриксі. Тому вона не може вільно обертатися під час розплітання будь-якої ділянки. Це і викликає суперспіралізацію, утворюється структурне напруження, яке блокує подальше розплітання подвійної спіралі. Ця проблема розв'язується за допомогою ферментів топоізомераз, які працюють там, де виникає суперспіралізація на нерозплетених ділянках ДНК.

Топоізомераза I розриває один із ланцюгів ДНК, при цьому її проксимальний кінець переноситься на ДНК. Дістальний кінець ДНК, ділянка ДНК (від місця розплітання до місця розриву) обертається навколо відповідного зв'язку цілого ланцюга, що і попереджає утворенню супервитків. Потім кінці розірваного ланцюга замикаються: один із ланцюгів переноситься з ферментом на другий кінець. Топоізомераза I розриває один ланцюг ДНК, викликає релаксацію негативної суперспіралізації. Присутня у прокариотів і еукаріотів.

Топоізомераза II (бактеріальна, *гіраза*) – розриває обидва ланцюга ДНК, відповідні кінці також переносить на себе, АТФ-залежна, викликає релаксацію позитивної суперспіралі.

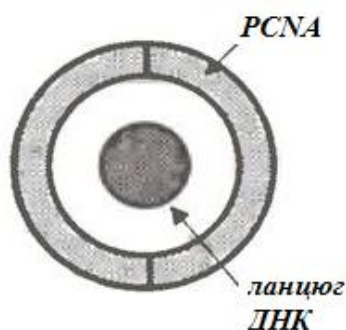
г) Фермент *хеліказа*, яку підтримують топоізомерази, розплітає подвійну спіраль ДНК на два окремих ланцюга.

З кожним із цих ланцюгів зв'язуються спеціальні *SSB-білки* (англ. Single Strand Binding Proteins). *SSB-білки* мають підвищену спорідненість до одноланцюгових ділянок ДНК і стабілізують їх у такому стані. *SSB-білки*, на відміну від гістонів, можуть зв'язуватися в першу чергу з дволанцюговими ділянками ДНК.

2. Ферменти полімеризації

а) Спеціальний білок виконує функції активатора *праймази*, після цього *праймаза* використовує в якості матриці відповідну ділянку одноланцюгової ДНК і синтезує коротку *РНК-затравку* або *праймер*.

б) Потім діють *ДНК-полімерази*. У еукаріот відомо 5 різних *ДНК-полімераз*: β - і ϵ -полімерази – беруть участь в репарації ДНК, γ -полімераза – в реплікації мітохондріальної ДНК, α - і δ -полімерази – в реплікації ядерної ДНК. Вважають, що α -полімераза зв'язана з *праймазою* і з δ -полімеразою, а δ -полімераза – з білком *PCNA* (англ. Proliferating Cell Nuclear Antigen).



Білок *PCNA* виконує роль «прищепки», яка закріплює комплекс полімераз до ланцюгу ДНК, що реплікується. В «замкненому» стані цей білок як кільце охоплює ланцюг ДНК і попереджає дисоціацію полімеру від даного ланцюгу ДНК.

ДНК-полімерази забезпечують поступове включення дезоксирибонуклеотидів в ланцюг ДНК, що будується комплементарно нуклеотидам батьківського ланцюга.

Очевидно, *ДНК-полімерази* мають ще додаткові властивості, але для еукаріотів це не встановлено.

У бактерій реплікація забезпечується *ДНК-полімеразою III*. *ДНК-полімераза III* зв'язується з білком *PCNA*.

ДНК-полімераза III має ще $3' \rightarrow 5'$ екзонуклеазну активність. Екзонуклеаза активується тільки тоді, коли виникає помилка і в новий ланцюг вбудовується «неправильний» нуклеотид. Фермент відщеплює з $3'$ -кінця останній нуклеотид, після чого починає працювати як *ДНК-полімераза*. Таким чином, відбувається постійний контроль системи за результатом діяльності.

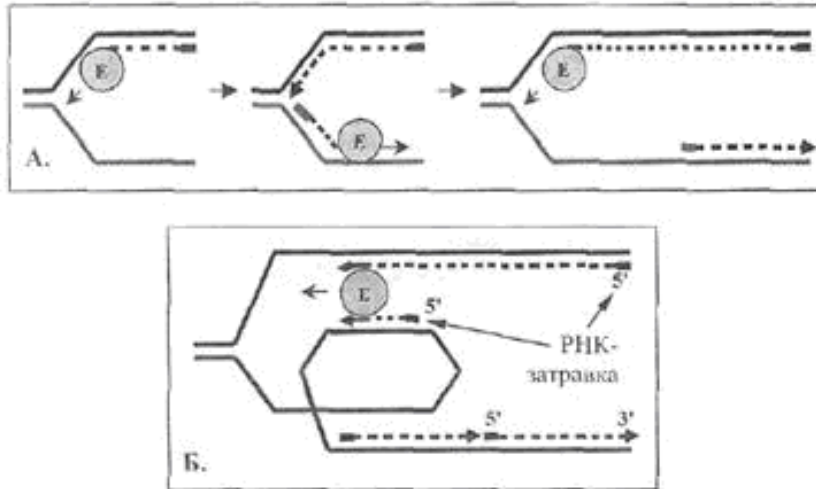
в) Нові ланцюги ДНК утворюються на початку у вигляді фрагментів *Оказакі* (короткі) і довгих фрагментів. Кожний із них починається з *праймерної РНК*. Коли ферментний комплекс, що рухається вздовж батьківського ланцюга, досягає *РНК-затравки* попереднього фрагмента, «зажим», що зв'язує *ДНК-полімеразу III* з батьківським ланцюгом ДНК, розкривається і даний фрагмент припиняє свою діяльність.

г) Проблемою синтезу ланцюгу ДНК, що запізнюється, є напрямок цього синтезу, який протилежний загальному напрямку розповсюдження реплікативної вилки. Щодо цього існує дві гіпотези:

- ферментний комплекс періодично зупиняє утворення лідируючого ланцюга, переходить на другий батьківський ланцюг і синтезує черговий фрагмент *Оказакі* ланцюга, що запізнюється. Потім повертається на перший батьківський ланцюг і продовжує збільшувати довжину лідируючого ланцюга;

- на другому ланцюзі батьківської ДНК (матриці ланцюга, що запізнюється) під час процесу реплікації формується петля.

**Можливі механізми утворення ланцюга,
що запізнюється**



3. Ферменти, що закінчують реплікацію ДНК

В результаті дії усіх попередніх учасників кожний новосинтезований ланцюг складається із фрагментів, що близько розташовані один до одного. Розрив зашиває *ДНК-лігаза*. Як і ДНК-полімерази, ДНК-лігаза утворює міжнуклеотидний (фосфодієфірний) зв'язок.

В полімеразній реакції бере участь вільний дНТФ (дезоксирибонуклеозидтрифосфат), а в ДНК-лігазній реакції – кінцеві дНМФ (дезоксирибонуклеозидмонофосфати) в складі фрагментів, що зшиваються.

Молекула ДНК буде не повністю реплікована, коли не відбудеться спеціальний процес реплікації її кінцевих, або теломерних ділянок. В цьому процесі бере участь фермент *теломераза*.

Вперше цю проблему сформулював А.М. Оловніков в 1971 р. по відношенню до лінійної ДНК.

ДНК-полімеразна система залишає недореплікованими 3'-кінці материнських ланцюгів ДНК, тобто нові ланцюги утворюються з укороченими 5'-кінцями. В кожному новому ланцюзі фрагмент Оказакі, що знаходиться у 5'-кінці, починається з короткої РНК-затравки, яка потім видаляється спеціальною нуклеазою. Але «пусте місце», що при цьому утворюється, не може забудуватись дезоксинуклеотидами, тому що ДНК-полімераза не здатна працювати «з нуля» (потрібен олігонуклеотид), вона тільки збільшує довжину з 3'-кінця. Такого кінця немає, тому новий ланцюг стає коротше вихідної ДНК.

Подібні кінці ДНК (де один ланцюг довше другого) називають гострими, або оверхенгами. Гострі кінці атакуються екзонуклеазами, які понуклеотидно «відрізають» одноланцюгові ділянки. Кінці ДНК стають «тупими».

Деякі вважають, що у людини молекули ДНК зберігають гострі кінці.

При відсутності теломерази поділ клітини призводить до укорочення хромосом. Із двох дочірніх хромосом одна коротше, чим вихідна, з однієї теломери, а друга – з протилежної.

Зменшення довжини молекули ДНК відповідно до довжини РНК-затравки складає 10-15 нуклеотидних пар. Але насправді воно складає більше – 50-65 нуклеотидних пар. Це пов'язано з просторовими розмірами ДНК-полімеразного комплексу: для ефективного зв'язування під час синтезу чергового фрагменту Оказакі потрібна ділянка батьківського ланцюга в декілька десятків нуклеотидів.

Середня кількість нуклеотидних пар в однієї молекули ядерної ДНК у людини – 120 млн. Таким чином, вкорочення ДНК при відсутності теломерази складає за один клітинний поділ $\sim 0,00005\%$. Це дуже мало. Але коли б не було механізму відновлення довжини теломер, то через певну кількість клітинних поділів хромосоми зовсім би зникли.

Буферні теломерні послідовності та проблеми кінцевої недореplikації.

Перший спосіб – на кінцях хромосомних ДНК, в теломерних ділянках хромосом, розташовані спеціальні нуклеотидні послідовності, що часто повторюються, це гексануклеотидні послідовності, які не несуть генетичну інформацію.

(5')...ГГТТАГ (3') – Г-ланцюг

(5')...ЦЦААТЦ (3') – Ц-ланцюг

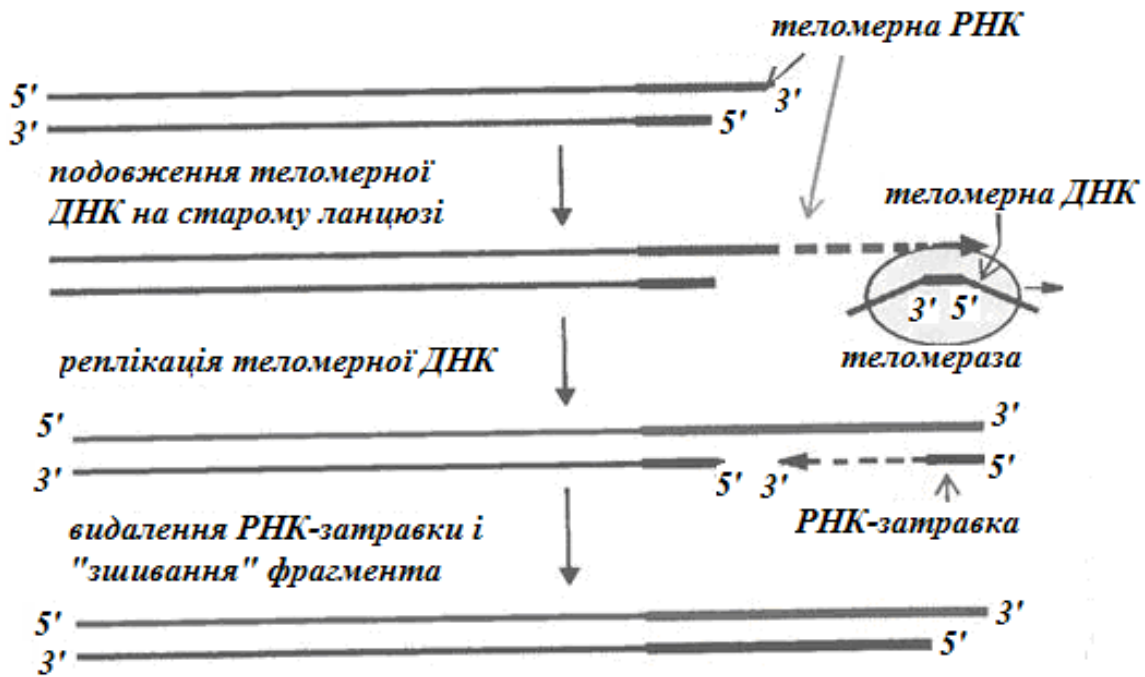
Багаточисельні повтори розташовані у 3'-кінця кожного ланцюга ДНК. За складом цих повторів у кожній теломерній ділянці ДНК розрізняють Г-ланцюг і Ц-ланцюг. Теломерні ділянки ДНК містять тисячі нуклеотидних послідовностей, що часто повторюються. Їх загальна довжина на одному кінці ДНК в однієї теломерної ділянці складає в клітинах ембріона людини 10-15 тисяч пар нуклеотидів. Таким чином, на обидві теломерні ділянки відводиться $\sim 0,02\%$ від середньої довжини молекули ядерної ДНК людини (120 млн. нуклеотидних пар).

Теломерні повтори не несуть генетичної інформації. Тому при відсутності теломерази відбувається втрата деякої частини цих повторів, що не відображується на функціонуванні генома.

Роль теломераз – захист від недореplikації більш важливих ділянок ДНК, вони виконують функцію буфера.

Другий спосіб розв'язання проблеми – добудування недореplikованих ділянок ДНК, що робить теломераза.

Теломераза подовжує не новий вкорочений ланцюг, а старий – більш довгий. Це відбувається до того, як екзонуклеази встигають відрізати і підрівняти старий ланцюг під довжину нового.



До 3'-кінця батьківського ланцюга теломераза послідовно вбудовує декілька десятків або сотень послідовностей – ГГТТАГ. Теломераза подовжує Г-ланцюг тої чи іншої теломери.

Потім збільшений старий ланцюг стає матрицею для утворення ще одного фрагмента Оказакі нового ланцюга (відноситься до Ц-ланцюга). Спочатку з 3'-кінця старого ланцюга праймаза синтезує РНК-затравку, а потім ДНК-полімераза β послідовно приєднує до затравки дезоксинуклеотиди комплементарно теломерним повторам старого ланцюга.

Ріст фрагмента йде в напрямку 5'→3' і припиняється при досягненні з попереднім 5'-кінцем нового ланцюга. ДНК-лігаза зшиває фрагмент з ланцюгом, а потім екзонуклеаза видаляє РНК-затравку на новому ланцюзі.

ДНК має ту ж конфігурацію, що і до дії теломери (новий ланцюг коротше старого ланцюга, але стає довший на серію теломерних повторів). Такий спосіб відновлення довжини теломер існує практично у всіх організмів.

Механізм ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) – альтернативний механізм подовження теломер, відбувається без участі теломери. ALT спостерігається у дрозофіли, а також в деяких пухлинних клітинах. Один із механізмів – рекомбінація між теломерними ділянками різних хромосом. Дві молекули ДНК взаємодіють своїми теломерними кінцями і утворюють гібридні теломери. Більш довгий ланцюг виконує функцію матриці, на якій ДНК-полімеразна система добудовує більш короткий ланцюг. В однієї з двох гібридних теломер є лідуєчий ланцюг і ланцюг, що запізнюється (росте з протилежного кінця у вигляді фрагмента Оказакі). По закінченню процесу або відновлюється негібридна структура теломер, або молекули ДНК обмінюються теломерними фрагментами відповідних ланцюгів. Таким чином, в немейотичній клітині відбуваються явища, що характерні для мейозу.

Структура теломер.

Нуклеосомна структура в теломерах не знайдена. Проте довгі теломери мишей мають нуклеосомну організацію. Самі відомі теломерні білки – білок Rap1 (в дріжджів), аналог – TRF1 (у ссавців). Очевидно, ці білки забезпечують щільну упаковку теломер до фракції гетерохроматина. Така структура забезпечує стабільність теломер. Теломерні повтори недосяжні для теломерази, ДНК-метілази і ендонуклеаз. Також за допомогою теломерних білків теломери кріпляться до компонентів ядерного матрикса.

Функції теломер:

1) механічні:

- а) беруть участь у фіксації хромосом до ядерного матриксу. Це важливо для правильної орієнтації хромосом в ядрі (особливо при мейозі);
- б) теломери з'єднують один з одним кінці сестринських хроматид (які утворюються після S-фази).

2) стабілізаційні:

- а) коли в клітині відсутні теломерази (або ALT), тоді наявність теломер захищає від недореплікації ділянки ДНК, де знаходяться гени;
- б) коли в клітині є теломеразна активність, тоді з'являється ще одна можливість стабілізації кінців розірваних хромосом (при випадковому розриві хромосом).

3) вплив на експресію генів: цю властивість теломер називають ефектом положення – активність генів, що розташовані поряд з теломерами, знижена (репресована). Такий ефект називають *транскрипційним мовчанням*, або *сайленсингом*. Під час укорочення теломер ефект положення зникає і прителомерні гени активуються.

- а) Сайленсинг – це результат дії білків RAP або TRF1, що взаємодіють з теломерами. Ці білки знижують доступність теломерної ДНК для ферментів.
- б) Ефект положення обумовлений тим, що близько розташована ядерна мембрана. Згідно гіпотези Оловнікова, в ядерній мембрані розташовані Ca^{2+} -канали, і потік іонів Ca^{2+} впливає на взаємодію білків з близько розташованими ділянками ДНК.

Ефект положення має вплив на транспозони (гени, які здатні до переміщення вздовж ДНК і можуть вбудуватися в теломерну ділянку).

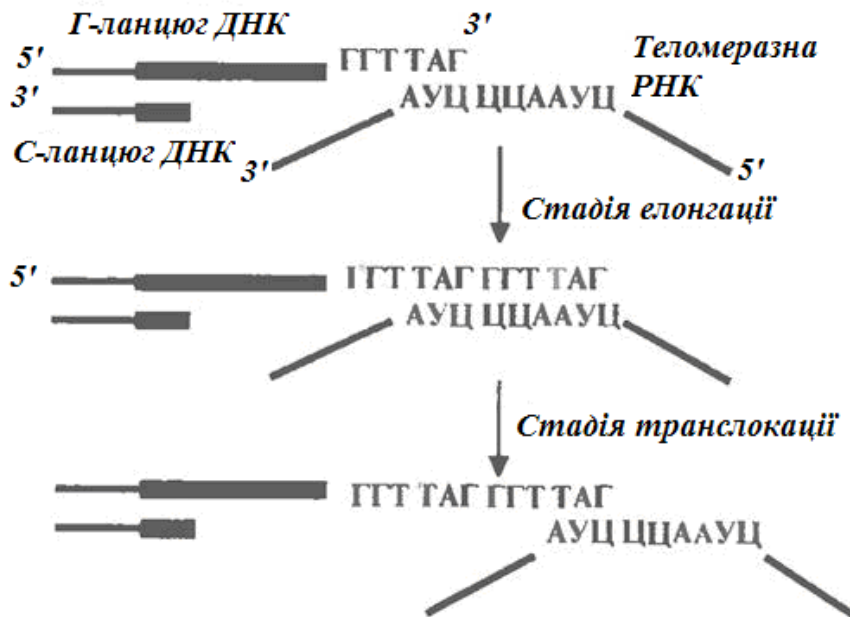
4) «рахувальна» функція. Теломерні ділянки ДНК працюють у якості реплікометра (пристрою, що рахує години); вони рахують кількість поділів клітини після зникнення теломеразної активності. Важливо, *скільки поділів ще залишилось до критичного зменшення довжини (хромосоми) теломери.*

Теломераза - це своєрідний пристрій, що визначає кількість поділів, які здатна зробити нормальна клітина при відсутності теломерази.

Механізм дії теломерази. Теломераза подовжує Г-ланцюг кожної теломери. Встановлено, що з теломеразою зв'язана теломеразна РНК довжиною біля 450 нуклеотидів. Її середня коротка ділянка комплементарна 1,5 теломерним повторам:

(3').....АУЦ ЦЦА АУЦ.....(5')

Лівий триплет цієї РНК (АУЦ) використовується як матриця для подовження 3'-кінця Г-ланцюга на один теломерний повтор. Включення нуклеотидів каталізується теломеразою.



Теломераза діє як зворотня транскриптаза – фермент, що синтезує ДНК на РНК-матриці. Напрямок подовження ланцюга ДНК – від 5'→3'.

Процес утворення нового теломерного повтору позначають як *елонгація*.

Потім відбувається *транслокація* – переміщення ферменту разом із своєю РНК вздовж ланцюга ДНК, що подовжується на один повтор, до 3'-кінця. У процесі транслокації РНК втрачає зв'язок з ДНК, потім цей зв'язок поновлюється.

Теломеразна теорія онкогенезу.

У реплікації ДНК беруть участь ферментні комплекси (15-20 різних білків), які можна поділити на 3 групи:

1 – *білки, що готують батьківську ДНК до реплікації*. Початок реплікації – спеціальна послідовність, багата на АТ; білки впізнають нуклеотид А.

Фермент геліказа розкручує подвійну спіраль з утворенням реплікативної вилки, енергетичні витрати – 2 молекули АТФ на одну пару нуклеотидів. При розплетенні виникає суперспіралізація ДНК, яка знімається за участі ферментів топоізомераз. Геліказа і топоізомераза працюють за допомогою SSB-білків, які зв'язуються з одноланцюговими ДНК.

2 – *ферменти полімеризації*. Фермент праймаза синтезує коротку РНК-затравку, або праймер. Потім діють ДНК-полімерази.

3 – *ферменти, що завершують реплікацію ДНК*. Ферменти лігази зшивають фрагменти ДНК. ДНК-лігаза об'єднує тільки такі одноланцюгові фрагменти, які входять до складу дволанцюгової ДНК. Але молекула ДНК не буде реплікованою до кінця, поки не відбудеться спеціальний процес – *реплікація кінців, або теломерних ділянок!*

В цьому процесі провідну роль має фермент теломераза. Середня кількість нуклеотидних пар в одній молекулі ядерної ДНК людини – 120 млн.

ДНК зменшує свою довжину при відсутності теломерази за один клітинний поділ на 0,00005%. Це дуже мало, але якщо б зовсім не існувало б механізму відновлення довжини теломер, тоді через певну кількість поділів хромосоми б зовсім зникли.

Проблема кінцевої недореplikації хромосом має біологічне значення – вона пояснює такі процеси як старіння і канцерогенез.

Нормальні соматичні клітини діляться у культурі обмежено – певну кількість разів. На відміну від цього, пухлинні клітини у поділі не обмежені, їх популяція може подвоюватися безмежно. Через цю особливість пухлинні клітини називають *іморталізованими* (безсмертними).

Подовження теломер – лише одна із ключових подій іморталізації, проте необхідна: без нього іморталізація неможлива. Проте це зовсім не ініціююча та недостатня подія.

На теломеразну активність були протестовані декілька тисяч зразків людських пухлин. 85% злоякісних новоутворень мали теломеразну активність, винятки – деякі злоякісні пухлини голови, де теломеразу знайшли лише у 40–60% випадків. У доброякісних пухлин частота виявлення теломерази – 27%, як у нормальних тканинах. Тому теломеразу вважають біохімічним маркером злоякісних пухлин людини.

Теломеразна теорія старіння. Кожна клітина має критичну кількість поділів – ліміт Хейфліка. Оловніков А.М. звернув увагу на те, що для репликації теломерних відділів ДНК потрібен спеціальний механізм. Саме це дало початок *теорії маргіномії* (теломерна теорія старіння). У соматичних клітин механізм репликації теломер відсутній, тому при поділі клітин теломери поступово стають коротшими. Довжина теломер наближається до критичного рівня і тоді клітини починають старіти, а коли досягають критичного рівня – гинуть.

Теорія маргіномії пояснює феномен Хейфліка – експериментальний доказ першого постулату Вейсмана про те, що соматичні клітини мають обмежену здатність до поділу. Одночасно теорія пов'язана і з другим постулатом Вейсмана – у статевих клітинах старіння відсутнє. У всіх клітинах статевої лінії функціонує механізм підтримки довжини теломер.

У еукаріотів ДНК реплікується в складі хроматину, в якому вона міцно пов'язана з білками, які належать до класу гістонів – нуклеосомами. Нуклеосоми розташовуються вздовж молекули ДНК з інтервалами 200 пар основ. Цим можна пояснити той факт, що нові фрагменти ланцюга ДНК, що запізнюється, закладаються у еукаріотів з інтервалами в 10 разів більш короткими (від 100 до 200 нуклеотидів), ніж у бактерій (від 1000 до 2000 нуклеотидів). Нуклеосоми слугують бар'єрами, які на певний час зупиняють просування ДНК-полімерази, наявність хроматину (а не «голої» ДНК) може, очевидно, пояснити і те, що реплікативні вилки рухаються у еукаріотів приблизно в 10 разів повільніше, ніж у бактерій.

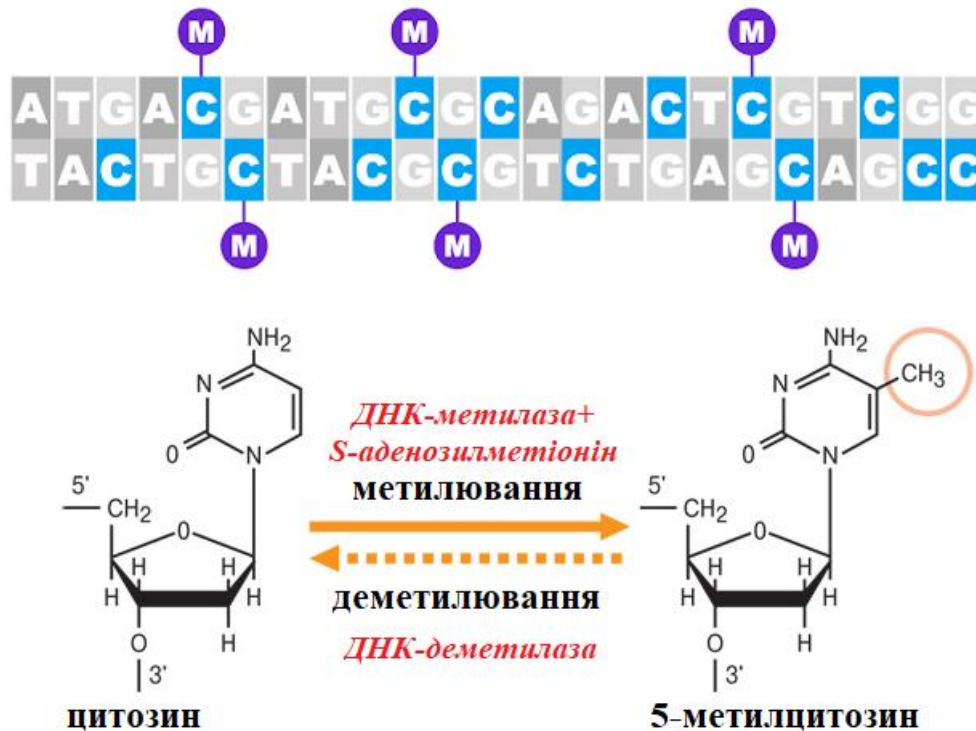
Відмінності в реплікації у прокаріотів та еукаріотів	
<i>Прокаріоти</i>	<i>Еукаріоти</i>
5 ДНК-полімераз (I, II, III, IV, V)	5 ДНК-полімераз (α , β , γ , δ , ϵ)
Функції полімераз: I: синтез, корекція, репарація, вирізання РНК-праймера; II: репарація; III: головний полімеризуючий фермент; IV: репарація за невідомих умов; V: репарація за невідомих умов.	Функції полімераз: α : полімеризуючий фермент; β : репарація; γ : синтез ДНК мітохондрій; δ : головний полімеризуючий фермент; ϵ : невідома функція.
Полімераза є екзонуклеозою	Не всі полімерази є екзонуклеазами
Одна точка початку реплікації	Декілька точок початку реплікації
Фрагменти Оказакі розміром 1000-2000 залишків	Фрагменти Оказакі розміром 150-200 залишків
ДНК не асоціюється з білками	Білки-гістони формують комплекс з ДНК

6. Метилування ДНК

Цей процес модифікації відбувається безпосередньо за реплікацією ДНК, або значно пізніше.

Метилування цитозину в ДНК еукаріотів.

В ядрах і в мітохондріях еукаріот містяться ферменти *ДНК-метилази*, вони каталізують перенесення CH_3 -групи від активної форми метіоніну (*S*-аденозилметіоніну, або SAM) на певні нітратні основи ДНК.



ДНК-метилаза метилує в ДНК залишки цитозину і перетворює їх в 5-метилцитозин. Метилується тільки біля 5% залишків цитозина, один із 20. Залишки 5-метилцитозину в ДНК розташовані нерівномірно, а згруповані в певних локусах – в центромірних ділянках ДНК, промоторних послідовностях деяких генів (місцях зв'язування РНК-полімерази), а також, можливо, в спейсерах (міжнуклеосомних ділянках ДНК).

Метилування цитозину в 5-му положенні підсилює взаємодію з комплементарним залишком гуаніну. Зв'язок між $\text{Г} \equiv \text{Ц}$ є більш міцним, ніж між $\text{А} = \text{Т}$. В результаті метилування цитозину 2-х ланцюгова структура відповідного локусу ДНК як би закріплюється додатковим «замком».

Функції метилування ДНК:

- бере участь в регуляції активності генів (є позитивна кореляція між функціональною активністю клітин і вмістом 5-метилцитозину). Найбільш метильована ДНК клітин мозку і печінки, а в мозку - ДНК клітин великих півкуль і кори мозочка; метилуються промотори генів регуляторних білків (наприклад, білка p53), які репресують функціональну активність клітини;
- метилування центромірних ділянок попереджає їх передчасну реплікацію.

7. Репарація пошкоджень ДНК

Репарація генетичних пошкоджень – властивість живих організмів відновлювати порушення і пошкодження, що виникають в ДНК в результаті помилок реплікації, а також при впливі різних ендогенних і екзогенних мутагенних факторів. **Пошкодження ДНК – це не мутація.** Мутація – це спадкова (фіксована) зміна в нуклеотидній послідовності генома організма.

У бактерії *E.coli* відомо біля 5 генів, що контролюють процеси репарації. В середньому в процесі реплікації геному ссавців довжиною 3 млрд. нуклеотидів виникає не більше 3 помилок. Щоденно в молекулах ДНК кожної клітини у людини біля 100000 ланок пошкоджуються за рахунок різних ендогенних процесів і екзогенних генотоксичних впливів. Менше 1 пошкодження ДНК із 1000 перетворюється на мутацію.

Агенти, які пошкоджують ДНК: зовнішні промені (ультрафіолетові, інфрачервоні, радіоактивні і інші); самовільні локальні зміни температури, вільні радикали, хімічні мутагени і т. д.

Основні пошкодження ДНК:

- алкілування;
- піримідиновий димер (під дією ультрафіолетових променів);
- одноланцюгові розриви (під дією іонізуючого опромінення);
- дволанцюгові розриви (під дією іонізуючого опромінення);
- 8-оксигуанін (під дією активних форм кисню);
- АП-сайт (апуриновий сайт) (в результаті гідролізу N-гілкозидного зв'язку за нормальних фізіологічних умов);
- міжланцюгова зшивка (під дією мітоміцину С, азотистого іприту тощо);
- зшивка ДНК-білок;
- помилка спарювання.

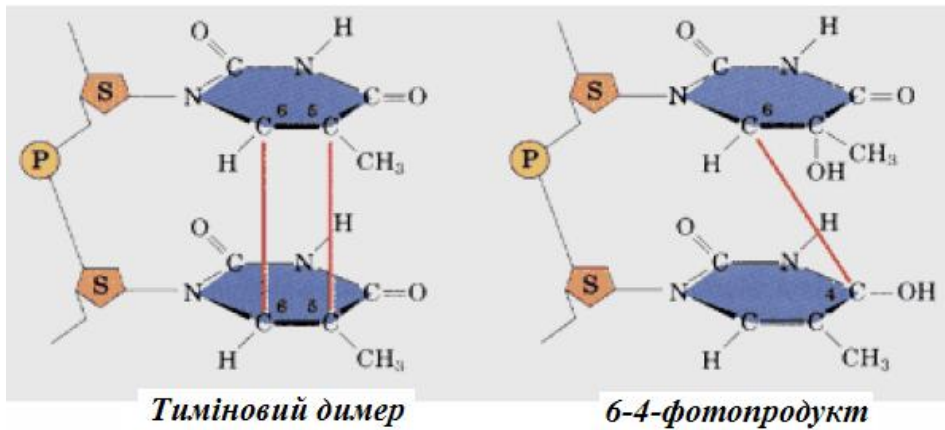
Пошкодження нітратних основ:

а) гідролітичне видалення основ: відбувається спонтанно, а також під дією різних факторів; пентозофосфатний остов ланцюга при цьому зберігається.

Дуже швидко видаляються пуринові основи. За добу в диплоїдній клітині молекули ДНК втрачають $5 \cdot 10^4$ таких основ. Коли б не було репарації, то за 70 років в кожній клітині, що не поділяється, ДНК втратило б біля 25% пуринових основ;

б) гідролітичне дезамінування основ – втрачається не ціла основа, а тільки аміногрупа (NH₂-група). Під час цього процесу цитозин перетворюється на урацил, 5-метилцитозин на тимін, аденін на гіпоксантин, основу, що не міститься в нормі ні в ДНК, ні в РНК;

в) утворення димерів тиміну ініціюється ультрафіолетовими променями і відбуваються там, де два тимидилових нуклеотида розташовані поряд в ланцюзі ДНК **T-T**. Між їх основами замикаються два ковалентних зв'язки. В результаті в цьому локусі ДНК порушується структура подвійної спіралі і тому порушується здатність брати участь в синтезі ДНК і РНК.



Пошкодження ланцюгів ДНК:

а) одноланцюгові розриви виникають тоді, коли між сусідніми нуклеотидами ланцюга ДНК руйнується фосфодієфірний зв'язок. Таке пошкодження часто виникає під впливом рентгенівських і радіоактивних променів. При накопиченні в ДНК великої кількості розривів порушується структура хромосом, що призводить до появи хромосомних аберацій (видимих пошкоджень хромосом);

б) поперечні зшивки – це ковалентні зв'язки 2-х видів:

- ДНК-ДНК (між основами двох ланцюгів ДНК),
- ДНК-білок (між ланцюгом ДНК і будь-яким білком хромосоми).

Такі зшивки блокують в певному локусі синтез ДНК і РНК, порушують процеси розходження ланцюгів ДНК.

Приклади репарації ДНК:

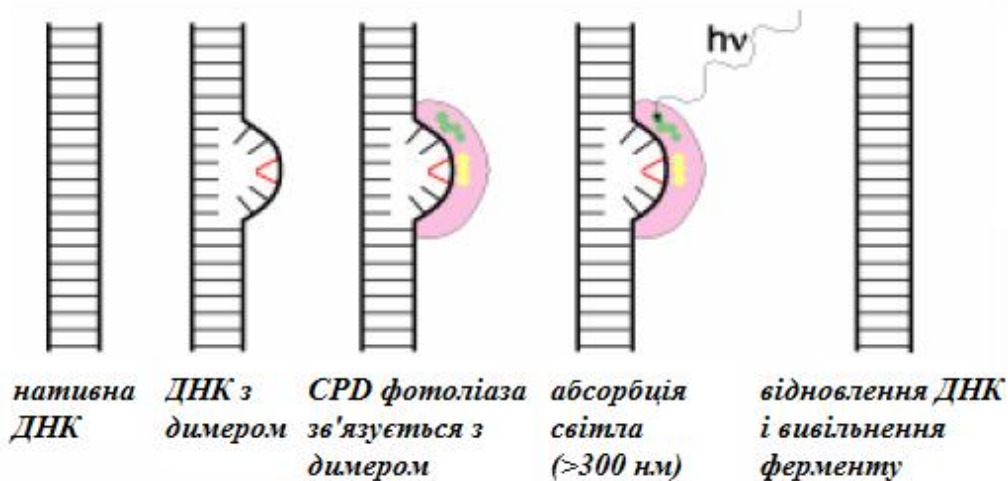
- репарація неспарених основ,
- відновлення вихідної структури,
- ексцизійна репарація – вирізання основ, нуклеотидів,
- постреплікативна репарація – рекомбінаційна репарація, SOS-репарація (мутагенний або «помилковий» шлях репарації).

Загальний принцип репарації ДНК полягає в тому, що вірогідність одночасного пошкодження в одному локусі відразу обох ланцюгів малоімовірна. Тому один із ланцюгів (непошкоджений) може слугувати матрицею для відновлення нормальної структури пошкодженого ланцюга.

Пряма репарація – процес усунення пошкоджень в молекулі ДНК за рахунок дії одного ферменту в одному акті біохімічної реакції.

Непряма репарація – процес усунення пошкоджень в молекулі ДНК, який відбувається у декілька послідовних хімічних реакцій, до яких залучена велика кількість білків.

У рослин і бактерій тимінові димери (Т-Т) можуть видалятися за допомогою *прямої фоторепарації*. Фоторепарація відбувається за участю ферменту *фотоліази* (мономерний флавін-залежний фермент, кофактори: ФАДН- і 5,10-метенілтетрагідрофолат), який використовує енергію світла і розриває ковалентний зв'язок між залишками тиміну. Фотоліаза зв'язується в темряві з димерами Т-Т; на світлі кофактор абсорбує фотон та використовує цю енергію для розщеплення Т-Т.



У бактерій функціонує інший механізм (мабуть, такий спосіб і у тварин, і у людини):

- видалення (ексцизія – вирізання) із пошкодженого ланцюга фрагмента, що містить тиміновий димер;
- ресинтез аналогічного фрагмента *de novo*.

У бактерій є фермент *ексцизунуклеаза*, який знаходить місце пошкодження і розриває з двох боків від цього місця відповідний ланцюг ДНК. Видаляється фрагмент (12–13 нуклеотидів), який містить тиміновий димер.

У людини і тварин функціонує *репараційна ендонуклеаза II*, яка розриває міжнуклеотидний зв'язок з одного боку (5') від димера. Потім спеціальна екзонуклеаза почергово відщеплює до 100 нуклеотидів.

Ресинтез фрагмента відбувається ДНК-полімеразою β , міжнуклеотидний зв'язок утворюється ДНК-лігазою.

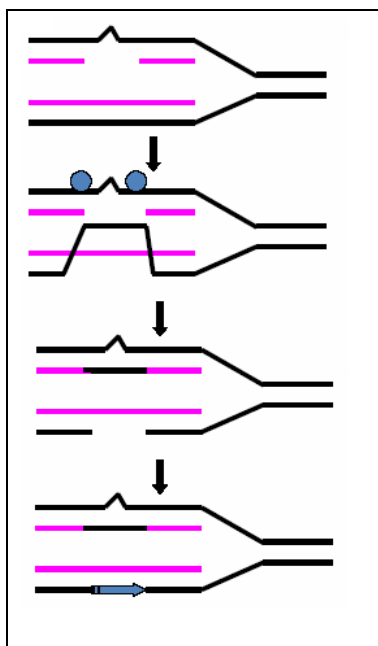
Залишки урацилу можуть з'являтися в структурі ДНК в результаті гідролітичного дезамінування цитозину. В репарації такого порушення приймають участь 5 ферментів: урацил-ДНК-глікозидаза (специфічна до такого типу порушень), репараційна ендонуклеаза I, екзонуклеаза, ДНК-полімераза β , ДНК-лігаза. В порівнянні з репарацією тимінових димерів, яка триває від 2 до 24 годин, цей процес відбувається набагато швидше – від 5 хв до 2 годин.

Проте цей механізм не може виправляти подібне пошкодження – дезамінування 5-метилцитозину з утворенням тиміну, оскільки тимін є нормальною основою ДНК і для її видалення не існує ферменту. Репарація такого пошкодження може бути заснована тільки на впізнання дефекту спарювання в парі Т-Г (яка замінила пару 5-метилЦ-Г). Проте до кінця цей процес ще не вивчено і тому існує думка, що дезамінування 5-метилцитозину не репарується. Таким чином, спонтанне дезамінування 5-метилцитозину в статевих клітинах, якщо воно відбувається, може змінювати генетичний зміст відповідних локусів ДНК та успадковуватися нащадками.

Ексцизійна репарація поділяється на:

- 1) *міс-метч репарацію* – виявлення некомплементарної пари тільки на дочірньому ланцюзі ДНК і заміна неправильної основи тільки на дочірньому ланцюзі;
- 2) *ексцизійна репарація основ* – ДНК-глікозилази розпізнають аномальні основи ДНК і каталізують гідролітичне розщеплення N-глікозильного зв'язку між основою і цукром; в результаті утворюється апуриновий / апіримідиновий сайт, який розпізнається специфічною ендонуклеазою, яка вводить в ланцюг ДНК розрив; фосфодиестераза відщеплює від ДНК залишок цукру і фосфатної кислоти, до якого не приєднаний залишок основи; «дірку» розміром в один нуклеотид заповнює ДНК-полімераза I і кінці ДНК з'єднуються ДНК-лігазою; в кожній клітині ссавців за одну 20-годинну генерацію спонтанно виникає біля 10000 апуринових сайтів і біля 500 – апіримідинових;
- 3) *ексцизійна репарація нуклеотидів*: починається із розпізнавання пошкодження; зв'язування мультисубодиничного комплексу з пошкодженим сайтом; потім відбувається подвійне надрізання пошкодженого ланцюга на декілька нуклеотидів від пошкодженого сайту в обох напрямках 5' і 3'; відбувається вивільнення олігонуклеотида, що містить пошкодження між двома надрізами, та заповнення вільного місця, що утворилось, за допомогою ДНК-полімерази з подальшим лігуванням кінців.

У еукаріотів система ексцизійної репарації нуклеотидів функціонує за тією ж схемою, як і у бактерій, але організована більш складніше і працює більш ефективно порівняно з бактеріями. Еукаріотична ексцизійна ендонуклеаза включає щонайменше 17 білків і при ексцизії вирізається 29 нуклеотидів.



Постреплікативна репарація полягає в репарації пробілів, що утворюються в дочірніх ланцюгах навпроти невиданих в ході реплікації димерів. Основна частина таких пробілів репарується шляхом рекомбінаційних обмінів між двома сестринськими ланцюгами. В процесі використовуються ферменти ДНК-полімераза I і лігаза, і білок ResA.

SOS-репарація. Ключова роль в SOS-індукції належить білку ResA, який зв'язується з білком SSB із одноланцюговою ДНК і утворює ДНК-білкові філаменти, які є активною формою білка і позначаються ResA*. ResA* є сигналом, що запускає індукцію SOS-регулона (біля 30 генів), продукти яких

необхідні для виживання клітини при масових пошкодженнях ДНК. В SOS-регулон входять гени UmuD, UmuC і DinB, продукти яких необхідні для «обхідної» (translesion) реплікації. Обхідна реплікація є неточною, схильною до помилок, в результаті якої зростає частота мутацій.



Хвороби, що асоційовані з дефектами системи репарації:

- пігментна ксеродермія (дефект нуклеотид-ексцизійної репарації) – при цьому дефекті шкіра стає дуже чутливою до світла; ультрафіолетове випромінювання провокує утворення димерів тиміну;
- тріхотіодистрофія (дефект нуклеотид-ексцизійної репарації);
- неполіпозний рак прямої кишки (дефект міс-метч репарації);
- анемія Фанконі (можливо, дефект репарації міжланцюгових зшивок).

Передчасне старіння також пов'язане з ослабленням функціонування систем репарації ДНК.

8. Експресія генів і транскрипційні фактори

В молекулі ДНК міститься певна генетична інформація про:

- структури усіх білків і РНК організму;
- порядок реалізації цієї інформації в різних клітинах у процесі онтогенезу і під час різних функціональних станів.

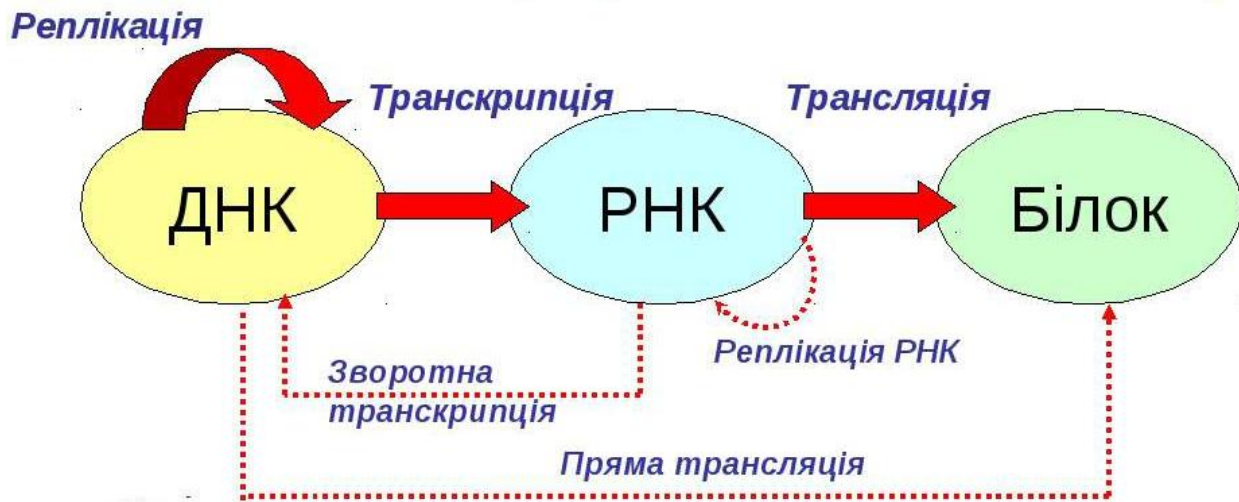
Всі клітини в межах певного організму містять у своїх ДНК однакову генетичну інформацію (тільки у лімфоцитів в процесі формування відбувається перебудова генів імуноглобулінів).

У процесі реплікації ДНК генетична інформація відтворюється повністю і потім передається дочірнім клітинам. Але потрібно, щоб ця інформація ще була реалізована, тобто *експресована*. Експресія відбувається не всіх генів, а тільки невеликої їх частини. Тому спектр функціонуючих генів і їх активність обумовлюють особливості тих чи інших клітин.

Експресія генетичної інформації про структуру певного білка відбувається у два етапи:

- *транскрипція*;
- *трансляція*.

Напрямок та механізм передачі генетичної інформації відображає центральна догма молекулярної біології



8.1. Організація генетичного матеріалу у прокаріотів та еукаріотів

В молекулі ДНК міститься певна генетична інформація про:

- структури усіх білків і РНК організму;
- порядок реалізації цієї інформації в різних клітинах у процесі онтогенезу і під час різних функціональних станів.

Всі клітини в межах певного організму містять у своїх ДНК однакову генетичну інформацію (тільки у лімфоцитів в процесі формування відбувається перебудова генів імуноглобулінів).

У процесі реплікації ДНК генетична інформація відтворюється повністю і потім передається дочірнім клітинам. Але потрібно, щоб ця інформація ще

була реалізована, тобто *експресована*. Експресія відбувається не всіх генів, а тільки невеликої їх частини. Тому спектр функціонуючих генів і їх активність обумовлюють особливості тих чи інших клітин.

Експресія генетичної інформації про структуру певного білка відбувається у два етапи:

- *транскрипція*;
- *трансляція*.

Інформація про структуру білків і РНК міститься в ділянках ДНК, які називаються генами і цистронами.

Ген – це ділянка ДНК з певною послідовністю нуклеотидів, яка необхідна та достатня для синтезу функціонального РНК-продукту.

Псевдогени – нефункціональні копії відповідних генів.

Цистрон – ділянка ДНК, що кодує один поліпептидний ланцюг.

Коли білок складається із різних поліпептидних ланцюгів, тоді його ген включає декілька цистронів (це стосується бактерій). У тварин і людини цистрони часто розташовані у різних хромосомах і їх теж називають генами: наприклад, ген α -ланцюгу і ген β -ланцюгу гемоглобіну.

У хромосомах також містяться гени різноманітних видів РНК.

Геном – сукупність послідовностей ДНК клітини в гаплоїдному наборі.

У геномі бактерій міститься біля 2500 цистронів. У хромосомах людини - біля 30000.

У еукаріотів в генах містяться *екзони* (*кодуючі ділянки*) і *інтрони* (*некодуючі ділянки*). Кількість інтронів від 2^x до декількох десятків. Наприклад, у гені білка міозина міститься 50 інтронів; у геномі деяких організмів інтрони можуть займати біля 90%.

Між генами знаходяться ділянки, які називаються *спейсерами*, що виконують наступні функції:

- структурну;
- правильне укладання нуклеосомної фібрили у вищі рівні;
- прикріплення хромосоми до апарату центріолей;
- містять специфічні локуси, що зв'язують певні білки;
- зв'язують білки, що виконують регуляторні функції.

Ділянка, в якій відбувається зв'язування РНК-полімерази з ланцюгом ДНК, називається *промотором*. Промотори містяться з початку гена (або групи генів), або можуть бути відділені від гена іншими функціональними локусами.

Характерний компонент промоторів у *E.coli* має назву *бокс Прибнова* (послідовність Прибнова):

(5') – TAT AAT – (3')

(3') – ATA TTA – (5')

Він розташований через 15 н. п. від стартової точки транскрипції. Довжина промотора – декілька десятків пар нуклеотидів.

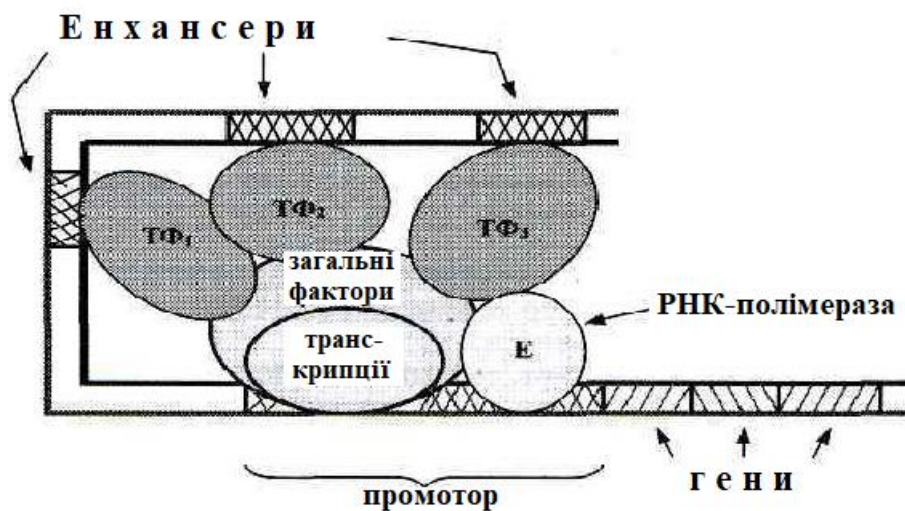
У еукаріотів РНК-полімераза зв'язується з ДНК разом з комплексом білків – так названих загальних факторів транскрипції. У промоторі еукаріотів

міститься невелика ділянка ініціації, ТАТА-бокс (який подібний до боксу Прібнова у бактерій) та інші.

Ділянки, що зв'язують білки-регулятори, у бактерій називають *операторами*. При певних умовах з оператором зв'язується специфічний білок-репресор, що призводить до блокування роботи РНК-полімерази.

У еукаріотів (і у людини) регуляція активності генів відбувається не тільки за допомогою білків-репресорів, а й білків-активаторів. Ці білкові молекули називаються *транскрипційними факторами*.

Локуси ДНК, що зв'язують транскрипційні фактори, які підвищують активність тільки певних генів, називають *енхансерами*. Енхансери можуть розташовуватись далеко від генів, що активуються, на відстані декількох тисяч нуклеотидних пар. ДНК утворює петлі, енхансери зближуються з промоторною ділянкою і за участі транскрипційних факторів утворюють багатокомпонентний комплекс, що впливає на активність відповідних генів.



Функціональні відділи в ДНК у еукаріотів

Для деяких генів у клітині може міститися декілька енхансерів, які віддалені один від одного. Усі вони в результаті вигинання ДНК збираються приблизно в одному місці простору.

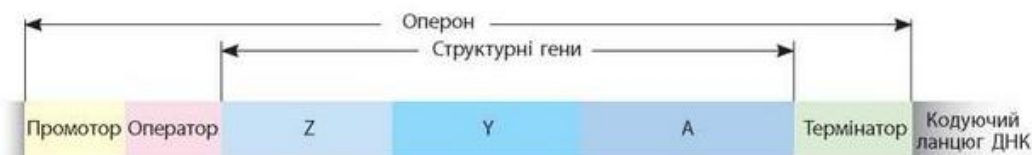
ДНК може містити короткі локуси, які слугують сигналами про термінацію транскрипції. У бактерій ділянки з такою функцією часто містяться перед генами і називаються *атенюаторами*. Ділянки, які також визначають термінацію транскрипції та містяться після генів, називаються *термінаторами*.

загальна схема будови гена



У бактерій гени ферментів, які каталізують ряд послідовних реакцій, часто об'єднуються в одну структурно-функціональну одиницю – *оперон*. Крім генів ферментів до складу оперону входять промотор (місце зв'язування РНК-полімерази) і оператор (місце зв'язування білка-репресора). Білок-репресор кодується спеціальним геном-регулятором, який часто до складу оперону не входить.

Будова оперона прокаріотичного організму



Принцип регуляції активності оперона полягає в тому, що на спорідненість білка-репресора до оператора можуть впливати метаболіти того ланцюга реакцій, ферменти якого кодуються даним опероном.

Розрізняють оперони двох типів:

- *індуцибельні оперони* (регулятор – вихідний субстрат, який стимулює реакції свого метаболізму – приклад прямого позитивного зв'язку),
- *репресибельні оперони* (регулятор – кінцевий продукт, який гальмує реакції, які призводять до його утворення – приклад негативного зворотного зв'язку).

Прикладом індукцибельних оперонів є лактозний оперон, а репресибельних – триптофановий оперон.

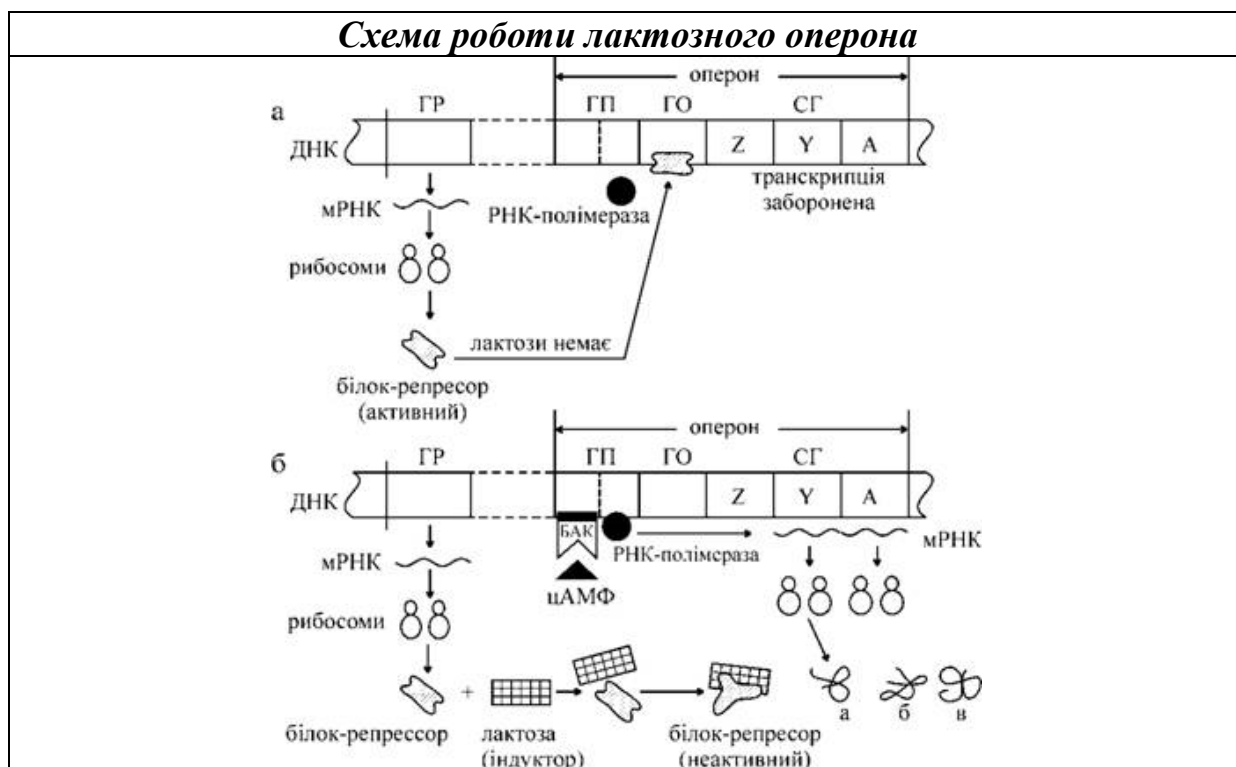
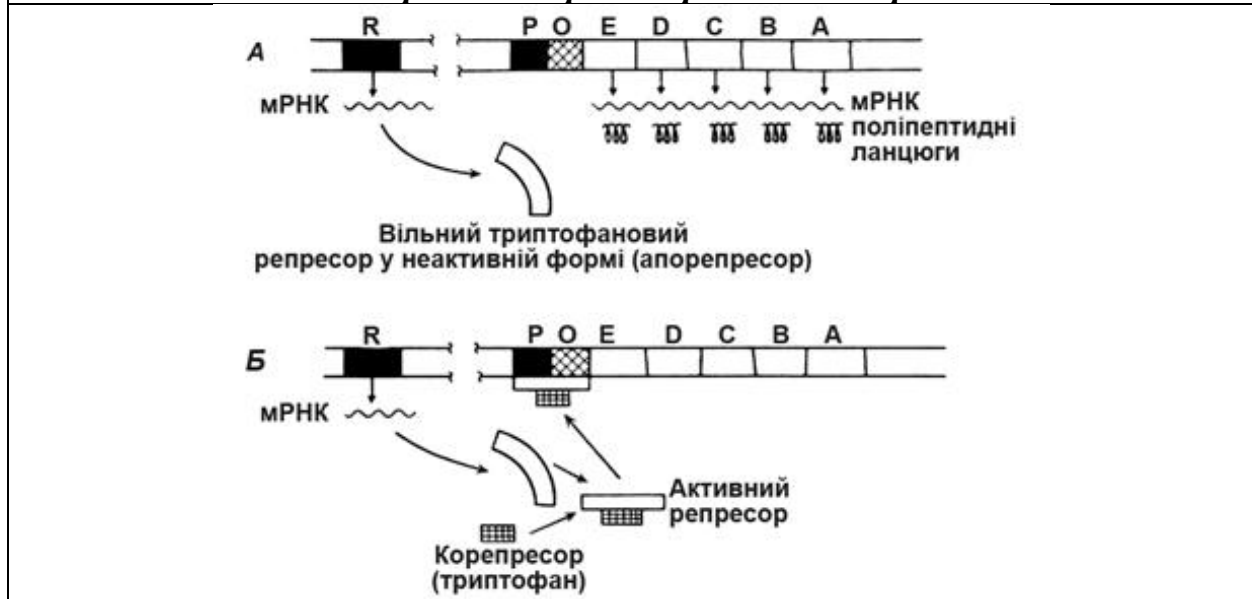


Схема роботи триптофанового оперона



Проте не всі гени організовуються в оперони. Багато генів є *конститутивними*, тобто вони увесь час залишаються активними. Проте швидкість транскрипції різних конститутивних генів може не співпадати. Це може бути пов'язане з різною спорідненістю промоторів до РНК-полімерази або з певними нюансами будови самої РНК-полімерази. Зокрема, за різних умов існування бактеріальної клітини утворюються різні σ -фактори (одна із субодиниць РНК-полімерази), які розпізнають різні промотори.

Гени еукаріотів відрізняються наявністю інтронів, а також присутністю в геномі генів, що багаторазово повторюються.

Наприклад, кожний із 5 видів гістонів (H_1 , H_{2a} , H_{2b} , H_3 і H_4) кодується відповідним геном.

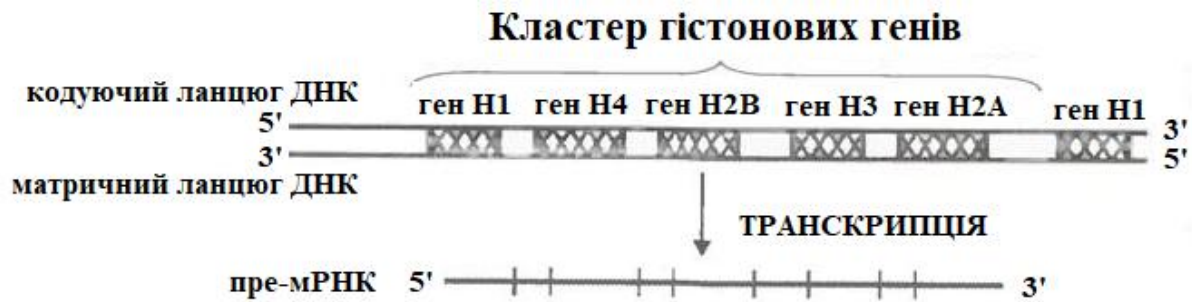
Особливості організації генів, що кодують гістони:

- усі 5 гістонових генів згруповані в єдиний кластер, його довжина ~ 6900 н. п.;

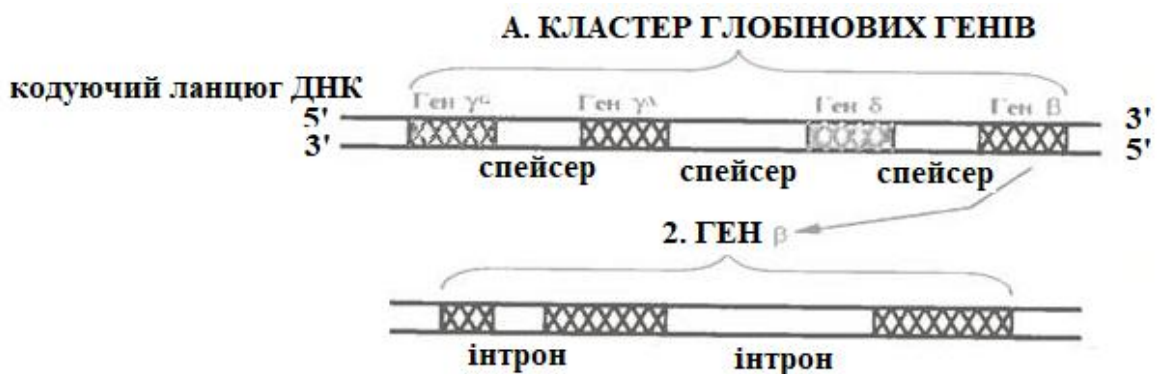
- ці кластери повторюються у геномі багато разів – у людини ~ 35 разів (у гаплоїдному наборі хромосом), у морського їжака – 300-1000 разів. Це прискорює швидкість синтезу гістонів в S-фазі клітинного циклу.

У хромосомі кластери розташовані тандемно один за одним. У різних кластерах однотипні гістонові гени, очевидно, не завжди повністю ідентичні. Тому гістони – це група дуже подібних білків, але між ними є відмінності. У всіх кластерах гени розташовані з однаковою послідовністю і розділені спейсерами, які складають $\sim 70\%$ загальної довжини кластера. Особливістю гістонових генів є відсутність у них інтронів, а також високий вміст пар ГЦ у гені H_3 (0,52), тоді як в середньому на загальну довжину ДНК у людини вміст пар ГЦ дорівнює 0,39. У людини і більшості еукаріот усі 5 гістонових генів кодуються одним і тим же ланцюгом ДНК. У дрозофіли в кластері гістонових генів (H_1 , H_{2A} і H_3) кодуючим є один ланцюг ДНК, а в кластері (H_{2B} і H_4) – інший ланцюг ДНК. Крім дрозофіли, у еукаріот кластер гістонових генів транскрибується як єдине ціле – у вигляді довгої пре-м-РНК, яка містить

інформацію про усі 5 гістонових білків. При дозріванні пре-м-РНК розрізається на 5 окремих гістонових мРНК.



Ще одним цікавим прикладом є гени гемоглобіну. В нормі зустрічається 4 види гемоглобіна (Hb), до складу яких входять субодиниці 5 видів: Hb A (субодиниці $\alpha_2\beta_2$) і Hb A₂ (субодиниці $\alpha_2\delta_2$), який зустрічається у дорослих, Hb ембріона (субодиниці $\alpha_2\varepsilon_2$) і Hb F – гемоглобін плоду (субодиниці $\alpha_2\gamma_2$). При цьому в Hb F γ -ланцюг буває двох видів: γ^G і γ^A (відмінність за одним амінокислотним залишком). Відповідно білкова частина Hb кодується 6-ма генами: α , β , δ , ε , γ^G і γ^A (крім того, декілька генів кодують ферменти синтезу гему – небілкового компоненту Hb). На відміну від генів гістонів, гени Hb вважаються унікальними, оскільки представлені невеликою кількістю копій. При цьому α -ген глобіна знаходиться в іншій хромосомі, аніж інші, та повторюється двічі. 4 глобінових гена γ^G , γ^A , δ і β об'єднані в кластер, який повторюється декілька разів. Таке розташування генів має такі пояснення: 1) гени, що входять до кластера, утворилися в еволюції із одного гена, який декілька разів подвоюється; після цього його копії еволюціонували кожна по своєму; 2) субодиниці, що кодуються цими генами, на відміну від α -ланцюгів, входять до складу одного виду Hb, який утворюється на певній стадії онтогенезу.



В глобіновому кластері наявні три спейсерних ділянки, великі за розміром: від 4000 до 14000 н. п., вони складають більшу частину від довжини кластера; в середині генів містяться довгі інтрони: в гені β їх два – довжиною 120 і 555 н. п. Транскрипція генів глобінового кластера відбувається окремо один від одного (тому що їх експресія відбувається на різних стадіях онтогенезу).

8.2. Спосіб запису генетичної інформації

Два ланцюги ДНК принципово різняться за своєю функціональною роллю: одна із них є *кодуючою*, або змістовою, друга – *матричною*. А процесі транскрипції в якості матриці виступає тільки один – матричний – ланцюг ДНК. Продукт цього процесу – пре-мРНК – за послідовністю нуклеотидів співпадає з кодуючим ланцюгом ДНК. Отже, за допомогою матричного ланцюга ДНК при транскрипції відтворюється в структурі РНК генетична інформація кодуючого ланцюга ДНК. На малюнках ген прийнято зображувати так, щоб кодуючий ланцюг був зверху; тоді 5'-кінець кодуючого ланцюга повинен розташовуватися зліва.

Одиницею інформації в кодуючому ланцюзі ДНК є *триплет* – послідовність із трьох нуклеотидів. 4 вида нуклеотидів можуть утворювати $4^3=64$ вида триплетів. Із них 61 триплет є змістовим, а 3 триплети – «беззмістові».

Генетичний код – певна відповідність між послідовністю нуклеотидів в молекулі мРНК і послідовністю амінокислот в молекулі білка, яка нею кодується.

Положення азотистої основи в кодоні мРНК									
1-а	2-а								3-я
	У		Ц		А		Г		
У	УУУ	Феніл-аланін	УЦУ	Серин	УАУ	Тирозин	УГУ	Цистеїн	У
	УУЦ		УЦЦ		УАЦ		УГЦ		Ц
	УУА	Лейцин	УЦА		УАА	Стоп-кодон	УГА	Стоп-кодон	А
	УУГ		УЦГ		УАГ		УГГ	Триптофан	Г
Ц	ЦУУ	Лейцин	ЦЦУ	Пролін	ЦАУ	Гістидин	ЦГУ	Аргінін	У
	ЦУЦ		ЦЦЦ		ЦАЦ		ЦГЦ		Ц
	ЦУА		ЦЦА		ЦАА	Гліцин	ЦГА		А
	ЦУГ		ЦЦГ		ЦАГ		ЦГГ		Г
А	АУУ	Ізолей-цин	АЦУ	Треонін	ААУ	Аспара-гін	АГУ	Серин	У
	АУЦ		АЦЦ		ААЦ		АГЦ		Ц
	АУА		АЦА		ААА	Лізін	АГА	А	
	АУГ	Метіонін	АЦГ		ААГ		АГГ	Аргінін	Г
Г	ГУУ	Валін	ГЦУ	Аланін	ГАУ	Аспара-гін	ГГУ	Гліцин	У
	ГУЦ		ГЦЦ		ГАЦ		ГГЦ		Ц
	ГУА		ГЦА		ГАА	Глутамін	ГГА		А
	ГУГ		ГЦГ		ГАГ		ГГГ		Г

Властивості генетичного коду:

1. *вироджений*: на одну амінокислоту припадає декілька (від 1 до 6) триплетів;
2. *специфічний*: кожному із змістових триплетів відповідає тільки одна амінокислота;
3. *колінеарність*: лінійна послідовність триплетів кодує аналогічну лінійну послідовність амінокислот;
4. *безперервний*: відсутність проміжних нуклеотидів між триплетами;
5. *універсальний*: у всіх видів організмів зміст будь-якого триплету однаковий.

Триплети мРНК, які відповідають триплетам ДНК, називають *кодонами*. Саме вони безпосередньо визначають порядок включення амінокислот в пептидний ланцюг. Тому в таблиці генетичного коду завжди вказують кодони мРНК.

Дуже часто кодони однієї амінокислоти відрізняються лише останній (третім) нуклеотидом. Крім того, у подібних за будовою амінокислот кодони також подібні між собою.

8.3. Транскрипційні фактори і репресори

На сьогодні ідентифіковано велику кількість білків, що мають властивості транскрипційних факторів або репресорів. При цьому вони вступають в різноманітні взаємовідносини один з одним, а також з речовинами, від чого залежить кінцевий вплив на активність генів.

У клітинах еукаріот існує ланцюг регуляторних взаємовідношень.

ДНК-зв'язуючі білки можна поділити на декілька груп:

- 1) білки, що містять мотив «спіраль-поворот-спіраль» (ці білки розповсюджені серед прокариотів як білки-репресори);
- 2) білки, що містять гомеодомени (характерні для еукаріотів; продукти гомеїотичних генів (відповідальних за ембріональний розвиток)).

Домен – фрагмент білкової молекули, який має відносно самостійну третинну структуру.

Гомеобокс – екзон гомеїотичного гена, який кодує гомеодомен відповідного білка.

Гомеодомен утворений близько 60 амінокислотами, має мотив «спіраль-поворот-спіраль», одна із α -спіралей взаємодіє з ДНК;

- 3) білки, що містять «цинкові пальці» (характерні для еукаріотів; багато регуляторних білків; мають пальцеподібні структури, які стабілізуються атомом цинку);
- 4) білки, що містять лейцинову «застібку» (характерні для еукаріотів; складаються з двох субодиниць, які поєднанні гідрофобними зв'язками між залишками лейцину).

Загальні фактори транскрипції

В складі промоторів розташовані характерні послідовності нуклеотидних пар, які мають назву *бокс*. У 80% промоторів еукаріот зустрічається ТАТА-бокс; ГЦ-, ЦААТ і інші бокси зустрічаються рідше. Розташовані вони по різному в різних промоторах: іноді ГЦ-бокс перед ТАТА-боксом, в інших навпаки.

В ділянці ТАТА-бокса з промотором спочатку зв'язується ТВР-білок (ТАТА – Binding Protein). Це ініціює приєднання декількох (восьми або більше) ТАФ-білків (ТВР-Associated Factors).

Білки ТВР і ТАФ називають *загальними факторами транскрипції*, тому що вони присутні у всіх клітинах і абсолютно необхідні для транскрипції більшості генів.

Комплекс цих білків позначають TFIIID (Transcriptional Factor D for polymerase II). Ці білки необхідні для зв'язування з промотором РНК-полімерази II.

Сукупність усіх білків разом із РНК-полімеразою формує *ініціаторний комплекс*.

Якщо працює РНК-полімераза I або III, тоді промотори відповідних генів містять інші послідовності і для формування ініціаторного комплексу залучені інші фактори транскрипції.

Для ефективної роботи гена необхідні також і інші білки, наприклад з ГЦ-боксом промотора зв'язується Sp1-білок, з ЦААТ-боксом – ще один білок. Відомі і такі транскрипційні коактиватори, як білки СВР і р300.

Комплекс р300/СВР ацетилює гістони, що сприяє витісненню з промоторної ділянки ДНК нуклеосом і забезпечує можливість формування основного ініціаторного комплексу.

Регуляція активності гена відбувається також і за участі транскрипційних факторів, які зв'язуються з енхансерами.

В якості прикладу функціонування транскрипційного фактору розглянемо *білок р53*, який є найбільш вивченим, оскільки залучений до контролю багатьох процесів, які відбуваються в клітині.

Білок р53 (або його ген) активується у відповідь на різноманітні пошкодження клітинних структур:

- нерепаровані розриви і інші пошкодження ДНК;
- порушення розходження хромосом у мітозі;
- руйнування мікротрубочок і т. д.

Білок р53 безпосередньо регулює активність 3^x груп генів:

1. активує гени (P21, GADD45 і інші), що відповідають за зупинку клітинного поділу;
2. активує гени (BAX, KILLER/DR5, PIG і інші), що вмикають апоптоз (процес, який шляхом активації спеціальних ферментів, веде до гибелі клітини); також репресує гени (BCL2, RELA), які стримують апоптоз;
3. активує гени (TSP1, VAIІ та інші), що гальмують ангиогенез (утворення нових судин).

За допомогою білка р53 клітина у відповідь на пошкодження своєї структури:

- або затримується на той чи іншій стадії мітотичного циклу і виправляє ці пошкодження;
- або (коли немає можливості виправити) взагалі припиняє поділ і вступає у процес клітинного старіння (фаза III за Хайфліком);
- або (коли є потенційна загроза пошкодження клітини або її оточення) забезпечує апоптоз.

Апоптозу підлягають і клітини, в яких відбулася пухлинна трансформація. Тому зрозуміло, чому одночасно гальмується ангиогенез: це також обмежує пухлинний ріст.

Тому білок р53 – найбільш важливий пухлинний супресор. Під час розвитку пухлин функції білка р53 порушуються.

Структура білка p53

Білок p53 не належить до жодної із вище перерахованих груп ДНК-зв'язуючих білків. Він містить 392 амінокислотних залишки, утворюючи 6 різних за розміром і функціями доменів. Центральний, самий великий домен (200 амінокислотних залишків), відповідає за впізнавання енхансерів генів-мішеней і зв'язування з ними. Самий перший від N-кінця (N-кінцевий) домен бере участь у взаємодії зі загальними факторами транскрипції – з комплексом TFIIID. Таким чином, ці домени забезпечують правильне зв'язування білка p53 під час транскрипції. Це зв'язування знаходиться під контролем багатьох факторів. В N-доміні є локус, що зв'язує його з білком-інгібітором Mdm2, який блокує взаємодію з комплексом TFIIID, в N-доміні знаходяться також залишки серину і треоніну, які можуть фосфорилюватися спеціальними протеїнкіназами (ДНК-протеїнкіназою, білком АТМ і ін.). Ці кінази активуються під час пошкодження ДНК та інших структур клітини і в результаті фосфорилування амінокислотних залишків N-доміну та білка-інгібітора Mdm2 останній від'єднується від N-доміну, що дає можливість взаємодії останнього з комплексом TFIIID.

Взаємодія центрального домену з енхансером також знаходиться під контролем, за рахунок модифікації. Але об'єктом модифікації є не центральний домен, а С-кінцевий домен. Модифікації С-кінцевого домену можуть бути різними – фосфорилування, ацетилювання і глікозилування з участю спеціальних ферментів. Коли С-кінцевий домен не модифікований, центральний домен не може взаємодіяти з ДНК-мішенню. Модифікація С-доміну дає білку p53 таку можливість і впливає на його специфічність.

Справа в тому, що p53-залежні енхансери (що відносяться до різних генів) мають різну послідовність нуклеотидних пар. Від виду модифікації С-доміну залежить, з якими конкретно енхансерами буде зв'язуватися білок p53, а з якими – не буде. Таким чином, за допомогою модифікації 2^x кінцевих (N- і С-) доменів білок p53 отримує (від багаточисельних «джерел») інформацію про стан клітини, переробляє цю інформацію шляхом зміни своєї конфігурації і відповідно реагує як транскрипційний фактор певних генів.

С-кінцевий домен виконує ще одну функцію. Відомо, що деякі гени (BCL2, RELA) репресуються білком p53 і це відбувається за участю С-доміна. С-домен зв'язується з комплексом TFIIID і знижує (пригнічує) його активність.

Достатньо важлива функція інших частин білка p53. У клітині молекули білка p53 утворюють між собою тетрамерні комплекси і це є звичайним станом білка незалежно від рівня його активності. За утворення цих комплексів відповідає α -спіральний домен, який знаходиться перед С-доміном. У мономерному стані білок p53 не здатен до активації.

Між центральним і α -спіральним доменами розташована функціонально важлива лінкерна (зв'язуюча) ділянка, яка необхідна для проникнення новосинтезованого білка p53 із цитоплазми у ядро.

Між N-кінцевим і центральними доменами розташовані ще 2 невеликих доміна, один з них містить багато залишків проліну. Обидва цих доміни беруть участь в активації певних мішеней-генів.

Обмін білка p53

У клітинах білок p53 постійно синтезується і також постійно руйнується. Середня тривалість життя молекул білка та їх стаціонарна концентрація у клітинах більшості тканин є дуже низькою. Але під час стресів і пошкодження клітини швидкість деградації білка p53 сповільнюється, що забезпечує збільшення його концентрації.

Таким чином, використовується 2 способи включення білка p53 у функціонування:

- підвищення його вмісту (шляхом зниження швидкості розпаду);
- підвищення активності (за рахунок модифікації).

Цим білок p53 відрізняється від багатьох інших білків, збільшення концентрації яких часто досягається шляхом активації гена.

Ген p53 достатньо активно функціонує практично постійно. Його суттєва активація спостерігається тільки в ранньому ембріогенезі та при розвитку ембріональної тератокарциноми.

8.4. Типи РНК. Їх структура і функції.

Загальний план будови РНК

Молекули РНК (крім РНК деяких вірусів) – одноланцюгові.

Особливості первинної структури:

а) пентоза в РНК – рибоза, має додаткову гідроксигрупу (ОН-група впливає на компонентність структури);

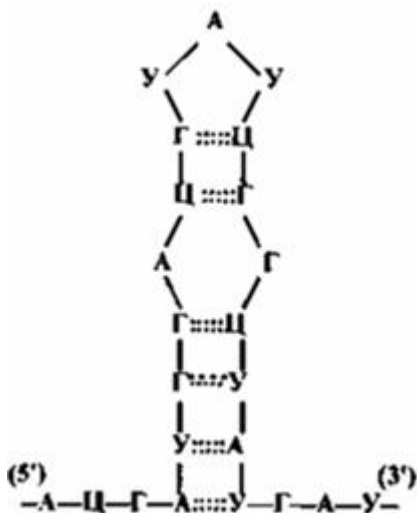
б) серед чотирьох основних, або мажорних нітратних основ замість тиміну міститься урацил, який від тиміну відрізняється відсутністю метильної групи у 5' положенні, що зменшує силу гідрофобної взаємодії у комплементарній парі А-У; це також знижує вірогідність утворення стійких дволанцюгових молекул;

в) в РНК (особливо в тРНК) високий вміст мінорних основ і нуклеозидів. Серед них: дигідроуридин (в урацилі відсутній один подвійний зв'язок); псевдоуридин (урацил по іншому зв'язаний з рибозою); диметиладенін (в нітратних основах по дві додаткові метильні групи); диметилгуанін та інші.

Ці основи не можуть брати участь в комплементарних взаємодіях.

Молекули РНК здатні виконувати власні функції тільки в одноланцюговому стані. Але у деяких ділянках ланцюг РНК може утворювати «петлі» або «шпильки» з дволанцюговою структурою.

Ця структура стабілізується взаємодіями між основами в парах А::У і Г::Ц, але можуть утворюватись «неправильні» пари, наприклад, Г...У; в деяких місцях «шпильки» взагалі не відбувається взаємодії. До складу «петель» може входити (особливо в тРНК і рРНК) 50% усіх нуклеотидів.



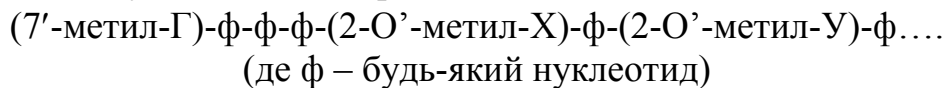
Загальна кількість нуклеотидів у РНК варіює від 75 до тисячі.

Особливості будови мРНК

Кількість різних мРНК в клітині дуже велика. Але тільки ~ 5% від загальної маси РНК у клітини складає мРНК. Зрілі мРНК мають подібний план будови.

Це тому, що лінійний ланцюг мРНК містить декілька ділянок з різною функціональною роллю:

а) з 5'-кінця знаходиться так званий *кеп* – ділянка із одного-чотирьох модифікованих нуклеотидів, наприклад:



Першим завжди є 7-метилгуанілат, з наступним нуклеотидом він зв'язаний пірофосфатним зв'язком.

Наступні нуклеотиди можуть бути метильовані за 2'-положенням рибози. Така незвичайна структура має на меті захист 5'-кінця мРНК від дії екзонуклеаз;

б) за *кепом* розташована 5'-ділянка, що не транлюється – послідовність із декількох десятків нуклеотидів. Ця ділянка комплементарна одній із частин рРНК, яка входить до складу малої субодиниці рибосоми. Вона забезпечує функцію первинного зв'язування мРНК з рибосоною;

с) трансляція мРНК починається завжди з ініціюючого кодону. Він у всіх мРНК однаковий – АУГ; цей триплет кодує метіонін. Після синтезу пептидного ланцюга з N-кінця метіонін відщеплюється (якщо він не потрібен для функціонування білка);

д) після ініціюючого кодону у мРНК міститься кодуюча частина, яка несе інформацію про послідовність амінокислот в молекулі білка.

У еукаріотів зрілі мРНК є моноцистронними – кожна містить інформацію про структуру тільки одного поліпептидного ланцюга. Але буває, що поліпептидний ланцюг після утворення на рибосомі розрізається на декілька менших ланцюгів. Наприклад, це спостерігається при синтезі інсуліна.

На відміну від еукаріотів, у бактерій мРНК – поліцистронні: на різних цистронах мРНК одночасно синтезуються різні поліпептидні ланцюги.

У прокариотів і еукаріотів кодуюча частина зрілої мРНК не містить інтронів; розташована безперервна послідовність змістових кодонів, що прочитуються в напрямку 5'-3'.

е) по закінченні змістової послідовності міститься кодон термінації – один із трьох «беззмістових» кодонів: УАА, УАГ або УГА;

ф) за кодоном термінації може розташовуватися ще 3'-нетранслююча ділянка, яка значно перевищує за довжиною 5'-нетранслюючу ділянку;

г) усі зрілі мРНК еукаріотів (крім гістонових мРНК) з 3'-кінця містять *полі(А)-фрагмент* із 150-200 аденілових нуклеотидів.

3'-нетранслююча ділянка і полі(А)-фрагмент беруть участь у регуляції тривалості життя мРНК, оскільки руйнування мРНК забезпечується 3'-екзонуклеазами.

Вважають, що полі(А)-фрагмент подібний за функцією теломерам ДНК. Після того, як чергова рибосома закінчує трансляцію мРНК, від полі(А)-фрагменту відщеплюються 10-15 нуклеотидів; якщо цей фрагмент зруйнований, то починає руйнуватися частина мРНК, що містить інформацію про синтез білка. Але це відбувається тільки тоді, коли немає 3'-нетранслюючої ділянки.

Загальна кількість нуклеотидів в мРНК складає біля декілька тисяч, але до кодувальної частини відноситься тільки 60-70% нуклеотидів.

В клітинах молекули мРНК практично завжди зв'язані з білками. Білки стабілізують лінійну структуру мРНК, попереджають утворення у частині мРНК «шпильок». Крім того, білки захищають мРНК від передчасного руйнування.

Комплекси мРНК з білками називають *інформосомами*.

Особливості будови тРНК

Кількість різних тРНК складає декілька десятків: від одного до шести видів для кожної з 20 амінокислот. Види тРНК, що здатні зв'язувати одну і ту ж амінокислоту, називають *ізоакцепторними*.

Специфічність тРНК позначають верхнім індексом, наприклад: тРНК^{Ала} (тРНК, яка транспортує амінокислоту аланін).

Загальна кількість нуклеотидів в молекулі тРНК не перевищує 100. Серед них високий вміст мінорних, або модифікованих, нуклеотидів. Наприклад, в аланіновій тРНК вміст мінорних нуклеотидів складає 13%.

До числа мінорних нуклеотидів відносяться: дигідроуридин (дГУ) і псевдоуридин; інозин (І) - в порівнянні з аденозином NH₂ група замінюється кето-групою; метилінозин (МІ), метил- і диметилгуанозин (МГ і м₂Г); метилуридин (МУ), або риботимідин.

За рахунок утворення декількох «шпильок», ланцюг тРНК завжди набуває характерну *вторинну структуру* «листка конюшини», яка містить чотири дволанцюгові і п'ять одноланцюгових ділянок. Мінорні нуклеотиди, як правило, не здатні до комплементарних взаємодій і тому вони містяться в одноланцюгових ділянках.

Для одноланцюгових ділянок характерно розміщення: акцепторної гілки, антикодонової петлі, додаткової петлі.

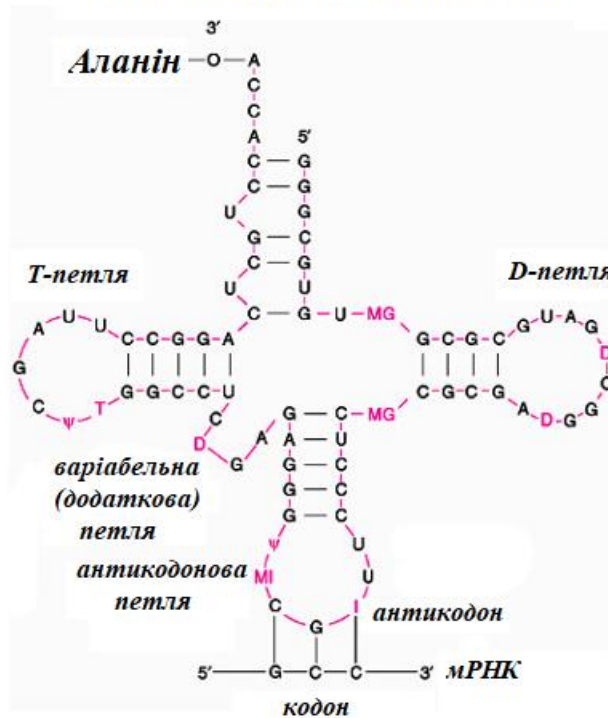
Акцепторна гілка – ділянка на 3'-кінці, яка складається із 4^х нуклеотидів, до останнього (А) ковалентно приєднується амінокислота.

Антикодонова петля – ділянка із 7 нуклеотидів у середині ланцюга. Три із них виконують функцію *антикодона*, який комплементарно взаємодіє з відповідним кодоном у ланцюзі мРНК.

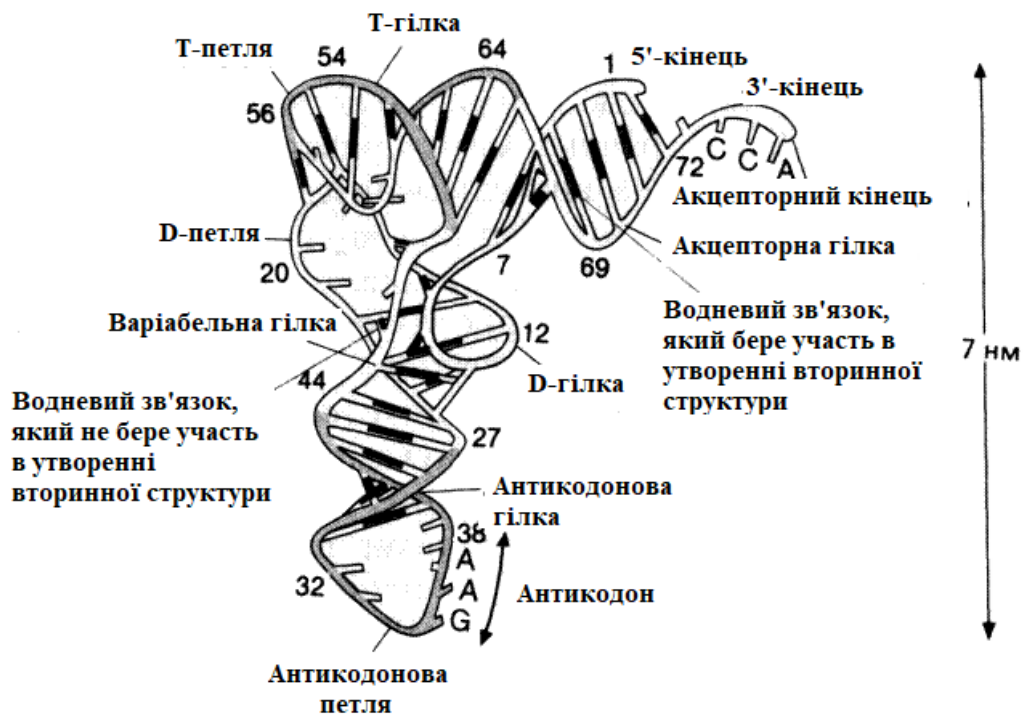
Дигідроуридилова і псевдоуридилова петлі, а також додатковий ланцюг (він не завжди є) сприяють формуванню специфічної для цієї тРНК *третинної*

структури. Наявність стабільної третинної структури – особливість тРНК. Для довгих, лінійних мРНК, ДНК така стабільність відсутня.

Аланінова транспортна РНК



У молекулі тРНК чотири дволанцюгові ділянки зближуються (по дві) і утворюють два витка подвійної спіралі, які розташовані майже перпендикулярно по відношенню один до одного, внаслідок чого молекула набуває Г-подібну форму.



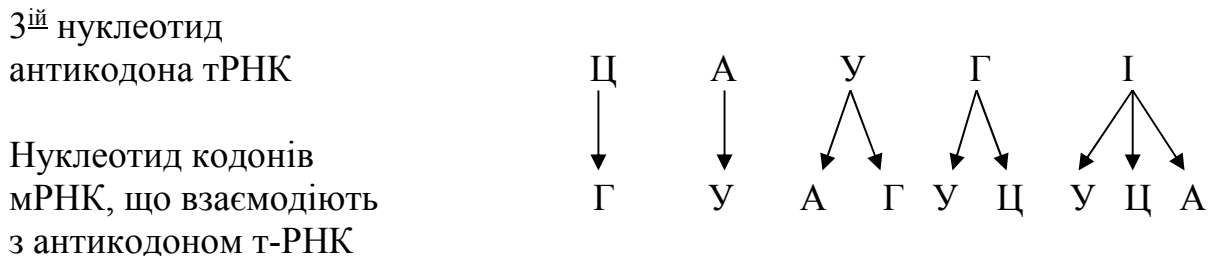
Взаємодія тРНК з лігандами

Зв'язування амінокислоти відбувається з допомогою фермента – специфічної *аміноацил-тРНК-синтази*. Існує 20 видів таких ферментів – один фермент на одну амінокислоту. Фермент має 2 центри впізнавання – амінокислоти і будь-якої із ізоакцепторних тРНК, які специфічні для кожної амінокислоти.

У складі ферментів є не тільки центр утворення ковалентного зв'язку між амінокислотою і тРНК, також є центр гідролізу ковалентного зв'язку. Цей центр працює тоді, коли до тРНК приєднується «ні та» амінокислота.

Взаємодія тРНК з кодоном мРНК відбувається за загальним принципом комплементарності і антипаралельності. Зміст кодона мРНК прочитується в напрямку 5'→3', а антикодона в тРНК прочитується в напрямку 3'→5'.

При цьому перші дві основи кодона і антикодона взаємодіють суворо комплементарно, утворюються пари А-У і Г-Ц. Третя основа може відступати від цього принципу. Можливі пари визначаються схемою:



Із схеми виходить:

- молекула тРНК зв'язується тільки з одним типом кодона, коли 3^{ій} нуклеотид в її антикодоні – Ц або А;
- тРНК зв'язується з двома типами кодонів, коли антикодон закінчується на У або Г;
- тРНК зв'язується з трьома типами кодонів, коли антикодон закінчується на І (інозиновий нуклеотид); це характерно для аланінової тРНК.

Рибосомальні рРНК і рибосоми

Рибосомальні РНК – основа формування субодиниць рибосом. Ці субодиниці, а також і рРНК, що входять до складу рибосом, позначаються за константною седиментацією (S) (швидкість осідання в ультрацентрифугі). Рибосоми із різних джерел відрізняються за S і складом.

Цитоплазматична рибосома еукаріот (80S) складається з:

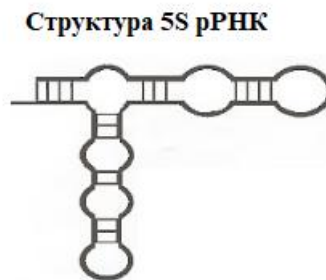
- малої субодиниці (40S), яка містить 1 молекулу 18S рРНК (~ 2000 нуклеотидів) і близько 30 молекул різних білків;
- великої субодиниці (60S), яка містить три різних молекули рРНК (28S рРНК (~ 4000 нуклеотидів), 5,8S рРНК (155 нуклеотидів), 5S рРНК (121 нуклеотид)), а також біля 45 білкових молекул.

Кожна субодиниця рибосом – це згорнутий *рибонуклеопротеїдний тяж*.

У рибосомах в складі рРНК набагато більше гуаніну і цитозину, ніж в інших РНК. Тому і в гені рРНК багато ГЦ.

У рРНК містяться також мінорні нуклеотиди, але їх тільки 1%, в основному, це нуклеозиди, метильовані за рибозою.

Вторинна структура рРНК містить багато дволанцюгових ділянок і петель.



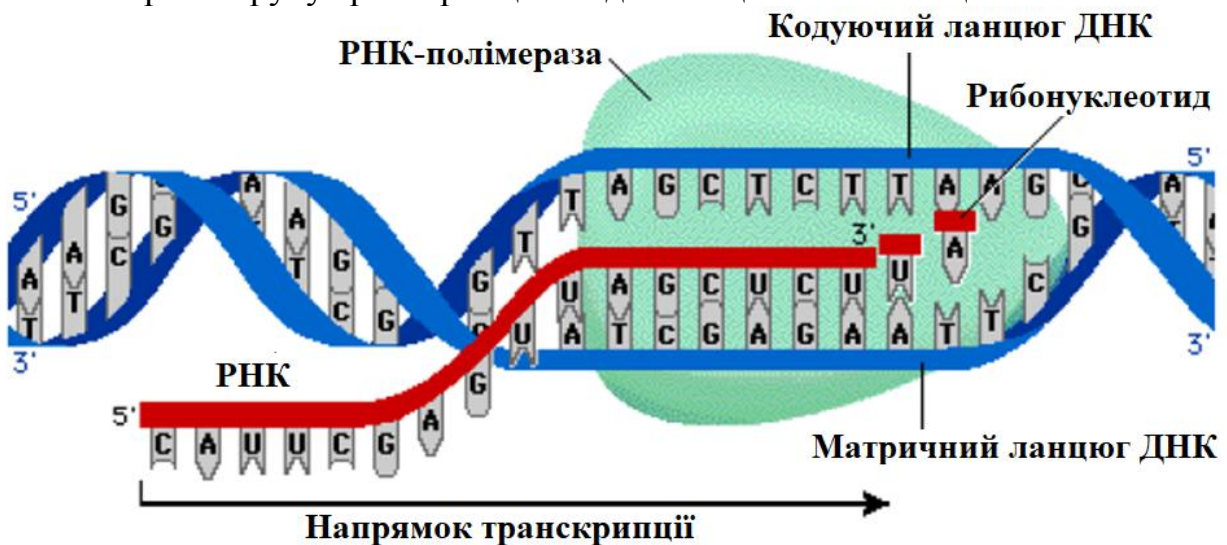
8.5. Загальна характеристика та механізм транскрипції ДНК

Загальна характеристика транскрипції

Транскрипція ДНК відбувається під час клітинного циклу, окрім поділу клітин. Транскрипція будь-якої ділянки ДНК може проходити багатократно; набір ділянок, що транскрибується, під впливом деяких факторів може змінюватися.

Транскрипція (від лат. transcription – переписування) – процес синтезу РНК з використанням ДНК в якості матриці.

Напрямок руху транскрипції – від 5'-кінця в бік 3'-кінця.



Фермент РНК-полімераза рухається вздовж ДНК і каталізує по чергове включення у ланцюг, що росте, рибонуклеотидів за принципом комплементарності.

Субстратами синтезу РНК є рибонуклеозид трифосфати (рНТФ), як і при синтезі ДНК, при цьому втрачаються пірофосфатні залишки:



Як і при усіх матричних синтезах, ланцюг мРНК антипаралельний матричному ланцюгу ДНК.

Відмінності від синтезу ДНК:

- a) асиметричність процесу – функцію матриці виконує один ланцюг ДНК;
- b) консервативність процесу: молекула ДНК після синтезу РНК повертається у вихідний стан; при синтезі ДНК молекули поновлюються на $\frac{1}{2}$;
- c) синтез РНК не потребує для початку «затравки».

Механізм транскрипції

Ініціація транскрипції

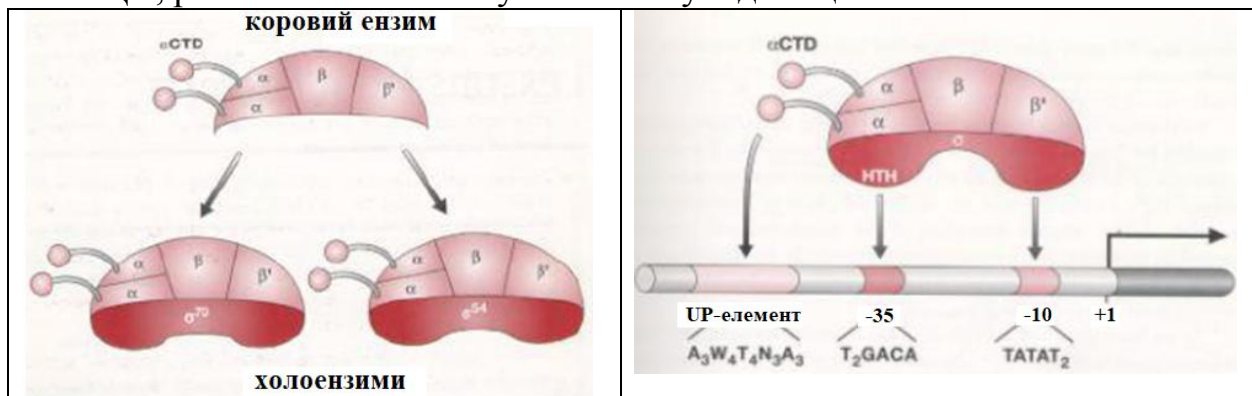
Перший і важливий етап транскрипції – це ініціація: зв'язування РНК-полімерази з промотором і утворення першого нуклеотидного зв'язку.

Прокаріоти не мають ядерної мембрани, тому процеси транскрипції, трансляції і мРНК деградації можуть відбуватися одночасно.

РНК-полімераза прокаріотів складається із 5 поліпептидів (холоензим), які збираються разом кожний раз, коли необхідна транскрипція гена:

- α – необхідна для сборки полімераз на ДНК,
- β – зв'язує трифосфати,
- β' – зв'язується з ланцюгом ДНК,
- σ – залучена до ініціації транскрипції.

Транскрипція починається з промотора. Незалежно від варіабельності промоторів серед прокаріотів, є декілька консервативних елементів в позиціях -10 і -35 від точки ініціації транскрипції. Консенсус в позиції -10 називається *TATA-бокс* (TATAAT) (бокс Прібнова). Консенсус в позиції -35 має вигляд TTTGAЦА, розпізнається і зв'язується з σ -субодиницею.



Ініціація транскрипції починається з вивільнення σ -субодиниці від РНК-полімерази. Швидкість РНК-полімерази у прокаріотів складає біля 40 нуклеотидів на секунду.

Після зв'язування з промотором, РНК-полімераза викликає локальну денатурацію ДНК, тобто розділення ланцюгів ДНК на довжину, що дорівнює довжині 15 п. н. - утворюється *транскрипційне вічко*. Після цього нуклеотиди матричного ланцюга ДНК (в ділянці вічка) мають здатність взаємодіяти з рНТФ.

Транскрипція у еукаріотів відбувається в ядрі. Синтез молекул РНК також починається з промоторів і завершується в сайтах термінації. У

еукаріотів є 3 типи РНК-полімераз (не враховуючи мітохондріальної та хлоропластної):

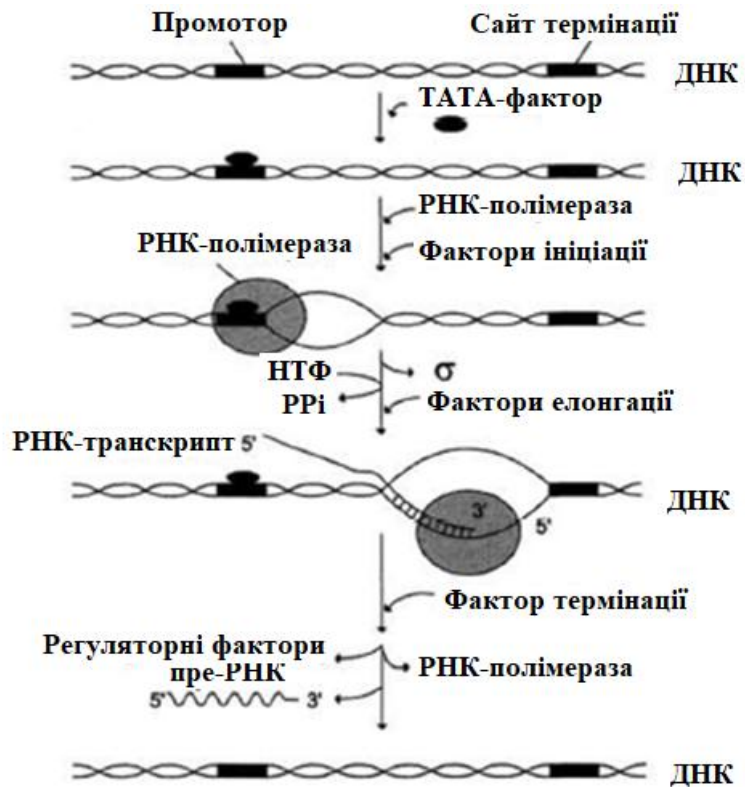
- РНК-полімераза I – синтезує в ядерцях рибосомні РНК (18S і 28S рРНК, крім 5S),
- РНК-полімераза II – синтезує мРНК і деякі sРНК,
- РНК-полімераза III – синтезує тРНК, sРНК, 5S-рРНК.

РНК-полімераза II людини містить більше 10 субодиниць, які слабо асоціюються одна з одною. Деякі з них належать до основних акторів транскрипції.

Наприклад, білки холоферменту РНК-полімерази II дріжджів:

- РНК-полімераза II – РНК-полімеразна активність, взаємодіє з багатьма загальними і тканиноспецифічними факторами транскрипції, бере участь у виборі точки ініціації транскрипції;
- TFIIB – зв'язує РНК-полімеразу II і TBP на промоторі, бере участь у виборі точки ініціації транскрипції;
- TFIIF – взаємодіє з РНК-полімеразою II, стимулює елонгацію транскрипції, компонент субкомплекса SRB/медіатор;
- TFIIN – активність ДНК-залежної АТФази, ДНК-хеліказна активність, володіє активністю CTD-кінази;
- SRB2, SRB5 – бере участь в утворенні ініціаторного комплексу, стимулює базальний та індукований синтез РНК, взаємодіє з TBP, компоненти субкомплекса SRB/медіатор;
- GAL11/SPT13 – беруть участь в утворенні ініціаторного комплексу, стимулюють базальний та індукований синтез РНК, компоненти субкомплекса SRB/медіатор, можливо, взаємодіють з активаторами транскрипції;
- SUG1 – компонент субкомплекса SRB/медіатор, можливо, взаємодіє з активаторами транскрипції;
- SRB4, SRB6, SRB7, SRB8, SRB9, SRB10, SRB11 – компоненти субкомплекса SRB/медіатор, можливо, взаємодіють з CTD-доменом РНК-полімерази II.

У еукаріотичних організмів розрізняють промотори, що містять ТАТА-бокс, та промотори, які не містять ТАТА-боксу. Біля 24% генів людини містять в промоторі ТАТА-мотив. Він розташовується на відстані 27-30 п.н. від кеп-сайта. Усереднений варіант мотиву можна уявити як ТАТА(А/Т)А(А/Т). положення ТАТА-елементу строго визначає сайт ініціації транскрипції, тобто 5'-кінець транскрипту. При пошкодженні або видаленні ТАТА-елемента утворюється набір молекул РНК з різними 5'-кінцями. Окремі нуклеотидні заміни в ТАТА-елементі можуть призвести до різкого зниження ефективності транскрипції.



Активация промотора відбувається за допомогою великого білка – ТАТА-фактора, який зв’язується з ТАТА-боксом. Приєднання ТАТА-фактора полегшує взаємодію промотора з РНК-полімеразою. Фактори ініціації викликають зміни конформації РНК-полімерази і забезпечують розкручування приблизно одного витка спіралі ДНК, тобто утворюється транскрипційна вилка, в якій матриця доступна для ініціації синтезу ланцюга РНК. Після того як синтезований рибоолігонуклеотид із 8-10 нуклеотидних залишків, σ -субодиниця відділяється від РНК-полімерази, а замість неї до молекули ферменту приєднуються декілька факторів елонгації.

Першим, в ланцюг РНК, що будується, потрапляє пуриновий нуклеотид – АТФ або ГТФ, при цьому усі три фосфатних залишка зберігаються, і утворюється перший 5'-3'-фосфатний зв’язок з другим нуклеотидом.

Ініціація транскрипції гена залежить від взаємодії з енхансерами цього гена.

У бактерій після цього σ -фактор втрачає зв’язок з РНК-полімеразою і РНК-полімераза (кофермент) починає переміщуватись вздовж ДНК.

У еукаріотів РНК-полімераза після ініціації транскрипції втрачає зв’язок з транскрипційними факторами і рухається вздовж ДНК.

Елонгація транскрипції

Елонгація транскрипції – це поступове подовження ланцюга пре-мРНК, що росте до кінцевого розміру.

РНК-полімераза рухається вздовж ДНК, відповідно рухається транскрипційне «вічко». На транскрибованій ділянці ДНК дволанцюгова спіральна структура відразу відновлюється.

У еукаріотів фактори елонгації підвищують активність РНК-полімерази і полегшують розходження ланцюгів ДНК. На стадії елонгації, в області транскрипційної вилки одночасно розділеними є біля 18 нуклеотидних пар ДНК. Кінець ланцюга РНК, який росте, утворює тимчасову гібридну спіраль, біля 12 пар нуклеотидних залишків, з матричним ланцюгом ДНК.

Під час транскрипції можуть виникати «помилки», і тоді у новосинтезовану РНК вбудовуються «неправильні» нуклеотиди. У середньому спостерігається утворення біля 1 помилки під час вбудовування 20000 нуклеотидів. Помилки при утворенні пре-мРНК легко компенсуються за рахунок великої кількості копій, які утворюються з одного гена.

Термінація транскрипції

Термінація – це заключний етап транскрипції.

Сигналом до закінчення транскрипції є наявність у кінці гена ділянок, які збагачені Г-Ц парами. Сила взаємодії між Г \equiv Ц значна і тому денатурація цих ділянок у ДНК йде важко. В результаті сповільнюється рух РНК-полімерази і цей факт може бути сигналом для припинення транскрипції. Але до закінчення процесу на 3'-кінці новосинтезованої РНК з'являється ГЦ-збагачена ділянка. Ця ділянка за рахунок взаємодії між власними нуклеотидами здатна утворювати «шпильку». Це полегшує від'єднання РНК від ДНК. У бактерій від'єднанню РНК сприяє спеціальний білок – Rho-фактор. Він зв'язується з ланцюгом РНК, що росте. В місцях Rho-залежної термінації РНК-полімераза припиняє елонгацію. Rho-фактор дестабілізує водневі зв'язки між матрицею ДНК і мРНК, вивільнюючи молекулу РНК. Крім Rho-залежної термінації у прокариотів може здійснюватися і Rho-незалежна термінація, яка контролюється послідовністю в ДНК-матриці. РНК-полімераза доходить до ЦГ-багатої ділянки. Синтезована молекула РНК формує стебло-петлю, за якою розташовано декілька урацилів, що призводить до від'єднання молекули РНК від матриці ДНК.

У еукаріотів синтез РНК закінчується в строго певних ділянках матриці – сайтах термінації транскрипції. Розкручування подвійної спіралі ДНК в області сайту термінації робить його доступним для фактора термінації. Фактор термінації полегшує відділення первинного транскрипту (пре-мРНК), комплементарного матриці, і РНК-полімерази від матриці. РНК-полімераза може вступити в наступний цикл транскрипції після приєднання σ -субодиниці.

На кожному гені, що транскрибуються працюють, рухаючись одна за одною декілька молекул РНК-полімерази. Середня відстань між ними залежить від «сили» промотора (обумовлена транскрипційними факторами) і концентрації РНК-полімерази та в середньому становить 300-500 п. н. Тому з одним геном одночасно зв'язано декілька ланцюгів пре-мРНК, що ростуть. Тому транскрипція гена нагадує своєрідний конвеєр.

Транскрипційні фактори, що зв'язуються з ДНК, можуть впливати на транскрипцію генів за допомогою декількох механізмів:

- в більшості вивчених на сьогодні випадків транскрипційні фактори стимулюють формування комплексу преініціації на ТАТА-боксі –

ініціаторном елементі за рахунок взаємодії їх транс-активуючих доменів з компонентами базального транскрипційного комплексу (або безпосередньо, або через коактиватори/медіатори);

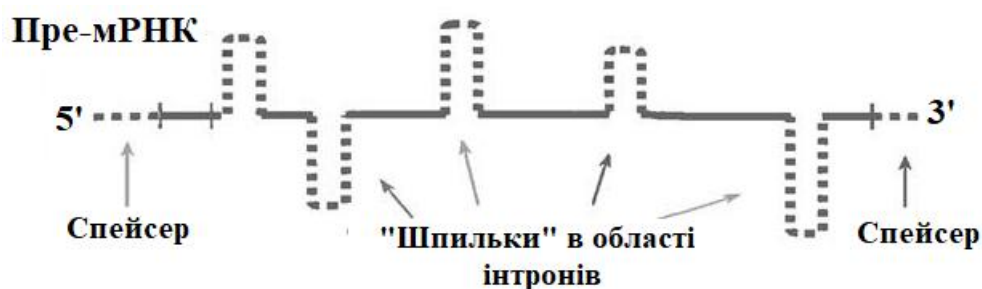
- деякі транскрипційні фактори викликають зміни структури хроматину, роблячи його більш доступним для РНК-полімераз;
- інші транскрипційні фактори є допоміжними, створюючи оптимальну конформацію ДНК для дії інших транскрипційних факторів;
- відомі транскрипційні фактори, які пригнічують транскрипцію за рахунок безпосередньої дії своїх інгібуючих доменів, або порушуючи сумісне функціонування комплексу транскрипційних факторів всередині регуляторної області гена (промотора, енхансера);
- існують транскрипційні фактори, які самі не зв'язуються з ДНК, а об'єднуються в більш складні комплекси шляхом білок-білкових взаємодій.

Інгібіторами транскрипції часто виступають антибіотики. Зокрема, актиноміцин D, який міцно зв'язується з ГЦ-багатими ділянками ДНК. Це блокує рух РНК-полімерази та унеможлиблює локальне розплетення. Чутливими до актиноміцину D є гени рРНК (багато Г-Ц).

На відміну від прокариотів у еукаріотів утворюється тільки попередники тих чи інших РНК – мРНК, рРНК і тРНК.

Пре-мРНК у декілька разів довше, ніж зрілі РНК:

- а) пре-мРНК містить спейсери (регуляторні ділянки, структурні функції);
- б) кодуєча ділянка пре-мРНК (як і ген) містить інтрони; часто інтронні послідовності утворюють «шпильки»; довжина пре-мРНК значно варіює у різних молекул – від 2 тис. до 20 тис. нуклеотидів, тому пре-мРНК називають гетерогенною ядерною РНК (гяРНК). Особливість пре-мРНК – відсутність з 5'-кінця кепа і з 3'-кінця полі(А)-фрагменту;



- в) у більшості випадків пре-мРНК еукаріот містить інформацію про синтез одного поліпептидного ланцюга, тобто під час дозрівання пре-мРНК утворюється тільки одна молекула мРНК.

Виключенням є гістонова пре-мРНК (потім розщеплюється на 5 різних гістонових мРНК).

Зрілі мРНК еукаріотів є моноцистронними:

- пре-рРНК: кластер 3^x генів рРНК, з яких транскрибується пре-рРНК, або 45S-РНК, яка містить послідовність 3^x зрілих рРНК – 18S-, 5,8S- і 28S-рРНК;

вони розділені спейсерами, але не містять інтронів і відсутні модифіковані нуклеотиди, які наявні у зрілих рРНК;

- пре-т-РНК: усі пре-т-РНК (крім деяких бактерій) містять послідовність тільки однієї тРНК. Відбувається утворення типової структури «листка конюшини», але вона ще відрізняється від той, що з'єднується з рибосомою, за наступними ознаками: наявні додаткові послідовності, не сформована акцепторна петля (ЦЦА), відсутні мінорні нуклеотиди, антикодон не займає «правильного» положення.



8.6. Дозрівання (процесінг) РНК – видалення, приєднання і модифікація тих чи інших, або нових нуклеотидів

Видалення «зайвих» послідовностей відбувається за участю спеціальних нуклеаз.

Екзонуклеази – послідовно відщеплюють з певного кінця ланцюга (3' або 5') один нуклеотид.

Ендонуклеази – розрізають ланцюг у будь-яких ділянках на окремі фрагменти.

Функції нуклеаз:

- відщеплення окремих «зайвих» нуклеотидів з кінців ланцюга (наприклад, в пре-РНК з 5'-кінця завжди знаходяться АТФ, або ГТФ, а з 3'-кінця часто ГЦ-ділянки. Ці ділянки важливі під час транскрипції, а при функціонуванні зрілого ланцюга не потрібні, тому заважають і потребують видалення);

- з кінців відщеплюються спейсерні послідовності нуклеотидів (якщо вони є);

- такі пре-РНК, як 45S-пре-рРНК і гістонова пре-мРНК, розрізаються ендонуклеазами на індивідуальні ланцюги РНК;

- із середніх ділянок пре-тРНК і практично в усіх (крім гістонових) пре-мРНК видаляються інтронні послідовності. При цьому екзонні послідовності зшиваються один з одним у безперервний ланцюг. Процес вирізання інтронів і зшивання екзонів називають *сплайсингом*. Для цього потрібні ендонуклеази і лігази (каталізують зшивання екзонів).

У деяких найпростіших інтрони видаляються за рахунок каталітичної активності пре-РНК.

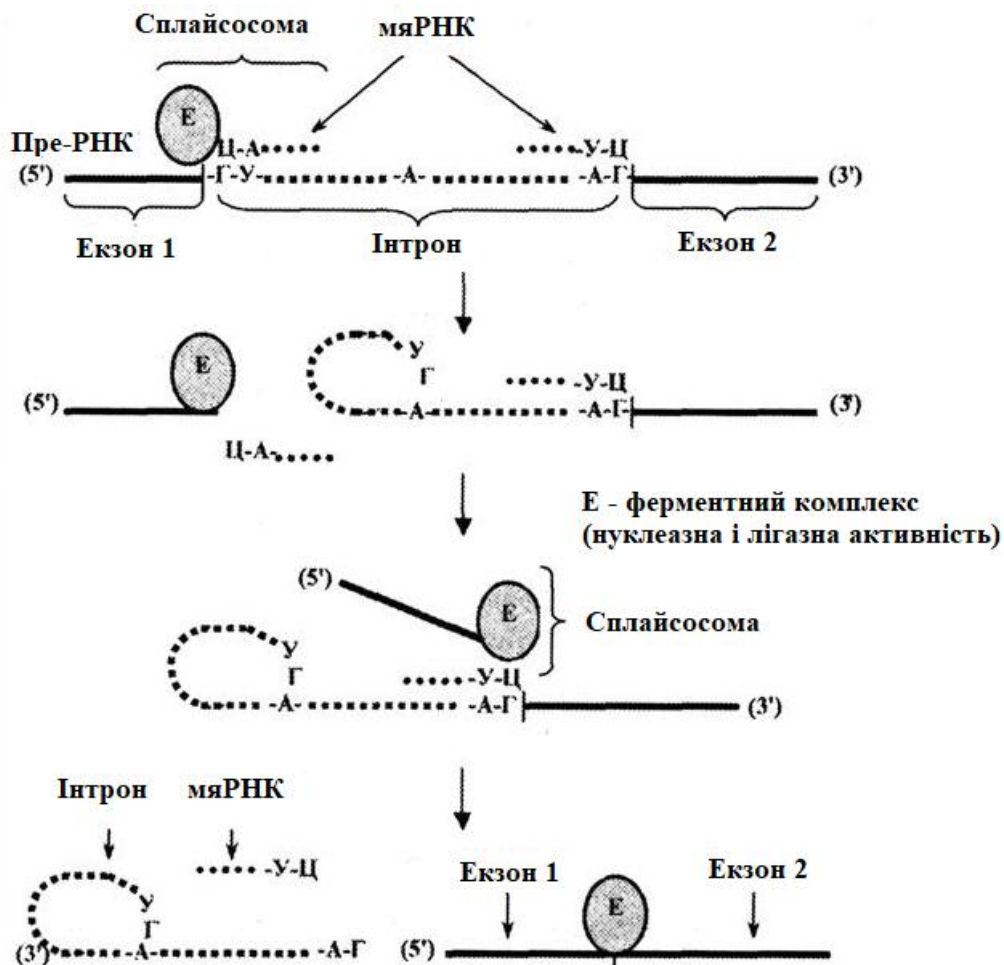
Під час сплайсингу дуже важливо забезпечити точність розрізання ланцюга пре-РНК. Помилка тільки на один нуклеотид змінює зміст усіх кодонів мРНК або антикодона тРНК. Ця точність забезпечується тим, що на початку і в кінці кожного інтрона містяться певні послідовності нуклеотидів

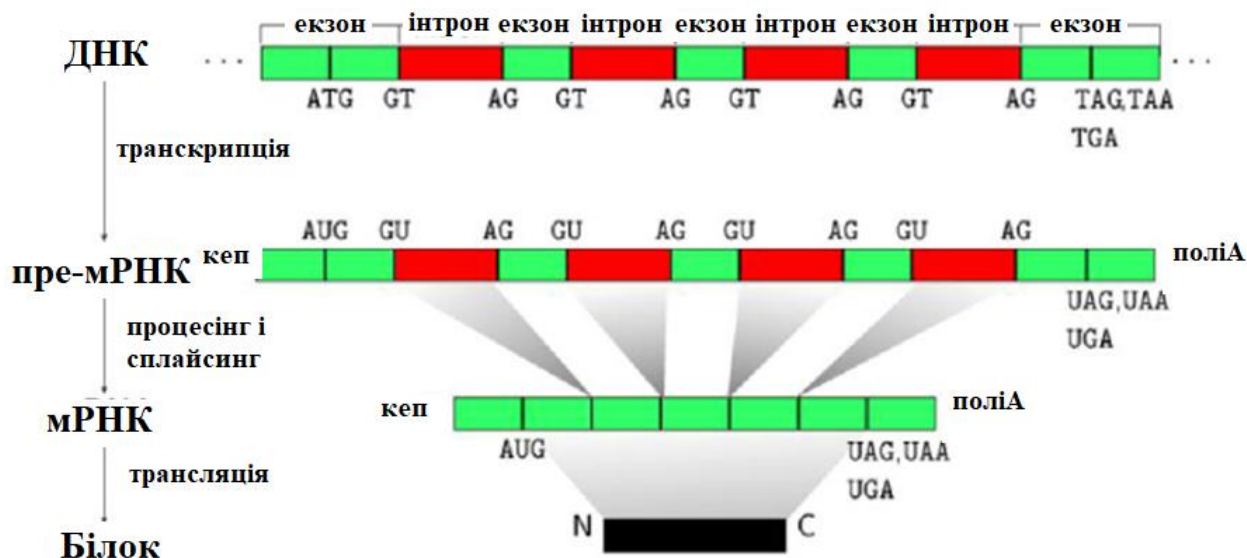
(інтрони завжди починаються з Г-Ц, а закінчуються дуплетом А-Г), а також тим, що для впізнавання цих послідовностей використовуються спеціальні РНК – так звані малі ядерні РНК (мяРНК). Малі ядерні РНК зв'язуються з ферментами, що каталізують сплайсинг, такі рибонуклеопротеїдні комплекси називають *сплайсосомами*.

Сплайсинг починається зі взаємодії двох мяРНК з початком і кінцем інтрона. Така взаємодія забезпечує «орієнтацію» ендонуклеази, яка діє на межі двох- і одноланцюгових ділянок.

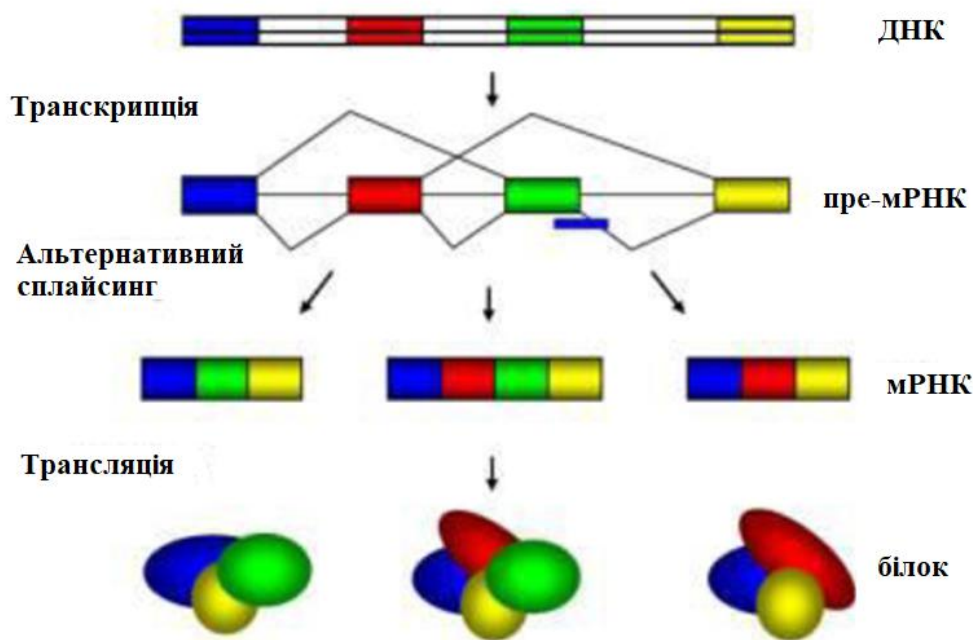
Перший розрив пре-РНК відбувається у ділянці 5'-кінця інтрона. При цьому 5'-кінець інтрона зв'язується з одним із нуклеотидів у середній частині того ще інтрона, що призводить до утворення кільцевої структури (або лассо-подібної). Тому перша мяРНК, очевидно, дисоціює, і ферментний комплекс переміщується до другої мяРНК, що маркує 3'-кінець інтрона. У цьому місці відбувається другий розрив пре-мРНК – за місцем розташування «правого» кінця «правої» мяРНК; або зв'язок екзона 2 з інтроном замінюється зв'язком з екзоном 1. Обидва розриви здійснюється одним способом - шляхом заміни одного міжнуклеотидного зв'язку на інший такий же зв'язок.

З порушенням механізму сплайсингу пов'язаний один із видів β-таласемії – генетичного захворювання, за якого порушується утворення β-ланцюгів гемоглобіну.





Альтернативний сплайсинг –

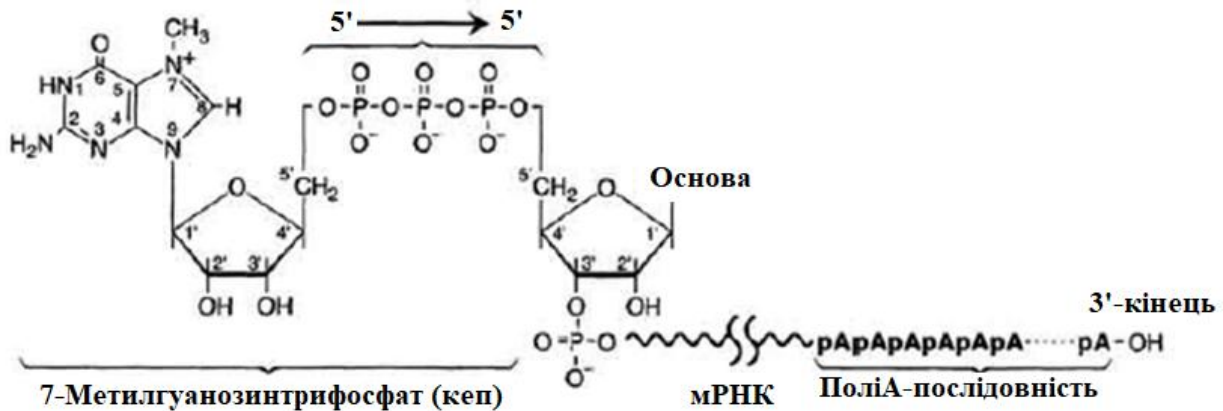


Приєднання і модифікація нуклеотидів

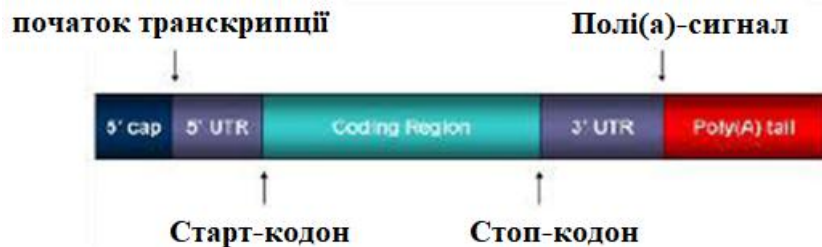
Під час дозрівання пре-мРНК втрачає значну частину нуклеотидів. Відбувається також нетранскрипційне приєднання окремих нуклеотидів.

Пре-мРНК з боку 5'-кінця приєднує 7-метилгуаніловий нуклеотид – компонент «кепа» (за рахунок пірофосфатного зв'язку, що не типово для полінуклеотидів). Модифікації пре-мРНК починаються на стадії елонгації. Коли довжина первинного транскрипту досягає біля 30 нуклеотидних залишків, відбувається кепування його 5'-кінця. В процесі кепування бере участь гуанілілтрансфераза, яка гідролізує макроергічний зв'язок в молекулі ГТФ і приєднує нуклеотиддифосфатний залишок 5'-фосфатною групою до 5'-

кінця синтезованого фрагменту РНК з утворенням 5',5'-фосфодіефірного зв'язку. Наступне метилювання залишку гуаніна у складі ГТФ з утворенням N7-метилюанозина завершує формування кепа. Модифікований 5'-кінець забезпечує ініціацію трансляції, подовжує час існування мРНК, захищаючи її від дії 5'-екзонуклеаз в цитоплазмі. Кепування необхідне для ініціації синтезу білка, так як ініціюючі триплети АУГ, ГУГ розпізнаються рибосомами тільки якщо є кеп. Наявність кепа також необхідна для роботи сплайсоми, яка забезпечує видалення інтронів.



З боку 3'-кінця понуклеотидно збільшується полі(А)-фрагмент, який складається із 100-200 залишків нуклеотидів. Для утворення полі(А)-фрагменту потрібен фермент – поліаденілатполімераза. Сигналом до початку поліаденілювання є послідовність –ААУААА- на ланцюзі РНК, який росте. Фермент поліА-полімераза, проявляючи екзонуклеазну активність, розриває 3'-фосфоестерний зв'язок після появи в ланцюгу РНК специфічної послідовності –ААУААА-. До 3'-кінця в точці розриву поліА-полімераза нарощує поліА-фрагмент. Наявність поліА-послідовності на 3'-кінці полегшує вихід мРНК із ядра і уповільнює її гідроліз в цитоплазмі. Ферменти, які здійснюють кепування і поліаденілювання, вибірково зв'язуються з РНК-полімеразою II, і за відсутності полімерази неактивні. Поліаденілювання необхідне для транспорту більшості мРНК в цитоплазму і захищає молекули мРНК від швидкої деградації. Молекули мРНК, які не мають полі(А)-ділянки, швидко руйнуються в цитоплазмі клітин еукаріотів рибонуклеазами.



Для пре-тРНК з 3'-кінця по черзі приєднується три нуклеотида – Ц, Ц і А, що утворюють акцепторну гілку. Важливо під час дозрівання пре-тРНК відбувається включення модифікованих нуклеотидів. Як і при метилюванні ДНК, мінорні нуклеотида з'являються у полінуклеотидному ланцюгу по завершенні стадії полімеризації, шляхом модифікації звичайних нуклеотидів, що містяться у ланцюзі.

У пре-мРНК відбувається метилювання рибозних залишків нуклеотидів «кепа»; у пре-рРНК теж спостерігається метилювання рибозних залишків, які містять нуклеотиди, що розташовані вздовж усієї молекули з частотою ~ 1%.

У пре-тРНК модифікації відбуваються більш різноманітніші:

- певні залишки уридина відновлюються з утворенням дигідроуридина;
- інші підлягають ізомеризації і утворюється псевдоуридин;
- або метилювання з утворенням метилуридина;
- деякі залишки аденозина дезамінуються з утворенням інозина; частина інозина потім ще метилюється з утворенням метилінозину.

Це тільки деякі приклади; наявні і інші реакції модифікації пре-тРНК.

Закінчується транскрипція тим, що у ядрі містяться молекули РНК:

- 1) 4 види рРНК: 28S, 18S, 5,8S і 5S-рРНК;
- 2) десятки видів тРНК (від 1 до 3 або більше для кожної з 20 амінокислот);
- 3) тисячі різних мРНК.

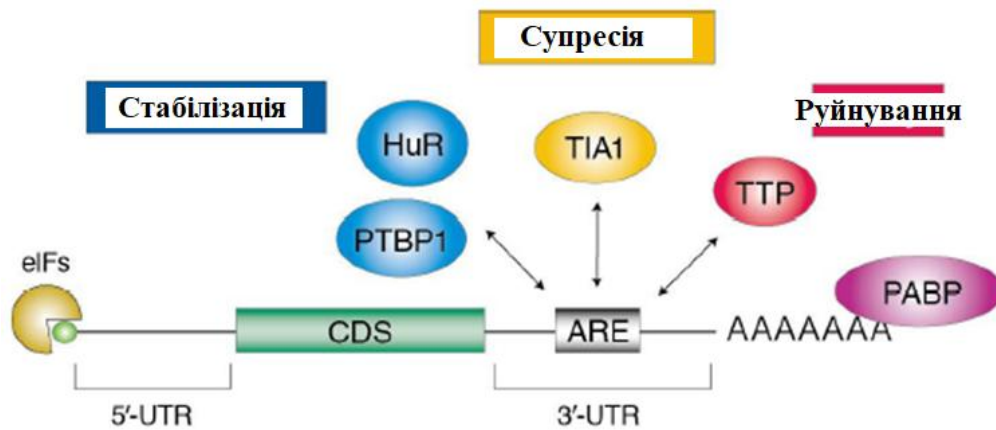
рРНК і мРНК у ядрі зв'язуються з білками. рРНК утворює з білками рибосоми дві субодиниці (великі і малі), які потім переміщуються у цитоплазму. мРНК зв'язується з іншими білками, які виконують захисну і транспортну функції, і у комплексі з білками теж переміщується в цитоплазму.

У процесі цих перетворень відбувається суттєва зміна седиментаційних властивостей.

Так, при видаленні «зайвих» нуклеотидів у ланцюзі пре-мРНК довжина її зменшується приблизно на 87%; залишається біля 13% від вихідної довжини. Потім приєднується біля 230 аденілових нуклеотидів, тому коефіцієнт седиментації (S) збільшується. На кінцевій стадії він зростає ще більше, як результат зв'язування з мРНК трьох білкових молекул утворюється мРНП (м-рибонуклеопротеїд).

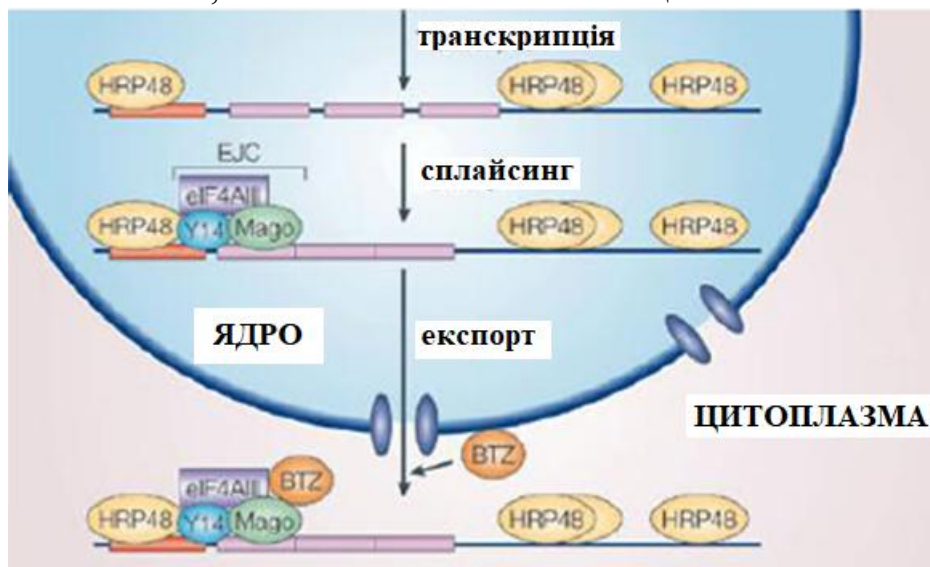
Стабільність та час існування мРНК.

У деяких мРНК в їх 3'-UTR районах зустрічаються ARE-елементи (AU-багатий елемент) з високою частотою аденіна і уридина. Зв'язування деяких білків із родини RBP (РНК-зв'язуючі білки) з ARE-елементом індукує деградацію мРНК. Гени ранньої відповіді, які відповідають на широкий спектр зовнішніх сигналів, включаючи онкогени і цитокіни, мають відносно короткий час існування із-за ARE-елементів в їх мРНК. Інший тип RBP білків, включаючи HuR, зв'язуючись з ARE, регулює стабільність мРНК за рахунок перешкоджання доступу до неї ендонуклеаз.



Транспорт мРНК.

Дозрілі мРНК розпізнаються за наявністю модифікацій і залишають ядро через ядерні пори. В цитоплазмі мРНК утворює нуклеопротеїдні комплекси – інформосоми, у складі яких транспортуються до рибосом. Багато мРНК містять сигнали, які визначають їх локалізацію.



8.7. РНК-синтезна активність вірусів

Відомі РНК-вмісні віруси, і для реплікації таких геномів використовуються дві ферментні системи.

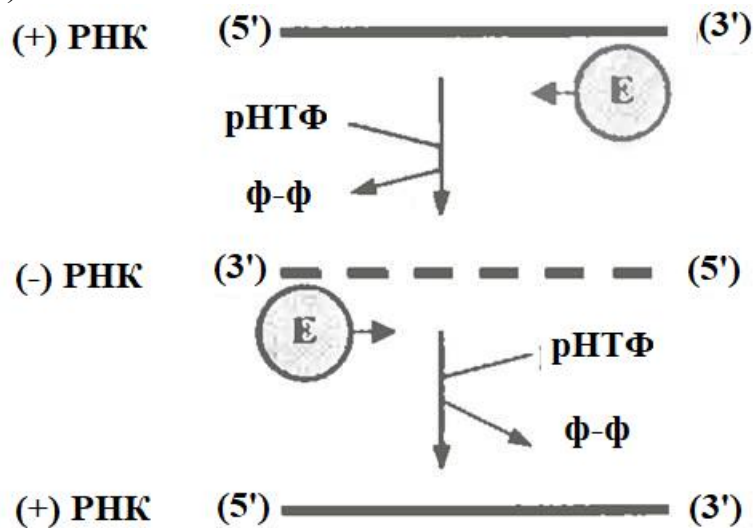
I. Зворотна транскриптаза (РНК-залежна ДНК-полімераза), яка послідовно каталізує три процеси:

- синтез (–)-ланцюга ДНК на вірусної (+)-РНК як на матриці;
- руйнування вірусної РНК, що входить до складу утвореного гібриду РНК-ДНК;
- синтез (+)-ланцюга ДНК по (–)-ланцюгу з утворенням дволанцюгової ДНК.

Потім ця ДНК інтегрується в геном клітини-хазяїна і виконує функцію матриці синтезу вірусних мРНК за допомогою РНК-полімеразної системи. Зворотня транскриптаза є у ретровірусів (вірус СНІДу), деяких онкогенних вірусів.



II. РНК-синтетаза (РНК-залежна РНК-полімераза). Цей спосіб є більш поширеним. На вірусній РНК як на матриці синтезується РНК. Це відбувається у цитоплазмі клітини, що заражена вірусом (може відбуватися як поза вірусної частинки, так і всередині неї). Механізм процесу подібний до механізму синтезу за участю РНК-полімерази: 1) ланцюг будується із рНТФ; 2) синтезується ланцюг антипаралельно і комплементарно до матричної; 3) ланцюг синтезується в напрямку $5' \rightarrow 3'$ (тоді матричний ланцюг зчитується у напрямку $3' \rightarrow 5'$).



(+)-РНК-вмістні віруси (пікорнавіруси), що використовують РНК-синтетазу, можуть безпосередньо використовувати (+)-РНК у трансляції. Всередині вірусної частинки РНК не асоційовано з білками. В процесі трансляції утворюється єдиний поліпептидний ланцюг, який потім розщеплюється на 7 вірусних білків (6 входять до складу нових вірусних частинок та РНК-синтетаза, яка відсутня у вірусних частинках). Тому

реплакація починається тільки після трансляції та накопичення РНК-синтетази. В процесі реплікації спочатку утворюється (–)-ланцюг РНК, а потім на його основі синтезується (+)-ланцюг РНК, ідентичний вірусним.

У (–)-РНК-вмістних вірусах (рабдовіруси, параміксовіруси) їх (–)-РНК до трансляції не здатна. Спершу відбувається транскрипція – утворення 5-ти моноцистронних (+)-РНК, які є мРНК. Цей процес каталізується РНК-синтетазою, що міститься у вірусній частинці. (–)-РНК асоційована з білками і утворює нуклеокапсид; після потрапляння до клітини (–)-РНК залишається в його складі. Серед білків нуклеокапсиду є два ферменти – різновиди РНК-синтетази. Один із них здійснює транскрипцію (–)-РНК. Після цього премРНК дозрівають, залишають нуклеокапсид та зв'язуються з рибосомами клітини. В певний момент нуклеокапсид може переключатися на реплікацію (можливо, внаслідок модифікації ферментів або всього нуклеокапсиду). Реплікація здійснюється іншим різновидом РНК-синтетази та включає два етапи – утворення на (–)-ланцюзі як на матриці (+)-ланцюга РНК та утворення на (+)-ланцюзі РНК як на матриці (–)-ланцюгів РНК.

(±)-РНК-вмістні віруси (реовіруси) містять біля 10 різних дволанцюгових РНК. Принцип репродукції такий же, як коли б геномом була дволанцюгова ДНК, але з участю РНК-синтетази. В процесі транскрипції за участі РНК-синтетази на (–)-ланцюгах РНК утворюються (+)-ланцюги РНК, які виступають в якості мРНК. А для накопичення нових двохланцюгових молекул (±)-РНК необхідно використання в якості матриці обох ланцюгів вірусної РНК.

8.8. Полінуклеотидфосфорилаза

В деяких клітинах, як бактеріального, так і тваринного походження, є фермент полінуклеотидфосфорилаза, який каталізує реакцію, яка може відбуватися як в прямому, так і в зворотному напрямку. Прямий напрямок реакції – розщеплення РНК шляхом фосфоролізу. Продуктами реакції є нуклеозиддифосфати (рНДФ). Зворотний напрямок реакції – об'єднання рНДФ в полінуклеотидний ланцюг з вивільненням фосфатних залишків). Так як в цьому процесі матриця не використовується, склад і довжина продукту визначається випадковими обставинами.

8.9. Розпад мРНК

Розпад мРНК у еукаріотів відбувається в цитоплазмі.

У деяких бактерій розпад мРНК починається з 5'-кінця, тобто відбувається у тому ж напрямку (5'→3'), у якому мРНК синтезується на ДНК і потім транлюється рибосомами. У бактерій відсутнє ядро, а мРНК є поліцистронною. Саме ці особливості призводять до того, що іноді одна і та ж молекула мРНК може одночасно брати участь у трьох процесах: 1) своєму утворенні на ДНК; 2) своєму функціонуванні; 3) своєму розпаді (поступовому зменшенні довжини з 5'-кінця за рахунок дії 5'-РНКаз). Це може призводити до так званого *ефекту положення*: кратність трансляції будь-якого цистрона залежить від положення цього цистрона в опероні. В одних випадках, при

переході від першого цистрона до останнього кратність трансляції закономірно зменшується, а в інших – закономірно збільшується. Наприклад, 5'-РНКаза зв'язалася з 5'-кінцем мРНК після того, як з ним встигло зв'язатися 10 рибосом: така і кратність трансляції першого цистрона. І нехай 5'-РНКаза вкорочує мРНК з 5'-кінця швидше, ніж РНК-полімераза подовжує мРНК з 3'-кінця. Тоді кожний наступний цистрон буде існувати менший час порівняно з попереднім. Тобто, менша кількість рибосом зможе з ним зв'язатися і здійснити трансляцію. Тобто, в даному випадку кратність трансляції буде в опероні закономірно зменшуватися. В середньому час напівжиття цистронів мРНК у бактерій становить 2-3 хвилини.

Руйнування мРНК еукаріотів з 3'-кінця.

У еукаріотів час напівжиття мРНК в клітині становить від 10 хв. (для короткоживучих мРНК) до 2 діб. При цьому короткоживучі мРНК – це зазвичай мРНК регуляторних білків. мРНК еукаріотів моноцистронні, тому ефекту положення немає. Розпад мРНК у еукаріотів відбувається за участі 3'-РНКаз (і, можливо, ендонуклеаз), тобто розпад починається з 3'-кінця, де міститься полі(А)-фрагмент із ~ 200 нуклеотидів (крім гістонових мРНК).

Полі(А)-фрагмент виконує функцію захисту до певного часу поступового зменшення довжини кодуєчих ділянок мРНК. Полі(А)-фрагмент руйнується 3'-РНКазою не постійно, а періодично. Це відбувається відповідно функціонуванню мРНК. Після закінчення трансляції мРНК черговою рибосомою від полі(А)-фрагмента відщеплюється 10-15 нуклеотидів. Коли у ньому залишається ~ 50 нуклеотидів, мРНК стає доступною для РНКаз і швидко руйнується. Зазвичай кратність трансляції може скласти 10-15 разів. Тому що, втративши 15 разів по 10 нуклеотидів, полі(А)-фрагмент зменшує його довжину з 200 нуклеотидів до критичної довжини – 50 нуклеотидів. Очевидно, полі(А)-фрагмент утворює петлю за рахунок взаємодії власним 3'-кінцем з будь-якою ділянкою мРНК, що транслюється. Утворюється дволанцюгова структура і 3'-кінець стає недосяжним для впливу 3'-РНКаз. Коли по цій ділянці переміщується рибосома, петля на деякий час розривається і 3'-кінець стає досяжним для РНКаз, яка встигає почергово відщепити 10-15 нуклеотидів. Потім (після звільнення ділянки від рибосоми) петля поновлюється, але вона вже коротша. І коли від полі(А)-фрагменту залишається тільки 50 нуклеотидів, петля утворюватися не може, і РНКаза без перешкод руйнує до кінця ланцюг мРНК.

У короткоживучих мРНК у 3'-ділянках, що не транслюються (розташовані між кодуєчою ділянкою і полі(А)-фрагментом) знаходяться спеціальні АУ-багаті елементи (AURE – AU-rich elements); присутність АУ-елементів різко прискорює деградацію полі(А)-фрагменту. Можливо, АУ-елементи заважають утворенню полі(А)-фрагментом петлі, що захищає 3'-кінець. Це може досягатися різними способами: 1) за рахунок утворення «шпильки» АУ-елементом; 2) за рахунок зв'язування певних протективних білків.

Цікавим прикладом є мРНК гена *c-fos* (один із протоонкогенів, який подібний до вірусного онкогену *v-fos*; обидва гена кодуєть одним із

транскрипційних факторів). В мРНК гена *c-fos* міститься АУ-елемент і ця мРНК є короткоживучою. До складу мРНК онкогена *v-fos* АУ-елемент не входить, тому час напівжиття цієї мРНК довший, чим і обумовлене виникнення пухлини. А для перетворення протоонкогена в онкоген потрібна тільки делеція невеликої ділянки, що відповідає АУ-елементу мРНК.

За принципом зворотного зв'язку продукти трансляції здатні стимулювати руйнування відповідних мРНК. Коли трансляція блокується антибіотиками, тоді час напівжиття мРНК зростає.

Є докази, що білки стимулюють розпад власних мРНК. Наприклад, розпад гістонових мРНК. Відомо, що гістонові РНК не містять полі(А)-фрагмента; але в їх 3'-ділянках, що не транслуються, міститься шпилечна петля, яка захищає 3'-кінець мРНК від РНКаз. Особливістю РНКаз є спорідненість до гістонів. Зв'язування гістонів призводить до прискорення деградації мРНК. Причиною є руйнування структури петлі, що робить 3'-кінець вільним для дії РНКаз. Іншим прикладом може виступати тубулінова мРНК. Розпад цієї мРНК прискорюється продуктами її трансляції – мономерами тубуліну і навіть не до кінця синтезованим пептидом.

Проте іноді в регуляції розпаду мРНК можуть бути задіяні і більш складні зв'язки. Наприклад, мРНК трансферина (білка, який необхідний для транспорту іонів заліза в плазмі крові і перенесення їх в клітину). Трансферин утворюється в гепатоцитах. При дефіциті іонів заліза в клітинах печінки стабільність трансферинової мРНК висока. Тому трансферин інтенсивно утворюється і забезпечує зв'язування заліза (в місцях руйнування еритроцитів, із продуктів харчування і ін.). Це сприяє підвищенню концентрації іонів Fe^{2+} і в клітинах (гепатоцитах та інших клітинах). При надлишку іонів Fe^{2+} в гепатоцитах стабільність трансферинової мРНК значно знижується. Отже, на інтенсивність розпаду мРНК впливає ліганд, що зв'язується з білком. В 3'-ділянці мРНК трансферину, що не транслуються, є 5 шпильок, що складають так званий залізочутливий елемент (IRE – iron-responsive element). За відсутності Fe^{2+} з ним зв'язується спеціальний IRE-зв'язуючий білок, що захищає полі(А)-фрагмент мРНК від дії 3'-РНКаз. Можливо, що цей білок, взаємодіючи одночасно з IRE 3'-кінцем полі(А)-фрагмента, полегшує утворення полі(А)-фрагментом петлі із захищеним 3'-кінцем. Внаслідок накопичення в гепатоцитах іонів Fe^{2+} , вони викликають дисоціацію IRE-зв'язуючого білка, внаслідок чого полі(А)-фрагмент мРНК трансферину стає більш доступним для 3'-РНКаз.

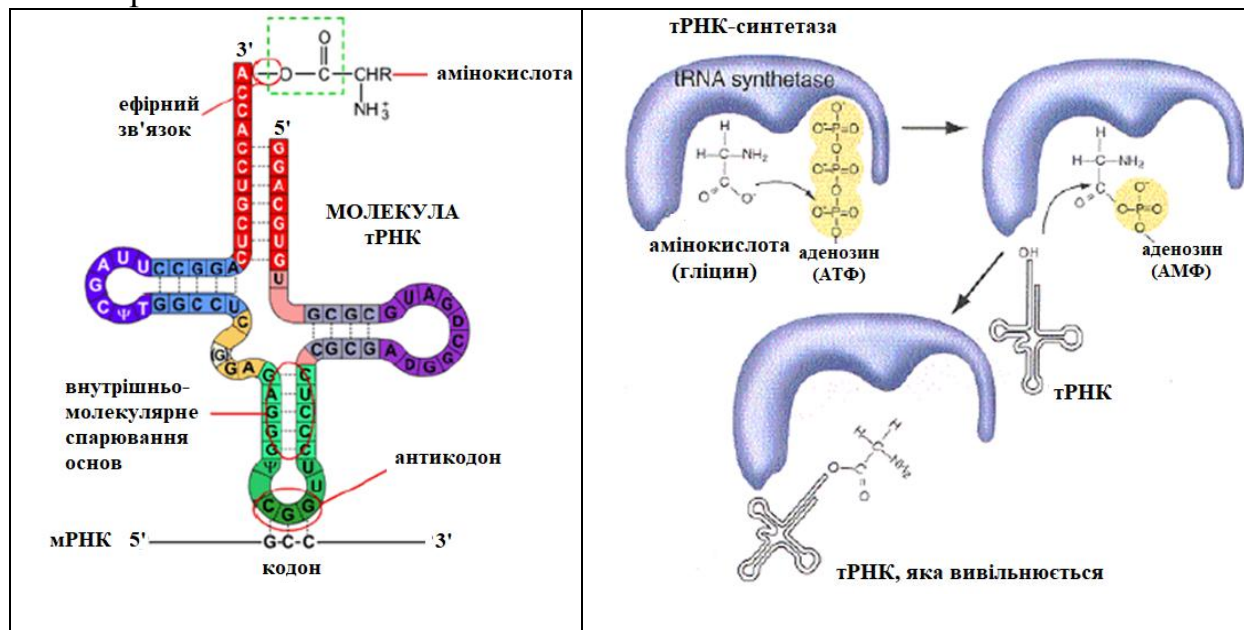
9. Трансляція мРНК

Трансляція – синтез білка. Трансляція мРНК відбувається в три стадії: ініціація, елонгація та термінація.

9.1. Механізми трансляції мРНК

В трансляції беруть участь не вільні амінокислоти, а *аміноацил-тРНК* (aa-тРНК): Ала-тРНК^{ала}, Мет-тРНК^{мет} та інші для всіх 20 амінокислот. Кожна амінокислота зв'язана з акцепторною петлею «власної» тРНК. Це не просто активація амінокислоти, а й спряження амінокислоти з її антикодом. Ключову роль у правильному зв'язуванні відіграють специфічні ферменти – *аміноацил-тРНК-синтази*; для виконання цієї ролі вони мають по два центри впізнавання – для амінокислоти і для тРНК. Взаємодія амінокислоти з тРНК потребує енергії АТФ: спочатку амінокислота зв'язується з аденилатом, а вже потім переміщується на тРНК. Ці стадії відбуваються в активному центрі аміноацил-тРНК-синтази.

Кожна молекула тРНК використовується як «носій» амінокислоти багаторазово.

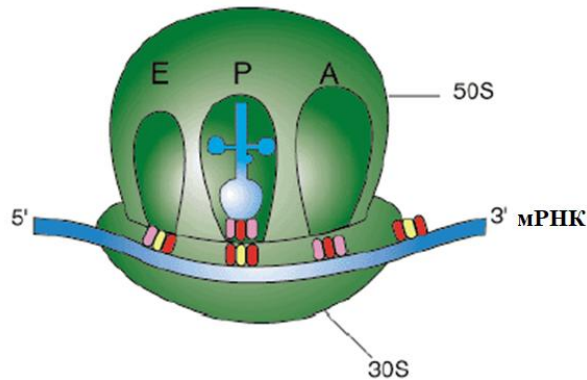


Процес *ініціації трансляції* починається зі зборки активної рибосоми. *Функціональні центри рибосом* знаходяться на контактуючих поверхнях обох субодиниць рибосоми. Форма субодиниць рибосом та їх контактуючих поверхонь складні. Зібрана рибосома нагадує по формі серце (відсутні порожнини): праві відділи утворені малою субодиницею, а ліві (більш великі) – великою субодиницею. Між ними знаходиться низка невеликих порожнин – заглибин у контактуючих поверхнях. У цих порожнинах розташовані ділянки, де містяться: мРНК, пептидил-тРНК (синтезований у даний час пептид, який зв'язаний з тРНК) і чергова аміноацил-тРНК.

У зібраному вигляді рибосома (містить приблизно 80 макромолекул) – це суперфермент, який правильно орієнтує компоненти процесу трансляції та каталізує певні реакції між компонентами рибосоми.

До складу рибосом входять:

- *центр зв'язування мРНК* (М-центр); він утворений частинкою 18S-рРНК, яка комплементарна протягом 5–9 нуклеотидів 5'-фрагменту мРНК, що нетранслюється;
- *пептидильний центр* (П-центр); на початку процесу трансляції з ним зв'язується ініціююча aa-тРНК. У еукаріотів кодоном ініціації є кодон, що кодує метіонін. Потім в П-центрі знаходиться пептидил-тРНК, яка містить вже синтезовану частину пептидного ланцюга;
- *Е-центр* («exit» - вихід); у Е-центр переміщується тРНК, яка втратила зв'язок з пептидилом, перед тим, як вона виходить із рибосоми. Часто розглядається як складова частина П-центру;
- *амінокислотний центр* (А-центр) – місце зв'язування чергової aa-тРНК;
- *пептидилтрансферазний центр* (ПТФ-центр); каталізує перенесення пептидила із складу пептидил-тРНК на чергову aa-тРНК, яка потрапляє у А-центр. При цьому утворюється ще один пептидний зв'язок і пептидил подовжується на одну амінокислоту.



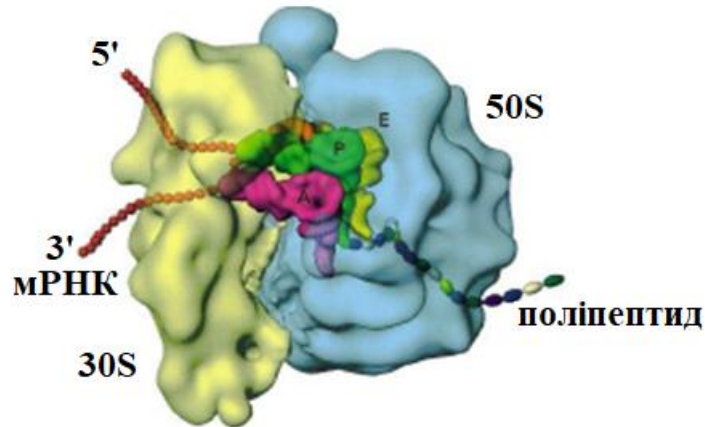
А - аміноацил-тРНК-зв'язуючий сайт
(акцепторна ділянка)
Р - пептидил-тРНК-зв'язуючий сайт
(доторна ділянка)
Е - ділянка від'єднання тРНК від
рибосоми

Як в А-центрі, так і в П-центрі антикодонова петля відповідної тРНК звернена до М-центру, а акцепторна петля з аміноацилом або пептидилом – до ПТФ-центру.

Мала субодиноця рибосоми містить 18S-рРНК, яка зв'язується з мРНК, тому М-центр розташований у малій субодиноці. Також на малій субодиноці знаходиться основна частина А-центру і невелика частина П-центру.

Велика субодиноця містить інші частини А-центру (ділянку зв'язування акцепторної петлі aa-тРНК з аміноацилом) і П-центру (основна частина), а також ПТФ-центр.

Рибосома прокариотів

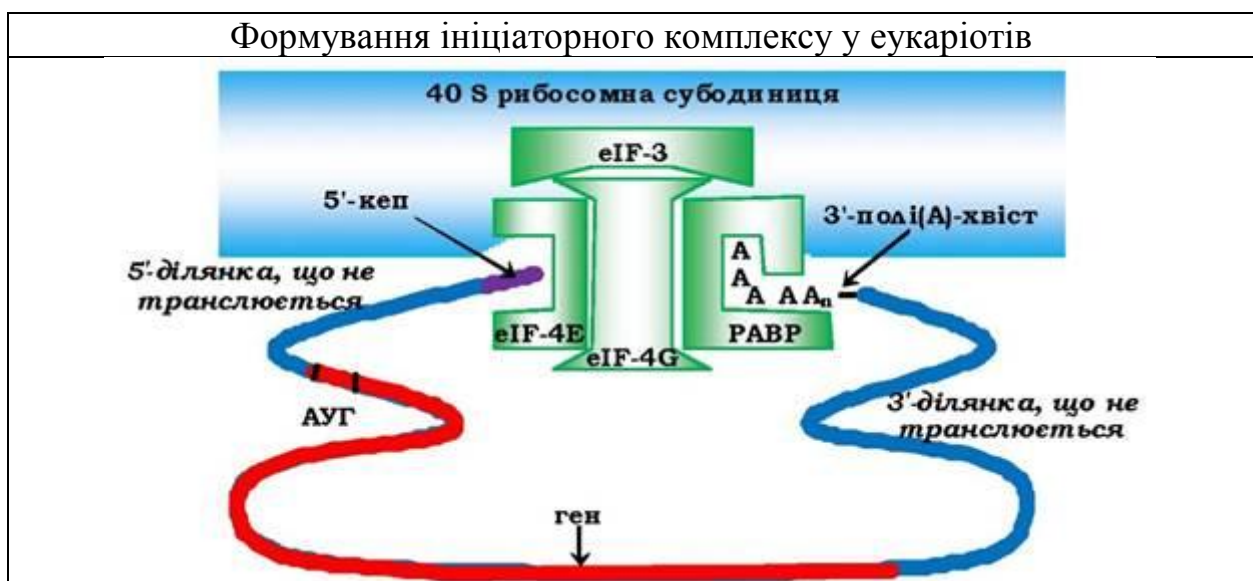
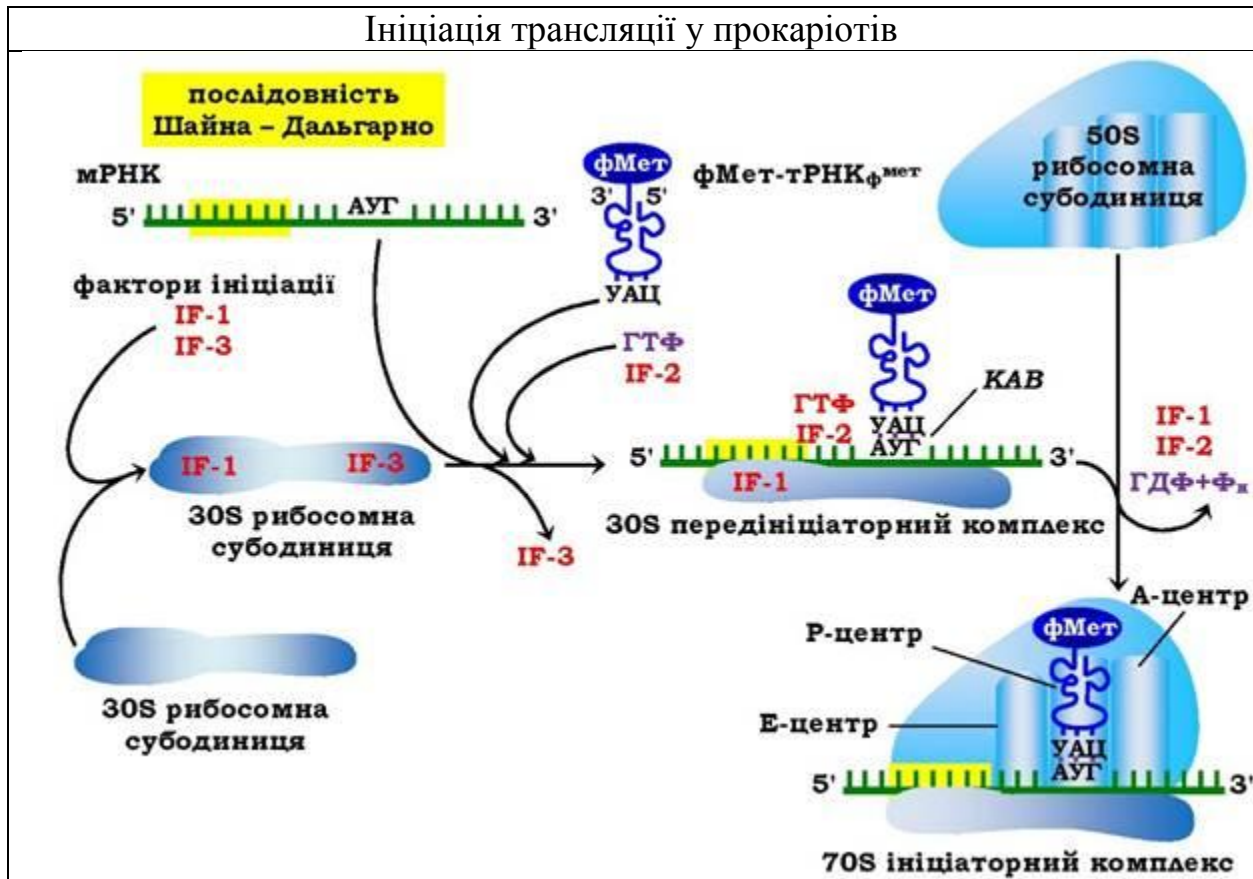


Синтез рибосом у еукаріотів відбувається в ядерці. рРНК (18S, 5,8S і 28S) синтезується в ядерці РНК-полімеразою I у вигляді єдиного попередника (45S), який потім піддається модифікаціям і нарізанню. 5S-рРНК синтезується РНК-полімеразою III і не потребує додаткових модифікацій. Майже вся рРНК знаходиться у вигляді магнієвої солі, що необхідно для підтримки структури. При видаленні іонів магнію рибосома піддається дисоціації на субодиниці.

Існує гіпотеза, що трансляція у еукаріотів відбувається не у всій цитоплазмі клітини, а в окремих областях цитоплазми – «трансляційних компартментах». Трансляція мРНК секреторних і мембранних білків (3-15% від усіх синтезованих клітиною білків) відбувається на рибосомах, які зв'язані з ендоплазматичною сіткою. Ще 35-45% рибосом зв'язані з цитоскелетом. 20-40% рибосом знаходяться у незв'язаному стані в цитозолі. Компартменталізація трансляції забезпечує високу швидкість біосинтеза білка та широкі можливості регуляції цього процесу.

Ініціація трансляції. мРНК (5'-ділянка, що не транлюється) зв'язується з малою 40S субодиницею рибосоми. У еукаріотів існує два основних механізми знаходження рибосомою стартового кодона АУГ – кеп-залежний (скануючий) та кеп-незалежний (внутрішня ініціація). При *кеп-залежному механізмі* мала субодиниця рибосоми сідає на 5'-кінець мРНК в обоєх частин кепу і рухається вздовж молекули мРНК, скануючи кодони в пошуках ініціаторного АУГ. *Кеп-незалежний механізм* здійснюється за рахунок елементів IRES (Internal Ribosomal Entry Site) – ділянки мРНК, що володіє вираженою вторинною структурою, яка дозволяє їй направляти рибосоми на стартовий кодон АУГ. 10-15% всіх мРНК здатні до кеп-незалежної трансляції. Кодон ініціації АУГ знаходиться на рівні П-центра майбутньої рибосоми. Консенсусна *послідовність Козак*, яка відіграє важливу роль в ініціації трансляції у еукаріотів, включає 4-6 нуклеотидів перед старт-кодоном і 1-2 нуклеотиди безпосередньо після старт-кодону. У ссавців це GCCRCCAUGG, у дводольних рослин – A(A/C)AAAUGG, у однодольних рослин – ARCCAUGGC. Оптимальний нуклеотидний контекст АУГ-кодона корелює з високим рівнем синтезу білка з відповідної мРНК *in vivo* і є характеристикою так званої «сильної» (та, яка ефективно ініціює трансляцію) послідовності Козак.

Послідовність Козак не є сайтом зв'язування рибосоми на протизагу прокаріотичній послідовності Шайна-Дальгарно. За рахунок комплементарної взаємодії з кодоном АУГ забезпечується зв'язування ініціюючої aa-тРНК (Мет-тРНК^{мет}). Вона взаємодіє з П-центром великої субодиниці; відбувається зв'язування і великої субодиниці. Формується структура із чотирьох основних компонентів.

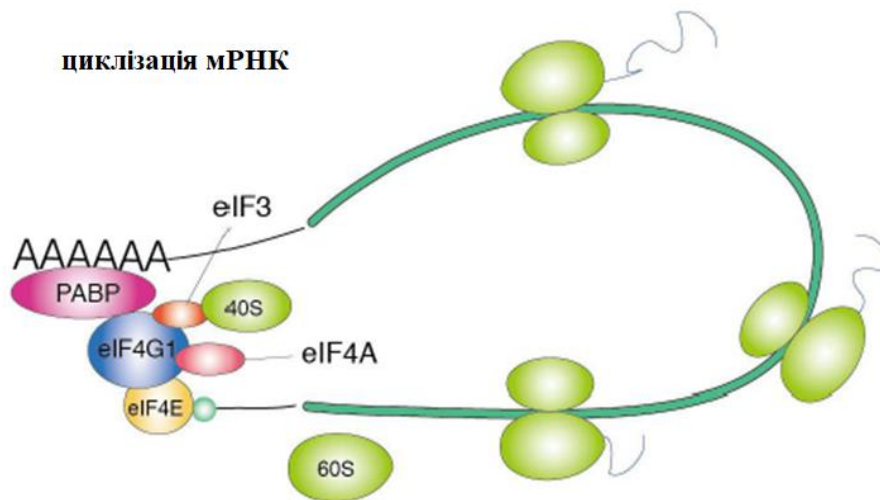


Для ініціації трансляції необхідні і інші компоненти – ГТФ і три білкові фактори – eIF-1, eIF-2 і eIF-3 (eucariotic initiation factor):

- фактор eLF-3 приєднується до вільної малої субодиниці рибосоми і заважає передчасному зв'язуванню 60S субодиниці рибосоми, і навпаки, сприяє зв'язуванню мРНК;
- фактор eLF-2 зв'язує ініціюючу aa-тРНК; мабуть, білок з aa-тРНК зв'язуються поза рибосомою; до складу комплексу входить ГТФ. Потім після розміщення Met-тРНК^{мет} в П-центрі і зв'язування з 60S субодиницею рибосоми ГТФ гідролізується до ГДФ і неорганічного фосфату, одночасно фактори eLF-3 і eLF-2 залишають рибосому;
- фактор eLF-1 сприяє новій «зарядці» фактора eLF-2 шляхом приєднання до нього чергових молекул ГТФ і Met-тРНК^{мет}.

В результаті ініціації трансляції в П-центрі зібраної рибосоми опиняються ініціюючий кодон мРНК (АУГ) і пов'язана з ним ініціююча aa-тРНК, яка при утворенні першого пептидного зв'язку відіграє роль пептидил-тРНК.

У еукаріотів можлива реініціація трансляції, коли після закінчення трансляції рибосома з білковими факторами не дисоціює від мРНК, а перескакує з 3'- на 5'-кінець мРНК і починає ініціацію ще раз. Це можливо завдяки так званій циклізації мРНК в цитоплазмі, тобто фізичному наближенню старт-і стоп-кодонів за допомогою спеціальних білків.



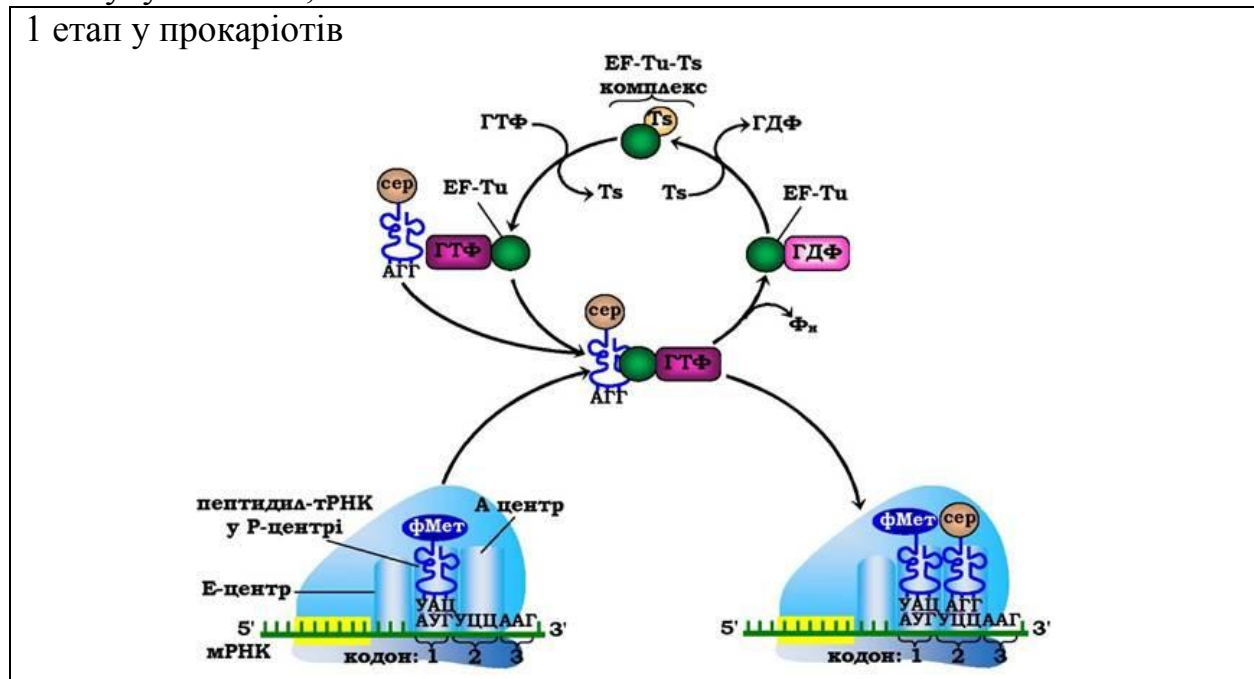
Елонгація трансляції. Після ініціації починається основний етап трансляції – елонгація (подовження пептидного ланцюга). Елонгація має циклічний характер: включенню кожної чергової амінокислоти відповідає один і той же цикл подій – незалежно від того, скільки амінокислотних залишків вже знаходиться в пептидному ланцюзі – тільки один (як відразу після ініціації) або вже більше 100.

У циклі елонгації розрізняють три стадії:

- зв'язування aa-тРНК. На першій стадії з вільним А-центром рибосоми з'єднується чергова aa-тРНК, що має антикодон, комплементарний кодону мРНК, яка знаходиться в А-центрі. Утворення цього зв'язку потребує ГТФ і два білкових фактора – фактора елонгації EF-1u і EF-1s (elongation factor).

Фактор EF-1u (як і фактор eIF-2) утворює комплекс з ГТФ і з черговою aa-тРНК, яка вже знаходиться в рибосомі.

Коли антикодон цієї аа-тРНК не комплементарний кодону мРНК в А-центрі, комплекс не затримується в цьому місці і шляхом дифузії виходить із рибосоми. Якщо антикодон цієї аа-тРНК комплементарний кодону мРНК, комплекс фактора EF-1u з ГТФ (комплекс елонгації) і з аа-тРНК розпадається: аа-тРНК цього комплексу зв'язується з А-центром, ГТФ гідролізується до ГДФ, і ГДФ разом із фактором EF-1u вивільнюються. Потім EF-1s за участі фактора EF-1s поза рибосомою обмінюють ГДФ на ГТФ і зв'язують чергову молекулу аа-тРНК;



- замикання пептидного зв'язку. У рибосомі після першої стадії поряд, один біля одного, розташовані пептидил-тРНК (у П-центрі) і аа-тРНК (у А-центрі). Також їх акцепторні петлі і пов'язані з ними амінокислотні залишки розташовані в каталітичному центрі (ПТФ). В каталітичному центрі проходить пептидилтрансферазна (ПТФ) реакція – перенесення пептидила (або ініціюючої амінокислоти) з його тРНК на амінокислоту аа-тРНК, яка тільки потрапила в рибосому. З тРНК амінокислотний залишок зв'язаний за допомогою власної карбоксильної групи. Під час ПТФ-реакції карбоксильна група пептидилу утворює зв'язок із NH₂-групою чергової амінокислоти.

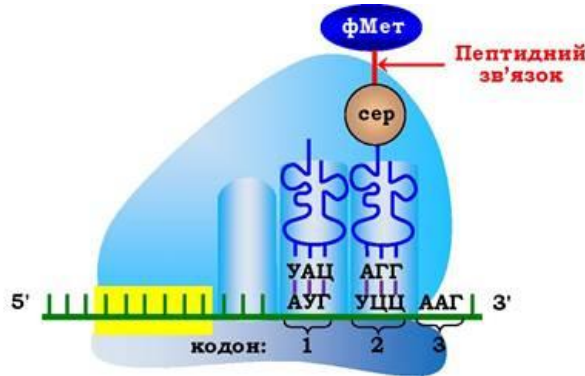
Амінний (N-) кінець пептидила залишається інтактним.

Ріст пептидильного ланцюга під час трансляції відбувається у напрямку від N- до С- кінця.

Пептидилтрансферазна реакція (ПТФ) супроводжується виділенням деякої кількості енергії, тому ГТФ не потрібна; не беруть участь і додаткові білкові фактори. Під час ПТФ-реакції пептидил подовжується на один амінокислотний залишок і стає зв'язаним із іншою тРНК. При цьому антикодонова петля цієї тРНК ще знаходиться в А-центрі рибосоми; акцепторна петля разом з пептидилом може потрапити в ході реакції в П-центр (А/П-орієнтація). А/П орієнтація є причиною виникнення стереохімічного напруження.

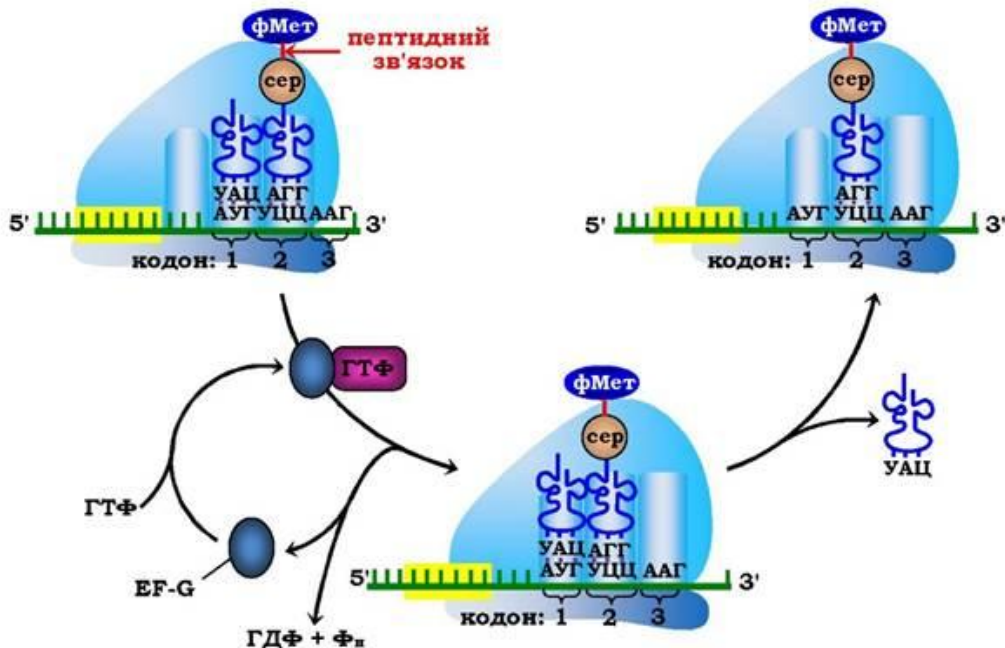
Попередня ж тРНК пептидила стає вільною: її антикодонова петля («голова») ще знаходиться в П-центрі, акцепторна петля («хвіст»), що звільняється, релаксує у бік Е-ділянки П-центру (П/Е орієнтація);

2 етап у прокаріотів



- транслокація. Остання стадія - переміщення мРНК разом з новоутвореною пептидил-тРНК відносно рибосоми на довжину одного кодону за рахунок руху рибосоми відносно мРНК в напрямку її 3'-кінця. Рушійною силою транслокації може бути стереохімічне напруження в структурі нової пептидил-тРНК. «Хвіст» (пептидил, зафіксований у П-центрі) втягує у П-центр і «голову» (тРНК). Так як тРНК зв'язана з кодоном мРНК, то і мРНК теж переміщується відносно рибосоми.

3 етап у прокаріотів

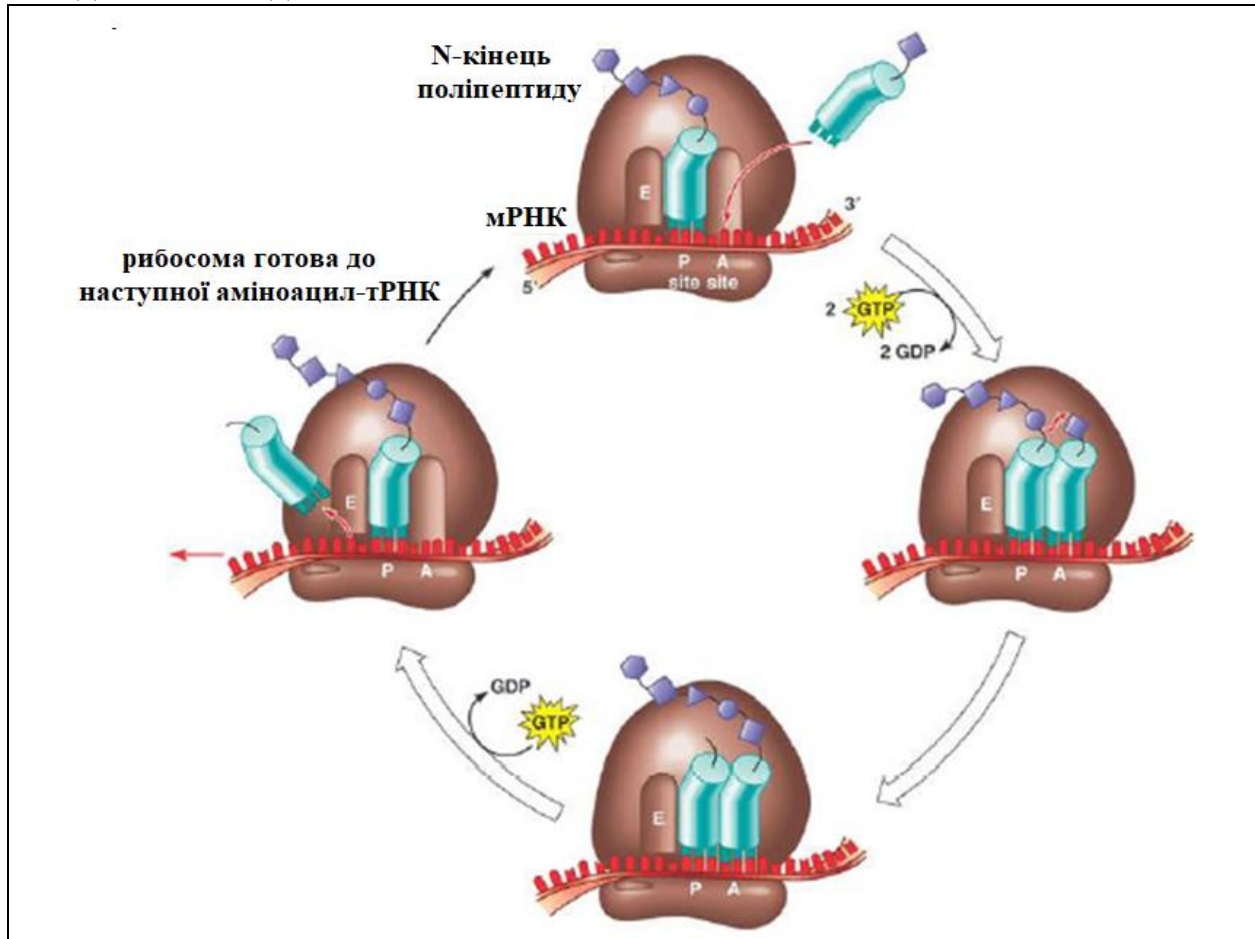


В процесі бере участь ГТФ і білковий фактор елонгації EF-2, який називається також *транслоказою*. Стереохімічне напруження може виникати не в пептидил-тРНК, а в транслоказі, яке виникає за рахунок енергії ГТФ. В результаті транслокації в П-центрі рибосоми з'являється нова пептидил-тРНК і кодон мРНК, що відповідає новій пептидил-тРНК. тРНК, що звільнюється при цьому, рухається із рибосоми. В А-центрі вже міститься наступний кодон мРНК і може приймати нову аа-тРНК.

На цьому цикл елонгації завершується і починається черговий цикл.

Подовження пептидного ланцюга на один амінокислотний залишок потребує витрати двох молекул ГТФ (одна молекула на зв'язування aa-тРНК і одна на транслокацію).

Багатократне повторення таких циклів і призводить до включення у пептидний ланцюг, що будується, амінокислотних залишків відповідно з послідовністю кодонів в мРНК.



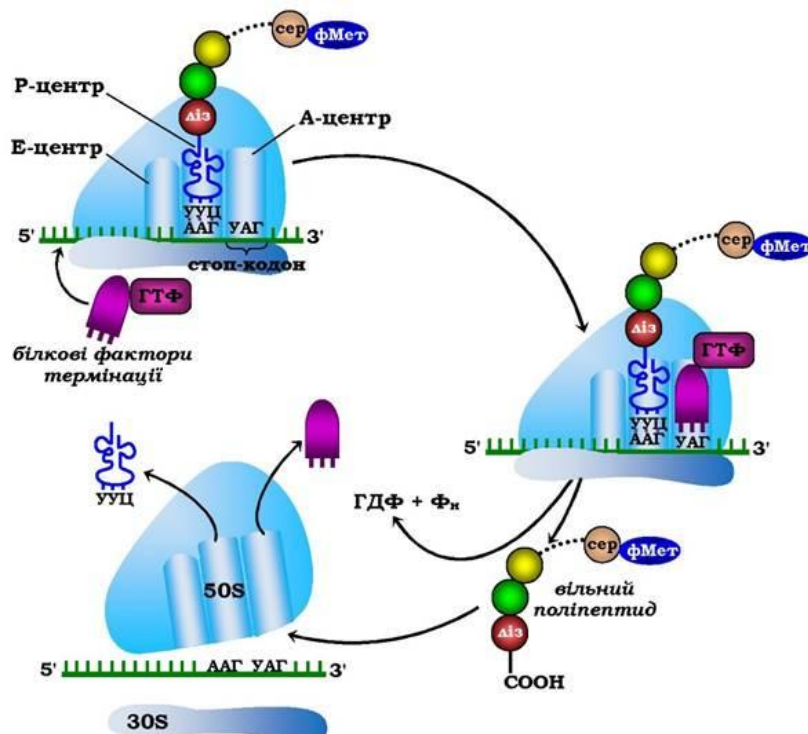
Термінація трансляції. Сигналом про закінчення трансляції слугує поява в рибосомі одного із «беззмистових» кодонів мРНК – УАА, УАГ або УГА. Ці кодони пізнаються вже не антикодомом aa-тРНК, а білковими факторами термінації (eRF; eucariotic releasing factor). Таких факторів два: один впізнає послідовність У-А-Пур, тобто кодони УАА і УАГ; другий – послідовність У-Пур-А, тобто кодони УАА і УГА. Фактор eRF, впізнавши власний антикодон, стимулює гідролазну активність ПТФ-центру. Внаслідок цього відбувається гідроліз зв'язку між тРНК і пептидом. Ні ГТФ, ні інший кофермент для цієї реакції не потрібний. На ефективність термінації трансляції у еукаріотів впливають послідовності нуклеотидів поруч з термінаторним кодоном і структура С-кінцевої частини поліпептидного ланцюга, що будується.

Після цього пептидний ланцюг, тРНК і мРНК відокремлюються від рибосоми, потім дисоціює рибосома на 60S- і 40S-субодиниці. Звільнені компоненти знову готові почати синтез чергового пептидного ланцюга.

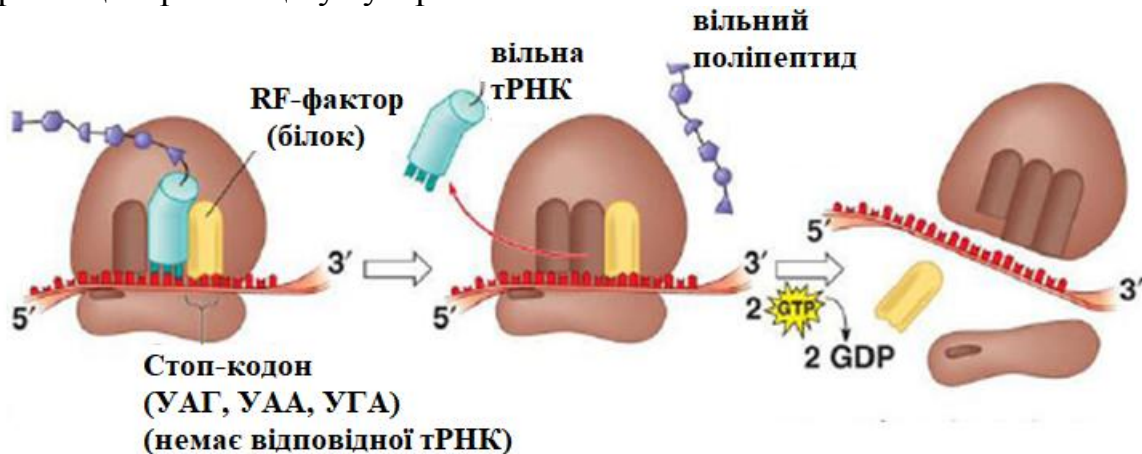
У прокаріотів відомі фактори термінації RF-1 (викликає відділення поліпептидного ланцюга при зчитуванні кодонів УАА і УАГ), RF-2 (діє

аналогічним чином при зчитуванні кодонів УАА і УГА) і RF-3 (здатний полегшити роботу двох інших факторів). Коли в А-ділянці опиняється один із трьох термінуючих кодонів – УАГ, УАА або УГА, із-за відсутності тРНК, яка б відповідала цим кодонам, поліпептидил-тРНК залишається зв'язаним з Р-ділянкою. RF-1 і RF-2 каталізують від'єднання поліпептидного ланцюга від тРНК, від'єднання їх обох від рибосоми, а 70S-рибосоми – від мРНК. RF-1 впізнає в А-ділянці кодон УАА або УАГ. RF-2 включається в тому випадку, коли в А-ділянці опиняється УАА або УГА. Якщо термінуючим кодоном є УАА, то ефективність процесу термінації є найбільшою, оскільки кодон впізнають обидва фактори – RF-1 і RF-2.

Термінація трансляції у прокаріотів



Термінація трансляції у еукаріотів



9.2. Полісоми

Один ланцюг мРНК, як правило, одночасно транслюють декілька рибосом. З 5'-ділянкою, що не транслюється, дозрілої мРНК зв'язується перша рибосома (разом із ініціюючою aa-тРНК). Рибосома починає рухатися до 3'-

кінця мРНК і приєднувати амінокислоти в пептидний ланцюг. При віддаленні на достатню відстань від 5'-ділянки, що нетранслюється, остання стає досяжною для наступної рибосоми. Таким чином, утворюється *полісома* (або полірибосома) – комплекс рибосом, які з'єднані ланцюгом мРНК і поступово переміщуються до 3'-кінця мРНК.

Отже, *процес трансляції має конвеєрний характер, як і транскрипція.*

Середня відстань між сусідніми рибосомами в полісомі залежить від багатьох факторів (співвідношення між пулом рибосом і мРНК). При трансляції глобінових мРНК (містять близько 430 нуклеотидів у кодуючій ділянці) в ретикулоцитах відстань складає близько 80 нуклеотидів, полісома з мРНК містить 5-6 рибосом.

Середня швидкість переміщення рибосом вздовж мРНК у еукаріотів складає близько 2-15 нуклеотидів на секунду, у бактерій – 30-50 нуклеотидів на секунду.

Переміщення рибосоми на три нуклеотиди (на один кодон) означає, що відбулося включення в пептид ще одного амінокислотного залишку, тому швидкість включення амінокислот у білки, що будуються, складає у еукаріотів 1-2 залишки у секунду. При швидкості 1-2 залишки на секунду загальна тривалість трансляції глобінової мРНК дорівнює 2 хвилини.

9.3. Особливості трансляції у прокариотів і в мітохондріях

У *прокариотів* існують особливості білоксинтезуючої системи. Перш за все, відмінні від еукаріотів параметри рибосоми. Бактеріальна 70S рибосома складається з малої субодиниці 30S (16S-рРНК і 21 молекула білка) і великої субодиниці 50S (23S-рРНК, 5S-рРНК і 34 молекул білків). Крім того, відрізняються також додаткові білкові фактори, що використовуються в процесі трансляції – фактори ініціації, елонгації і термінації.

Власне сам процес трансляції збігається за механізмом з процесом трансляції у еукаріотів, проте має декілька відмінностей:

- *спряження трансляції із транскрипцією.* У прокариотів можуть одночасно відбуватися і подальше продовження мРНК під час транскрипції, і трансляція уже утворених ділянок цієї мРНК. Таким чином, утворюється єдиний комплекс, який включає ДНК (у бактерій кільцева); ДНК-полімеразу, що рухається вздовж ДНК; ділянку мРНК, що синтезується; рибосому, що рухається вздовж мРНК; ділянку поліпептидних ланцюгів, що синтезуються;
- *спряження синтазу декількох пептидних ланцюгів.* Відомо, що бактеріальні мРНК є поліцистронними (містять інформацію про структури декількох пептидних ланцюгів). Кожний цистрон мРНК має ініціюючий і термінуючий кодони, а перед ініціюючим кодоном розташовується специфічна послідовність (так звана *послідовність Шайна-Дальгарно* – аналог 5'-ділянки, що не транслюється) у мРНК еукаріот) для зв'язування з 16S-рРНК малої субодиниці. Тому цистрони мРНК можуть транслюватися одночасно і незалежно один від одного. Незалежно від

цього відбувається зв'язування інших рибосом з іншими цитронами тієї самої мРНК та їх трансляція;

- *ініціаторна aa-тРНК*. Ініціаторною aa-тРНК у бактерій є не Met-тРНК^{мет}, а формілMet-тРНК_f^{мет}. Це означає, що після зв'язування з ініціаторною тРНК залишок метіоніну ще приєднує формільну групу – вона блокує амінний кінець. Тому N-кінець усіх поліпептидних ланцюгів у бактерій починається з формілметіоніну. По закінченню трансляції відщеплюється або тільки формільна група, або увесь цей амінокислотний залишок.

ДНК крім ядра міститься ще в *мітохондріях і пластидах*. Тобто, в клітинах є автономний геном і автономна система його експресії. Ця система подібна до тої, що є у прокариот, та включає кільцеву ДНК, подібні за параметрами до прокариотичних рибосоми. Для ініціації трансляції в мітохондріях та пластидах також використовується формілMet-тРНК_f^{мет}.

Мітохондріальна ДНК містить біля 15000 п.н., що на 3-4 порядки менше, ніж в ДНК хромосом. В одній мітохондрії міститься 1-2 молекули ДНК; у всіх мітохондріях клітини міститься багато таких молекул – від 50 до 3000, які є практично однаковими. Але сумарна частка мітохондріальної ДНК від загальної маси клітинної ДНК становить не більше 0,5–1%. Ще менший внесок ДНК мітохондрій в загальну кількість генів. ДНК мітохондрій кодує тільки 10-20 мітохондріальних білків; це складає приблизно 5% усіх білків мітохондрій. ДНК мітохондрій кодує рРНК мітохондріальних рибосом і мітохондріальні тРНК. В процнмі трансляції в мітохондріях використовується всього 22 вида тРНК, тоді як в цитоплазмі їх біля 60.

Очевидно, поясненням існування цієї автономної системи може бути той факт, що мітохондрії та пластиди вважається «нащадками» стародавніх прокариотів, які потрапили у еукаріотичні клітини і утворили з ними симбіоз.

9.4. Інгібітори трансляції

Інгібування трансляції у прокариотів. Специфічними інгібіторами трансляції є антибіотики, які впливають на мікроорганізми, але не проявляють ефекту на процес трансляції в клітинах господаря.

- Антибіотики, які діють у ділянці малої (30S-) субодиниці:

стрептоміцин – діє на ту частину П-центра, яка знаходиться на малій субодиниці; інгібує зв'язування ініціаторної aa-тРНК;

тетрациклін – впливає на А-центр малої (30S-) субодиниці; інгібує зв'язування чергової aa-тРНК.

- Антибіотики, які діють у ділянці великої (50S-) субодиниці:

левоміцетин (або *хлорамфенікол*) – інгібує активність ПТФ-центру;

еритроміцин – діє на ту ділянку великої субодиниці, яка відповідає за транслокацію; в результаті новий пептидил-тРНК залишається в А-центрі і перешкоджає зв'язуванню чергової aa-тРНК.

Інгібування трансляції у еукаріотів. У тварин і людини різні речовини можуть виступати в якості інгібіторів трансляції:

- Антибіотики:

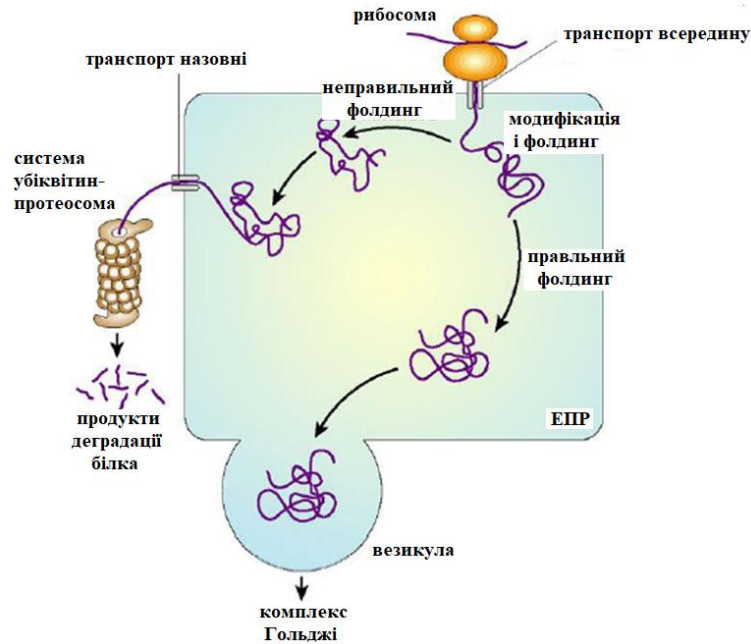
циклогексимід – блокує ПТФ-центр, який міститься на великій (80S-) субодиниці рибосоми;

пуроміцин – є структурним аналогом aa-тРНК, тому він займає А-центр рибосоми (як бактеріальної, так і еукаріотичної); в ПТФ-реакції на пуроміцин переноситься пептидил; пептидилпуроміцин не переноситься в П-центр, а залишає рибосому. Таким чином, відбувається переривання елонгації.

- *Дифтерійний токсин* (вражає не тільки ті тканини, які заселені бактеріями, але і внутрішні органи, куди він потрапляє з током крові). В клітинах дифтерійний токсин інактивує один із факторів елонгації, фактор EF-2, або транслоказу, тобто інгібує синтез білку в цілому.
- *Інтерферони* – невеликі білки-глікопротеїни, які виробляються в клітинах тварин і людини, інфікованих деякими вірусами (особливо ефективно стимулюють віруси з двохланцюговою РНК (реовіруси)), а також в інших випадках. Інтерферони зв'язуються зі специфічними рецепторами клітинної мембрани, в результаті чого запускаються різні сигнальні шляхи. Один із шляхів включає сборку певного транскрипційного фактора і закінчується специфічною зміною активності певних генів. Інші сигнальні шляхи мають антивірусну направленість. Вони ініціюються при утворенні на клітинній мембрані комплексу інтерферону з вірусною РНК, в результаті чого стимулюється розпад в клітинах мРНК і гальмування трансляції. При цьому гальмується синтез як вірусних білків, так і власних. Комплекс інтерферона з РНК сам або через посередника здатен активувати олігонуклеотидсинтетазу, яка каталізує синтез олігоаденілата, який активує ендонуклеазу, здатну руйнувати мРНК. Крім того, комплекс інтерферона з РНК підвищує активність протеїнкінази, яка модифікує певні білки шляхом їх фосфорилування. Серед цих білків є протеїнкіназа, яка модифікує фактор ініціації трансляції eIF-2 (фосфорилує його), що призводить до втрати ним активності та блокуванню трансляції.

10. Фолдинг білка

Фолдинг білка – процес спонтанного згортання поліпептидного ланцюга в унікальну нативну структуру (третинну структуру). Фолдинг білків відбувається в ендоплазматичному ретикулумі, де містяться необхідні для цього шаперони і ферменти. Також ендоплазматичний ретикулум володіє унікальним окисним потенціалом, який полегшує утворення дисульфідних зв'язків в процесі фолдингу білка. Із ендоплазматичного ретикулума білки з коректною структурою транспортуються до місця призначення, а з порушеною структурою піддаються деградації.



Можлива послідовність фолдингу білка:

Випадковий «клубок»

вторинна і третинна структури відсутні,
пептидний ланцюг повністю розгорнутий

Стан - попередник розплавленої глобули

вторинна структура сформована не повністю,
третинна структура відсутня,
ланцюг частково розгорнутий

Розплавлена глобула

вторинна структура повністю сформована,
ланцюг згорнутий в компактну глобулу,
проте жорстка третинна структура відсутня

Нативний білок

ланцюг згорнутий в компактну глобулу,
яка має чітку третинну структуру

В процесі фолдингу білка важливу роль відіграє *феномен кооперативності*. Феномен кооперативності – утворення одного або декількох «правильних» зв'язків різко прискорює замикання інших нативних зв'язків. Завдяки цьому весь фолдинг білка займає менше секунди. Для великих білків зі складною структурою фолдинг може тривати декілька хвилин.

Фолдинг білка забезпечується не одномоментно, а в декілька стадій. У випадку достатньо великих білків спочатку формується третинна структура доменів, а потім домени займають правильне положення відносно один одного. Пізніше вже відбувається зв'язування мономерів у олігомери (об'єднання декількох субодиниць)

Для маленьких білків (довжиною біля 100 амінокислот) проміжних стадій немає. Фолдинг відбувається за принципом «все або нічого».

Фолдинг відбувається таким чином. Розгорнутий пептидний ланцюг тривалий час не може згорнутися – не утворюються контакти між амінокислотними залишками, бо залишки не зближуються. Потім ланцюг випадково досягає стану, в якому може утворюватися декілька «правильних» або нативних контактів. В результаті з'являється «ядро згортання» (ядро нуклеації). Після цього фолдинг завершується дуже швидко. Так відбувається фолдинг, наприклад, білка - хімотрипсिनного інгібітора 2 (довжиною 65 амінокислотних залишків).

Тільки невеликі білки здатні самовільно будувати природну структуру білка. Фолдинг великих білків відбувається за участі специфічних білків-шаперонів і ферментів – фолдаз, які створюють можливість для швидкого формування просторової структури білка.

Ферменти – фолдази необхідні в каталітичних кількостях. До цих ферментів відносяться:

- *протеїндисульфідізомераза* – каталізує переміщення в білках дисульфідних зв'язків. Лабілізація (або ізомеризація) дисульфідних зв'язків у молекулі білка, що формується, дає можливість знайти (шляхом випадкового перебору) таку комбінацію цих зв'язків, якій відповідає енергетично найбільш оптимальна просторова структура. В клітині цей фермент пов'язаний з ендоплазматичною сіткою. Крім дисульфідізомеразної активності цей фермент має здатність до неспецифічного зв'язування пептидів в стехіометричних концентраціях. Таку ж здатність мають типові шаперони;
- *пептидилпроліл-цис-трансізомераза* – каталізує перехід радикалів в області пептидного зв'язку проліна із транс-конфігурації в цис-конфігурацію, і навпаки. При цьому відбувається тимчасовий розрив даного пептидного зв'язку, в результаті чого стає можливим поворот навколо його площини; після цього зв'язок знову замикається.

Шаперони – це родина спеціальних внутрішньоклітинних білків. Вони мають здатність розпізнавати і зв'язуватися з частково згорнутими (або розгорнутими) білками. Після виходу із рибосоми у білках можуть відбуватися «помилкові» взаємодії, наприклад, між гідрофобними фрагментами, і це буде заважати правильному згортанню молекул. Зв'язування шаперонів із

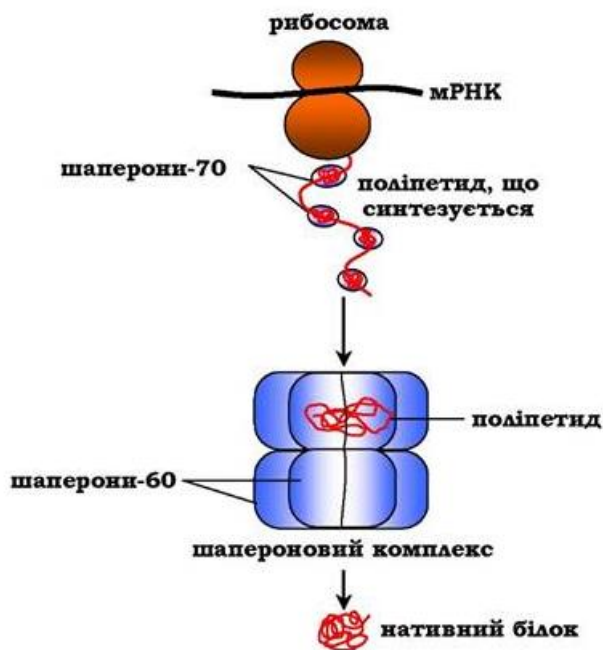
подібними фрагментами частково стабілізує згорнуту молекулу до тих пір, поки не відбудеться правильний фолдинг білка.

Більшість носинтезованих білків може згортатися за відсутності шаперонів. Багато шаперонів є *білками теплового шоку* (Hsp, heat shock protein), тобто білками, експресія яких починається у відповідь на зростання температури або інші клітинні стреси. Тепло сильно впливає на фолдинг білка, а деякі шаперони беруть участь у виправленні потенціальної шкоди від неправильного згортання білка.

Інші шаперони беруть участь у фолдингу нових білків в той момент, коли вони «витягуються» із рибосоми.

Функції молекулярних шаперонів:

- забезпечення правильного фолдингу новосинтезованих білків (попередження агрегації нових білків, «неправильних» внутрішніх взаємодій, лабілізація «неправильних» слабких зв'язків);
- контроль за рефолдингом (попередження агрегації, лабілізація зв'язків просторової структури);
- участь в деяких видах внутрішньоклітинного транспорту білків (до лізосом – старі білки, до мітохондрій – нові білки);
- підтримка ряду білків в певній конформації, в стані так званого незавершеного фолдингу (наприклад, рецептор до глюкокортикоїдних гормонів, рецептори до естрогенів та прогестерону).



Система DnaK/DnaJ у бактерій. Родина білків Hsp70 – це шаперони з масою біля 70 кДа. У шаперонів є «помічники» (*ко-шаперони*) з меншою молекулярною масою. Шаперон DnaK – один із представників родини Hsp70, його ко-шапероном є білок DnaJ. Система цих білків здійснює ко-трансляційний фолдинг, тобто зв'язуються із поліпептидними ланцюгами, що синтезуються, ще до закінчення трансляції, що попереджає «неправильні» взаємодії всередині ще повністю не синтезованих пептидів і агрегацію ланцюгів, які вивільнюються із рибосом. В процесі фолдингу витрачається

АТФ. Для відділення шаперонів в кінці процесу фолдингу необхідна присутність фактора GrpE.

Система GroEL/GroES у бактерій, в мітохондріях і пластидах.
Шаперони GroEL відносяться до білків Hsp60. Ко-шапероном виступає білок GroES. Часто білки Hsp60 називають шаперонінами. Ці білки формують унікальний комплекс, функція якого полягає в ізолюванні білка, що згортається, виправленні в ньому «неправильних» взаємодій та наданні цьому білку можливості самому знайти оптимальну просторову структуру.

Шаперони також беруть участь у фолдингу вірусних білків, без чого останні не можуть брати участь в сборці вірусної частинки.

Проте фолдинг не завжди призводить до формування «правильної» структури білкової молекули. Існує група важких неврологічних захворювань, які обумовлені «неправильним» фолдингом певного білка, який закономірно повторюється. Даний білок в нормальній конформації називається *пріоновим білком* (PrP^c, prion protein, constitutive) та міститься в мозку. За певних умов цей білок набуває іншої конформації з переважанням ділянок з β -структурою, які майже повністю відсутні в нативній формі; молекула білка має підвищену схильність до агрегації. Такий білок називається *пріоном* (PrP^{sc}, proteinaceous infection particle). Така «неправильна» форма білка викликає перехід в таку ж «неправильну» форму і «правильних» форм. Отже, пріони по відношенню до своїх вихідних молекул відіграють роль антишаперонів, які здійснюють фолдинг навпаки. І цей процес є автокаталітичним. Пріони стійкі до протеаз. *Тому пріони є унікальними інфекційними агентами (без нуклеїнової кислоти).* У корів пріони викликають губчасту енцефалопатію, у людини при вживанні м'яса таких корів – хворобу Крейцфельда-Якоба. Також у людини може розвиватися хвороба куру, а у овець – почесуха.

11. Сортування і модифікація білків

При утворенні «експортних», мембранних, лізосомальних, пероксисомальних трансляція відбувається на гранулярній ендоплазматичній сітці. Окремі субодиниці рибосом з ендоплазматичною сіткою ніколи не пов'язані.

Первинний поліпептидний ланцюг таких білків завжди починається із *сигнальної послідовності*. Сигнальна послідовність знаходиться з N-кінця пептидного ланцюга і включає 15-35 амінокислотних залишків. На початку і в кінці сигнальної послідовності знаходяться залишки з полярними радикалами, в середині – з гідрофобними. Це забезпечує взаємодію сигнальної послідовності із відповідними шарами мембрани ендоплазматичної сітки. В кінцевій структурі білка сигнальна послідовність відсутня, вона відщеплюється спеціальною пептидазою після проникнення усієї поліпептидної послідовності білка у внутрішній простір ендоплазматичної сітки.

Послідовність подій при трансляції:

- спочатку в гіалоплазмі збирається ініціаторний комплекс, що включає в себе мРНК одного із білків, рибосому і ініціюючу aa-тРНК, тп починається синтез сигнальної послідовності;
- в гіалоплазмі є специфічні частинки, що впізнають сигнальну послідовність (*SRP – signal recognition particle*). Вони є комплексами РНК-білок. Коли на вільній рибосомі з'являється сигнальна послідовність, SRP зв'язується з рибосомою і зупиняє трансляцію. Комплекс, що утворився - мРНК-рибосома-сигнальна послідовність-SRP - стає здатним зв'язуватися із *докінг-білками*, які знаходяться на цитоплазматичній поверхні мембрани ендоплазматичної сітки. Сигнальна послідовність відіграє роль «мітки», яка визначає, яка рибосома повинна бути прикріплена до ендоплазматичної сітки. Можливо, відбувається також впізнання певного локусу мРНК, так як відомо, що білки різного призначення синтезуються в різних областях ендоплазматичної сітки;
- сигнальна послідовність проникає в ліпідну фазу мембрани ендоплазматичної сітки на всю її глибину і виконує роль організатора, навколо якого особливим способом групуються мембранні білки. В ході цієї взаємодії відбувається гідроліз ГТФ, а SRP виходять назад у гіалоплазму. В результаті в місці знаходження сигнальної послідовності мембранні білки утворюють канал, так званий *поліпептид-транслокуючу пору (транслокон)*;
- трансляція відновлюється і новосинтезований поліпептид починає протягуватися через пору у внутрішній простір ендоплазматичної сітки. При цьому сигнальна послідовність залишається фіксованою в області пори (що, імовірно, зберігає структуру каналу). В цьому місці новосинтезований пептидний ланцюг утворює петлю. *При даному механізмі трансляції не рибосоми рухаються по мРНК, а мРНК переміщується відносно зафіксованих на ендоплазматичній сітці рибосом*. А новосинтезований поліпептидний ланцюг має подвійну фіксацію: до пори (через сигнальну послідовність з N-кінця) і до рибосоми (з C-кінця);

- по закінченню трансляції поліпептидний ланцюг втрачає фіксацію з обох боків (за рахунок відділення від рибосоми та дії сигнальної пептидази), вивільнюється в простір ендоплазматичної сітки, де відбувається його фолдінг.

Подібним чином синтезується багато глікопротеїнів – білками, що містять вуглеводний компонент, який представлений одним або декількома розгалуженими олігосахаридними ланцюгами. Глікопротеїнами є практично всі лізосомальні білки, деякі мембранні (глікофорин, антигенні детермінанти, транслокази, рецептори до гормонів тощо) та «експортні» (деякі білки плазми крові) білки.

Процес глікозування білків відбувається в трьох компартментах клітини – в гіалоплазмі, ендоплазматичній сітці та комплексі Гольджі.

В гіалоплазмі утворюється однакова для всіх білків «заготовка» – розгалужене олігосахаридне ядро із 14 мономерів. До нього входять 2 залишки N-ацетилглюкозаміну, 9 залишків маннози і 3 залишки глюкози. Синтез відбувається шляхом послідовного приєднання моносахаридних залишків до спеціальної ліпідоподібної речовини – доліхолфосфату (довгий вуглецевий ланцюг, що включає біля 100 атомів Карбону). Доліхолфосфат є гідрофобним і легко проходить через мембрани. Антибіотик тунікоміцин здатен блокувати прикріплення до доліхолфосфату першого залишку N-ацетилглюкозаміна і, таким чином, порушувати синтез глікопротеїнів.

За допомогою доліхолфосфату олігосахаридні ядра транспортуються із гіалоплазми до внутрішнього простору ендоплазматичної сітки. Потім спеціальна трансфераза переносить ці ядра від доліхолфосфату на новосинтезовані білки. Зв'язування олігосахариду із пептидним ланцюгом відбувається через амідну (NH₂-CO-) групу залишку аспарагіну. Тому такий процес називається *N-глікозилюванням*.

Ще можливе *O-глікозилювання* – при цьому олігосахарид зв'язується через гідроксигрупу (OH-) серину або треоніну. Але *O-глікозилювання* відбувається лише у апараті Гольджі. В результаті *N-глікозилювання* відповідні білки набувають одного чи декількох олігосахаридних ядер.

В ендоплазматичній сітці можуть відбуватися і інші види модифікацій білків. Наприклад, *гідроксилювання* залишків проліну і лізину здійснюється спеціальним ферментним комплексом, для функціонування потрібна аскорбінова кислота.

Після цих первинних модифікацій в ендоплазматичній сітці відбувається «упакування» сформований білків в *транспортні міхурці*. Вони утворюються у місцях високої концентрації глікозилюваних білків всередині ендоплазматичної сітки. Мембрана ендоплазматичної сітки в таких місцях починає випинатися назовні та відшнуровується у вигляді міхурця. Ззовні він покритий особливим білком клатрином. Транспортні міхурці дифундують до комплексу Гольджі і зливаються з його мембранами.

В комплексі Гольджі продовжуються модифікації та сортування білків. В апараті Гольджі олігосахаридне ядро новосинтезованих білків зазнає різних змін. Так, майже завжди видаляється останній залишок глюкози і декілька

залишків маннози. Для деяких білків на цьому перебудова завершується, а для інших ще продовжується. Так, в певних місцях олігосахаридного ядра приєднуються додаткові залишки галактози та її похідних, нейрамінової або сіалової кислоти. Іноді шляхом О-глікозилювання формуються нові олігосахаридні ланцюги. В результаті цих модифікацій полегшується *сортування білків*.

Білки, які функціонують в ендоплазматичній сітці (ферменти фолдингу, шаперони, ферменти N-глікозилювання і гідроксилювання) та у складі міхурців відшнурувалися від нього, повертаються назад дякуючи наявності у них подібної послідовності із 4-х амінокислотних залишків (-лізин-аспарагінова кислота-глутамінова кислота-лейцин-), яка впізнається.

Білки лізосом, очевидно, також мають певну послідовність, за якою вони відсортовуються. Після цього відбувається додаткова специфічна модифікація їх олігосахаридного компоненту – фосфорилується один із залишків маннози. На внутрішній поверхні мембрани апарату Гольджі у певних місцях є рецептори для маннозофосфату. Саме тут збираються лізосомальні ферменти; їх взаємодія з рецепторами є стимулом до початку утворення і відбрунькування міхурців.

В мембрані, окрім рецепторів, є також протонні насоси, які створюють всередині майбутніх лізосом кисле середовище. Зниження рН у міхурцях приводить до дисоціації лізосомальних ферментів від рецепторів. Після чого рецептори групуються в кластери і видаляються із лізосоми у складі маленьких міхурців, щоб повернутися в апарат Гольджі. При спадковому захворюванні муколіпідозі II (хворобі I-клітин) не відбувається фосфорилування маннози у складі прелізосомальних ферментів, що порушує сортування білків.

Майбутні *інтегральні білки мембран*, очевидно, відсортовуються ще в процесі трансляції. Вважається, що вони не протягуються повністю через пору у мембрані ендоплазматичної сітки, а так і лишаються зафіксованими у даній мембрані. Це можливо завдяки наявності протяжної гідрофобної ділянки в середній частині поліпептидного ланцюга. Після закінчення трансляції і відщеплення сигнальної послідовності N-кінець такого ланцюга опиняється у просвіті ендоплазматичної сітки, а C-кінець – на цитоплазматичній поверхні. У більш складних випадках після відщеплення першої сигнальної послідовності у білку як з N-кінця, так і з C-кінця можуть виявлятися і інші сигнальні послідовності, які протягують відповідний кінець через мембрану. Тоді пептидний ланцюг не один, а декілька разів «прошиває» мембрану. Потім ці білки (разом із оточуючою ділянкою мембрани) опиняються спочатку у стінці транспортного міхурця, що переміщується від ендоплазматичної сітки до апарату Гольджі, потім у мембрані цистерн апарату Гольджі, а згодом у стінці транспортного міхурця, що рухається до плазматичної мембрани і зливається з нею. При цьому увесь час зберігається полярність мембран і орієнтація у них інтегральних білків.

Разом із вбудовуванням у мембрану ендоплазматичної сітки нових білків відбувається включення в неї і нових ліпідних молекул, що приводить

до збільшення площі мембрани і створює її надлишок, необхідний для відшнуровування частин мембрани у вигляді міхурців і росту клітини.

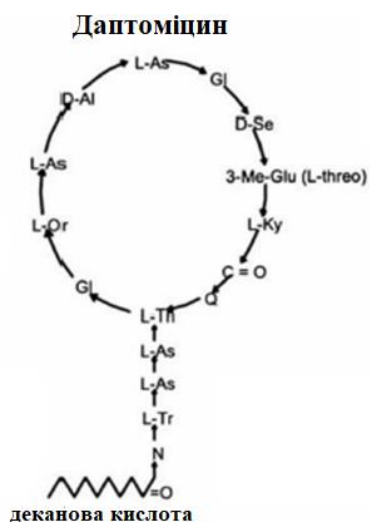
Біля 95% мітохондріальних білків утворюються вільними рибосомами, а інші 5% - внутрішньомітохондріальними рибосомами. Проте при трансляції цих білків теж утворюється сигнальна послідовність для подальшого проходження пептидного ланцюга через мембрани мітохондрій із гіалоплазми в матрикс, де ця послідовність відщеплюється. Якщо білок повинен функціонувати в міжмембранному просторі мітохондрій, то він має ще і другу сигнальну послідовність, яка експонується після видалення першої. За допомогою другої сигнальної послідовності цей білок проникає у міжмембранний простір. До закінчення всіх транспортних процесів поліпептидний ланцюг залишається у розгорнутому стані, що забезпечується шаперонами.

Багато ядерних білків також мають сигнальну послідовність і за її допомоги проникають через пори в ядерній мембрані.

Сигнальна послідовність є і у білків-транскрипційних факторів. Вона може розташовуватися і на N-кінці, і в середині ланцюга. Очевидно, вона слугує міткою для подальшого транспорту в ядро.

Для гістонових білків сигнальна послідовність непотрібна, оскільки вони мають невеликий розмір та великі гідрофобні області, що полегшує взаємодію між собою та транспорт через ядерну мембрану.

Крім білків, в клітинах також синтезується велика кількість **пептидів**, які можуть утворюватися або шляхом вирізання із більш довгого поліпептидного ланцюга, або шляхом прямого безматричного синтезу. За першим механізмом синтезуються пептидні гормони (окситоцин, вазопресин,



нейропептиди) та ціла низка інших біологічно активних сполук (кініни, ангіотензини та інші). За другим механізмом пептиди синтезуються за допомогою спеціальних ферментів, оскільки в ДНК немає гена, який би прямо кодував послідовність амінокислот в такому пептиді. Ці ферменти утворюються на рибосомах і каталізують ланцюг реакцій, в ході яких певні амінокислоти приєднуються одна до одної в певній послідовності. У тварин і людини так синтезуються малі пептиди – глутатіон, карнозин і ансерин (специфічні дипептиди м'язевої тканини) тощо. У бактерій в цей спосіб синтезуються пептидні компоненти клітинних

стінок, антибіотики граміцидин, даптоміцин (ефективний проти метицилін-резистентного золотистого стафілококу) та інші сполуки. Не-рибосомальні пептиди є дуже ефективними антибіотиками, імуносупресорами, антивірусними та протипухлинними агентами.

12. Розпад білків

В клітинах постійно відбуваються процеси синтезу і розпаду білків. Процеси розпаду білків є надзвичайно важливими для клітин і організму в цілому, оскільки білкові молекули під впливом різноманітних факторів можуть «старіти». Крім того, вміст певних білків за певних умов повинен змінюватися, пристосовуватися до нових обставин.

Білки дуже відрізняються за середньою тривалістю існування. Найбільш короткоживучими є регуляторні білки. Структурні білки мають більшу тривалість життя.

Багато білків розпадаються в тих же клітинах, де і синтезуються. Це більшість внутрішньоклітинних білків. Проте деякі білки синтезуються в одних клітинах, а розпадаються в інших. До цієї групи відносяться позаклітинні білки та деякі внутрішньоклітинні білки (наприклад, гемоглобін).

У еукаріотів розпад короткоживучих білків є *убіквітин-залежним*. *Убіквітин* – невеликий консервативний білок (76 амінокислотних залишка). *Убіквітинилювання* – це посттрансляційне приєднання ферментами убіквітин-лігазами одного або декількох мономерів убіквітину за допомогою ковалентного зв'язку до бічних аміногруп білків-мішеней. Приєднання убіквітина впливає на внутрішньоклітинну локалізацію і функцію білків. Система убіквітинилювання залучена до таких процесів як проліферація, розвиток і диференціювання клітин, реакція на стрес і патогени, репарація ДНК.

Для приєднання убіквітину до білка-мішені необхідні три ферменти:

- убіквітин-активуючий фермент (E1) – формує по С-кінцю убіквітина тіоефірний зв'язок;
- убіквітин-кон'югуючий фермент (E2) – родина ферментів, які приймають убіквітин на себе; ці ферменти виступають донорами убіквітину для певних білків;
- убіквітин-лігаза (E3) – переносить убіквітин з E2 на білок; представлена різними формами, специфічними по відношенню до різних білків.

Зв'язування убіквітину відбувається через залишок лізину білка. До однієї молекули білка приєднується багато молекул убіквітину, оскільки в молекулі білка може бути декілька залишків лізину або молекули убіквітину приєднують одна до одної, формуючи ланцюжок.

Білки, які мають убіквітинову мітку, далі руйнуються в спеціальних частинках – *протеосомах* – мультибелкових циліндричних структурах, які містять протеази ат присутня в клітинах еукаріотів, архей та деяких бактерій. У еукаріотів протеосоми локалізуються в цитоплазмі та ядрі. Протеосоми виділяють у вигляді індивідуальних частинок з коефіцієнтами седиментації 20S і 26S. В клітинах людини нараховується біля 30000 протеосом. В протеосомі убіквітиновий ланцюг видаляється, дозволяючи білку розгорнутися (unfold) і завантажитися всередину протеосоми, де він неспецифічно деградує до пептидів довжиною 7-9 амінокислотних залишка.

26S протеосоми здатні впізнавати білки, марковані не убіквітином, а іншими спеціальними білками. Наприклад, фермент орнітиндекарбоксилаза руйнується за убіквітин-незалежним шляхом. Білок-антизим є маркером для впізнавання протеосомою при деградації орнітиндекарбоксилази. За убіквітин-незалежним шляхом деградують такі білки як c-jun, кальмодулін, p53, p21 тощо.

Вільна 20S протеосома деградує білки, що не мають третинної структури, короткоживучі регуляторні білки, довгоживучі білки, окисленні, розгорнуті, мутовані та пошкодженні білки, пептиди, які не пройшли процесинг в ендоплазматичній сітці.

Довгоживучі білки також можуть руйнуватися в лізосомах. Стан білка діагностується шаперонами, які і переносять білки, які повинні руйнуватися, в лізосоми.

13. Епігенетика

Епігенетика – галузь генетики, що вивчає механізми спадковості та мінливості, в основі яких не лежить зміна первинної послідовності ДНК і РНК.

Епігенетична регуляція – процес, що призводить до змін активності гена без змін в його кодуючій послідовності.

Механізми епігенетичного регулювання:

- метилювання ДНК (ядерної, рідше мітохондіальної);
- ремоделювання упаковки хроматину («гістоновий код» – модифікація гістонів, інших білків);
- РНК-інтерференція (за участі малих РНК, що направляють метилювання, модулюють транскрипцію, трансляцію; siRNAs, rasiRNAs, piRNAs, snoRNAs та ін.);
- конформаційна пріонізація білків;
- інактивація однієї із двох Х-хромосом у особин жіночої статі; імпринтинг.

Розглядають декілька рівнів епігенетичної регуляції:

- ДНК (геном) – метилювання; послідовності, що повторюються; мутації віддалених регуляторних елементів; транспозиції генетичного матеріалу;
- РНК (транскриптом) – регуляторні мотиви пре-мРНК; антизмістові РНК; РНК, що не транслюються; мікроРНК; двохланцюгові РНК;
- білки (протеом) – метилювання/деметилювання лізину 4 і 9 гістону H3; ацетилювання/деацетилювання гістонів тощо.

Епігенетичні зміни, як правило, зворотні, не зачіпають змін первинної структури ДНК, можуть бути довготривалі і короткотривалі. Це повністю відрізняється від генетичних змін, які, як правило, необоротні (мутації), призводять до зміни первинної структури ДНК та стабільно успадковуються.

В результаті таких епігенетичних модифікацій як модифікації молекули ДНК, гістонів та негістонових білків хроматину можуть відбуватися зміни статусу транскрипції.

Метилювання ДНК – основний спосіб передачі епігенетичної інформації у рослин і ссавців. Метилювання ДНК не порушує здатності до комплементарної взаємодії, але стабілізує подвійну спіраль ДНК і розпізнається багатьма білками. Цитозин метилюється значно частіше за аденін. Це може відбуватися спонтанно без участі ферментів. Найбільш ефективно спонтанно метилюється цитозин в мотиві CpG.

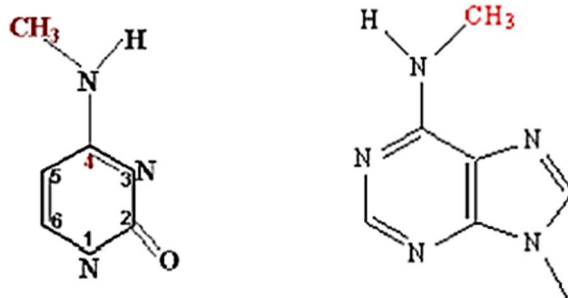
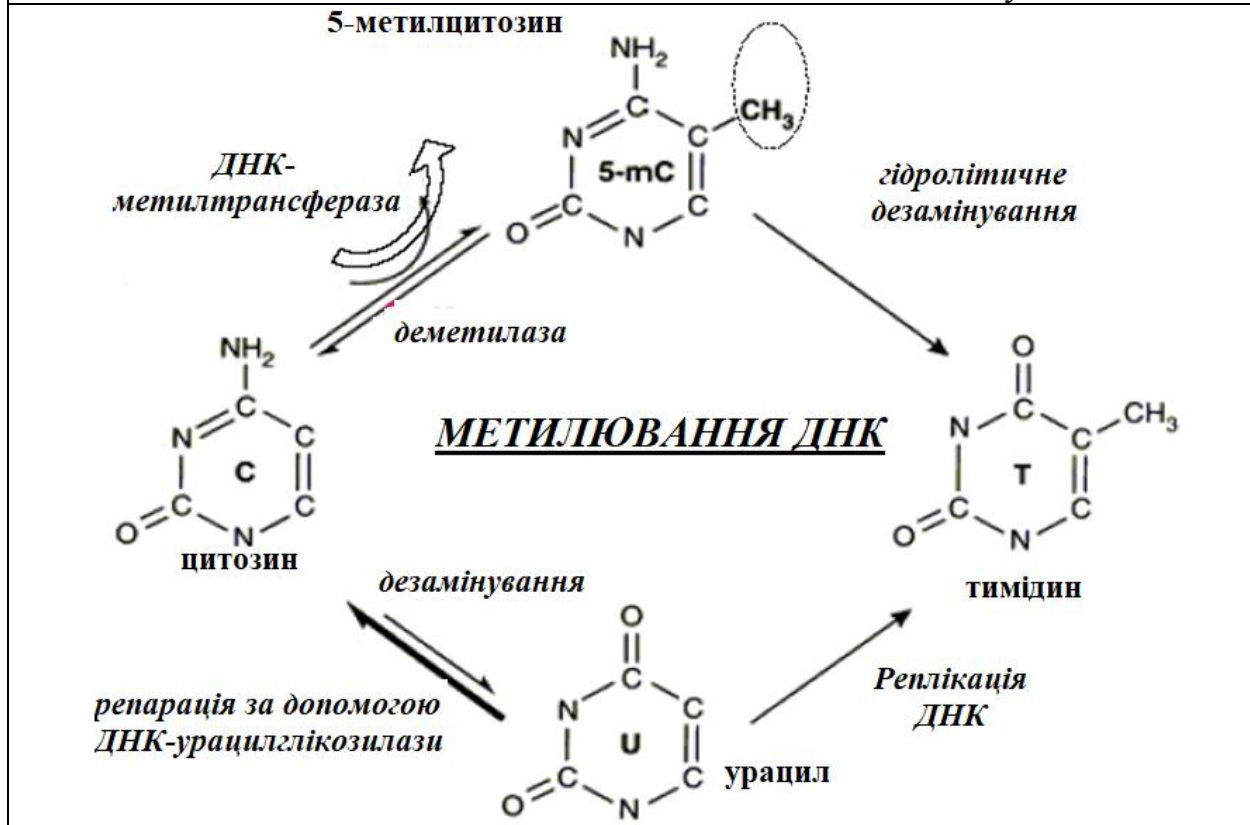


Схема метилювання та деметилювання цитозину



В результаті спонтанного дезамінування метильованого цитозину виникає тимін, що призводить до мутації, яка закріплюється при реплікації ДНК. Те ж саме відбувається в геномах *in vivo*, в результаті чого відбувається елімінація мотивів CpG (у рослин – CpNpG).

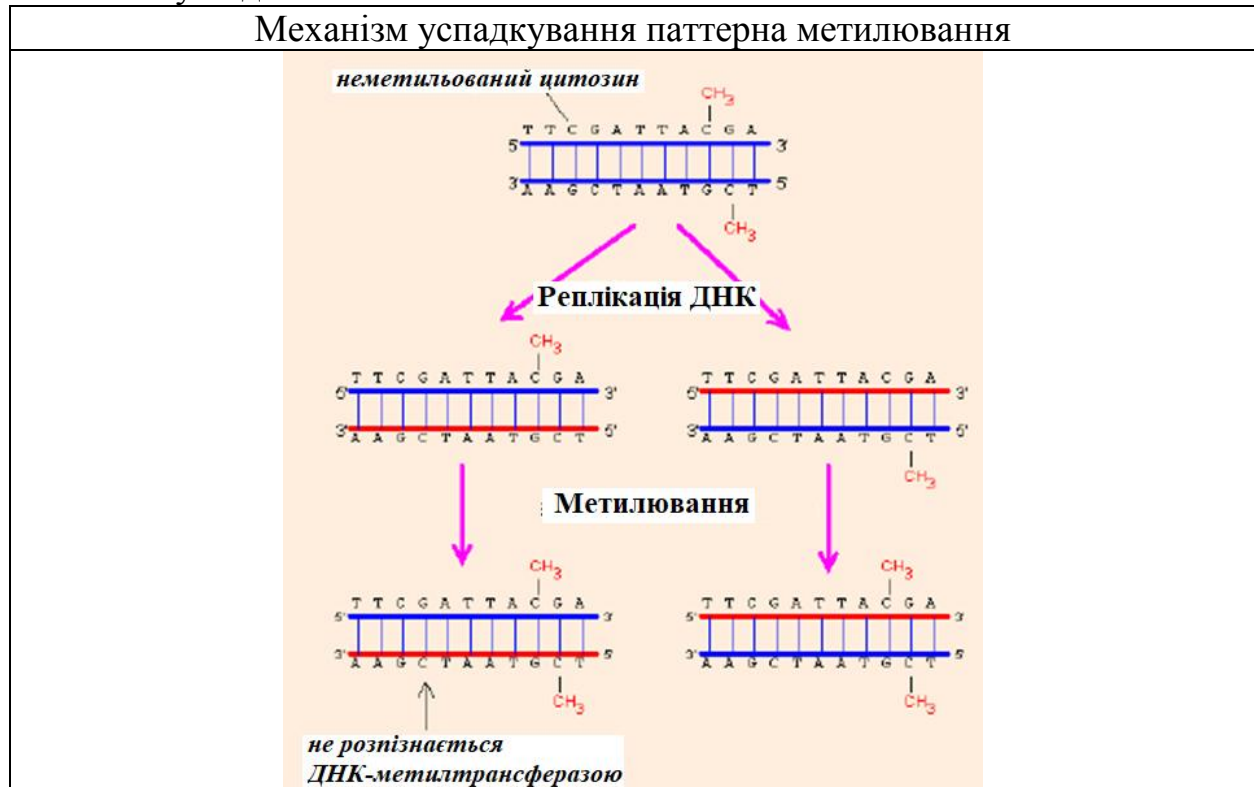
Довжина більшості острівців CpG – 0,5-3 т.п.н.; вони мають відносно високий GC-склад (більше 50-60%). Острівці CpG достатньо щільно розташовуються (один на 10 п.н., в 10-20 разів чаптіше ніж в середньому по геному). Як правило, острівці CpG містять мотиви CCGCCC (сайти зв'язування транскрипційного фактора SP1). В геномі людини міститься біля 45000 острівців. 60% генів мають в своєму локусі CpG як мінімум один острів. Вони присутні у всіх генів «домашнього господарства». CpG острівці розташовуються в основному в промоторах і 5'-районах генів. Також часто розповсюджені і внутрішньогенні острівці, які не зачіпають старт транскрипції. Існують і міжгенні CpG-острівці.

У хребетних метилювання острівців використовується для закріплення патерна експресії, який може бути обраний іншими способами. Встановлений статус метилювання, як правило, стабільний і в подальшому підтримується. CpG-острівці або гіперметилювані, або гіпометилювані. CpG в промоторах зазвичай неметилювані, що необхідне для транскрипції відповідного гена (метилювання, як правило, призводить до блокування транскрипції). Внутрішньогенні CpG-острівці частіше гіперметилювані.

Розрізняють прямий і опосередкований механізми репресії транскрипції, що обумовлена метилюванням. Прямий механізм обумовлений тим, що метильні групи порушують ДНК-білкові взаємодії, виступаючи у велику

борозну ДНК і перешкоджаючи зв'язуванню специфічних транскрипційних факторів. Проте деякі транскрипційні фактори, навпаки, мають бльшу спорідненість до метильованих сайтів. До чутливих до метилювання транскрипційних факторів належать AP-2, E2F, NF-κB, CREB, Мус/Мун. До нечутливих до метилювання транскрипційних факторів належать SP-1, СТF. Опосередкований механізм полягає в тому, що метильовані райони ДНК зв'язують MBD (methyl binding domain)-вмісні білки, які залучають транскрипційні репресори або білки, що модифікують гістони. Більшість MBD-вмісних білків є репресорами або корепресорами транскрипції та можуть формувати комплекси з деацетилазами гістонів (репресорами).

У ссавців функціонує щонайменше дві системи метилювання, за які відповідають різні *метилази*. Метилювання de novo вносить елементи мінливості в профіль метилювання. Підтримуюче метилювання забезпечує підтримку вже сформованого профілю та активується при кожному клітинному поділі.



Основні функції метилювання ДНК:

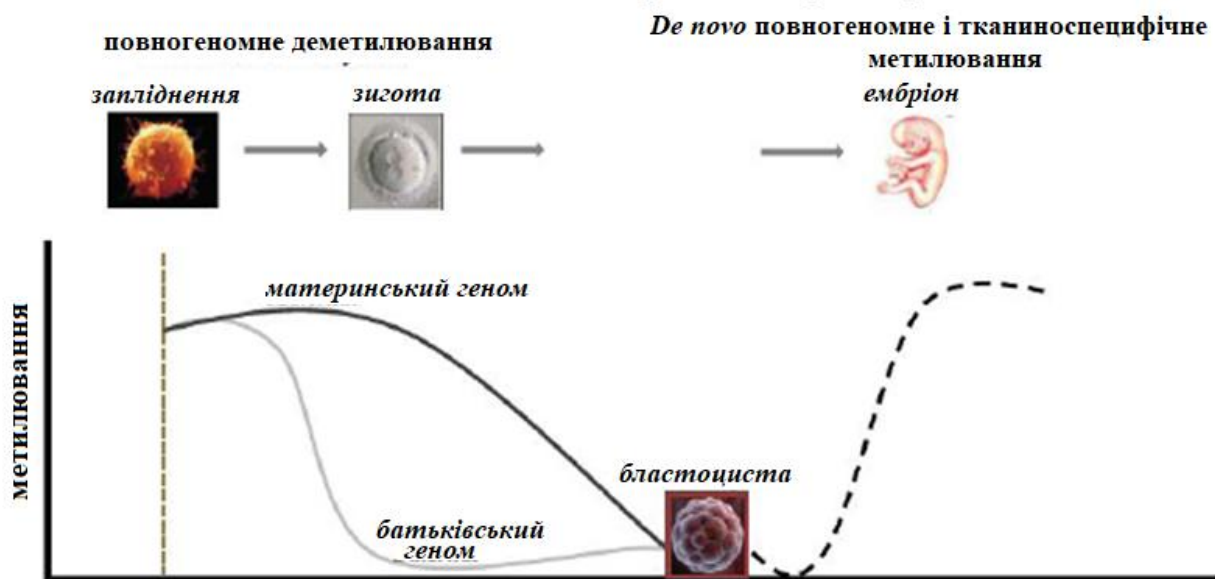
- підтримка структури хроматину і стабільності хромосом;
- сайленсинг чужерідних послідовностей, що повторюються та інтегровані;
- механізм захисту проти ефектів вбудовування чужерідної ДНК – високо метильованими є сателіти та інші послідовності, що повторюються, транспозони, провірусні копії, послідовності, які характерні для гетерохроматину;
- тканиноспецифічне довготривале пригнічення експресії генів на рівні транскрипції, що не успадковується;
- формування профілю експресії, який характерний для певного типу клітин – високо метильованими є транскрипційно неактивні гени (в гаметах – всі,

крім тих, що експресуються гаметоспецифічно), гени «пухлинної інвазії» та інші онкогени, гени імпринтингу; гіпометильованими є транскрипційно активні гени.

Більша частина (практично всі) метилювання зникають в ранньому ембріогенезі за рахунок деметилювання і/або гідроксилування метильних груп. Паттерн метилювання геному (розподіл метильованих основ) встановлюється заново в кожному поколінні, в основному не успадковується, але є і виключення. Після встановлення специфічні паттерни метилювання підтримуються в поколіннях клітин, забезпечуючи специфічність експресії генів. Таким чином, при зміні поколінь відбувається послідовне циклічне метилювання/деметилювання по багатьом позиціям в геномі.

Підчас ембріонального розвитку в первинних статевих клітинах відбувається повногеномне деметилювання, яке витирає попередні батьківські відмітки метилювання. Після запліднення батьківський геном активно деметилюється, в той час як материнський геном пасивно деметилюється. Потім по всьому геному відбувається нове метилювання в обох батьківських геномах до імплантації. Тим не менш, гени імпринтингу, проходячи через це репрограмування, зберігають своє метилювання, що дозволяє успадковувати специфічну для батьків моноалельну експресію генів в соматичних тканинах протягом дорослого життя.

Хвилі деметилювання в ранньому ембріогенезі

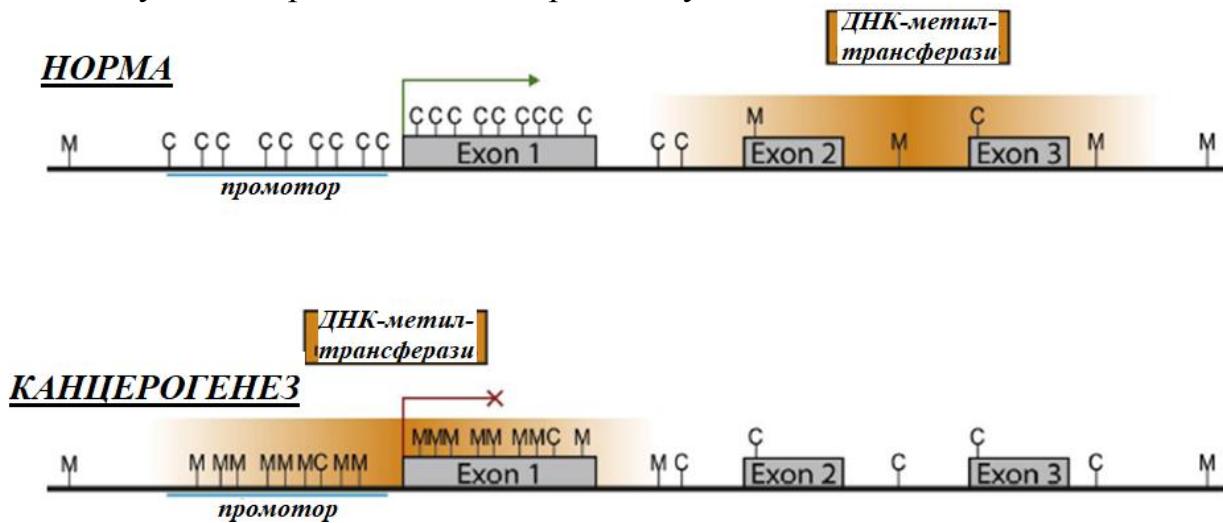


Деметилювання ДНК може мати глобальний (наприклад, у ссавців на ранніх етапах розвитку зародка, при старінні) і специфічний (геномний імпринтинг) характер.

Геномний імпринтинг – епігенетичний процес, при якому експресія певних генів здійснюється залежно від того, від матері чи від батька надійшли алелі.

Пухлинні процеси характеризуються інактивациєю шляхом гіперметилювання ключових генів-онкосупресорів і шляхом гіпометилювання

активацією цілого ряду онкогенів (*raf*, *c-fos*, *c-myc*, *c-Ha-ras*, *c-K-ras*), факторів росту (*IGF2*, *TGF*) і мобільних елементів, що повторюються та розташовуються в районах генетохроматину.



Показано, що чим довше характерна тривалість життя у вида тварини, тим повільніше знижується у цього вида рівень метилювання з віком. З віком спостерігається формування аберантних паттернів метилювання – гіпометилювання в старіючих клітинах і тканинах в цілому, але гіперметилювання CpG-острівців в старіючих клітинах і тканинах. Такі ж різнонаправлені зміни метилювання характерні для ракових клітин.

Ремоделювання хроматину.

В геномі присутні ділянки, вільні від нуклеосом (активні для транскрипції, сайти зв'язування транскрипційних факторів, регуляторних білків); ділянки, де положення нуклеосоми чітко фіксовано (+1 нуклеосома в генах (дріжджі – від +1 нуклеотиді, хребетні – від +60)); ділянки, в яких нуклеосомна укладка піддається регуляції білками АТФ-залежного ремоделювання хроматину. Ремоделювання хроматину полягає у посттрансляційних модифікаціях N-регуляторних кінців гістонів, наприклад, ацетилювання залишків лізину, метилювання залишків лізину і аргініну, фосфорилювання залишків серину і треоніну, убіквітинилування залишків лізину, АДФ-рибозилування, сумоїлювання тощо. Роль посттрансляційних модифікацій гістонів полягає в зміні електростатичної взаємодії між гістонами і ДНК. Зокрема, полі-АДФ-рибозилування призводить до того, що гістони або негістонові білки набувають значний негативний заряд і від'єднуються від ДНК; ацетилювання гістонів також вносить негативний заряд, послаблюючи взаємодію ДНК-нуклеосома. Принцип роботи «гістонового коду» полягає в тому, що певний амінокислотний залишок в гістоні модифікується за допомогою відповідного ферменту, і ця модифікація сприймається певним білком.

Під час реплікації нуклеосоми розбираються на димери і від'єднуються від ДНК, а потім збираються на ДНК знову. Для двох дочірніх ланцюгів необхідно в два рази більше нуклеосом. Частина нуклеосом під час реплікації збирається за напівконсервативним принципом (наприклад, якщо один димер

НЗН4 «старий», то другий – новосинтезований). Новосинтезовані гістони будуть модифікуватися за зразком «старих».

Епігеном – сукупність станів метилювання геному і модифікацій гістонів.

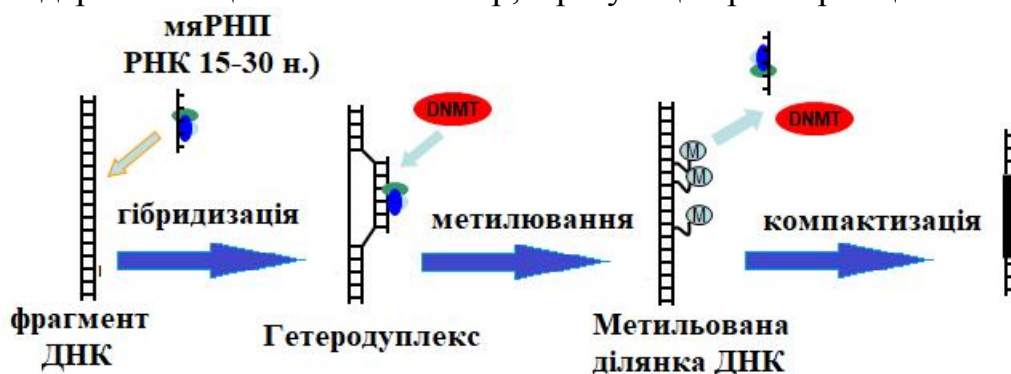
При дослідженні 80 пар однойцевих близнюків у віці 3-74 років було показано, що чим старше за віком пара близнюків, тим більша рівниця в їх профілях метилювання і ацетилювання гістонів, що призводило до суттєвої різниці в паттерні експресії генів.

При клонуванні трьохколькової кішки ніколи не утвориться кішка ідентичного забарвлення, так як малюнок визначається випадковою плямистістю і випадковою інактивациєю одного із алелей гена, який визначає забарвлення (чорний/коричневий), в Х-ромосомі.

В пухлинних клітинах паттерн епігенетичних модифікацій значно відрізняється від такого в нормальних клітинах.

Некодуючі РНК (ncRNA) – загальна назва різних видів РНК (незалежно від довжини молекули і просторової організації), які не містять інформацію про первинну структуру білка. До некодуючих РНК відносяться короткі (5S-рРНК, тРНК, siРНК, miРНК, gРНК та ін.) та довгі (інші рРНК, Xist, dsРНК, Air та ін.). Наприклад, в геномі миши закодовано біля 30000 довгих і біля 25000 малих некодуючих РНК.

мяРНК (snRNA) (малі ядерні РНК) ідентифіковані в ядрі, завжди зв'язані з білками, формуючи малі ядерні рибонуклеопротеїнові частинки (РНП, snurp). Містять велику кількість уридину, мають розмір від 90 до 300 нуклеотидів, транскрибуються РНК-полімеразою II або РНК-полімеразою III. Їх 5'-кінець має триметильований кеп (по N7 і два рази по N2 гуанозину). мяРНК беруть участь в процесінгу пре-мРНК, розщепленні поліцистронних мРНК, підтриманні цілісності теломер, в регуляції транскрипції.



мяРНП беруть участь в РНК-залежному метилюванні ДНК, що відіграє важливу роль у формуванні гетерохроматину, транскрипційному генному сайленсингу та пригніченні міграції мобільних генетичних елементів.

тмРНК (tmRNA) («транспортно-матрична» РНК) здатна переносити аланін до рибосоми і одночасно є матрицею для синтезу короткого пептиду. Ген цієї РНК – *SsrA*, ідентифіковано у всіх секвенованих бактеріальних геномах. Частина тмРНК подібна до тРНК, 5'-кінець представлений лінійною послідовністю та має шпильку.

мяоРНК (snoRNA) (малі ядерцеві РНК) разом з нуклеазами беруть участь в процесінгу рРНК. Вони локалізовані в регіоні ядерця. Гени мяоРНК

містяться в інтронах інших генів, іноді єдиною функцією останніх є утворення мяоРНК. До складу рРНК входять модифіковані компоненти нуклеотидів – псевдоуридин і 2'-О-метилрибоза. мяоРНК транскрибуються в основному РНК-полімеразою II, але кодуються часто в інтронах генів рибосомних білків, іноді в генах, що не транскрибуються (зі СТОП-кодонами). мяоРНК мають ділянки, що комплементарні рРНК. мяоРНК поділяються на два класи – Н/АСА (Gar1p, Cbf5p, Nhp2p, Nor10p, Rok1p) і С/Д (p68, p62, Nor1p, p56, p58, фібрилярин).

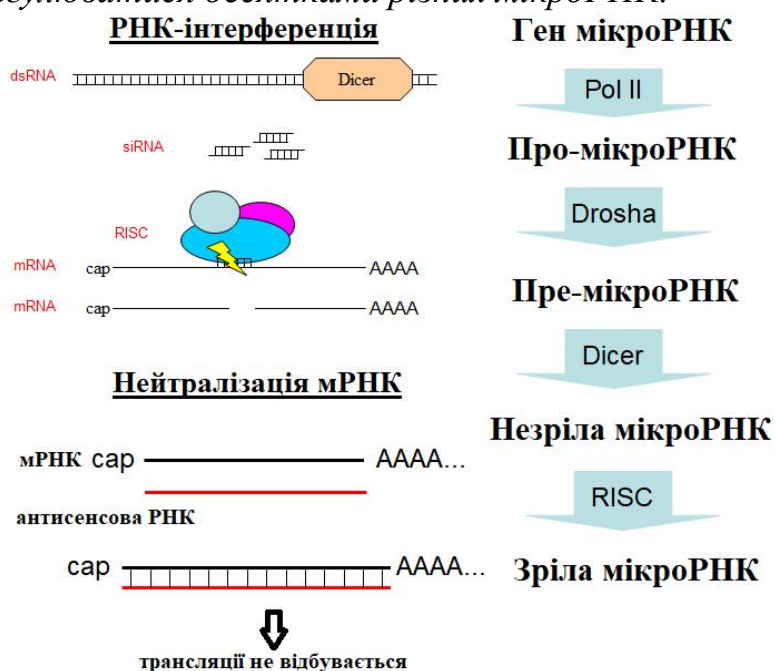
гРНК (gRNA) (гидові РНК) – малі РНК, що беруть участь в редагуванні пре-мРНК у трипаносом.

мцРНК (scRNA) (малі цитоплазматичні РНК) – різні за походженням і функцією малі РНК розміром від 20 до 200 нуклеотидів, які функціонують в цитоплазмі і беруть участь в РНК-інтерференції (siRNA, miRNA, piwiRNA).

piwiРНК – клас мцРНК, які експресуються в генераторних клітинах ссавців і утворюють РНК-білкові комплекси з білками piwi. Такі piwiРНК комплекси (piRC) задіяні в сайленсинг транскрипції генів в клітинах зародкового шляху при сперматогенезі. Вони відрізняються за структурою і механізмами синтезу від miРНК і siРНК. piwiРНК беруть участь в сайленсингу РНК шляхом утворення RISC (RNA-induced silencing complex, або siRNA). Три білки підродино Piwi – MIWI, MIWI2 і MILI – необхідні для сперматогенезу у мишей.

miРНК (siRNA) (малі інтерферуючі РНК) утворюються із довгої дволанцюгової РНК (dsRNA), яка може виникати в клітині в результаті роботи РНК-залежних РНК-полімераз, двонаправленої транскрипції генів (транскрипції з обох антипаралельних ланцюгів), транскрипції регіонів, що містять інвертовані повтори. Крім того, джерелом dsRNA можуть бути РНК-вмісні віруси та штучні генетичні конструкції. miРНК здійснюють деградацію мРНК (через запуск РНК-інтерференції) і/або модифікацію хроматину. За оцінками біля 1% генів є генами miРНК, які регулюють до 30% структурних генів.

1 мікроРНК здатна брати участь в регуляції багатьох генів; експресія 1 гену може регулюватися десятками різних мікроРНК.



ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ ЗНАТЬ

- 1. Подвійна спіраль ДНК стабілізується:**
 - А) водневими зв'язками ;
 - Б) іонними зв'язками
 - В) гідрофобними зв'язками
 - Г) ковалентними зв'язками
- 2. Згідно із правилами Чаргаффа кількість:**
 - А) $A=T$; Б) $C=G$; В) $T=C$; Г) $A+G=T+C$.
- 3. До складу нуклеосоми входить нуклеотидних пар:**
 - А) 20-60; Б) 140; В) 90; Г) 200.
- 4. Гістон H1 в хроматині бере участь у формуванні:**
 - А) нуклеосом; Б) супербідного рівня; В) петель; Г) дисків.
- 5. Теломери ДНК виконують такі функції:**
 - А) механічна; Б) стабілізаційна; В) регуляторна (сайленсінг сусідніх ділянок); Г) регуляторна (вибіркова експресія генів); Д) репараційна.
- 6. Репарація ДНК забезпечується послідовною дією трьох ферментів:**
 - А) праймарази, ДНК-полімерази, рестриктази;
 - Б) нуклеази, ДНК-полімерази, ДНК-лігази;
 - В) теломерази, рестриктази, лігази;
 - Г) рестриктази, екзонуклеази, лігази.
- 7. Під впливом нітритів у ДНК відбувається:**
 - А) дезамінування цитозину з перетворенням в урацил;
 - Б) інтеркаляція з утворенням поперечних зшивок у подвійній спіралі;
 - В) розрив N-глікозидного зв'язку аденіну або гуаніну з дезоксирибозою;
 - Г) утворення тимінових димерів.
- 8. У ролі провідників (векторів) для рекомбінантних ДНК застосовують:**
 - А) праймери;
 - Б) віруси, плазміди, косміди;
 - В) рестриктази, лігази;
 - Г) бактерії, мітохондрії.
- 9. Виберіть правильні твердження:**
 - А) первинна структура ДНК – це порядок розташування азотистих основ в ланцюгу ДНК;
 - Б) два ланцюги ДНК антипаралельні;
 - В) геном людини був розшифрований за допомогою методів хроматографії електрофорезу;
 - Г) вторинна структура ДНК була доведена методом мічених атомів;
 - Д) правила Чаргаффа були встановлені за допомогою рентгеноструктурного аналізу;
 - Е) АТФ – це мононуклеотид.
- 10. Яка кількість молекул гістонів входить до складу нуклеосомного кору (ядра):**
 - А) 10; Б) 8; В) 5; Г) 7.

11. Невеликі кільцеві молекули ДНК, які розташовані окремо від нуклеоїду бактеріальної клітини і містять у своєму складі декілька важливих для функції всієї клітини генів, та можуть реплікуватися, це:

А) віруси; Б) плазміди; В) теломери; Г) фрагмент Оказакі.

12. Виберіть правильне твердження:

А) оцінка частоти мутацій, що ґрунтується на порівнянні амінокислотного складу гомологічних білків різних видів, завжди занижена, оскільки деякі мутації можуть суттєво змінювати функцію білка і виключатись з популяції під впливом тиску добору;

Б) з чотирьох азотистих основ ДНК лише продукт спонтанного дезамінування цитозину впізнається як неприродний для ДНК;

В) механізм гомологічної рекомбінації ДНК був використаний для заміни дефектного гену при хворобі Леша-Ніхана;

Г) для копіювання ДНК ретровірусу в зараженій клітині не використовується ферментний апарат клітини-господаря.

13. Виберіть правильне твердження:

А) Цистрони одного протеїну можуть розташовуватись в різних хромосомах;

Б) Всі гени містять нітрони.

В) Всі гени еукаріот містять інтрони.

Г) Відносно нечисленні регуляторні елементи здатні забезпечити диференціювання різноманітних типів клітин за рахунок комбінаційної генетичної регуляції.

Д) Геном - це сукупність генів, які кодують всі білки, властиві даному організму.

Е) Гени рРНК утворюють кластери або транскриптони, а гени гемоглобіну – унікальні.

Є) Як правило, зміни в експресії, які лежать в основі розвитку багатоклітинних організмів, не супроводжуються змінами генетичного тексту.

Ж) Експресія регулюється на різних стадіях переносу інформації від ДНК до РНК і білку, але найбільш поширений контроль на рівні дозрівання мРНК

З) Білок-регулятор з'єднується з регуляторною послідовністю ДНК і стимулює транскрипцію сусіднього гену.

14. Процес посттранскрипційної модифікації первинних транскриптів РНК називається:

А) Сплайсингом;

Б) Процесінгом (дозріванням);

В) Кепуванням;

Г) Видаленням нітронів.

15. Комплекс мяРНК та протеїнів, що забезпечує вирізання інтронів та з'єднання екзонів у первинному транскрипті РНК-це:

А) Сплайсома;

Б) Реплісома;

- В) Лігаза;
- Г) Рибозим.

16.Ензими транскрипції еукаріотів-це:

- А) Праймаза, рестриктаза, лігаза;
- Б) Метилаза, теломераза, ДНК-полімераза;
- В) Праймаза, ДНК-полімераза;
- Г) РНК-полімераза I. РНК-полімераза II, РНК-полімераза III.

17.Дозрівання мРНК поєднує:

- А) «Кепування», вирізання інтронів, з'єднання екзонів, приєднання поліА ділянки на 3'-кінці;
- Б) Метилювання залишків цитозину, вирізання ушкоджених фрагментів рестриктазами, приєднання гістонів,
- В) утворення специфічної вторинної структури «листок конюшини» з формуванням антикодонової, дигідроурацилової і псевдоуридилової петель;
- Г) Організацію нуклеопротейнових комплексів з каталітичними властивостями.

18.Послідовність ДНК, яка кодує поліпептид:

- А) Ген:
- Б) Оперон:
- В) Цистрон:
- Г) Геном

19.Організація генетичного матеріалу у еукаріотів включає:

- А) Незалежні гени, повторювальні гени, кластери генів, сателітна ДНК, спейсери;
- Б) Незалежні гени, транскриптони, оперони, спейсери, плазміди;
- В) стаціонарні гени та мобільні елементи транспозони.
- Г) незалежні гени та гени, що перекриваються.

20.Гени, властиві тільки багатоклітинним організмам-це гени:

- А) гістонів;
- Б) трансмембранних протеїнів адгезії та сигналювання;
- В) Ензимів гліколізу;
- Г) структурних та скорочувальних протеїнів

21.Ділянки ДНК багатьох клітинних організмів, які не підлягають транскрипції – це:

- А) Інтрони, гени тРНК та рРНК:
- Б) Цистрони.
- В) Спейсери, регуляторні ділянки, теломери;
- Г) теломери.

22.Мітохондріальна ДНК-це кільцева молекула, яка:

- А) Кодує тільки тРНК та рРНК, необхідні для синтезу протеїнів у мітохондріях
- Б) Кодує 13 повноцінних протеїнів, що синтезуються на рибосомах мітохондрій

- В) Містить 37 генів та частково забезпечує мітохондрію інформацією, необхідною для синтезу специфічних протеїнів
- Г) повністю забезпечує мітохондрію інформацією, необхідною для синтезу специфічних протеїнів.

23.Геном - це:

- А) Сукупність ДНК, яка кодує протеїни у даному організмі;
- Б) Сукупність ДНК, яка кодує протеїни, тРНК та рРНК у даному організмі;
- В) Повна генетична інформація, що міститься у клітині;
- Г) сукупність ядерної ДНК

24.Геном людини містить:

- А) Близько 100 тис. генів (цистронів), що кодують пептиди, а також регуляторні ділянки та спейсери;
- Б) 3,5 млрд нуклеотидних пар (гаплоїдний набір), що утворюють нітрони та екзони;
- В) Близько 30 тис. генів, що кодують протеїни;
- Г) Близько 30 тис цистронів, що кодують пептиди, тРНК та рРНК, а також регуляторні ділянки та спейсери.

25.Частка геному людини, що припадає на цистрони, які кодують пептиди, тРНК та рРНК, складає:

- А) Близько 3% геному;
- Б) Близько 25% геному;
- В) Близько 90% геному;
- Г) Близько 70% геному.

26.За послідовністю нуклеотидів в мРНК еукаріот не можна встановити структуру гену тому що:

- А) Генетичний код вироджений.
- Б) мРНК містить мінорні основи;
- В) зріла мРНК не містить інтронів;
- Г) зріла мРНК містить «кеп» та поліА-ділянку.

27.З наведеного переліку виберіть чинники, які впливають на активність регуляторного протеїну:

- А) Активність його синтезу;
- Б) Зв'язування з низькомолекулярними речовинами;
- В) зв'язування РНК-полімерази;
- Г) Фосфорилування/дефосфорилування;
- Д) Кооперативна взаємодія субодиниць;
- Е) Тканинна специфічність генного тексту.

28.Виберіть правильне твердження:

- А) σ -фактор зв'язується з РНК-полімеразою, але не з ДНК;
- Б) σ -фактор у складі РНК-полімерази з'єднується з ДНК;
- В) Протеїн-активатор ініціації зв'язуються з РНК-полімеразою, якщо вони попередньо приєднались до специфічної ділянки оператора на ДНК.
- Г) Протеїн активатор ініціації зв'язується з специфічною послідовністю ДНК, але не з РНК-полімеразою.

29.Виберіть правильні твердження: а) матричні синтети здійснюються за напівконсервативним механізмом, б) при реплікації в точці ініціації виникають дві протилежно спрямовані реплікативні вилки, в) компліментарність при реплікації забезпечується завдяки специфічності ДНК-полімерази, г) σ -фактор РНК-полімерази забезпечує точність транскрипції, д) реальність процесу оберненої транскрипції була доведена завдяки виділенню ферменту РНК-залежної ДНК-полімерази, е) необхідність «затравки» для РНК-полімерази пояснюється тим, що цей фермент може тільки «нарощувати» олігонуклеотид але не може розпочинати його синтез із об'єднання двох нуклеотидів. є) завдяки неперервності генетичного коду на одному відрізку матриці може бути зашифровано декілька білків.

30.Виберіть правильні відповіді і обґрунтуйте їх:

А. У процесі трансляції:

- а) пептидний зв'язок утворюється у пептидильному центрі рибосоми;
- б) сформована рибосома приєднує мРНК;
- в) пептидний зв'язок утворюється в аміноацильному центрі рибосоми;
- г) синтезується поліпептид послідовність якого відповідає повній послідовності мРНК.

Б. Дозрівання протеїнів полягає в:

- а) утворенні гідрофільної глобули за участю шаперонів;
- б) утворенні дисульфідних зв'язків для фіксації самовільно сформованої просторової структури;
- в) приєднанні непротеїнового компоненту, ензимній модифікації груп та просторовій укладці молекули;
- г) убіквітин-залежному гідролізі в протеасомах.

В. Великі молекули протеїнів набувають просторової форми завдяки:

- а) зв'язуванню з убіквітином;
- б) самодовільному процесу згортання ланцюга, що стабілізується дисульфідними зв'язками;
- в) зв'язуванню з шаперонами з витратою АТФ.
- г) синтезу на мембрані ендоплазматичної сітки

31.Виберіть правильні твердження: а) завдяки неперервності генетичного коду на одному відрізку матриці може бути зашифровано декілька білків, б) залишок амінокислоти з'єднується специфічно з антикодоном тРНК. в) утворення доменів поліпептидного ланцюга починається вже під час трансляції всередині рибосоми. г) індукторами лактозного оперону є лактоза і глюкоза.

32.Назвіть послідовність РНК і пептиду, що відповідають фрагменту ДНК 3'-ААГЦТААГЦТТАГАЦ-5'. Які зміни в послідовності протеїну можуть відбутися в результаті:

- а) зміщення рамки зчитування на 1 нуклеотид вправо, б) дії нітриту на цитозин, в) дії ультрафіолетового випромінювання на тиміновий димер.

33. Зі скількох амінокислот буде складатися поліпептид, що утвориться при трансляції послідовності мРНК (вказані 5'-, та 3'-ділянки, що не транскрибуються):

ЦУУУСАУГУГЦГАЦГАУУУЦГГАЦАЦАУААААУУАЦУГУГАГУГ?

А) 8;

Б) 9;

В) 10;

Г) 13.

34. Знайдіть відповідність показників групи А показникам групи В:

№ п/п	<i>Група А</i>	№ п/п	<i>Група В</i>
1	Гетерохроматин	А	Неконденсований хроматин, що відповідає деспіралізованим сегментам хромосом
2	Еухроматин	Б	Конденсований хроматин недоступний для транскрипції
3	Хромосома	В	Довга суперспіралізована нитка ДНК, зв'язана з деякою кількістю РНК, гістонів, інших білків
4	Хроматин	Г	Ауторепродуктивна структура ядра, у якій концентрується ДНК і з якою зв'язана функція ядра

35. Охарактеризуйте функцію:

<i>Ензим</i>	<i>Функція</i>	<i>Еу-/Прокаріоти</i>
ДНК-лігаза		
Екзонуклеаза		
ДНК-полімераза III		
Праймаза		
Гіраза		
Теломерази		
ДНК-полімераза I		
α-ДНК –полімераза		
Топоізомераза		
δ-ДНК-полімераза		
ε-ДНК-полімераза		
Рестриктаза		
ДНК-метилаза		
γ-ДНК-полімераза		
Ендонуклеаза		

36. Знайдіть відповідність між поняттями та їх характеристиками:

Поняття	Характеристика
1. Фактори транскрипції 2. Оперон 3. Цистрон 4. Регуляторні елементи	А) Регуляторні протеїни, що мають домени зв'язування з молекулою ДНК Б) Ділянка ДНК, яка кодує один поліпептид В) Функціонально пов'язані гени у прокаріот із спільною системою регуляції Г) Послідовні ДНК, до яких прикріплюються фактори транскрипції

37. Знайдіть відповідність між поняттями та їх характеристиками:

Поняття	Характеристика
1. Регуляторні протеїни геному у прокаріот 2. Регуляторні протеїни геному у еукаріот 3. Регуляторні ділянки геному у прокаріот 4. Регуляторні ділянки геному у еукаріот	А) Оператор, атенюатор Б) Репресори, CAP В) Цис-елементи, сигнали термінації, енхансери, сайленсери Г) TFIID, мотиви «цинкові пальці» або «лейцинові застібки»

38. Охарактеризуйте поняття та відповідність типу організму:

Поняття	Характеристика	Еу-/Прокаріоти
Ген		
Цистрон		
Спейсер		
Інтрон		
Оперон		
Кластер		
Цинкові пальці		
Лейцинова «застібка»		
Спіраль-оберт-спіраль		
Індуцибельний оперон		
Репресибельний оперон		
Сайленсер		
Енхансер		
Аттенюатор		
Механізм «переключення класів»		
Комплекс RISC		

39. Поєднайте тип РНК і його ознаки:

Тип РНК	Ознака
1. тРНК 2. мРНК 3. мяРНК 4. рРНК	А) Рибозими утворюють із протеїнами сплайсоми Б) Г-Ц-типу, їх транскрипцію блокує актиноміцин D, у зрілому вигляді представлені чотирма видами В) Мають у зрілому вигляді антикодонову петлю Г) Мають найбільш мінливі молекулярну масу та вміст у клітині, ланцюг починається із 7-метилгуанілату («кеп»)

40. Заповніть таблицю «Матричні синтези»:

Ознака	Реплікація	Транскрипція	Трансляція
Біологічна роль			
Напрямок синтезу полімеру			
Механізм (консервативний, напівконсервативний, дисперсивний)			
Необхідність затравки			
Активовані мономери			
Ферменти, їх надмолекулярна організація			
Визначеність ділянки синтезу (від і до)			
Енергетичні витрати в розрахунку на 1 мономерну ланку			
Сутність етапів: а) ініціація, б) елонгація. в) термінація . г) дозрівання			

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ ЗНАТЬ

1. Сформулюйте основний постулат молекулярної біології.
2. Вкажіть для процесу реплікації:
 - А) матрицю - _____;
 - Б) субстрати - _____;
 - В) джерела енергії - _____;
 - Г) фермент, що забезпечує з'єднання дезоксирибонуклеотидів в біополімер - _____;
 - Д) локалізацію в клітині - _____;
 - Е) фазу клітинного циклу, в якій відбувається це процес - _____.
3. Серед реакцій спонтанного дезамінування основ у ДНК дезамінування метилцитозину особливо небезпечне. Чому?
4. Заповніть пропуски:

Укладка ДНК у _____ структуру досягається шляхом суперспіралізації за участі позитивно заряджених протеїнів _____.
5. Заповніть пропуски:

Відстань між парами азотистих основ у подвійній спіралі складає _____; на один оберт спіралі, висота якого _____, припадає _____ нуклеотидних пар.
6. Закресліть непотрібне:

Теломераза видовжує Г/Ц довший/коротший 5'/3'-кінець ланцюга, використовуючи як матрицю/праймер фрагмент ДНК/РНК із специфічною/одноманітною послідовністю.
7. Про що можуть свідчити наступні факти:
 - А) у культурі фібробластів упродовж ділення клітин рівень 5-метилцитозину в ДНК і активність ДНК-метилази знижуються і одночасно вкорочуються теломери;
 - Б) найшвидше знижується рівень 5-метилцитозину в ДНК клітин миші, які діляться всього 20 разів;
 - В) в мозку і серці людини зниження рівню 5-метилцитозину в ДНК виражене найсильніше, як і старіння;
 - Г) у горбуші після нересту відбувається інтенсивне деметилювання ДНК та загибель клітин.
8. Які властивості надає ДНК наявність метильованих основ (5-метилцитозину) порівняно з РНК, де вони відсутні?
9. Заповніть пропуски:
 - А) _____ розрізають дволанцюгову спіраль ДНК у специфічних послідовностях, які складаються із 4-8 нуклеотидів (паліндроми), розділяючи її на фрагменти строго визначених розмірів - _____;
 - Б) з метою ампліфікації і одержання в чистому вигляді певних генів фрагменти еукаріотичної ДНК можуть бути вбудовані в бактеріофаги або плазміди, які називають _____;

В) колонія клітин, яка походить від однієї клітини, називається _____;

Г) окрема колонія бактерій, які містять плазмиду з включеним в неї фрагментом ДНК людини, називається _____, набір таких бактерій, що представляє весь геном людини, - _____;

Д) ДНК _____ краще захищена від мутацій ніж ДНК _____ завдяки присутності в хроматині _____;

Е) сайти, чутливі до нуклеази, знаходяться у _____ ділянці ДНК;

Є) відстань між парами азотистих основ у подвійній спіралі складає _____, на один оберт спіралі, висота якого _____, припадає _____ нуклеотидних пар.

10. У регуляторній ділянці гістидинового оперону кишкової палички знаходиться 7 залишків гістидину. Поясніть у чому полягає функція такої ділянки?

11. Заповніть пропуски:

А) Протеїн _____ містить структуру, утворену близько 30 а. к. залишків, для зв'язування в якій _____ використовуються 2 залишки гістидину і 2 - цистеїну.

Б) Гени рРНК і гістонів прокариотів і еукаріотів мають спільну ознаку будови - _____.

В) Згідно загальної кількості нуклеотидів і довжини гену у людини могло би бути близько 30 000 генів, але їх близько _____, тому що _____.

Г) У процесі диференціювання хромосоми в родині генів імуноглобулінів відбувається _____ VL, J, CL.

Д) Ген _____ - ланцюга гемоглобіну міститься в іншій хромосомі, ніж кластер генів _____ ланцюгів.

Е) При надлишку триптофану експресія триптофанового оперону у *E. coli* закінчується на _____, який розташований після _____, який розташований після _____, так як рибосома, що синтезує лідерний пептид не відстає від _____.

Є) При надлишку глюкози не транскрибується лактозний оперон, тому що в ділянці _____ неможливе приєднання _____.

Ж) Інтерференція РНК пов'язана із руйнуванням _____ під впливом дволанцюгової малої РНК, яка комплементарна до ділянки відповідного _____.

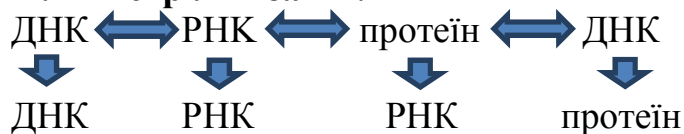
З) У _____ організмів порівняно з _____ в геномі закодовані у великій кількості трансмембранні молекули для клітинної адгезії та сигналювання та ген-регуляторні протеїни.

І) β -таласемія-генетичне порушення _____ пре-мРНК β -ланцюгів гемоглобіну внаслідок мутації в інтроні (Г \rightarrow Ц).

12. Яким чином забезпечується специфічність зв'язування амінокислотного залишку відповідною тРНК?

13. У гліцинспецифічній тРНК *E. coli* міститься антикодон ГЦЦ. Він може спарюватись на рибосомах або з кодоном ГГУ, або ГГЦ. Як пояснюється здатність однієї тРНК розпізнавати декілька різних кодонів?

14. Укажіть, яким стрілкам в схемі відповідають реальні процеси і назвіть їх. Які стрілки зайві?



15. Чи можна, виходячи з амінокислотної послідовності поліпептиду, передбачити нуклеотидну послідовність його мРНК?

16. Запишіть всі можливі нуклеотидні послідовності мРНК, які здатні кодувати трипептид лей-мет-тир.

17. Яка біологічна доцільність того, що протеїни синтезуються на РНК, а не на ДНК?

18. На 5'-кінці багатьох мРНК є довга послідовність, яка не транслюється. Як виявити місце початку інформаційної ділянки мРНК?

19. Заповніть пропуск: Інтерференція РНК пов'язана із руйнуванням _____ під впливом дволанцюгової малої РНК, яка комплементарна до ділянки відповідного.

20. Запишіть формули нуклеотидів ГТФ, УДФ, дАМФ, дТДФ, дЦТФ.

а) в складі нуклеотидів обведіть олівцем пуринові азотисті основи;

б) підкресліть нуклеотиди, що містять рибозу, однією рисою, а нуклеотиди, що містять дезоксирибозу, - двома рисками.

21. Напишіть формулу тринуклеотида А-Ц-Г.

а) вкажіть фосфодієфірні зв'язки;

б) відмітьте 5'- і 3'-кінці.

22. Наведено фрагмент одного ланцюга ДНК:

Г-Ц-Т-А-А-Т-Ц-Г-Ц-Т-А-Г.

а) Запишіть нуклеотидну послідовність другого комплементарного ланцюга;

б) вкажіть 5'- і 3'-кінці в ланцюгах ДНК.

23. Фрагмент іРНК має наступну нуклеотидну послідовність:

5'А-Ц-У-А-Ц-Ц-А-Ц-А-А-Ц-Г-У-Г-А3'

а) визначте, скільки амінокислот закодовано в даному фрагменті;

б) користуючись таблицею генетичного коду, визначте закодовану амінокислотну послідовність;

в) за фрагментом іРНК встановіть первинну структуру обох ланцюгів ДНК, відмітьте ланцюг, що транскрибується, вкажіть 5'- і 3'-кінці в ланцюгах ДНК.

24. Поліпептид складається з 10 амінокислот, розміщених у такій послідовності: глн – про – ала – сер – мет – три – асп – глі – асн – гіс. Визначте структуру іРНК, яка кодує даний поліпептид.

25. Перший ланцюг гена має таку структуру: ТАТ – ТЦТ – ТТТ – ТГТ – ГГА – ЦГЦ. Вкажіть структуру відповідного фрагмента молекули білка, синтезованого за участю другого ланцюга ДНК.

26. Які атоми пуринового циклу в пуриновому нуклеотиді ДНК можуть утворювати водневі зв'язки, але не беруть участі в утворенні уотсон-криківських пар?
27. Відомий один ланцюг подвійної спіралі ДНК, яка має послідовність (5')GCGCAATATTTCTCAAAAATATTGCGC(3'). Напишіть послідовність нуклеотидів в комплементарному ланцюзі. Що є особливе в послідовності цього сегмента ДНК? Чи може ця двохланцюгова ДНК утворювати різні структури?
28. Вирахуйте масу подвійної спіралі ДНК в грамах, якщо її довжина дорівнює відстані від Землі до Місяця (біля 320000 км). Маса ДНК довжиною 1000 пар нуклеотидів - біля $1 \cdot 10^{-18}$ г; відстань між двома сусідніми парами основ дорівнює 0,34 нм. Для інформації, в тілі людини міститься біля 0,5 г ДНК.
29. Поясніть, чому збільшується поглинання УФ-світла подвійною спіраллю ДНК (гіперхромний ефект) при її денатурації.
30. Ділянка гена має таку структуру: ЦГГЦГЦТЦААААТЦГГ. Запишіть склад відповідної ділянки того гена, інформація про який міститься в даному гені. Як відобразиться на будові білка видалення із гена четвертого нуклеотиду?
31. Одноланцюговий фрагмент молекули ДНК має наступну послідовність нуклеотидів: ЦГТ ГАТ ТТТ ГГТ ТГТ АГГ.
Яка буде структура молекул ДНК після реплікації?
32. Ділянка ДНК має наступний склад нуклеотидів:
...АГТ АЦГ ГЦА ТГЦ АТТ АЦА ТГЦ ЦГГ АЦГ ТААТ...
Запишіть нуклеотидний склад дочірніх ДНК, які утворились в результаті реплікації вихідного фрагменту молекули. Вкажіть, яка із полінуклеотидних ланцюгів є старою, яка – новою.
33. Зі скількох амінокислот буде складатися поліпептид, що утвориться при трансляції послідовності мРНК (вказані 5'- та 3'-ділянки, що не транслюються):
CUUUCAUGUGCGACGAAUUCGGACACAUAAAAUUACUGCUGUAA
UGC
Користуючись таблицею генетичного коду вкажіть послідовність амінокислот в поліпептиді.
34. Зі скількох амінокислот буде складатися поліпептид, що утвориться при трансляції послідовності мРНК (вказані 5'- та 3'-ділянки, що не транслюються):
CUGCCUCAUGCCAGACGCCUCUACACAUUGAAAUUACUGCUGU
Користуючись таблицею генетичного коду вкажіть послідовність амінокислот в поліпептиді.
35. Зі скількох амінокислот буде складатися N-кінцевий фрагмент поліпептиду, що утвориться при трансляції послідовності мРНК (вказана також 5'-ділянка, що не транслюються):
ACACAUGUUCGGACACAUAAAAUUACUG

Користуючись таблицею генетичного коду вкажіть послідовність амінокислот в поліпептиді.

36. Зі скількох амінокислот буде складатися фрагмент поліпептиду, що утвориться при трансляції послідовності мРНК:

GCAUUCGAACGAAUUCGGACACAUA AAAAUUACUG

Користуючись таблицею генетичного коду вкажіть послідовність амінокислот в поліпептиді.

37. На одному з ланцюгів синтезована іРНК, у якій А – 14%, Г – 20%, У – 40%, Ц – 26%. Визначте вміст нуклеотидів у молекулі ДНК (у %).

38. Фрагмент молекули ДНК містить 560 тимідилових нуклеотидів, що становить 28% від загальної кількості. Визначте, скільки в даному фрагменті аденілових, гуанілових та цитидилових нуклеотидів.

39. Фрагмент молекули ДНК містить 250 гуанілових нуклеотидів, що становить 15% від загальної кількості. Визначте, скільки в даному фрагменті аденілових нуклеотидів.

40. Фрагмент молекули ДНК містить 300 гуанілових нуклеотидів, що становить 20% від загальної кількості. Яка сумарна кількість аденілових та тимідилових нуклеотидів?

41. Фрагмент молекули ДНК містить 20% аденілових нуклеотидів від загальної кількості. Який відсоток цитидилових нуклеотидів у даному фрагменті?

42. Фрагмент молекули ДНК містить 250 тимідилових нуклеотидів, що становить 19% від загальної кількості. Визначте довжину даного фрагменту.

43. В одному ланцюгу ДНК міститься 35 аденілових, 120 цитидилових, 137 гуанілових та 60 тимідилових нуклеотидів. Визначте довжину даного фрагменту ДНК.

44. Довжина ділянки ДНК складає 1020 нм. Визначте кількість нуклеотидів в даній ділянці.

45. Фрагмент молекули ДНК містить 150 аденілових та 75 гуанілових нуклеотидів. Встановити кількість водневих зв'язків, що утворюються між комплементарними ланцюгами ДНК.

46. Частка ГЦ-пар в молекулі ДНК складає 0,4. Розрахуйте частку динуклеотидів ЦрГ.

47. Розрахуйте, скільки типів динуклеотидних контактів існує у полінуклеотидному ланцюзі.

48. Частка АТ-пар в молекулі ДНК складає 0,4. Розрахуйте частку динуклеотидів ТрА.

49. Частка ГЦ-пар в молекулі ДНК складає 0,4. Розрахуйте частку динуклеотидів АрТ.

50. Фрагмент ДНК в В-формі має 91535 пар основ. Скільки повних обертів подвійної спіралі має ця подвійна спіраль?

51. Фрагмент ДНК в В-формі має 7520 витків. Скільки нуклеотидів входить до складу фрагменту?

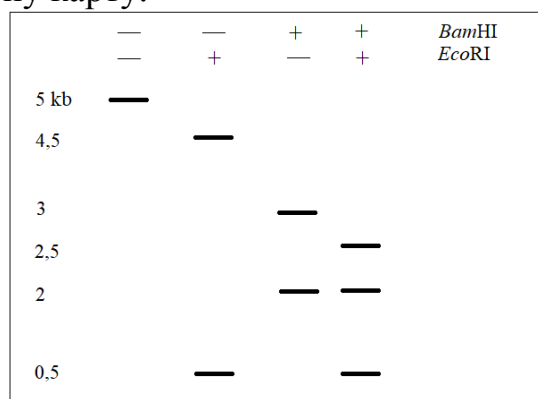
52. Фрагмент ДНК має 320 пар нуклеотидів. Скільки фосфатних залишків має цей фрагмент?
53. Скільки фосфатних залишків має фрагмент ДНК довжиною 680 нм?
54. Скільки і яких видів вільних нуклеотидів необхідно для реплікації молекули ДНК, в якій кількість аденіна дорівнює 600 000, а гуаніна — 2400000?
55. Загальна маса всіх молекул ДНК в 46 хромосомах однієї соматичної клітини людини дорівнює $6 \cdot 10^{-9}$ мг. Чому буде дорівнювати маса молекул ДНК після реплікації?
56. Ферменти, які здійснюють реплікацію ДНК, рухаються зі швидкістю 0,6 мкм/хв. Скільки часу необхідно для подвоєння ДНК в хромосомі, яка має 500 репліконів (одиниць реплікації), якщо довжина кожного реплікону 60 мкм?
57. Визначте час реплікації гена, який кодує білок з молекулярною масою 68420. Середня молекулярна маса амінокислоти — 100, швидкість реплікації - $9 \cdot 10^4$ пар основ за хвилину.
58. Визначте час реплікації прокариотичного гена, з якого транскрибується молекула мРНК, що містить 350 нуклеотидів. Швидкість реплікації - $9 \cdot 10^4$ пар основ за хвилину.
59. Час реплікації прокариотичного гена становить 0,03 хв., швидкість реплікації - $9 \cdot 10^4$ пар основ за хвилину. Визначте кількість пар основ даного гена.
60. Час реплікації прокариотичного гена становить 0,07 хв., швидкість реплікації - $9 \cdot 10^4$ пар основ за хвилину. Визначте молекулярну вагу даного гена, якщо середня маса одного нуклеотиду 345.
61. Середня довжина ДНК однієї хромосоми миші — 3 см. Визначте загальну кількість ориджинів у клітині миші, якщо тривалість S-фази — 10 годин, а кількість хромосом у диплоїдному наборі — 40. Швидкість реплікації - $9 \cdot 10^4$ пар основ за хвилину.
62. Середня довжина ДНК однієї хромосоми людини — 4 см. Визначте загальну кількість ориджинів у клітині людини, якщо тривалість S-фази — 6 годин, а кількість хромосом у диплоїдному наборі — 46. Швидкість реплікації - $9 \cdot 10^4$ пар основ за хвилину.
63. Середня довжина ДНК однієї хромосоми людини — 4 см. Визначте загальну тривалість S-фази, якщо загальна кількість ориджинів реплікації в клітині дорівнює 506. Швидкість реплікації - $9 \cdot 10^4$ пар основ за хвилину.
64. Визначте середню довжину хромосоми, якщо загальна кількість ориджинів реплікації в клітині дорівнює 546, тривалість S-фази — 7 годин, а кількість хромосом у диплоїдному наборі — 42. Швидкість реплікації - $9 \cdot 10^4$ пар основ за хвилину.
65. Клітини *E. coli*, які вирощувались довгий час на середовищі, що містить ізотоп ^{15}N , переносять у середовище з ^{14}N , чекають два покоління (4-кратне зростання кількості клітин) і виділяють ДНК. Яким буде молярне співвідношення «гібридної» ДНК ^{15}N - ^{14}N до «легкої» ^{14}N - ^{14}N ?

66. Клітини *E. coli*, які вирощувались довгий час на середовищі, що містить ізотоп ^{15}N , переносять у середовище з ^{14}N , чекають три покоління (8-кратне зростання кількості клітин) і виділяють ДНК. Яким буде молярне співвідношення «гібридної» ДНК ^{15}N - ^{14}N до «легкої» ^{14}N - ^{14}N ?
67. Клітини *E. coli*, які вирощувались довгий час на середовищі, що містить ізотоп ^{15}N , переносять у середовище з ^{14}N , чекають три покоління (8-кратне зростання кількості клітин) і виділяють ДНК. Яким буде молярне співвідношення «гібридної» ДНК ^{15}N - ^{14}N , «важкої» ^{15}N - ^{15}N та «легкої» ^{14}N - ^{14}N ?
68. В молекулі ДНК із 960 пуринових основ 420 складає гуанін. Визначте, яка кількість аденіну, гуаніну, тиміну і цитозину необхідна для синтезу нуклеотидів для забезпечення реплікації даної молекули.
69. Припустимо, що ДНК в клітинах кишкової палички синтезується зі швидкістю 100 000 нуклеотидів за хвилину і для реплікації хромосоми необхідно 10 хв. Яка довжина хромосоми кишкової палички в парах нуклеотидів? Яка фізична довжина цієї двохспіральної молекули хромосоми?
70. Молекула ДНК має відносну молекулярну масу 69 000, в тому числі 8625 є аденіновими нуклеотидами. Визначте кількість аденінових, тимідилових, гуанілових і цитидилових нуклеотидів, які містяться в молекулах ДНК після реплікації вихідної молекули. Відносна молекулярна маса одного нуклеотида в середньому складає 345.
71. Довжина фрагменту молекули ДНК складає 720 нм; частина цитидилових нуклеотидів в даному фрагменті складає 15%. Визначте відносну молекулярну масу відповідного фрагменту обох молекул ДНК після реплікації вихідної молекули, а також відсотковий вміст та сумарну кількість всіх нуклеотидів, які входять до складу фрагментів цих молекул ДНК.
72. Сайт рестрикції для рестриктази *Bam*HI G↓GATC↑C, рестриктази *Sau*3A - N↓GATC↑N (стрілки вказують місця рестрикції, послідовності нуклеотидів наведені у напрямку 5'→3', N – будь-який нуклеотид). Яка частка сайтів *Bam*HI розщеплюється також *Sau*3A? Яка частка сайтів *Sau*3A розщеплюється також *Bam*HI?
73. Сайт рестрикції для рестриктази 1 C↓GTTTC↑C, рестриктази 2 - N↓GTTTC↑N (стрілки вказують місця рестрикції, послідовності нуклеотидів наведені у напрямку 5'→3', N – будь-який нуклеотид). Яка частка сайтів рестриктази 1 розщеплюється також рестриктазою 2? Яка частота зустрічності в геномі сайтів рестрикції рестриктази 1?
74. Сайт рестрикції для рестриктази 1 N↓GTAC↑C, рестриктази 2 - N↓GTAC↑N (стрілки вказують місця рестрикції, послідовності нуклеотидів наведені у напрямку 5'→3', N – будь-який нуклеотид). Яка частка сайтів рестриктази 2 розщеплюється також рестриктазою 1? Яка частота зустрічності в геномі сайтів рестрикції рестриктази 1?
75. Сайт рестрикції для рестриктази 1 N↓GTAC↑N, рестриктази 2 - N↓GTAC↑N (стрілки вказують місця рестрикції, послідовності

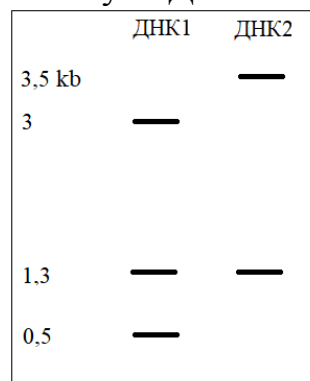
нуклеотидів наведені у напрямку 5'→3', N – будь-який нуклеотид). Яка частка сайтів рестриктази 2 розщеплюється також рестриктазою 1? Яка частота зустрічності в геномі сайтів рестрикції рестриктази 2?

76. Сайт упізнання рестриктази *AvaI* має послідовність CYCGRG, де Y – позначає будь-який піримідин, а R – пурин. Чому дорівнює очікувана відстань в парах нуклеотидів між сайтами рестрикції *AvaI* будь-якої випадкової довгої послідовності ДНК.

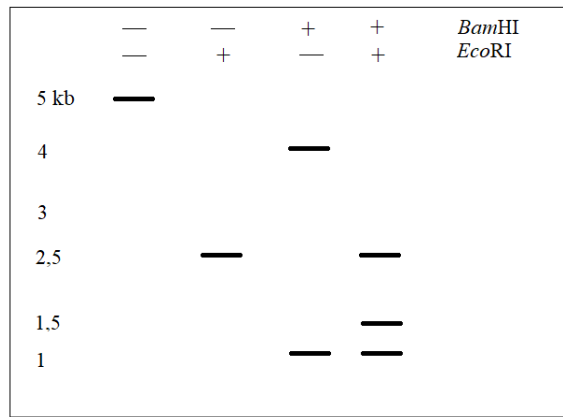
77. Фрагмент ДНК розміром 5 kb (тисяч пар основ) має сайти рестрикції двох рестриктаз – *BamHI* та *EcoRI*. На рисунку наведено результати електрофорезу (електрофореграма) цього фрагменту, обробленого (+) чи не обробленого (-) даними рестриктазами. На основі електрофореграми визначте, скільки сайтів рестрикції *BamHI* та *EcoRI* має даний фрагмент та побудуйте рестриктну карту.



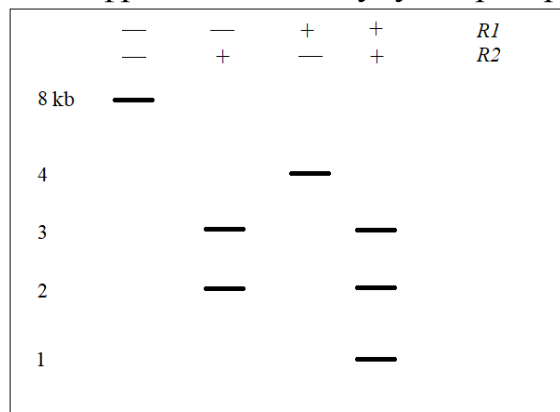
78. Дві молекули ДНК ідентичні за нуклеотидною послідовністю, обробляли рестриктазою *EcoRI*. Продукти рестрикції наведені на електрофореграмі. Чим відрізняються вихідні молекули ДНК?



79. Фрагмент ДНК розміром 5 kb (тисяч пар основ) має сайти рестрикції двох рестриктаз - *BamHI* та *EcoRI*. На рисунку наведено результати електрофорезу (електрофореграма) цього фрагменту, обробленого (+) чи не обробленого (-) даними рестриктазами. На основі електрофореграми визначте, скільки сайтів рестрикції *BamHI* та *EcoRI* має даний фрагмент та побудуйте рестриктну карту.



80. Фрагмент ДНК розміром 8 kb (тисяч пар основ) має сайти рестрикції двох рестриктаз – рестриктази 1 (*R1*) і рестриктази 2 (*R2*). На рисунку наведено результати електрофорезу (електрофореграма) цього фрагменту, обробленого (+) чи не обробленого (-) даними рестриктазами. На основі електрофореграми визначте, скільки сайтів рестрикції рестриктази 1 та рестриктази 2 має даний фрагмент та побудуйте рестриктну карту.

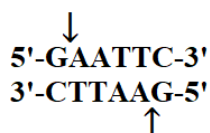


- 81.** Маса геному бактерій *E. coli* $3,174 \cdot 10^9$ атомних одиниць маси (а.о.м.), середня довжина кодуєчої ділянки гена приблизно 1000 пар нуклеотидів. Визначте кількість генів в геномі *E. coli*, враховуючи, що на кодуєчій послідовності припадає 90% від усіх послідовностей геному, а маса одного нуклеотиду – 345 а.о.м.
- 82.** Загальна довжина еукаріотичного гена становить 350000 пар нуклеотидів. Визначте кількість нуклеотидів кодуєчої частини гена, якщо інтрони складають 45%, а регуляторні елементи – 15% від загальної послідовності нуклеотидів.
- 83.** Маса бактеріального геному $2,800 \cdot 10^9$ атомних одиниць маси (а.о.м.), середня маса кодуєчої частини одного гена - $7 \cdot 10^5$ а.о.м. (на кодуєчій частині припадає 95% геному). Визначте середню кількість нуклеотидів регуляторної ділянки гена, враховуючи, що кожен ген містить одну регуляторну ділянку, а маса одного нуклеотиду – 345 а.о.м.
- 84.** Геном ретровірусу представлений двома молекулами РНК, кожна молекула РНК мстить три гена: ген *gag* складається з 2000 нуклеотидів, ген *pol* – з 2900 нуклеотидів та ген *env* – з 1800 нуклеотидів. На позагенній послідовності РНК припадає 15% геному. Визначте масу кожного гена окремо та масу геному ретровірусу.

85. Як зміниться структура фрагмента синтезованого білка, якщо в першому ланцюгу ДНК під дією хімічних факторів випаде 11-й нуклеотид?
86. Визначте молекулярну масу кодуючої частини прокариотичного гена, що контролює утворення білка, який складається із 300 амінокислот. Середня молекулярна маса нуклеотиду 345.
87. Визначте молекулярну масу прокариотичної мРНК, з якої синтезований поліпептид розміром 50 амінокислот. Середня молекулярна маса нуклеотиду дорівнює 345.
88. Визначте відносну молекулярну масу гена, якщо в одному його ланцюзі закодовано білок з відносною молекулярною масою 3000?
89. До складу білка входить 800 амінокислот. Визначте довжину та молекулярну масу гена, який кодує синтез цього білка.
90. Один з ланцюгів ДНК має відносну молекулярну масу 68310. Визначте кількість амінокислот та відносну молекулярну масу білка, закодованого цим ланцюгом ДНК.
91. Білок складається з 248 амінокислот. Що важче: білок чи ген, який його кодує?
92. Довжина фрагмента ДНК становить 1530 нм. Скільки в ньому закодовано білкових молекул, які складаються в середньому із 300 амінокислотних залишків?
93. Молекулярна маса білка 100 000. Визначте довжину гена, який кодує цей білок, а також кількість нуклеотидів у ДНК.
94. До складу білка входить 240 амінокислот. Яка довжина й відносна молекулярна маса гена, що кодує даний білок?
95. Амінокислоти аспарагін-гліцин-фенілаланін-пролін-треонін послідовно складають поліпептид. Визначте структуру, довжину й відносну молекулярну масу ділянки ДНК, яка кодує даний поліпептид.
96. Довжина фрагмента ДНК – 4080 нм. Яку кількість амінокислот кодує даний фрагмент, якщо 360 нуклеотидів є інтронними?
97. Синдром набутого імунodefіциту – інфекційне захворювання, яке передається переважно статевим шляхом. Збідник СНІДу (вірус імунodefіциту людини – ВІЛ) – ретровірус, спадковий матеріал якого (РНК) містить 9213 нуклеотидів. Скільки триплетів має РНК ВІЛ? Визначте сумарну відносну молекулярну масу білкових молекул, закодованих у геномі вірусу, якщо на структурні гени припадає 4000 нуклеотидів.
98. Визначте кількість нуклеотидів кодуючої частини прокариотичного гена, що контролює утворення білка, який складається із 250 амінокислот.
99. Визначте молекулярну масу прокариотичного гена, що контролює утворення білка, який складається із 100 амінокислот, якщо на кодуючу частину припадає 95% послідовності гена. Середня молекулярна маса нуклеотиду дорівнює 345.
100. Прокариотичний білок складається із 200 амінокислот. Визначити, яку довжину має ген, що його кодує, якщо на кодуючу частину припадає 95%

нуклеотидної послідовності гена (відстань між двома парами основ в молекулі ДНК складає 0,34 нм).

101. Прокаріотичний білок складається із 100 амінокислот. Визначити, яку довжину має відповідна мРНК, з якої транлюється даний білок, якщо на кодуючу частину припадає 90% нуклеотидної послідовності гена (припустити, що відстань між основами в молекулі мРНК складає 0,34 нм).
102. Довжина кодуючої частини прокаріотичного гена 254 нм. Визначте кількість амінокислот у білку, що синтезується з даного гена.
103. Маса еукаріотичного білка 19000, а довжина гену дорівнює 20400 нм. Визначте відсоток нуклеотидів, що припадають на кодуючі та некодуєчі послідовності гену (середня маса однієї амінокислоти – 100, а відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК складає 0,34 нм).
104. Суспензія мікроорганізмів культивувалася у середовищі, яке містило [³H]-мічений уридин. З цих клітин були ізольовані клітинні компоненти і проводилося вимірювання радіоактивності фракції мРНК, яка показала, що в мРНК $1 \cdot 10^5$ клітин включилося 2 пікомоля уридина. Допустивши, що склад нуклеотидів мРНК є випадковим і що середня довжина мРНК складає 2000 нуклеотидів. Розрахуйте, скільки молекул мРНК було синтезовано у кожній окремій клітині під час культивування (вважайте, що число Авогадро: $6 \cdot 10^{23}$).
105. Суспензія мікроорганізмів культивувалася у середовищі, яке містило [³H]-мічений уридин. З цих клітин були ізольовані клітинні компоненти і проводилося вимірювання радіоактивності фракції мРНК. Розрахуйте, скільки молей міченого уридину включилося в 1 млн. клітин за умови, що в кожній клітині синтезується 1500 молекул РНК з середньою довжиною 3000 нуклеотидів (вважайте, що число Авогадро: $6 \cdot 10^{23}$).
106. Еукаріотичний ген має 6 екзонів. Напишіть продукт сплайсингу мРНК за умов, якщо у третьому інтроні відбулася делеція, яка захоплює точку розгалуження.
107. Ген має 8 екзонів. Напишіть продукт сплайсингу мРНК за умов, що у другому інтроні на 3'-кінці відбулася заміна гуанозину на цитидин.
108. Ген має 5 екзонів. Напишіть продукт сплайсингу мРНК за умов, що у відбулася делеція трьох нуклеотидів на 5'-кінці четвертого інтрону.
109. Ген має 7 екзонів. Напишіть продукт сплайсингу мРНК за умов, що відбулася заміна аденозину на гуанідин за 10 нуклеотидів до точки розгалуження.
110. Два фрагменти ДНК, що мають послідовності:
Послідовність 1: GATCCTGAATTCCCGATGGCTTAG
Послідовність 2: GGCTATCAAGTGAATTCCCCCGGATTTTAGСТА
обробляють рестриктазою *EcoRI*, отримані продукти рестрикції змішують та інкубують з лігазою. Напишіть послідовності всіх рекомбінантних молекул ДНК, що утворяться після такої процедури. Сайт рестриктази *EcoRI* має вигляд (стрілками позначені місця розрізів):



- 111.** Дві молекули ДНК, що мають послідовності:
 GATCCTGGATCCCCGATGGCTTAG
 GGCTATCAAGTGAATTCCTAGCTA
 обробляють рестриктазою *Bam*HI, отримані продукти рестрикції змішують та інкубують з лігазою. Напишіть послідовності всіх рекомбінантних молекул ДНК, що утворяться після такої процедури. Сайт рестриктази *Bam*HI має вигляд G↓GATC↑C (стрілки вказують місця рестрикції, послідовності нуклеотидів наведені у напрямку 5'→3').
- 112.** Дві молекули ДНК, що мають послідовності:
 AATCCTGGATCCCCGATGGCTTAG
 GGCTATCAAGTGATCCCCGGATCCTAGCTA
 обробляють рестриктазою *Sau*3A, отримані продукти рестрикції змішують та інкубують з лігазою. Напишіть послідовності всіх рекомбінантних молекул ДНК, що утворяться після такої процедури. Сайт рестриктази *Sau*3A має вигляд N↓GATC↑N (стрілки вказують місця рестрикції, послідовності нуклеотидів наведені у напрямку 5'→3', N – будь-який нуклеотид).
- 113.** Дві молекули ДНК, що мають послідовності:
 GATCCTGAATTCTCCGGATCCGGCTT
 GGCTATCAAGTGAATTCCTAGCTA
 обробляють рестриктазами *Eco*RI та *Bam*HI, отримані продукти рестрикції змішують та інкубують з лігазою. Напишіть послідовності всіх рекомбінантних молекул ДНК, що утворяться після такої процедури. Сайт рестриктази *Eco*RI має вигляд G↓AATT↑C, *Bam*HI – G↓GATC↑C (стрілки вказують місця рестрикції, послідовності нуклеотидів наведені у напрямку 5'→3').
- 114.** Розгляньте амінокислотні послідовності трьох олігопептидів:
 a. Ala-Ser-Tyr-Gln-Thr-Gly-Asn,
 b. Lys-Lys-Ala-Gly-Ser-Arg-Lys,
 c. Ala-Leu-Gly-Ile-Phe-Val-Met.
 Які з них: а) легше розчиняються у воді? б) повинні взаємодіяти з ДНК?
- 115.** Розгляньте амінокислотні послідовності трьох олігопептидів:
 a. Phe-Met-Ala-His-Ser-Val-Tyr,
 b. Lys-Ala-His-Arg-Arg-Met-Lys,
 c. Ser-Glu-Val-Lys-Ser-Asp-Gly.
 Які з них: а) легше розчиняються у воді? б) повинні взаємодіяти з клітинною мембраною?
- 116.** Розгляньте амінокислотні послідовності трьох олігопептидів:
 a. Phe-Met-Ala-His-Ser-Val-Tyr,
 b. Lys-Ala-His-Arg-Arg-Met-Lys,
 c. Ser-Glu-Val-Lys-Ser-Asp-Gly.

Які з них: а) легше розчиняються у воді? б) повинні взаємодіяти з клітинною мембраною?

117. Розгляньте фрагмент послідовності амінокислот:

Ala-Leu-Met-Thr-Ser-Leu-Val-Gly-Pro-Gly-Ser-Phe-Lys-Ile-Ser-Val-Gln-Val
Які фрагменти зберігають невпорядковану структуру в складі білка? На яких фрагментах імовірно утворюються α -спіралі та β -структурні ділянки?

118. Розгляньте фрагмент послідовності амінокислот:

Ala-Lys-Gly-Pro-Lys-Asn-Ser-Pro-Lys-Ala-Gln-Gly-Pro-Ser-Lys
Які фрагменти зберігають невпорядковану структуру в складі білка? На яких фрагментах імовірно утворюються α -спіралі та β -структурні ділянки?

119. Розгляньте фрагмент послідовності амінокислот:

Ala-Leu-Lys-Phe-Gln-Ile-Gln-Leu-Ala-Pro-Gly-Ser-Leu-Lys-Ile-Asn-Val-Thr-Leu-Gly

Які фрагменти зберігають невпорядковану структуру в складі білка? На яких фрагментах імовірно утворюються α -спіралі та β -структурні ділянки?

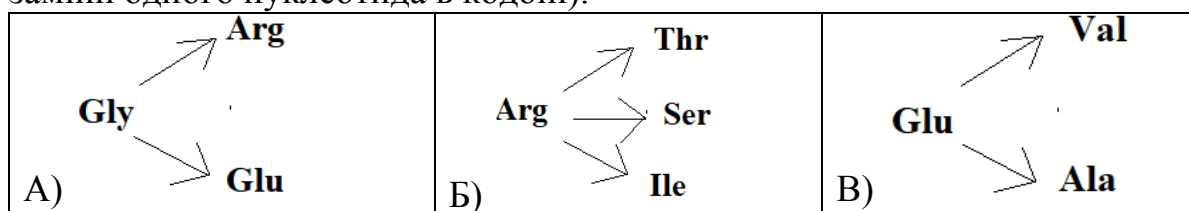
120. Проаналізуйте властивості олігопептидів на основі їхньої первинної амінокислотної послідовності, зашифрованої у нуклеотидних послідовностях мРНК (вказані у напрямку від 5'- до 3'-кінця), нуклеотиди позначені як: А-аденін, G-гуанін, С-цитозин та U-урацил:

- GCU AGC UAU CAA ACG GGA AAC
- AAG AAG GCU GGA AGU CGC AAG
- GCU CUA GGA AUA UUU GUC AUG

121. На основі аналізу властивостей амінокислот дайте відповіді на наступні запитання: а) Який з олігопептидів легше розчиняється у воді? б) Який з олігопептидів повинен взаємодіяти з ДНК? в) Який з олігопептидів може занурюватися у клітинну мембрану?

122. Яка зміна послідовності нуклеотидів може привести до заміни в молекулі протеїну: а) глу на вал, б) ліз на глу, в) глу на ліз, г) вал на глу, д) гіст на арг. Як змінюється електрофоретична рухливість протеїну при рН 7,0, якщо його рІ становила 6,8? Як заміна впливає на стабільність молекули?

123. На рисунку представлено амінокислотні заміни, які можна спостерігати при порівнянні амінокислотних послідовностей певного нормального білка та його мутантних форм. Використовуючи таблицю генетичного коду, визначте триплети, які відповідають даним амінокислотам у даних білках (за умови, що кожна амінокислотна заміна відбулась в результаті заміни одного нуклеотида в кодоні).



124. У результаті мутаційної заміни одного нуклеотиду в ДНК бактерії порушується синтез всіх протеїнів. Поліпептидні ланцюги обриваються в

- тому місці, де повинна бути включена одна і та ж амінокислота. Поясніть, в чому сутність цього явища?
125. У результаті мутації гену у протеїну, який він кодує, часто замінюється лише одна амінокислота. Помічено, що різні заміни зустрічаються з різною частотою. Наприклад, ала часто замінюється на вал, глі, глу і практично ніколи на арг, цис. Чим пояснюється така специфіка замін?
 126. Відомі генетичні порушення синтезу гемоглобіну, в результаті яких синтезується дефектний гемоглобін, наприклад, HbS, в β -субодиницях якого в 6 положенні відбулася заміна глу на вал або Hb Белфас, в β -субодиницях якого в 15 положенні відбулася заміна три на арг. У результаті яких змін могла відбутися кожна з цих замін? Як змінюється характер зв'язків в просторовій структурі протеїну в кожному випадку?
 127. Відомо, що метіоніну відповідає лише один кодон. Поясніть, яким чином цей єдиний кодон може використовуватись як для ініціюючого залишку метіоніну, так і для його внутрішніх залишків в поліпептидах?
 128. Чи є правильним твердження, що метіонін виявляється лише на N-кінцях поліпептидних ланцюгів, так як стартовим кодоном для синтезу білків є АУГ? Відповідь обґрунтуйте.
 129. Чи є правильним твердження, що кожним N-кінцевим амінокислотним залишком білків є метіонін, так як стартовим кодоном для синтезу білків є АУГ? Відповідь обґрунтуйте.
 130. В одній молекулі РНК бактеріофагу закодовано три протеїни. Синтез їх починається незалежно для кожного зі свого ініціюючого кодону. В одній молекулі РНК вірусу поліомієліту закодовано декілька протеїнів. Синтез їх здійснюється таким чином: трансляція РНК починається в одній точці і синтезується один довгий поліпептид. Він розрізається на фрагменти і кожний фрагмент - це окремий вірусний протеїн. Запропонуйте досліди, за допомогою яких можна було би розрізнити два різних механізми синтезу декількох протеїнів на одній РНК.
 131. Який повинен бути склад синтетичного полірибонуклеотиду, який би кодував переважно залишки фенілаланіну і невелику кількість залишків лейцину і серину? Які ще амінокислоти, але в значно меншій кількості кодувала би ця РНК?
 132. Один ланцюг ділянки ДНК з *E coli* має наступну послідовність основ 5'-ГТАГЦТАЦЦАТАГГ-3'. Дайте відповіді на наступні питання: А. Яка послідовність мРНК, що транскрибується з комплементарного ланцюга? Б. Який пептид буде синтезуватись, якщо трансляція почнеться точно з 5'-кінця цієї мРНК? В. Яка аміноацил-тРНК буде зв'язуватись при цьому синтезі після відокремлення від рибосоми тРНК^{ала}? Г. Що відбудеться з тРНК^{ала} після того, як аланін утворить пептидний зв'язок? Д. Які зв'язки руйнуються і які утворюються в ала-тРНК при утворенні пептидного зв'язку аміногрупою аланіну? Е. Який поліпептид закодований на вищеназваному ланцюгу ДНК? Він такий же, як і на комплементарному ланцюгу, чи інший? Є. Чи можна на підставі будови нуклеотиду зробити висновок про його належність до початку, середини або кінця гену?

- 133.** Протеїн сполучної тканини колаген має в своєму складі багато проліну і оксипроліну. Оскільки оксипролін генетично не кодується, його включення в молекулу колагену може йти двома шляхами: включенням в колаген оксипроліну, який утворився внаслідок ферментативного гідроксилювання вільного проліну або гідроксилюванням проліну вже в складі молекули колагену. Для того, щоби з'ясувати, який з цих шляхів використовується в організмі, щуру вводили з їжею ^{14}C -пролін і з хвоста виділяли колаген. При цьому виявилось, що колаген радіоактивний. Аналогічно вводили ^{14}C -оксипролін, але в цьому випадку в колагені радіоактивність не виявлялась. Зробіть висновок про те, на якому етапі синтезу протеїну потрапляє оксипролін до складу колагену?
- 134.** Пептид має наступну структуру: фен–ала–арг–глі–тре–сер
- а) чи може декілька іРНК, які відрізняються одна від одної за первинною структурою, кодувати даний пептид або ні?
- б) запишіть дві різні послідовності іРНК, що кодують даний пептид, вкажіть 5' - і 3' -кінці в іРНК.
- 135.** Складіть таблицю заміних, незамінних та умовно заміних амінокислот.
- 136.** Що таке ізоелектрична точка амінокислоти, пептида, білка?
- 137.** Напишіть формулу пептиду, який складається із:
серин-гліцин-тирозин-аланін-лейцин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Великий М. М., Старикович Л. С., Климишин Н. І., Чайка Я. П. Молекулярні механізми інтеграції метаболізму. Львів: В-во ЛНУ. 2007. 229 с.
2. Ельская А. В., Стародуб Н. Ф. Регуляция биосинтеза белка у эукариот. Київ: Наукова думка, 1990. 280 с.
3. Карпов О. В., Демидов С. В., Кир'яненко С. С. Клітинна та генна інженерія. Київ: Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.
4. Кучменко О. Б. Біохімія рослин. Метаболічний атлас (в схемах і таблицях): навч.-метод. посіб. Ніжин: НДУ ім. М. Гоголя, 2020. 170 с.
5. Кучменко О. Б., Марченкова А. І. Цитологія: навч. посіб. Ніжин: НДУ ім. М. Гоголя, 2018. 147 с.
6. Лыло В. В. Роль убиквитина в регуляции клеточных процессов. *Укр. біохім. журнал*. 2010. Т. 86, № 6. С. 5–13.
7. Методичні вказівки до розв'язку задач з курсу «Молекулярна біологія». Для студентів третього та четвертого курсу заочного відділення ННЦ «Інститут біології» / упорядн. К. С. Афанасьєва, С. Р. Рушковський. Київ, 2014. 34 с.
8. Молекулярная патология белка / под ред. Д. И. Заболотного. Київ: Логос, 2008. 236 с.
9. Негруцкий Б. С. Организация білкового синтезу у вищих еукариотів. Київ: Обереги, 2001. 165 с.
10. Остапченко Л. І., Андрійчук Т. Р., Бабенюк Ю. Д. та ін. Біохімія. Київ: КНУ, 2012. 796 с.
11. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 384 с.
12. Столяр О. Б. Молекулярна біологія: навч. посіб. Київ: КНТ, 2015. 226 с.
13. Цимоха А. С. Протеасомы: участие в клеточных процессах. *Цитология*. 2010. Т. 52. № 4. С. 277–300.
14. Epstein R. J. Human molecular biology. An introduction to the molecular basis of health and disease. Cambridge University Press, 2003. 623 p.
15. Geng F., Wenzel S., Tansey W.P. Ubiquitin and Proteasomes in Transcription. *Annual Review of Biochemistry*. 2012. V. 81. P. 177–201.
16. Lieberman M., Peet A. Marks' basic medical biochemistry. Wolters Kluwer, 2018.
17. Lundblad R.L., Macdonald F.M. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology (4th Edition). CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton-London-New York, 2010. 1080 p.
18. Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger Principles of biochemistry. 2016. 1130 p.
19. PCR technology: principle and applications for DNA amplification; ed. H.Erlich. New York: W.H.Freeman and Company, 1992.
20. Rodwell V. W., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Weil P. A. Harper's illustrated biochemistry. McGraw Hill Education, 2018. 2023 p.
21. Varshavsky A. The Ubiquitin System, an Immense Realm. *Annual Review of Biochemistry*. 2012. V. 81. P. 167–176.

Навчальне видання

КУЧМЕНКО О. Б.,
МАРЧЕНКОВА А. І.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ КЛІТИНИ

Навчальний посібник

Технічний редактор – І. П. Борис

Тираж виготовлено з оригінал-макету замовника.

Підписано до друку 31.08.21 р.
Гарнітура Times
Замовлення № 338

Формат 60x84/16
Обл.-вид. арк. 6,05
Ум. друк. арк. 8,02

Папір офсетний
Електронне вид-ня



Ніжинський державний університет
імені Миколи Гоголя.

м. Ніжин, вул. Воздвиженська, 3^А
(04631) 7-19-72

E-mail: vidavn_ndu@ukr.net
www.ndu.edu.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
ДК № 2137 від 29.03.05 р.