

Radomska Szkoła Wyższa w Radomiu

Radom Academy in Radom

А. Гоженко, А. Козирев, О. Цебржинський, О. Гоженко, В. Жуков
A. Gozhenko, A. Kozyrev, O. Tsebrzhinsky, E. Gozhenko, W. Zukow

**ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ
ТА ПЕРСОНАЛЬНА ГЕНОМІКА ФІЗИЧНИХ
І ПСИХІЧНИХ ЗДІБНОСТЕЙ ЛЮДИНИ**

**Basis molecular biology
and genomics personal physical and mental faculties of man**

Одеса, Бидгощ, 2017
Odesa, Bydgoszcz, 2017

**Radomska Szkoła Wyższa w Radomiu
Radom Academy in Radom**

**А. Гоженко, А. Козирев, О. Цебржинський, О. Гоженко, В. Жуков
A. Gozhenko, A. Kozyrev, O. Tsebrzhinsky, E. Gozhenko, W. Zukow**

**ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ
ТА ПЕРСОНАЛЬНА ГЕНОМІКА ФІЗИЧНИХ
І ПСИХІЧНИХ ЗДІБНОСТЕЙ ЛЮДИНИ**

**Basis molecular biology
and genomics personal physical and mental faculties of man**

Навчальний посібник

Tutorial

**Одеса, Бидгощ
Odesa, Bydgoszcz
2017
2017**

Gozhenko A., Kozyrev A., Tsebrzhinsky O., Gozhenko E. Zukow W. Основи молекулярної біології та персональна геноміка фізичних і психічних здібностей людини = Basis molecular biology and genomics personal physical and mental faculties of man. RSW. Odesa, Bydgoszcz. 2017. 340 p. Bibliography of 101 items. ISBN 9781365585838. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.192685>

УДК 577.2-577.21 UDC 577.2-577.21
ББК 28.070-28.04 LBC 28.070-28.04

Гоженко А., Козирев А., Цебржинський О., Гоженко О., Жуков В. Основи молекулярної біології та персональна геноміка фізичних і психічних здібностей людини. Навчальний посібник. RSW. Одеса. Бидгощ. 2017 р. 340 с. – Бібліографія 101 найменування. ISBN 9781365585838. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.192685>

Рецензенти: Reviewers:

dr hab. R. Muszkieta (Poland)

dr hab. M. Napierała (Poland)

В навчальному посібнику висвітлені молекулярно-біологічні основи функціонування організму людини та основи персональної геноміки. Представлені основні розділи геноміки і протеоміки. Розкриті молекулярні механізми зберігання, передачі та реалізації спадкової інформації. Описані молекулярно-генетичні маркери схильності до розвитку і прояву фізичних та психічних здібностей людини, розкриті питання їх впливу на фізичний і психічний потенціал. Описані сучасні методики лабораторних досліджень на молекулярному рівні.

Посібник розрахований на студентів та викладачів в сфері біології, медицини, біомедицинської інженерії, фізичної реабілітації та фізичного виховання і спорту.

At Tutorial highlights molecular functioning of human body basics and fundamentals of personal genomics. The basic sections of genomics and proteomics. Disclosed molecular mechanisms of storage, transmission and sale of genetic information. Described molecular genetic markers of susceptibility to and manifestation of physical and mental abilities, opened the question of their impact on physical and mental potential. Described the modern methods of laboratory research at the molecular level.

The Tutorial is intended for students and teachers in the field of biology, medicine, biomedical engineering, physical rehabilitation and physical education and sports.

Гоженко А., Козирев А., Цебржинський О., Гоженко О. Жуков В. Основи молекулярної біології та персональна геноміка фізичних і психічних здібностей людини. Навчальний посібник. RSW. Одеса. Бидгощ. 2017 р. 340 с. – Бібліографія 101 найменування. ISBN 9781365585838. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.192685>

© The Author(s) 2017.

This monograph is published with Open Access.
Open Access This articles is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.



Attribution — You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work). Noncommercial — You may not use this work for commercial purposes. Share Alike — If you alter, transform, or build upon this work, you may distribute the resulting work only under the same or similar license to this one.
Zawartość jest objęta licencją Creative Commons Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne-Na tych samych warunkach 4.0

ISBN 9781365585838

DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.192685>

340 s. Liczba znaków: 583 387 (ze streszczeniami i okładką). Liczba grafik: 13 x 1 000 znaków (ryczalt) = 13 000 znaków.
Razem: Liczba znaków: 596 387 (ze streszczeniami, okładką i grafikami) = 14,9 arkuszy wydawniczych.
340 p. Number of characters: 583 387 (with abstracts). Number of images: 13 x 1000 characters (lump sum) = 13 000 characters.
Total: Number of characters: 583 387 (with abstracts, summaries and graphics) = 14,9 sheet publications.

ЗМІСТ

Список умовних скорочень.	11
Вступ.	14
Introduction.	16
Розділ I. Предмет і історія розвитку молекулярної біології.	17
Контрольні питання.	25
Розділ II. Структура і організація генетичного матеріалу.	27
Глава 1. Структура хромосом.	27
1.1. Будова хромосом.	27
1.2. Хромосомні аберації.	30
1.3. Каріотип людини.	32
Контрольні питання.	35
Глава 2. Структура нуклеїнових кислот.	37
2.1. Нуклеотиди.	38
2.1.1. Будова нуклеотидів.	38
2.1.2. Метаболізм нуклеотидів.	40
2.2. Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК).	42
2.3. Рибонуклеїнова кислота (РНК).	45
2.4. Гібридизація нуклеїнових кислот.	47
Контрольні питання.	49
Глава 3. Структура гена і генома.	50
3.1. Будова гена.	50
3.2. Поліморфізм генів.	55
3.3. Геном людини.	63
Контрольні питання.	68
Глава 4. Зберігання і модифікація генетичного матеріалу.	70
4.1. Реплікація ДНК.	70
4.2. Репарація ДНК.	76
4.3. Рекомбінація ДНК.	80
Контрольні питання.	85

Глава 5. Експресія генетичного матеріалу.	86
5.1. Біосинтез білка.	86
5.1.1. Транскрипція.	86
5.1.2. Процесінг.	103
5.1.3. Трансляція.	106
5.2. Регуляція генної експресії.	114
Контрольні питання.	119
Розділ III. Структура і функціонування білків.	121
Глава 1. Структура, властивості і функціонування амінокислот.	121
1.1. Будова, властивості і функції амінокислот.	121
1.2. Будова, властивості і функції пептидів.	131
1.3. Біосинтез амінокислот.	134
Контрольні питання.	135
Глава 2. Структура, властивості і функціонування білків.	136
Контрольні питання.	149
Глава 3. Фолдінг білків.	151
Контрольні питання.	154
Глава 4. Функціонування білків.	155
Контрольні питання.	161
Розділ IV. Персональна геноміка.	163
Глава 1. Інтерпритація результатів молекулярно-генетичного тестування.	163
Контрольні питання.	171
Розділ V. Молекулярна генетика фізичних здібностей людини.	173
Глава 1. Історія розвитку молекулярно-генетичних досліджень схильності до розвитку і прояву фізичних здібностей людини.	173
Контрольні питання.	174
Глава 2. Генетична спадковість фізичних здібностей людини.	176
Контрольні питання.	179
Глава 3. Молекулярно-генетичні маркери витривалості.	180
3.1. ALU I/D поліморфізм гена ангіотензин-1 конвертуючого ферменту (ACE).	182

- 3.2. DraI поліморфізм гена адренергічного рецептора α -2A типу (*ADRA2A*). 183
- 3.3. Gly16Arg поліморфізм гена адренергічного рецептора β -2A типу (*ADRB2*). 183
- 3.4. Gln12 поліморфізм гена АМФ-дезамінази (*AMPD1*). 184
- 3.5. I/D поліморфізм гена брадикінінового рецептора β 2 (*BDKRB2*). 184
- 3.6. Rs1867785 G і rs11689011 T поліморфізми гена ендотеліального PAS-домена протеїну 1 (*EPAS1* або *HIF2A*). 185
- 3.7. (GGAA)_n 185-bp поліморфізм гена рецептора еритропоетину (*EPOR*). 185
- 3.8. C825T поліморфізм гена гуанін зв'язуючого протеїну 3 (*GNB3*). 186
- 3.9. H63D поліморфізм гена гемохроматозу (*HFE*). 186
- 3.10. Pro582Ser поліморфізм гена фактора, індукуємого гіпоксією 1 (*HIF1A*). 187
- 3.11. Glu23Lys поліморфізм гена АТФ-залежного калієвого каналу підродини J, 11-го типу (*KCNJ11*). 187
- 3.12. Gly160 алель гена ядерного фактора активованих Т-клітин, С4 (*NFATC4* або *NFAT3*). 188
- 3.13. E298D поліморфізм гена ендотеліальної NO-синтази (*NOS3*). 188
- 3.14. Rs4253778 G поліморфізм гена α -рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (*PPARA*). 189
- 3.15. Rs2016520 C поліморфізм гена δ -рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (*PPARD*). 189
- 3.16. Gly482Ser поліморфізм гена коактиватора PPAR γ , 1 α (*PPARGC1A*). 189
- 3.17. Ala203Pro і Arg292Ser поліморфізми гена коактиватора PPAR γ , 1 β (*PPARGC1B*). 190
- 3.18. 5I/5D поліморфізм гена регуляторної В субодиниці протеїнтрансфотази 3, α (*PPP3R1* або *CNB*). 191
- 3.19. Ser12Thr поліморфізм гена мітохондріального транскрипційного фактора А (*TFAM*). 191
- 3.20. Ala55Val поліморфізм гена роз'єднувального білка 2 (*UCP2*). 191
- 3.21. Rs1800849 T поліморфізм гена роз'єднувального білка 3 (*UCP3*). 191

3.22. Rs2010963 C поліморфізм гена фактора росту ендотелію судин А (*VEGFA*). 192

3.23. His472Gln поліморфізм гена рецептора 2-го типу фактора росту ендотелію судин (*VEGFR2*). 193

Контрольні питання. 193

Глава 4. Молекулярно-генетичні маркери швидкості і сили. 195

4.1. ALU I/D поліморфізм гена ангіотензин-1 конвертуючого ферменту (*ACE*). 196

4.2. Arg577 поліморфізм гена α -актиніна-3 (*ACTN3*). 196

4.3. (CAG) n L (≥ 22) поліморфізм гена рецептора андрогену (*AR*). 196

4.4. Pro582Ser поліморфізм гена фактора, індукуємого гіпоксією 1 (*HIF1A*). 197

4.5. Rs4253778 C поліморфізм гена α -рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (*PPARA*). 197

4.6. Pro12Ala поліморфізм гена γ -рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (*PPARG*). 198

Контрольні питання. 198

Глава 5. З'вязок рівня експресії генів з розвитком і проявом фізичних здібностей людини. 199

Контрольні питання. 204

Глава 6. Застосування генного допінгу. 205

Контрольні питання. 209

Розділ VI. Молекулярна генетика психічних здібностей людини. 201

Глава 1. Молекулярно-генетичні маркери рис темпераменту і особистості людини. 210

1.1. Гени серотонінергічної системи. 211

1.2. Гени дофамінергічної системи. 221

1.3. Гени розумових здібностей людини. 225

Контрольні питання. 226

Розділ VIII. Молекулярно-біологічні методи дослідження. 227

Глава 1. Забір, транспортування і зберігання біологічного матеріалу. 227

- 1.1. Зішкріб букального епітелію (букальний зішкріб). 227
- 1.2. Змив букального епітелію (букальний змив). 228
- 1.3. Забір венозної крові (венопункція). 229
- 1.4. Амніоцентез. 229
- 1.5. Кордоцентез. 232
- 1.6. Біопсія хоріону (хоріонбіопсія). 232
- Контрольні питання. 233
- Глава 2. Екстракція ДНК з біологічного матеріалу. 234
 - 2.1. Екстракція ДНК з букального епітелію сорбентним методом. 234
 - 2.2. Виділення ДНК з букального епітелію методом лужної екстракції. 235
 - 2.3. Екстракція ДНК з лейкоцитів крові сорбентним методом. 235
 - Контрольні питання. 237
- Глава 3. Методи роботи з ДНК. 238
 - 3.1. Фрагментування ДНК. 238
 - 3.2. Молекулярне клонування ДНК. 239
 - 3.3. Ампліфікація ДНК. 242
 - 3.3.1. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). 243
 - 3.3.2. ПЛР в реальному часі. 250
 - 3.3.3. ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). 251
 - 3.4. Сепарація ДНК. 252
 - 3.5. Гібридизація ДНК. 254
 - 3.5.1. Саузерн-блотінг. 254
 - 3.5.2. Варіанти блот-гібридизації. 255
 - 3.6. Методи на основі ДНК-маркерів. 256
 - 3.6.1. Маркери на основі ДНК-зондів. 257
 - 3.6.2. ПЛР-маркери. 258
 - 3.7. Секвенування ДНК. 262
 - 3.7.1. Метод Максама-Гілберта. 263
 - 3.7.2. Метод Сенгера. 264
 - 3.7.3. NGS-секвенування. 265
 - 3.8. Генотипування. 272

3.8.1. SNP-генотипування.	273
3.8.2. ДНК-фінгерпринтинг.	284
3.9. Генетичне картування.	287
Контрольні питання.	294
Заключення.	296
Словник термінів.	300
Список літератури.	314
Про авторів.	323

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

aa-тРНК	аміноцил-тРНК-синтетаза
АДФ	аденозиндифосфат
АМФ	аденозинмонофосфат
а.п.	азотиста підстава
АП-сайт	апуриновий сайт
АТ	артеріальний тиск
АТФ	аденозинтрифосфат
ВАДА	Всесвітнє антидопінгове агенство
ВЕЖХ	високоєфективна рідинна хроматографія
ВІЛ	вірус імунодефіциту людини
ВНД	вища нервова діяльність
ГАМК	гамма-аміномасляна кислота, γ -аміномасляна кислота
ГДФ	гуанозиндифосфат
ГЮК	гідроксиіндолоцтова кислота
ГМФ	гуанозинмонофосфат
ГТФ	гуанозинтрифосфат
дАТФ	дезоксиаденозинтрифосфат
ДАПД	довільно ампліфикована поліморфна ДНК
ДВЕЖХ	денатуруюча високоєфективна рідинна хроматографія
ДОФА	L-Диоксифенілаланін (3,4-диоксифенілаланін)
дГТФ	дезоксигуанозинтрифосфат
ддНТФ	дідезоксинуклеотидтрифосфат
ДЗД	ДНК-зв'язуючий домен
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
дНМФ	дезоксирибонуклеозидмонофосфат
дНТФ	дезоксирибонуклеотидтрифосфат
дТТФ	дезокситимідинтрифосфат

дЦДФ	дезоксцитидиндифосфат
дЦТФ	дезоксцитидинтрифосфат
ЕДТА	етилендіамінтетрауксусна кислота
ЕР	ендоплазматичний ретикулум
ЖЄЛ	життєва ємність легенів
ЖК	жирні кислоти
ЗТ	зворотна транскрипція
ІМФ	інозинмонофосфат
іРНК	інформаційна РНК
кДНК	комплементарна ДНК
КоА	кофермент А
КТП	короткий тандемний повтор
ЛСД	діетиламід d-лізергінової кислоти
МАО	моноаміноксидаза
МСК	максимальне споживання кисню
мРНК	матрична РНК
МС-ПЛР	метил-специфічна ПЛР
мтДНК	мітохондріальна ДНК
МФЗ	мультифакторіальні захворювання
мяРНК	мала ядерна РНК
мяРНП	малі ядерні рибонуклеопротейди
НАД	нікотинамідаденіндинуклеотид
НДФ	нуклеозиддифосфат
н.з.	нуклеотидний залишок
НМФ	нуклеозидмонофосфат
н.п.	нуклеотидна послідовність
НТФ	нуклеозидтрифосфат
ОНП	однонуклеотидний поліморфізм
ОРА	опорно-руховий апарат
ПААГ	поліакриламідний гель
ПГД	преімплантаційна генетична діагностика

ПДАФ	поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів
ПДРФ	поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
п.н.	пара нуклеотидів
п.п.	пара підстав
ПСАФ	поліморфізм специфічно ампліфікованих фрагментів
РНК	рибонуклеїнова кислота
рРНК	рибосомна РНК
СНП	секвенування нового покоління
ССС	серцево-судинна система
тДНК	трансгенна ДНК
тРНК	транспортна РНК
ТФ	транскрипційний фактор
УДФ	урідиндифосфат
УЗД	ультразвукове дослідження
УМФ	урідинмонофосфат
УТФ	урідинтрифосфат
УФ	ультрафіолетовий
УФО	ультрафіолетове опромінення
ФВП	фактор внутрішнього підкріплення
ФРДФ	фосфорибозілдифосфат
цАМФ	циклічний аденозинмонофосфат
ЦДФ	цитидиндифосфат
ЦНС	центральна нервова система
ЦТФ	цитидинтрифосфат
ШКТ	шлунково-кишковий тракт

ВСТУП

За неповних 100 років після вторинного відкриття законів Грегора Менделя молекулярна біологія і генетика пройшла триумфальний шлях від натурфілософського розуміння законів спадковості та мінливості через експериментальне накопичення фактів формальної генетики до молекулярно-біологічного розуміння сутності гена, його структури та функції. Від теоретичних побудов о гені, як абстрактної одиниці спадковості – до розуміння його матеріальної природи як фрагменту молекули ДНК, кодуючого амінокислотну структуру білка, до клонування індивідуальних генів, створення докладних генетичних мап людини, тварин, ідентифікації генів, мутації яких пов'язані з важкими спадковими хворобами, розробки методів молекулярної біотехнології та генної інженерії, що дозволяють направлено отримувати організми із заданими спадковими ознаками, а також проводити спрямовану корекцію мутантних генів людини, тобто генотерапію спадкових захворювань. Молекулярна біологія і генетика значно поглибили уявлення людства про сутність життя, еволюції живої природи, структурно-функціональних механізмів регуляції індивідуального розвитку. Завдяки їх успіхам започатковано розв'язання глобальних проблем людства, пов'язаних з охороною його генофонду.

В останні роки поступово формується новий напрям, який можна віднести до функціональної геноміки, оскільки він виявляє зв'язки між активністю окремих генів і різними функціями людини. Серед них важливе місце займає виявлення зв'язку специфічних генів з розвитком рухової функції, рисами особистості, темпераменту та інтелекту. Спадкова обумовленість фізичної обдарованості, є безсумнівною. В справжній час визнано аксіомою, що високих досягнень у трудовій та спортивній діяльності, може досягнути лише талановита людина, яка володіє певним набором генетичних передумов до даного виду діяльності. З удосконаленням методів молекулярної біології і генетики, з'явилась можливість визначення фізичних і психічних задатків з використанням генетичних маркерів вже при народженні. В зв'язку з цим

впровадження цих методів в практику біологічної, медичної і спортивної науки суттєво підвищило прогностичні можливості професійної і спортивної орієнтації та відбору.

Мета справжнього навчального посібника – ознайомлення майбутніх фахівців в області біології, медицини, біомедичної інженерії, фізичної реабілітації та фізичного виховання і спорту із молекулярно-біологічними основами функціонування організму людини, молекулярно-генетичними маркерами схильності до розвитку і прояву її фізичних і психічних здібностей та сучасними методами молекулярно-біологічних досліджень.

INTRODUCTION

In less than 100 years after the second discovery of the laws of Gregor Mendel molecular biology and genetics was a triumphal path of natural-philosophical understanding of the laws of heredity and variation in experimental accumulation of facts formal genetics to molecular-biological understanding of the nature of the gene, its structure and function. From the theoretical constructs of the gene as an abstract unit of heredity - to understand its physical nature as a fragment of the DNA molecule encoding the amino acid structure of the protein, the cloning of individual genes create detailed genetic maps of humans, animals, identification of gene mutations are associated with severe hereditary diseases, development of methods of molecular biotechnology and genetic engineering, which allow getting sent organisms with desired hereditary traits and conduct directed correction of mutant human genes, ie gene therapy of inherited diseases. Molecular biology and genetics significantly deepened the idea of humanity the essence of life, the evolution of nature, structural and functional mechanisms of regulation of individual development. Due to their success the solution of global challenges related to the protection of its gene pool.

In recent years, gradually formed a new direction, which can be attributed to functional genomics, as it detects links between the activity of individual genes and the different functions of man. Among them occupies an important place due the detection of specific genes with the development of motor function, personality traits, temperament and intelligence. Hereditary conditionality physical talent is undoubted. In real time considered axiomatic that high achievements in labor and sports activities can achieve only a talented person who has a certain set of genetic background to this type of activity. With improvement of molecular biology and genetics, it was possible to determine the physical and mental traits using genetic markers at birth. In this regard, the implementation of these methods in practice biological, medical and sports science significantly enhanced predictive capabilities and professional sports orientation and selection.

The purpose of this manual - to acquaint future specialists in biology, medicine, biomedical engineering, physical rehabilitation and physical education and sports in molecular biological basis for the functioning of the human organism, molecular genetic markers of susceptibility to and manifestation of physical and mental abilities and modern methods molecular biology research.

РОЗДІЛ І

ПРЕДМЕТ І ІСТОРІЯ РОЗВИТКУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

Молекулярна біологія – комплекс біологічних наук, які вивчають механізми зберігання, передачі та реалізації генетичної (спадкової) інформації, будову, властивості і функції нерегулярних біополімерів – білків і нуклеїнових кислот, а також молекулярних комплексів (молекулярних машин) на їх основі.

Виникнувши як біохімія нуклеїнових кислот, молекулярна біологія пережила період бурхливого розвитку власних методів дослідження, якими тепер відрізняється від біохімії.

Досягнення молекулярної біології в пізнанні живої природи важко переоцінити. Великих успіхів вдалося досягти завдяки вдалій концепції досліджень: складні біологічні процеси розглядаються з позиції окремих молекулярних систем, що дозволяє застосовувати точні фізико-хімічні методи дослідження. Це також залучило в цю галузь науки багато великих умів із суміжних напрямів, що також благотворно вплинуло на масштаби і швидкість розвитку наукових знань у цій галузі. Настільки значимі відкриття, як визначення структури ДНК, розшифровка генетичного коду, штучна спрямована модифікація геному, дозволили значно глибше зрозуміти специфіку процесів розвитку організмів і успішно вирішувати численні найважливіші фундаментальні та прикладні наукові, медичні та соціальні завдання, які ще не так давно вважалися нерозв'язними.

Молекулярна біологія як окремий напрямок біохімії почала формуватися в 30-х роках минулого століття. Саме тоді для поглибленого розуміння феномена життя виникла необхідність у цілеспрямованих дослідженнях на молекулярному рівні процесів збереження і передачі спадкової інформації в живих організмах. Тоді й визначилися завдання молекулярної біології у вивченні структури, властивостей і взаємодії нуклеїнових кислот і білків.

Термін «молекулярна біологія» був вперше використаний британським фізиком і молекулярним біологом Вільямом Астбері в контексті досліджень, що стосувалися з'ясування залежностей між молекулярною структурою і

фізичними та біологічними властивостями фібрилярних білків, таких, як колаген, фібрин крові або скоротливі білки м'язів.

На зорі виникнення молекулярної біології РНК вважалася компонентом рослин та грибів, а ДНК розглядалася як типовий компонент клітин тварин.

Першим дослідником, що довів, що ДНК міститься в рослинах, був радянський біолог, біохімік та основоположник молекулярної біології в СРСР А.М. Белозерський, який виділив у 1935 р. ДНК гороху. Це відкриття встановило той факт, що ДНК є універсальною нуклеїною кислотою, яка присутня у клітинах рослин і тварин.

Серйозним досягненням стало встановлення американськими генетиками Джорджем Бідлом і Едуардом Тейтемом прямого причинно-наслідкового зв'язку між генами і білками. У своїх експериментах вони піддавали клітини нейроспорів (*Neurospora crassa*) ретгеновському опроміненню, що викликало мутації. Отримані результати показали, що це призводило до зміни властивостей специфічних ферментів.

У 1940 р. американський біохімік Альбер Клод виділив з цитоплазми тваринних клітин цитоплазматичні РНК, що містили в собі гранули, які були менше мітохондрій. Він назвав їх мікросомами. Згодом при дослідженні структури і властивостей виділених часток була встановлена їх основна роль в процесі біосинтезу білка. У 1958 р. на першому симпозіумі, присвяченому цим частинкам, було прийнято рішення називати ці частинки рибосомами.

Ще одним важливим кроком у розвитку молекулярної біології стали опубліковані в 1944 р. дані експерименту американських молекулярного біолога і імунолога Освальда Евері і молекулярних біологів Коліна Маклауда і Макліна МакКарті, які показали, що причиною трансформації бактерій є ДНК. Це був перший експериментальний доказ ролі ДНК у передачі спадкової інформації, розвінчавший існуюче раніше уявлення про білкову природу генів.

На початку 50-х рр. британський біохімік Фредерік Сенгер показав, що білковий ланцюг є унікальною послідовністю амінокислотних залишків.

В кінці 50-х рр. британські біохіміки Макс Перуц і Джон Кендрю розшифрували просторову будову перших білків. Вже в 2000 р. були відомі

сотні тисяч природних амінокислотних послідовностей і тисячі просторових структур білків.

Приблизно в той же час дослідження американського біохіміка Ервіна Чаргаффа дозволили йому сформулювати правила, що описують співвідношення а.п. в ДНК, що допомогло надалі зробити найбільший прорив у молекулярній біології і одне з найбільших відкриттів у біології взагалі.

Ця визначна подія відбулася в 1953 р., коли американський і британський молекулярні біологи Джеймс Уотсон і Френсіс Крик, ґрунтуючись на роботах британських біофізика і рентгенографа Розалін Франклін і біофізика Моріса Вілкінса по рентгено-структурному аналізу ДНК, встановили двохспіральну структуру молекули ДНК. Це відкриття дозволило відповісти на принципове питання про здатність носія спадкової інформації до самовідтворення і зрозуміти механізм передачі такої інформації. Цими ж вченими був сформульований принцип комплементарності а.п., що має ключове значення для розуміння механізму утворення надмолекулярних структур. Це принцип, який застосовується тепер для опису всіх молекулярних комплексів, дозволяє описувати і передбачати умови виникнення слабких (невалентних) міжмолекулярних взаємодій, що обумовлюють можливість формування вторинної, третинної і т.д. структури макромолекул, протікання самозбірки надмолекулярних біологічних систем, що визначають таку велику різноманітність молекулярних структур та їх функціональних наборів.

Тоді ж, в 1953 р. виник науковий журнал «Journal of Molecular Biology». Його очолив Джон Кендрю, сферою наукових інтересів якого було дослідження структури глобулярних білків. Аналогічний російськомовний науковий журнал під назвою «Молекулярная биология» був заснований в СРСР радянським біохіміком і молекулярним біологом В.О. Енгельгардтом в 1966 р.

У 1958 р. Френсіс Крик сформулював центральну догму молекулярної біології – уявлення про необоротність потоку генетичної інформації від ДНК через РНК до білків. У 1970 р. ця догма була кілька поправлена з урахуванням накопичених знань, оскільки незалежно американським генетиком Хоуардом Теміном і американським біохіміком, молекулярним біологом і вірусологом

Дейвідом Балтімором було відкрито явище зворотної транскрипції – процес утворення двуланцюгової ДНК на матриці одноланцюгової РНК, який відбувається у онкогенних вірусів. Їми був виявлений фермент зворотна транскриптаза або ревертаза, відповідальний за здійснення цього процесу. Слід зазначити, що сувора необхідність потоку генетичної інформації від нуклеїнових кислот до білків до цих пір залишається основою молекулярної біології.

У 1957 р. радянський біохімік і молекулярний біолог О.С. Спірін спільно з А.М. Белозерським показали, що, при істотних відмінностях у нуклеотидному складі ДНК з різних організмів, склад сумарних РНК подібний. На підставі цих даних вони дійшли сенсаційного висновку про те, що сумарна РНК клітини не може виступати в якості переносника генетичної інформації від ДНК до білків, оскільки не відповідає їй за своїм складом. Разом з тим вони помітили, що існує мінорна фракція РНК, яка повністю відповідає за своїм нуклеотидним складом ДНК і яка може бути істинним переносником генетичної інформації від ДНК до білків. В результаті вони передбачили існування відносно невеликих молекул РНК, які є за будовою аналогами окремих ділянок ДНК і виконують роль посередників при передачі генетичної інформації, що міститься в ДНК, в рибосому, де з використанням цієї інформації здійснюється синтез білкових молекул.

У 1961 р. південно-африканським біологом Сіднеєм Бреннером, французьким генетиком і мікробіологом Франсуа Жакобом, американським мікробіологом Метью Месельсоном з одного боку і Ф. Гро, Франсуа Жакобом і французьким біохіміком і мікробіологом Жаком Моно з іншого, вперше отримано дослідне підтвердження існування таких молекул – матричної або інформаційної РНК. Тоді ж вони розробили концепцію і модель функціональної одиниці ДНК – оперона, яка дозволила пояснити, як саме здійснюється регуляція експресії генів у прокариот. Дослідження механізмів біосинтезу білка і принципів структурної організації і роботи молекулярних машин – рибосом – дозволило сформулювати постулат, що описує рух генетичної інформації, званий центральною догмою молекулярної біології.

У 1961 р. і протягом наступних декількох років американськими біохіміками і генетиками Хайнріхом Маттеєм і Маршаллом Ніренбергом, а потім індійським і американськими молекулярним біологом Харом Кораной і біохіміком Робертом Холлі були проведені кілька робіт з розшифровки генетичного коду, в результаті яких було встановлено безпосередній взаємозв'язок між структурою ДНК і синтезом білків і визначена послідовність нуклеотидів, яка визначає набір амінокислот у білку. Також були отримані дані про універсальність генетичного коду. У 1962 р. генетичний код був розшифрований.

Для розвитку сучасних уявлень про функції РНК вирішальним було відкриття некодуючих РНК, зроблене за результатами робіт О.С. Спіріна спільно з А.М. Белозерським у 1958 р. і Чарльзом Бреннером із співавторами і американським молекулярним біологом Солом Шпігельманом у 1961 р. відповідно.

Серйозний розвиток отримали способи культивування та гібридизації тваринних клітин.

У 1963 р. Франсуа Жакобом і Сіднеєм Бреннером були сформульовані уявлення про реплікон – послідовність невід'ємно реплікуючихся генів, що пояснює важливі аспекти регуляції реплікації генів.

У 1967 р. в лабораторії О.С. Спіріна було вперше продемонстровано, що форма компактно згорнутої РНК визначає морфологію рибосомної частинки.

У 1967 р. американським біохіміком Артуром Корнбергом, був здійснений синтез *in vitro* біологічно активної ДНК.

У 1968 р. було зроблено значне фундаментальне відкриття. Японський біохімік Рейджі Оказакі, виявивши фрагменти ДНК відстаючого ланцюга при дослідженні процесу реплікації, названими на честь неї фрагментами Оказакі, уточнила механізм реплікації ДНК.

У 1970 р. незалежно Хоуардом Теміном і Дейвідом Балтімором було зроблено значне відкриття: був виявлений фермент ревертаза, відповідальний за здійснення зворотної транскрипції – утворення дволанцюгової ДНК на

матриці одноланцюгової РНК, яке відбувається у онкогенних вірусів, що містять РНК.

У цьому ж році, Харой Кораною був проведений хімічний синтез гена.

Ще одним важливим досягненням молекулярної біології стало пояснення механізму мутацій на молекулярному рівні. У результаті серії досліджень були встановлені основні типи мутацій: дуплікації, інверсії, делеції, транслокації та транспозиції. Це дало можливість розглядати еволюційні зміни з точки зору генних процесів, дозволило розробити теорію молекулярних годин, яка застосовується в філогенії.

До початку 70-х рр. були сформульовані основні принципи функціонування нуклеїнових кислот і білків в живому організмі. Було встановлено, що білки і нуклеїнові кислоти в організмі синтезуються за матричним механізмом, молекула-матриця несе в собі зашифровану інформацію про послідовність амінокислот (у білку) або нуклеотидів (в нуклеїновій кислоті). При реплікації або транскрипції такою матрицею служить ДНК, при трансляції або зворотній транскрипції – мРНК. Таким чином, були створені теоретичні передумови для розвитку прикладних напрямів молекулярної біології, зокрема, генної інженерії.

У 1972 р. американські біохіміки Пол Берг, Герберт Боер і Стенлі Коен розробили технологію молекулярного клонування. Тоді ними вперше була отримана в пробірці рекомбінантна ДНК. Ці видатні експерименти заклали основи генної інженерії, а цей рік вважається датою народження цього наукового напрямку.

У 1974 р. американськими мікробіологами Гамільтоном Смітом і Даніелем Натансом, та швейцарським мікробіологом і генетиком Вернером Арбером, були відкриті рестриктази.

1978 р. став роком відкриття сплайсингу. Його відкрив американський молекулярний біолог і генетик Філіп Шарп.

У 1977 р. Фредерік Сенгер, і незалежно американські біохіміки і молекулярні біологи Аллан Максам і Уолтер Гілберт розробили різні методи

визначення первинної структури (секвенування) ДНК. Метод Сенгера, так званий метод обриву ланцюга, є основою сучасного методу секвенування.

У 1976 р. Фредерік Сенгер розшифрував нуклеотидну послідовність ДНК фага φx174 довжиною 5375 нуклеотидних пар.

1981р. – серповидноклітинна анемія стає першою генетичною хворобою, що діагностується за допомогою аналізу ДНК.

1982-1983 рр. – зроблено відкриття каталітичної функції РНК в американських лабораторіях канадського молекулярного біолога Сіднея Олтмена і американського молекулярного біолога Томаса Чека. Це змінило існуюче уявлення про виняткову роль білків. За аналогією з каталітичними білками – ензимами, каталітичні РНК були названі рибозимами.

У 1982 р. Томасом Чеком був відкритий автосплайсінг.

У 1983 р. американський біохімік і молекулярний біолог Кері Муліс відкрив полімеразну ланцюгову реакцію – ПЛР, завдяки якій стало можливо штучно значно збільшити кількість молекул ДНК в розчині для подальшої роботи. На сьогоднішній день це один з найбільш важливих методів молекулярної біології, що застосовується при вивченні генів, генетичному встановленні особи і встановленні спорідненості, дослідженні спадкових і вірусних захворювань і т.п.

У 1990 р. одночасно трьома групами вчених був опублікований метод, що дозволяв швидко одержувати в лабораторії синтетичні функціонально активні РНК (штучні рибозими або молекули, які взаємодіють з різними лігандами – аптамери). Цей метод отримав назву «еволюція в пробірці». А незабаром після цього, в 1991-1993 рр. в лабораторії російського молекулярного біолога А.Б. Четверіна була експериментально показана можливість існування, розвитку і ампліфікації молекул РНК у формі колоній на твердих середовищах.

У 1996 р. британськими генетиками і ембріологами Яном Вілмутом і Кейтом Кемпбелом був успішно проведений експеримент по генетичному клонуванню тварини. В результаті даного експерименту на світ з'явилась вівця Долі – перші тварина, отримана з генетичного коду іншої

дорослої істоти шляхом генетичного клонування. Ця визначна подія стала революцією у генній інженерії.

У 1998 р. практично одночасно американські генетики Крейг Мелло і Ендрю Файєр описали спостерігаючийся раніше при генних експериментах з бактеріями і квітами механізм РНК-інтерференції, при якому невелика дволанцюгова молекула РНК призводить до специфічного придушення експресії гена. Відкриття механізму РНК-інтерференції має дуже важливе практичне значення для сучасної молекулярної біології. Це явище широко використовується в наукових експериментах в якості інструменту для «виключення», тобто, придушення експресії окремих генів. Особливий інтерес викликаний тим, що цей спосіб дозволяє здійснювати оборотне (тимчасове) придушення активності досліджуваних генів. Ведуться дослідження можливості застосування цього явища для лікування вірусних, пухлинних, дегенеративних і метаболічних захворювань. Слід зазначити, що в 2002 р. були відкриті мутанти вірусу поліомієліту, здатні уникати РНК-інтерференції, тому потрібна ще клопітка робота для розробки дійсно ефективних методів лікування на основі цього явища.

У 1999-2001 рр. декількома групами дослідників визначена з дозволом від 5,5 до 2,4 Å структура бактеріальної рибосоми.

У 2001 р. вченими з міжнародного консорціуму і групи американського генетика і біолога Крейга Вентера у найавторитетніших наукових журналах світу «Nature» та «Science» були опубліковані перші дані про геном людини. Повний геном був опублікован у 2003 р. Публікування було закінчено у 2006 р.

До 2006 р. «Protein Data Bank» (PDB) містив дані про просторову структуру 40000 білків.

Контрольні питання

1. Що вивчає молекулярна біологія?
2. Коли молекулярна біологія почала формуватися, як окремий напрямок біохімії?
3. Коли і ким була встановлена двохспіральна структура молекули ДНК?

4. Коли і ким була сформульована центральна догма молекулярної біології?
5. Перерахуйте основні відкриття у сфері молекулярної біології.

РОЗДІЛ II

СТРУКТУРА І ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Глава 1. Структура хромосом

1.1. Будова хромосом

Хромосоми (грец. *χρῶμα* – колір і *σῶμα* – тіло) – нуклеопротейні структури в ядрі еукаріотичної клітини (клітини, що містить ядро), які стають легко помітними у певних фазах клітинного циклу (під час мітозу – непрямого поділу клітин, або мейозу – двохступового поділу клітин).

Хромосоми еукаріотів мають складну будову. У них зосереджена більша частина спадкової інформації.

Хромосоми представляють собою високий ступінь конденсації хроматину – речовини, яка поєднує в собі ДНК, РНК і білки.

Хроматин – це дезоксирибонуклеопротейд, що виявляється під світловим мікроскопом у вигляді тонких ниток і гранул. У процесі мітозу хроматин шляхом спіралізації утворює добре видимі (особливо в метафазі) структури, що інтенсивно забарвлюються – хромосоми. Хроматин постійно присутній в клітинному ядрі. Якщо хроматин упакований щільно його називають конденсованим або гетерохроматином. Він добре спостерігається під мікроскопом. ДНК, що знаходиться у гетерохроматині не транскрибується, зазвичай це стан характерний для незначущих або ділянок, що «мовчать». У інтерфазі гетерохроматин зазвичай розташовується по периферії ядра (пристінковий гетерохроматин). Повна конденсація хромосом відбувається перед поділом клітини. Якщо хроматин упакований нещільно, його називають еу- або інтерхроматином. Цей вид хроматину набагато менш щільний при спостереженні під мікроскопом і зазвичай характеризується наявністю транскрипційної активності. Щільність упаковки хроматину багато в чому визначається модифікаціями спеціалізованих білків гістонів – ацетилюванням і фосфорилюванням.

Гістони – це білки з молекулярною масою 11-21 кД, що містять багато залишків амінокислот аргініну і лізину. Послідовність амінокислот гістонів висококонсервативна і практично не розрізняється в самих різних групах організмів. Завдяки позитивному заряду гістони утворюють іонні зв'язки з негативно зарядженими фосфатними групами, розташованими на зовнішній стороні подвійної спіралі ДНК. Існує 5 типів гістонів: H1, H2A, H2B, H3 і H4. В ядрі кожної клітини присутні близько 60 млн. молекул кожного типу гістонів, а загальна маса гістонів приблизно дорівнює вмісту ДНК. Амінокислотні залишки лізину, аргініну і кінцеві аміногрупи гістонів можуть модифікуватися: ацетилюватися, фосфорилюватися, метилюватися або здійснювати взаємодію з білком убіквітином (негістоновий білок). Модифікації бувають зворотними і незворотними, вони змінюють заряд і конформацію гістонів, а це впливає на взаємодію гістонів між собою і з ДНК. Активність ферментів, відповідальних за модифікації, регулюється і залежить від стадії клітинного циклу. Модифікації роблять можливими конформаційні перебудови хроматину. У ядрі еукаріотичної клітини присутні сотні найрізноманітніших ДНК-зв'язуючих негістонових білків. Кожен білок комплементарен певній послідовності нуклеотидів ДНК (сайт ДНК). До цієї групи відносять сімейство сайт-специфічних білків типу «цинкові пальці». Кожен «цинковий палець» впізнає певний сайт, який складається з 5 нуклеотидних пар. Інше сімейство сайт-специфічних білків – гомодимери. Фрагмент такого білка, що контактує з ДНК, має структуру «спіраль-поворот-спіраль». До групи структурних та регуляторних білків, які постійно асоційовані з хроматином, відносять білки високої рухомості – HMG-білки (англ. high mobility gel proteins). Вони мають молекулярну масу менше 30 кД і характеризуються високим вмістом заряджених амінокислот. Завдяки невеликій молекулярній масі HMG-білки мають високу рухливість при електрофорезі в ПААГ. До негістонових білків належать також ферменти реплікації, транскрипції і репарації. За участю структурних, регуляторних білків і ферментів, що приймають участь у синтезі ДНК і РНК, нитка нуклеосом перетворюється на висококонденсований

комплекс білків і ДНК. Утворена структура в 10000 разів коротше вихідної молекули ДНК.

Вважається, що в ядрі існують так звані функціональні домени хроматину (ДНК одного домену містить приблизно 30000 п.п.), тобто кожна ділянка хромосоми має власну «територію».

Основу хромосоми становить лінійна (не замкнута в кільце) макромолекула ДНК значної довжини (наприклад, у молекулах ДНК хромосом людини налічується від 50 до 245 млн. п.п.). У розтягнутому вигляді довжина хромосоми людини може сягати 5 см.

До складу хромосоми входять п'ять гістонів і ряд негістонових білків. Чотири гістони H2A, H2B, H3 і H4 утворюють октамерний білковий комплекс $(H2A, H2B, H3, H4)_2$, котрий називають октомером або нуклеосомним кором. Октомер складається з восьми білкових глобул. Молекула ДНК «накручується» на поверхню гістонового октамеру, здійснюючі 1.75 обороту (близько 146 п.н.). Такий комплекс гістонових білків з ДНК служить основною структурною одиницею хроматину, яку називають нуклеосома. ДНК, що зв'язує нуклеосомні частинки, називають лінкерною ДНК. У середньому лінкерна ДНК становить 60 пар н.з. Молекули гістона H1 зв'язуються з ДНК в міжнуклеосомних ділянках (лінкерних послідовностях) і захищають ці ділянки від дії нуклеаз. В цілому вся конструкція трохи нагадує намиста. Послідовність з таких нуклеосом, з'єднаних білком H1, називається нуклеофіламентом, або нуклеосомною ниткою, діаметром близько 10 нм.

У ранній інтерфазі (фаза G1) основу кожної з майбутніх хромосом становить одна молекула ДНК. У фазі синтезу (S) молекули ДНК входять у процес реплікації і подвоюються. У пізній інтерфазі (фаза G2) основа кожної з хромосом складається з двох ідентичних молекул ДНК, що утворилися в результаті реплікації і з'єднаних між собою в районі центромерної послідовності. Перед початком поділу клітинного ядра хромосома, що представлена на цей момент ланцюжком нуклеосом, починає спіралізовуватися, або упаковуватися, утворюючи за допомогою білка H1 більш товсту хроматинну нитку, або хроматиду, діаметром 30 нм.

Хроматида – це дезоксирибонуклеопротеїд. Метафазна хромосома складається з двох сестринських хроматид, з'єднаних одна з одною в області первинної перетяжки – центромери. У результаті подальшої спіралізації діаметр хроматида досягає до часу метафази 700 нм. Значна товщина хромосоми (діаметр 1400 нм) на стадії метафази дозволяє, нарешті, побачити її в світловий мікроскоп. Конденсована хромосома має вигляд літери X (часто з нерівними плечима), оскільки дві хроматиди, що виникли в результаті реплікації, як і раніше з'єднані між собою в районі центромери.

Центромера – це особливим чином організована ділянка хромосоми, спільна для обох сестринських хроматид. Центромера ділить тіло хромосоми на два плеча. В кожній хромосомі виділяють коротке (p) і довге (q) плечі.

У залежності від розташування первинної перетяжки розрізняють такі типи хромосом:

- **равноплечові (метацентричні)**, коли центромера розташована посередині, а плечі приблизно рівної довжини. Хромосома має V-подібну форму;
- **неравноплечові (субметацентричні)**, коли центромера зміщена від середини хромосоми, а плечі нерівної довжини. Хромосома має L-подібну форму;
- **паличкоподібні (ахроцентричні)**, коли центромера зміщена до одного кінця хромосоми і одне плече дуже коротке.

У деяких хромосомах можуть бути вторинні перетяжки, що відокремлюють від тіла хромосоми ділянку, звану супутником, або сателітом. Хромосоми, що володіють супутником прийнято позначати як SAT-хромосоми.

1.2. Хромосомні аберації

Хромосомні аберації (хромосомні мутації) – це внутрішньо- і міжхромосомні структурні перебудови, що супроводжуються порушенням порядку фрагментів хромосом.

До хромосомних аберацій відносяться:

- **делеції (лат. deletion – знищення)** – втрата ділянки хромосоми.
Розрізняють термінальні (втрата кінцевої ділянки хромосоми) і інтеркалярні (втрата ділянки на внутрішній ділянці хромосоми) делеції;
- **дуплікації (лат. duplicatio – подвоєння)** – подвоєння ділянки хромосоми, що містить гени;
- **інверсії** – поворот окремих ділянок хромосоми на 180° . Розрізняють парацентричну (інвертований фрагмент лежить по один бік від центромери) і періцентричну (інвертований фрагмент лежить по різні сторони від центромери) інверсії;
- **транслокації** – обмін ділянками хромосом, при якому відбувається переміщення генетичного матеріалу без його втрати, або з втратою. Розрізняють збалансовані, або реципрокні транслокації (дві негомологічні хромосоми обмінюються ділянками без втрати генетичного матеріалу), робертсонівські транслокації (дві негомологічні хромосоми об'єднуються в одну без втрати генетичного матеріалу), транспозиції (перенесення ділянки хромосоми на інше місце на одній хромосомі без втрати генетичного матеріалу), незбалансовані транслокації (присутній зайвий фрагмент однієї хромосоми та/або втрачена частина генетичного матеріалу іншої хромосоми) і децентричні транслокації (утворюється дицентрична хромосома з втратою генетичного матеріалу).

Ділянка, що переміщується в результаті транспозиції носить назву транспозону. Транспозони були отримані американським генетиком Барбарою Мак-Клінток в 1951 р., за що в 1983 р. вона отримала Нобелівську премію по фізіології і медицині.

Розрізняють два класи транспозонів:

- **ретротранспозони**, які переміщуються по геному шляхом зворотної транскрипції;
- **ДНК-транспозони**, які переміщуються по геному шляхом прямого вирізання і вставки з використанням кодуемого транспозоном ферменту транспозази.

Серед мутацій також розрізняють утворення ізохромосом і кільцевих хромосом.

Ізохромосоми – це аномальні хромосоми, які утворюються на стадії анафази поділу клітин, коли центромера поділяється горизонтально, а не подовжньо. В результаті утворюється одна хромосома з двома довгими плечима і одна з двома короткими.

Кільцева хромосома виникає в тому випадку, коли розриви спостерігаються в обох плечах якоїсь хромосоми. Ацентричні фрагменти при цьому втрачаються, а центральна частина хромосоми замикається в кільце.

1.3. Каріотип людини

Каріотип – це сукупність ознак (кількість, розміри, форма і т.д.) повного набору хромосом, притаманна клітинам даного біологічного виду (видовий каріотип), даного організму (індивідуальний каріотип) або лінії (клону) клітин. Кожна клітина тіла людини містить 46 хромосом. Хромосоми завжди парні. Таким чином в клітині знаходиться 23 пари хромосом. Пари відрізняються між собою за розміром, формою і розташуванням центромер. 22 пари гомологічні одна одній – аутосоми і одна пара (X і Y) – статеві хромосоми. Наявність Y-хромосоми успадковується виключно по батьківській лінії. Саме вона визначає чоловічу стать особі. В процесі гаметогенезу відбувається випадкове розходження гомологічних хромосом в мейозі, і в кожній зрілій статевій клітині (гаметі) залишаються тільки 23 хромосоми – гаплоїдний набір. При цьому в кожній гаметі залишається лише одна статеві хромосома. В яйцеклітині – це X-хромосома, тоді як сперматозоїди з рівною ймовірністю несуть як X-, так і Y-хромосому. Таким чином стать майбутньої особі детермінується геномом сперматозоїду. При заплідненні диплоїдний набір хромосом відновлюється.

При записі нормального каріотипу індивідуума вказують загальну кількість хромосом і тип статевих хромосом. Таким чином, нормальний каріотип чоловіка – 46,XY, а жінки – 46,XX. Геном чоловіка складається з 25

хромосом (груп зчеплень), 22 з яких – аутосоми, 2 – статеві хромосоми (X і Y) і 1 – мітохондріальна (мтДНК). У жінок пара X-хромосоми розглядається як одна, тому геном жінки складається з 24 хромосом. В кожній клітині присутні порядка 1000 мітохондрій, а в кожному мітохондріоні міститься приблизно 10 кільцевих мітохондріальних хромосом. Таким чином, в клітинах присутні 10000 копій мітохондріальних хромосом. мтДНК успадковується виключно по материнській лінії.

Для процедури визначення каріотипу можуть бути використані будь-які популяції клітин, які діляться, для визначення людського каріотипу використовується або одноядерні лейкоцити, отримані з проби крові, розподіл яких провокується додаванням мітогенів, або культури клітин, що активно діляться в нормі (фібробласти шкіри, клітини кісткового мозку). Збагачення популяції клітинної культури проводиться зупинкою поділу клітин на стадії метафази мітозу додаванням колхіцину – алкалоїду, що блокує утворення мікротрубочок і «розтягування» хромосом до полюсів поділу клітини і перешкоджає тим самим завершенню мітозу. Отримані клітини в стадії метафази фіксуються, фарбуються і фотографуються під мікроскопом; з набору одержаних фотографій формується систематизований каріотип – нумерований набір пар гомологічних хромосом (аутосом), зображення хромосом при цьому орієнтується вертикально короткими плечима вгору, їх нумерація проводиться в порядку убутання розмірів, пара статевих хромосом міститься в кінець набору.

Процес вивчення будови і кількості хромосом, і графічний запис результатів (визначення каріотипу) носить назву **каріотипування (англ. karyotyping)**. Візуальне подання повного каріотипу називають **каріограмою**.

Для отримання класичного каріотипу використовується забарвлення хромосом різними барвниками або їх сумішами: у силу розходжень у зв'язуванні барвника з різними ділянками хромосом фарбування відбувається нерівномірно і утворюється характерна полосата структура, яка представляє собою комплекс поперечних міток, або смуг – бендів (англ.

banding). При фарбуванні хромосоми в ній визначаються також підсмуги (субсмуги, або суббенди) і підпідсмуги.

Візуальне подання повного хромосомного набору у вигляді полосатої структури носить назву **ідіограми**.

Структура бендів відображає лінійну неоднорідність хромосоми і специфічна для гомологічних пар хромосом та їх ділянок (за винятком поліморфних районів, де локалізуються різноманітні алельні варіанти генів). Перший метод забарвлення хромосом, що дозволяє отримати такі високодеталізовані зображення, був розроблений шведським цитологом Касперсоном. Цей метод отримав назву Q-забарвлення. Використовуються і інші барвники. Такі методики отримали загальну назву диференціального фарбування хромосом.

Порівняння комплексів бендів в класичній каріотипії або ділянок зі специфічними спектральними характеристиками дозволяє ідентифікувати як гомологічні хромосоми, так і окремі їх ділянки, що дозволяє детально визначати хромосомні аберації. Такий аналіз має велике значення в медичній практиці, дозволяючи діагностувати ряд хромосомних захворювань, викликаних як грубими порушеннями каріотипів (порушення числа хромосом), так і порушенням хромосомної структури або множинністю клітинних каріотипів в організмі (мозаїцизм).

Для вказівки положення певного гена (локуса) в хромосомі використовують стандартну номенклатуру. Наприклад, якщо вказують, що ген *CFTR* розташований в ділянці 7q31.2, то це означає, що він локалізований у 2-у суббенді 31 бенда довгого плеча 7-ї хромосоми.

В каріотипі можуть спостерігатися певні відхилення від норми – анеуплоїдія і триплоїдія. **Анеуплоїдія** – це спадкова зміна, при якій число хромосом в клітинах не кратно основному набору. Вона може виражатися, наприклад, в наявності додаткової хромосоми або в нестачі якої-небудь хромосоми.

Існують чотири основні форми анеуплоїдії: моносомія, трисомія, тетрасомія і пентасомія.

Моносомія – це наявність всього однієї з пари гомологічних хромосом. Прикладом моносомії у людини є синдром Тернера, що виражається в наявності всього однієї статевої (X) хромосоми. Таким чином кількість хромосом становить 45 – 22 пари. Пара статевих хромосом є неповною. Генотип такої людини X0, стать – жіноча.

Трисомія – це наявність трьох гомологічних хромосом замість пари в нормі. Найбільш часто у людини зустрічається трисомія по 16-й хромосомі (більше одного відсотка випадків вагітності). Серед новонароджених найбільш поширена трисомія по 21-й хромосомі, або синдром Дауна. Кількість хромосом в цьому випадку становить 47 – 22 пари. 21 пара хромосом містить одну зайву хромосому.

Тетрасомія – це наявність 4 гомологічних хромосом замість пари в диплоїдному наборі.

Пентасомія – це наявність 5 гомологічних хромосом замість 2-х.

Тетрасомія і пентасомія зустрічаються надзвичайно рідко. Їх прикладами у людини можуть служити каріотиби XXXX, XXYY, XXXY, XYYY, XXXXX, XXXXY, XXXYY, XYYYY і XXYYYY. Як правило, з наростанням кількості «зайвих» хромосом збільшується тяжкість і вираженість клінічних симптомів.

Триплоїдія представляє собою наявність повного додаткового комплекту хромосом. Найбільш часто вона виникає внаслідок запліднення двома сперматозоїдами (диспермія) або через неправильну розбіжність хромосом в оогенезі. При цитогенетичному дослідженні виявляють 69 хромосом, тобто кожна хромосома представлена в 3 примірниках.

Контрольні питання

1. Що представляють собою хромосоми?
2. Яку роль відіграє хроматин?
3. Скільки типів гістонів Вам відомі?
4. На скільки плечей поділяє хромосому центромера?
5. Які типи хромосом існують?
6. Що таке хромосомні аберації?

7. Які види хромосомних аєрацій Вам відомі?
8. Скільки відів транспозонів розрізняють?
9. Що представляє собою каріотип?
10. Що таке каріотипування?
11. Які відхилення від норми в каріотипі Ви знаєте?
12. У чому полягає пентасомія?

Глава 2. Структура нуклеїнових кислот

Тривалий час залишалося невідомим, що представляє собою речовина, яка утворює ген, здатна до самореплікації, мутацій і фенотипованого прояву. Перші відомості про фізичні і хімічні основи спадковості були отримані при роботі з мікроорганізмами: бактеріями, вірусами і бактеріофагами. Ці організми, раніше вивчаємі як збудники хвороб людини і домашніх тварин, виявилися зручними об'єктами для дослідження речовини спадковості і природи генетичного матеріалу.

У 1928 р. британський бактеріолог Фредерік Гріфіт вивчав пневмококи, які викликали запалення легенів у мишей, для отримання вакцини. З'ясувалося, що пневмококи бувають двох типів: бескапсульні та з полісахаридною капсулою, при цьому збудником смертельних форм запалення легенів виявилися бактерії з полісахаридною капсулою. При введенні мишам пневмококів з полісахаридною капсулою спостерігалась загибель тварин. Якщо мишам вводили пневмококи без полісахаридної капсули, то вони справлялися із захворюванням і виживали. При ін'єкції вбитих бактерій, незалежно від наявності або відсутності капсули на їх поверхні, тварини взагалі не захворювали запаленням легенів. Якщо ж мишам вводили суміш пневмококів: живих без капсули і вбитих нагріванням, але маючих капсулу, то тварини гинули.

У цьому випадку з організмів загиблих мишей вдалося виділити бактерії із захисними полісахаридними капсулами. Таким чином, в цих експериментах бактерії, які не мають капсул, придбали здатність утворювати її завдяки речовині спадковості, яка перейшла з вбитих бактерій в живі. Тільки в 40-х рр. ХХ ст. в іншій лабораторії була з'ясована природа цієї загадкової речовини спадковості. Фактором, що перетворює непатогенні бескапсульні пневмококи у патогенні з полісахаридною оболонкою, виявилася молекула ДНК.

Нуклеїнові кислоти були відкриті швейцарським фізіологом, гістологом і біохіміком Фрідрихом Мішером у 1869 р. Мішер виділил ДНК з клітин гноя людини і сперми лосося. Спочатку нова речовина отримала назву нуклеїн, а

пізніше, коли Мішер визначив, що ця речовина володіє кислотними властивостями, вона отримала назву нуклеїнової кислоти.

В кожному організмі наявні 2 типи нуклеїнових кислот: дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) і рибонуклеїнова кислота (РНК). ДНК і РНК складаються з мономерних одиниць – нуклеотидів, саме тому нуклеїнові кислоти носять назву полінуклеотидів.

Нуклеїнові кислоти – це молекулярно-генетичні системи управління. Вони мають властивості генетичної пам'яті, перетворення генетичної інформації, матричного самовідтворення та динамічної завадостійкості. У ДНК зашифрована програма і контроль онтогенезу фенотипу у вигляді коду структури всіх білків. Із змінами і комбінаціями ДНК відтворюється і передається потомству.

Нуклеїнові кислоти виконують наступні функції:

- Зберігання спадкової інформації (ДНК);
- Здійснення переносу спадкової інформації (ДНК);
- Реалізація спадкової інформації (РНК).

2.1. Нуклеотиди

2.1.1. Будова нуклеотидів

Нуклеотиди представляють собою фосфорні ефіри нуклеозидів – глікозіламінів, які містять а.п., зв'язану з сахаром (рибозою, або дезоксирибозою). Кожен нуклеотид містить 3 хімічно розрізняючихся компоненти: гетероциклічну а.п., моносахарид (пентозу) і залишок фосфорної кислоти.

Залежно від числа наявних у молекулі залишків фосфорної кислоти розрізняють нуклеозидмонофосфати (НМФ), нуклеозиддифосфати (НДФ) і нуклеозидтрифосфати (НТФ).

Нуклеотиди мають наступну номенклатуру (табл. 1).

Номенклатура нуклеїнових кислот

Азотиста підстава	Нуклеозид		Нуклеотид	
	ДНК	РНК	ДНК	РНК
Аденін (А)	Дезоксиаденозин	Аденозин	Дезоксиаденозин 5'-трифосфат (дАТФ)	Аденозин 5'-трифосфат (АТФ)
Гуанін (G)	Дезоксигуанозин	Гуанозин	Дезоксигуанозин 5'-трифосфат (дГТФ)	Гуанозин 5'-трифосфат (ГТФ)
Цитозин (С)	Дезоксицитидин	Цитидин	Дезоксицитидин 5'-трифосфат (дЦТФ)	Цитидин 5'-трифосфат (ЦТФ)
Тимін (Т)	Дезокситимідин	-	Дезокситимідин 5'-трифосфат (дТТФ)	-
Урацил (U)	-	Урідин	-	Урідин 5'-трифосфат (УТФ)

Пентози в нуклеотидах представлені або рибозою (у складі РНК), або дезоксирибозою (у складі ДНК). Нуклеотиди, в яких є пентози представлені рибозою, називають **рибонуклеотидами**, а нуклеїнові кислоти, побудовані з рибонуклеотидів – **рибонуклеїновими кислотами**, або **РНК**. Нуклеотиди, в яких є пентози представлені дезоксирибозою, називають **дезоксирибонуклеотидами**, а нуклеїнові кислоти, побудовані з дезоксирибонуклеотидів – **дезоксирибонуклеїновими кислотами**, або **ДНК**.

Нуклеїнові кислоти за своєю будовою відносять до класу лінійних полімерів. Остов нуклеїнової кислоти має однакову будову по всій довжині молекули і складається з чередуючихся груп – пентоза-фосфат-пентоза.

Варіабельними групами в полінуклеотидних ланцюгах служать а.п. двох типів – **пуринові (пурини)** і **піримідинові (піримідини)**. До пуринів відносяться **аденін (А)** і **гуанін (G)**, а до піримідинів – **цитозин (С)**, **тимін (Т)** і **урацил (U)**. До молекули ДНК входять аденін (А), гуанін (G), цитозин (С) і тимін (Т). До молекули РНК входять аденін (А), гуанін (G), цитозин (С) і замість тиміна (Т) – урацил (U).

2.1.2. Метаболізм нуклеотидів

Синтез пуринів і піримідинів *de novo* призводить до монофосфату, відповідно ІМФ і УМФ. З цих двох попередників синтезуються всі інші нуклеотиди.

Синтез пуринових нуклеотидів здійснюється з ІМФ. В його підставі гіпоксантин перетворюється в дві стадії відповідно у аденін або гуанін. Утворені нуклеозидмонофосфати АМФ і ГМФ переходять в дифосфати АДФ і ГДФ під дією нуклеозидфосфаткінази і, нарешті, фосфорилуються нуклеозиддифосфаткіназами до трифосфатів АТФ і ГТФ. Нуклеозидтрифосфати служать будівельними блоками для РНК або функціонують як коферменти.

Перетворення рибонуклеотидів в дезоксирибонуклеотиди відбувається на стадії дифосфатів і каталізується нуклеозиддифосфатредуктазою.

Шляхи біосинтезу піримідинових нуклеотидів складніше, ніж шляхи синтезу пуринових нуклеотидів. Перш за все вихідний УМФ фосфорилується до ди-, а потім трифосфату УТФ. УТФ перетворюється цитидинтрифосфатсинтазою (СТР-синтаза) в ЦТФ. Так як відновлення піримідинових нуклеотидів до дезоксирибонуклеотидів відбувається на стадії дифосфатів, ЦТФ повинен бути гідролізований фосфатазою до ЦДФ, після чого можуть утворитися дЦДФ і дЦТФ.

Будівельний блок ДНК, дезокситимідинтрифосфат дТТФ синтезується з УДФ в кілька стадій. Підстава тимін утворюється на рівні нуклеозидмонофосфату при метилюванні дезоксиурідинмонофосфату. Відповідають за цю стадію тимідилатсинтаза і допоміжний фермент дигідрофолатредуктаза, які є важливими мішенями для дії цитостатиків.

Нуклеотиди належать до найбільш складних метаболітів. Їх біосинтез вимагає багато часу і високих витрат енергії. Тому зрозуміло, що нуклеотиди не повністю руйнуються, а здебільшого знову беруть участь в синтезі. Перш за все це відноситься до пуринових підстав аденіну і гуаніну. В організмі вищих тварин близько 90% пуринових підстав знову перетворюються в

нуклеозидмонофосфати, зв'язуючись з ФРДФ. Участь піримідинових підстав у ресинтезі досить незначна.

Розпад пуринів і піримідинів протікає різними шляхами. В організмі людини пурини розпадаються до сечової кислоти і в такій формі виводяться із сечею. Пуринове кільце при цьому залишається незачепленим. Навпаки, кільце піримідинових підстав (урацилу, тиміну і цитозину) руйнується до невеликих фрагментів, які знову включаються в метаболізм або можуть виводитися з організму.

ГМФ розпадається у дві стадії до гуанозіну, а потім – до гуаніну. Гуанін дезамінується з утворенням іншої пуринової підстави – ксантину. У найбільш важливому шляху розпаду АМФ, нуклеотид дезамінується з утворенням ІМФ. З ІМФ, аналогічно розпаду ГМФ, утворюється пуринова підстава гіпоксантин. Один і той же фермент, ксантиноксидаза, перетворює гіпоксантин в ксантин, а ксантин – в сечову кислоту. На кожній з цих стадій реакції в субстрат вводиться оксогрупа окисленням молекулярним киснем. В якості іншого продукту реакції утворюється токсичний пероксид водню (H_2O_2), який видаляється пероксидазами.

У більшості ссавців сечова кислота руйнується в результаті розкриття кільця під дією урикази з подальшим виведенням з організму алантоїну, що утворюється. В організмі приматів, в тому числі людини, алантоїн не утворюється, а кінцевим продуктом катаболізму пуринів є сечова кислота (як у птахів і багатьох рептилій). У більшості інших тварин деградація пуринів призводить до аллантоїнової кислоти або сечовини і гліоксилату.

При руйнуванні піримідинових нуклеотидів важливими проміжними сполуками є вільні підстави урацил і тимін. Обидва з'єднання розпадаються однаковим способом: піримідинове кільце спочатку відновлюється, а потім гідролітично розщеплюється. На наступній стадії при відщепленні CO_2 і NH_3 в якості продукту розпаду урацилу утворюється β -аланін, подальша деградація якого призводить до ацетату, CO_2 і NH_3 . Аналогічним чином з β -аміноізомасляної кислоти, продукту розпаду тиміну, утворюються пропіонат, CO_2 і NH_3 .

2.2. Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК)

Унікальність структури і функціональна індивідуальність молекул ДНК і РНК визначаються їх первинною структурою – послідовністю а.п. в полінуклеотидному ланцюгу.

Первинна структура ДНК. Первинна структура ДНК представляє собою порядок чередування дНМФ у полінуклеотидному ланцюгу. Кожна фосфатна група в полінуклеотидному ланцюгу, за винятком фосфорного залишку на 5'-кінці молекули, бере участь в утворенні двох ефірних зв'язків за участю 3'- і 5'-вуглецевих атомів двох сусідніх дезоксирибоз, тому зв'язок між мономерами позначаються як 3', 5'-фосфодиефірні. Кінцеві нуклеотиди ДНК розрізняють за структурою: на 5'-кінці знаходиться фосфатна група, а на 3'-кінці ланцюга – вільна ОН-група. Ці кінці називають 5'- і 3'-кінцями.

Лінійну послідовність дезоксирибонуклеотидів у полімерному ланцюгу ДНК звичайно скорочено записують за допомогою однолітерного коду, наприклад -A-G-C-T-T-A-C-A- від 5'- до 3'-кінця. У кожному мономері нуклеїнової кислоти присутній залишок фосфорної кислоти. При рН=7 фосфатна група повністю іонізована, тому *in vivo* нуклеїнові кислоти існують у вигляді поліаніонів (мають множинний негативний заряд). Залишки пентоз теж проявляють гідрофільні властивості. А.п. майже нерозчинні у воді, але деякі атоми пуринового і піримідинового циклів здатні утворювати водневі зв'язки.

Вторинна структура ДНК. У травні 1952 р. Розалін Франклін після 100 годинної експозиції волокон В-форми ДНК на рентгенівському дифрактометрі, отримала фотографію 51.

Хрестоподібне розташування дифракційних плям служило прямою вказівкою на структуру у вигляді спіралі. Подальший аналіз даних дозволив Франклін зробити висновок, що спіраль ДНК складається з двох ниток, у якій фосфатні групи розташовуються зовні, а підстави всередині спіралі. Вона також визначила крок спіралі (0.34 нм) та її періодичність (10 пар на виток). Франклін знайшла пояснення факту відсутності дифракційних плям на четвертій лінії і ослаблення інтенсивності плям на шостий лінії в тому, що нитки спіралі не зеркальносиметричні відносно осі спіралі. За її

оцінками, одна нитка зрушена щодо іншої нитки по вертикалі приблизно на три восьмих витка спіралі. Ця рентгенограма послужила головним поштовхом до відкриття двоспіральності ДНК Франклін та побудові моделі просторової структури Джеймсом Уотсоном і Френсісом Криком.

У 1953 р. Джеймсом Уотсоном і Френсісом Криком була запропонована модель відкритої їми просторової структури ДНК. За це визначне відкриття Уотсон і Крик у 1962 р. отримали Нобелівську премію по фізіології і медицині.

Відповідно до моделі Уотсона-Крика, молекула ДНК має форму спіралі, утворену двома полінуклеотидними ланцюгами, закрученими відносно один одного і навколо загальної осі (ДНК-дуплекс). Подвійна спіраль правозакручена, полінуклеотидні ланцюги в ній антипаралельні, тобто якщо один з них орієнтований в напрямку 3'→5', то інший – в напрямку 5'→3'. Тому на кожному з кінців молекули ДНК розташовані 5'-кінець одного ланцюга і 3'-кінець іншого ланцюга. Всі підстави ланцюгів ДНК розташовані усередині подвійної спіралі, а пентозофосфатний остов – зовні. Полінуклеотидні ланцюги утримуються відносно один одного за рахунок водневих зв'язків між комплементарними пуриновими і піримідиновими а.п. А завжди комплементарно з'єднується з Т, а G – з С. А і Т утворюють два зв'язки, а G і С – три зв'язки.

При такому поєднанні кожна пара містить по три кільця, тому загальний розмір цих п.о. однаковий по всій довжині молекули. Водневі зв'язки при інших поєднаннях підстав у парі можливі, але вони значно слабкіше. Послідовність нуклетидів одного ланцюга повністю комплементарна послідовності нуклеотидів іншого ланцюга. Тому, згідно з правилом комплементарності, або правилом Чаргафа (у 1951 р. Ервін Чаргаф встановив закономірності в співвідношенні пуринових і піримідинових підстав в молекулі ДНК), кількість пуринових підстав (A+G) дорівнює кількості піримідинових підстав (T+C). Комплементарні підстави укладені в стопку в серцевині спіралі. Між підставами дволанцюгової молекули в стопці виникають гідрофобні взаємодії, стабілізуючі подвійну спіраль. Така структура виключає контакт азотистих залишків з водою, але стопка підстав не може бути абсолютно вертикальною.

П.п. злегка зміщені відносно одна одної. В утвореній структурі розрізняють два жолобки – великий, шириною 2,2 нм, і малий, шириною 1,2 нм. Азотисті підстави області великого і малого жолобків взаємодіють зі специфічними білками, які беруть участь в організації структури хроматину.

Залежно від концентрації іонів і нуклеотидного складу молекули, подвійна спіраль ДНК в живих організмах існує в різних формах. Розрізняють А-, В- і Z-форми ДНК.

- **А-форма ДНК** – це правоспіральний конформаційний стан дволанцюгової молекули ДНК, що виникає при 75%-ої вологості і в присутності іонів калію, натрію або цезію, кількість п.п. на виток – 11, відстань між п.п. – 2,56, кут обертання між сусідніми п.п. – $32,7^\circ$, діаметр спіралі – 23, всі підстави мають антиконформацію.
- **В-форма ДНК** – це правоспіральний конформаційний стан дволанцюгової молекули ДНК, що існує при високій відносній вологості ($>92\%$) і в розчинах з низькою іонною силою. Вважають, що в живих клітинах практично вся ДНК існує саме в В-формі. Кількість п.п. на 1 виток – 10, відстань між парами підстав 3,38, кут обертання між сусідніми парами підстав – 36° , діаметр спіралі – 19, залишок дезоксирибози знаходиться в С2'-ендоконформації, всі підстави мають антиконформацію.
- **Z-форма ДНК** – це лівоспіральний конформаційний стан дволанцюгової молекули ДНК, що існує при дуже високих концентраціях солей або в присутності етанолу і, як правило, при чергуванні послідовності (дГдЦ)n. При цьому характерною особливістю Z-форми ДНК є чергування конформацій залишків нуклеотидів: в дЦ-ланках залишки вуглеводу мають С2'-ендо-, а підстави – антиконформацію, а в дГ-ланках залишки дезоксирибози знаходяться в С3'-ендо-, а підстави – в синконформації; кількість п.п. на 1 виток – 12, діаметр спіралі 18. Z-форма може існувати *in vivo* (наприклад, при заміні цитозина на метилцитозин).

Третинна структура ДНК (суспералізація ДНК). Кожна молекула ДНК упакована в окрему хромосому. У диплоїдних клітинах людини знаходиться 46 хромосом. Загальна довжина ДНК всіх хромосом клітини становить 1.74

м, але вона упакована у ядрі, діаметр якого в мільйони разів менше. Щоб розташувати ДНК в ядрі клітини, повинна бути сформована дуже компактна структура. Компактизація і суперспіралізація ДНК здійснюється за допомогою різноманітних білків, взаємодіючих з певними послідовностями в структурі ДНК (див. розд. II, гл. 1.1).

2.3. Рибонуклеїнова кислота (РНК)

Первинна структура РНК. Первинна структура РНК представляє собою порядок чередування НМФ у полінуклеотидному ланцюгу. У РНК, як і у ДНК, нуклеотиди пов'язані між собою 3', 5'-фосфодіефірними зв'язками. Кінці полінуклеотидних ланцюгів РНК неоднакові. На одному кінці знаходиться фосфорильована ОН-група 5'-вуглецевого атому, на іншому кінці – ОН-група 3'-вуглецевого атома рибози, тому кінці називають 5'- і 3'-кінцями ланцюга РНК.

Гідроксильна група біля 2'-вуглецевого атома рибози робить молекулу РНК нестабільною. Так, в слабощолоковому середовищі молекули РНК гідролізуються навіть при нормальній температурі, тоді як структура ланцюга ДНК не змінюється.

Вторинна структура РНК. Молекула РНК, на відміну від молекули ДНК, побудована з одного полинуклеотидного ланцюга. Окремі ділянки ланцюга РНК утворюють спеціалізовані петлі – «шпильки», за рахунок водневих зв'язків між комплементарними а.п. А-У і G-С.

Ділянки ланцюга РНК в таких спіральних структурах антипаралельні, але не завжди повністю комплементарні, в них зустрічаються неспаровані нуклеотидні залишки або навіть одноланцюгові петлі, які не вписуються в подвійну спіраль. Наявність спіралізованих ділянок характерна для всіх типів РНК. Хоча РНК, як правило, представляє собою одну нитку, ця нитка, навиваючи сама на себе, може утворювати короткі ділянки подвійної спіралі, яка має структуру А-форми і зберігає її навіть при 100%-ної вологості, на відміну від ДНК, яка при даних умовах завжди має В-форму.

Третинна структура РНК. Одноланцюгові РНК характеризуються компактною і впорядкованою третинною структурою, що виникає шляхом взаємодії спіралізованих елементів вторинної структури. Так, можливе утворення додаткових водневих зв'язків між нуклеотидними залишками, достатньо віддаленими один від одного, або зв'язків між ОН-групами залишків рибози. Третинна структура РНК стабілізована іонами двовалентних металів, наприклад іонами Mg^{2+} , які зв'язуються не тільки з фосфатними групами, але і з підставами.

Типи РНК. У цитоплазмі клітин присутні 3 типи РНК – транспортні РНК (тРНК), матричні (інформаційні) РНК (мРНК або іРНК) і рибосомні РНК (рРНК). Вони розрізняються за первинною структурою, молекулярною масою, конформацією, тривалістю існування і, найголовніше, за функціональною активністю.

➤ **Транспортні РНК (тРНК).** Просторову структуру будь-яких тРНК, незалежно від відмінностей у послідовності нуклеотидів, описують універсальною моделлю «конюшиного листа». У кожній молекулі тРНК є ділянки ланцюга, які не беруть участь в утворенні водневих зв'язків між нуклеотидними залишками. До них, зокрема, відносять ділянку, відповідальну за зв'язування з амінокислотою на 3'-кінці молекули і антикодон – специфічний триплет нуклеотидів, взаємодіючий комплементарно з кодоном мРНК. До складу нуклеотидів тРНК входять мінорні підстави (в середньому 10-12 підстав на молекулу). Вони представлені метилованими підставами, ізомерами і аналогами піримідинів.

Мінорні підстави виконують 2 функції: вони роблять тРНК стійкими до дії нуклеаз цитоплазми і підтримують певну третинну структуру молекули, так як не можуть брати участь в утворенні комплементарних пар, і протидіють спіралізації певних ділянок в полінуклеотидній послідовності тРНК. Функція тРНК полягає у транспортуванні амінокислот до місця синтезу білка;

➤ **Матричні (інформаційні) РНК (мРНК або іРНК).** Первинна структура всіх мРНК, незалежно від унікальності їх кодувальної послідовності, має однакову будову 5'- і 3'-кінців. Так, на 5'-кінці присутній модифікований

нуклеотид 7-метилгуанозин-5'-трифосфат (кеп). Кілька десятків нуклеотидів відокремлюють кап від ініціюючого кодону, зазвичай це триплет -AUG-. За кодуючою ділянкою слідує один з термінуючих кодонів – -UGA-, -UUA-, -UAG-. На 3'-кінці більшості мРНК присутня послідовність нуклеотидів з 100-200 аденозинмонофосфатних залишків. мРНК використовується як матриця для синтезу білка.

- **Рибосомні РНК (рРНК).** Рибосомні РНК мають численні спіральні ділянки. Розрізняють наступні рРНК: 5S, 5,8 S, 28S і 18S (S – коефіцієнт седиментації). рРНК містять декілька модифікованих нуклеотидів, частіше всього це метиловані похідні а.п. або рибози (2'-метилрибоза). рРНК утворюють комплекси з білками, які називають рибосомами. У функції рРНК входять здійснення процесу трансляції і каталіз утворення пептидних зв'язків між приєднаними до тРНК амінокислотами.

Існують також **некодуючі РНК (англ. non-coding RNA, ncRNA)**, які представляють собою молекули РНК, які не транслуються в білки. Раніше використовувався синонім **малі РНК (англ. small RNA, smRNA)**, але в даний час він вже не використовується, так як деякі некодуючі РНК можуть бути дуже великими, наприклад, Xist.

Послідовність ДНК, на якій транскрибуються некодуючі РНК, часто називають **РНК-геном**.

Некодуючі РНК включають в себе тРНК, рРНК, такі малі РНК, як snoRNA, microRNA, siRNA, а також довгі некодуючі РНК – Xist, Evi, Air, CTN, PINK.

Останні транскриптомні технології та методи гібридизації на мікрочіпах припускають наявність більш 30000 довгих некодуючих РНК. Приблизно така ж кількість малих регуляторних РНК міститься в геномі миші.

2.4. Гібридизація нуклеїнових кислот

Вторинна структура нуклеїнових кислот утворюється за рахунок слабких взаємодій – водневих і гідрофобних. Тому якщо водяний розчин ДНК нагріти до 100°C, то зв'язки, що утримують два ланцюги подвійної спіралі разом,

руйнуються. У результаті розриву водневих і гідрофобних зв'язків ланцюги ДНК розходяться. Цей процес носить назву **денатурації**. Але якщо розчин, що містить денатуровану ДНК, дуже повільно охолоджувати до 65°C, то можуть вийти двоспіральні структури, ідентичні вихідним. Такий процес отримав назву **ренатурації**. На явищі денатурації і ренатурації заснований метод, що носить назву **молекулярної гібридизації (англ. molecular hybridization)** – з'єднання *in vitro* комплементарних одноланцюгових нуклеїнових кислот в одну молекулу.

Процес гібридизації може здійснюватися між двома будь-якими ланцюгами нуклеїнових кислот (ДНК-ДНК або ДНК-РНК) за умови, що вони містять комплементарні послідовності нуклеотидів. Такі гібридні структури можна виділити центрифугуванням в градієнті щільності сахарози або спостерігати в електронному мікроскопі. Якщо розчин, що містить зразки ДНК 1 і ДНК 2, виділені з організмів різних видів, денатурувати, а потім провести ренатурацію, то утворюються двоспіральні структури. Але поряд з вихідними ДНК 1 і ДНК 2 утворюються гібридні подвійні спіралі, які містять ланцюг ДНК зразка 1 і ланцюг ДНК зразка 2, де присутні як спаралізовані, так і неспіралізовані ділянки. У неспіралізованих ділянках фрагменти ланцюгів ДНК не комплементарні, тобто в ході гібридизації виходять недосконалі гібриди.

Методом молекулярної гібридизації можна встановити:

- схожість і відмінність первинної структури різних зразків нуклеїнових кислот;
- відмінність ДНК, виділених з організмів різних видів;
- ідентичність ДНК всіх органів і тканин одного організму.

При проведенні гібридизації ДНК-РНК були виділені гібридні молекули, які містили один ланцюг ДНК і один ланцюг РНК. Якщо для експерименту були взяті ДНК і РНК (первинний транскрипт), виділені з одного організму, то утворювались досконалі гібриди, тому що молекула РНК комплементарна ланцюгу ДНК. Гібридизацією ДНК-РНК було вперше встановлено, що всі види РНК клітини мають на молекулі ДНК комплементарні ділянки.

Контрольні питання

1. Коли і ким були відкриті нуклеїнові кислоти?
2. Що представляють собою нуклеотиди?
3. Які види нуклеотидів Ви знаєте?
4. Скільки типів азотистих підстав існує? Перерахуйте підстави кожного типу.
5. Які азотисті підстави входять до складу ДНК, а які до складу РНК?
6. У чому полягає метаболізм нуклеотидів?
7. Опишіть первинну структуру ДНК.
8. Коли і ким була встановлена вторинна структура молекули ДНК?
9. Що представляє собою вторинна структура ДНК?
10. Які форми ДНК Вам відомі?
11. Наведіть характеристики третинної структури ДНК.
12. Опишіть первинну структуру РНК?
13. Що представляє собою вторинна структура РНК.
14. Наведіть характеристики третинної структури РНК.
15. Які типи РНК Ви знаєте. Що це за типи?
16. Що таке некодуєчі РНК?
17. Що таке РНК-геном?
18. У чому полягає гібридизація нуклеїнових кислот?
19. Що відбувається під час денатурації нуклеїнової кислоти?
20. Що можна встановити методом молекулярної гібридизації?

Глава 3. Структура гена і генома

Геноміка – наука, основним предметом вивчення якої є гени і геном живих організмів.

3.1. Будова гена

Термін ген було введено у 1910 р. датським генетиком Вецеліусом Йогансенем і відносилось до гіпотетичної одиниці інформації, що регулює спадковість індивідуальних ознак живого організму. Пізніше, коли була відкрита хімічна структура генів, даний термін отримав іншу інтерпретацію. Під геном розумілась ділянка ДНК, яка представляє собою послідовність нуклеотидів і в якій закодована інформація про послідовність нуклеотидів в іншій нуклеїновій кислоті (інший ген) або амінокислотну послідовність в білку.

Сукупність генів організму, поряд з іншими послідовностями ДНК становить його геном.

В ході проекту ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) були отримані розсіпані по всьому геному складні елементи регуляції і транскрипції, які, не дивлячись на велику віддаленість один від одного, здатні взаємодіяти між собою і одночасно кодувати декілька функціональних продуктів (білки і різноманітні типи РНК). В зв'язку з цим з'явилося нове визначення гену.

Ген – це сукупність геномних послідовностей, що кодують зчеплений набір потенційно перекриваючихся функціональних продуктів.

РНК-кодуючі і білок-кодуючі гени транскрибуються і часто об'єднуються під назвою структурних генів. Дослідження останніх років відкрили також регуляторні гени, які як правило не транскрибуються.

Виділяють наступні групи регуляторних генів:

- **гени реплікації**, що містять сайти, які відповідають за початок і кінець реплікації ДНК;
- **гени рекомбінації**, що містять специфічні сайти, які розпізнаються рекомбінаційними ферментами;

- **гени сегрегації**, які визначають взаємодію хромосом з апаратом веретена в процесі мейозу і мітозу;
- **гени, що містять сайти приєднання (сайти мішені)** для білків, гормонів та деяких інших молекул.

Істинна кількість регуляторних генів і багато їх функцій до справжнього часу не відомі.

Координована робота (експресія) великого числа генів можлива завдяки наявності регуляторних механізмів, що визначають місце, час і рівень експресії конкретного гена або групи генів. Щоб експресія гена була регульованою, він повинен містити індивідуальну (регуляторну) позначку, за якою регуляторні компоненти генетичної системи клітини або організму могли б безпомилково чинити на нього необхідний вплив. Відповідно з цим будь-який ген складається з двох основних функціональних частин (послідовностей нуклеотидів) – регуляторної та структурної (кодуючої).

До регуляторної частини відносяться:

- **промотори** (ділянки гена, до яких приєднується РНК-полімераза для початку процесу транскрипції; розташовані на початку гена – 5'-кінці);
- **енхансери** (ділянки ДНК, які посилюють процес транскрипції з найближчого до них промотору);
- **сайленсери** (ділянки ДНК, які пригнічують процес транскрипції з найближчого до них промотору);
- **інтрони** (некодуючі послідовності нуклеотидів; ділянки ДНК, які розташовані між екзонами; регулюють утворення різноманітних мРНК за принципом один ген – декілька функціональних продуктів за рахунок альтернативного сплайсингу; можуть містити в собі енхансери і гени, які кодують мікроРНК);
- **термінатор** (ділянка ДНК, яка термінує процес транскрипції; розташована на 3'-кінці гену).

До структурної частини відносяться:

- **екзони** (кодуючі послідовності нуклеотидів);

➤ **невеликі ділянки інтронів** (в деяких випадках, якщо вони містять в собі гени мікроРНК). Екзони зберігаються під час сплайсингу і займають 1,5% від всього ядерного геному.

Число екзонів і інтронів в генах може варіювати у широких межах. Першій і останній екзони часто містять нетранскрибуємі ділянки ДНК (5'UTR (англ. untranslated region) 1-го екзону і 3'UTR останнього екзону). Для точності процесу сплайсингу послідовність інтронів завжди починається на GT і закінчується нуклеотидами AG. Для більшості промоторів характерна наявність двох консервативних послідовностей нуклеотидів – ТАТА- і СААТ-боксів.

Справжня схема гену є простішою, що проілюстрована в лінійному вигляді. Нерідко інформація про один білок може бути закодована в двох віддалених один від одного генах. В цьому випадку говорять про нелінійну відповідність продукту експресії ділянки ДНК, які його кодують.

У вищих еукаріот ехансер може активувати промотор на відстані, яка досягає декілька сотен тисяч п.н., що є однією з особливостей регуляції транскрипції вищих еукаріотів. Район дії ехансеру обмежують спеціальні прикордонні елементи, які носять назву інсуляторів.

Інсулятори (англ. insulate – ізолювати) – це регуляторні елементи, які блокують взаємодію між ехансером і промотором, якщо знаходяться між ними.

Впроваджуючися між ехансером і промотором, інсулятор блокує здатність ехансеру активувати транскрипцію з даного промотору. Цей елемент діє як нейтральний, тобто не приймаючий участі у активації або репресії транскрипції. Інсулятор припиняє розповсюдження як позитивної, так і негативної інформації від ехансера. Інсулятори не впливають безпосередньо на активність ехансеру і промотору, тобто промотор може бути активований любим іншим ехансером, а ехансер може активувати будь який інший промотор.

Інтрони вперше були виявлені у 1988 р. в β -глобіні миші британським біохіміком і молекулярним біологом Річардом Робертсом. За це відкриття він у 1993 р. отримав Нобелівську премію по фізіології і медицині.

Послідовність нуклеотидів, відповідна інтрону, видаляється з транскрибованої з нього РНК в процесі сплайсингу до того, як відбудеться трансляція.

Інтрони характерні для всіх типів еукаріотичної РНК, але також знайдені в тРНК і рРНК прокариотів. Кількість і довжина інтронів дуже різні в різних видах і серед різних генів одного організму.

Існує чотири групи інтронів:

- **ядерні (сплайсосомні) інтрони**, які піддаються сплайсингу при допомозі сплайсосоми і мРНК;
- **інтрони групи I**;
- **інтрони групи II**;
- **інтрони групи III**.

Інтрони I, II і III групи здатні до автосплайсингу і зустрічаються рідше, ніж сплайсосомні інтрони. Інтрони I групи, які зустрічаються у бактерій і найпростіших – єдиний клас інтронів, який вимагає присутність незв'язаного гуанілового нуклеотиду. Їх вторинна структура відрізняється від вторинної структури інтронів II і III групи. Інтрони II і III групи схожі один на одного і мають консервативну вторинну структуру. Вони володіють властивостями, схожими на властивості сплайсосоми і, ймовірно, є її еволюційними попередниками.

Сумарний розмір інтронів, як правило, багаторазово перевищує сумарний розмір екзонів конкретних генів. Таким чином, геном еукаріотичного організму містить не тільки послідовність нуклеотидів з генетичною інформацією про білки і нуклеїнові кислоти, а й велика кількість послідовностей нуклеотидів, що не несуть такої інформації.

Від 3 до 8% генів людини не містять інтронів і, по всій видимості, кодують один мРНК продукт.

Крім інтронів в геномі еукаріот є велика кількість інших некодуючих послідовностей нуклеотидів, тому загальна довжина некодуючих послідовностей нуклеотидів в їх геномі у десятки разів перевищує довжину кодуючих послідовностей.

Регуляторна частина гена забезпечує перші етапи реалізації генетичної інформації, що міститься в його структурній частині. Розмір гена складається з розмірів його структурної та регуляторної частин. Визначити протяжність гена не так просто, особливо в разі генів еукаріот. Окремі елементи регуляторної області генів, наприклад, ехансери, можуть розташовуватися на значній (>60000 п.п.) відстані від структурної частини гена як перед нею, так і позаду неї або навіть у ній самій. Середні розміри гена людини складають приблизно 10000-30000 п.п. (від 22 п.п. (гени мікроРНК) до 2,2 млн. п.п. (ген дистрофіну)).

За своїм функціональним призначенням гени можуть бути поділені на дві групи:

- **група I** – гени, які кодують безпосередньо білки (гени транскрипційних факторів, гени синтезу ферментів, гени рецепторів, гени-модифікатори функції білків);
- **група II** – гени, які контролюють синтез рибосомальних, транспортних, ядерних, великих некодуючих проміжків РНК (англ. large intervening non-coding RNA – lincRNA) і малих РНК (регулятори трансляційної ефективності мРНК або швидкості їх деградації: miRNA, siRNA і piRNA).

За характером експресії гени також можуть бути поділені на дві групи:

- **гени «домашнього господарства» (англ. house-keeping genes)** – продукти цих генів необхідні для забезпечення життєдіяльності будь якого типу клітин;
- **тканеспецифічні гени** – гени, які забезпечують спеціалізовані функції клітин, тобто гени, функціонально активні тільки в певних типах клітин (тканинах) і тільки на певних стадіях онтогенезу.

Символи генів людини прийнято писати прописними літерами і курсивом, наприклад ген *ACE*. Продукти експресії генів теж пишуться прописними літерами, але звичайним начертанням, наприклад фермент ACE.

3.2. Поліморфізм генів

Існування в популяції двох і більшого числа алелей одного гену називають **алелеморфізмом**, або **поліморфізмом**, а білкові продукти, що утворюються під час експресії цих варіантів генів – **поліморфними**, або **поліморфами**. Відмінності між алелями одного і того ж гена, як правило, полягають у незначних варіаціях його генетичного коду.

Більшість відомих поліморфізмів виражаються або в замінах одного нуклеотиду, або в зміні числа фрагментів ДНК, що повторюються. Поліморфізми нуклеотидних послідовностей виявлені у всіх структурних елементах генома: екзонах, інтронах, регуляторних ділянках і т.д. Тим не менш варіації, що зачіпають кодуєчі фрагменти генів і відображаються на амінокислотній послідовності їх продуктів, зустрічаються відносно рідко. Локус називається поліморфним, якщо в популяції існують два або більше алелей цього локусу. Однак, якщо один з алелів має дуже високу частоту, скажімо, 0.99 або більше, то висока ймовірність того, що жоден інший алель не буде присутній у вибірці, взятої з популяції, якщо тільки ця вибірка не буде дуже великою. Таким чином, зазвичай локус визначається як поліморфний, якщо частота найбільш поширеного алеля менше 0.99. Такий розподіл має дуже умовний характер і в літературі можна знайти інші критерії поліморфності.

На сьогоднішній день виявлено понад 13 млн. поліморфізмів (припускається наявність не менш ніж 20 млн.) генома людини, на частку яких, головним чином, доводяться **однонуклеотидні поліморфізми (ОНП, або сніпи (англ. single nucleotide polymorphism – SNP, snip))** – відмінності послідовності ДНК розміром в один нуклеотид, сегментальні дуплікації, інсерції/делеції – індели (англ. indels) і інверсії.

Виділяють два варіанта геномного поліморфізму:

- **кількісні зміни** в області локалізації міні- і мікросателітних послідовностях ДНК (так звані повторні поліморфізми в транскрибуємих і нетранскрибуємих ділянках);
- **якосні зміни** окремих нуклеотидів (сніпи і індели).

В першому випадку мінливість по кількості повторюючихся одиниць створює серію алелей, характер і частота яких є унікальною для кожного варіабельного локусу.

Кожен окремий сніп може бути представлений в популяції двома, трьома або чотирма варіантами (за кількістю можливих нуклеотидів в даній позиції ДНК: А, G, T, C), однак більшість сніпів існує у двох варіантах (біалельні), наприклад, заміна А на G або T на C).

Кожен генетичний локус характеризується певним рівнем мінливості, тобто присутністю різних алелів, або варіантів послідовностей ДНК у різних індивідуумів.

Стосовно до гену алелі поділяються на дві групи:

- **нормальні**, або **алелі дикого типу**, при яких функція гена не порушена;
- **мутантні**, що призводять до порушення роботи гена.

У будь-яких популяціях і для будь-яких генів алелі дикого типу є переважаючими.

Під **мутацією** розуміють будь-які зміни в послідовності ДНК незалежно від локалізації та впливу на життєздатність. Таким чином, поняття «мутація» є більш широким у порівнянні з поняттям «мутантний алель». У науковій літературі порівняно часто зустрічаються в популяціях варіанти ділянок генів, які не призводять до помітних порушень функцій, зазвичай розглядаються як нейтральні мутації або генетичні поліморфізми, тоді як поняття «мутація» та «мутантний алель» зазвичай вживаються як синоніми.

Переважає більшість мутацій – результат заміни одного нуклеотиду в змістовній частині гена (екзоні). Ці заміни зазвичай відбуваються під час реплікації ДНК при підготовці клітини до поділу. Хоча процес реплікації надзвичайно точний і існує складна система ферментів впізнавання і виправлення помилок реплікації, тим не менш, помилки зустрічаються в середньому з частотою 10^{-9} - 10^{-11} на один включений нуклеотид.

Іншим важливим джерелом точкових (нуклеотидних) замін є мутагенний вплив радіації або хімічних речовин на структуру ДНК. Отже, точкові мутації можуть бути наслідком хімічних, фізичних і ендогенних факторів. Якщо

мутації виникають в статевих клітинах, то висока ймовірність їх передачі в ряду поколінь. Частота народження нейтральних і негативних мутацій розрізняється між представниками різних рас і етносів, що обумовлює між ними відмінності у схильності до розвитку захворювань і в прояві будь-яких фенотипів. Слід також зазначити, що точкові мутації, як правило, мають не випадкове розміщення в геномі і навіть в окремих генах. Нерідко вони зосереджені в якихось обмежених ділянках ДНК. Помічено, що особливо часто нуклеотидні заміни зачіпають області CpG-острівців – ділянок ДНК довжиною 200-300 п.п., зазвичай розташованих на початку транскрипційної частини багатьох структурних генів (особливо генів домашнього господарства).

Незважаючи на компактне розташування послідовностей, що експресуються і відсутність інтронних структур, мітохондріальний геном відрізняється вираженою нестабільністю – частота виникнення нових мутацій мтДНК перевищує таку для ядерної ДНК в 10-20 разів. Високий рівень мутагенезу мтДНК пояснюється відсутністю ефективних систем репарації, зміненним генетичним кодом (заміни в третьому положенні кодонів не призводять до зміни амінокислотної послідовності білка) і протікаючими в мітохондрії окисно-відновними процесами.

В більшості випадків варіабельність мтДНК обумовлена точечними замінами підстав (транзиціями і трансверсіями), рідше – делеціями і вставками різноманітної довжини.

Найбільш мінлива область мітохондріального геному – **контрольний регіон (петля зсуву, або D-петля (англ. displacement loop))** – також володіє консервативними і варіабельними ділянками, найбільш поліморфним з яких є домен, розташований між позиціями 16024 п.н. і 16400 п.н., або гіперваріабельний сегмент I.

Перша повна опублікована послідовність мтДНК людини, що отримала назву «кембріджської» (англ. Cambridge reference sequence – CRS), – одна з найбільш поширених серед європейських популяцій. У зв'язку з цим виділяють варіанти мтРНК, відповідні (англ. Cam) та невідповідні (англ. non-Cam) «кембріджській» версії.

Різні зміни в нуклеотидній послідовності транскрибуємих ділянок ДНК можуть по-різному проявлятися у фенотипі (табл. 2).

Таблиця 2

Функціональна значимість ДНК-поліморфізмів

Тип поліморфізму	Локалізація	Функціональний ефект	Частота в геномі	Передбачуваний ефект на фенотип
Нонсенс	Кодуючі ділянки	Передчасна термінація амінокислотної послідовності	Дуже низька	Дуже високий
Місенс (несинонімічний або неконсервативний тип)	Кодуючі ділянки	Заміна амінокислоти в білку зі зміненням його фізико-хімічних властивостей	Низька	Від помірного до дуже високого в залежності від локалізації
Місенс (несинонімічний або неконсервативний тип)	Кодуючі ділянки	Заміна амінокислоти в білку без зміни його фізико-хімічних властивостей	Низька	Від низького до дуже високого в залежності від локалізації
Інсерції/делеції (з зміщенням рамки зчитування)	Кодуючі ділянки	Зміщення рамки зчитування в кодуючій ділянці з негативними наслідками для білка	Низька	Дуже високий в залежності від локалізації
Інсерції/делеції (без зміщення рамки зчитування)	Кодуючі або некодуючі ділянки	Зміни амінокислотної послідовності зі вставкою або делецією амінокислот	Низька	Від низького до дуже високого
Сенс (синонімічний)	Кодуючі ділянки	Не призводить до заміни амінокислоти, але може впливати на сплайсинг, стабільність мРНК і конформацію білків	Середня	Від низького до високого
Поліморфізм в промоторном або регуляторном регіоні	Промотор, 5'UTR, 3'UTR	Не призводить до заміни амінокислоти, але може впливати на рівень, місце і час експресії гена	Від низької до середньої	Від низького до високого
Сплайсинговий	Перші 10 п.п. екзона на кордоні з інтронами	Може впливати на процес сплайсинга	Низька	Від низького до дуже високого
Інтронний	В інтронах	Може впливати на експресію гена або стабільність мРНК	Середня	Дуже низький
Міжгенний	Некодуючі ділянки між генами	Може впливати на експресію гена за допомогою модифікації енхансерів, сайленсерів або за рахунок інших механізмів	Висока	Дуже низький

Частина з них не надає ніякого впливу на структуру і функцію відповідного білка. Прикладом може служити велика частина заміни нуклеотидів, що не призводять до заміщення амінокислот в силу вираженості генетичного коду (синонімічні, або сенс (англ. sense) мутації; наприклад, заміна нуклеотиду Т на С у кодоні ССТ не призводить до заміщення проліну на іншу

амінокислоту). Однак деякі синонімічні заміни можуть впливати на стабільність мРНК, характер сплайсингу і конформацію білків.

Мутантні алелі можуть бути поділені на три класи:

- мутації, що ведуть до повної втрати функції (англ. **loss-of-function**);
- мутації, що супроводжуються кількісними змінами відповідних РНК і первинних білкових продуктів;
- домінантно-негативні мутації, які змінюють властивості білкових субодиниць таким чином, що вони надають пошкоджуючу дію на життєздатність або функціонування експресуючихся типів клітин (англ. **gain-of-function**).

Найбільш пошкоджуючу дію мають мутації, які призводять або до утворення безглузлого білка, або до передчасного закінчення його синтезу, тобто делеції або інсерції, що некротні трьом нуклеотидам і тому викликаючи зміщення рамки зчитування, а також нонсенс (англ. **nonsense**) мутації – заміни нуклеотидів, при яких утворюються передчасні термінуючі кодони. Прояв таких мутацій залежить від їх внутригенної локалізації.

Якщо стоп-кодон розташований в останньому екзоні гена або в межах останніх 50-55 нуклеотидів передостаннього екзону, то укорочений (дефектний) білок утворюється. Нонсенс-мутації, розташовані у більш близьких до початку транскрипції локусах, призводять до швидкої деградації мРНК за рахунок механізму, відомого як нонсенс-опосередкована деградація мРНК (англ. **nonsense-mediated mRNA decay – NMD**).

Нонсенс-мутації широко поширені: у світових популяціях виявлено більше 2000 таких сніпів, локалізованих в усіх хромосомах (згідно останньої версії бази даних сніпів «dbSNP Build 129»). Близько 500 з них зустрічаються часто (гетерозиготність 10-50%), при цьому будь-який індивід у середньому може бути носієм близько 50 мутантних алелей (з них 28 алелів перебувають у гомозиготному стані, тобто у кожного індивіда не функціонують як мінімум 14 генів).

Сумісна з життям гомозиготність по мутантному алелю зустрічається в популяціях нерідко (не менше 99 сніпів), що свідчить про взаємозамінність

деяких генів (наприклад, *ACTN3* і *ACTN2*) або про наявність інших компенсаторних механізмів.

Разом з тим зараз активно розробляються фармакологічні препарати, що дозволяють білкам повноцінно синтезуватися при наявності передчасних термінуючихся кодонів в генах, що кодують ці білки.

Фенотипічний прояв заміни нуклеотидів в кодонах так званих (місенс (англ. missense) мутацій або несінонімічних сніпів) залежить від природи відповідних амінокислотних заміни в білку і від функціональної значущості того домену, в якому це відбулося. Так, заміни амінокислот у активних центрах білків можуть супроводжуватися повною втратою їх функціональної активності, тоді як навіть більш серйозні порушення в інших частинах білка часто надають істотно менший вплив на фенотип. Мутації на стику екзонів і інтронів – сплайсингові мутації – часто порушують процесинг первинного РНК-транскрипту (у зв'язку з порушенням процесів впізнавання сигнальних послідовностей нуклеотидів молекулами РНК), в результаті чого відбувається або неправильне вирізання відповідної інтронної ділянки і трансляція безглузлого подовженого білка, або вирізання екзонів та утворення деетільованого білка.

Порушення в регуляторних ділянках генів супроводжуються кількісними змінами відповідного продукту та не зачіпають структури і функціональної активності білка. Прояв таких мутацій визначається кордонним рівнем концентрації білка, при якому його функція ще зберігається.

Окремо варто відзначити рідкісні сніпи (НраII-сніпи), асоційовані з епігенетичними модифікаціями (впливають на експресію генів).

До інших типів генних мутацій відносяться:

- **делеції** (відсутність фрагментів ДНК);
- **дуплікації** (подвоєння фрагментів ДНК);
- **інверсії** (поворот фрагментів ДНК);
- **транслокації** (обмін фрагментами ДНК між різними генами і хромосомами);
- **інсерції** (англ. insert – вставляти) (вставка фрагментів ДНК).

Частина таких мутацій (делеції, дуплікації і інсерції) викликає генетичний дисбаланс і призводить до серйозних порушень синтезу білка, тоді як інші (інверсії і транслокації) зазвичай не супроводжуються втратою або придбанням генетичного матеріалу або його розривами і можуть ніяк не проявлятися в фенотипі, тобто вести себе як типові нейтральні мутації.

Існує також клас динамічних мутацій, або мутацій експансії, пов'язаних з нестабільністю числа тринуклеотидних повторів у функціонально значимих частинах генів. Багато тринуклеотидних повторів, локалізованих в транскрибуємих або регуляторних ділянках генів, характеризуються високим рівнем популяційної мінливості, у межах якого не спостерігається фенотипічних порушень. Хвороба розвивається лише тоді, коли кількість повторів в цих сайтах перевищує певний критичний рівень («хвороби експансії»: хорея Гентінгтона, хвороба Кенеді, ряд спиноцеребральних атаксій).

Спеціального розгляду заслуговують мутації, зумовлені інсерціями протяжних мобільних елементів геному типу LINE, SINE, транспозонів. В справжній час отримані прямі

докази зв'язку внутрішньогенних переміщень цих елементів з виникненням низки спадкових захворювань (наприклад, гемофілії А, нейрофіброматозу, міопатії Шарко–Марі–Тус), а також схильністю до ішемічної хвороби серця, артеріальної гіпертензії і інших мультифакторіальних захворювань.

На кінцевий ефект мутації впливає не тільки її тип (індели, сніпи, дуплікації і т.д.) і місце розташування в гені, але і тип генів (гени транскрипційних факторів, гени синтезу ферментів, гени рецепторів, гени-модифікатори функції білків, гени малих РНК), в яких локалізовані мутації. Оскільки транскрипційні чинники регулюють експресію безлічі генів, то мутації в генах, що кодують ці фактори, роблять більш істотний ефект на прояв якої-небудь ознаки, ніж мутації в генах з одиначною функцією. Так, негативні мутації генів транскрипційних факторів реалізуються переважно у внутрішньоутробному періоді, викликаючи важкі каліцтва і індукуючи переривання вагітності. З іншого боку мутації, що зачіпають гени, що кодують різні ферменти, реалізуються у вигляді захворювань найчастіше протягом

першого року життя. Мутації генів-рецепторів стають очевидними переважно в період статевого дозрівання. І, нарешті, мутації генів, продукти яких модифікують функцію білків (транспортні білки, білки процесингу та ін.), проявляються вже у дорослих індивідуумів.

Існує універсальна стандартна система для позначення різних мутацій, яка розрахована як на запис амінокислотних заміни в білках, так і на нуклеотидні заміни та перестановки в ДНК. У першому випадку кожній амінокислоті відповідає однолітерний символ (іноді трьохлітерний символ залишають), ліворуч записується нормальний варіант амінокислоти, праворуч – мутантний, а розташований в центрі номер відповідає місцю заміни в ланцюжку первинного продукту трансляції.

Наприклад, запис P582S (Pro582Ser) означає заміну проліну на серин у 582-му положенні продукту експресії гена *HIF1A*. Так записуються різні варіанти амінокислотних заміни при місенс-мутаціях.

Літерою X (або Ter) позначається місце зупинки синтезу поліпептидного ланцюга при нонсенс-мутаціях.

Наприклад, R577X (Arg577Ter) означає заміну аргініну на стоп-сигнал у 577-му кодоні α -актініна-3 (продукт експресії гена *ACTN3*).

Відсутність однієї або декількох амінокислот позначають значком Δ .

Так, найбільш часта мутація, що призводить до муковісцидозу, Δ F508 – означає відсутність фенілаланіну у 508-му положенні трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу.

Міжнародний центр біотехнологічної інформації (англ. National Center for Biotechnology Information – NCBI) має базу даних по ОНП (англ. the single nucleotide polymorphism database – dbSNP). Кожному поліморфізму в базі надається особистий індивідуальний номер (англ. reference SNP – rs). Наприклад, R577X поліморфізм гену *ACTN3* позначається як rs1815739.

Відлік нуклеотидів в молекулі ДНК починається з першого смислового кодону, так що нуклеотид під номером +1 відповідає першому нуклеотиду в молекулі кДНК. Вгору за течією (або зправа наліво від 3'- до 5'-кінця) від першого кодону нуклеотиди записуються зі знаком «←», вниз за течією (від 5'-

до 3'-кінця) – зі знаком «+». Нуклеотиди екзонів позначають заголовними літерами, інтронів – прописними.

Слід враховувати, що однонуклеотидні поліморфізми завжди представляють собою двохалельну систему, тому навіть при самій високій варіабельності такого сайту кількість гетерозиготних за даним локусом особин в популяції не буде перевищувати 50-55%. Між тим гіперваріабельні сателітні повтори представляють собою мультиалельні системи з рівнем гетерозиготності від 70 до 90%.

3.3. Геном людини

Геном – це повна генетична система клітини, яка визначає характер онтогенетичного розвитку організму і спадкову передачу в ряді поколінь усіх його структурних і функціональних ознак.

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

Проект «Геном людини» (англ. The Human Genome Project – HGP) – це міжнародний науково-дослідний проект, по розшифровці геному людини.

Його головною метою було визначення послідовності нуклеотидів, які складають ДНК і ідентифікування 20000-25000 генів у людському геномі. Проект розроблявся починаючи з 1984 р., а розпочався у 1990 р., під егідою Департаменту енергетики США (United States Department of Energy – DOE) і Національного інституту здоров'я США (National Institutes of Health – NIH). Очолив проект Джеймс Уотсон, який був головою Національного Центру Досліджень Людського Геному починаючи з 1988 р. У квітні 1993 р.

його замінив американський генетик Френсіс Коллінз, а у 1997 р. назва центру було змінена на Національний Інститут Досліджень Людського Геному (англ. National Human Genome Research Institute – NHGRI). Запланований бюджет склав 3 млрд. \$. (1 нуклеотид – 1\$). Основний обсяг секвенування був виконаний в університетах і дослідницьких центрах США, Канади, Великобританії, Німеччині, Франції, Японії та Китаю. Ці країни склали Міжнародний консорціум.

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

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

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

Хоча метою проекту з розшифровки геному людини було розуміння будови геному людського виду, проект також фокусувався і на кількох інших організмах, серед яких бактерії, зокрема, кишечна паличка (*Escherichia coli* (*E.*

coli)), комахи, такі як мушка чернобрюхая дрозозфіла (*Drosophila melanogaster*), і ссавці, наприклад, миша.

Спочатку планувалося визначення послідовності більше 3 млрд. нуклеотидів, що містяться в гаплоїдному людському геномі. Потім кілька груп оголосили про спробу розширити завдання до секвенування диплоїдного геному людини, серед них міжнародний проект «HarMap», «Personal Genome Project», «Roche-454», «Perlegen», «J. Craig Venter™ INSTITUTE – JCVI», «Applied Biosystems» і «Illumina». Геном будь-якого окремо взятого організму (виключаючи однайцевих близнят і клонованих тварин) унікальний, тому визначення послідовності людського геному в принципі, має включати в себе і секвенування численних варіацій кожного гена. Проте, в завдання проекту «Геном людини» не входило визначення послідовності всієї ДНК, що знаходиться в людських клітинах; а деякі гетерохроматинові області (загалом близько 8%) залишаються несеквенованими до справжнього часу.

Незважаючи на майже стовідсоткову розшифровку структури генома людини, у функціональному плані геном розшифрований не більше ніж на 1-2%, що свідчить про наше відносне розуміння влаштування, принципів роботи і функцій елементів геному.

Наявність в клітинах людини понад 100000 різних типів білків і молекул РНК припускає, що в середньому в одному гені закладена інформація про п'ять функціональних продуктів.

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

Крім генів в ДНК людини виявлено безліч інших базових елементів геному.

Близько 50% всього геному людини складається з повторюваних послідовностей, які включають в себе: сателітні ДНК, інвертовані повтори, помірні і нізкокопійні повтори, міні- і мікросателітні послідовності ДНК, а також різні класи транспозонів.

Сателітна ДНК – це клас високоповторюючихся послідовностей, що складає близько 10% всього геному людини.

Мікро- та міні-сателітні послідовності (мікро- та міні-сателіти) представляють собою багаточисленну групу розсіяних по всьому геному відносно коротких тандемних повторів (**КТП (англ. short tandem repeats – STR)**).

КТП – це повтор двох або більше пар безпосередньо прилягаючих один до одного нуклеотидів в послідовності ДНК. Довжина КТП зазвичай становить від 2 до 10 п.п. (наприклад, $(CATG)_n$) і зазвичай знаходиться в некодуючій інтронній області, тобто є смітцевою ДНК.

Мікросателіти – це клас динуклеотидних повторів.

Міні-сателіти містять від 3 до 15 нуклеотидів.

Інвертовані, або звернені повтори становлять до 5% геному. Вони складаються з двох тотожних копій довжиною близько 300 п.п., орієнтованих в протилежних напрямках на одній нитці ДНК і лежать на відстані від одного десятка тис. п.н. один від одного.

Група **помірно повторюваних послідовностей** дуже гетерогенна за довжиною і кількістю копій і становить близько 35% геному людини. Як правило, вони розподілені дисперсно по всіх хромосомам, причому відносно короткі послідовності ДНК (до 300 п.п.), так звані SINE-повтори (англ. short interspersed elements – SINE), зустрічаються більше 1,7 млн. разів (1,2 млн. копій з Alu-сімейства, 450000 копій MIR, 85000 копій MIR3). Довші LINE-повтори (англ. long interspersed elements – LINE) – до 1 млн. разів.

Транспозон – це послідовність ДНК, здатна переміщатися усередині геному в результаті процесу, що носить назву транспозиції. Транспозони відносяться до мобільних елементів геному (вбудовуючись в геном, можуть викликати мутації, в тому числі і такі значні, як хромосомні перебудови). Клас

LTR-транспозонів (англ. long terminal repeats – LTR) включає елементи, подібні ретровірусам (близько 240000 копій довжиною 6-11 kb). ДНК-транспозони, що відносяться до другого класу транспозонів, переміщуються шляхом прямого вирізання і вставки з використанням кодованого транспозоном ферменту транспозази (приблизно 300000 копій довжиною 2-3 kb).

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

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

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

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

мтДНК представляє собою геном клітинних органелл – мітохондрій.

Синтез ДНК в мітохондріях проходить незалежно від синтезу ядерної ДНК, а спадкування цієї цитоплазматичної генетичної структури – мітохондріальної хромосоми – відбувається в нормі строго по материнській лінії. Мітохондріальна хромосома представлена кільцевою дволанцюговою

молекулою ДНК, яка присутня в органелі у вигляді ковалентно замкнутої суперспіралізованої форми, асоційованої з внутрішньою мембраною мітохондрії. Кожна органела містить від 1 до 10 молекул мтДНК, що становить 1000-10000 копій на клітину. Як правило, один організм володіє єдиною формою мтДНК, тобто одним гаплотипом, успадкованим по материнській лінії.

Високий ступінь вивченості генетичного апарату мітохондрій обумовлений невеликими розмірами мітохондріального геному, що відрізняється щільною локалізацією генів, відсутністю інтронів і протяжних нетранскрибуємих ділянок.

Мітохондріальний геном людини являє собою невелику (16569 п.н.) кільцеву молекулу ДНК і кодує 13 білків – компонентів ензиматичних систем окислювального фосфорилування, гени 22 тРНК і 2 рРНК. У ряді інших видів мітохондріальний геном людини відрізняється найбільшою компактністю. Тут гени білкового комплексів і рРНК чергуються з генами тРНК, а міжгенні ділянки представлені короткими, в декілька нуклеотидів, вставками. Єдиною протяжною, близько 1,1 тис. п.н., некодуючою структурою мітохондріального геному є контрольний регіон (петля зсуву, або D-петля), ділянки якої забезпечують асоціацію мітохондріальної хромосоми на мембрані органели і містять структури, необхідні для ініціації та регуляції процесів реплікації і транскрипції мтДНК.

Контрольні питання

1. Що вивчає геноміка?
2. Коли і ким було введено термін «ген»?
3. Що представляє собою ген?
4. Які групи регуляторних генів виділяють?
5. Що відноситься до регуляторної частини гену?
6. Яку функцію виконуть інтрони?
7. Яку назву має ділянка ДНК, яка термінує процес транскрипції?
8. Що відноситься до структурної частини гену?
9. Що таке екзони?

10. Яку функцію виконують інсулятори?
11. Скільки груп інтронів існує? Перерахуйте ці групи.
12. На скільки груп можуть бути поділені гени за своїм функціональним призначенням? Що це за групи?
13. На скільки груп можуть бути поділені гени за характером своєї експресії? Опишіть ці групи?
14. Що представляє собою генетичний поліморфізм?
15. Що таке однонуклеотидні поліморфізми?
16. Скільки варіантів геномного поліморфізму виділяють? Що це за варіанти?
17. На скільки груп стосовно до гену, поділяються алелі? Опишіть ці групи?
18. Що розуміють під мутацією?
19. Що відноситься до найбільш мінливої області мітохондріального геному?
20. На які класи можуть бути поділені мутантні алелі?
21. Які мутації викликають генетичний дисбаланс і призводять до серйозних порушень синтезу білка?
22. Опишіть принципову схему запису і нумерації нуклеотидів.
23. Що представляє собою геном людини?
24. Що Вам відомо про проект «Геном людини»?
25. З чого складається близько 50% всього геному людини?
26. Що представляє собою мітохондріальна ДНК?

Глава 4. Зберігання і модифікація генетичного матеріалу

4.1. Реплікація ДНК

Живі організми протягом S-фази клітинного циклу, яка передує поділу клітини, подвоюють вміст ДНК таким чином, що кожна дочірня клітина після поділу отримує набір хромосом, ідентичний батьківській клітині. Процес подвоєння хромосом носить назву **реплікації (редуплікації)**. Реплікація представляє собою синтез ДНК.

Хромосома містить одну безперервну двохланцюгову молекулу ДНК. При реплікації кожне коло вихідної (батьківської) двохланцюгової ДНК служить матрицею для синтезу нового (дочірнього) комплементарного ланцюга. Новостворена подвійна спіраль має один вихідний (батьківський) і один знову синтезований (дочірній) ланцюг. Такий механізм подвоєння ДНК отримав назву полуконсервативної реплікації.

Механізм полуконсервативної реплікації був розшифрований у 1967 р. Рейджі Оказакі.

Первинна структура нового ланцюга визначається первинною структурою вихідного ланцюга, тому що в основі його утворення лежить принцип комплементарності підстав ($G=C$ і $A=T$). Ферменти і білки, що приймають участь у реплікації, повинні працювати швидко і точно. Ці умови виконуються за допомогою особливого мультиферментного комплексу.

Реплікацію можна поділити на 4 етапи:

- **ініціацію** – утворення реплікативної вилки;
- **елонгацію** – синтез нових ланцюгів;
- **виключення праймерів**;
- **термінацію** – завершення синтезу двох дочірніх ланцюгів ДНК.

Ініціація реплікації. Синтез ДНК у еукаріотів відбувається в S-фазу клітинного циклу. Ініціацію реплікації регулюють специфічні сигнальні білкові молекули – фактори росту. Фактори росту зв'язуються з рецепторами мембран клітин, які передають сигнал, що спонукає клітину до початку реплікації. Синтез нових одноланцюгових молекул ДНК може відбутися тільки при

розбіжності батьківських ланцюгів. У певному сайті (точка початку реплікації, або оріджин) відбувається локальна денатурація ДНК, ланцюги розходяться і утворюються дві реплікативні вилки (назву отримана за характерну Y-подібну форму), що рухаються в протилежних напрямках. В утворенні реплікативної вилки приймає участь ряд білків і ферментів. Так, сімейства ДНК-топоізомераз (I, II і III), володіючи нуклеазною активністю, бере участь у регуляції суперспіралізації ДНК. Наприклад, ДНК-топоізомераза I розриває фосфоефірний зв'язок в одному з ланцюгів подвійної спіралі і ковалентно приєднується до 5'-кінця в точці розриву. Після закінчення формування реплікативної вилки фермент ліквідує розрив у ланцюгу і відокремлюється від ДНК. Розрив водневих зв'язків в дволанцюговій молекулі ДНК здійснює фермент ДНК-хеліказа. ДНК-хеліказа використовує енергію АТФ для розплітання подвійної спіралі ДНК. У результаті відбувається розкручування ділянки суперспіралізованої молекули ДНК. У підтримці цієї ділянки ДНК в розкрученому стані беруть участь SSB-білки (англ. single strand binding proteins –SSB), тобто білки, що зв'язуються з одноланцюговими нитками ДНК. SSB-білки, не закриваючи азотистих підстав, зв'язуються з одноланцюговою ДНК по всій довжині розділившихся ланцюгів і таким чином запобігають їх комплементарному скручуванню і утворенню «шпильок». Вони володіють великою спорідненістю до одноланцюгових ділянок ДНК, незалежно від первинної структури ланцюгів.

Елонгація реплікації. Реплікація ДНК здійснюється ДНК-залежними ДНК-полімеразами.

Субстратами і джерелами енергії для синтезу продукту служать 4 макроергічних з'єднання – дАТФ, дГТФ, дЦТФ і дТТФ, для активації яких необхідні іони магнію. Нейтралізуючи негативний заряд нуклеотидів, вони підвищують їх реакційну здатність.

Ферменти проявляють каталітичну активність тільки у присутності попередньо розкрученої матричної дволанцюгової ДНК. Синтез ланцюгів ДНК проходить у напрямку 5'→3' зростаючого ланцюга, тобто черговий нуклеотид приєднується до вільного 3'-ОН-кінця

попереднього нуклеотидного залишку. Синтезуемий ланцюг завжди антипаралелен матричному ланцюгу. У ході реплікації утворюються 2 дочірніх ланцюги, що представляють собою копії матричних ланцюгів.

У синтезі еукаріотичних ДНК беруть участь 5 ДНК-полімераз: α , β , γ , δ і ϵ . ДНК-полімерази розрізняють за кількістю субодиниць, молекулярній масі, асоціації з різними допоміжними білками, які прискорюють процес біосинтезу ДНК, і функціональному призначенню. ДНК-полімерази α , β , δ і ϵ беруть участь у синтезі ДНК в ядрі клітин, ДНК-полімераза γ – у реплікації мітохондріальної ДНК. ДНК-полімерази β , δ і ϵ не можуть ініціювати утворення дочірніх ланцюгів, так як не мають спорідненості до одиночної нитки ДНК.

Ініціює реплікацію ДНК-полімераза α , яка комплементарна певному сайту одноланцюгової ДНК. Приєднуючись до нього, ДНК-полімераза α синтезує невеликий фрагмент РНК-праймер, або РНК-затравку що складається з 8-10 рибонуклеотидів. ДНК-полімераза α складається з чотирьох субодиниць. Кожна з субодиниць ферменту виконує певну функцію: «впізнавання» сайту реплікації, синтез праймера (8-10 рибонуклеотидів) і синтез фрагмента ланцюга ДНК (близько 50 дезоксирибонуклеотидів). Таким чином, ДНК-полімераза α синтезує олігонуклеотид, що містить приблизно 60 н.з. Перші 8-10 представлені рибонуклеотидами (праймер), а решта – дезоксирибонуклеотидами. Олігонуклеотид, синтезований ДНК-полімеразою α , що утворює невеликий дволанцюговий фрагмент з матрицею, дозволяє приєднатися ДНК-полімеразі δ і продовжити синтез нового ланцюга в напрямку від 5'- до 3'-кінця по ходу розкручування реплікативної вилки. ДНК-полімераза δ послідовно нарощує ланцюг, крок за кроком приєднуючи до нього відповідні дезоксинуклеотиди. Вибір ДНК-полімеразою δ чергового нуклеотиду визначається матрицею. Включення дезоксирибонуклеозидмонофосфатів до зростаючого ланцюга ДНК супроводжується гідролізом макроергічних зв'язків відповідних нуклеозидтрифосфатів і відщепленням пірофосфату ($H_4P_2O_7$). Енергія макроергічних зв'язків витрачається на утворення 3',5'-фосфодієфірних зв'язків між останнім нуклеотидом зростаючого ланцюга ДНК і нуклеотидом, що приєднується. Включення нуклеотиду до синтезуемого ланцюга ДНК

неможливо без попереднього зв'язування азотистої підстави водневими зв'язками з комплементарним нуклеотидом матричного ланцюга. ДНК-полімерази (α , β , γ , δ і ϵ) можуть синтезувати нуклеотидний ланцюг лише в напрямку $5' \rightarrow 3'$, матричний ланцюг завжди зчитується в напрямку $3' \rightarrow 5'$.

В кожній реплікативній вилці йде одночасно синтез двох нових ланцюгів. Напрямок синтезу ланцюга ДНК збігається з напрямком руху реплікативної вилки лише для одного зі знову синтезованих ланцюгів (лідуючий ланцюг). На іншому матричному ланцюзі синтез дочірньої ДНК здійснюється двома ферментами: ДНК-полімеразою α і ДНК-полімеразою ϵ в напрямку $5' \rightarrow 3'$, але проти руху реплікативної вилки. Тому інший ланцюг синтезується преривисто, короткими фрагментами, які називають «**фрагментами Оказакі**» (були описані Рейджі Оказакі у 1968р.). Дочірній ланцюг ДНК, синтез якого відбувається фрагментами, носить назву відстаючого ланцюга. Кожен фрагмент Оказакі (приблизно 100 н.з.), містить праймер. Праймери видаляє ДНК-полімераза β , поступово відщеплюючи з 5'-кінця фрагменту по одному рибонуклеотиду. До ОН-групи на 3'-кінці попереднього фрагменту ДНК-полімераза β приєднує дезоксирибонуклеотиди в кількості, що дорівнює вирізаному праймеру і таким чином заповнює пролом, що виникає при видаленні рибонуклеотидів. Фермент ДНК-лігаза каталізує утворення фосфодієфірного зв'язку між 3-ОН-групою дезоксирибози одного фрагменту ланцюга ДНК і 5-фосфатом наступного фрагменту. Реакція протікає з витратою енергії АТФ. Таким чином, з безлічі фрагментів Оказакі утворюється безперервний ланцюг ДНК.

ДНК хромосоми людини містить приблизно 150 млн. п.н. Реплікація такої великої молекули зі швидкістю 50 нуклеотидів в хвилину йшла б приблизно 800 годин. Тому ініціація синтезу ДНК відбувається в декількох сайтах хромосоми, які називають **сайтами ініціації реплікації**, або **оріджинами (англ. origin – походження) реплікації (oriC)**.

Термін «сайт» використовують для позначення будь-якої ділянки геному. Оріджини реплікації мають певну нуклеотидну послідовність. Послідовність ДНК, обмежену двома оріджинами реплікації, називають одиницею реплікації,

або репліконом. На оріджинах за участю ДНК-топоізомерази I ініціюється двонаправлена реплікація. Утворюються дві реплікативні вилки, що переміщуються в протилежних напрямках до тих пір, поки не зустрінуться з наступним репліконом, тобто реплікація припиняється, коли зустрічаються дві реплікативні вилки.

Після завершення реплікації відбувається метилювання нуклеотидних залишків новостворених ланцюгів ДНК.

Метильні групи приєднуються до всіх залишків аденіну в послідовності -GATC-, при цьому утворюється N₆-метиладенін, а також можливе метилювання цитозину в послідовності -GC- та утворення N₅-метилцитозину. Кількість метилованих підстав дорівнює приблизно 1-8%. Модифікація відбувається за участю ферментів, відповідаючих за процес метилювання – ДНК-метилтрансфераз 1, 3a і 3b (DNMT1, DNMT3a і DNMT3b). Вони використовують в якості джерела метильних груп S-аденозилметіонін (SAM). DNMT1 є ДНК-метилтрансферазою, яка підтримує метилований стан ДНК, приєднуючи метильні групи до одного з ланцюгів ДНК в точках, де інший, комплементарний йому ланцюг, метилований. Білок DNMT3L є гомологічним іншим DNMT-білкам, але не має каталітичної активності. Замість цього, DNMT3L підтримує метилтрансферази, сприяючи зв'язуванню цих ферментів з ДНК і стимулюючи їх активність.

Приєднання метильних груп до залишків аденіну та цитозину не порушує комплементарності ланцюгів. Наявність метильних груп в ланцюгах ДНК необхідне для формування структури хромосом, а також для регуляції транскрипції генів. Протягом нетривалого часу в молекулі ДНК послідовності -GATC- метиловані по аденіну тільки в матричному, але не в новому ланцюгу. Ця різниця використовується ферментами репарації для виправлення помилок, які можуть виникати при реплікації.

Функція ДНК-метилювання до цих пір не повністю зрозуміла. За останні роки було запропоновано декілька версій ролі ДНК-метилювання: контроль експресії гена, контроль цілісності хромосоми, контроль пререкомбінантних подій. Гіпотезою про роль ДНК-метилювання в геномі є припущення про те, що

це захисний механізм проти вбудовування в геном "паразитних" послідовностей типу ретровірусних елементів.

Термінація реплікації. На кожному кінці хромосоми присутня специфічна нуклеотидна послідовність. Вона представлена численними повторами (сотні або навіть тисячі разів) олігонуклеотидів -GGGTTA-, які носять назву теломерної послідовності, або теломерної ДНК. Наявність теломер необхідно для завершення реплікації кінцевих інформативних послідовностей хромосом, тобто для зберігання генетичної інформації. Після завершення реплікації хромосоми 5'-кінці дочірніх ланцюгів ДНК недобудовані, тому що після видалення праймерів ці фрагменти виявляються недореплікованими. Це відбувається тому, що ДНК-полімераза β , яка відповідає за заповнення пролома, утвореного після видалення праймера, не може вести синтез ланцюга ДНК від 3'- до 5'-кінця. Таким чином, в ході кожного циклу реплікації 5'-кінці синтезованих ланцюгів скорочуються. Але такі втрати не представляють небезпечності для генетичної інформації хромосом, тому що вкорочення ДНК йде за рахунок теломер. Під час наступного циклу реплікації 5'-кінці ланцюгів ДНК знову залишаються недобудованими. Таким чином, з кожним клітинним поділом ДНК хромосом будуть послідовно зменшуватися. Скорочення теломер в більшості клітин в міру їх старіння – важливий фактор, що визначає тривалість життя організму. Проте в ембріональних та інших клітинах, що швидко поділяються втрати кінців хромосом недопустимі, тому що вкорочення ДНК буде відбуватися дуже швидко. В еукаріотичних клітинах є фермент теломераза (нуклеотиділтрансфераза), що забезпечує відновлення недореплікованих 5'-кінців.

До особливостей цього ферменту відносять присутність у якості простетичної групи РНК. Фрагмент РНК в активному центрі телорази служить матрицею при синтезі теломерних повторів хромосом. За допомогою РНК фермент комплементарно прикріплюється до 3'-кінця недобудованого дочірнього ланцюга ДНК. Теломераза за принципом комплементарності послідовно подовжує 3'-кінець ланцюга ДНК на один гексануклеотид

-GGGTTA-. Синтез завжди йде від 5'- до 3'-кінця. Потім теломераза зміщується по ланцюгу ДНК на один теломер і починає синтез нового фрагменту -GGGTTA-.

4.2. Репарація ДНК

Процес, що дозволяє живим організмам відновлювати пошкодження, що виникають в ДНК, називають **репарацією**. Всі репараційні механізми засновані на тому, що ДНК –дволанцюгова молекула, тобто в клітині є дві копії генетичної інформації. Якщо нуклеотидна послідовність одного з двох ланцюгів виявляється пошкодженою (зміненою), дані можна відновити, так як другий (комплементарний) ланцюг збережений.

Процес репарації відбувається в кілька етапів. На **першому етапі** виявляється порушення комплементарності ланцюгів ДНК. У ході **другого етапу** некомплементарний нуклеотид або тільки підстава усувається, на третьому і четвертому етапах йде відновлення цілісності ланцюга за принципом комплементарності. Однак у залежності від типу пошкодження кількість етапів і ферментів, які беруть участь у його усуненні, може бути різною.

Дуже рідко відбуваються ушкодження, які зачіпають обидва ланцюга ДНК, тобто порушення структури нуклеотидів комплементарної пари. Такі пошкодження в статевих клітинах не рапаруються, так як для здійснення складної репарації за участю гомологічної рекомбінації потрібна наявність диплоїдного набору хромосом.

Усі пошкодження ДНК поділяються на два типи:

- **спонтанні пошкодження;**
- **індукуємі пошкодження.**

Спонтанні пошкодження ДНК. Порушення комплементарності ланцюгів ДНК можуть відбуватися спонтанно, тобто без участі будь-яких пошкоджуючих факторів, наприклад в результаті помилок реплікації, депуринізації, дезамінування нуклеотидів.

Помилки реплікації. Точність реплікації ДНК дуже велика, але приблизно один раз на 10⁵-10⁶ н.з. відбуваються помилки спаровування, і

тоді замість пари нуклеотидів А-Т, G-C в дочірньому ланцюгу ДНК виявляються включеними нуклеотиди, некомплементарні нуклеотидам матричного ланцюга. Однак ДНК-полімерази δ і ϵ здатні після приєднання чергового нуклеотида у зростаючий ланцюг ДНК робити крок назад (в напрямку від 3'- до 5'-кінця) і вирізати останній нуклеотид, якщо він не комплементарний нуклеотиду в матричному ланцюгу ДНК. Цей процес виправлення помилок спаровування (чи корекція) інколи не спрацьовує і тоді в ДНК після закінчення реплікації залишаються некомплементарні пари, тим більше, що ДНК-полімераза α позбавлена коригуючого механізму та «помиляється» частіше, ніж інші полімерази.

При неправильному спаровування в первинній структурі дочірнього ланцюга ДНК незвичайні підстави не з'являються, порушена тільки комплементарність. Система репарації некомплементарних пар повинна відбуватися тільки на дочірньому ланцюгу і робити заміну некомплементарних підстав тільки в ньому. Ферменти, що беруть участь у видаленні неправильної пари нуклеотидів, розпізнають матричний ланцюг по наявності метилованих залишків аденіну в послідовностях -GATC-. Поки підстави нуклеотидних залишків в дочірньому ланцюгу неметиловані, ферменти повинні встигнути виявити помилку реплікації і усунути її.

Розпізнавання та видалення (**перший етап**) не комплементарного нуклеотиду відбувається за участю спеціальних білків mut S, mut L і mut H. Кожен з білків виконує свою специфічну функцію. Mut S знаходить неправильну пару і зв'язується з цим фрагментом. Mut H приєднується до метилованої (по аденіну) ділянки -GATC-, розташованій поблизу некомплементарної пари. Сполучним елементом між mut S і mut H служить білок mut L, його приєднання завершує утворення активного ферменту. Формування комплексу mut S, mut L і mut H на ділянці, що містить помилку, сприяє прояву у білка mut H ендонуклеазної активності. Ферментативний комплекс гідролізує фосфоефірний зв'язок в неметилованому ланцюгу.

До вільних кінців ланцюга приєднується екзонуклеаза (**другий етап**). Відщеплюючи по одному нуклеотиду в напрямку від 3'- до 5'-кінця дочірнього

ланцюга, вона усуває ділянку, що містить некоплементарну пару. Пролом забудовує ДНК-полімераза β (**третій етап**), з'єднання основної і знову синтезованої ділянок ланцюга каталізує фермент ДНК-лігаза (**четвертий етап**). Для успішного функціонування екзонуклеази, ДНК-полімерази β і ДНК-лігази необхідна участь у репарації хелікази і SSB-білків.

Депуринізація (апуринізація). ДНК кожної клітини людини втрачає за добу близько 5000 пуринових залишків внаслідок розриву N-глікозидного зв'язку між пурином і дезоксирибозою.

Тоді в молекулі ДНК на місці цих підстав утворюється ділянка, що позбавлена азотистих підстав. Вона носить назву **апуринового сайту**, або **АП-сайту** (англ. **apurinic site – AP-site**). Термін «АП-сайт» використовують також у тих випадках, коли з ДНК випадають піримідинові підстави і утворюються **апіримідинові сайти** (англ. **apurinic-apyrimidinic site**). Цей тип ушкоджень усуває фермент ДНК-інсртаза, який може приєднувати до дезоксирибози підставу у відповідності з правилом комплементарності. У цьому випадку немає необхідності розрізати ланцюг ДНК, вирізати неправильний нуклеотид і репарувати розрив.

Дезамінування. Реакції дезамінування цитозину та перетворення його в урацил, аденіну в гіпоксантин, гуаніну в ксантин відбуваються значно рідше, ніж депуринізація, і складають 10 реакцій на один геном на добу.

Виправлення цього виду спонтанного пошкодження відбувається в 5 етапів. У репарації приймає участь ДНК-N-глікозілаза, яка гідролізує зв'язки між аномальною підставою і дезоксирибозою (**перший етап**), в результаті утворюється АП-сайт, який розпізнає фермент АП-ендонуклеаза (**другий етап**). Як тільки в ланцюгу ДНК виникає розрив, в роботу вступає ще один фермент – АП-екзонуклеаза, який відщеплює від ланцюга дезоксирибозу, позбавлену підстави (**третій етап**). У ланцюгу ДНК з'являється пролом розміром в один нуклеотид. Наступний фермент ДНК-полімераза β до 3'-кінця розорваного ланцюга приєднує нуклеотид за принципом комплементарності (**четвертий етап**). Щоб з'єднати два вільних кінця (3'-кінець вбудованого нуклеотиду і 5'-

кінець основного ланцюга), потрібен ще один фермент – ДНК-лігаза (**п'ятий етап**).

Нерепаруємо і тому небезпечно дезамінування метилованого цитозину. Продукт його спонтанного дезамінування – тимін, нормальна для ДНК підстава, яка не розпізнається ДНК-N-глікозилазою.

Індуковані пошкодження ДНК. Індуковані пошкодження виникають в ДНК в результаті впливу різноманітних мутагенних факторів як хімічної, так і радіаційної природи.

Утворення димерів піримідинових підстав. Під дією УФО подвійний зв'язок між С5 і С6 атомами вуглецю в складі піримідинових підстав (тиміні і цитозині) може розриватися. Атоми вуглецю залишаються пов'язаними одним зв'язком. Відстань між паралельними площинами підстав полінуклеотидного ланцюга, у якому відбувся розрив, дорівнює приблизно 3,4 Å. Ця відстань дозволяє звільнившись валентностями між С-С атомами піримідинових підстав, розташованих послідовно в ланцюгу ДНК, сформувати циклобутанове кільце. У залежності від того, які підстави з'єднані в димер, їх називають димерами тиміну, цитозину або тимін-цитозиновими димерами.

Видалення піримідинових димерів відбувається під дією ферменту фотоліази.

Фотоліаза розщеплює зв'язки між сусідніми піримідиновими підставами, які тільки утворилися і відновлює нативну структуру. У фотоліазі є ділянка, або сама поглинаюча фотони (у синій частині спектру), або здійснююча зв'язування з кофакторами, адсорбуючими світло. Таким чином, світло активує фотоліазу, яка розпізнає димери в опроміненій ДНК, приєднується до них і розриває зв'язки, які виникли між піримідиновими кільцями. Після цього фермент відділяється від ДНК.

Пошкодження підстав ДНК хімічними мутагенами. А.п. в ДНК можуть піддаватися різноманітним пошкодженням: алкілуванню, окисленню, відновленню або зв'язуванню підстави з формамідними групуваннями. Репарація починається з приєднання ДНК-N-глікозилази до ушкодженої підстави. Існує безліч ДНК-N-глікозилаз, специфічних до різних

модифікованих підстав. Ферменти гідролітично розщеплюють N-глікозидний зв'язок між зміненою підставою і дезоксирибозою, це призводить до утворення АП-сайту в ланцюгу ДНК. Репарація АП-сайту може відбуватися або тільки при участі ДНК-інсертази, яка приєднує до дезоксирибози підставу у відповідності з правилом комплементарності, або за участю всього комплексу ферментів, які беруть участь у репарації: АП-ендонуклеази, АП-екзонуклеази, ДНК-полімерази і ДНК-лігази.

4.3. Рекомбінація ДНК

Генетична рекомбінація – це перерозподіл генетичного матеріалу (ДНК), що приводить до виникнення нових комбінацій генів. Рекомбінація може відбуватися шляхом обміну клітинними ядрами, цілими молекулами ДНК або частинами молекул. У той час як процеси реплікації та репарації ДНК забезпечують відтворення і збереження генетичного матеріалу, рекомбінація призводить до генетичної мінливості. Рекомбінація відбувається при репарації двунітевих розривів в ДНК і для продовження реплікації в разі зупинки реплікаційної вилки.

Виділяють три типи рекомбінації:

- **загальна (гомологічна);**
- **сайт-специфічна;**
- **випадкова (не гомологічна).**

Загальна рекомбінація відбувається, як правило, між протяжними ділянками ідентичних або гомологічних н.п. Її часто називають **гомологічною рекомбінацією** або **кросинговером**. При загальній рекомбінації відбувається розрив двох гомологічних ділянок ДНК, і кожен з кінців одного сегменту з'єднується з відповідними кінцями іншого таким чином, що обидві молекули, що утворилися, містять різні фрагменти обох ДНК, які приймають участь в рекомбінації. Сайти, за якими відбуваються розрив і з'єднання кожного з двох ланцюгів, дуже часто не збігаються. Розрізняють одинарний і подвійний кросинговери.

Звичайно загальна рекомбінація відбувається між гомологічними і алельними ділянками різних молекул ДНК, але вона може відбутися і між гомологічними, але неалельними областями рекомбінуємих молекул. У цьому випадку один з продуктів рекомбінації втрачає частину ДНК, а інший набуває «зайвий» сегмент. Такий процес отримав назву нерівного кросинговеру.

Іноді рекомбінація відбувається між неалельними ділянками однієї і тієї ж хромосоми (наприклад, між повторюваними послідовностями ДНК) з відповідною втратою ділянки, що лежить між сайтами рекомбінації.

На відміну від уже розглянутих випадків деякі рекомбінаційні події нереципрокні. Як наслідок, один з утворених продуктів є ідентичним однієї з вихідних молекул, а інший відрізняється від обох партнерів. Такий процес часто називається генною конверсією.

Рекомбінація називається сайт-специфічною, якщо сайти разриву і з'єднання у двох рекомбінуємих молекулах або двох фрагментах однієї і тієї ж молекули ДНК знаходяться в межах досить коротких специфічних гомологічних нуклеотидних послідовностей, як правило, не більше 25 нуклеотидів. Такі короткі послідовності може мати тільки один з партнерів, або обидва. Як приклад першого варіанту можна привести транспозиції деяких мобільних елементів у еу- і прокариот, а другого – процес інтеграції-вищеплення ДНК фага λ з хромосоми *E. Coli*. Мабуть, загальна рекомбінація між будь-якими парами гомологічних послідовностей здійснюється за допомогою одного і того ж комплексу ферментів, з іншого боку, для кожного випадку сайт-специфічної рекомбінації необхідний свій набір ферментів.

Рекомбінація між негомологічними нуклеотидними послідовностями (негомологічна рекомбінація) відбувається вельми часто. До негомологічної рекомбінації можна віднести процес випадкового вбудовування вірусної або плазмідної ДНК у ДНК клітин тварин, в результаті чого в реплікуючихся геномах паповавірусів з'являється безліч делецій і дуплікацій. Кінці розірваної ДНК можуть з'єднатися, навіть якщо вони негомологічні. В деяких випадках рекомбінація відбувається між послідовностями, що містять кілька

гомологічних п.п., або між короткими частково гомологічними ділянками. Але, як правило, рекомбінуємі сегменти не мають гомологічних послідовностей.

Щоб могла відбутися гомологічна рекомбінація між подвійними спіралями, кожен з чотирьох ланцюгів повинен бути розірван і потім з'єднан з новим партнером. Відповідні ланцюги обох лінійних гомологічних дуплексів ДНК надрізаються і вільні кінці однієї спіралі спаровуються з комплементарними ділянками іншої. перехрест стабілізується зшиванням кінців донорних ланцюгів з вільними кінцями реципієнтної спіралі. Точка перехреста ланцюгів, що обмінюються, переміщається уздовж спіралей – процес, називаємія міграцією гілки. При цьому відбувається одночасна розбіжність ланцюгів вихідних спіралей та їх реасоціація з новими партнерами з утворенням дочірніх дуплексів. Структури, що при цьому утворюються називаються структурами Холідея, а дана модель гомологічної рекомбінації – моделлю Холідея (на ім'я британського генетика Робіна Холідея, який вперше запропонував цю модель у 1964 р.).

Структури Холідея можуть переходити в рекомбінантні подвійні спіралі шляхом внесення розриву і з'єднання ланцюгів двома альтернативними способами. Один спосіб полягає в розрізанні і з'єднанні перехрещуючихся ланцюгів. Два реципрокні продукти можуть утворитися, якщо розрив і подальше з'єднання ланцюгів відбудуться в точці перехрещення в структурах або по лінії перетину чотирьох ланцюгів в ізомерній структурі Холідея. Розмір фрагментів, що обмінюються залежить від відстані, на яку відбулася міграція гілки до акту рекомбінації. В основі рекомбінації даного типу лежить гомологічне спаровування ланцюгів, що належать двом різним спіралям ДНК, тому швидше за все вона відбудеться в тому місці, де таке спаровування можливо а ріогі і де гомологічна послідовність досить велика, щоб могла відбутися міграція гілки в рамках структури з ланцюгами, що схрестилися.

У ході міграції гілки при паруванні ланцюгів, що належать різним спіралям, утворюються гетеродуплекси. У таких гетеродуплексах в межах сегменту між сайтом початку утворення структури Холідея і сайтом кросинговеру може утримуватися по одній чи більше помилково спарених

підстав. Вони видаляються так само, як будь-які модифіковані підстави при репарації ДНК. Однак, оскільки видалення може бути будь-яким через помилково спарені підстави, в обох рекомбінантних спіралях в даному сайті можуть виявитися однакові п.п., тобто рекомбінація для цього сайту виявиться реципрокною. Таким чином, кожна з рекомбінантних спіралей може бути схожа на будь-який з початкових дуплексів у тих позиціях, де початково вони розрізнялися.

Альтернативний механізм спільної рекомбінації включає утворення дволанцюгового розриву в одному з дуплексів-партнерів. Далі за допомогою екзонуклеаз в місці розриву утворюється пролом. При паруванні 3'-одноланцюгового кінця пролому з комплементарним ланцюгом інтактної спіралі в останній утворюється петля.

Розмір цієї петлі збільшується у міру того, як ДНК-полімераза нарощує 3'-кінець ланцюга, що «вклинився». У підсумку другий одноланцюговий кінець пролома спаровується з комплементарною послідовністю в петлі, що переміщується. У результаті такого спаровування утворюється система «праймер- матриця », і ДНК-полімераза синтезує недостаючий ланцюг, заповнюючи пролом. Лігування двох зростаючих кінців з вихідними ланцюгами призводить до утворення подвійної структури Холідея (тобто структури, в якій дві спіралі об'єднані двома перехрестями, по одному на кожному кінці пролому).

Міграція гілки в одному або обох перехрестях пересуває обидва місця зчеплення в будь-якому напрямку, при цьому в ділянках, що фланкують пролом, можуть виникати помилки. Поділ таких структур може йти двома способами – з перехрестям і без нього, з утворенням чотирьох дуплексів.

Утворення помилкових пар (гетеродуплексів) в районах, що фланкують пролом, зумовлює набуття як реципрокних, так і нерципрокних рекомбінацій між генетичними маркерами. Якщо дволанцюжковий розрив відбувається поблизу (або в межах) ділянки, де між спіралями є відмінності (заміни підстав, делеції, інверсії, інсерції, і т.п.), то рекомбінанти успадкують нуклеотидну послідовність партнера, у якого розриву не відбувалося.

Нереципрокна загальна рекомбінація використовується і при репарації деяких пошкоджень ДНК. Наприклад, якщо тимінові димери не були видалені з УФ-опроміненої ДНК до того, як до них підійшла реплікативна вилка, то синтез комплементарного ланцюга в цій ділянці не може бути завершений. Оскільки тимінові димери, що знаходяться навпроти пролomu, не можуть бути вищеплені, залишається один шлях для порятунку хроматиди –використати генетичну інформацію гомологічної сестринської хроматиди і заповнити пролом. Для цього застосовується такий же механізм, як для репарації проломів.

У загальній рекомбінації беруть участь два специфічних ферменти і ще кілька ферментів, які каталізують також процеси реплікації і репарації ДНК.

Один зі специфічних ферментів, необхідних для успішної гомологічної рекомбінації, називається *recA*-білком. Він каталізує обмін одиночними ланцюгами, використовуючи енергію гідролізу АТФ до АДФ і неорганічного фосфату. *RecA*-залежне впровадження одноланцюгових ДНК до дуплексу – перший етап рекомбінаційних процесів у рамках обох схем Холідея та механізму з утворення дволанцюгових розривів.

Другий фермент, що складається з трьох окремих субодиниць (В, С і D) і тому називається *recBCD*-нуклеазою, володіє ендо- і екзонуклеазною, а також геліказною активностями. Механізм його дії до кінця не встановлений, однак відомо, що *recBCD*-нуклеаза індукуює розриви в дуплексній ДНК і завдяки притаманній їй геліказній активності разом з *recA* ініціює рекомбінаційний процес.

Ідентифіковано також фермент, який розрізає вузли в структурах Холідея. За його участю утворюються липкі кінці, що з'єднуються лігазою.

У загальній рекомбінації беруть участь також гелікази і SSB-білки, що зв'язуються з одноланцюговою ДНК. Обидва вони необхідні для забезпечення процесу міграції гілки.

Як відомо, переміщенню ланцюгів під час міграції гілки сприяє Pol I, а у з'єднанні розірваних ланцюгів бере участь ДНК-лігаза. Для зняття топологічних

обмежень при розкручуванні спіралі і для розплутування перекручених структур, мабуть, потрібні ферменти топоізомераза типу І і, можливо, гіраза.

Контрольні питання

1. У чому полягає процес реплікації ДНК?
2. На скільки етапів поділяється реплікація? Перерахуйте ці етапи.
3. Що відбувається під час ініціації реплікації?
4. Які зміни відбуваються під час елонгації реплікації.
5. Що таке оріджини реплікації?
6. Для чого потрібно метилювання ДНК?
7. Як відбувається метилювання ДНК?
8. Опишіть принцип роботи теломерази.
9. Яку назву носить процес, що дозволяє живим організмам відновлювати пошкодження, що виникають в ДНК?
10. На які типи поділяються пошкодження ДНК. Що це за типи?
11. У чому полягають помилки реплікації і як вони усуваються?
12. Які етапи дезамінування Ви знаєте?
13. Що представляють собою індуквані пошкодження ДНК?
14. Що таке генетична рекомбінація?
15. Які типи рекомбінації виділяють?
16. У чому полягає кросинговер?
17. Які види кросинговеру Вам відомі?
18. Опишіть генну конверсію.
19. Як відбувається внутрішньомолекулярна рекомбінація?
20. Опишіть модель гомологічної рекомбінації Холідея.

Глава 5. Експресія генетичного матеріалу

Експресія генів – це процес, в ході якого спадкова інформація від гена перетворюється на функціональний продукт – РНК або білок.

5.1. Біосинтез білка

Біосинтез білка – складний багатостадійний процес синтезу поліпептидного ланцюга з амінокислотних залишків, що відбувається на рибосомах клітин живих організмів за участю молекул м- і тРНК.

Біосинтез білка можна розділити на стадії транскрипції, процесингу та трансляції.

5.1.1. Транскрипція

Транскрипція – це процес синтезу РНК з використанням ДНК в якості матриці. Транскрипція є першою стадією реалізації генетичної інформації в клітині. У ході процесу транскрипції утворюються молекули мРНК, які служать матрицею для синтезу білків, а також транспортні, рибосомальні та інші види молекул РНК, що виконують структурні, адапторні та каталітичні функції.

Транскрипція у еукаріотів відбувається в ядрі. В основі механізму транскрипції лежить той же структурний принцип комплементарного спаровування підстав у молекулі РНК ($G=C$, $A=U$ і $T=A$). ДНК служить тільки матрицею і в ході процесу транскрипції не змінюється. Рибонуклеозидтрифосфати (АТФ, ГТФ, ЦТФ і УТФ) – субстрати і джерела енергії, необхідні для протікання полімеразної реакції, утворення 3',5'-фосфодіефірного зв'язку між рибонуклеозидмонофосфатами.

Синтез молекул РНК починається в визначених послідовностях (сайтах) ДНК, які називають промотори, і завершується у термініючих ділянках (сайти термінації). Ділянка ДНК, обмежена промотором і сайтом термінації, являє собою одиницю транскрипції – **транскриптон**. У еукаріотів до складу транскриптону, як правило, входить один ген, а у прокаріотів декілька.

У кожному транскриптоні присутня неінформативна зона, яка містить специфічні послідовності нуклеотидів, з якими взаємодіють регуляторні транскрипційні фактори.

Співвідношення інформативної та неінформативної частин у транскриптонах еукаріотів становить у середньому 1:9, а у прокаріотів – 9:1.

Сусідні транскриптони можуть бути відділені один від одного нетранскрибуємими ділянками ДНК. Поділ ДНК на безліч транскриптонів дозволяє здійснювати з різною активністю індивідуальне зчитування (транскрипцію) різних генів.

У кожному транскриптоні транскрибується тільки один з двох ланцюгів ДНК, який називається матричним, другий, комплементарний йому ланцюг, називається кодуєчим. Синтез ланцюга РНК йде від 5'- до 3'-кінця, при цьому матричний ланцюг ДНК завжди антипаралелен синтезуємії нуклеїновій кислоті.

Транскрипція не пов'язана з фазами клітинного циклу. Вона може прискорюватися і сповільнюватися в залежності від потреби клітини або організму в певному білку.

Біосинтез РНК здійснюється ДНК-залежними РНК-полімеразами. У ядрах еукаріотів виявлено 3 спеціалізовані РНК-полімерази: РНК-полімераза I, яка синтезує пре-рРНК; РНК-полімераза II, відповідальна за синтез пре-мРНК; РНК-полімераза III, яка синтезує пре-тРНК. РНК-полімерази представляють собою олігомерні ферменти, що складаються з декількох субодиниць – 2α , β , β' і σ . Субодиниця σ виконує регуляторну функцію, це один з факторів ініціації транскрипції. РНК-полімерази I, II і III, впізнають різні промотори. Вони містять різні за будовою субодиниці σ .

Транскрипційні фактори. Транскрипційні фактори або фактори транскрипції (ТФ) – це білки або білкові комплекси, які взаємодіють з певними регуляторними сайтами і прискорюють або сповільнюють процес транскрипції.

Після переміщення ТФ в ядро клітини, вони специфічно взаємодіють з ДНК, або стехіометрично взаємодіють з іншим білком, який може утворювати специфічний до послідовності ДНК комплекс «білок-ДНК».

ТФ безпосередньо не беруть участь в каталітичному акті утворення РНК, але необхідні для проходження основних етапів транскрипції і її регулювання.

В рамках такого визначення білки типу hsp90, що утримують транскрипційні фактори в цитозолі, виключаються з розгляду як ТФ. Регуляторні ферменти, які здійснюють свій вплив за допомогою каталітичної активності, а не через стехіометричні взаємодії, також не повинні розглядатися як ТФ. Нарешті, не відносяться до транскрипційних факторів і такі ДНК-зв'язуючі білки, як гістони, для яких характерний низький рівень специфічності при взаємодії з ДНК. Що стосується групи ядерних білків HMG, то вони містять як білки, що неспецифічно зв'язуються з ДНК (HMG 1 і HMG 2), так і реальні ТФ сімейств SRY або Sox.

За функціональною ознакою прийнято розрізняти три класи факторів транскрипції:

- до першого класу відносяться основні фактори транскрипції, що забезпечують нерегульований базальний рівень транскрипції і функціонують в клітинах всіх типів;
- до другого класу відносяться фактори транскрипції, що специфічно взаємодіють з певними послідовностями ДНК, які є основними регуляторами транскрипції і забезпечують тканеспецифічну експресію генів;
- третій клас ТФ (у тому числі численні ТАФ-білки (англ. ТАВ-associated factors)) представлений білками-коактиваторами транскрипції, які діють узгоджено з основними і тканеспецифічними факторами, забезпечуючи більш тонку регуляцію транскрипції.

ТАФ-фактори відрізняються від основних факторів і активаторів транскрипції. Після клонування генів ТАФ-факторів та очищення кодованих цими генами білків з'ясувалося, що ТАФ-білки забезпечують фізичну взаємодію між активаторами транскрипції та основними факторами, оскільки вони мають здатність зв'язувати білки обох груп. Ті ж функції властиві SRB-білкам

дріжджів. Таким чином, коактиватори транскрипції є білками-адаптерами, що забезпечують перенесення регуляторного сигналу від тканеспецифічних білків-активаторів транскрипції до РНК-полімерази II.

ТФ, що зв'язуються з ДНК, можуть впливати на транскрипцію генів через кілька механізмів:

- у більшості вивчених до теперішнього часу випадків ТФ стимулюють формування комплексу преініціації на ТАТА-боксі – ініціаторному елементі за рахунок взаємодії їх трансактивуючих доменів з компонентами базального транскрипційного комплексу (або безпосередньо, або через коактиватори/медіатори);
- деякі ТФ викликають зміни структури хроматину, роблячи його більш доступним для РНК-полімераз;
- інші ТФ є допоміжними, створюючи оптимальну конформацію ДНК для дії інших транскрипційних факторів;
- відомі ТФ, які пригнічують транскрипцію за рахунок безпосередньої дії своїх інгібуючих доменів, або порушуючи спільне функціонування комплексу транскрипційних факторів всередині регуляторної області гена (промотора або енхансера);
- нарешті, є ТФ, які самі не зв'язуються з ДНК, а об'єднуються в більш складні комплекси за допомогою білок-білкових взаємодій.

Специфічність взаємодії транскрипційних факторів з розпізнаваними ними регуляторними послідовностями генів визначається переважно особливостями їх **ДНК-зв'язуючих доменів (ДЗД)**. Багато факторів зв'язуються з ДНК у вигляді димерів (мультимерів), і склад цих комплексів також може впливати на специфічність зв'язування з ДНК.

Пропонована класифікація транскрипційних факторів спирається на сукупність властивостей їх ДЗД. В деяких випадках враховуються і особливості димеризаційних доменів ТФ. Таким чином, основні підрозділи класифікації визначаються виходячи з функціональних і структурних критеріїв. Один з нижчих рівнів ієрархії задається генами, що кодують транскрипційні фактори, а найнижчий відповідає різним білкам, що утворюється при альтернативному

сплайсингу однієї пре-мРНК. Запропонована класифікація дозволяє приписати окремому транскрипційному фактору десятковий класифікаційний код, що відповідає його приналежності до певної групи ТФ. Два білка різних біологічних видів при наявності вираженої функціональної або структурної гомології розглядаються в рамках запропонованої класифікації як один і той же фактор. Однак часто буває важко або навіть неможливо встановити відносини подібності між транскрипційними факторами, походження яких сильно різняться, наприклад, білками хребетних і комах. Тому в більшості випадків ТФ хребетних, комах, вищих рослин і грибів приписуються в цій класифікації до різних груп.

Відповідно до запропонованої схеми все ТФ за ключовими особливостями ДЗД розділені на чотири наступних суперкласи:

- суперклас 1: фактори, ДЗД яких збагачений позитивно зарядженими амінокислотними залишками (англ. basic domain, 284 чинника);
- суперклас 2: фактори, у яких ДЗД домен формується за участю координованих іонів цинку (англ. zinc-coordinated DNA-binding domain, 148 чинників).
- суперклас 3: фактори, що мають ДНК-зв'язуючий мотив типу спіраль-поворот-спіраль (англ. helix-turn-helix DNA binding motif, 369 чинників);
- суперклас 4: фактори, у яких поверхня, що контактує з ДНК, представлена у вигляді складним чином організованого скефолда з бета-ниток. Контакти з ДНК в цьому випадку здійснюються по малій борозенці (англ. beta-scaffold factors with minor grooves contacts, 156 чинників).

Існує також велика група транскрипційних факторів з невідомою в даний час структурною організацією ДЗД, які належать до умовного суперкласу 0.

Найменування більш низьких рівнів класифікації обрані довільним чином (за аналогією з класифікацією біологічних видів). По-перше, у відповідності з основними структурними характеристиками ДЗД визначені певні класи. Ці класи є загальноприйнятими в літературних джерелах. Вони використані в базі даних TRANSFAC і описані там у таблиці CLASS. У більшості випадків приналежність якого-небудь ТФ до певного класу, зазначена в класифікації, не

викликає сумнівів. За останні роки відбулося лише кілька змін в розбитті факторів на рівні класів, найбільш крупним з яких є об'єднання ТФ типів Myb і Ets в загальний клас чинників, що мають триптофановий кластер.

У більшості класів поділ на групи цілком очевидний. Так, усередині класу bZIP фактори типів AP-1, CREB, і C/EBP віднесені до окремих родин, що зумовлено, в першу чергу, відмінностями у формуванні ДНК-білкових комплексів. У багатьох родинах класифікація може бути продовжена шляхом поділу сімейства на підродини. При побудові коду класифікації кожній підродині, що входить до складу сімейства, приписується певний номер. При цьому цифра «0» використовується нарівні зі значущими цифрами (1, 2, ...) для тих факторів, які поки не можуть бути приписані до якої-небудь з відомих підродин. Проте, в ряді випадків розподіл на підродини не має сенсу (в першу чергу при наявності обмеженого набору чинників). Таким чином, четвертий рівень класифікації (підродина) є необов'язковим.

Загальне число регуляторних білків становить кілька тисяч. Кожному фактору відповідає п'ятизначний цифровий код, перша цифра якого відноситься до суперкласу, друга – до класу, третя – до сімейства, четверта – до підродини, п'ята є видовою характеристикою фактора.

Більшість ТФ мають модульну будову і можуть містити:

- ДЗД;
- димеризаційний (олігомеризаційний) домен. Багато факторів зв'язуються з ДНК у вигляді димерів, а деякі у вигляді комплексів більш високих порядків. У більшості випадків відповідає за це домен функціонально об'єднаний з ДЗД;
- транс-активууючий або транс-репресуючий домен, який часто характеризується підвищенням вмістом певних амінокислотних залишків. Наприклад, для активаційних доменів властива збагаченість глутаміном, проліном, серином/треоніном або залишками кислих амінокислот;
- модулюючу область, яка часто є мішенню для модифікуючих ферментів, здебільшого протеїнкінази;
- ліганд-зв'язуючий домен.

Якщо гістонові білки переважно регулюються ацетилюванням-деацетилюванням, то негістонові – фосфорилуванням-дефосфорилуванням. Грає також роль метилювання-деметилювання і АДФ-рибозилування. Формування (конденсація) хромосом пов'язана з фосфорилуванням гістонів, а посилення транскрипції – з ацетилюванням в них залишків лізину.

Ядерні рецептори – це негістонові білки, що представляють собою ДНК-зв'язуючі транскрипційні фактори з консервативною доменною організацією, активність яких контролюється ліпофільними лігандами, фосфорилуванням і взаємодіями з іншими білками. Більшість ядерних рецепторів локалізовано (незалежно від наявності ліганда) майже виключно в клітинному ядрі, тоді як основна частина рецепторів стероїдів за відсутності ліганду може знаходитися в цитоплазмі. Незалежно від типу рецептора відповідний ліганд викликає внутрішньоядерний перерозподіл рецепторів між нуклеоплазмою і хроматином. Лігандами ядерних рецепторів є глюкокортикоїди, мінералокортикоїди, прогестерон, андрогени, естроген, екдізон комах, 25-гідроксіхолестерін, тироксин, ретиноева кислота з вітаміну А, кальційтріол з вітаміну Д, ейкозаноїди, мелатонін. Після взаємодії ліганда з рецептором, утворений транскрипційний фактор пов'язується в ДНК або з промотором гена (близько 100 нуклеотидів; має ділянки зв'язування білків-регуляторів і ДНК-залежної РНК-полімерази 2, має блоки-поватори ТАТА, СААТ і GC, промотор є асиметричним), або з енхансером, активуючим експресію групи генів (близько 1000 не тільки в своїй хромосомі; впливає через спеціальні білки, що впливають на промотори) або з сайленсером, інгібуючим експресію групи генів.

Білок сиртуїн (7 видів) проводить деацетилювання білків-гістонів, що впливає на посилення пакування і конденсацію хроматину, що в свою чергу впливає на транскрипцію. Сиртуїн SIRT6 грає роль в гомологічній рекомбінації (HR, форма репарації двохниткових розривів за участю гомологічних хромосом) шляхом деацетилювання і стабілізації репараційних ферментів CtIP і DNA-PCs. Делеція SIRT6 у мишей призводить до скорочення тривалості життя і розвитку синдрому прискороного старіння. Сиртуїн SIRT1 активується

фосфодіестеразою-4, яку в свою чергу активує ресвератрол (фенол зі шкірки червоного винограду).

Фермент полі (АДФ-рибоза) полімераза (англ. Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP-1) рибозилує білки за участю НАД, що призводить до утворення нікотинаміду інгібуючого сиртуїн. PARP-1 є регулятором NHEJ, BER, а також бере участь у підтримці довжини теломер. Виявлена позитивна кореляція між активністю PARP-1 в мононуклеарних клітинах крові і тривалістю життя 13 видів ссавців і людини.

NF-κB – транскрипційний фактор, що активується активними формами кисню, а також введенням в клітку фенобарбіталу або проліфератором пероксидом. Активація відбувається опосередковано, оскільки прямий вплив активних форм кисню на очищений NF-κB не впливає на нього. Активація NF-κB, викликана УФО або TNF-альфа, може здійснюватися як за тим же шляхом, що й активація c-jun: через gas-raf-MAPKK сигнальний шлях, так і через TNF-альфа-рецептор. NF-κB контролює утворення багатьох факторів росту та потрібен для нормальної проліферації стовбурових клітин. Оскільки транскрипційні фактори NF-κB і c-jun можуть активуватися за загальним шляхом, то не виключено існування якогось невідомого рецептора активних форм кисню, який приводить в дію c-src, запускаючи каскад кіназних реакцій. Можливо, що активація невідомого рецептора пов'язана зі зміною співвідношення SH- і SS-груп. На користь цього свідчать дані, що введення N-ацетил-цистеїну, сполуки, що збільшує рівень відновленого глутатіону в клітині, запобігає активації MAP-кіназ, викликаній H₂O₂.

PPAR є ліганд-індуцибельними транскрипційними факторами, які належать до надсімейства ядерних рецепторів гормонів. Зв'язуючись з ретіноїдними рецептором X в якості партнера, вони запускають транскрипцію генів, що містять особливу послідовність ДНК, яка називається PPRE (англ. Peroxisome Proliferator Response Element). В якості лігандів PPAR виступають ЖК або їх похідні. PPARa експресується в тканинах, де потрібен високий рівень мітохондріального окислення ЖК, тобто в печінці, нирках, серці, скелетних м'язах і стінці судин. Він активується ЖК, ейкозаноїдами, 15-d

простагландином, окисленими ЖК. Він регулює експресію генів, що сприяють окисленню ліпідів і ліпопротеїнів метаболізму (наприклад, головного аполіпопротеїну високої щільності Apo A-1). Таким чином, PPAR α протидіє метаболічному синдрому і старінню в цілому.

При пошкодженні клітин різних органів і тканин, незалежно від причин цього пошкодження, відбувається дуже швидка неспецифічна активація ряду генів (*c-fos* та *c-jun* дають білки, які об'єднуються в активуючий протеїн – AP-1, який впізнає послідовність TGACTCA, *c-myc* і *myb77* – кодують рецептор глюкокортикоїдів), які були умовно об'єднані під назвою «негайні гени предранньої реакції». Їх продукти являються протоонкогенами і проапоптозними факторами.

Активація гена *c-jun* може реалізуватися через різні шляхи передачі мітотичного сигналу, в тому числі через послідовний ланцюг фосфокіназних реакцій, учасниками якої є продукти генів *c-src*, *c-ras*, *c-raf*, *MAPKK*, *MAPK/ERK (MEK)*. Активні форми кисню опосередковано активують функції білків цих генів. У клітинах з мутаціями в генах *c-src*, *c-ras* або *c-raf* активні форми кисню нездатні активувати транскрипційний фактор *c-jun*.

Ген *c-myc* кодує білок, що зв'язується з ДНК і є фактором транскрипції. Продукт гена *c-myc* регулює експресію до 15% всіх генів, зв'язується через енансерні послідовності (англ. E-boxes) і посилює активність ацетилтрансферази гістонів. Мутантні версії гена *myc* (протоонкоген) виявлені в багатьох пухлинах, при цьому ген експресується постійно, що призводить до порушення регуляції багатьох генів, в тому числі, відповідальних за проліферацію клітин.

Ras – це сімейство генів, а також білки, які вони кодують – так звані малі G-білки (малі ГТФ-ази), які є мембранозв'язувальними білками, що беруть участь в передачі сигналу в аденілатциклазній і кальцієвій месенджерних системах. Вони регулюють розмноження клітин. Деякі мутації можуть призводити до постійної активації Ras, що порушує регуляцію поділу клітин. Помилки в регуляції Ras можуть привести до зростання пухлини і метастазування. Дійсно, в 20-25% пухлин людини виявлено мутації в гені *Ras*,

що підвищують його активність, а в деяких типах пухлин ця цифра доходить до 90%. Суперсімейство білків Ras являє собою малі ГТФази і включає в себе Ras, Rho, Arf, G-білок Rab і Ran (всього близько 100 білків).

Ген *c-src* кодує білки – нерцепторні тирозинпротеїнкінази ссавців. У хребетних відомі дев'ять кіназ Src-сімейства: Src, Yes, Fgr, Fyn, Lyn, Hck, Lck, Blk та Frk. Всі вони активуються активними формами кисню.

p53 (білок p53) – це транскрипційний фактор, що регулює клітинний цикл. p53 виконує функцію супресора утворення злоякісних пухлин, відповідно ген *TP53* є антионкогеном. Мутації гена *TP53* виявляються в клітинах близько 50% ракових пухлин. Найчастіше його називають «зберігачем або вартовим геному» (англ. Guardian of the genome). Свою назву білок отримав за молекулярну масу, яка була визначена по його руху в ПААГ – 53 кДа. Реальна молекулярна маса білка становить 43,7 кДа. Похибка в первісному визначенні молекулярної маси викликана наявністю безлічі залишків проліну в складі p53, які уповільнюють рух білка в гелі. Ген людини, що кодує білок p53, називається *TP53*. Хромосомна локалізація гена – 17p13.1. Людський білок p53 складається з 393 амінокислотних залишків і має 5 доменів:

- N-кінцевий домен, який активує транскрипцію (англ. transcription-activation domain – TAD), амінокислотні залишки 1-42;
- багатий проліном домен, важливий для апоптотичної активності p53, амінокислотні залишки 80-94;
- ДЗД («цинковий палець»), амінокислотні залишки 100-300;
- домен, відповідальний за олігомеризацію (тетрамеризація дуже важлива для активності p53 *in vivo*), амінокислотні залишки 307-355;
- C-кінцевий домен, задіяний у від'єднанні ДЗД від ДНК, амінокислотні залишки 356-393.

Мутації, інактивуючі p53 при онкологічній трансформації, зазвичай зачіпають ДЗД. Ці мутації призводять до нездатності білка p53 зв'язуватися з ДНК і, отже, виконувати функцію активатора транскрипції. Такі мутації звичайно є рецесивними. У разі мутацій в домені, що відповідає за олігомеризацію, мутантний білок часто здатний утворювати димери з білком

дикого типу, інактивуєчи його. Такі мутації є доміантними. Білок p53 є продуктом гена-супресора пухлини *TP53* і експресується у всіх клітинах організму. При відсутності ушкоджень генетичного апарату білок p53 знаходиться в неактивному стані, а при появі пошкоджень ДНК активується. Активація полягає в придбанні здатності зв'язуватися з ДНК і активувати транскрипцію генів, які містять у регуляторній області нуклеотидну послідовність, яка називається p53-response element (ділянка ДНК, з якою зв'язується білок p53). Таким чином, p53 – фактор, який запускає транскрипцію групи генів і який активується при накопиченні пошкоджень ДНК. Результатом активації p53 є зупинка клітинного циклу і реплікації ДНК, при сильному стресовому сигналі – запуск апоптозу. Білок p53 активується при ушкодженнях генетичного апарату, а також при стимулах, які можуть привести до подібних пошкоджень, або є сигналом про несприятливий стан клітини (стресовий стан). Функція білка p53 полягає у видаленні з пулу реплікуючих клітин тих клітин, які є потенційно онкогенними (звідси образна назва білка p53 – зберігач геному). Це подання підтверджується тим фактом, що втрата функції білка p53 може бути встановлена в ~ 50% випадків злоякісних пухлин людини. У регуляції активності білка p53 провідна роль належить посттрансляційним модифікаціям білка і його взаємодій з іншими білками. Активація білка p53 відбувається у відповідь на численні стресові стимули, такі як безпосередні пошкодження ДНК (класичний стимул), пошкодження апарату сегрегації генетичного матеріалу (наприклад, мітотичного веретена), зменшення концентрації вільних рибонуклеотидів, гіпоксія, тепловий шок, висока концентрація NO (монооксиду азоту), іонізуюче випромінювання. У швидко проліферуючих клітинах було виявлено збільшення концентрації білка p53 в порівнянні з клітинами, що поділяться повільно. Значення збільшення концентрації p53 в даному випадку полягає в тому, що клітини, які швидко реплікують ДНК, більш схильні до виникнення пошкоджень генетичного апарату, ніж, наприклад, непроліферуючі клітини у фазі G0. Отже, збільшення концентрації p53 – це підготовка клітини для швидкої реакції на можливе виникнення пошкоджень ДНК. Очевидно, що для зупинки клітинного циклу в

умовах стимуляції проліферації позаклітинними ростовими факторами потрібна вища концентрація p53, ніж в умовах фази G0. Внаслідок суворого посттрансляційного контролю активації білка p53, висока концентрація білка p53 сама по собі не веде до його активації. Концентрація білка p53 збільшується в результаті зняття інгібування трансляції його мРНК. Придушення трансляції відбувається в результаті зв'язування регуляторних білків з послідовностями нуклеотидів в 3'-нетранслюємій області мРНК. Модифікація білка p53 призводить до його активації. Латентний (неактивний) білок p53 локалізується в цитоплазмі (принаймні на деяких стадіях клітинного циклу). Активний білок p53 локалізується в ядрі клітини. При відсутності стресового стимулу білок p53 має короткий період напіврозпаду (5-20 хв залежно від типу клітин). Активація білка пов'язана зі збільшенням його стабільності. У регуляції стабільності (і активності) білка p53 головна роль належить білку Mdm2.

При нормальних умовах в клітині експресуються і білок p53, і білок Mdm2. Функція білка Mdm2 спочатку була встановлена у мишей, звідси назва Mdm2 (англ. mouse double minute chromosome amplified oncogene – онкоген, який був ампліфікований на хромосомі типу «double minute»). Гомологічний ген людини *HDM2* також є онкогеном. N-кінцевий домен білка Mdm2 зв'язується з N-кінцевим трансактивуючим доменом білка p53. Таким чином, білок Mdm2 перешкоджає активуючій дії білка p53. Крім того, комплекс Mdm2:p53 є інгібітором транскрипції (ймовірно, внаслідок збереження здатності білка p53 до приєднання до ДНК). Білок Mdm2 є ферментом групи E3 системи убіквітин-залежного протеолізу, причому Mdm2 специфічний щодо білка p53. Це означає, що білок Mdm2 каталізує перенесення активованого убіквітину з ферменту групи E2 на білок p53. Таким чином, білок Mdm2 є E3-лігазою. Маркований убіквітином білок p53 є субстратом для 26S-протеасоми, яка здійснює протеоліз молекул білка p53. В нестресорних умовах постійно утворюється комплекс Mdm2:p53 і здійснюється протеоліз p53. Цим пояснюється низька концентрація p53 в клітині в відсутність стресу. Центральна роль білка Mdm2 в деградації білка p53 підтверджується і тим фактом, що додавання до клітин моноклональних антитіл до комплексу

Mdm2:p53 призводить до значного збільшення концентрації білка p53. З наведених міркувань також зрозуміло, що підвищена експресія білка Mdm2 є онкогенним фактором, а сам білок слід віднести до протоонкогенних. Крім 26S-протеасоми протеоліз білка p53 може здійснюватися цистеїновими протеазами сімейства C2, які також відомі як кальпаїни. Активованій білок p53 стимулює експресію гена *mdm2*. Таким чином, для регуляції активності білка p53 існує механізм негативного зворотного зв'язку. Ген *mdm2* є пізнім геном серед тих, експресію яких стимулює білок p53. Відносна трансактивуюча активність білка p53 щодо *mdm2* і інших генів-мішеней p53 задає той часовий проміжок, протягом якого p53 може виконувати свої функції. Функція білка Mdm2 в маркуванні білка p53 для деградації, мабуть, не є унікальною, оскільки зв'язування кінази JNK з білком p53 призводить до убіквітилювання і подальшої деградації p53.

Запропоновано декілька моделей молекулярних механізмів активації білка p53. Дані моделі схожі в тому, що вони враховують центральну роль білка Mdm2 в регуляції стану білка p53. Тільки перша із запропонованих моделей отримала найбільш повне підтвердження, тоді як інші підтверджені тільки частково. Детально охарактеризована група білків, яка включає кінази, родинні кінази PI(3)K (англ. phospho-inositide 3-kinase; фосфоінозит 3-кіназа). Найбільш відомим білком даної групи є білок ATM (англ. ataxia telangiectasia mutated). ATM – білок, мутований при комплексному захворюванні, яке включає симптоми атаксії і телеангіоектезії. Білок ATM і споріднені йому білки групи PI(3)K використовують один домен для специфічного зв'язування з дволанцюговим розривом ДНК. При цьому змінюється конформація всього білка, в тому числі і другого домену, який володіє кіназною активністю. Зв'язування білка ATM з дволанцюговим розривом ДНК призводить до активації кіназної активності білка. Кіназа ATM фосфорилує білок p53 по залишку Ser15. Кіназа DNA-PK (англ. DNA-dependent protein kinase) – протеїнкіназа, активність якої залежить від зв'язування з ДНК. Вона фосфорилує білок p53 по залишках Ser15 і Ser37. Дані залишки серину, а також передбачувані сайти фосфорилування Thr18 і Ser20 розташовуються в тій

частині білка p53, яка взаємодіє з білком Mdm2. Передбачається, що в фосфорильованій формі білок p53 не взаємодіє з білком Mdm2, що збільшує період напіврозпаду білка p53 і, можливо, призводить до його активації. Також було показано, що для нормально функціонуючої клітини одного дволанцюгового розриву ДНК достатньо для активації білка p53 і зупинки клітинного циклу. Друга гіпотеза припускає, що фосфорилуються залишки білка Mdm2, які розташовані в частині білка, відповідальній за зв'язування з білком p53. Результатом є дисоціація комплексу Mdm2:p53. Такий гіпотетичний сайт фосфорилування був запропонований на білку Mdm2. При цьому передбачається роль кінази DNA-ПК в фосфорилуванні. Дана модель не виключає попередню. Третя гіпотеза припускає, що фосфорилується Mdm2, і це призводить до інгібування E3-лігазної активності білка. Комплекс Mdm2:p53 не дисоціює, але одночасно білок p53 не маркується для деградації.

Крім розглянутих посттрансляційних модифікацій p53 піддається ацетилюванню і глікозилуванню, що призводить до збільшення афінності білка p53 до сайтів зв'язування в ДНК.

Білок p53 активується у відповідь на підвищену експресію протоонкогенів *Ras*, *Myc*, β -Катеніна і аденовірусного онкогена *E1A*. Це достовірно встановлена біохімічна подія отримала пояснення тільки після встановлення ролі білка p19ARF (англ. product of alternative reading frame of INK4a gene). p19ARF – білковий продукт гена *INK4a*, який зчитується з альтернативної рамки зчитування і має масу 19 кДа. Підвищена експресія онкогенів призводить до значного посилення експресії білка p19ARF, що принаймні частково обумовлено збільшенням концентрації транскрипційного фактора E2F. Білок p19ARF синтезується в результаті зчитування альтернативної рамки гена *INK4a*. Ген *INK4a* – це ген-супресор пухлини, який крім p19ARF кодує білок p16INK4a (англ. inhibitor of cyclin-dependent kinases Cdk4.6). p16INK4a є інгібітором циклін-залежних кіназ Cdk4.6, який має масу 16 кДа. Білок p19ARF зв'язується з Mdm2 і в меншій мірі з p53. Зв'язування з Mdm2 призводить до інгібування E3-лігазної активності Mdm2. Отже, збільшення концентрації білка p19ARF призводить до зменшення швидкості

деградації p53 і веде до збільшення концентрації p53 і далі до активації білка p53.

Активований білок p53 є специфічним транскрипційним фактором. Гени, транскрипцію яких стимулює білок p53, кодують білки-компоненти апоптотичної програми (проапоптотичні компоненти) і білки, які регулюють клітинний цикл. Активований білок p53 супресує транскрипцію ряду генів. Цей супресуючий ефект не пов'язаний з супресорною функцією комплексу Mdm2:p53, так як даний комплекс супресує транскрипцію тих генів, які активуються білком p53 (не пов'язаних з білком Mdm2). У той же час супресорний ефект білка p53 стосується іншого набору генів. Репресія транскрипції принаймні частково пояснюється тим, що білок p53 формує комплекси з неспецифічними транскрипційними факторами. Серед них виділяються білок ТВР (англ. TATA-box binding protein), який зв'язується з послідовністю ТАТА), білок СBF (англ. ССААТ binding factor) білок, який зв'язується з послідовністю ССААТ і білок SP-1. Тобто, p53 блокує транскрипцію генів, блокуючи ТАТА-бокс.

При нормальному збільшенні активності протоонкогенів (наприклад, в результаті передачі проліферативного сигналу від рецепторів цитоплазматичної мембрани) активація протоонкогенів носить тимчасовий характер і значимого збільшення концентрації p19ARF не відбувається. Результатом передачі проліферативного сигналу є одночасно активація протоонкогенів і інактивація p53. Так, для цитокінів bFGF (англ. basic fibroblast growth factor) – основний фактор росту фібробластів і IGF-1 (англ. insulin-like growth factor 1) – інсуліно-подібного фактору росту типу 1, було показано, що одним з наслідків їх дії є збільшення концентрації Mdm2. Антиапоптотична дія ростових факторів, можливо, реалізується після дії p53.

Ген p53 кодує принаймні два білки з дещо різної регуляцією (дві форми виникають в результаті альтернативного сплайсингу пре-мРНК). Також існують дані, які вказують на можливість існування цілої групи білків, родинних білку p53, найбільш охарактеризованим з них є білок p73. Сімейство клітинних білків Bcl-2 нараховує 17 членів. Білки родини Bcl-2 проявляють широкий спектр

активності від інгібування апоптозу до його індукції. Сімейство Bcl-2 включає до себе субсімейства, які різняться функціонально і структурно. Субсімейство Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w та ін) – найбільш близькі гомологи-інгібітори апоптозу. Білки субсімейств Bax і BH3 є промоторами апоптозу. Апоптоз асоціюється з різними змінами в мітохондріях, включаючи вивільнення цитохрому С в цитоплазму. Bcl-2-родинні білки включені в регуляцію цих змін шляхом формування каналів в мембрані, через які цитохром С надходить в цитоплазму. При цьому Bcl-2 і Bcl-XL інгібують викид цитохрому С, а Bax – стимулює, але Bcl-2 може інгібувати здатність Bax до формування каналів. Крім того, Bcl-2 і Bcl-XL можуть зв'язувати цитохром С безпосередньо і витіснити його з апоптосом, запобігаючи цим активацію каспаз. Bcl-2 кодується протоонкогенами і є внутрішньоклітинним мембранозв'язуючим білком, блокуючим апоптоз. Цей білок експресується на ряді гемопоетичних клітин, на малігнізованому і незв'язаному з пухлиною епітелії. Ген *Bcl-2* виконує унікальну серед онкогенів ссавців функцію як негативного регулятора апоптозу. Вперше це було виявлено при вивченні хромосомних транслокацій, типових для лімфом. Крім того, Bcl-2 пов'язаний зі стовбуровими клітинами, комітуючими диференціювання і морфогенез. Зменшення концентрації Bcl-2 призводить клітини до апоптозу. З іншого боку, понадекспресія Bcl-2 захищає клітини від смерті, але це не призводить до безсмертя нормальні клітини і не є причиною пухлинної трансформації таких клітин. Гетерогенність експресії Bcl-2 у пухлинах передбачає різні шляхи регуляції гена. До того ж, експресія білка, асоційована з передраковими ураженнями, можливо, пов'язана з ранньою стадією утворення пухлини. Білок Bcl-2 також пов'язаний з наявністю резистентності пухлини до терапії. Крім того, прогностичне значення експресії Bcl-2 показано для декількох видів пухлин, таких як неходжкінська лімфома, сквамозна клітинна карцинома, карцинома молочної залози, карцинома жовчного міхура і тимома. Порушення регуляції експресії Bcl-2 спостерігається у пацієнтів з множинною мієломою і гострим мієлолейкозом. Bcl-2 був запропонований в якості корисного маркера для оцінки адекватності терапії ІЛ-2, наприклад, у пацієнтів зі СНІД.

Стадії транскрипції. В процесі транскрипції розрізняють 3 стадії: ініціацію, елонгацію і термінацію.

Ініціація. Активація промотору відбувається за допомогою великого білка – ТАТА-фактора, званого так тому, що він взаємодіє зі специфічною послідовністю нуклеотидів промотора – ТАТААА- (**ТАТА-бокс**).

Приєднання ТАТА-фактора полегшує взаємодію промотора з РНК-полімеразою. Фактори ініціації викликають зміну конформації РНК-полімерази і забезпечують розкручування приблизно одного витка спіралі ДНК, тобто утворюється транскрипційна вилка, в якій матриця доступна для синтезу ланцюга РНК.

Після того, як синтезовано олігонуклеотид з 8-10 н.з., σ -субодиниця відділяється від РНК-полімерази, а замість неї до молекули фермента приєднуються декілька факторів елонгації.

Елонгація. Фактори елонгації підвищують активність РНК-полімерази і полегшують розбіжність ланцюгів ДНК. Синтез молекули РНК йде від 5'- до 3'-кінця комплементарно матричному ланцюгу ДНК. На стадії елонгації, в області транскрипційної вилки, одночасно розділені приблизно 18 нуклеотидних пар ДНК. Зростаючий кінець ланцюга РНК утворює тимчасову гібридну спіраль, близько 12 пар н.з., з матричним ланцюгом ДНК. У міру просування РНК-полімерази по матриці в напрямку від 3'- до 5'-кінця попереду неї відбувається розходження, а позаду – відновлення подвійної спіралі ДНК.

Термінація. Розкручування подвійної спіралі ДНК в області сайту термінації робить його доступним для фактору термінації. Завершується синтез РНК в строго визначених ділянках матриці – сайтах термінації, або термінаторах. Фактор термінації полегшує віддалення первинного транскрипту (пре-мРНК), який комплементарен матриці, і РНК-полімерази від матриці. РНК-полімераза може вступити у наступний цикл транскрипції після приєднання субодиниці σ .

Поділ процесу транскрипції на стадії є спрощеною моделлю, він використовується для зручності опису механізмів біосинтезу РНК. У звичайних умовах холофермент РНК-полімераз еубактерій для ініціації транскрипції не

вимагає додаткових факторів. Синтез РНК, який не залежить від присутності регуляторних молекул, отримав назву **базальної транскрипції**. Базальна транскрипція не може відбуватися *in vivo*, і цей термін використовується тільки при описі результатів досліджень синтезу РНК *in vitro*, в безклітинних системах транскрипції. На відміну від цього для точної ініціації транскрипції РНК-полімеразою II потрібна наявність, крім її субодиниць, ще й основних факторів транскрипції – білків-активаторів та білків-репресорів. Така транскрипція отримала назву **індукованої, або активованої**.

5.1.2. Процесінг

Посттранскрипційна модифікація або процесінг РНК – це сукупність процесів, які призводять до перетворення пре-мРНК в зрілу мРНК.

Первинні транскрипти мРНК, перш ніж будуть використані в ході синтезу білка, піддаються ряду ковалентних модифікацій. Ці модифікації необхідні для функціонування мРНК в якості матриці.

Кепування. Модифікації пре-мРНК починаються на стадії елонгації. Коли довжина первинного транскрипту досягає приблизно 30 н.з., відбувається кепування його 5'-кінця. Здійснює кепування фермент гуанілілтрансфераза. Вона гідролізує макроергічний зв'язок в молекулі ГТФ та приєднує нуклеотиддифосфатний залишок 5'-фосфатної групи до 5'-кінця синтезованого фрагменту РНК з утворенням 5',5'-фосфодієфірного зв'язку. Подальше метилювання залишку гуаніну в складі ГТФ з утворенням N⁷-метилгуанозину завершує формування кепу.

Модифікований 5'-кінець забезпечує ініціацію трансляції, подовжує час життя мРНК, захищаючи її від дії 5'-екзонуклеаз в цитоплазмі. Кепування необхідно для ініціації синтезу білка, так як ініціюючі триплети AUG і GUG розпізнаються рибосомою тільки якщо присутній кеп. Наявність кепу також необхідна для роботи складної ферментної системи, що забезпечує видалення інтронів.

3'-кінець більшості транскриптів, синтезованих РНК-полімеразою II, також піддається модифікації, при якій спеціальним ферментом поліА-

полімеразою формується поліА-послідовність (поліА-«хвіст»), що складається з 100-200 залишків аденілової кислоти.

Сигналом до початку поліаденілювання є послідовність -AAUAAA- на зростаючому ланцюгу РНК. Фермент поліА-полімераза, проявляючи екзонуклеазну активність, розриває 3'-фосфоефірний зв'язок після появи в ланцюгу РНК специфічної послідовності -AAUAAA-. До 3'-кінця в точці розриву поліА-полімераза нарощує поліА-«хвіст». Наявність поліАпослідовності на 3'-кінці полегшує вихід мРНК з ядра і уповільнює її гідроліз у цитоплазмі.

Ферменти, що здійснюють кепування і поліаденілювання, вибірково пов'язуються з РНК-полімеразою II, і за відсутності полімерази неактивні.

Сплайсинг. З появою методів, що дозволяють вивчати первинну структуру молекул мРНК в цитоплазмі і послідовність нуклеотидів кодуючої її геномної ДНК, було встановлено, що вони не комплементарні, а довжина гена в кілька разів більше «зрілої»

мРНК. Послідовності нуклеотидів, які присутні в ДНК, але не входять до складу зрілої мРНК, були названі некодуєчими, або інтронами, а послідовності, присутні в мРНК – кодуєчими, або екзонами. Таким чином, первинний транскрипт – це суворо комплементарна матриці нуклеїнова кислота (пре-мРНК), що містить як екзони, так і інтрони. Довжина інтронів становить від 80 до 1000 нуклеотидів. Послідовності інтронів «вирізаються» з первинного транскрипту, а кінці екзонів з'єднуються один з одним. Таку модифікацію РНК називають **сплайсингом (англ. to splice – зрощувати)**. Сплайсинг відбувається в ядрі, а до цитоплазми надходить вже «зріла» мРНК.

Гени еукаріотів містять більше інтронів, ніж екзонів, тому дуже довгі молекули пре-мРНК (близько 5000 нуклеотидів) після сплайсингу перетворюються в більш короткі молекули цитоплазматичної мРНК (від 500 до 3000 нуклеотидів).

Процес «вирізання» інтронів протікає за участю п'яти мяРНП, які з білками формують структуру, яка носить назву **сплайсосоми**.

До складу мяРНП входить мала ядерна РНК (мяРНК), нуклеотидний ланцюг якої пов'язаний з білковим кістяком, що складається з декількох протомерів. У сплайсингу беруть участь різні мяРНП.

Нуклеотидні послідовності інтронів функціонально неактивні. Але на 5'- і 3'-кінцях вони мають високоспецифічні послідовності – AGGU- і GAGG- відповідно (сайти сплайсингу), які забезпечують їх видалення з молекули пре-мРНК. Зміни структури цих послідовностей впливають на процес сплайсингу.

На першій стадії процесу мяРНП зв'язуються зі специфічними послідовностями первинного транскрипту (сайти спласингу), далі до них приєднуються інші мяРНП. При формуванні структури сплайсосоми 3'-кінець одного екзону зближується зі 5'-кінцем наступного екзону. Сплайсосома каталізує реакцію розщеплення 3',5'-фосфодиефірного зв'язку на кордоні екзону з інтроном. Послідовність інтрону видаляється, а два екзони з'єднуються. Утворення 3',5'-фосфодиефірного зв'язку між двома екзонами каталізують мяРНК, що входять в структуру сплайсосоми. У результаті сплайсингу з первинних транскриптів мРНК утворюються молекули «зрілої» мРНК.

Альтернативний сплайсинг. Для деяких генів описані альтернативні шляхи сплайсингу і поліаденілювання одного і того ж транскрипту. Екзон одного варіанту сплайсингу може виявитися інтроном в альтернативному шляху, тому молекули мРНК, утворені в результаті альтернативного сплайсингу, розрізняються набором екзонів. Це призводить до утворення різних мРНК і, відповідно, різних білків з одного первинного транскрипту.

Вибір одного з шляхів (альтернативний сплайсинг) та одного з можливих сайтів поліаденілювання грає важливу роль в тканинспецифічній експресії генів. Різні варіанти сплайсингу можуть призводити до утворення різних ізоформ одного і того ж білка. Наприклад, ген тропоніну складається з 18 екзонів і кодує численні ізоформи цього м'язового білка. Різні ізоформи тропоніну утворюються в різних тканинах на певних стадіях їх розвитку.

Процесінг т- і рРНК. Гени, що кодують більшу частину структурних РНК, транскрибуються РНК-полімеразами I і III. Нуклеїнові кислоти –

попередники тРНК і рРНК – піддаються в ядрі розщепленню і хімічній модифікації (процесінгу).

Первинний транскрипт тРНК містить близько 100 нуклеотидів, а після процесінгу –70-90 н.з. Посттранскрипційні модифікації первинних транскриптів тРНК відбуваються за участю РНК-аз (рибонуклеаз). Так, формування 3'-кінця тРНК каталізує РНК-аза, що представляє собою 3'-екзонуклеазу, «відрізаючи» по одному нуклеотиду, поки не досягне послідовності -ССА, однакової для всіх тРНК. Для деяких тРНК формування послідовності -ССА на 3'-кінці (акцепторний кінець) відбувається в результаті послідовного приєднання цих трьох нуклеотидів. Пре-тРНК містить всього один інтрон, що складається з 14-16 нуклеотидів. Видалення інтрону і сплайсинг призводять до формування структури, яка носить назву антикодону. Антикодон представляє собою триплет нуклеотидів, що забезпечує взаємодію тРНК з комплементарним кодоном мРНК в ході синтезу білків.

У клітинах людини міститься близько сотні копій гену рРНК, локалізованих групами на п'яти хромосомах. Гени рРНК транскрибуються РНК-полімеразою I з утворенням ідентичних транскриптів. Первинні транскрипти мають довжину близько 13000 н.з. (45S рРНК). Перш ніж покинути ядро в складі рибосомної частинки, молекула 45S рРНК піддається процесінгу, в результаті утворюється 28S рРНК (близько 5000 нуклеотидів), 18S рРНК (близько 2000 нуклеотидів) і 5,8S рРНК (близько 160 нуклеотидів), які є компонентами рибосом. Інша частина транскрипту руйнується в ядрі.

5.1.3. Трансляція

Трансляцією називають здійснюємий рибосомою синтез білка з амінокислот на матриці мРНК. Переклад інформації, укладеної в полінуклеотидній послідовності мРНК, в амінокислотну послідовність білка потребує певного способу кодування або шифрування, тобто існування виразного закону, за яким чергування чотирьох нуклеотидів в мРНК задає специфічну послідовність амінокислот у білку.

Генетичний код. Необхідність кодування структури білків в лінійній послідовності нуклеотидів мРНК і ДНК продиктована тим, що в ході трансляції немає відповідності між кількістю мономерів в матриці мРНК і продукті – білку, що синтезується, а також відсутня структурна подібність між мономерами РНК і білка. Це виключає комплементарну взаємодію між матрицею і продуктом – принцип, за яким здійснюється побудова нових молекул ДНК і РНК в ході реплікації і транскрипції.

Звідси стає зрозумілим, що повинен існувати «словник», що дозволяє з'ясувати, яка послідовність нуклеотидів мРНК забезпечує включення в білок амінокислот в заданій послідовності. Цей «словник» отримав назву **генетичного, біологічного, нуклеотидного, або амінокислотного коду**. Він дозволяє шифрувати амінокислоти, що входять до складу білків, за допомогою певної послідовності нуклеотидів в ДНК і мРНК. Для нього характерні певні властивості.

Одним з основних питань при з'ясуванні властивостей коду було питання про кількість нуклеотидів, яка повинна визначати включення в білок однієї амінокислоти. Відразу було зрозуміло, що це число не може бути рівним 1 або 2, так як в цьому випадку кількість кодуючих елементів буде недостатньою для шифрування 20 амінокислот в білках. Кількість кодуючих послідовностей з 4 нуклеотидів по три дорівнює $4^3=64$, що понад ніж у 3 рази перевищує мінімальну кількість, яка необхідна для кодування 20 амінокислот. Надалі було встановлено, що кодуючими елементами в шифруванні амінокислотної послідовності є трійки нуклеотидів, або **триплети**, які отримали назву **кодонів (кодуючих тринуклеотидів)**.

Сенс кодонів став зрозумілий в 60-х р. ХХ ст., коли, використовуючи безклітинну систему синтезу білків (табл. 3) і синтетичні полірибонуклеотиди із заданою послідовністю нуклеотидів в якості матриці, Маршал Ніренберг і Дж. Маттеї синтезували поліпептиди певної будови.

Основні компоненти білковосинтезуючої системи

№ з/п	Необхідні компоненти	Функції
1	Амінокислоти	Субстрати для синтезу білків
2	tРНК	Адаптори. Взаємодіють акцепторним кінцем з амінокислотами, а антикодоном з кодоном мРНК
3	aa-tРНК-синтетази	Кожна aa-tРНК-синтетаза каталізує реакцію специфічного зв'язування однієї з 20 амінокислот з відповідною tРНК
4	мРНК	Матриця містить лінійну послідовність кодонів, визначаючи первинну структуру білків
5	Рибосоми	Місця синтезу білків
6	АТФ і ГТФ	Джерела енергії
7	Білкові фактори ініціації, елонгації і термінації	Забезпечують процес трансляції
8	Іони магнію	Кофактор, стабілізуючий структуру рибосом

Так, на матриці полі-У, що складається тільки з залишків УМФ, був отриманий поліфенілаланін, а на матриці полі-Ц – поліпролін. З цього випливало, що триплет -UUU кодує амінокислоту фенілаланін, а триплет -ССС – амінокислоту пролін.

У наступних експериментах використовували змішані синтетичні полірибонуклеотиди з відомим складом. У результаті цієї роботи вдалося встановити, що з 64 кодонів включення амінокислот до поліпептидного ланцюга, що синтезується, шифрує 61 триплет, а 3 інших – UAA, UAG, UGA не кодують включення в білок амінокислот і отримали назву безглуздох, або нонсенс-кодонів. Проте надалі було показано, що ці триплети сигналізують про завершення трансляції, і тому їх стали називати термінуючими, або стоп-кодонами (Stop).

Кодони мРНК і триплети нуклеотидів в кодуючій нитці ДНК з направленням від 5' до 3'-кінця мають однакову послідовність а.п., за винятком того, що в ДНК замість U, характерного для мРНК, стоїть Т.

Специфічність генетичного коду. Кожному кодону відповідає тільки одна певна амінокислота. У цьому сенсі генетичний код суворо однозначний.

Виродженність генетичного коду. У мРНК і ДНК має сенс 61 триплет, кожний з яких кодує включення в білок однієї з 20 амінокислот. З цього

впливає, що в інформаційних молекулах включення до білку однієї і тієї ж амінокислоти визначають декілька кодонів. Ця властивість генетичного коду отримала назву виродження.

У людини одним кодоном зашифровані тільки 2 амінокислоти – метіонін і триптофан, тоді як амінокислоти лейцин, серін і аргінін – шістьма кодонами, а амінокислоти аланін, валін, гліцин, пролін і треонін – чотирма кодонами. В триплетах для молекули РНК, нуклеотид Т змінюється на У.

Надмірність кодуючих послідовностей – найцінніша властивість коду, тому що вона підвищує стійкість інформаційного струму до неблагапрятних впливів зовнішнього і внутрішнього середовищ. При визначенні природи амінокислоти, яка повинна бути включена до білку, третій нуклеотид у кодоні не має такого важливого значення, як перші два. Для багатьох амінокислот заміна нуклеотиду у третій позиції кодону не позначається на його значенні.

Лінійність запису інформації. Під час трансляції кодони мРНК «читаються» з фіксованої стартової точки послідовно і не перекриваються. У записі інформації відсутні сигнали, що вказують на кінець одного кодону і початок наступного.

Кодон AUG є ініціюючим і прочитується як на початку, так і в інших ділянках мРНК як метіонін. Наступні за ним триплети читаються послідовно без будь-яких пропусків аж до стоп-кодону, на якому синтез поліпептидного ланцюга завершується.

Універсальність. До недавнього часу вважалося, що код є абсолютно універсальним, тобто сенс кодових слів однаковий для всіх вивчених організмів: вірусів, бактерій, рослин, земноводних, ссавців, включаючи людину. Проте пізніше стало відомо одне виключення, виявилось, що мітохондріальна мРНК містить 4 триплети, що мають інше значення, ніж в мРНК ядерного походження. Так, в мРНК мітохондрій триплет UGA кодує Trp, AUA – Met, а AGA і AGG прочитуються як додаткові стоп-кодони.

Колінеарність гену і продукту. У прокариотів виявлена лінійна відповідність послідовності кодонів гену і послідовності амінокислот у білковому продукті, тобто існує колінеарність гену і продукту.

У еукаріотів послідовності підстав в гені, колінеарні амінокислотній послідовності в білку, прериваються ітронами. Тому в еукаріотичних клітинах амінокислотна послідовність білка колінеарна послідовності екзонів в гені або зрілій мРНК після посттранскрипційного видалення інтронів.

Рибосоми. Рибосоми представляють собою рибонуклеопротеїдові утворення – своєрідні «фабрики», на яких йде збірка амінокислот в білки.

Еукаріотичні рибосоми мають константу седиментації 80S і складаються з 40S (малої) і 60S (великої) субодиниць.

Кожна субодиниця включає рРНК і білки. У 40S субодиницю входить рРНК з константою седиментації 18S і близько 30-40 білків. У 60S субодиниці виявлено 3 види рРНК: 5S, 5,8S і 28S і близько 50 різних білків.

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

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

У рибосомі є 2 центри для приєднання молекул тРНК: аміноацильний (А) і пептидилний (Р) центри, в утворенні яких беруть участь обидві субодиниці. Разом центри А і Р включають ділянку мРНК, рівну 2 кодонам. Під час трансляції центр А пов'язує фермент аміноцил-тРНК-синтетазу (aa-тРНК), будову якої визначає кодон, що знаходиться в області цього центру. У структурі цього кодону зашифрована природа амінокислоти, яка буде включена до зростаючого поліпептидного ланцюга. Центр Р займає пептидил-тРНК, тобто тРНК, пов'язана з пептидним ланцюжком, який вже синтезований.

Центральна догма молекулярної біології. Центральна догма молекулярної біології – це узагальнююче правило реалізації генетичної інформації: інформація передається від нуклеїнових кислот до білка, але не в зворотному напрямку. Правило було сформульовано Френсісом Криком у 1958 р. і приведено у відповідність з накопиченими на той час даними в 1970 р.

Згідно йому, перехід генетичної інформації від ДНК до РНК і від РНК до білка є універсальним для всіх без винятку клітинних організмів.

Даний перехід лежить в основі біосинтезу макромолекул. Реплікації генома відповідає інформаційний перехід ДНК→ДНК, транскрипції – ДНК→РНК, а трансляції РНК→білок. У природі зустрічаються також переходи РНК→РНК (реплікація у вірусів), РНК→ДНК (зворотня транскрипція у вірусів), ДНК→білок (пряма трансляція у *E. coli*), а також зміна конформації пріонів (білків, що існують у двох формах) що передається від молекули до молекули (табл. 4).

Таблиця 4

*Способи передачі інформації згідно
Центральної догми молекулярної біології*

Процес	Загальні	Спеціальні	Невідомі
Реплікація	ДНК→ДНК	РНК→РНК	Білок→ДНК
Транскрипція	ДНК→РНК	РНК→ДНК	Білок→РНК
Трансляція	РНК→білок	ДНК→білок	Білок→білок

Стадії трансляції. У ході синтезу білка прочитання інформації мРНК йде в напрямку від 5'- до 3'-кінця, забезпечуючи синтез пептиду від N- до С-кінця.

Кожна еукаріотична мРНК кодує будову тільки одного поліпептидного ланцюга (тобто вона моноцистронна), на відміну від прокаріотичних мРНК, які часто містять інформацію про декілька пептидів (тобто вони поліцистронні). Ці відмінності викликані тим, що у прокаріотів ДНК позбавлена інтронів, і РНК-полімераза транскрибує ділянки, прочитання інформації з яких підпорядковується загальному регуляторному механізму. Крім того, на поліцистронних мРНК синтез білка починається до того, як закінчується їх власний синтез, тому що процеси транскрипції і трансляції не розділені. У еукаріотів трансляція протікає в цитоплазмі, куди з ядра поступують вже «зрілі» мРНК.

Події на рибосомі включають етапи ініціації, елонгації і термінації.

Ініціація. Ініціація трансляції є подією, в ході якої відбувається утворення комплексу, що включає Met-тРНК_i^{Met}, мРНК і рибосому, де тРНК₁^{Met}

– ініціююча метіонінова тРНК. У цьому процесі беруть участь не менше 10 факторів ініціації, які позначаються як eIF (англ. eukaryotic initiation factors) – еукаріотичні фактори ініціації із зазначенням номеру і літери. Спочатку 40S субодинаця рибосоми з'єднується з фактором ініціації, який перешкоджає її зв'язуванню з 60S субодинацею, але стимулює об'єднання з потрібним комплексом, що включає Met-тРНК_i^{Met}, eIF-2 і ГТФ. Потім цей тепер вже більш складний комплекс зв'язується з 5'-кінцем мРНК за участю декількох eIF. Один з факторів ініціації (eIF-4F) впізнає і приєднується до кепу на молекулі мРНК, тому він отримав назву кепзв'язуючого білка. Прикріпившись до мРНК, 40S субодинаця починає ковзати по некодуєчій частині мРНК до тих пір, поки не досягне ініціюючого кодону (старт-кодону) AUG кодуєчої нуклеотидної послідовності. Ковзання 40S субодинаці по мРНК супроводжується гідролізом АТФ, енергія якого витрачається на подолання ділянок спіралізації в нетрансліруємій частині мРНК. В еукаріотичних клітинах некодуєчі ділянки мРНК мають різну довжину, але зазвичай від 40 до 80 нуклеотидів, хоча зустрічаються області з протяжністю більше 700 нуклеотидів.

Досягнувши початку кодуєчої послідовності мРНК, 40S субодинаця зупиняється і зв'язується з іншими факторами ініціації, прискорюючими приєднання 60S субодинаці та утворення 80S рибосоми за рахунок гідролізу ГТФ до ГДФ і неорганічного фосфату. При цьому формуються А- і Р-центри рибосоми, причому в Р-центрі опиняється AUG-кодон мРНК з приєднаною до нього Met-тРНК_i^{Met}.

У клітинах є 2 розрізняючихся за структурою тРНК, що впізнають кодон AUG. Ініціюючий кодон впізнається тРНК_i^{Met}, а триплети мРНК, що кодуєть включення метіоніну у внутрішні ділянки білка, прочитуються іншою тРНК^{Met}.

Елонгація. По завершенні ініціації рибосома розташовується на мРНК таким чином, що в Р-центрі знаходиться ініціюючий кодон AUG з приєднаною до нього Met-тРНК_i^{Met}, а у А-центрі – триплет, що кодує включення першої амінокислоти синтезуемого білка. Далі починається найтриваліший етап білкового синтезу – елонгація, в ході якого рибосома за допомогою aa-тРНК послідовно «читає» мРНК у вигляді триплетів нуклеотидів, слідуєчих за

ініціюючим кодоном в напрямку від 5' до 3'-кінця, нарощуючи поліпептидний ланцюг за рахунок послідовного приєднання амінокислот.

Нуклеотидна послідовність, яка починається з ініціюючого кодону, поділяє наступні нуклеотиди на триплети, які кодують амінокислоти, і завершується термінуючим кодоном, називається рамкою зчитування. Існує тільки три можливості трансляції нуклеотидної послідовності до амінокислотної в залежності від старт-кодону. При цьому амінокислотна послідовність змінюється. Нижче наведені три можливі рамки зчитування для послідовності GUACGUAAGUAAGUAUGGACGUA:

- Рамка зчитування 1: GUA CGU AAG UAA GUA UGG ACG;
- Рамка зчитування 2: ..G UAG GUA AGU AAG UAU GGA CGU;
- Рамка зчитування 3: .GU ACG UAA GUA AGU AUG GAC GUA.

Інтервал між старт- і стоп-кодонами називається **відкритою рамкою зчитування (англ. open reading frame – ORF)**.

Мутація, в результаті якої вставляється або видаляється один нуклеотид і змінюється рамка зчитування, називається здвигом рамки. Оскільки послідовність нової рамки зчитування повністю відмінна від початкової, вся подальша амінокислотна послідовність буде змінюватися після мутації. Функція такого білка буде повністю втраченою.

Включення кожної амінокислоти в білок відбувається в 3 стадії, в ході яких:

- aa-тРНК кожної амінокислоти, що входить до білка, зв'язується з А-центром рибосоми;
- пептид від пептидил-тРНК, що знаходиться в Р-центрі, приєднується до α -NH₂-групи аміноацильного залишку aa-тРНК А-центру з утворенням нового пептидного зв'язку;
- подовжена на один амінокислотний залишок пептидил-тРНК переміщується з А-центру до Р-центру в результаті транслокації рибосоми.

Термінація. Термінація трансляції настає в тому випадку, коли в А-центр рибосоми потрапляє до одного зі стоп-кодонів: UAG, UAA або UGA. Для стоп-кодонів немає відповідних тРНК. Замість цього до рибосоми приєднуються 2

білкових звільнюючих фактори RF (англ. releasing factor) або фактора термінації. Один з них за допомогою пептидилтрансферазного центру каталізує гідролітичне відщеплення синтезованого пептиду від тРНК. Інший за рахунок енергії гідролізу ГТФ викликає дисоціацію рибосоми на субодиниці.

Матрична природа процесу трансляції проявляється в тому, що послідовність надходження аа-тРНК в рибосому для синтезу білка суворо детермінована мРНК, тобто порядок розташування кодонів вздовж ланцюга мРНК однозначно задає структуру синтезованого білка. Рибосома сканує ланцюг мРНК у вигляді триплетів і послідовно відбирає з навколишнього середовища «необхідні» аа-тРНК, звільняючи в ході елонгації деацільовані тРНК.

Мала і велика субодиниці рибосоми в процесі трансляції виконують різні функції: мала суб'єдиниця приєднує мРНК і декодує інформацію за допомогою тРНК та механізму транслокації, а велика суб'єдиниця відповідає за утворення пептидних зв'язків.

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

Багато модифікації здійснюються в ЕР. Тут відбуваються фолдінг поліпептидних ланцюгів і формування унікальної третинної або четвертинної структури білків. Для підтримання нативної конформації молекул величезне значення має правильне формування дисульфідних зв'язків.

5.2. Регуляція генної експресії

Регуляція експресії генів дає клітинам контроль над своєю структурою та функцією і є основою їх диференціювання, морфогенезу і адаптації. Експресія генів є субстратом для еволюційних змін, так як контроль за часом,

місцем і кількісними характеристиками експресії одного гена може мати вплив на функції інших генів в цілому організмі.

Організація хроматину. У клітинах ссавців поряд з адаптивним регулюванням, що забезпечує пристосовування організму до мінливих умов внутрішнього і зовнішнього середовищ, існують механізми, які зберігають стабільну (існуючу протягом усього життя клітини і навіть багатьох її генерацій) репресію одних генів і депресію інших.

В ядрах диференційованих клітин хроматин має таке укладання, що тільки невелика кількість генів (часто менше 1%) доступно для транскрипції. Розрізняють ділянки гетерохроматину, в яких ДНК упакована дуже компактно і недоступна для транскрипції, і ділянки еухроматину, що мають більш рихле укладання і здатні зв'язувати РНК-полімеразу. У різних типах клітин в області еухроматину попадають різні гени, а це означає, що в різних тканинах транскрибуються різні ділянки хроматину.

Зміна кількості генів. Збільшення кількості генів (ампліфікація) використовується організмом в тому випадку, коли виникає необхідність збільшити синтез певного генного продукту. Багато генів, що кодують білки або РНК, необхідні організму у великих кількостях (наприклад, гістони, тРНК, рРНК), постійно присутні в ампліфікованому стані. Так, у людини 20% загального геному складається з ділянок, що кодують т-, р- і ядерні РНК, останні з яких забезпечують посттранскрипційні модифікації РНК. Ампліфіковані ділянки можуть розташовуватися один за одним (тандемно) в хромосомі або утворювати позахромосомні фрагменти ДНК, що називаються подвійними міні-хромосомами. Їх розмір коливається від 100 до 1000 кілобаз – kb (1 kb = 1000 п.н.). Описано більше 20 генів здатних ампліфікувати при певних умовах.

Втрата генетичного матеріалу – досить рідкісний спосіб регуляції. Найбільш яскравий приклад втрати всіх генів за рахунок руйнування ядра – процес дозрівання еритроцитів. Нестабільні ампліфіковані гени і подвійні хромосоми. Вони, як правило, зникають у наступних генераціях. Втрата генетичного матеріалу відбувається в процесі дозрівання лімфоцитів і

утворення плазматичних клітин різних клонів, що синтезують секретуємі форми імуноглобулінів.

Перебудова генів. У вищих організмів, так само як і у прокариотів, відзначають процес обміну, переміщення генів між хромосомами або всередині хромосом, об'єднання генів з утворенням зміненої хромосоми, яка після таких структурних змін здатна до реплікації і транскрипції. Цей процес отримав назву «генетичної рекомбінації» (див. розд. II, гл. 4.3).

Регуляція транскрипції. Мінімальний синтез будь-якого білка підтримується в тому випадку, якщо до ТАТА-ділянки промотору приєднується ТАТА-зв'язуючий білок, фактори транскрипції і РНК-полімераза, що утворюють ініціюючий комплекс, що здійснює синтез невеликої кількості мРНК. Формування комплексу – багаторівневий процес, від утворення якого залежить швидкість ініціації транскрипції. Ідентифіковано понад 100 різних білків, здатних взаємодіяти зі специфічними фізичними регуляторними послідовностями ДНК, впливаючи головним чином на процес складання транскрипційного комплексу та швидкість транскрипції.

Ці білки мають один або кілька доменів, які забезпечують виконання регуляторних функцій.

Розрізняють наступні види доменів:

- **ДНК-зв'язуючі домени (ДЗД)**, відповідальні за впізнавання і зв'язування регуляторних факторів зі специфічними ділянками на молекулі ДНК;
- **домени, що активують транскрипцію** за рахунок зв'язування з білками основного ініціаторного комплексу: транскрипційними факторами, коактиваторами і РНК-полімеразою;
- **антирепресорні домени**, завдяки яким білки здатні взаємодіяти з гістонами нуклеосом і звільняти транскрибуємі ділянки ДНК від зв'язку з цими інгібіторними структурами;
- **домени, що зв'язують ліганди**, приєднання яких до білка змінює його конформацію і забезпечує зв'язування з молекулою ДНК.

Приєднання ліганда до рецептору утворює ДНК-зв'язуючу ділянку, що впізнає специфічну послідовність в регуляторній зоні ДНК і індукує транскрипцію певних генів.

На молекулі ДНК на відстані 100-200 п.п. від стартової точки транскрипції є короткі специфічні послідовності ДНК: СААТ-елемент або СААТ-бокс, СG-бокс і октамерний бокс (включає 8 н.з.), що впізнають транскрипційні фактори. Ці елементи є у всіх клітинах, і конститутивно експресуємі гени мають потребу тільки у них. В той же час для генів, що піддаються адаптивній регуляції, виявленні ділянки молекули ДНК, які вдалені (до 1000 і більше п.п.) від промотору, але теж приймаючі участь у регуляції транскрипції. Ці нуклеотидні послідовності бувають 2 типів:

- **енхансери** – ділянки ДНК розміром 10-20 п.п., які зв'язуючись з регуляторними білками, забезпечують збільшення швидкості транскрипції.
- **сайленсери** – ділянки ДНК, які зв'язуючись з регуляторними білками, забезпечують зменшення швидкості транскрипції. Процес пригнічення експресії певного гену або групи генів носить назву **сайленсінгу**. Сайленсінг генів може відбуватися як на рівні транскрипції, так і на посттранскрипційному рівні. Сайленсінг на рівні транскрипції є результатом модифікації гістонів, в гетерохроматині, яка призводить до того, що відповідні ділянки ДНК стають недоступними для апарату транскрипції (РНК-полімераза) та факторів транскрипції.

Сайленсінг на посттранскрипційному рівні є результатом руйнування (деградації) мРНК відповідних генів. Руйнування мРНК перешкоджає трансляції і формуванню продукту гена (зазвичай, поліпептиду, білка).

Загальний механізм посттранскрипційного сайленсінгу – це шлях **РНК-інтерференції** (англ. **RNA interference, RNAi**), яка представляє собою процес придушення експресії гена на стадії транскрипції, трансляції, деаденілювання або деградації мРНК за допомогою малих молекул РНК.

За проведення РНК-інтерференції відповідають **малі інтерферентні РНК** або **короткі інтерферентні РНК** (англ. **small interfering RNA** або **short interfering RNA, siRNA**), які були відкриті у 1999 р. групою британських

молекулярних біологів під керівництвом Девіда Болкомба, як компонент системи посттранскрипційного сайленсінгу генів у рослин. Процес РНК-інтерференції починається з дії ферменту Dicer, який розрізає довгі молекули дволанцюгової РНК на короткі фрагменти порядку 21-25 нуклеотидів – siRNA. Один з двох ланцюгів кожного фрагмента називають «спрямовуючим». Ця одноланцюгова РНК далі включається до складу РНК-білкового комплексу RISC (англ. RNA-induced silencing complex). В результаті активності RISC одноланцюговий фрагмент РНК з'єднується з комплементарною послідовністю молекули мРНК і викликає розривання мРНК білком Argonaute або інгібування трансляції та/або деаденілювання мРНК. Ці події призводять до придушення експресії відповідного гену тобто сайленсінгу, ефективність якого обмежена концентраціями молекул малих РНК – siRNA і мікроРНК.

Селективний ефект РНК-інтерференції на експресію генів робить її корисним інструментом для досліджень з використанням культур клітин і живих організмів, так як синтетичні дволянюгові РНК, введені в клітини, викликають супресію специфічних генів. RNAi використовується для великомасштабних досліджень в галузі біохімії, молекулярної біології, генетики, біотехнології та медицини. Так, наприклад, РНК-інтерференцію використовують для систематичного «виключення» генів в клітинах і встановлення функцій генів при вивченні поділу клітини.

Обидва шляхи виключення генів використовуються для регуляції власних генів. Механізми сайленсінга також захищають організм від транспозонів і вірусів. Тому механізми сайленсінга генів можуть бути частиною еволюційно стародавньої імунної системи, що захищає від чужорідної ДНК.

Елементи відповіді, або cis-елементи – це регуляторні послідовності ДНК, загальні для групи генів. Вони забезпечують координовану регуляцію транскрипції генів і, як правило, розташовуються на відстані приблизно в 250 п.п. вище промотору кожного гену. В іншому ці нуклеотидні послідовності мають багато спільного з енансерами.

Посттранскрипційна регуляція. В організмі тварин істотне значення в забезпеченні різноманітності білків відіграє посттранскрипційний процесинг

РНК. Основні засоби такої регуляції – альтернативний сплайсинг (див. розд. II, гл. 5.1.2) і зміна стабільності РНК.

Стабільність молекул мРНК – фактор, зміна якого впливає на рівень трансляції. Стабілізація мРНК при фіксованій швидкості транскрипції призводить до накопичення і збільшення кількості утворюємого білкового продукту. Стабілізація мРНК досягається за рахунок подовження часу її життя.

Регуляція трансляції і посттрансляційна регуляція. Ці види регуляції досягаються за рахунок зміни швидкості трансляції і відмінних в тривалості життя молекул білка.

Зміна швидкості трансляції забезпечується регуляторними білками і залежить від вмісту певного білка в клітині. Якщо його вміст достатній, то синтез припиняється, а якщо ні – продовжується.

Після того, як білки синтезовані, час їхнього життя регулюється ферментами протеазами. У кожній клітині швидкість розщеплення білків варіює в широких межах. Ферменти, що каталізують регуляторні реакції метаболічних шляхів, як правило, піддаються швидкому розщепленню, тому швидкість оновлення цих молекул досить висока. Фізіологічний стан організму також впливає на тривалість життя білків. Крім того, існує потужна система захисту, що забезпечує швидке розщеплення дефектних білків.

Контрольні питання

1. Що таке експресія генів?
2. Що представляє собою біосинтез білка?
3. Що таке транскрипція?
4. Транскриптон – це...
5. Які класи факторів транскрипції розрізняють за функціональною ознакою?
6. Через які механізми транскрипційні фактори можуть впливати на транскрипцію генів?
7. На які суперкласи поділяють транскрипційні фактори за ключовими особливостями ДНК-зв'язуючих доменів?
8. Що представляють собою ядерні рецептори?

9. Що Вам відомо про білок p53?
10. Скільки стадій включає процес транскрипції? Що це за стадії?
11. Що відбувається під час термінації транскрипції?
12. Що таке індукована транскрипція?
13. Що представляє собою процесінг РНК?
14. У чому полягає кепування?
15. Що таке сплайсинг?
16. Що формує сплайсосу?
17. Опишіть альтернативний сплайсинг.
18. Що представляє собою процес трансляції?
19. Що таке генетичний код?
20. Що є кодуючими елементами в шифруванні амінокислотної послідовності?
21. У чому полягає специфічність генетичного коду, а у чому його виродженність?
22. На чому заснована універсальність генетичного коду?
23. Опишіть будову рибосоми.
24. Яку функцію виконують рибосоми?
25. Ким і коли була сформульована центральна догма молекулярної біології? У чому вона полягає?
26. Перерахуйте стадії трансляції.
27. Що відбувається під час елонгації трансляції?
28. Що називається відкритою рамкою зчитування?
29. Які посттрансляційні модифікації Вам відомі?
30. Яким чином здійснюється регуляція генної експресії?
31. Що є досить рідкісним способом регуляції генної експресії?
32. Як відбувається перебудова генів?
33. Опишіть загальний механізм посттранскрипційного сайленсінгу.
34. У чому полягає посттрансляційна регуляція генної експресії?
35. Чим забезпечується зміна швидкості трансляції?

Розділ III.

СТРУКТУРА І ФУНКЦІОНУВАННЯ БІЛКІВ

Протеоміка – наука, основним предметом вивчення якої є білки і їх взаємодії в живих організмах. Протеоміка досліджує «виробництво» білків, їх декомпозицію і заміну, вивчає як білки модифікуються після їх синтезу в організмі.

Центральна роль білків в організмі була визнана у 1926 р., коли американський хімік Джеймс Самнер – лауреат Нобелівської премії показав, що фермент уреаза є білком. Ідея про те, що вторинна структура білків – результат утворення водневих зв'язків між амінокислотами, була висловлена Вільямом Астбері в 1933 р., але американський хімік і кристалограф Лайнус Полінг вважається першим вченим, який зміг успішно передбачити вторинну структуру білків. Пізніше американський хімік Уолтер Каузман, спираючись на роботи датського біохіміка Кая Ліндерстрем-Ланга, вніс вагомий внесок у розуміння законів утворення третинної структури білків і ролі в цьому процесі гідрофобних взаємодій. У 1949 р. Фредерік Сенгер визначив амінокислотну послідовність інсуліну, продемонструвавши таким способом, що білки – це лінійні полімери амінокислот, а не їх розгалужені (як у деяких цукрів) ланцюги, колоїди або циклоли.

Глава 1. Структура, властивості і функціонування амінокислот

1.1. Будова, властивості і функції амінокислот

У складі білків в організмі людини зустрічаються тільки 20 α -амінокислот. Одні і ті ж амінокислоти присутні в різних за структурою і функціями білках. Індивідуальність білкових молекул визначається порядком чергування амінокислот у білку. Амінокислоти можна розглядати як букви алфавіту, за допомогою яких, як у слові, записується інформація. Послідовність

амінокислот у білку несе інформацію про побудову просторової структури і функції даного білка.

Амінокарбонові кислоти або **амінокислоти** – це органічні сполуки, в молекулі яких одночасно містяться карбоксильні і амінні групи. Амінокислоти можуть розглядатися як похідні карбонових кислот, в яких один або кілька атомів водню замінені на амінні групи. Амінокислоти представляють собою безбарвні кристалічні речовини, добре розчинні у воді. Багато з них мають солодкий смак.

Наявність аміно- і карбоксильної груп, з'єднаних з одним і тим же α -вуглецевим атомом – загальна структурна особливість амінокислот. Радикал амінокислот (R) в простому випадку представлений атомом водню (гліцин), але може мати і більш складну будову.

У водних розчинах при нейтральному значенні рН α -амінокислоти існують у вигляді біполярних іонів.

Існує 20 амінокислот. 19 з 20 амінокислот містять в α -положенні асиметричний атом вуглецю, з яким пов'язані 4 різні заміщаючі групи. В результаті ці амінокислоти в природі можуть знаходитися в двох різних ізомерних формах – L і D. Виняток становить амінокислота гліцин, яка не має асиметричного α -вуглецевого атома, так як її радикал представлений тільки атомом водню.

У складі білків присутні тільки L-ізомери амінокислот. Чисті L-або D-стереоізомери можуть за тривалий термін мимовільно і неферментативно перетворюватися в еквімолярну суміш L- і D-ізомерів. Цей процес називають **рацемізацією**. Рацемізація кожної L-амінокислоти при даній температурі йде з певною швидкістю. Цю обставину можна використовувати для встановлення віку людей і тварин. Так, у твердій емалі зубів є білок дентин, в якому L-аспаратат переходить в D-ізомер при температурі тіла людини зі швидкістю 0,01% на рік. В період формування зубів у дентині міститься тільки L-ізомер, тому за змістом D-аспаратату можна розрахувати вік обстежуваного.

В табл. 5 представлені амінокислоти і їх умовні скорочення.

Амінокислоти і їх умовні скорочення

Амінокислота (кирил.)	Трьохлітерне позначення (кирил.)	Амінокислота (лат.)	Трьохлітерне позначення (лат.)	Однолітерне позначення (лат.)
Аланін	Ала	Alanine	Ala	A
Аргінін	Арг	Arginine	Arg	R
Аспарагін	Асн	Asparagine	Asn	N
Аспартат (аспарагінова кислота)	Асп	Aspartate (aspartic acid)	Asp	D
Валін	Вал	Valine	Val	V
Гістидин	Гіс	Histidine	His	H
Гліцин	Глі	Glycine	Gly	G
Глутамат (глутамінова кислота)	Глу	Glutamine (glutamic acid)	Glu	E
Глутамін	Глн	Glutamine	Gln	Q
Ізолейцин	Іле	Isoleucine	Ile	I
Лейцин	Лей	Leucine	Leu	L
Лізін	Ліз	Lysine	Lys	K
Метіонін	Мет	Methionine	Met	M
Пролін	Про	Proline	Pro	P
Серин	Сер	Serine	Ser	S
Треонін	Тре	Threonine	Thr	T
Тирозин	Тир	Tyrosine	Tyr	Y
Триптофан	Три	Tryptophan	Trp	W
Фенілаланін	Фен	Fenylalanine	Phe	F
Цистеїн	Цис	Cysteine	Cys	C

Всі 20 амінокислот в організмі людини різняться за будовою, розмірами та фізико-хімічними властивостями радикалів, приєднаних до α -вуглецевого атома.

Амінокислоти класифікуються по радикалу, функціональним групам, класах аміноацил-тРНК-синтез, шляхам їх біосинтезу, здатності організму синтезувати їх з попередників та характеру катаболізму.

За радикалом амінокислоти розділяються на чотири групи:

- **неполярні:** гліцин, аланін, валін, ізолейцин, лейцин, пролін, метіонін, фенілаланін і триптофан;
- **полярні незаряджені (заряди скомпенсовані) при рН=7:** серин, треонін, цистеїн, аспарагін, глутамін і тирозин;
- **полярні заряджені негативно при рН<7:** аспартат і глутамат;

➤ **полярні заряджені позитивно при $pH > 7$:** лізин, аргінін і гістидин.

За своєю хімічною будовою амінокислоти розділяються на чотири функціональні групи:

➤ **аліфатичні:**

• **моноаміномонокарбонові:** гліцин, аланін, валін, ізолейцин і лейцин;

• **оксимоноамінокарбонові:** серин і треонін;

• **моноамінодикарбонові:** аспартат і глутамат;

• **аміди моноамінодикарбонових:** аспарагін і глутамін;

• **діаміномонокарбонові:** лізин і аргінін;

• **сіркомістячі:** цистеїн і метіонін;

➤ **ароматичні:** фенілаланін, тирозин і триптофан;

➤ **гетероциклічні:** триптофан, гістидин і пролін;

➤ **імінокислоти:** пролін.

По класах аміноацил-тРНК-синтетаз амінокислоти розділяються на два класи:

➤ **клас I:** валін, ізолейцин, лейцин, цистеїн, метіонін, глутамат, глутамін, аргінін, тирозин і триптофан;

➤ **клас II:** гліцин, аланін, пролін, серин, треонін, аспартат, аспарагін, гістидин і фенілаланін.

Для амінокислоти лізин існують аміноацил-тРНК-синтетази обох класів.

Шляхи біосинтезу протейногенних амінокислот різнопланові. Одна і та ж амінокислота може утворюватися різними шляхами. До того ж абсолютно різні шляхи можуть мати дуже схожі етапи. Проте, мають місце і виправдані спроби класифікувати амінокислоти по шляхам їх біосинтезу. Існує уявлення про наступні біосинтетичні сімейства амінокислот: аспартату, глутамату, серину, пірувату і пентоз. Не завжди конкретну амінокислоту можна однозначно віднести до певного сімейства. Робляться поправки для конкретних організмів та враховується переважаючий шлях. За домами амінокислоти зазвичай розподіляють на п'ять сімейств:

➤ **сімейство аспартату:** аспартат, аспарагін, треонін, ізолейцин, метіонін і лізин;

- **сімейство глутамату:** глутамат, глутамін, аргінін і пролін;
- **сімейство пірувату:** аланін, валін і лейцин;
- **сімейство серину:** серин, цистеїн і гліцин;
- **сімейство пентоз:** гістидин, фенілаланін, тирозин і триптофан.

Фенілаланін, тирозин, і триптофан іноді виділяють в сімейство шикімату.

По здатності організму синтезувати з попередників амінокислоти розділяються на дві групи:

- **незамінні (повинні потрапляти з їжею):** валін, ізолейцин, лейцин, треонін, метіонін, лізин, фенілаланін, триптофан, аргінін і гістидин;
- **замінні (можуть синтезуватися в організмі):** гліцин, аланін, пролін, серин, цистеїн, аспартат, аспарагін, глутамат, глутамін і тирозин.

Класифікація амінокислот на незамінні і замінні не позбавлена недоліків. Наприклад, тирозин є замінною амінокислотою тільки за умови достатнього надходження фенілаланіну. Для хворих фенілкетонурією тирозин стає незамінною амінокислотою. Аргінін синтезується в організмі людини і вважається замінною амінокислотою, але у зв'язку з деякими особливостями його метаболізму при певних фізіологічних станах організму може бути прирівняний до незамінної амінокислоти. Гістидин також синтезується в організмі людини, але не завжди в достатніх кількостях, тому повинен надходити з їжею.

Біодеградація амінокислот може йти різними шляхами. За характером продуктів катаболізму протеїногенні амінокислоти ділять на три групи:

- **глюкогенні** (при розпаді дають метаболіти, не підвищують рівень кетонів тіл, здатні відносно легко ставати субстратом для глюконеогенезу: піруват, α -кетоглутарат, сукциніл-КоА, фумарат, оксалоацетат): гліцин, аланін, валін, пролін, серин, треонін, цистеїн, метіонін, аспартат, аспарагін, глутамат, глутамін, аргінін і гістидин;
- **кетогенні** (розпадаються до ацетил-КоА і ацетоацетил-КоА, що підвищують рівень кетонів тіл у крові і перетворюються в першу чергу у ліпіди): лейцин і лізин;

➤ **глюко-кетогенні** (при розпаді утворюються метаболіти обох типів):
ізолейцин, фенілаланін, тирозин і триптофан.

Функції амінокислот. Значення амінокислот для організму в першу чергу визначається тим, що вони використовуються для синтезу білків, метаболізм яких займає особливе місце в процесах обміну речовин між організмом і зовнішнім середовищем. Пояснюється це тим, що білки входять в усі основні структурні компоненти клітин, тканин і органів, виконують ферментативні функції, беруть участь в перенесенні речовин через мембрани і т.д. Важливу роль в координації роботи всіх систем клітин відіграють білкові гормони. Амінокислоти безпосередньо беруть участь в біосинтезі не тільки білків, але і великої кількості інших біологічно активних сполук, що регулюють процеси обміну речовин в організмі, таких як нейромедіатори і гормони – похідні амінокислот. Амінокислоти служать донорами азоту при синтезі всіх азотовмісних небілкових сполук, в тому числі нуклеотидів, тема, креатину, холіну та інших речовин. Катаболізм амінокислот може служити джерелом енергії для синтезу АТФ. Енергетична функція амінокислот стає значущою при голодуванні, деяких патологічних станах (наприклад, цукровий діабет) і переважно білковому харчуванні. Саме обмін амінокислот здійснює взаємозв'язок різноманітних хімічних перетворень в живому організмі.

Аланін бере участь у створенні енергетичного запасу глюкози в печінці та м'язах у вигляді глікогену. Підтримує рівень глюкози в крові. Використовується як джерело енергії м'язами і клітинами мозку, сприяє відновленню після травм, бере участь в процесі створення імуноглобулінів і антитіл, може прийматися в підвищеному дозуванні перед спортивними тренуваннями для створення запасу енергії.

Аргінін сприяє підйому рівня гормону росту в крові, знижує рівень жиру в організмі, бере участь в процесах росту м'язових клітин, бере участь в утворенні колагену, запобігає фізичній і розумовій втомі, підвищує витривалість, важливий для збереження і збільшення обсягу м'язової тканини, прискорює загоєння травм. Збільшує сперматогенез, бере участь в утворенні насінної рідини, складаючи майже 80% її обсягу. Робить позитивний вплив на

ССС, розширює судини, запобігає появі атеросклеротичних бляшок, нормалізує АТ, стимулює імунну систему.

Аспарагін сприяє перетворенню вуглеводів в м'язову енергію, підвищує активність імунної системи, збільшує опірність організму несприятливим факторам, а також стомленню, підвищує витривалість, нормалізує процеси збудження і гальмування в ЦНС, підвищує детоксикаційну функцію печінки, діє як гепатопротектор. Є критично важливими для росту і розмноження лейкозних клітин при деяких видах лімфолейкозу.

Аспарат відіграє важливу роль в обміні азотистих речовин, бере участь в утворенні піримідинових підстав і сечовини. Аспарагінова кислота, як і аспарагін, є критично важливими для росту і розмноження лейкозних клітин при деяких видах лімфолейкозу.

Валін використовується м'язовою тканиною в якості джерела енергії під час інтенсивних фізичних вправ, бере участь в утворенні і запасанні глікогену, необхідний для відновлення тканини і підтримки азоту в організмі. Валін є одним з головних компонентів в рості і синтезі тканин тіла. Підвищує м'язову координацію і знижує чутливість організму до болю, холоду та спеки.

Гістидин бере участь в синтезі протеїну, сприяє зростанню і відновленню тканин, є попередником глютаміну. Входить до складу мієлінових оболонки, що захищають нервові клітини. Може покращувати і нормалізувати функцію шлунково-кишкового тракту, стимулює утворення гемоглобіну і лейкоцитів. Сприяє покращенню статевої функції, тому що є попередником гістаміну і підсилює статеве збудження. Сприяє виведенню важких металів з організму. З гістидину синтезується карнозин – потужний м'язовий антиоксидант. Гістидин входить до складу активних центрів безлічі ферментів, є попередником в біосинтезі гістаміну. Гістидин – одна з істотних амінокислот, що сприяє зростанню і відновленню тканин.

Гліцин грає важливу роль у синтезі інших амінокислот, нуклеїнових та жовчних кислот в організмі. Необхідний для нормальної діяльності ЦНС, підтримки здоров'я простати, покращує імунну систему, знижує рівень

холестерину, покращує кисневе живлення органів, нормалізує АТ і рівень цукру в крові.

Глутамін є найбільш часто зустрічаємою амінокислотою в тканинах мускулатури. Глутамін служить енергетичним паливом при виснажливій роботі, бере участь в синтезі білків скелетної мускулатури, відповідає за 35% всього азоту, який проникає в м'язи, створює анаболічні умови відновлення і росту м'язів, бере участь у виробленні гормону росту, який сприяє метаболізму жирів в організмі і підтримує зростання м'язової тканини, підсилює синтез тестостерону.

Глутамат нейтралізує шкідливі продукти білкового обміну, зв'язуючись з аміаком і утворюючи глутамін. Особливо важливий цей процес в головному мозку, тому що тканина мозку особливо чутлива до підвищення концентрації аміаку. Глутамінова кислота є збудливим нейротрансмітером в ЦНС. Вона бере участь у підтримці м'язової маси і зменшенні жирових відкладень, впливаючи на гормон росту. Бере участь у метаболізмі цукру і жирів.

Ізолейцин метаболізується в м'язову тканину, необхідний для утворення гемоглобіну і стабілізації рівня цукру в крові. Він широко використовується спортсменами для відновлення м'язової тканини і прискорення процесів вироблення енергії.

Лейцин метаболізується в м'язову тканину, вносить 10% внеску в продукцію енергії під час інтенсивних фізичних вправ, знижує підвищений рівень цукру в крові, сприяє збільшенню виробництва гормону росту, сприяє загоєнню ушкоджень шкіри і кісткової тканини, використовується при токсикозах, захворюваннях печінки та після хірургічних операцій.

Лізин пригнічує розмноження вірусів, утворює карнитин в процесі метаболізму разом з вітаміном С, покращуючи стійкість до стресів і жировий метаболізм, протидіє стомленню, сприяє відновленню кісткової та сполучної тканини, колагену, сприяє абсорбції кальцію, підтримує баланс азоту, бере участь у синтезі антитіл, гормонів, ферментів, альбумінів та детоксикації.

Метіонін перетворює надмірне накопичення жиру печінкою і перетворює його в енергію, є потужним детоксикаційним агентом, виводить важкі метали,

покращує травлення, антиоксидант, знищувач вільних радикалів, сприяє регенерації тканин печінки і нирок, запобігає випаданню волосся і підтримує їх зростання, запобігає стомленню, розщеплює холестерин, забезпечує захист глутатіону, запобігаючи його розпаду при перевантаженні організму токсинами. Бере участь в синтезі карнітину.

Пролін є основним компонентом колагену і сприяє його виробництву, зміцнює суглоби, сухожилля, зв'язки, серцевий м'яз, прискорює загоєння ран.

Серін зміцнює імунну систему. Сприяє нормалізації стану волосся, шкіри, нігтів. Необхідний для повноцінного обміну жирів і ЖК, м'язового зростання. Бере участь у продукції клітинної енергії, ацетилхоліну і глікогену. Перетворюється в цистеїн в процесі метаболізму. Бере участь у біосинтезі гліцину, метіоніну, цистеїну та триптофану.

Треонін бере участь в процесах росту тканин, бере участь в біосинтезі ізoleyцину, сприяє енергообміну в м'язових клітинах, спільно з метіоніном і аспартамом підтримує ліпотропну функцію печінки, знешкоджує токсини, грає важливу роль в утворенні колагену і еластину, підвищує імунітет, бере участь у виробництві антитіл.

Тирозин стимулює вивільнення гормону росту, який в присутності вітаміну В6 збільшує м'язову масу і знижує рівень жиру в тілі. Бере участь у біосинтезі дофаміну і дофамінових рецепторів, адреналіну, гормонів щитовидної залози, меланіну, нейротрансмітерів, що регулюють настрій. Знижує апетит і зменшує жирову масу. Антидепресант, знімає стрес, дратівливість і безсоння. Сприяє функціонуванню наднирників, гіпофіза і щитовидної залози.

Триптофан необхідний для виробництва вітаміну В3 і серотоніну, відповідального за настрій, якість сну і сприйняття болю. Знімає нервову напругу, усуває відчуття тривоги. Є антидепресантом. Нормалізує сон, стабілізує настрій, знижує утворення холестерину, знижує тиск, розширює кровоносні судини, бере участь в синтезі альбумінів і глобулінів, стимулює підйом рівня гормону росту, який необхідний для збільшення м'язової маси та зменшення маси жиру, підвищує опірність стресам, контролює апетит людини і

його вагу. Він знижує тягу до їжі, особливо вуглеводної, сприяє зниженню маси тіла, нормалізує апетит при булімії і анорексії.

Фенілаланін потрібен для синтезу і вивільнення гормону росту, основний елемент у виробництві колагену і сполучної тканини. Є природним біологічним стимулятором мозку, бере участь в утворенні нейротрансмітерів, підвищує працездатність і розумову активність і пам'ять, пригнічує біль та апетит. Фенілаланін – антидепресант. Він покращує настрій, дозволяє справлятися з роздратуванням і почуттям тривоги, зняти напругу, стимулює щитовидну залозу, бере участь в утворенні інсуліну, меланіну (регуляції кольору шкіри), адреналіну, норадреналіну, допаміну, тироксину, дофамінових рецепторів і тирозину. Сприяє виробленню та активізації морфіноподібних гормонів, що об'єднуються в групу ендорфінів – гормонів радості. Допомагає при вітіліго.

Цистеїн необхідний для синтезу інсуліну. Його недолік в організмі веде до підвищення рівня цукру та зниження кількості лейкоцитів, підвищує імунітет, знижує захворюваність респіраторних шляхів, грає важливу роль в утворенні шкірного покриву. Є антиоксидантом. Прискорює загоєння опіків і ран, знижує хворобливість при запаленнях, зміцнює сполучні тканини, сприяє регенерації тканин шкіри і волосся. Обереігає від ожиріння печінку.

Валін, ізолейцин і лейцин складають комплекс амінокислот з розгалуженими ланцюгами – **ВСАА (англ. branched-chain amino acids)**. Ці незамінні амінокислоти в першу чергу метаболізуються у м'язах і становлять 35% всіх амінокислот в них. Вони приймають важливу участь у процесах анаболізму і відновлення, мають антикатаболічну дію. Тобто ВСАА – основний матеріал для побудови нових м'язів. Їх можна розглядати як основне «паливо» для м'язів, яке покращує стан здоров'я і підвищує спортивні показники. ВСАА виконують роль субстратів для синтезу м'язового білка і продукції енергії, служать прекурсорами для синтезу інших амінокислот, особливо аланіну і глютаміну, є метаболічними модуляторами, стимулюють синтез м'язового протеїну за рахунок активації ферментів PI3K і mTOR, пригнічують катаболізм

і руйнування м'язів, стимулюють вироблення анаболічного гормону – інсуліну, спалюють жир за рахунок експресії лептину в адипоцитах за допомогою mTOR.

Комплекс всіх 20 амінокислот і комплекс ВСАА – одні із самих ефективних, популярних і затребуваних спортивних харчових добавок.

1.2. Будова, властивості і функції пептидів

Пептиди (грец. *πέπτος* – живильний) – це сімейство речовин, молекули яких побудовані із залишків α -амінокислот, з'єднаних в ланцюг пептидними (амідними) зв'язками $-C(O)NH-$. Це природні або синтетичні сполуки, що містять десятки, сотні або тисячі мономерних ланок – амінокислот.

Термін пептид був запропонований німецьким хіміком Емілем Фішером, який до 1905 р. розробив загальний метод синтезу пептидів. У 1953 р. американський біохімік Вінсент Дю Виньо синтезував окситоцин – перший поліпептидний гормон. У 1953 р. американським біохіміком Робертом Мерріфілдом був розроблений метод твердофазного пептидного синтезу. За цю методологію у 1984 р. він отримав Нобелівську премію по хімії, а у 1998 р. – приз Асоціації розробників біомолекулярного обладнання за внесок у розвиток біомолекулярних технологій. У 1963 р., на основі твердофазного пептидного синтезу були створені автоматичні синтезатори пептидів. Використання методів синтезу поліпептидів дозволило отримати синтетичний інсулін і деякі ферменти.

На сьогоднішній день відомо більше 1500 видів пептидів, визначено їх властивості та розроблено методи синтезу.

Молекула пептиду – це послідовність амінокислот: два і більше амінокислотних залишків, з'єднаних між собою амідним зв'язком, складають пептид. Кількість амінокислот в пептиді може сильно варіювати. І відповідно до їх кількості розрізняють:

➤ **олігопептиди** – молекули, що містять до десяти амінокислотних залишків, іноді в їх назві згадується кількість амінокислот, що входять до їх складу, наприклад, дипептид, трипептид, пентапептид та ін.;

➤ **поліпептиди** – молекули, до складу яких входить більше десяти амінокислот.

Сполуки, що містять більше ста амінокислотних залишків, зазвичай називаються білками.

Проте цей поділ умовний, деякі молекули, наприклад, гормон глюкагон, який містить лише 29 амінокислот, називають білковим гормоном.

За якісним складом розрізняють наступні пептиди:

➤ **гомомерні пептиди** – сполуки, що складаються тільки з амінокислотних залишків;

➤ **гетеромерні пептиди** – речовини, до складу яких входять також небілкові компоненти.

Пептиди також поділяються за способом зв'язку амінокислот між собою:

➤ **гомодитні** – пептиди, амінокислотні залишки яких з'єднані тільки пептидними зв'язками;

➤ **гетеродитні** пептиди – сполуки, в яких крім пептидних зв'язків зустрічаються ще й дисульфідні, ефірні та тіоефірні зв'язки.

Ланцюжок повторюваних атомів називається пептидним остовом: (-NH-CH-OC-). Ділянка (-CH-) з амінокислотним радикалом утворює з'єднання (-NH-C(R1)H-OC-), зване амінокислотним залишком. N-кінцевий амінокислотний залишок має вільну α -аміногрупу (-NH), в той час як у C-кінцевого амінокислотного залишку вільною є α -карбоксільна група (OC-).

Пептиди розрізняються не тільки за амінокислотним складом, а й за кількістю, а також розташуванню і з'єднанню амінокислотних залишків у поліпептидний ланцюжок. Приклад: Про-Сер-Про-Ала-Гіс і Гіс-Ала-Про-Сер-Про. Незважаючи на однаковий кількісний і якісний склад, ці пептиди мають зовсім різні властивості.

Пептидний (амідний) зв'язок – це вид хімічного зв'язку, що виникає при утворенні білків і пептидів в результаті взаємодії α -аміногрупи (-NH₂) однієї амінокислоти з α -карбоксільною групою (-COOH) іншої амінокислоти. З двох амінокислот (1) і (2) утворюється дипептид (ланцюжок з двох амінокислот) і молекула води.

За цією ж схемою рибосома генерує і більш довгі ланцюжки з амінокислот: поліпептиди і білки. Різні амінокислоти, які є «будівельними блоками» для білка, відрізняються радикалом R.

Петидний зв'язок дуже міцний, і в нормальних клітинних умовах (37°C, нейтральний рН) мимоволі не розривається. Пептидний зв'язок руйнується при дії на нього спеціальних протеолітичних ферментів (англ. protein – білок і lysis – руйнування) – протеаз і пептидгідролаз.

Кількість амінокислотних залишків у структурі біологічно активних пептидів може варіювати від 3 до 50. До одних з найбільш маленьких пептидів можна віднести ті-реотропін-релізинг-гормон і глутатіон (трипептиди), а також енкефаліни, які мають у своєму складі 5 амінокислот. Однак більшість біологічно активних пептидів має в своєму складі більше 10 амінокислот, наприклад нейропептид Y (регулятор апетиту) містить 36 амінокислот, а кортіколіберин – 41 амінокислоту.

Деякі з пептидів, зокрема більшість пептидних гормонів, містять пептидні зв'язки, утворені α -аміногрупою і α -карбоксыльною групою сусідніх амінокислот. Як правило, вони синтезуються з неактивних білкових попередників, в яких специфічні протеолітичні ферменти руйнують певні пептидні зв'язки.

Зміна в амінокислотному складі пептидів часто призводить до втрати одних і виникнення інших біологічних властивостей.

В організмі людини виробляється безліч пептидів, що беруть участь в регуляції різних біологічних процесів і володіють високою фізіологічною активністю. Функції пептидів залежать від їх первинної структури.

Відкриті і вивчені в даний час пептиди можна розділити на групи за їх основною фізіологічною дією:

- пептиди, що володіють гормональною активністю (окситоцин, вазопресин, релізинг-гормони гіпоталамуса, меланоцитстимулюючий гормон, глюкагон та ін.);
- пептиди, що регулюють процеси травлення (гастрин, холецистокінін, вазоінтестінальний пептид, шлунковий інгібуючий пептид та ін.);

- пептиди, що регулюють тонус судин і АТ (брадикінін, калідін, ангіотензин II);
- пептиди, що регулюють апетит (лептин, нейропептид Y, меланоцитстимулюючий гормон, α -ендорфіни);
- пептиди, що володіють знеболюючою дією (енкефаліни, ендорфіни та інші опіоїдні пептиди). Знеболюючий ефект цих пептидів в сотні разів перевершує анальгезуючий ефект морфіну;
- пептиди, які беруть участь у регуляції ВНД, в біохімічних процесах, пов'язаних з механізмами сну, навчання, пам'яті, виникнення почуття страху і т.д.

Однак такий розподіл пептидів вкрай умовний. З'явилися дані про те, що багато пептидів мають широкий спектр дії. Так, меланоцитстимулюючий гормон, крім стимуляції пігментоутворення, бере участь у регуляції апетиту (разом з лептином пригнічує споживання їжі і є антагоністом нейропептида Y). У той же час α -ендорфіни, крім анальгезуючого ефекту підсилюють споживання їжі, тобто є синергістами нейропептида Y. Вазопресин, крім антидіуретичного і судинозвужувального ефекту, має властивість покращувати пам'ять.

1.3. Біосинтез амінокислот

В організмі людини можливий синтез восьми замінних амінокислот: аланіну, аспартату, аспарагіну, серину, гліцину, глутамату, глутаміну і проліну. Вуглецевий скелет цих амінокислот утворюється з глюкози. α -аміногрупа вводиться у відповідні α -кетокислоти в результаті реакцій трансамінування. Універсальним донором α -аміногрупи служить глутамат. Шляхом трансамінування α -кетокислот, що утворюються з глюкози, синтезуються амінокислоти. Глутамат також утворюється при відновлювальному амінуванні α -кетоглутарату глутаматдегідрогенази. Ці реакції оборотні і відіграють велику роль як в процесі синтезу амінокислот, так і при їх катаболізмі. Такі реакції, які виконують подвійну функцію, називають амфіболічними.

Аміди глутамін і аспарагін синтезуються з відповідних дикарбонових амінокислот – глутаміну і аспарагіну.

Серин утворюється з 3-фосфогліцерата – проміжного продукту гліколізу, який окислюється до 3-фосфопірувата і потім трансамінується з утворенням серина.

Гліцин синтезується двома шляхами:

- з серину за участю похідного фолієвої кислоти в результаті дії сериноксиметилтрансферази;
- в результаті дії ферменту гліцинсинтази.

Пролін синтезується з глутамату в ланцюзі оборотних реакцій. Ці ж реакції використовуються і при катаболізмі проліта.

Крім восьми перерахованих замісних амінокислот, в організмі людини можуть синтезуватися ще чотири амінокислоти. Частково замісні амінокислоти аргінін і гістидин синтезуються складним шляхом в невеликих кількостях. Велика їх частина повинна надходити з їжею. Синтез аргініну відбувається в реакціях орнітинового циклу. Гістидин синтезується з АТФ і рибози. Частина імідазольного циклу гістидину утворюється з пуринового ядра аденіну, джерелом якого служить АТФ, інша частина молекули – з атомів рибози. При цьому утворюється 5-фосфорибозіламін, який окрім синтезу гістидину необхідний для синтезу пуринів. Для синтезу умовно замісних амінокислот тирозину і цистеїну потрібні незамінні амінокислоти фенілаланін і метіонін відповідно. Утворення інших амінокислот також можливе при наявності відповідних α -кетокислот, які можуть трансамінуватися з глутамату. Таким чином, незамінною частиною молекули амінокислот є їх вуглецевий скелет. Джерелом таких незамінних α -кетокислот служать тільки білки їжі. Виняток становлять лізин і треонін, які не піддаються трансамінуванню, їх α -кетоаналогі з їжею практично не надходять і в організмі не синтезуються. Єдине джерело цих амінокислот – харчові білки.

Контрольні питання

1. Що вивчає протеоміка?

2. Що представляють собою амінокислоти?
3. Скільки амінокислот існує?
4. Перерахуйте відомі Вам амінокислоти.
5. Яким чином класифікують амінокислоти?
6. Наведить класифікацію амінокислот.
7. Опишіть функції кожної амінокислоти.
8. Що таке пептиди?
9. Яким чином класифікують пептиди?
10. Що представляє собою пептидний зв'язок?
11. Які групи пептидів Ви знаєте?
12. Опишіть шляхи біосинтезу амінокислот.

Глава 2. Структура, властивості і функціонування білків

Білки (протеїни або поліпептиди) – це високомолекулярні органічні речовини, що складаються із сполучених в ланцюжок пептидним зв'язком α -амінокислот. В живих організмах амінокислотний склад білків визначається генетичним кодом, при синтезі в більшості випадків використовується 20 стандартних амінокислот. Безліч їх комбінацій дають велику різноманітність властивостей молекул білків. Крім того, амінокислоти у складі білка часто піддаються посттрансляційним модифікаціям, які можуть виникати і до того, як білок починає виконувати свою функцію, і під час його роботи в клітині. Часто в живих організмах кілька молекул білків утворюють складні комплекси, наприклад, фотосинтетичний комплекс.

Білки класифікують за наступними параметрами:

- **за формою молекул:** глобулярні і фібрилярні;
- **по молекулярній масі:** низькомолекулярні, високомолекулярні, тощо;
- **за хімічною будовою:** наявність або відсутність небілкової частини;
- **по виконуванім функціям:** транспортні, захисні, структурні і ін.;
- **по локалізації в клітині:** ядерні, цитоплазматичні, лізосомальні, тощо;
- **по локалізації в організмі:** білки крові, печінки, серця, тощо;
- **по можливості адаптивно регулювати кількість даних білків:** білки, що синтезуються з постійною швидкістю (конститутивні) і білки, синтез яких може посилюватися при впливі факторів середовища (індуцібельні);
- **за тривалістю життя в клітині:** від дуже швидко оновлюючихся білків (менше 1 год.) до дуже повільно оновлюючихся білків (тижні і місяці);
- **за схожими ділянками первинної структури і спорідненими функціями (сімейства білків).**

За хімічною будовою білки класифікуються на дві групи:

- **прості білки або протеїни;**
- **складні білки або протеїди.**

Протеїни побудовані із залишків α -амінокислот і при гідролізі розпадаються тільки на амінокислоти. По просторовій будові і розчинності протеїни поділяють на:

- **глобулярні** – водорозчинні білки, загальна форма молекули більш-менш сферична:
- **альбуміни** – розчинні у воді в широкому інтервалі (рН від 4 до 8,5), осідають 70-100%-ним розчином сульфату амонію;
- **поліфункціональні глобуліни** з великою молекулярною масою, важче розчинні у воді, розчинні в сольових розчинах, часто містять вуглеводну частину;
- **гістони** – низькомолекулярні білки з високим вмістом в молекулі залишків аргініну і лізину, що обумовлює їх основні властивості;
- **протаміни** відрізняються ще більш високим вмістом аргініну (до 85%), як і гістони, утворюють стійкі асоціати з нуклеїновими кислотами, виступають як регуляторні та репресорні білки – складова частина нуклеопротеїнів;
- **проламіни** характеризуються високим вмістом глютамінової кислоти (30-45%) і проліну (до 15%), нерозчинні у воді, розчиняються в 50-90% етанолі;
- **глутеліни** містять близько 45% глютамінової кислоти.
- **фібрилярні** – утворюють полімери, їх структура зазвичай високорегулярна і підтримується, в основному, взаємодіями між різними ланцюгами. Вони утворюють мікрофіламенти, мікротрубочки, фібрили, підтримують структуру клітин і тканин. Протеїди представляють собою двокомпонентні білки, в яких крім пептидних ланцюгів (простого білка) міститься компонент не амінокислотної природи – простетична група. При гідролізі складних білків, окрім вільних амінокислот, звільняється небілкова частина або продукти її розпаду. В якості простетичної групи можуть виступати різні органічні (вуглеводи і ліпіди) та неорганічні (метали) речовини.

Серед протеїдів виділяють наступні основні класи:

- **глікопротеїди**, що містять в якості простетичної групи ковалентно пов'язані вуглеводні залишки та їх підклас – протеоглікани, з мукополісахарідними простетичними групами. В утворенні зв'язку з вуглеводними залишками

зазвичай беруть участь гідроксильні групи серину або треоніну. Велика частина позаклітинних білків, зокрема, імуноглобуліни – глікопротеїди. В протеогліканах вуглеводна частина складає ~95%, вони є основним компонентом міжклітинного матриксу;

- **ліпопротеїди**, що містять в якості простетичної частини нековалентно пов'язані ліпіди. Ліпопротеїди, утворені білками-аполіпопротеїнами зв'язуються з ними ліпідами і виконують функцію транспорту ліпідів;
- **металопротеїди**, що містять негемові координаційно пов'язані іони металів. Серед металопротеїдів є білки, які виконують депонуючі і транспортні функції (наприклад, залізовмісні феритин і трансферин) і ферменти (наприклад, цинковмісні карбоангідраза і різні супероксиддисмутази, що містять в якості активних центрів іони міді, марганцю, заліза та інших металів);
- **нуклеопротеїди**, що містять нековалентно пов'язані ДНК або РНК, зокрема, хроматин, з якого складаються хромосоми, є нуклеопротеїдом;
- **фосфопротеїди**, що містять в якості простетичної групи ковалентно пов'язані залишки фосфорної кислоти. В утворенні складноєфірного зв'язку з фосфатом беруть участь гідроксильні групи серину або треоніну, фосфопротеїном є, зокрема, казеїн молока;
- **хромопротеїди** – збірна назва складних білків з забарвленими простетичними групами різної хімічної природи. До них відноситься безліч білків з металомістячою порфіриною простетичною групою, що виконують різноманітні функції – гемопротеїни (білки, що містять в якості простетичної групи гем – гемоглобін, цитохроми та ін.), хлорофіли, флавопротеїди з флавіною групою та ін.

Білки мають дуже складну будову. Пептидні ланцюги містять десятки, сотні і тисячі амінокислотних залишків, з'єднаних міцними пептидними зв'язками. За рахунок внутрішньомолекулярних взаємодій білки утворюють певну просторову структуру, яка називається **конформацією білків**. Лінійна послідовність амінокислот у білку містить інформацію про побудову тривимірної просторової структури. Розрізняють 4 рівня структурної

організації білків, які називаються первинною, вторинною, третинною та четвертинною структурами.

Існують загальні правила, за якими йде формування просторових структур білків.

Первинна структура білка. Амінокислотні залишки в пептидному ланцюгу білків чергуються не випадковим чином, а розташовані в певному порядку. Лінійну послідовність амінокислотних залишків в поліпептидному ланцюгу називають **первинною структурою білка**.

Первинна структура кожного індивідуального білка закодована в певному гені. У процесі синтезу білка, тобто трансляції, інформація, що знаходиться в гені, спочатку переписується на мРНК, а потім, використовуючи мРНК в якості матриці, на рибосомі відбувається збірка первинної структури білка (див. розд. II, гл. 5.1.3). Кожен з 50000 індивідуальних білків організму людини має унікальну для даного білка первинну структуру. Всі молекули даного індивідуального білка мають однакове чергування амінокислотних залишків у білку, що в першу чергу відрізняє даний індивідуальний білок від будь-якого іншого.

Лінійні поліпептидні ланцюги індивідуальних білків за рахунок взаємодії функціональних груп амінокислот набувають певну просторову тривимірну структуру, яка називається **конформацією білка**. Всі молекули індивідуальних білків (тобто тих, що мають однакову первинну структуру) утворюють в розчині однакову конформацію. Отже, вся інформація, необхідна для формування просторових структур, знаходиться в первинній структурі білків. У білках розрізняють два основних типи конформації поліпептидних ланцюгів: вторинну і третинну структури.

Вторинна структура білка. **Вторинна структура білка** – просторова структура, що утворюється в результаті взаємодій між функціональними групами, що входять до складу пептидного кістяка. При цьому пептидні ланцюги можуть набувати регулярні структури двох типів: α -спіраль і β -структуру.

α -спіраль. В даному типі структури пептидний остов закручується у

вигляді спіралі за рахунок утворення водневих зв'язків між атомами кисню карбонільних груп і атомами азоту аміногруп, що входять до складу пептидних груп через 4 амінокислотних залишки. Водневі зв'язки орієнтовані уздовж осі спіралі. На один виток α -спіралі доводиться 3,6 амінокислотних залишки.

В утворенні водневих зв'язків беруть участь практично всі атоми кисню і водню пептидних груп. В результаті α -спіраль стягується безліччю водневих зв'язків. Незважаючи на те, що дані зв'язки відносять до розряду слабких, їх кількість забезпечує максимально можливу стабільність α -спіралі. Так як все гідрофільні групи пептидного остову зазвичай беруть участь в утворенні водневих зв'язків, гідрофільність (тобто здатність утворювати водневі зв'язки з водою) α -спіралей зменшується, а їх гідрофобність збільшується.

α -спіральна структура – найбільш стійка конформація пептидного остова, що відповідає мінімуму вільної енергії. В результаті утворення α -спіралей поліпептидний ланцюг коротшає, але якщо створити умови для розриву водневих зв'язків, поліпептидний ланцюг знову подовжиться. Радикали амінокислот знаходяться на зовнішній стороні α -спіралі і спрямовані від пептидного остову в сторони. Вони не беруть участь в утворенні водневих зв'язків, характерних для вторинної структури, але деякі з них можуть порушувати формування α -спіралі.

β -структура. β -структура формується за рахунок утворення безлічі водневих зв'язків між атомами пептидних груп лінійних областей одного поліпептидного ланцюга, що робить вигини, або між різними поліпептидними ланцюгами. β -структура утворює фігуру, подібну листу, складеному «гармошкою» – **β -складчастий шар.**

Коли водневі зв'язки утворюються між атомами пептидного остова різних поліпептидних ланцюгів, їх називають межланцюговими зв'язками. Водневі зв'язки, що виникають між лінійними ділянками всередині одного поліпептидного ланцюга, називають внутріланцюговими. В α -структурах водневі зв'язки розташовані перпендикулярно поліпептидного ланцюга. Якщо пов'язані поліпептидні ланцюги спрямовані протилежно, виникає

антипаралельна β -структура, якщо ж N- і C-кінці поліпептидних ланцюгів збігаються, утворюється **структура паралельного β -складчастого шару**.

На відміну від α -спіралей, розрив водневих зв'язків, що формують β -структури, не викликає подовження даних ділянок поліпептидних ланцюгів.

Нерегулярні вторинні структури. У білках відзначають області з нерегулярною вторинною структурою, які часто називають безладними клубками. Вони представлені петлеподібними і кільцеподібними структурами, що мають меншу регулярність укладання, ніж описані вище α -спіраль і β -структура. Однак і вони не так сильно варіюють від однієї молекули білка до іншої. У кожному індивідуальному білку вони мають свою фіксовану конформацію, яка визначається амінокислотним складом даної ділянки ланцюга та оточуючих його ділянок. Терміном безладний клубок також часто називають денатурований білок, що утворився після розриву слабких внутрішньомолекулярних зв'язків і втратив свою впорядковану структуру.

Третинна структура білка. Третинна структура білка – це тривимірна просторова структура, що утворюється за рахунок взаємодій між радикалами амінокислот, які можуть розташовуватися на значній відстані один від одного в поліпептидному ланцюгу. У її утворенні приймають участь елементи вторинної структури – α -спіраль і β -структура.

У формуванні третинної структури білків беруть участь наступні зв'язки:

➤ **гідрофобні взаємодії.** При укладанні поліпептидний ланцюг білка прагне прийняти енергетично вигідну форму, що характеризується мінімумом вільної енергії. Тому гідрофобні радикали амінокислот прагнуть до об'єднання всередині глобулярної структури розчинних у воді білків. Між ними виникають так звані гідрофобні взаємодії, а також сили Ван-дер-Ваальса між близько прилеглими один до одного атомами. В результаті всередині білкової глобули формується гідрофобне ядро. Гідрофільні групи пептидного остову при формуванні вторинної структури утворюють безліч водневих зв'язків, завдяки чому виключається зв'язування з ними води та руйнування внутрішньої, щільної структури білка;

- **іонні та водневі зв'язки.** Гідрофільні радикали амінокислот прагнуть утворити водневі зв'язки з водою і тому в основному розташовуються на поверхні білкової молекули. Всі гідрофільні групи радикалів амінокислот, що опинилися всередині гідрофобного ядра, взаємодіють один з одним за допомогою іонних і водневих зв'язків. Іонні зв'язки можуть виникати між негативно зарядженими (аніонними) карбоксильними групами радикалів аспарагінової і глутамінової кислот і позитивно зарядженими (катионними) групами радикалів лізину, аргініну або гістидину. Водневі зв'язки виникають між гідрофільними незарядженими групами (такими як -ОН, -CONH₂, SH-групи) і будь-якими іншими гідрофільними групами. Білки, що функціонують в неполярному (ліпідному) оточенні, наприклад білки мембран, мають зворотний пристрій: гідрофільні радикали амінокислот розташовані всередині білка, в той час як гідрофобні амінокислоти локалізовані на поверхні молекули і контактують з неполярним оточенням. У кожному разі радикали амінокислот займають найбільш вигідне біоенергетичне положення;
- **ковалентні зв'язки.** Третинну структуру деяких білків стабілізують дисульфідні зв'язки, які утворюються за рахунок взаємодії SH-груп двох залишків цистеїну. Ці два залишки цистеїну можуть знаходитися далеко один від одного в лінійній первинній структурі білка, але при формуванні третинної структури вони зближуються і утворюють міцне ковалентне зв'язування радикалів. Більшість внутрішньоклітинних білків позбавлене дисульфідних зв'язків. Однак такі зв'язки поширені в білках, що секретуються клітинами в позаклітинний простір. Вважають, що ці ковалентні зв'язки стабілізують конформацію білків поза клітини і запобігають їх денатурації. До таких білків відносять гормон інсулін і імуноглобуліни.

Всі білки з однаковою первинною структурою, що знаходяться в однакових умовах, набувають однакову, характерну для даного індивідуального білка конформацію, що визначає його специфічну функцію. Функціонально активну конформацію білка називають **нативною структурою**.

Підтримання характерної для білка конформації можливо завдяки виникненню безлічі слабких зв'язків між різними ділянками поліпептидного ланцюга. Однак білки складаються з величезного числа атомів, що знаходяться в постійному (броунівському) русі, що призводить до невеликих переміщень окремих ділянок поліпептидного ланцюга, які зазвичай не порушують загальну структуру білка і його функції. Отже, білки мають конформаційну лабільність – схильність до невеликих змін конформації за рахунок розриву одних і утворення інших слабких зв'язків. Конформація білка може змінюватися при зміні хімічних і фізичних властивостей середовища, а також при взаємодії білка з іншими молекулами. При цьому відбувається зміна просторової структури не тільки ділянки, що контактує з іншою молекулою, а й конформація білка в цілому. Конформаційні зміни відіграють величезну роль у функціонуванні білків у живій клітині.

Денатурація білків. Розрив великої кількості слабких зв'язків у молекулі білка призводить до руйнування її нативної конформації. Так як розрив зв'язків під дією різних факторів носить випадковий характер, то молекули одного індивідуального білка набувають у розчині форму випадково сформованих безладних клубків, що відрізняються один від одного тривимірною структурою. Втрата нативної конформації супроводжується втратою специфічної функції білків. Цей процес носить назву **денатурації білка**.

При денатурації білка не відбувається розриву пептидних зв'язків, тобто первинна структура білка не порушується. В денатурованому білку гідрофобні радикали, які в нативній структурі молекули заховані усередині гідрофобного ядра, виявляються на поверхні. При досить високій концентрації білка і відсутності сильного відштовхуючого заряду молекули можуть об'єднуватися один з одним гідрофобними взаємодіями, при цьому розчинність білка знижується і відбувається утворення осаду. Компактна, щільна просторова структура нативного білка при денатурації різко збільшується в розмірах і стає легко доступною для розщеплення пептидних зв'язків протеолітичними ферментами. Денатурацію білків викликають чинники, що сприяють розриву гідрофобних, водневих та іонних зв'язків, що стабілізують конформацію білків:

- **висока температура** (понад 50°C), що збільшує тепловий рух атомів в молекулі і призводить до розриву слабких зв'язків;
- **інтенсивне струшування розчину**, що приводить до зіткнення білкових молекул з повітряним середовищем на поверхні розділу фаз і зміни конформації цих молекул;
- **органічні речовини** (наприклад, етиловий спирт, фенол і його похідні) здатні взаємодіяти з функціональними групами білків, що призводить до їх конформаційних змін. Для денатурації білків у біохімічних дослідженнях часто використовують сечовину або гуанідінхлорид, які утворюють водневі зв'язки з аміно- та карбонільними групами пептидного остова і деякими функціональними групами радикалів амінокислот. Відбувається розрив зв'язків, які беруть участь у формуванні вторинної та третинної структури нативних білків, і утворення нових зв'язків з хімічними реагентами;
- **кислоти і луги**, змінюючи рН середовища, викликають перерозподіл зв'язків у молекулі білка;
- **солі важких металів** (такі як мідь, ртуть, срібло, свинець та ін.) утворюють міцні зв'язки з важливими функціональними групами білків (найчастіше з -SH), змінюючи їх конформацію і активність;
- **детергенти** – речовини, що містять гідрофобний вуглеводневий радикал і гідрофільну функціональну групу (такі речовини називають амфифільними). Гідрофобні радикали білків взаємодіють з гідрофобними частинами детергентів, що змінює конформацію білків. Денатурований під дією детергентів білок зазвичай залишається в розчиненому вигляді, так як гідрофільні частини денатуруючої речовини утримують його в розчині. До найбільш відомих детергентів відносять різні мила.

Супервторинна структура білка. Просторова структура кожного білка індивідуальна і визначається його первинною структурою. Однак порівняння конформацій різних за структурою і функціями білків виявило наявність у них схожих сполучень елементів вторинної структури. Такий специфічний порядок формування вторинних структур називають **супервторинною структурою білка**. Супервторинна структура білка формується за рахунок міжрадикальних

взаємодій. Певні характерні поєднання α -спіралей і β -структур часто позначають як «**структурні мотиви**». Специфічне просторове розташування α -спіралей і β -структур формується за рахунок міжрадикальних взаємодій.

- **супервторинна структура типу β -бочонка.** Така структура дійсно нагадує бочонок, де кожна β -структура розташована всередині і пов'язана з α -спіральною ділянкою поліпептидного ланцюга, що знаходяться на поверхні молекули. Супервторинну структуру у вигляді β -бочонка мають деякі ферменти, наприклад тріозофосфатізомераза і один домен піруваткінази.
- **супервторинна структура типу α -спіраль-поворот- α -спіраль.** Цей структурний мотив виявлено в багатьох ДНК-зв'язуючих білках. Великий жолобок ДНК добре пристосований для зв'язування білків, що мають невеликі спіральні ділянки. В даний структурний мотив входять дві α -спіралі – одна коротша, інша довша, які з'єднані поворотом поліпептидного ланцюга. Більш коротка α -спіраль розташовується впоперек жолобка, а довша – у великому жолобку, утворюючи нековалентні специфічні зв'язки радикалів амінокислот з нуклеотидами ДНК.
- **супервторинна структура у вигляді «цинкового пальця».** Цей вид супервторинної структури також часто відзначають в ДНК-зв'язуючих білках. «**Цинковий палець**» – фрагмент білка, що містить близько 20 амінокислотних залишків, в якому атом цинку пов'язаний з радикалами чотирьох амінокислот: звичайно з двома залишками цистеїну і двома – гістидину. В деяких випадках замість залишків гістидину також знаходяться залишки цистеїну. Два близько лежачих залишку цистеїну відділені від двох інших залишків гістидину (або цистеїну) амінокислотою послідовністю, що складається приблизно з 12 амінокислотних залишків. Ця ділянка білка утворює α -спіраль, яка може специфічно зв'язуватися з регуляторними ділянками великого жолобка ДНК. Специфічність взаємодії ДНК-зв'язуючого білка з певною областю ДНК залежить від послідовності амінокислотних залишків, розташованих в області «цинкового пальця».
- **супервторинна структура у вигляді «лейцинової застібки-блискавки».** Деякі ДНК-зв'язуючі білки олігомерні, тобто містять в своєму складі кілька

поліпептидних ланцюгів. Крім того, існують білки, які функціонують в комплексі з іншими білками. Об'єднання протомерів або окремих білків в комплекси іноді здійснюється за допомогою структурних мотивів, званих «лейциновою застібкою-блискавкою». На поверхні кожного з двох взаємодіючих поліпептидних ланцюгів або білків є α -спіральна ділянка, що містить принаймні 4 залишки лейцину. Лейцинові залишки розташовуються через кожні 6 амінокислот один від одного. Так як кожен виток α -спіралі містить 3,6 амінокислотних залишки, радикали лейцину знаходяться на поверхні кожного другого витка. Лейцинові залишки α -спіралі одного білка можуть взаємодіяти з лейциновими залишками іншого білка за допомогою гідрофобних взаємодій, поєднуючи їх разом. Прикладом з'єднання білків за допомогою «лейцинної застібки-блискавки» можуть служити гістони, до складу яких входить велика кількість позитивно заряджених амінокислот – аргініну і лізину. Молекули гістонів об'єднуються в комплекси, що складаються з 8 мономерних білків за допомогою «лейцинових застібок-блискавок», незважаючи на те, що всі мономери мають сильний позитивний заряд.

Доменна структура білка. Якщо поліпептидний ланцюг білка містить більше 200 амінокислот, як правило, його просторова структура сформована у вигляді двох або більше доменів. **Домен** – це ділянка поліпептидного ланцюга, яка в процесі формування просторової структури придбала незалежно від інших ділянок того ж ланцюга конформацію глобулярного білка.

Так, легкий ланцюг імуноглобуліну G складається з двох доменів. В деяких випадках доменами називають окремі структурні ділянки поліпептидного ланцюга.

Четвертинна структура білка. Багато білків містять у своєму складі лише один поліпептидний ланцюг. Такі білки називають **мономерами**. До мономерних білків відносять і білки, що складаються з декількох кіл, але з'єднаних ковалентно, наприклад дисульфідними зв'язками (тому інсулін слід розглядати як мономерний білок). У той же час існують білки, що складаються з двох і більше поліпептидних ланцюгів. Після формування тривимірної

структури кожного поліпептидного ланцюга вони об'єднуються за допомогою тих же слабких взаємодій, які брали участь в утворенні третинної структури: гідрофобних, іонних та водневих. Кількість і взаєморозташування поліпептидних ланцюгів у просторі називають **четвертинною структурою білка**.

Окремі поліпептидні ланцюги в такому білку носять назву **протомерів**, або **субодиниць**. Білок, що містить в своєму складі кілька протомерів, називають **олігомерним**. До складу олігомерних білків може входити від двох до декількох десятків протомерів, хоча найбільш часто зустрічають білки, що містять від двох до чотирьох поліпептидних ланцюгів (димерні і тетрамерні білки). В таблиці 5 наведена номенклатура четвертинної структури білків.

Таблиця 6

Номенклатура четвертинної структури білків

Кількість протомерів (субодиниць)	Назва білка	Кількість протомерів (субодиниць)	Назва білка
1	Мономер	13	Тридекамер
2	Димер	14	Тетрадекамер
3	Тример	15	Пентадекамер
4	Тетрамер	16	Гексадекамер
5	Пентамер	17	Гептадекамер
6	Гексамер	18	Октадекамер
7	Гептамер	19	Нонадекамер
8	Октамер	20	Ейкозамер
9	Нонамер	21	21-мер
10	Декамер	22	22-мер
11	Ундекамер	23	23-мер
12	Додекамер	-	-

Олігомерні білки мають велику молекулярну масу. Білки з молекулярної масою більше 50000Д практично завжди містять кілька мономерних поліпептидних ланцюгів. У порівнянні з індивідуальними мономерними білками олігомери виконують більш складні функції.

Розпізнавання і приєднання окремих протомерів олігомерного білка відбуваються завдяки формуванню на їх поверхні контактних ділянок. Останні складаються з радикалів амінокислот, зібраних в даному місці в процесі утворення третинної структури білка. Сукупність цих радикалів формує

унікальні поверхні, здатні з високою специфічністю об'єднуватися один з одним. Специфічність зв'язування контактних ділянок визначається їх комплементарністю. Западини і виступи на поверхні однієї молекули повинні збігатися з виступами і западинами на поверхні іншої молекули, як два шматки нерівно розірваного паперу. Крім того, функціональні групи радикалів амінокислот на одній контактуючій поверхні повинні утворювати слабкі хімічні зв'язки з радикалами амінокислот на іншій поверхні. В області контактних поверхонь зазвичай міститься багато гідрофобних радикалів амінокислот, в результаті об'єднання яких формується гідрофобне ядро олігомерного білка. Гідрофільні радикали можуть утворювати водневі та іонні зв'язки. Таким чином, взаємодія протомерів здійснюється в багатьох точках контактуючих поверхонь, з утворенням десятків слабких зв'язків. Завдяки цьому контактні поверхні з'єднуються з високою специфічністю, і помилки формування четвертинної структури білків практично виключені.

Контрольні питання

1. Що представляє собою білки?
2. За якими параметрами класифікують білки?
3. На скільки груп за хімічною будовою класифікуються білки. Що це за групи?
4. Які класи протеїдів Вам відомі?
5. Що таке конформація білків?
6. Опишіть первинну структуру білка.
7. Що представляє собою вторинна структура білка?
8. Наведить характеристики третинної структури білка.
9. Які зв'язки беруть участь у формуванні третинної структури білків?
10. Що представляє собою денатурація білків?
11. Що Вам відомо про супервторинну структуру білка?
12. Які види супервторинної структури білка існують?
13. Що таке доменна структура білка?
14. Опишіть четвертинну структуру білка.

15. Що таке олігомерний білок?

Глава 3. Фолдінг білків

Формування тривимірної структури білків – найважливіший біологічний процес, так як від просторової структури білків залежить їх біологічна функція.

Процес згортання поліпептидного ланцюга в правильну просторову структуру отримав назву **фолдінгу білків**. Індивідуальні білки, продукти одного гена, мають ідентичну амінокислотну послідовність і набувають в однакових умовах клітини однакову конформацію і функцію. Це положення підтверджується здатністю деяких білків після денатурації (при якій відбувається розрив слабких зв'язків, але не пошкоджується первинна структура білків) спонтанно відновлювати свою унікальну конформацію і функцію.

Довгий час вважалося, що процес денатурації білків незворотній. Однак виявилось, що деякі очищені і денатуровані білки здатні в дослідних умовах відновлювати конформацію при видаленні денатуруючих агентів. На початку 60-х рр. ХХ ст. виявили, що процес денатурації білків може бути оборотним. Це відкриття було зроблено при вивченні денатурації рибонуклеази – ферменту, що розщеплює зв'язки між нуклеотидами в РНК. Рибонуклеаза – глобулярний білок, що містить один поліпептидний ланцюг, що складається з 124 амінокислотних залишків. Його конформацію стабілізують 4 дисульфідні і безліч слабких зв'язків. Однак якщо шляхом діалізу очистити рибонуклеазу від денатуруючих агентів, ферментативна активність білка поступово відновлюється. Цей процес називається **ренатурацією**, або **ренативацією білка**.

Однак у клітині концентрація білків настільки висока, що існує велика ймовірність взаємодії білків з несформованою конформацією. На їх поверхні розташовуються гідрофобні радикали, схильні до об'єднання. Тому для багатьох білків, що мають високу молекулярну масу і складну просторову структуру, фолдінг протікає за участю спеціальної групи білків, які носять назву **шаперонів (франц. chaperon – няня)**.

У процесі синтезу поліпептидних ланцюгів, транспорту їх через мембрани, при складанні олігомерних білків виникають проміжні нестабільні конформації, схильні до агрегації. На знову синтезованому поліпептиді є безліч гідрофобних радикалів, які в тривимірній структурі заховані усередині молекули. Тому на час формування нативної конформації реакційно-здатні амінокислотні залишки одних білків повинні бути відокремлені від таких же груп інших білків. Шаперони представляють собою виявлені білки, здатні зв'язуватися з білками, що знаходяться в нестійкому, схильному до агрегації стані. Вони здатні стабілізувати їх конформацію, забезпечуючи фолдінг білків.

Серед шаперонів розрізняють:

- **конститутивні** (високий базальний синтез яких не залежить від стресових впливів на клітини організму);
- **індуцібельні**, синтез яких в нормальних умовах йде слабо, але при стресових впливах на клітину різко збільшується. Індуцібельні шаперони відносять до білків теплового шоку (вперше ці білки були виявлені в клітинах, які піддавалися впливу високої температури) – **HSP (англ. heat shock protein)**, швидкий синтез яких відзначають практично у всіх клітинах, які піддаються будь-яким стресовим впливам.

Відповідно до молекулярної маси всі шаперони можна розділити на 6 основних груп:

- **Високомолекулярні** – з молекулярною масою від 100 до 110 кД;
- **Ш-90 (Hsp90)** – з молекулярною масою від 83 до 90 кД;
- **Ш-70 (Hsp70)** – з молекулярною масою від 66 до 78 кД;
- **Ш-60 (Hsp60)**;
- **Ш-40 (Hsp40)**;
- **низькомолекулярні** – з молекулярною масою від 15 до 30 кД.

При синтезі білків N-кінцева область поліпептиду синтезується раніше, ніж C-кінцева. Для формування конформації білка потрібна його повна амінокислотна послідовність. Тому в період синтезу білка на рибосомі захист реакційно-здатних радикалів (особливо гідрофобних) здійснюють шаперони Ш-70.

Ш-70 – висококонсервативний клас білків, який присутній у всіх відділах клітини: цитоплазмі, ядрі, ER, мітохондріях. В області карбоксильного кінця єдиного поліпептидного ланцюга шаперонів є ділянка, утворена радикалами амінокислот у формі борозенки. Вона здатна взаємодіяти з ділянками білкових молекул і розгорнутих поліпептидних ланцюгів довжиною в 7-9 амінокислот, збагачених гідрофобними радикалами. В синтезуємому поліпептидному ланцюгу такі ділянки зустрічаються приблизно через кожні 16 амінокислот.

Фолдінг багатьох високомолекулярних білків, що мають складну конформацію (наприклад, доменну будову), здійснюється в спеціальному просторі, сформованому шаперонами Ш-60. Ш-60 функціонують у вигляді олігомерного комплексу, що складається з 14 субодиниць. Ш-60 утворюють 2 кільця, кожне з яких складається з 7 субодиниць, сполучених один з одним. Субодиниця Ш-60 складається з 3 доменів: апікального (верхівкового), проміжного і екваторіального. Верхівковий домен має ряд гідрофобних залишків, звернених у порожнину кільця, сформованого субодиницями. Екваторіальний домен має ділянку зв'язування з АТФ і володіє АТФ-азною активністю, тобто здатний гідролізувати АТФ до АДФ і H_3PO_4 .

Шапероновий комплекс має високу спорідненість до білків, на поверхні яких є елементи, характерні для незвернутих молекул (насамперед ділянки, збагачені гідрофобними радикалами). Потрапляючи в порожнину шаперонового комплексу, білок зв'язується з гідрофобними радикалами апікальних ділянок Ш-60. У специфічному середовищі цієї порожнини, в ізоляції від інших молекул клітини відбувається перебір можливих конформацій білка, поки не буде знайдена єдина, енергетично найбільш вигідна конформація. Вивільнення білка зі сформованою нативною конформацією супроводжується гідролізом АТФ в екваторіальному домені.

Якщо білок не придбав нативної конформації, то він вступає в повторний зв'язок з шапероновим комплексом. Такий шаперонозалежний фолдінг білків вимагає витрат великої кількості енергії.

Таким чином, синтез і фолдінг білків протікають за участю різних груп шаперонів, що перешкоджають небажаним взаємодіям білків з іншими

молекулами клітини і супроводжують їх до остаточного формування нативної структури.

При дії різних стресових факторів (висока температура, гіпоксія, інфекція, УФО, зміна рН середовища, зміна молярності середовища, дія токсичних хімічних речовин, важких металів і т.д.) в клітинах посилюється синтез білків HSP. Маючи високу спорідненість до гідрофобних ділянок частково денатурованих білків, вони можуть перешкоджати їх повній денатурації і відновлювати нативну конформацію білків. Встановлено, що короточасні стресові впливи збільшують вироблення HSP і підвищують стійкість організму до тривалих стресових впливів.

Контрольні питання

1. Що таке фолдінг білків?
2. Що представляє собою процес ренатурації?
3. Що таке шаперони?
4. Які види шаперонів розрізняють?
5. Що представляє собою шапероновий комплекс?

Глава 4. Функціонування білків

Зв'язування білків з лігандами. Кожен індивідуальний білок, що має унікальну первинну структуру і конформацію, володіє і унікальною функцією, що відрізняє його від всіх інших білків. Набір індивідуальних білків виконує в клітині безліч різноманітних і складних функцій. Необхідна умова для функціонування білків – приєднання до нього іншої речовини – **ліганда**.

Лігандами можуть бути як низькомолекулярні речовини, так і макромолекули. Взаємодія білка з лігандом є високо специфічною і визначається будовою ділянки білка, званого **центром зв'язування білка з лігандом** або **активним центром**.

Активний центр білків – це певна ділянка білкової молекули, яка як правило, знаходиться в її поглибленні («кишені»), сформованій радикалами амінокислот, зібраних на певній просторовій ділянці при формуванні третинної структури і здатній комплементарно зв'язуватися з лігандом. У лінійній послідовності поліпептидного ланцюга радикали, що формують активний центр, можуть знаходитися на значній відстані один від одного. Висока специфічність зв'язування білка з лігандом забезпечується комплементарністю структури активного центру білка структурі ліганду. Ліганд повинен мати здатність входити і просторово збігатися з конформацією активного центру. Цей збіг може бути неповним, але завдяки конфірмаційній лабільності білка активний центр здатний до невеликих змін і «підганяється» під ліганд. Крім того, між функціональними групами ліганда і радикалами амінокислот, що утворюють активний центр, повинні виникати зв'язки, які утримують ліганд в активному центрі. Зв'язки між лігандом і активним центром білка можуть бути як нековалентними (іонними, водневими і гідрофобними), так і ковалентними. Активний центр білка – відносно ізольована від оточуючого білок середовища ділянка, сформована амінокислотними залишками. В цій ділянці кожен залишок завдяки своєму індивідуальному розміру і функціональним групам формує рельєф активного центру. Об'єднання таких амінокислот в єдиний функціональний комплекс змінює реакційну здатність їх радикалів, подібно до

того, як змінюється звучання музичного інструменту в ансамблі. Тому амінокислотні залишки, що входять до складу активного центру, часто називають «ансамблем» амінокислот. Унікальні властивості активного центру залежать не тільки від хімічних властивостей формуючих його амінокислот, але і від їх точної взаємної орієнтації в просторі. Тому навіть незначні порушення загальної конформації білка в результаті точкових змін його первинної структури або умов навколишнього середовища можуть привести до зміни хімічних і функціональних властивостей радикалів, що формують активний центр, порушувати зв'язування білка з лігандом і його функцію. При денатурації активний центр білків руйнується, і відбувається втрата їх біологічної активності. Часто активний центр формується таким чином, що доступ води до функціональних груп його радикалів обмежений, тобто створюються умови для зв'язування ліганда з радикалами амінокислот. В деяких випадках ліганд приєднується тільки до одного з атомів, що володіє певною реакційною здатністю. Центр зв'язування білка з лігандом часто розташовується між доменами. Різні домени в білку можуть переміщатися один щодо одного при взаємодії з лігандом, що полегшує подальше функціонування білка.

Основна властивість білків, що лежить в основі їх функцій – вибірковість приєднання до певних ділянок білкової молекули специфічних лігандів. Лігандами можуть бути неорганічні (часто іони металів) і органічні речовини, низькомолекулярні і високомолекулярні речовини. Існують ліганди, які змінюють свою хімічну структуру при приєднанні до активного центру білка (зміни субстрату в активному центрі ферменту). Також існують ліганди, що приєднуються до білка тільки в момент функціонування і ліганди, постійно пов'язані з білком, що виконують допоміжну роль при функціонуванні білків.

У тих випадках, коли амінокислотні залишки, що формують активний центр, не можуть забезпечити функціонування даного білка, до певних ділянок активного центру можуть приєднуватися небілкові молекули. Так, в активному центрі багатьох ферментів присутній іон металу (кофактор) або органічна небілкова молекула (кофермент). Небілкову частину, міцно пов'язану з

активним центром білка і необхідну для його функціонування, називають простетичною групою.

З'єднання протомерів в олігомерному білку – приклад взаємодії високомолекулярних лігандів. Кожен протомер, з'єднаний з іншими протомером, служить для них лігандом, так само як вони для нього.

Іноді приєднання будь-якого ліганда змінює конформацію білка, в результаті чого формується центр зв'язування з іншими лігандами.

Швидкість взаємодії білка з лігандом визначається концентраціями білка і ліганду в розчині, а також ступенем комплементарності білка і ліганда.

Хоча взаємодія ліганду з активним центром білка є високоспецифічною, завжди можна підібрати іншу речовину, яка так само буде взаємодіяти з білком. Ліганд, що взаємодіє з білком і порушує його функцію, носить назву **інгібітора білка**. Якщо ця речовина по структурі схожа на ліганд, її називають **структурним аналогом ліганда**. Вона так само взаємодіє з активним центром білка. Аналог, що заміщує природний ліганд в активному центрі білка і знижує його функцію, носить назву **конкурентного інгібітора білка**.

Коактиватор транскрипції представляє собою кофактор транскрипції, який активує транскрипцію, не зв'язуючись з ДНК безпосередньо. Активація обумовлена зв'язуванням коактиватора з факторами транскрипції і з комплексом РНК-полімерази з промотором. Коактиватор утворює «міст» між факторами транскрипції і транскрипційним комплексом.

Корепресор представляє собою невелику молекулу, що пов'язується з неактивним репресором (апорепресором) з утворенням комплексу, який приєднується до оператора і блокує транскрипцію.

Функції білків. Так само як і нуклеїнові кислоти і інші біологічні макромолекули (полісахариди і ліпіди), білки – необхідні компоненти всіх живих організмів, вони беруть участь в більшості життєвих процесів клітини. Білки входять до складу клітинних структур – органел, секретуються в позаклітинний простір для обміну сигналами між клітинами, гідролізу їжі і утворення міжклітинної речовини. Білки здійснюють обмін речовин і енергетичні перетворення.

Білки виконують в організмі наступні функції:

- **структурну функцію.** Структурні білки цитоскелету, як свого роду арматура, надають форму клітинам і багатьом органоїдам і беруть участь у зміні форми клітин. Більшість структурних білків є філаментозними білками. Наприклад, мономери актину і тубуліну – це глобулярні, розчинні білки, але після полімеризації вони формують довгі нитки, з яких складається цитоскелет, що дозволяє клітині підтримувати форму. Колаген і еластин – основні компоненти міжклітинної речовини сполучної тканини, а з іншого структурного білка кератину складаються волосся і нігті;
- **захисну функцію.** Існують декілька видів захисних функцій білків:
 - **фізичний захист.** У ньому бере участь колаген – білок, який утворює основу міжклітинної речовини сполучних тканин (у тому числі кісток, хряща, сухожиль і глибоких шарів шкіри (дерми)). Кератин, що становить основу рогових щитків і волосся та інших похідних епідермісу. Зазвичай такі білки розглядають як білки зі структурною функцією. Прикладами цієї групи білків служать фібриноген і тромбін, які беруть участь у згортанні крові;
 - **хімічний захист.** Зв'язування токсинів білковими молекулами може забезпечувати їх детоксикацію. Особливо важливу роль в детоксикації у людини відіграють ферменти печінки, що розщеплюють отрути або переводять їх у розчинну форму, що сприяє їх швидкому виведенню з організму;
 - **імуний захист.** Білки, що входять до складу крові та інших біологічних рідин, беруть участь в захисній відповіді організму як на пошкодження, так і на атаку патогенів. Білки системи комплементу і антитіла (імуноглобуліни) відносяться до білків другої групи, вони нейтралізують бактерії, віруси або чужорідні білки. Антитіла, що входять до складу адаптативної імунної системи, приєднуються до чужорідних для даного організму речовин, антигенів, і тим самим нейтралізують їх, спрямовуючи до місць знищення. Антитіла можуть секретуватися в міжклітинний простір або закріплюватися в мембранах спеціалізованих В-лімфоцитів, які називаються плазмоцитами. У той час як ферменти мають обмежену спорідненість до субстрату,

оскільки занадто сильне приєднання до субстрату може заважати протіканню каталізуємої реакції, стійкість приєднання антитіл до антигену нічим не обмежена;

➤ **регуляторну функцію.** Багато процесів всередині клітин регулюються білковими молекулами, які не служать ні джерелом енергії, ні будівельним матеріалом для клітини. Ці білки регулюють транскрипцію, трансляцію, сплайсинг, а також активність інших білків та ін. Регуляторну функцію білки здійснюють або за рахунок ферментативної активності (наприклад, протеїнази), або за рахунок специфічного зв'язування з іншими молекулами, як правило, впливаючого на взаємодію з цими молекулами ферментів. Так, транскрипція генів визначається приєднанням факторів транскрипції – білків-активаторів і білків-репресорів до регуляторних послідовностей генів. На рівні трансляції зчитування багатьох мРНК також регулюється приєднанням білкових факторів, а деградація РНК і білків також проводиться спеціалізованими білковими комплексами. Найважливішу роль в регуляції внутрішньоклітинних процесів грають протеїнази – ферменти, які активують або пригнічують активність інших білків шляхом приєднання до них фосфатних груп;

➤ **сигнальну функцію.** Сигнальна функція білків – це здатність білків служити сигнальними речовинами, передаючи сигнали між клітинами, тканинами, органами та різними організмами. Часто сигнальну функцію об'єднують з регуляторною, так як багато внутрішньоклітинних регуляторних білків теж здійснюють передачу сигналів. Сигнальну функцію виконують білки-гормони, цитокіни, фактори росту та ін. Гормони переносяться кров'ю. Більшість гормонів тварин – це білки або пептиди. Зв'язування гормону з рецептором є сигналом, що запускає в клітині відповідну реакцію. Гормони регулюють концентрацію речовин в крові і клітинах, зростання, розмноження та інші процеси. Прикладом таких білків служить інсулін, який регулює концентрацію глюкози в крові. Клітини взаємодіють один з одним за допомогою сигнальних білків, що передаються через міжклітинну речовину. До таких білків належать, наприклад, цитокіни

та фактори росту. Цитокіни – невеликі пептидні інформаційні молекули. Вони регулюють взаємодію між клітинами, визначають їх виживання, стимулюють або пригнічують ріст, диференціювання, функціональну активність і апоптоз, забезпечують узгодженість дій імунної, ендокринної та нервової систем. Прикладом цитокінів може служити фактор некрозу пухлини, який передає сигнали запалення між клітинами організму;

- **транспортну функцію.** Розчинні білки, що беруть участь в транспорті малих молекул, повинні мати високу спорідненість (афінність) до субстрату, коли він присутній у високій концентрації і легко його вивільняти в місцях низької концентрації субстрату. Прикладом транспортних білків можна назвати гемоглобін, який переносить кисень з легень до решти тканин і вуглекислий газ від тканин до легень, а також гомологічні йому білки, знайдені у всіх царствах живих організмів. Деякі мембранні білки беруть участь в транспорті малих молекул через мембрану клітини, змінюючи її проникність. Ліпідний компонент мембрани водонепроникний (гідрофобний), що запобігає дифузії полярних або заряджених (іони) молекул. Мембранні транспортні білки прийнято поділяти на білки-канали і білки-переносники. Білки-канали містять внутрішні заповнені водою пори, які дозволяють іонам (через іонні канали) або молекулам води (через білки-аквапорини) переміщатися через мембрану. Багато іонних каналів спеціалізуються на транспорті тільки одного іона. Так, калієві і натрієві канали часто розрізняють ці подібні іони і пропускають тільки один з них. Білки-переносники зв'язують, подібно ферментам, кожен стерпну молекулу або іон і, на відміну від каналів, можуть здійснювати активний транспорт з використанням енергії АТФ. «Електростанція клітини» – АТФ-синтаза, яка здійснює синтез АТФ за рахунок протонного градієнта, також може бути віднесена до мембранних транспортних білків;
- **запасну (резервну) функцію.** До таких білків належать так звані резервні білки, які запасуються в якості джерела енергії і речовини в яйцеклітинах тварин, білки третинних оболонок яйця (овальбуміни) і основний білок молока (казеїн). Вони також виконують, головним чином, живильну

функцію. Ряд інших білків використовується в організмі як джерело амінокислот, які в свою чергу є попередниками біологічно активних речовин, що регулюють процеси метаболізму;

- **рецепторну функцію.** Білкові рецептори можуть як знаходитися в цитоплазмі, так і вбудовуватися в клітинну мембрану. Одна частина молекули рецептора сприймає сигнал, яким найчастіше служить хімічна речовина, а в деяких випадках – світло, механічний вплив (наприклад, розтягнення) та інші стимули. При впливі сигналу на певну ділянку молекули – білок-рецептор – відбуваються її конформаційні зміни. В результаті змінюється конформація іншої частини молекули, що здійснює передачу сигналу на інші клітинні компоненти. Існує кілька механізмів передачі сигналу. Деякі рецептори каталізують певну хімічну реакцію, інші служать іонними каналами, які при дії сигналу відкриваються або закриваються, треті специфічно пов'язують внутрішньоклітинні молекули-посередники. У мембранних рецепторах частина молекули, що зв'язується з сигнальною молекулою, знаходиться на поверхні клітини, а домен, що передає сигнал – всередині;
- **моторну (рухову) функцію.** Цілий клас моторних білків забезпечує рух організму, наприклад, скорочення м'язів, у тому числі локомоції (міозин), переміщення клітин всередині організму (наприклад, амебоїдний рух лейкоцитів), рух війок і джгутиків, а також активний і спрямований внутрішньоклітинний транспорт (динеїн і кінезін). Динеїни і кінезіни проводять транспортування молекул уздовж мікротрубочок з використанням гідролізу АТФ в якості джерела енергії. Динеїни переносять молекули та органели з периферичних частин клітини у напрямку до centrosomi, кінезіни – в протилежному напрямку. Динеїни також відповідають за рух війок і джгутиків. Цитоплазматичні варіанти міозину можуть брати участь в транспорті молекул і органел по мікрофіламентам.

Контрольні питання

1. Що представляє собою ліганд?

2. Що таке активний центр білків?
3. Що Ви знаєте про інгібітор білка?
4. Структурний аналог ліганда – це...
5. Які функції виконують білки в організмі? Опишіть ці функції.

РОЗДІЛ IV

ПЕРСОНАЛЬНА ГЕНОМІКА

Глава 1. Інтерпритація результатів молекулярно-генетичного тестування

Персональна геноміка – розділом геноміки, пов'язаний з секвенуванням і аналізом генома людини. Після розшифровки генотипу його можна проаналізувати за допомогою опублікованої літератури для визначення рівню схильності до розвитку і прояву певних фізичних та психічних здібностей людини, а також ймовірності ризику виникнення і розвитку спадкових і мультифакторіальних захворювань.

Практичне застосування знань про молекулярні механізми, що лежать в основі індивідуальних відмінностей у розвитку і прояві фізичних і психічних здібностей, пов'язані з трьома аспектами:

- орієнтацією і відбором;
- оптимізацією і корекцією трудового і тренувального процесу;
- профілактикою захворювань.

В якості прикладу інтерпритації результатів молекулярно-генетичного тестування, наведемо фізичні здібності людини.

Як відомо, неадекватний вибір виду фізичної діяльності супроводжується формуванням нераціональної функціональної системи адаптації з великим числом зайвих, неефективних і навіть недоцільних функціональних взаємозв'язків, напругою компенсаторних механізмів, ускладненням відновних процесів, повільним розвитком фізичних здібностей, складним досягненням високого рівня професійної майстерності, невтішним прогнозом перспективності і, нарешті, зупинкою зростання майстерності у зв'язку з вичерпанням генетичного резерву організму.

Діяльність, пов'язана з підвищеними фізичними навантаженнями, нерідко призводить до розвитку різних патологій. Надмірні пролонговані фізичні навантаження можуть призвести до тривалої гіперфункції серця з

подальшим розвитком вираженої гіпертрофії міокарда, яка не тільки перешкоджає зростанню майстерності, а й стає причиною формування «бичачого» серця і виникнення аритмій.

У цьому плані можливості молекулярної генетики (застосування генетичних маркерів у поєднанні з фенотипічною діагностикою) дозволяють надавати допомогу спеціалістам у:

- визначенні схильності дітей і підлітків до певного виду рухової діяльності (професійна орієнтація і відбір);
- підвищенні зростання фізичних показників за рахунок оптимізації та корекції трудового і тренувального процесу;
- профілактиці різних захворювань, пов'язаних з професійною діяльністю.

Роль фахівців у галузі молекулярної генетики, також полягає в підборі оптимальної рухової діяльності для конкретної людини з урахуванням її генетичної конституції.

Разом з тим треба відзначити, що остаточною кількістю індивідів, які досягли високого рівня професійної і спортивної майстерності, все ж таки встановлюється неспадковими факторами (відсоток реалізації генетичного потенціалу завжди нижче теоретично очікуваного) і залежить, в тому числі, від запитів суспільства.

Разом з тим треба відзначити, що остаточною кількістю індивідів, які досягли високого рівня спортивної майстерності, все ж таки встановлюється неспадковими факторами (відсоток реалізації генетичного потенціалу завжди нижче теоретично очікуваного) і залежить, в тому числі, від запитів суспільства. На підтримку гіпотези про загальну схильність до певних видів спорту можна навести приклади по частоті зустрічаємості різних алелей генів, асоційованих з руховою діяльністю. Так, на підставі аналізу G/C поліморфізму 7 інтрону гена *PPARA* можна виділити індивідів з наявністю алелей G (носії генотипів GG і GC) або C (носії генотипів GC і CC). Було виявлено, що частота зустрічаємості *PPARA* G алеля значимо вище серед стаєрів, а частота *PPARA* C алеля – серед спринтерів і важкоатлетів. Подібний антагонізм алелей, коли перший алель гена привертає до видів спорту однієї метаболічної

спрямованості, а другий – до видів спорту іншого метаболічної спрямованості, виявлений також для *ACE I/D*, *HIF1A Pro582Ser* і *PPARGC1A Gly482Ser* поліморфізмів. На підставі цих даних можна припустити, що носійство будь-яких алелей генів *ACE*, *HIF1A*, *PPARA* і *PPARGC1A* не обмежує людину в можливості занять видами спорту взагалі.

Розшифровка первинної структури всього геному людини, насиченість геному високополіморфними ділянками, які є зручними молекулярними маркерами, наявність хромосомоспецифічних і локуспецифічних клонотек ДНК, клонотек експресійної кДНК, широкі можливості аналізу геному людини за допомогою біоінформаційних технологій і з'ясування смислових нуклеотидних послідовностей якісно змінили підхід до ідентифікації генів. Сучасна стратегія картування фізичних здібностей включає такі підходи:

➤ аналіз зчеплення (англ. linkage analysis). Цей метод заснований на простежуванні косегрегації генів при передачі від батьків до нащадків в ряду поколінь. Аналіз зчеплення – це вивчення відповідності спостерігаємої картини сегрегації ознак і генетичних маркерів у родоводі і певної моделі успадкування. При цьому розраховуються шанси (ймовірності) за і проти зчеплення в даній сім'ї. Кількісний показник зчеплення – це логарифм співвідношення шансів (правдоподібності) за і проти зчеплення – лод-бал (англ. LOD score), який можна обчислити для різних значень рекомбінантної фракції (Θ) – від 0 до 0,5. Значення Θ , при якому лод-бал максимальний, і є найбільш ймовірна оцінка дистанції між генетичним маркером і передбачуваним геном ознаки. Зчеплення є статистично значимим ($P < 0,05$), якщо лод-бал дорівнює 2,0, і підтвердженим, якщо лод-бал перевищує порогове значення – 3,0 (ця величина означає, що ймовірність зчеплення в 20 разів вище ймовірності його відсутності). В даний час аналіз зчеплення проводять, використовуючи велику кількість маркерів, розподілених по всьому геному – від 500 до кількох десятків тисяч (мультилокусний аналіз зчеплення). При цьому розраховується співвідношення ймовірностей для кожного інтервалу між двома сусідніми маркерами. Інтервали зі значенням лод-бала, що перевищує порогове, і є найбільш ймовірною областю

локалізації гена (підтверджуюче картування). В інтервалах, для яких лод-бал нижче виключаємого порогу, локалізація гена виключається (виключаєме картування). Мультилокусний аналіз зчеплення вимагає великих обчислень, для яких спеціально розроблені програми – LINKAGE, FASTMAP, EXCLUDE та ін. Аналіз зчеплення – основний метод генетичного картування простих моногенних ознак (хвороб), якщо відомі тип успадкування ознаки та рівень пенетрантності (класичний, параметричний аналіз зчеплення). Невірно задані параметри можуть призвести до невірних висновків;

- метод ідентичних за походженням (спільних) алелів, або IBD-аналіз (англ. identical by descent – IBD) – це непараметричний аналіз зчеплення, при якому інформацію про зчеплення отримують тільки на основі успадкування маркерів в парах (здоровий/хворий) родичів без апріорних припущень про тип спадкування та інших характеристик. Такий непараметричний підхід є менш суворим, але, ймовірно, більш ефективним: у (здоровий/хворий) родичів повинен виявлятися надлишок загальних алелів навіть при неповній пенетрантності, наявності фенкопій, дієтичної гетерогенності та високій частоті алеля, зчепленого з фенотипом. Метод загальних алелей дозволяє виявити, наскільки частіше, в порівнянні з випадковою сегрегацією, пара родичів з певним фенотипом успадковує одну і ту ж (ідентичну за походженням) копію ділянки геному. Наприклад, родинні пари можуть мати або не мати один загальний за походженням алель по кожному локусу. Імовірність загального алеля (IBD-показник, α_R) при випадковій менделевській сегрегації дорівнює $1/2$. Якщо ж маркерний локус зчеплений з фенотипом, пари (здоровий/хворий) родичів повинні мати загальний алель частіше, ніж у половині випадків. У практиці фізичної культури і спорту цей метод передбачає сканування всього геному за допомогою великого числа генетичних маркерів з відомою хромосомною локалізацією на предмет асоціацій певних локусів з різноманітними кількісними (QTL- картування, наприклад, МСК, показників швидкості і сили) і якісними (наприклад, наявність або відсутність спортивного розряду) ознаками. Надалі

передбачається прицільне секвенування ділянок, розташованих навколо знайдених локусів, і виявлення в них поліморфізмів, зчеплених з відомими генетичними маркерами;

➤ дослідження асоціацій у популяціях, на відміну від двох попередніх методів генетичного картування, засноване не на аналізі косегрегації генетичного матеріалу в сім'ях, а на пошуку популяційних кореляцій. Цей метод є найбільш поширеним і застосовується для виявлення інформативних поліморфних локусів, асоційованих з різними фізичними і психічними здібностями людини. Пошук поліморфних генів-кандидатів та їх використання у вивченні генетичної схильності до виконання різних фізичних навантажень заснований на знанні молекулярних механізмів м'язової або будь-якої іншої діяльності і припущенні, що поліморфізм даного гена може вплинути на рівень метаболічних процесів або на морфофункціональні особливості організму. Дослідження асоціацій поліморфізмів генів-кандидатів засноване на декількох методичних підходах:

1. дослідження «випадок-контроль» (англ. case-control study), при якому проводиться пошук популяційних кореляцій в частотах алелей (генотипів, гаплотипів, гаплогруп). У класичному випадку вони представляють собою порівняння досліджуваних з індивідами, що не мають трудового або спортивного стажу з тієї ж популяції. Наприклад, генетичний маркер (алель даного гену) вважається асоційованим з витривалістю (алель витривалості), якщо його частота серед досліджуваних значимо ($P < 0,05$) вище, ніж в контрольній вибірці, і має тенденцію до підвищення із зростанням кваліфікації (цей феномен відображає процес відбору);
2. одномоментне (поперечне) дослідження (англ. cross-sectional study) – проведення кореляційного або порівняльного аналізу генотипів з даними одноразового обстеження (дослідження «генотип-фенотип»; наприклад, антропометрія, гістоморфометрія, спіроергометрія, визначення рівня фізичної підготовленості, змагальної успішності та ін.);

3. динамічне (поздовжнє або лонгітюдне) дослідження (англ. longitudinal study) – проведення кореляційного або порівняльного аналізу генотипів з даними багаторазових обстежень випробовуваних (аналізується ефект тренування).

Асоціативні дослідження проводять з використанням різного числа маркерів.

Дослідження, що проводяться в рамках молекулярної генетики, за структурою можна класифікувати наступним чином:

- опис окремих випадків;
- опис серії випадків;
- дослідження «випадок-контроль»;
- аналітичне одномоментне дослідження;
- проспективне динамічне дослідження;
- метааналіз.

Виділення підвбірок (підгруп) за якою-небудь ознакою (наприклад, статтю, віком, спеціалізацією), ймовірно здатному вплинути на результати дослідження носить назву стратифікації (розшарування). У дослідженнях «випадок-контроль» види рухової діяльності поділяють на різні групи відповідно, наприклад, за типом енергозабезпечення фізичного навантаження. У цьому випадку в однорідних групах фізіологічні закономірності, що використовуються в трудовому або тренувальному процесі повинні бути однаковими. Крім ознак, що характеризують розвиток витривалості, швидкості і сили, беруть до уваги потужність виконуваної фізичної роботи з поділом на максимальну, субмаксимальну, велику, помірну і змінну, а також циклічність навантаження з поділом на циклічну (циклічні види спорту) і ациклічну (ациклічні види спорту) роботу. Будь-яке дослідження в залежності від того, наскільки надійні отримані в ньому результати і наскільки вони застосовні в практиці, можна охарактеризувати з двох точок зору: достовірності (внутрішньої обґрунтованості) та узагальнюємості (зовнішньої обґрунтованості, придатності).

Для визначення значимості поліморфізму гена в діагностиці схильності до певного виду рухової діяльності необхідно враховувати три основні критерії:

- функціональну значимість ДНК-поліморфізму, що залежить від типу поліморфізму і його локалізації. Передбачуваний ефект поліморфізму на фенотип може бути дуже низьким (1 бал за 5-бальною шкалою), низьким (2 бали), помірним (3 бали), високим (4 бали) і дуже високим (5 балів);
- кількість повторень результатів незалежних досліджень за типом «випадок-контроль»;
- число повторень результатів незалежних досліджень за типом «генотип-фенотип».

Таким чином, чим більше балів набирає певний генетичний маркер за кожним критерієм, тим меншою мірою він може вважатися ложнопозитивним (результат артефакту) і тим більшою мірою він є значимим і надійним для діагностики схильності до занять різними видами рухової діяльності.

Для зручності значимість маркера можна позначати у вигляді формули ABC, де А – передбачуваний ефект поліморфізму (бали: від 1 до 5), В – число незалежних досліджень за типом «випадок-контроль», в яких були показані схожі результати (бали: від 0 до n), С – число незалежних досліджень за типом «генотип-фенотип», де були показані схожі результати (бали: від 0 до n). З наведених вище прикладів випливає, що оцінка значимості для ACE I алеля – $A_3B_{13}C_{17}$, а для ACTN3 R577 алеля – $A_5B_6C_{11}$. У розширеному варіанті цієї формули можна також враховувати інші критерії, такі, як число досліджень (по типу «випадок-контроль» або «генотип-фенотип») з суперечливими (наприклад, в двох роботах була виявлена більш низька частота ACE I алеля в групі досліджуваних в порівнянні з контролем) або негативними (наприклад, у трьох роботах не був виявлений зв'язок ACE I алеля зі схильністю до занять руховою діяльністю, спрямованою на розвиток витривалості) даними.

Інтерпретація результатів молекулярно-генетичних досліджень повинна проводитися на основі сумарного внеску генотипів і алелей генів у визначення спадкової схильності до рухової діяльності і до розвитку професійних патологій людини.

Відповідно до функціональної значимості певних алелей генів, асоційованих з руховою діяльністю, кожному алелю присвоюється умовна одиниця значимості – бал.

У залежності від кількості балів і якісного складу комбінацій генотипів у досліджуємих можна визначити 4 типу схильності до розвитку і прояву фізичних здібностей:

- низька схильність (визначається на підставі того, що серед великої вибірки висококваліфікованих індивідумів відсутні носії такого мінімального числа сприяючих конкретній діяльності алелей або якщо у них відсутні знайдені у випробуваного негативні мутації, що впливають на результат) означає, що є висока ймовірність того, що індивід не зможе подолати заданий необхідний рівень в певній групі видів рухової діяльності, що потребують переважного прояву будь-якої фізичної здібності (витривалості, швидкості, сили, спритності, гнучкості). По всій видимості, до цієї категорії досліджуваних будуть ставитися індивіди з негативними мутаціями, що викликають інтолерантність до фізичних навантажень;
- помірна схильність – є відносна ймовірність, що індивід зможе досягти видатних результатів у тій групі видів рухової діяльності, де потрібен прояв певної фізичної здібності;
- виражена схильність – велика ймовірність, що індивід зможе досягти видатних результатів у тій групі видів рухової діяльності, де потрібен прояв певної фізичної здібності;
- яскраво виражена схильність – дуже велика ймовірність, що індивід зможе досягти видатних результатів у тій групі видів рухової діяльності, де потрібен прояв певної фізичної здібності.

На підставі виявлення схильності до розвитку і прояву окремих фізичних здібностей, для досліджуємого підбирається набір груп видів рухової діяльності, до яких він схильний (з урахуванням фенотипових даних).

Індивідуальне молекулярно-генетичне заключення повинно складатися з наступних розділів:

- перерахування всіх виявлених генотипів за досліджуваними локусами ДНК. Ця інформація носить конфіденційний характер, тому що містить генетичні дані індивіда про його схильність до певних видів рухової діяльності і про ризик розвитку мультифакторних та інших патологій. З цією інформацією можуть бути ознайомлені виключно досліджуєми і батьки досліджуємого і, при наявності їх дозволу, – особистий (сімейний або спортивний) лікар і тренер;
- інтерпретаційна частина. Відповідно до отриманих генетичних даних надається інформація про схильність індивіда до розвитку і прояву фізичних здібностей, а також про ризик розвитку різних патологічних станів і захворювань (але тільки при запиті цих даних): артеріальна гіпертензія, атеросклероз, порушення згортання крові, гіпертрофія міокарда лівого шлуночку серця, раптова серцева смерть, цукровий діабет 2-го типу, ожиріння, посттравматичні ураження НС, захворювання ОРА та ін;
- рекомендаційна частина:
 1. для досліджуємого підбираються групи видів рухової діяльності, в яких він може досягти видатних результатів, а також опис сильних і слабких сторін систем організму з точки зору потенціалу розвитку фізичних здібностей;
 2. дієтичні рекомендації: складаються на основі певної індивідуальної чутливості випробуваних до харчових речовин;
 3. профілактичні рекомендації: визначаються заходи з профілактики мультифакторних захворювань і патологічних станів, пов'язаних як з професійною діяльністю, так і способом життя.

Контрольні питання

1. Перерахуйте основні аспекти, які складають основу практичного застосування знань про молекулярні механізми, що лежать в основі індивідуальних відмінностей у розвитку і прояві фізичних здібностей?
2. У чому саме молекулярна генетика надає допомогу спеціалістам?

3. Які підходи включає сучасна стратегія картування фізичних здібностей?
4. За якою структурою можна класифікувати дослідження, що проводяться в рамках виявлення схильності до розвитку і прояву фізичних здібностей?
5. Які основні критерії необхідно враховувати при визначенні значимості поліморфізму гена в діагностиці схильності до певного виду рухової діяльності?
6. Скільки типів схильності до розвитку і прояву фізичних здібностей існує?
7. З яких розділів повинно складатися індивідуальне молекулярно-генетичне заключення?

РОЗДІЛ V

МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

ФІЗИЧНИХ ЗДІБНОСТЕЙ ЛЮДИНИ

Глава 1. Історія розвитку молекулярно-генетичних досліджень схильності до розвитку і прояву фізичних здібностей людини

На прикінці 90-х рр. ХХ ст. в арсеналі генетиків з'явилися високоефективні експериментальні технології, що забезпечували можливість визначення молекулярних механізмів успадкування фізичних здібностей людини. Методи молекулярної біології у цій сфері вперше були застосовані американським і британським вченими Клодом Бушаром і Х'ю Монтгомері.

У 1995 р. Клод Бушар почав грандіозний міжнародний проект "HERITAGE" (скорочення від англ. слів HEalth, RIsk Factors, Exercise Training And Genetics), в якому брало участь кілька дослідних центрів, і вивчався зв'язок між генотипічними і фенотипічними даними у понад 800 осіб після декількох тижнів різних фізичних навантажень. Бушар і його колеги вели пошук поліморфних локусів, асоційованих з фізичною діяльністю людини в двох напрямках. Один з них заснований на скануванні всього геному за допомогою набору генетичних маркерів з відомою хромосомною локалізацією на предмет асоціації певних локусів з різноманітними кількісними ознаками. Інший напрямок припускає прицільне секвенування ділянок, розташованих навколо знайдених локусів і виявлення в них поліморфізмів, зчеплених з відомими генетичними маркерами. Пошук поліморфних генів-кандидатів та їх використання у вивченні генетичної схильності до виконання різних фізичних навантажень заснований на знанні молекулярних механізмів м'язового або будь-якого іншого виду діяльності і припущенні, що поліморфізм даного гена може вплинути на рівень метаболічних процесів в організмі. Бушар зі своїми колегами досягли значного прогресу в розумінні успадкування фізичних здібностей людини і молекулярно-генетичної обумовленості їх розвитку і

прояву. Дослідниками було опубліковано сотні робіт в різноманітних журналах генетичного, фізіологічного і медичного напрямків, а досягнення в цій області вони продовжують регулярно резюмувати в науковому журналі «Medicine and Science in Sport and Exercise» у вигляді «Мапи фізичної активності людини» (англ. «The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes»).

Паралельно з цим група Бушара сумісно з німецькими та фінськими колегами в рамках проекту «Genathlete study» займається пошуком генетичних маркерів, асоційованих зі схильністю до занять видами спорту, що направлені на розвиток витривалості.

У 1998 р. Х'ю Монтгомері та його колеги опублікували результати своїх досліджень у науковому журналі «Nature». Це була перша стаття по результатам подібних досліджень. Монтгомері досліджував зв'язок поліморфізму гена *ACE* зі здатністю до сходження на гори-вісьмитисячники і силовою витривалістю. У світових ЗМІ результати цієї праці були піднесені як відкриття «гена спорту». Висновки Монтгомері полягали в наступному: носійство мутантного варіанту гена *ACE* (алелі D) сприяє прояву швидкісно-силових здібностей, а нормальний алель I дає перевагу під час перебування в умовах високогір'я і у прояві витривалості.

Ці публікації стали поштовхом до проведення подібних досліджень в інших лабораторіях світу.

В справжній час галузь генетичної науки, яка вивчає гени відповідальні за розвиток і прояв фізичних здібностей людини, носить назву **кінезіогенетики**. Розділ геноміки, який вивчає вплив фізичного навантаження на експресію генів, відповідно отримав назву **кінезіогеноміки**.

Контрольні питання

1. Коли з'явилися експериментальні технології, що забезпечували можливість визначення молекулярних механізмів успадкування фізичних здібностей людини?
2. Хто стояв у витоків цих досліджень?

3. Хто опублікував першу наукову статтю по результатам таких досліджень?

4. Який ген отримав назву «гену спорту»?

Глава 2. Генетична спадковість фізичних здібностей людини

Результати досліджень з визначення успадкування психологічних, психофізіологічних, нейродинамічних і сенсомоторних показників свідчать про те, що чим складніше поведінкова діяльність людини, тим менш виражений вплив генотипу і більша роль навколишнього середовища. Так, для більш простих рухових навичок спадковість виявилась вищою, ніж для більш складних.

Найбільшою мірою генетичному контролю схильні швидкі рухи, що вимагають, в першу чергу, особливих швидкісних властивостей НС – високої лабільності (швидкості протікання збудження) і рухливості нервових процесів (зміни збудження і гальмування, і навпаки), а також розвитку анаеробних можливостей організму і наявності швидких м'язових волокон у скелетних м'язах. Висока генетична обумовленість отримана також для гнучкості. У меншій мірі генетичний вплив виражений для показників абсолютної м'язової сили. У найменшій мірі успадкування спостерігається для показників витривалості до тривалої циклічної роботи і спритності.

Таблиця 7

Відсоток успадкування фізіологічних і біохімічних показників людини

Фізіологічні і біохімічні показники	% успадкування
ЖЄЛ	43-78
Приріст МСК	47
Ударний об'єм серця	29-62
Діастолічний АТ у спокої	24-63
Склад м'язових волокон	45-99
Мінеральна щільність кісток	75-83
Концентрація еритроцитів	42-79
Середній об'єм еритроцитів	94-97
Гемоглобін	37-87
Рівень глюкози крові	37-67
Рівень тестостерону крові	50-69
Максимальна концентрація лактату крові	28-98

Відсоток успадкування фізичних здібностей людини

Фізична здібність	% успадкування
Фізична активність	29-68
Ізична активність	35-83
Ізометрична сила	44-96
Динамічна сила	29-87
Ексцентрична сила	62-82
Вибухова сила	61-89
Кистева динамометрія	30-65
Швидкість	60-100
Час реакції	40-70
Гнучкість	50-69
Спритність (нейром'язова координація)	41-87
Рівновага	30-65

Передбачається, що показники успадкування прямо не асоційовані з кількістю генів, від яких залежить розвиток і прояв ознаки. Велика частина ознак людини пов'язана з роботою певного набору генів («так чи інакше все залежить від генів»), за винятком деяких ознак, таких, як, наприклад, морально-етичні), а число генів протягом життя не змінюється. Тим не менше було показано, що з віком показники успадкування можуть змінюватися: з одного боку, середовищні впливи можуть посилюватися (наприклад, на жировий компонент), з іншого – послаблятися (наприклад, на конституцію тіла або IQ) або залишатися на колишньому рівні, що свідчить про динамічні коливання у ступені експресії генів (а не в зміні їх кількості) протягом онтогенезу.

В основі успадкування, мабуть, лежить поліморфізм ДНК, який обумовлює індивідуальні відмінності в ступені розвитку і прояву певних ознак. Висловлюється припущення, що на показники спадковості впливають кількість поліморфних генів, відповідальних за розвиток ознаки (і доля в них консервативних генів, які в меншій мірі схильні до змін), а також кількість і частота зустрічаємості в популяції ДНК-поліморфізмів, детермінуючих норму і діапазон реакції. Крім того, на показники успадкування ознаки в певній мірі можуть впливати епігенетичні чинники.

Значну роль у зростанні рівня розвитку фізичних здібностей грає так звана тренуємість, або здатність до навчання людини, тобто її здатність

підвищувати функціональні можливості під впливом тренування. Чим нижче коефіцієнт спадковості певної фізичної здібності, тим вище її тренуємість, і навпаки. Найбільш тренуємими фізичними здібностями є спритність та загальна витривалість, а найменш тренуємими – швидкість та гнучкість. Середнє положення за тренуємістю займає сила. Це підтверджується даними про ступінь приросту різних фізичних здібностей в процесі багаторічного спортивного тренування: показники швидкості (спринтерський біг, плавання на 25 і 50 м) збільшуються в 1,5-2 рази, якості сили при роботі локальних м'язових груп – в 3,5-3,7 рази, при глобальній роботі – на 75-150%, витривалості – в десятки разів.

Для одних показників характерна вузька норма реакції. Вони в середньому незначно змінюються навіть при помітних коливаннях зовнішніх умов, у тому числі при тривалому тренуванні (високоуспадкоуємі ознаки – H^2 від 60% і вище: довжина тіла, склад м'язових волокон в скелетних м'язах, типологічні особливості НС та ін). Іншим показникам притаманна широка норма реакції, що допускає значні зміни у фенотипі (маса тіла, кількість мітохондрій в м'язі, показники зовнішнього дихання та ін). Комплексний вплив фактора величини зсуву морфофункціональних показників у результаті тренувального процесу і фактора тимчасової характеристики росту, розвитку і функціонування організму людини обумовлює ту чи іншу ступінь тренуємісті. Можна виділити високотренуємих, середнетренуємих і низькотренуємих людей. Визначення індивідуальної тренуємісті важливо в системі професійної і спортивної орієнтації і відбору. Наприклад, поєднання високого вихідного рівня і високих темпів зростання якого-небудь показника говорить про велику обдарованість людини.

Критичні періоди онтогенезу характеризуються підвищеною активністю окремих генів і їх комплексів, що контролюють розвиток будь-яких ознак організму. У ці періоди відбувається значна перебудова регуляторних процесів, якісний і кількісний стрибок у розвитку окремих органів і функціональних систем, результатом чого є можливість адаптації до нового рівня існування організму і його взаємодії із середовищем.

Сенситивні періоди – це періоди зниження генетичного контролю і підвищеної чутливості окремих ознак організму до середовищних впливів, в тому числі педагогічного і тренерського. Сенситивні періоди для різних здібностей проявляються гетерохронно. Сенситивний період прояву швидкості, спритності і гнучкості в середньому припадає на вік 11-15 років, м'язової сили – 14-18 років і витривалості – 15-20 років. Для педагогів та тренерів, які працюють у галузі фізичного виховання і спорту, знання сенситивних періодів надзвичайно важливо, тому що один і той же об'єм фізичного навантаження, число тренувальних занять, підходів до снарядів і т.п. лише у сенситивний період забезпечує найбільший тренувальний ефект, який в інші вікові періоди не може бути досягнутий. Разом з тим надмірні фізичні навантаження, не розраховані на можливості конкретного спортсмена, саме в сенситивний період можуть значно загальмувати розвиток його фізичних здібностей і подальше їх вдосконалення.

Контрольні питання

1. Для яких рухових навичок спадковість є вищою, а для яких нижчею?
2. Які рухи найбільш схильні до генетичного контролю?
3. Що лежить в основі успадкування фізичних здібностей?
4. Що грає значну роль у зростанні рівня розвитку фізичних здібностей?
5. Які фізичні здібності є найбільш тренуємими?
6. Що обумовлює ту чи іншу ступінь тренуємості людини?
7. В чому значення сенситивних періодів?

Глава 3. Молекулярно-генетичні маркери витривалості

Молекулярно-генетичний маркер (ДНК-маркер) – це певний алель гена (або генотип, різноманітні комбінації алелей і генотипів), асоційований з розвитком і проявом певних фізичних здібностей, антропометричними, композиційними, фізіологічними, біохімічними, психологічними та іншими показниками, а також зі схильністю до занять певним видом трудової діяльності або спорту (групою видів спорту). Центральна ідея молекулярної генетики у даному аспекті полягає в уяві про те, що індивідуальні відмінності в ступені розвитку тих чи інших фізичних і психічних здібностей людини багато в чому обумовлені ДНК-поліморфізмами, яких налічується не менш 13 млн.

До справжнього часу виявлено 120 генетичних маркерів, асоційованих з фізичною діяльністю людини. Згідно виявленим ефектам поліморфізмів генів, виділяють маркери, що асоціюються з анаеробними можливостями (м'язова і кардіореспіраторна витривалість) – 77 маркерів і аеробними (швидкісно-силові здібності: швидкість, вибухова і абсолютна сила) – 43 маркери.

Існують також алелі, що обмежують фізичну діяльність людини (алелі інтолерантності до фізичних навантажень) за допомогою зниження або навпаки підвищення експресії генів, зміни активності або структури продуктів їх експресії. Наслідком такого обмеження рухової діяльності в кращому випадку стає припинення росту фізичних результатів, в найгіршому – розвиток патологічних станів.

Відмітна особливість молекулярно-генетичних маркерів, що не змінюються на протязі усього життя – це можливість їх визначення зразу після народження дитини, а значить, прогноз розвитку показників, значимих в умовах трудової і спортивної діяльності, можливо скласти дуже рано. Можливості молекулярної генетики дозволяють надавати допомогу спеціалістам, у визначенні схильності дітей і підлітків до певного виду рухової діяльності, підвищенні росту трудових і спортивних показників за рахунок оптимізації і корекції режиму праці і тренувального процесу, а також у

профілактиці різноманітних захворювань, пов'язаних з професійною діяльністю.

Маркери витривалості локалізовані в 23 генах, мтДНК і Y-хромосомі (табл. 9).

Таблиця 9

Молекулярно-генетичні маркери витривалості

Ген	Хромосомна локалізація	Поліморфізм	Маркер витривалості
<i>ACE</i>	17q23.3	Alu I/D	I
<i>ADRA2A</i>	10q24-q26	6.7/6.3 kb	6.7-kb
<i>ADRB2</i>	5q31-q32	Gly16Arg (rs1042713 G/A)	16Arg
<i>AMPD1</i>	1p13	Gln12Ter (rs17602729 C/T)	Gln12
<i>BDKRB2</i>	14q32.1-q32.2	+9/-9	-9
<i>EPAS1</i> (<i>HIF2A</i>)	2p21-p16	rs1867785 A/G rs11689011 C/T	rs1867785 G rs11689011 T
<i>EPOR</i>	19p13.3-p13.2	(GGAA) _n повтори	185-bp
<i>GNB3</i>	12p13	C825T (Ser275Ser rs5443)	825T
<i>HFE</i>	6p21.3	His63Asp (rs 1799945 C/G)	63Asp
<i>HIF1A</i>	14q21-q24	Pro582Ser (rs11549465 C/T)	Pro582
<i>KCNJ11</i>	11p15.1	Glu23Lys (rs5219 C/T)	Glu23
мтДНК	мтДНК	Мітохондріальні гаплогрупи	Сприятливі: H і L0 Несприятливі: K, J2, T і L3*
<i>NFATC4</i> (<i>NFAT3</i>)	14q11.2	Gly160Ala (rs2229309 G/C)	Gly160
<i>NOS3</i>	7q36	Gly298Asp (rs1799983 G/T) (CA) _n повтори	Gly298 164-bp
<i>PPARA</i>	22q13.31	rs4253778 G/C	rs4253778 G
<i>PPARD</i>	6p21.2-p21.1	rs2016520 T/C	rs2016520 C
<i>PPARGC1A</i>	4p15.1	Gly482Ser (rs8192678 G/A)	Gly482
<i>PPARGC1B</i>	5q33.1	Ala203Pro (rs7732671 G/C) Arg292Ser (rs11959820 C/A)	203Pro 292Ser
<i>PPP3R1</i> (<i>CNB</i>)	2p15	Промотор 5I/5D	5I
<i>TFAM</i>	10q21	Ser12Thr (rs1937 G/C)	12Thr
<i>UCP2</i>	11q13	Ala55Val (rs660339 C/T)	55Val
<i>UCP3</i>	11q13	rs1800849 C/T	rs1800849 T
<i>VEGF</i>	6p12	rs2010963 G/C	rs2010963 C
<i>VEGFR2</i> (<i>KDR</i>)	4q11-q12	His472Gln (rs1870377 T/A)	472Gln
Y-хромосома	Y-хромосома	Гаплогрупи Y-хромосоми	Сприятливі: E*, E3* і K*(xP) Несприятливі: E3b1

Окрім генетичних маркерів витривалості виділяють також генетичні маркери «тренуємості витривалості», які були виявлені в результаті динамічних

досліджень, коли аналізується ефект тренування та його зв'язок з генотипами (табл. 10).

Таблиця 10

Молекулярно-генетичні маркери «тренуємості витривалості»

Ген	Хромосомна локалізація	Поліморфізм	Маркер витривалості
<i>ACE</i>	17q23.3 T-3892C	Alu I/D	I T
<i>AMPD1</i>	1p13	Gln12Ter (rs17602729 C/T)	Gln12
<i>APOE</i>	19q13.2	Arg158Cys Cys112Arg	158Cys (ApoE*2) 112Arg (ApoE*4)
<i>ATP1A2</i>	1q21-q23	8.0/3.3 kb (α 2 екзон 1) 10.5/4.3 kb (α 2 екзон 21-22)	8.0-kb 10.5-kb
<i>CKM</i>	19q13.2-q13.3	<i>Nco</i> I A/G	Сприятливий: AG Несприятливий: GG
<i>GABPB1</i> (<i>NRF2</i>)	15q21.2	rs12594956 A/C rs8031031 C/T rs7181866 A/G	rs12594956 A rs8031031 T rs7181866 G
<i>HBB</i>	11p15.5	-551C/T +16C/G (rs10768683)	-551C +16C
<i>HIF1A</i>	14q21-q24	Pro582Ser (rs11549465 C/T)	Pro582
мтДНК	мтДНК	Варіанти в позиціях 16133, 12406, 13365, 13470, 15925, 16223 і 16362	Сприятливі: non-Sam в позиціях 16133, 16223 і 16362 Несприятливі: non-Sam в позиціях 12406, 13365, 13470 і 15925
<i>NRF1</i>	7q32	rs2402970 C/T rs6949152 A/G	rs2402970 C rs6949152 A
<i>PPARD</i>	6p21.2-p21.1	rs2016520 T/C rs2267668 A/G	rs2016520 T rs2267668 A
<i>PPARGC1A</i>	4p15.1	Gly482Ser (rs8192678 G/A)	Gly482
<i>VEGF</i>	6p12	(C-2578A) / (G-1154A) / (G-634C) комбінації	AAG і CGC гаплотипи

3.1. ALU I/D поліморфізм гена ангіотензин-1 конвертуючого ферменту (ACE)

Ангіотензин II є потужним вазопресором і альдостерон-стимулюючим пептидом, який контролює АТ і рідинний електролітний баланс. Цей фермент грає ключову роль в ренін-ангіотензиновій системі.

Ген ангіотензин-1 конвертуючого ферменту (англ. **angiotensin-I converting enzyme** – *ACE* або **peptidyl-dipeptidase A**) кодує фермент, який

бере участь в перетворенні ангіотензину I в фізіологічно активний пептид ангіотензин II. Хромосомна локалізація гена *ACE*: 17q23.3. Ген містить 26 екзонів.

У 16-му інтроні гена спостерігається інсерційно-делеційний поліморфізм – I/D. Номер ALU I/D поліморфізму гена *ACE* в dbSNP – rs4340. *ACE* I алель пов'язаний не тільки зі схильністю до розвитку витривалості, але й стійкістю до гіпоксії в умовах високогір'я.

3.2. *Dra*I поліморфізм гена адренергічного рецептора α -2A типу (*ADRA2A*)

α -2-адренорецептори є членами суперсімейства рецепторів, пов'язаних з G-білком. Вони відіграють важливу роль у регуляції симпатичної активності, що має велике значення в адаптації ССС у відповідь на фізичні навантаження.

α -2-адренорецептор кодується **геном альфа2 адренергічного рецептора (англ. alpha-2 adrenergic receptor – *ADRA2A*)**. Хромосомна локалізація гена *ADRA2A*: 10q24-q26. Ген не містить інтронів.

У 3' UTR-ділянці гена спостерігається *Dra*I або 6.7/6.3 kb поліморфізм, який представляє собою наявність або відсутність фрагментів завдовжки 6.7 або 6.3 kb. Номер поліморфізму в dbSNP – rs583668. При наявності 6.3-kb алеля були виявлені значне прискорення серцебиття, симптоми вегетативного розладу, а також велика втрата натрію з потом при виконанні фізичних навантажень. Зі схильністю до розвитку витривалості пов'язаний *ADRA2A* 6.7-kb алель.

3.3. *Gly*16Arg поліморфізм гена адренергічного рецептора β -2A типу (*ADRB2*)

β -2-адренорецептори, як і α -2-адренорецептори, є членами суперсімейства рецепторів, пов'язаних з G-білком. Вони беруть участь в регуляції багатьох функцій організму.

β -2-адренорецептор кодується геном **бета2 адренергічного рецептора** (англ. **beta-2 adrenergic receptor – ADRB2**). Хромосомна локалізація гена *ADRB2*: 5q31-q32. Ген не містить інтронів.

У 1-му екзоні гена спостерігається Gly16Arg поліморфізм, який функціонально дисинтизує рецептор. Номер поліморфізму в dbSNP – rs1042713. *ADRB2* Gly16Arg алель асоціюється з низькою щільністю рецептора і низькими значеннями серцевого викиду в спокої, низьким рівнем систолічного АТ, зменшеною бронходилатацією та низьким ризиком розвитку ожиріння.

3.4. Gln12 поліморфізм гена АМФ-дезамінази (*AMPD1*)

М-ізоформа АМФ-дезамінази, яка є специфічною для скелетних м'язів кодується геном **аденозинмонофосфат дезамінази 1** (англ. **adenosine monophosphate deaminase 1 – AMPD1**). Хромосомна локалізація гена *AMPD1*: 1p13.

У 34-му нуклеотиді 2-го екзону гена спостерігається Gln12 поліморфізм, в результаті якого відбувається одонуклеотидна заміна С на Т. Номер поліморфізму в dbSNP – rs17602729. Результатом поліморфізму є нонсенс-мутація у 12-му кодоні – глутаміновий кодон перетворюється в стоп-кодон. При даній мутації блокується синтез ланцюга білка, який стає каталітично неактивним.

У індивідів з дефіцитом АМФ-дезамінази спостерігається знижена аеробна і анаеробна працездатність та швидке накопичення лактату в крові відразу після 30-секундного анаеробного навантаження.

3.5. I/D поліморфізм гена брадикінінового рецептора β 2 (*BDKRB2*)

Брадикінін посилює проникненість капілярів, знижує судинний тонус, підвищує ударний об'єм серця, захищає міокард від ішемії, сприяє скороченню гладкої мускулатури органів, модулює передачу нервових імпульсів у НС та бере участь у репарації.

Брадикініновий рецептор β_2 , який є одним з основних медіаторів ефекту брадикініну, кодується геном брадикінінового рецептора β_2 (англ. **bradykinin receptor B2 – BDKRB2**). Хромосомна локалізація гена *BDKRB2*: 14q32.1-q32.2.

У 1-му екзоні гена спостерігається інсерційно-делеційний поліморфізм – I/D, який полягає у вставці або випадінні 9 нуклеотидів: +9/–9. Номер поліморфізму в dbSNP – rs5810761. З відсутністю вставки (–9) пов'язаний значно виражений судинорозширювальний ефект.

3.6. Rs1867785 G і rs11689011 T поліморфізми гена ендотеліального PAS-домена протеїну 1 (*EPAS1* або *HIF2A*)

Фактор індукований гіпоксією 2-го типу (англ. *EPAS1* – Endothelial PAS domain protein 1 або *HIF2a*), активується в умовах гіпоксії і грає важливу роль в мітохондріальному і катехоламіновому гомеостазі, в регуляції серцевого викиду, ангиогенезі, адіпогенезі, ремоделюванні судин і продукції еритропоетину.

Фактор кодується геном ендотеліального PAS-домена протеїну (англ. **endothelial PAS domain protein 1 – *EPAS1*, або hypoxia inducible factor 2 – *HIF2A*, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)**). Хромосомна локалізація гена *EPAS1*: 2p21-p16.

3.7. (GGAA)_n 185-bp поліморфізм гена рецептора еритропоетину (*EPOR*)

Еритропоетин є основним регулятором еритропоезу. До тих пір поки не порушена оксигенація тканин, концентрація еритропоетину і об'єм циркулюючих еритроцитів, залишаються постійними. В умовах гіпоксії кількість циркулюючого в плазмі еритропоетину зростає приблизно в 1000 разів і досягає 5-30 од/мл. У відповідь на зниження кисню фактор, індукований гіпоксією (*HIF-1 α*), активує вироблення еритропоетину. Функції еритропоетину здійснюються через специфічні поверхневі рецептори (англ. erythropoietin receptor – *EPOR*).

Рецептор еритропоетину кодується геном рецептора еритропоетину (англ. **erythropoietin receptor – EPOR**). Хромосомна локалізація гена *EPOR*: 19p13.3-p13.2.

У 5'-фланкуючому регіоні гена між -618 та -420 нуклеотидами спостерігається (GGAA)_n 185-bp поліморфізм. Номер поліморфізму в dbSNP – rs71164195.

3.8. C825T поліморфізм гена гуанін зв'язуючого протеїну 3 (*GNB3*)

G-білок представляє собою гетеротрімер який складається з трьох субодиниць: α , β і γ . Він бере участь в процесі проведення внеклітинних сигналів.

G-білок кодується геном гуанін зв'язуючого протеїну 3 (англ. **guanine nucleotide binding protein (G protein) або beta polypeptide 3**). Хромосомна локалізація гена *GNB3*: 12p13.

Сплайсингова мутація – заміна С на Т у 825-й позиції гена, супроводжується порушенням реплікації 9-го екзону, що веде до втрати частини поліпептидного ланцюга, який складається з 41 амінокислоти. Номер поліморфізму в dbSNP – rs5443. Носії *GNB3* 825Т алеля більшою мірою схильні до зниження жирової маси у відповідь на дієту або фізичні навантаження.

3.9. H63D поліморфізм гена гемохроматозу (*HFE*)

Спадковий гемохроматоз – це захворювання людини, що викликається надмірним накопиченням заліза в печінці, підшлунковій залозі та інших органах і тканинах.

Ген гемохроматозу (англ. **hemochromatosis – HFE**) кодує мембранний білок, необхідний для нормальної регуляції синтезу хепсидіна в печінці та опосередкованого хепсидіном транспорту заліза з ентероцитів, гепатоцитів та макрофагів. Хромосомна локалізація гена *HFE*: 6p21.3.

У 187-й позиції 2-го екзону гена спостерігається H63D поліморфізм – заміна нуклеотиду С на G, яка призводить до заміщення His на Asp в 63-му

кодоні. Мутація асоційована з високим насиченням трансферіна залізом і високим рівнем ферітину і частіше зустрічається серед довгожителів, ніж людей з середньою тривалістю життя. Номер поліморфізму в dbSNP – rs1799945.

3.10. Pro582Ser поліморфізм гена фактора, індукуємого гіпоксією 1 (HIF1A)

Фактор, індукуємий гіпоксією 1 (HIF-1) відповідає за регуляцію експресії генів, що забезпечують адаптацію клітин до гіпоксії. Тобто він є транскрипційним.

Фактор кодується геном фактора, індукуємого гіпоксією 1 (англ. **hypoxia inducible factor 1 – HIF1A, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)**). Хромосомна локалізація гена *HIF1A*: 14q21-q24.

У 12-му екзоні гена спостерігається Pro582Ser поліморфізм, що представляє собою заміну С на Т, яка призводить до заміщення Pro на Ser у 582-му положенні амінокислотної послідовності білка. Даний поліморфізм підвищує стабільність білка HIF-1 α) і збільшує стійкість клітин до гіпоксії. Номер поліморфізму в dbSNP – rs11549465.

3.11. Glu23Lys поліморфізм гена АТФ-залежного калієвого каналу підродини J, 11-го типу (KCNJ11)

Білок АТФ-залежного калієвого каналу, підродини J, 11-го типу приймає участь у вуглеводному обміні. Він грає роль випрямного каналу, пропускаючи калій до клітини і майже не випускаючи його з неї.

Білок кодується геном АТФ-залежного калієвого каналу підродини J, 11-го типу (англ. **potassium inwardly-rectifying channel, subfamily j, member 11 – KCNJ11**). Хромосомна локалізація гена *KCNJ11*: 11p15.1.

У гені спостерігається Glu23Lys поліморфізм – заміна С на Т, що призводить до заміщення Glu на Lys в 23-му амінокислотному положенні білка. Цей поліморфізм асоційований з фенотипами, що мають відношення до

обміну глюкози та інсуліну, показників роботи ССС та маси тіла. Номер поліморфізму в dbSNP – rs5219.

3.12. Gly160Ala поліморфізм гена ядерного фактора активованих Т-клітин, С4 (NFATC4 або NFAT3)

Ядерні фактори активованих Т-клітин (англ. nuclear factor of activated T-cell – NFAT) представляють собою транскрипційні фактори, які приймають участь у диференціюванні адипоцитів і метаболізмі жирів, ангиогенезі, зростанні міокарду, розвитку НС, хондрогенезі, детермінації складу м'язових волокон, енергетичному і кисневому забезпеченні м'язової діяльності, м'язовому та вуглеводному метаболізмі.

Фактор NFATC4 кодується геном ядерного фактора активованих Т-клітин, С4 (англ. nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4 – *NFATC4*, або *NFAT3*). Хромосомна локалізація гена *NFATC4*: 14q1 1.2.

В кодуєчій області гена спостерігається Gly160Ala поліморфізм – заміна G на C в 2-му екзоні, яка приводить до заміщення Gly на Ala в амінокислотному положенні 160. Номер поліморфізму в dbSNP – rs2229309. *NFATC4* Gly160 алель асоціюється з низьким ризиком розвитку гіпертрофії міокарду лівого шлуночка серця.

3.13. E298D поліморфізм гена ендотеліальної NO-синтази (NOS3)

Оксид азоту (NO) – один з найважливіших біологічних медіаторів. Він приймає участь у багатьох біохімічних та фізіологічних процесах, таких як вазодилатація, зниження агрегації тромбоцитів, різноманітні реакції імунної системи, нейротрансмісія, регуляція тонуусу гладких м'язів, забезпечення скорочувальної функції міокарду, регулювання споживання глюкози.

NO-синтаза кодується геном ендотеліальної NO-синтази (англ. nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) – *NOS3*). Хромосомна локалізація гена *NOS3*: 7q36.

В 7-му екзоні гена спостерігається E298D поліморфізм. Номер поліморфізму в dbSNP – rs1799983. E298D поліморфізм асоційований з високим рівнем серцевого викиду при виконанні фізичних навантажень середньої інтенсивності і більш високим зниженням діастолічного АТ в результаті 20-тижневих тренувань аеробної спрямованості.

3.14. Rs4253778 G поліморфізм гена α -рецептора, активуємого проліфераторами пероксісом (*PPARA*)

Білок PPAR α – це транскрипційний чинник, який входить до сімейства PPAR і приймає участь у регуляції ліпідного і вуглеводного метаболізму та енергетичному гомеостазі. Він також відповідає за регуляцію ваги тіла.

Білок кодується геном α -рецептора, активуємого проліфераторами пероксісом (англ. **peroxisome proliferator-activated receptor alpha – *PPARA***). Хромосомна локалізація гена *PPARA*: 22q13.31.

У 7-му інтроні гена спостерігається rs4253778 поліморфізм – заміна G на C в положенні 2528.

3.15. Rs2016520 C поліморфізм гена δ -рецептора, активуємого проліфераторами пероксісом (*PPARD*)

Білок PPAR δ – це транскрипційний чинник, який входить до сімейства PPAR і приймає участь у регулювання генів, залучених до різноманітних метаболічних процесів.

Білок кодується геном δ -рецептора, активуємого проліфераторами пероксісом (англ. **peroxisome proliferator-activated receptor delta – *PPARD***). Хромосомна локалізація гена *PPARD*: 6p21.2-p21.1.

У нетранслюємій частині 4-го екзону гена спостерігається rs2016520 поліморфізм – заміна T на C.

3.16. Gly482Ser поліморфізм гена коактиватора PPAR γ , 1 α (*PPARGC1A*)

При підвищених запитах тканин організму в окислювальному фосфорилуванні субстратів, значно зростає експресія гена коактиватора

PPAR γ , 1 α (англ. **peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha – PPARGC1A**). Хромосомна локалізація гена *PPARGC1A*: 4p15.1.

У 8-му екзоні гена спостерігається Gly482Ser поліморфізм, який представляє собою заміну G на A в положенні 1444. Ця заміна призводить до заміщення Gly на Ser в амінокислотному положенні 482 білка PGC-1 α . Номер поліморфізму в dbSNP – rs8192678. Поліморфізм асоційований із зменшенням мітохондріального біогенезу та окислювальних процесів в клітинах.

3.17. Ala203Pro і Arg292Ser поліморфізми гена коактиватора PPAR γ , 1 β (*PPARGC1B*)

Функція транскрипційного коактиватора PGC-1 β полягає в активуванні факторів, що регулюють експресію генів, залучених у мітохондріальний біогенез та метаболізм.

PGC-1 β кодується геном коактиватора **PPAR γ , 1 β** (англ. **peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta – PPARGC1B**). Хромосомна локалізація гена *PPARGC1A*: 5q33.1.

З руховою діяльністю людини асоційовані два поліморфізми гена – Ala203Pro і Arg292Ser. Номери поліморфізмів в dbSNP – rs7732671 і rs 11959820 відповідно.

У поліморфізмі Ala203Pro спостерігається заміна G на C, а у поліморфізмі Arg292Ser – заміна C на A. Ala203Pro поліморфізм асоціюється з низьким ризиком розвитку ожиріння та гіпертрофії міокарду лівого шлуночка серця, поліпшеним метаболізмом глюкози і високою фізичною працездатністю. Arg292Ser розглядають в якості протективного поліморфізму щодо ризику розвитку цукрового діабету 2-го типу.

3.18. 5I/5D поліморфізм гена регуляторної В субодиниці протеїнтрансфотази 3, α (*PPP3R1* або *CNB*)

Ca²⁺-кальцімодулінзалежна протеїнфосфатаза або кальціневрін, приймає участь в сигнальних шляхах, необхідних для регуляції генів та біологічних відповідей на зовнішню стимуляцію в різних типах клітин.

Кальціневрін кодується геном регуляторної В субодиниці протеїнтрансфотази 3, α (англ. **protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha – *PPP3R1*, або calcineurin B – *CNB***). Хромосомна локалізація гена *PPP3R1*: 2p15.

У промоторі гена, в позиціях від –1059 до –1063 спостерігається 5I/5D поліморфізм. Номер поліморфізму в dbSNP – rs3039851.

3.19. Ser12Thr поліморфізм гена мітохондріального транскрипційного фактора А (*TFAM*)

Енергозабезпечення м'язової діяльності аеробним шляхом можливо тільки при підтримці оптимальної кількості мтДНК та експресії її генів. За експресію генів мтДНК відповідає спеціальний білок – транскрипційний фактор А.

Білок кодується геном мітохондріального транскрипційного фактора А (англ. **transcription factor A, mitochondrial – *TFAM***). Хромосомна локалізація гена *TFAM*: 10q21.

У 1-му екзоні гена спостерігається Ser12Thr поліморфізм, який призводить до заміни G на C. В результаті відбувається заміщення Ser на Thr у 12-му кодоні. Номер поліморфізму в dbSNP – rs1937. Ser12Thr поліморфізм асоційований з низьким ризиком розвитку гіпертрофії міокарду лівого шлуночку серця та високими значеннями МСК і максимальної потужності.

3.20. Ala55Val поліморфізм гена роз'єднувального білка 2 (*UCP2*)

UCP2 – представник сімейства роз'єднувальних білків, який бере участь у регуляції обміну жирів, термогенезі, витраті енергії, нейтралізації реактивних форм кисню і нейропротекції. *UCP2* також впливає на секрецію інсуліну.

UCP2 кодується геном роз'єднувального білка 2 (англ. **uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) – UCP2**). Хромосомна локалізація гена *UCP2*: 11q13.

Поліморфізм Ala55Val представляє собою заміну С на Т і асоціюється з низькою утилізацією жирних кислот, зниженою витратою енергії в спокої, високою метаболічною ефективністю м'язової діяльності та фізичною активністю. Номер поліморфізму в dbSNP – rs660339.

3.21. Rs1800849 Т поліморфізм гена роз'єднувального білка 3 (UCP3)

UCP3, як і UCP2, є представником сімейства роз'єднувальних білків, який бере участь у транспорті жирних кислот, терморегуляції, підтримці гомеостазу глюкози, нейтралізації реактивних форм кисню.

UCP3 кодується геном роз'єднувального білка 3 (англ. **uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) – UCP3**). Хромосомна локалізація гена *UCP3*: 11q13.

В промоторі гена спостерігається rs1800849 поліморфізм, який представляє собою заміну С на Т і асоціюється з підвищеним рівнем ліпопротеїнів високої щільності, зниженими індексом маси тіла і рівнем жировідкладення та високими аеробними можливостями.

3.22. Rs2010963 С поліморфізм гена фактора росту ендотелію судин А (VEGFA)

Фактор росту ендотелію судин VEGF відноситься до основних чинників, які безпосередньо впливають на ріст судин. VEGF – це глікопротеїн, що зв'язується з клітинами кровоносних і лімфатичних судин і стимулює їх проліферацію, сприяє зростанню м'язових волокон і захищає міогенні клітини від апоптозу.

VEGF кодує ген фактора росту ендотелію судин А (англ. **vascular endothelial growth factor A – VEGFA**). Хромосомна локалізація гена *VEGFA*: 6p12. При фізичних навантаженнях аеробного характеру експресія цього гена суттєво підвищується.

В промоторній області гена спостерігається rs2010963 поліморфізм, який полягає у заміні G на C в положенні –634.

3.23. His472Gln поліморфізм гена рецептора 2-го типу фактора росту ендотелію судин (*VEGFR2*)

Як і у випадку з геном *VEGFA*, в результаті фізичних навантажень аеробного характеру експресія гена рецептора 2-го типу фактора росту ендотелію судин (англ. *vascular endothelial growth factor receptor 2 – VEGFR2*, або *kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase) – KDR*) теж суттєво підвищується. Хромосомна локалізація гена *VEGFR2*: 4q11-q12.

До функціональних поліморфізмів гену відноситься His472Gln поліморфізм, який полягає у заміні T на A. Номер поліморфізму в dbSNP – rs1870377.

Контрольні питання

1. Що представляє собою молекулярно-генетичний маркер?
2. Які маркери виділяють згідно виявленим ефектам поліморфізмів генів?
3. Скільки в справжній час відомо молекулярно-генетичних маркерів, асоційованих з розвитком і проявом витривалості?
4. Які генетичні маркери «тренуєності витривалості» Ви знаєте?
5. З якими здібностями, окрім витривалості, пов'язаний *ACE I* алель?
6. Алель якого гену асоціюється з низькою щільністю рецептора і низькими значеннями серцевого викиду в спокої, низьким рівнем систолічного АТ, зменшеною бронходилатацією та низьким ризиком розвитку ожиріння?
7. Який поліморфізм, пов'язаний з АМФ-дезаміназою, Вам відомий?
8. В яких умовах активується ген *EPAS1*?
9. Яку роль відіграє Pro582Ser поліморфізм гена *HIF1A*?
10. Який поліморфізм асоційований з фенотипами, що мають відношення до обміну глюкози та інсуліну, показників роботи ССС та маси тіла?
11. З чим асоційований E298D поліморфізм гена *NOS3*?

12. Який поліморфізм асоційований із зменшенням мітохондріального біогенезу та окислювальних процесів в клітинах?
13. Arg292Ser поліморфізм гена *PPARGC1B* розглядають в якості протективного поліморфізму до певного захворювання. Що це за захворювання?
14. Який поліморфізм асоційований з низьким ризиком розвитку гіпертрофії міокарду лівого шлуночку серця та високими значеннями МСК і максимальної потужності?

Глава 4. Молекулярно-генетичні маркери швидкості і сили

До справжнього моменту описано як мінімум 6 поліморфізмів генів, асоційованих зі схильністю до розвитку швидкості і сили (табл. 11).

Таблиця 11

Молекулярно-генетичні маркери швидкості і сили

Ген	Хромосомна локалізація	Поліморфізм	Маркер швидкості/сили
<i>ACE</i>	17q23.3	Alu I/D	D
<i>ACTN3</i>	11q13.1	Arg577Ter (rs1815739 C/T)	R577
<i>AR</i>	Xq11/2-q12	(CAG) _n	L(≥22)
<i>HIF1A</i>	14q21-q24	Pro582Ser (rs11549465 C/T)	582Ser
<i>PPARA</i>	22q13/31	rs4253778 G/C	Rs4253778 C
<i>PPARD</i>	3p25	Pro12Ala (rs1801282 C/G)	12Ala

В табл. 12 представлені молекулярно-генетичні маркери, що асоціюються з приростом показників швидкості і сили у відповідь на тренування аеробної спрямованості.

Таблиця 12

Молекулярно-генетичні маркери, що асоціюються з приростом показників швидкості і сили у відповідь на тренування аеробної спрямованості

Ген	Хромосомна локалізація	Поліморфізм	Маркер швидкості/сили
<i>ACE</i>	17q23.3	Alu I/D	D (динамічна сила) I (ізометрична сила)
<i>ACTN3</i>	11q13.1	Arg577Ter (rs1815739 C/T)	Arg577
<i>AMPD1</i>	1p13	Gln12Ter (rs17602729 C/T)	Gln12
<i>IGF1</i>	12q22-q23	(CA) _n (>192/192/<192)	192
<i>IL15</i>	4q31	rs1057972 A/T	rs1057972 T
<i>IL15RA</i>	10p15-p14	rs2296135 A/C	rs2296135 C
<i>PPARG</i>	3p25	Pro12Ala (rs1801282 C/G)	12Ala
<i>PPP3R1</i> (<i>CNB</i>)	2p15	Промотор 5I/5D	5I/5I (в комбінації з IGF1 192 алелем)
<i>RETN</i>	19p13.2	-420 C/G	-420 C
		398 C/T	398 C
		540 G/A	540 G
<i>TNF</i>	6p21.3	-308 G/A	-308 A
<i>VDR</i>	12q13.11	Taq I T/t (rs731236 C/T)	t

4.1. ALU I/D поліморфізм гена ангіотензин-1 конвертуючого ферменту (ACE)

У 16-му інтроні гена спостерігається інсерційно-делеційний поліморфізм – I/D. Номер поліморфізму в dbSNP – rs4340. На відміну від ACE I алеля, який асоціюється з витривалістю, ACE D алель асоціюється з розвитком швидкості, сили і м'язової маси.

4.2. Arg577 поліморфізм гена α -актиніна-3 (ACTN3)

α -актиніни є актинзв'язувальними білками. У скелетних м'язах вони складають домінуючий білковий компонент Z-лінії саркомера. Цей компонент формує сіткову структуру, яка об'єднує тонкі філаменти, що містять актин і стабілізує скорочувальний апарат м'язових волокон. Окрім виконання цієї функції, саркомерні α -актиніни взаємодіють з білками, залученими у безліч сигнальних шляхів. α -актинін-2 експресується головним чином у міокарді і окислювальних м'язових волокнах, а α -актинін-3 – у гліколітичних швидких м'язових волокнах типу II d/x і в меншій мірі у окисних швидких м'язових волокнах типу IIa. У повільних м'язових волокнах типу I, α -актинін-3 не експресується зовсім.

α -актинін-3 кодується геном α -актиніна-3 (англ. *actinin, alpha 3* – *ACTN3*). Хромосомна локалізація гена *ACTN3*: 11q13-q14.

У 16-му екзоні гена спостерігається Arg577 поліморфізм, який полягає у заміні С на Т. В результаті цієї заміни кодон, який кодує Arg, перетворюється в стоп-кодон і зупиняє синтез поліпептидного ланцюга α -актиніна-3. Нестача α -актиніна-3, в свою чергу призводить до низького рівня розвитку швидкісно-силових здібностей людини. Номер поліморфізму в dbSNP – rs1815739.

4.3. (CAG)_n L (≥ 22) поліморфізм гена рецептора андрогену (AR)

Рецептор андрогену – це транскрипційний фактор, відповідаючий за регуляцію м'язової маси людини.

Рецептор кодується геном рецептора андрогену (англ. **androgen receptor – AR**), який в значній мірі експресується у скелетних м'язах. Хромосомна локалізація гена *AR*: Xq12.

У 1-му екзоні гена спостерігається (CAG)_n поліморфізм. Номер поліморфізму в dbSNP – rs137852589. У нормі кількість CAG-повторів гена *AR* коливається в межах від 8 до 31, що і визначає поліморфізм цього гена. Всі алелі з кількістю CAG-повторів до 22 класифікуються як S-алелі, а алелі з 22 і вище CAG-повторами як L-алелі. Відповідно, чоловіки можуть бути носіями генотипів S0 (<22) або L0 (>22), а жінки – носіями генотипів SS, SL і LL. *AR* L-алелі дають деяку перевагу в нарощуванні м'язової маси і розвитку сили.

4.4. Pro582Ser поліморфізм гена фактора, індукуємого гіпоксією 1 (HIF1A)

У 12-му екзоні гена спостерігається Pro582Ser поліморфізм, що представляє собою заміну С на Т, яка призводить до заміщення Pro на Ser у 582-му положенні амінокислотної послідовності білка. Даний поліморфізм підвищує стабільність білка HIF-1α) і збільшує стійкість клітин до гіпоксії. Номер поліморфізму в dbSNP – rs11549465. Даний поліморфізм асоціюється не тільки зі схильністю до розвитку витривалості, а й з розвитком швидкості і сили.

4.5. Rs4253778 С поліморфізм гена α-рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (PPARA)

У 7-му інтроні гена спостерігається rs4253778 поліморфізм – заміна G на С в положенні 2528. На відміну від *PPARA* G алеля, який асоціюється з витривалістю, *PPARA* С алель асоціюється з розвитком швидкості, сили і м'язової маси.

4.6. Pro12Ala поліморфізм гена γ -рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (*PPARG*)

Транскрипційний фактор PPAR γ 2 приймає участь у регуляції генів, зв'язаних з синтезом тригліцеридів, диференціюванням адипоцитів і міобластів, чутливістю тканин до інсуліну, активністю остеобластів і остеокластів.

Фактор кодується геном γ -рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (**peroxisome proliferator-activated receptor gamma – *PPARG***). Хромосомна локалізація гена *PPARG*: 3p25.

У екзоні В спостерігається Pro12Ala поліморфізм – заміна С на G в 34 положенні, що призводить до заміщення Pro на Ala в амінокислотному положенні 12 ізоформи білка PPAR γ 2. Номер поліморфізму в dbSNP – rs1801282. Поліморфізм асоціюється з поліпшеним глікемічним профілем у відповідь на фізичні навантаження.

Контрольні питання

1. Опишіть молекулярно-генетичне маркери швидкості і сили.

Глава 5. З'язок рівня експресії генів з розвитком і проявом фізичних здібностей людини

Розвиток і прояв фізичних здібностей людини залежить не тільки від наявності тих чи інших поліморфних варіантів генів, а й від рівня експресії цих генів. Крім того, інтенсивність роботи генів змінюється у різних людей по-різному. Необхідно з'ясувати, як підвищується експресія генів у кожної окремої людини при інтенсивних короточасних фізичних навантаженнях або при тривалій роботі з помірним навантаженням. Не менш важливим є питання про те, як експресуються гени в гетерозиготному стані, тобто при наявності сприятливих і несприятливих поліморфних алелей в одному генотипі. Чи працює один з алелів і якщо так, то який? А якщо працюють обидва, обумовлюючи середній рівень синтезу відповідного ферменту? Без з'ясування рівнів експресії генів в кожному конкретному випадку не можливий конкретний професійний і спортивний відбір, а також вибір оптимальної системи трудового і тренувально-змагального процесу та індивідуального медико-біологічного забезпечення.

Фізичні навантаження являють собою різні за стимулом зовнішні впливи, які призводять до специфічних структурних та метаболічних зрушень у клітинах скелетних м'язів. Короточасне фізичне навантаження призводить до зміни експресії сотень генів, яка повертається до вихідного рівня через деякий час (секунди, хвилини, години). Так, наприклад, встановлено, що фізичні навантаження змінюють експресію 573 генів в м'язах стегна людини. Навіть не надто інтенсивні фізичні навантаження знижують ризик розвитку діабету і ожиріння. Вплив йде через метилювання ДНК і є прикладом епігенетичних змін в геномі.

Довготривалу адаптацію до фізичних навантажень різного спрямування, мабуть, можна розглядати як відповідь організму на сукупність одноразових фізичних навантажень, які призводять до глобальних змін в системі регуляції генної експресії. У деяких дослідженнях було встановлено наявність стійкої експресії сотень генів у спортсменів і добровольців у відповідь на тривалі

фізичні навантаження аеробного та анаеробного характеру. Встановлено, що рівень експресії генів, відповідальних за мітохондріальний біогенез, окислення жирів і вуглеводів, позитивно корелює з показниками МСК у стаєрів, в той час як рівень експресії генів м'язових білків корелює з показниками сили у троеборців. Між спортсменами протилежних груп є відмінності в експресії по що найменше двадцяти генам.

Очевидно, що картина профілю генної експресії буде змінюватися в залежності від часу забору біопробы. Можна припустити, що в результаті детренування після тривалих фізичних навантажень, експресія генів в скелетних м'язах людини прийде до вихідного рівня. Однак зважаючи на індивідуальні відмінності (висока чи низька генетична схильність до розвитку і прояву фізичних здібностей) вихідні рівні генної експресії в скелетних м'язах можуть відрізнятися між дослідною і контрольною групами.

Наукові дослідження виявили певні гени, експресія яких підвищується при тренуванні витривалості і сили (табл. 13).

Таблиця 13

Гени, активність яких підвищена при тренуванні витривалості і сили

Функціональна група	Символи генів
Структура, розвиток та скорочування скелетних м'язів	<i>CHI3L1, CLEC3B, COL11A2, KCNMB3, LMO7, MRCL3 (B), PEX12, PPP1R12A, PRKG1, SPRR1A, SSPN, UTRN (C)</i>
Енергетичний метаболізм	<i>ALOX15B, ARSF, AMY1A, ARPP-19, BPGM, CBR3, CYP3A7, CYP4B1, DLAT, GALE, GOT1(B), LDHB (B), ME1, SGPL1</i>
Мітохондріальні білки	<i>ACSL6, ATP5F1, BCKDHB, FXN, MDH1 (B), MTCPI, MTRR, MTX1, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB8, SDHB, UQCRB</i>
Імунна відповідь	<i>APLN, ATP6V0A2, CCL22, CCL26, CCRL1, CD1A, CD8A, CSF2RA, GPX3, PF4, TGFBI (B)</i>
Метаболізм білків	<i>AIP (C), APBA3, GZMM, KLK11, MSRA, PALM2-AKAP2, PTS, SERPINB8, SOLH, SULT1C1, SURF5, MAG, UCHL3(C)</i>
Клітинний цикл та проліферація	<i>CDC2L2, CDK2, DNAJA2, ENPEP, ESM1, NEK1, PDCD5, PMS2, RARRES1, S1000A2, TGFBR2, WDR45</i>
Транспортні білки	<i>CLTB (B), CNGBI, NBEA, NUP155, SCFD1, SLC15A3, SLC16A7 (B), SLC4A7, SLC6A12</i>
Ангіогенез	<i>EPAS1 (B), FIGF, FLT4, SH2D2A</i>
Сигнальна трансдукція	<i>ARHGAP6 (C), CALCR (C), FSTL3, GPR34, GRB7, HMHA1, HUNK, ITS2, LIFR, NRAS, P2RY5,</i>

	<i>PLA2R1, PLEKHG6, PRR5, PTPN4, PTPO, PTPRE, RAB33A, RAPGEF5, SOS2, STAC, TEK</i>
Транскрипція і трансляція	<i>APOBEC1, ATF1, ELF3S1 (C), HOXD8, KCNIP3, KRR1, LDB2, LMO4 (C), NRF1, PER3, PMS2L1, REV1L, ROD1, RORA, SIRT6 (C), SKIV2L2, SOX12, TCF21, TCF4, TRPS1, ZNF187</i>
Клітинний цикл та проліферація	<i>CDC2L2, CDK2, DNAJA2, ENPEP, ESM1, NEK1, PDCD5, PMS2, RARRES1, S1000A2, TGFBR2, WDR45</i>
Розвиток та функції нейронів	<i>AGRIN, EFNB2 (B), GBX2, NEDD1 (C), NOVA1, PCDH12, SYP</i>
Інші функції (деякі не визначені)	<i>ARMCX1, ASMTL, BEST1, CAST, CCDC19, CCDC95, CYB5D2, JPH3, REEP2, SCHIP1, SDF4, TBC1D22A, VSIG2, ZDHHC2, LOC651370, LOC90925, FANCF (B), C12orf32, CDSN (C)</i>

В табл. 14 наведені символи, хромосомна локалізація, повні назви генів і функції білків, які вони кодують.

Таблиця 14

Символи, хромосомна локалізація, повні назви генів і функції білків, які вони кодують

Ген та його хромосомна локалізація	Повна назва гена	Функція білка в організмі
<i>ACE</i> (17q23.3)	Ген ангіотензин-1 конвертуючого фермента (Angiotensin-I converting enzyme)	Каталізує перетворення ангіотензину-I у ангіотензин-II, регулюючий судинний тонус, звужуючи просвіт судин
<i>ACTN3</i> (11q13- q14)	Ген альфа-актиніну 3 (Actinin, alpha 3)	Стабілізує скорочувальний апарат швидких м'язових волокон
<i>ADRA2A</i> (10q24- q26)	Ген альфа-адренорецептора, тип 2A (Alpha-2A adrenergic receptor)	Мембранний α 2-адренорецептор до норадреналіну, сприяє бадьорості та вазоконстрикції
<i>ADRB2</i> (5q31-q32)	Ген бета-2 адренергічного рецептора (Beta-2 adrenergic receptor)	Мембранний β -адренорецептор до норадреналіну, активує глікогеноліз та ліполіз для енергетики м'язів
<i>AGT</i> (1q42-43)	Ген ангіотензиногену (Angiotensinogen)	Внаслідок експресії дає ангіотензиноген
<i>AGTR1</i> (3q21-25)	Ген рецептора 1 типу ангіотензину II (Angiotensin II receptor, type 1)	Ангіотензинергічний рецептор на мембранах гладеньких м'язів судин для звуження судин
<i>AMPD1</i> (1p13)	Ген аденозин-монофосфат-дезамінази 1 (Adenosine monophosphate deaminase 1)	Каталізує реакцію дезамінування АМФ у інозинмонофосфат у скелетних м'язах
<i>AR</i> (Xq11-12)	Ген рецептора андрогену (Androgen receptor)	Ядерний рецептор до 5-дигідротестерону, впливає на

		об'єм скелетних м'язів
<i>AVPR1</i> (12q14-15)	Ген рецептора аргінін-вазопресину, тип 1a (Arginine vasopressin receptor 1A)	Опосередковує сигнали аргінін-вазопресина, відповідає за важливі функції головного мозку, пов'язані з емоціями, творчістю, темпераментом, поведінкою у суспільстві, вазоконстрикцією
<i>BDKRB2</i> (6q3.2)	Ген рецептора брадикініну, тип B2 (Bradykinin receptor B2)	Опосередковує дію брадикініну – судинорозширювального фактору, антагоніста ангіотензину II
<i>CNB</i> (2p15)	Ген кальціневрину B (Calcineurin B)	Дефосфорилує транскрипційні фактори сімейства NFAT, що призводить до активації експресії генів, приймаючих участь у гіпертрофічній відповіді міокарду
<i>COL1A1</i>	Ген колагену тип I альфа 1	Фібриллярний білок, який складає основу сполучної тканини організму та забезпечує її міцність та еластичність
<i>CYP1A2</i> (15q24.1)	Ген цитохрому P-450-1a2 (Cytochrome 1a2)	Детоксикація ксенобіотиків шляхом гідроксилювання
<i>FABP2</i> (4q28-31)	Ген білка, зв'язуючого жирні кислоти, тип 2 (Fatty acid-binding protein)	Бере участь у абсорбції та транспортуванні жирних кислот
<i>HIF1A</i> (14q21-q24)	Ген фактора, індукуємого гіпоксією 1A (Hypoxia-inducible factor 1, alpha)	Запускає експресію генів, що підвищують адаптацію організму в умовах гіпоксії (гліколіз, ріст судин та ін.)
<i>FTO</i> (16q12.2)	Ген, асоційований з жировою масою (Fat mass and obesity associated – FTO)	Функція цього гену на даний час невідома
<i>EPAS1</i> він же (<i>HIF2A</i>) (2p21-p16)	Ген ендотеліального PAS-домена, білок 1 (Endothelial PAS domain protein 1) він же Ген фактора, індукуємого гіпоксією 2A (Hypoxia-inducible factor 2, alpha)	Запускає експресію генів, підвищуючих адаптацію організму в умовах гіпоксії (гліколіз, ріст судин та ін.)
<i>EPOR</i> (19p13.3-p13.2)	Ген рецептора еритропоетину (Erythropoietin receptor)	Опосередковує дію еритропоетину на еритропоез у червоному кістковому мозку
<i>MB</i> (22q11 – 22q13)	Ген міоглобіну (Myoglobin)	Кисень-зв'язуючий білок скелетних м'язів та міокарду
<i>MTHFR</i> (1p36.3)	Ген метилентетрагідрофолатредуктази (Methylenetetrahydrofolate reductase)	Відіграє ключову роль при перетворенні фолату (вітамін B9 або Bc) у активну форму тетрагідрофолат для синтезу пуринів та тиміну
<i>MYF6</i> (12q21)	Ген міогенного фактора 6 (Myogenic factor 6)	Відповідає за кінцеве диференціювання м'язових волокон та злиття міофібрил
<i>NFATC4</i>	Ген ядерного фактора	Регуляція експресії багатьох генів,

<i>(14q11.2)</i>	активованих Т-клітин (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4)	залучених до аеробного метаболізму, м'язового скорочення, активує Т- лімфоцити
<i>NOS3</i> <i>(7q36)</i>	Ген NO-синтази 3 (Nitric oxide synthase 3)	Фермент синтеза NO, що викликає судинорозширюючий ефект
<i>PPARA</i> <i>(22q12-q13.1)</i>	Ген альфа-рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (Peroxisome proliferator activated receptor alpha)	Регулює активність генів, відповідаючих за обмін вуглеводів та жирів
<i>PPARG</i> <i>(3p25)</i>	Ген гамма-рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)	Регулює активність генів, відповідаючих за обмін вуглеводів та жирів
<i>PPARGC1A</i> <i>(4p15.1)</i>	Ген коактиватора PPARG, тип 1A (Peroxisome proliferator- activated receptor gamma, coactivator 1 alpha)	Коактивує дію ряду транскрипційних факторів, регулює мітохондріальний біогенез та обмін речовин
<i>PPARD</i> <i>(6p21.2- p21.1)</i>	Ген дельта-рецептора, активуємого проліфераторами пероксисом (Peroxisome proliferator- activated receptor delta)	Регулює активність генів, відповідаючих за обмін вуглеводів та жирів
<i>SERT</i> <i>(17q11.1-q12)</i>	Ген переносника серотоніну (The serotonin transporter)	Транспортує серотонін – нейромедіатор, що регулює складні поведінкові реакції та через спинний мозок активує рухову активність
<i>SLC9A9</i> <i>(3q24)</i>	Ген натрій-водневого іоніту, сімейство 9, член 9 (Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9)	Приймає участь у трансмембранному обміні натрію на водень клітин мозку, м'язів та міокарду
<i>TFAM</i> <i>(10q21)</i>	Ген мітохондріального транскрипційного фактора А (Transcription factor A, mitochondrial)	Активує транскрипцію мітохондріальних генів и реплікацію мітохондріальної ДНК
<i>UCP1</i> <i>(4q31.21)</i>	Ген роз'єднувального білка 1 (Mitochondrial uncoupling protein 1)	Приймає участь у роз'єднанні окиснення та фосфорилування
<i>UCP2</i> <i>(11q13)</i>	Ген роз'єднувального білка 2 (Mitochondrial uncoupling protein 2)	Приймає участь у роз'єднанні окиснення та фосфорилування
<i>UCP3</i> <i>(11q13)</i>	Ген роз'єднувального білка 3 (Mitochondrial uncoupling protein 3)	Приймає участь у роз'єднанні окиснення та фосфорилування, транспорті жирних кислот
<i>VDR BsmI</i> <i>(12q13.1)</i>	Рецептор вітаміну D (Vitamin D receptor gene polymorphism BsmI)	Регулює експресію білків, залучених до гомеостазу кальцію та фосфору
<i>VEGF</i>	Ген фактора росту ендотелія	Збільшує проникність судин,

(6p21)	судин (Vascular endothelial growth factor)	кількість кровоносних та лімфатичних судин
--------	---	--

Контрольні питання

1. Скільки в справжній час відомо молекулярно-генетичних маркерів, асоційованих з розвитком і проявом швидкості і сили?
2. На відміну від *ACE I* алеля, який асоціюється з витривалістю, з розвитком чого асоціюється *ACE D* алель?
3. До чого призводить нестача α -актиніна-3?
4. Поліморфізм якого гену збільшує стійкість клітин до гіпоксії? Опишіть даний поліморфізм.
5. Який поліморфізм асоціюється з поліпшеним глікемічним профілем у відповідь на фізичні навантаження?

Глава 6. Застосування генного допінгу

Майбутнє фармакогенетики і фармакогеноміки, вже сьогодні диктує необхідність розвитку нового напрямку в даних областях – розробці методів виявлення генного допінгу.

В останні роки все більший розвиток отримує генна терапія, заснована на введенні в клітину терапевтичного гена, який може компенсувати функцію аномального або відсутнього гена. Генетичний матеріал (ДНК або РНК), укладений у вірус або ліпід, потрапляє в організм шляхом прямої ін'єкції в орган-мішень, або за допомогою аерозолів при легеневому застосуванні. При введенні ДНК в організм, гени здатні індукувати РНК, яка в свою чергу синтезує відповідний білок, який має терапевтичний ефект. Ці методи генної терапії розробляються для лікування пацієнтів зі смертельними захворюваннями, для яких немає інших способів лікування.

У спорті генна терапія може використовуватися для лікування травм, таких як м'язові ушкодження, розриви зв'язок і сухожиль, переломів кісток, що вимагає великих зусиль і часу. Перенесення генів, що кодують необхідні ростові фактори, в пошкоджену тканину сприяє прискоренню регенерації тканинних дефектів, викликаних травмою.

Генна терапія вже прийшла у великий спорт, але вона може застосовуватися і в якості генного допінгу.

Генний допінг представляє собою нетерапевтичне застосування генів, генетичних елементів або модуляторів генної експресії, що мають здатність підвищувати спортивні результати. Введення спортсменам генів, які продукують «внутрішні» біологічно активні речовини, може підвищити їх фізичні можливості. Спортсмен, який піддається генному допінгу, отримує додаткову кількість генетичної інформації (ДНК або РНК) шляхом генно-терапевтичних маніпуляцій.

Одним з генів, що використовуються для генного допінгу, є ген *EPO* (ген еритропоетину), який кодує еритропоетин. Введення додаткової копії цього гену в організм людини індукує посилену продукцію еритроцитів крові, що

сприяє збільшенню перенесення кисню від легенів до тканин, підвищуючи витривалість.

Іншим відомим геном є *IGF-I* (інсуліно-подібний ростовий фактор 1), відповідальний за збільшення м'язової маси, яка забезпечується без спортивних тренувань і фізичних навантажень. *IGF-I*, швидше за все, замінить заборонені зараз анаболічні стероїди. Особливість гена *IGF-I* полягає в тому, що він може використовуватися як «ремонтний ген», що прискорює процес регенерації м'язових тканин, які часто пошкоджуються через фізичні перевантаження. Існує близько п'яти варіацій цього «гена невразливості». На відміну від гена *EPO*, ефекти *IGF-I* не поширюються далі певного м'яза, в який його ввели, тобто якщо зробити ін'єкцію в м'яз ноги, м'язові тканини серця спортсмена не збільшуються. А для того, щоб визначити, чи була зроблена ін'єкція цього гена, необхідно брати зразок м'язової тканини прямо в точці ін'єкції, яку знайти майже неможливо.

Генний допінг також може використовуватися для стимулювання зростання нових кровоносних судин, що сприяє збільшенню доставки кисню і поживних речовин до тканин. Для цієї мети може використовуватися ген, відповідальний за синтез фактора росту ендотелію судин – *VEGF*. У терапії цей ген вже використовується для формування шунтів у пацієнтів з ішемічною хворобою серця і захворюваннями периферичних артерій. Вектори з геном *VEGF* також можуть служити в якості генного допінгу.

В якості генного допінгу можуть також використовуватися гени, що синтезують речовини, які блокують утворення або ефекти міостатину, відповідаючого за контроль зростання м'язів. Застосування блокаторів міостатину сприяє істотному збільшенню м'язової маси за рахунок гіпертрофії і гіперплазії. У медицині цей метод був призначений для лікування м'язової дистрофії Дюшенна і міотонічної дистрофії.

Фармакологічні препарати AICAR та GW-1516 перебудовують роботу генів в організмі. Механізм дії цих препаратів пов'язаний з впливом на процеси вироблення енергії, вони підвищують утворення і подальше окислення ліпідів і збільшують швидкість кровотоку, що забезпечує стабільний транспорт ліпідів

до місць їх метаболізму. Крім того, AICAR та GW-1516 пов'язані з процесами метаболізму вуглеводів – головною енергетичною субстанцією при тривалому фізичному навантаженні. Вони збільшують вміст вільних жирних кислот в обох типах м'язових волокон – швидких і повільних, через зміну рівнів білків, що беруть участь у ліпідному обміні і підвищення вмісту глюкози в білих м'язових волокнах. AICAR, особливо в поєднанні з GW-1516, активує близько 40 % генів, які включаються при реальних інтенсивних фізичних навантаженнях. Препарати, залежно від інтенсивності фізичного навантаження, значно підвищують працездатність у вправах на витривалість шляхом, мабуть, перетворення швидкоскорочуючихся м'язових волокон в більш енергоефективні, ліпідогенеруючі, повільноскорочуючися м'язові волокна. Небезпека вживання AICAR та GW-1516 в тому, що вчені недостатньо досліджували наслідки впливу препарату на організм людини, зокрема, потенційно вони можуть негативно впливати на ССС і привести до інфаркту міокарда. Відразу ж після появи препаратів, вченими був розроблений метод визначення наявності їх в сечі. Був виведений середній показник, відхилення від якого і показують наявність в організмі забороненого препарату, після чого проводиться додатковий аналіз проб.

Генний допінг більш ефективний, порівняно з хімічним, при цьому на даний момент не існує адекватних методів діагностики його застосування. У той же час неконтрольоване проведення генної терапії в спортивних цілях може призвести до серйозних негативних наслідків для здоров'я спортсменів. Підвищена продукція навіть нешкідливої, «рідної» біологічно активної речовини в організмі неминуче торкнеться регуляторних систем, що стежать за балансом біологічно активних речовин у крові. Передбачити довготривалі наслідки таких втручань – досить важке завдання.

ДНК, яка використовується для перенесення гена, є природною і тому не відрізна від власної ДНК спортсмена. Модифікований ген доставляється в організм за допомогою вектора, що містить ДНК. Визначити наявність вектора, часток вірусів або хімічних агентів можна тільки шляхом біопсії у місці ін'єкції,

однак для цього треба знати, де точка уколу, до того ж піддавати всіх спортсменів інвазивній процедурі вкрай небажано.

При використанні багатьох форм генетичного допінгу немає необхідності прямого введення генів в необхідний орган-мішень. Наприклад, ген *EPO* можна ввести практично в будь-яку точку тіла для локальної продукції еритропоєтину, який потім потрапить в кровотік і буде впливати на кістковий мозок. У більшості випадків генний допінг призводить до утворення протеїну, ідентичного власним протеїнам спортсмена. Тільки рівень цього протеїну в крові може вказувати на застосування допінгу. Про застосування генного допінгу з введенням гена *EPO* може свідчити підвищений рівень гемоглобіну і гематокриту. Однак гени можна регулювати, включаючи їх і відключаючи за допомогою спеціальних медичних препаратів.

У 2003 р було заведено першу в світі кримінальну справу про застосування в спорті генного допінгу. Мова йде про застосування репоксігену – препарату на основі популярного в генній інженерії аденовірусного вектору, несучого ген *EPO*. Німецький тренер-експериментатор Томас Спрінгштейн випробував даний препарат на спортсменах до 18 років, не думаючи про те, що надлишок еритропоєтину може привести до згущення крові і утворенню тромбів. Фармакологічна фірма-виробник розробляла цей препарат для хворих анемією, а не для спорту.

Судячи з того, з якою швидкістю впроваджується як генний допінг, так і інші досягнення сучасної біології та медицини, є реальна загроза того, що такі частково генетично-модифіковані спортсмени з'являться раніше, ніж будуть офіційно схвалені клітинні технології лікування хворих і спортивні змагання перетворяться на біотехнологічні гонки таких спортсменів.

Виявлення генного допінгу в справжній час є однією з найголовніших задач ВАДА, яке виділяє на розробку методів його виявлення, близько мільйона доларів на рік. В останні роки завдяки успіхам у соматичній генній терапії було відкрито новий метод визначення генного допінгу. Цей метод заснований на *spiPCR* (англ. single-copy primer-internal intron-spanning PCR – *spiPCR*). Для його проведення досить зразка цільної крові. В основі цього діагностичного

методу лежить відмінність в структурі між трансгенною (тДНК) і геномною ДНК – тДНК не містить частин інтронних послідовностей. Чутливість методу дозволяє виявляти тДНК у величезній кількості геномної ДНК.

Контрольні питання

1. Опишіть застосування генного допінгу.

РОЗДІЛ VI
МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА
ПСИХІЧНИХ ЗДІБНОСТЕЙ ЛЮДИНИ

Глава 1. Молекулярно-генетичні маркери рис темпераменту і особистості людини

Психогенетика (грец. *psyche* – душа і *genesis* – походження) – наука про спадковість і мінливість психічних і психофізіологічних властивостей, що виникла на стиці психології і генетики. У західній літературі частіше застосовується термін «генетика поведінки» (англ. *behavioral genetics*).

Предметом психогенетики є взаємодія спадковості і середовища у формуванні міжіндивідуальної варіантності психологічних властивостей людини (темпераменту, когнітивних і рухових функцій). В останні роки активно розвиваються такі галузі психогенетики як генетична психофізіологія, що досліджує спадкові та середовищні детермінанти біоелектричної активності мозку, генетика індивідуального розвитку, а також геноміка поведінки, що вивчає вплив генетичних ефектів на поведінку і різні види психопатологій.

Молекулярна психогенетика займається вивченням ролі генів у розвитку і прояві різноманітних рис темпераменту і особистості людини.

До темпераменту традиційно відносять характеристики індивіда з боку динамічних особливостей його психічної діяльності. Проблема пошуку генів, що беруть участь у розвитку рис особистості та темпераменту, надзвичайно актуальна як для кращого розуміння їх ролі у формуванні нормальної поведінки, так і поведінкових розладів і ефективності їх лікування.

Вважається, що дитячий темперамент є предиктором можливих поведінкових проблем. Оскільки риси темпераменту знаходяться під впливом таких чинників навколишнього середовища як стиль виховання, насильство в дитинстві, сезон народження, соціально-економічний статус, то певна поведінка батьків по відношенню до їхніх дітей дозволить уникнути негативних

проявів особистості (розвитку зовнішньо- і внутрішньонаправлених проблем поведінки) і призведе до успішної соціалізації індивіда та формування зрілої особистості.

Згідно з результатами близнюкових і сімейних досліджень, показники успадкування для рис темпераменту становлять 40-60%, причому, експресія генів варіює в процесі індивідуального розвитку індивіда і знаходиться під впливом факторів навколишнього середовища.

Існуючі психобіологічні моделі припускають, що формування особистісних рис опосередковано функціонуванням нейромедіаторних систем мозку. Останнім часом в результаті молекулярно-генетичних досліджень (зокрема, повногеномного аналізу зчеплення) вчені виявили ряд «локусів кількісних характеристик» для властивостей особистості, однак, лімітуючим фактором у пошуках специфічних генів є складність виявлення генетичної асоціації внаслідок її невеликого (до 1,5 %) ефекту. Оцінка епістатичного ефекту великого числа функціональних кандидатних маркерів і впливу факторів навколишнього середовища є необхідною умовою при проведенні такого роду досліджень.

1.1. Гени серотонінергічної системи

Серотонін (5-гідрокситриптамін, 5-НТ) – гормон та один з основних нейромедіаторів. За хімічною будовою серотонін відноситься до біогенних амінів, класу триптаміну. Серотонін утворюється з амінокислоти триптофану шляхом її послідовного 5-гідроксилювання ферментом 5-триптофангідроксилазою в результаті чого виходить 5-гідрокситриптофан (5-ГТ) і потім декарбоксілювання отриманого 5-гідрокситриптофану ферментом триптофандекарбоксілазою.

В основі функціонування серотонінергічної системи лежить виділення серотоніну, або 5-гідрокситриптаміну (англ. 5-hydroxytryptamine, 5-НТ) в синаптичну щілину. В останній він частково інактивується і частково захоплюється назад пресинаптичним терміналом. Саме на ці процеси впливають антидепресанти останньої генерації, які отримали назву інгібіторів

зворотного захоплення серотоніну. Рецептори серотоніну представлені як метаботропними, так і іонотропним. Всього налічується сім типів таких рецепторів, 5-НТ 1-7, причому 5-НТ 3 іонотропні, решта – метаботропні:

- 5-НТ 1 тип, що нараховує кілька підтипів: 1А-Е, які можуть бути як пре- так і постсинаптичними, пригнічує аденілатциклазу;
- 5-НТ 4 і 7 – стимулюють аденілатциклазу;
- 5-НТ 2, що нараховує кілька підтипів: 2А-С, які можуть бути тільки постсинаптичними, активує інозітолтрифосфат;
- 5-НТ 5А підтип також пригнічує аденілатциклазу.

Коротка інформація по серотонінових рецепторах:

- підтип 5-НТ1А: локалізація – ядро шва; ефекторна система – інгібування аденілатциклази; функція – ауторецептор;
- 5-НТ1В: чорна субстанція; інгібування аденілатциклази; ауторецептор;
- 5-НТ1D: судини головного мозку; інгібування аденілатциклази; звуження судин;
- 5-НТ1Е: кора; смугасте тіло; інгібування аденілатциклази;
- 5-НТ1F: головний мозок; периферія; інгібування аденілатциклази;
- 5-НТ2А: тромбоцити, гладкі м'язи, кора; активація фосфоліпази С; агрегація тромбоцитів, скорочення м'язів, нейрональне збудження;
- 5-НТ2В: дно шлунка; активація фосфоліпази С; скорочення;
- 5-НТ2С: хоріоїдне сплетіння; активація фосфоліпази С;
- 5-НТ3: периферичні рецептори; іонний механізм (утворення каналів – збільшення проникності Na і K); нейрональне збудження, вивільнення серотоніну;
- 5-НТ4: гіпокамп, шлунковокишковий тракт; активація аденілатциклази; нейрональне збудження, вивільнення ацетилхоліну.

Структура серотоніну має схожість зі структурою психоактивної речовини ЛСД (діетиламід д-лізергінової кислоти). ЛСД діє як агоніст деяких 5-НТ рецепторів та інгібує зворотне захоплення серотоніну, збільшуючи його зміст.

Нейрони, що є джерелом шляхів серотонінергічної системи, знаходяться переважно в корі головного мозку і в агломерованому вигляді в передньому (ростральному) і задньому (каудальному) ядрах шва мозкового стовбура. Клітини серотонінергічної системи згруповані в стовбурі мозку в 9 ядрах, позначених як В1-В9 відповідно до їх розташування. В ядрах шва серотонінергічні нейрони локалізуються разом з нейронами іншої хімічної приналежності (ГАМК-ергічними, що виділяють субстанцію Р, енкефаліновими та ін).

Клітинні ефекти серотоніну різноманітні, але в основному мають інгібіторний, гальмівний характер. Функція рецепторів включає як пряму регуляцію іонних каналів, так і багатоступеневу, пов'язану з G-білками і ферментами, їх регуляцію. Фактично в мозку міститься 1-2% всього серотоніну, наявного в організмі, а переважна його частина виявляється в екстраневральних структурах, що ускладнює використання показників метаболізму серотоніну для оцінки стану ЦНС. Весь метаболічний оборот серотоніну в нервовій тканині істотно залежить від активного транспорту в мозок триптофану і пов'язаний з функціями триптофангідроксилази, декарбоксилази ароматичних амінокислот і моноаміноксидази (МАО). Основним кінцевим метаболітом серотоніну є 5-гідроксиіндолоцтова кислота (5-ГІОК).

Участь серотоніну в діяльності ЦНС різноманітне. Це насамперед зумовлено тим, що вона супроводжується змінами метаболізму в бік зниження споживання мозком глюкози, поглинання кисню, лактатів і неорганічних фосфатів, а також порушенням співвідношення Na і K. Встановлено збудливу дію серотоніну на парасимпатичний відділ стовбура головного мозку і лімбічну зону кори. Він активує бульбарний відділ ретикулярної формації, але гальмує передачу імпульсів через зоровий бугор, мозолисте тіло і синапси кори великих півкуль головного мозку. Крім того, є свідчення впливу серотонінергічної системи мозку на збудливість вазомоторних і терморегуляторних центрів, а також блювотного центру.

Згідно сучасним уявленням, серотонін відіграє основну роль у регуляції настрою. З порушенням функції серотонінергічної системи пов'язують розвиток

психічних порушень, що виявляються депресією і тривогою. Надлишок серотоніну зазвичай викликає паніку, в той час як недолік, викликає депресію. Дефіцит моноамінів, до яких відноситься серотонін, здатний призводити до порушення синаптичної передачі в нейронах лімбічної системи і формувати депресивні стани, що протікають у вигляді різноманітних клінічно окреслених синдромів. Біохімічні дослідження дозволили зрозуміти, чому ряд харчових продуктів може служити своєрідними ліками від депресії. При емоціогенному харчовому поведженні, коли пацієнти їдять для того, щоб поліпшити настрій, зменшити тугу і апатію, вони воліють до легкозасвоємої вуглеводної їжі. Підвищення надходження вуглеводів призводить до гіперглікемії і слідом за нею до гіперінсулінемії. У стані гіперінсулінемії змінюється проникність гематоенцефалічного бар'єру для амінокислоти триптофану – попередника серотоніну, отже, збільшується синтез останнього в ЦНС. Прийом їжі може бути своєрідним модулятором рівня серотоніну в ЦНС – підвищення його синтезу, пов'язане з поглинанням вуглеводної їжі, призводить одночасно до посилення почуття насичення і до зменшення депресивних проявів. Тим самим було наочно показано: булімія і депресія мають загальний біохімічний патогенетичний механізм – дефіцит серотоніну.

Серотонінергічна система має відношення до різних видів соціальної поведінки (харчової, статевої, агресивної) і емоцій. Нейроендокринні ритми, настрої, сон, апетит і когнітивні функції модулюються серотониною системою середнього мозку. Серотонинова система іншої частини мозку – префронтальної кори – порушується при різних видах асоціальної поведінки (ауто- і екстероагресія, вбивство). Вважається, що виснаження серотонінової системи префронтальної кори обумовлює поведінкове розгальмування. Вивчення вмісту серотоніну в крові показало більш широкі межі коливання його змісту у хворих на шизофренію в порівнянні з іншими хворими і з психічно здоровими особами. У багатьох дослідженнях було також продемонстровано зниження в тканини мозку самогубців рівня 5-ГІОК. Це послужило підставою для гіпотези, згідно з якою гальмування метаболічного обороту серотоніну в деяких відділах мозку, зокрема, в стовбурових структурах

і префронтальній корі, є одним з нейробіологічних механізмів формування суїцидальної поведінки. На сьогоднішній день серотонінова система найбільш вивчена з цих позицій, і всі автори сходяться в тому, що дефіцит серотонінергічної медіації є важливим механізмом суїцидальної поведінки. У жертв суїциду і в осіб з високим ризиком суїциду, найімовірніше, має місце локальне зниження серотонінової медіації, що супроводжується підвищенням активності відповідних постсинаптичних рецепторів. Одним з важливих підтверджень цієї точки зору є ефективність антидепресантів – блокаторів зворотного захоплення серотоніну при депресіях з суїцидальними спробами.

Істотне значення надається серотоніну в діяльності антиноцицептивної системи, центральної регуляції больової чутливості. Зниження його змісту призводить до ослаблення анальгетичного ефекту, зниження больових порогів, більшій частоті розвитку больових синдромів. Від вмісту серотоніну в ЦНС залежить і ступінь вираженості болезаспокійливої дії морфіну та інших наркотичних анальгетиків. Вважають також, що анальгетична дія серотоніну може опосередковуватися ендogenousними опіатами, оскільки він сприяє вивільненню β -ендорфіну з клітин передньої долі гіпофіза. Місцеве (наприклад, внутрішньом'язове) введення екзогенного серотоніну викликає сильний біль у місці введення. Імовірно серотонін поряд з гістаміном і простагландінами, подразнюючи рецептори в тканинах, відіграє роль у виникненні больової імпульсації з місця пошкодження або запалення.

Серотонінергічна система мозку бере участь у регуляції сексуальної поведінки. Встановлено, що підвищення рівня серотоніну в мозку супроводжується пригніченням статевої активності, а зниження його вмісту, навпаки, веде до її підвищення.

Вплив серотоніну на функції деяких ендокринних залоз обумовлений, мабуть, не тільки його прямою дією, але і центральними механізмами, так як в підбугорній області мозку виявлені терміналі серотонінергічних нейронів, стимуляція яких супроводжується посиленням виділення кортиколіберіна і соматотропного гормону. Важливим є і та обставина, що серотонін стимулює

секрецію адреналіну і норадреналіну в мозковій частини надниркових залоз. Найімовірніше це здійснюється також через гіпоталамо-гіпофізарну систему.

Розлад циклу сон–неспанння при депресії пов'язано також з дісметаболізмом серотоніну. Він регулює δ-сон, ініціює фазу швидкого сну. Порушення сну можуть бути як основною (іноді єдиною) скаргою, що маскує депресію, так і однією з багатьох. Це особливо чітко видно на прикладі так званої прихованої (ларвірованої) депресії (депресії без депресії), оскільки при даній формі патології розлади сну можуть бути ведучим, а часом і єдиним проявом захворювання.

При оцінці схильності до алкоголізму, особлива увага приділяється аналізу генетичного поліморфізму серотонінового рецептора підкласу 2A (5-HT_{2A}), так як серотонін бере участь у регуляції споживання алкоголю. Прийом алкоголю посилює вивільнення катехоламінів і змінює концентрацію опіоїдів, призводить до тимчасової активації системи підкріплення, що викликає позитивну емоційну реакцію. У людини ген *5-HT_{2A}* знаходиться на довгому плечі 13-й хромосоми в локусі q14-q21 і характеризується рядом поліморфізмів в кодуєчій області, з яких діалельний поліморфізм (1438 G/A) в промоторній області розглядається в якості генетичного маркера, зчепленого з нервово-психічними захворюваннями, в тому числі і зі зловживанням алкоголем.

Було виявлено, що коливання рівня серотоніну в плазмі корелюють з динамікою нападу мігрені і була сформульована «серотонінова гіпотеза» мігрені. В її патогенезі і механізмах дій антимигренозного засобів беруть участь лише деякі специфічні підтипи 5-HT₁-рецепторів, локалізованих в церебральних судинах і сенсорному ядрі трійчастого нерву. Показано, що нейрони серотонінергічного дорсального ядра шва (одна з основних структур ендогенної антиноцицептивної системи) і норадренергічної блакитної плями стовбура мають численні проєкції до судин головного мозку і спінального ядра трійчастого нерву. Встановлено, що на пресинаптичних закінченнях трійчастого нерву локалізовані 5-HT_{1D}-рецептори і рецептори до ендотеліну. Вони знаходяться за межами гематоенцефалічного бар'єру, а їх активація призводить до інгібування виділення нейропептидів кальцитоніну, субстанції P

і до попередження розвитку нейрогенного запалення. Відповідно до цієї концепції, при мігрені (форма асептичного нейрогенного запалення) критичний фактор ймовірно нейрогенної або гормональної природи антидромно активує периваскулярні аферентні терміналі трійчастого нерву. Це викликає деполаризацію нервових закінчень і виділення з них потужних вазоділатуючих і аллогенних речовин – нейропептидів кальцитоніну, субстанції Р, нейрокініну А і вазоінтестіціального пептиду. Дані нейропептиди викликають розширення судин, збільшення проникності судинної стінки, пропотівання білків плазми і формених елементів крові, набряк судинної стінки і прилеглих ділянок твердої мозкової оболонки, дегрануляцію тучних клітин, агрегацію тромбоцитів. Кінцевим результатом нейрогенного запалення і є біль. Збільшення вмісту вільного серотоніну плазми в фазу нападу мігрені пов'язують з розпадом тромбоцитів. Вогнищева неврологічна симптоматика, характерна для цього етапу мігренозного нападу, виникає внаслідок звуження церебральних судин і зниження кровотоку в окремих ділянках мозку. У фазу головного болю спостерігається збільшення екскреції серотоніну і його метаболітів з сечею і подальше зниження його вмісту в плазмі і спинномозковій рідині. Це призводить до зниження тону судин, їх надмірному розтягуванню, периваскулярному набряку, подразненню больових рецепторів. Є підстави вважати, що у хворих мігренню є генетично зумовлений дефект обміну серотоніну, який може бути зумовлений багатьма факторами, в тому числі порушенням метаболізму тромбоцитів, дефіцитом ферменту, що руйнує тирамін в ШКТ (це підтверджується наявністю захворювань ШКТ у значної кількості осіб, які страждають на мігрень). У безболевому періоді мігрені виявлено підвищення чутливості серотонінових і норадреналінових рецепторів судинної стінки. Всередині судини активується агрегація тромбоцитів, що супроводжується виділенням серотоніну. Знижується вміст MAO, що також призводить до асептичного нейрогенного запалення судини.

Одним з нейрохімічних механізмів формування епілептичної активності є зміна обміну триптофану – «витік» його окислення в ЦНС з серотонінового на кінуреніновий шлях. В результаті в головному мозку знижується рівень

серотоніну (гальмівного нейромедіатора) і зростає рівень кінуреніну, який підвищує збудливість нейронів мозку. Однак, встановлено, що серотонін попереджає у мишей розвиток судом, що викликаються киснем. Більш того, будучи введеним в сонну артерію, він може припинити розвиток судом. Деякі протисудомні препарати (фенобарбітал, дилантин та ін) підвищують концентрацію серотоніну в мозку. Відома і власна протисудомна дія серотоніну. Він подовжує позитивність сну, викликаного барбітуратами. Особливо виражену гальмівну дію серотонін надає на кору великих півкуль. Гальмуючий ефект серотоніну обумовлений його безпосереднім впливом на синапси мозку. Важливо те, що, надаючи гальмівний вплив на кору великих півкуль і задіючу систему зорового бугра, серотонін не пригнічує активності ретикулярної формації середнього мозку. Не менш вираженим є його властивість вибірково збуджувати підкіркові структури, пов'язані з реакцією пробудження. Серотоніну притаманна здатність активувати холіноестеразу головного мозку, завдяки чому він є не тільки хімічним медіатором, але і модифікатором дії ацетилхоліну.

Відомо, що серотонінергічні нейрони шва середнього мозку іннервують церебральні судини і їх активність впливає на інтенсивність мозкового кровотоку. Найбільш виразні зрушення спостерігаються при церебральних інсультах. Експериментальні дані та клінічні дослідження свідчать про можливу участь серотоніну в патогенезі гострих порушень мозкового кровообігу, зокрема ішемічних інсультів. У цьому плані слід враховувати ангіоспастичні ефекти серотоніну, реалізовані опосередковано через гіпоталамус і при безпосередньому впливі на морфологічно змінені судини мозку. Цьому, мабуть, передують зміна вмісту серотоніну в речовині мозку. Встановлене значне підвищення вмісту серотоніну в спинномозковій рідині хворих субарахноїдальним крововиливом, ускладненим «відстроченим» вазоспазмом з розвитком інфаркту мозку – свідоцтво про безсумнівну участь цього біогенного аміну у вазоконстрикторному ефекті відносно церебральних судин.

В таблиці 15 представлені головні гени серотонінергічної системи та їх зв'язок з особистими характеристиками.

Таблиця 15

Поліморфізми генів серотонінергічної системи та їх зв'язок з особистими характеристиками

Ген	Поліморфізм	Функціональність алеля	Фізіологічний прояв
Ген транспортера серотоніну (<i>5HTT</i> , <i>SERT</i> або <i>SLC6A4</i>)	L/S в промоторному регіоні	При короткому (S) алелі транспортер серотоніну експресується в меншій мірі, ніж при довгому (L)	У носіїв LL генотипу підвищені дративливість та негативизм
Ген рецептора серотоніну 1 A (<i>5HT1A</i>)	C (-1019) G (rs 6295)	Рівень транскрипції алеля G вище, ніж C алеля	У носіїв G алеля підвищений невротизм та уникнення збитку
Ген рецептора серотоніну 2 A (<i>5HT2A</i>)	T102C (rs6313)	Рівень транскрипції алеля T вище, ніж C алеля	Носії C алеля менш агресивні і більш схильні до депресій
Ген моноаміноксидази A (<i>MAOA</i>)	VNTR в промоторному регіоні	Рівень транскрипції алеля з 3 повторами вище, ніж з 4	У носіїв алеля з 3 повторами підвищена ймовірність виникнення агресивної та антисоціальної поведінки
Ген триптофангідроксилази 1 типу (<i>TPH1</i>)	A218C (rs1800532)	Рівень транскрипції алеля A вище, ніж C алеля	У носіїв C алеля рівень тривожності і непрямой ворожості підвищений
Ген нейротропінового фактору розвитку мозку (<i>BDNF</i>)	Val66Met (rs6265)	Секреція зрілого Met-BDNF білка в нейронах знижена у порівнянні з Val-BDNF білком	Алель 66Met пов'язаний з підвищеною тривожністю, більш слабкою епізодичною пам'яттю та зниженою активністю гіпокампу під час процесів запам'ятовування

Гена транспортера серотоніну (*5HTT*, *SERT* або *SLC6A4*) розташований на 17 хромосомі в області q11.1-q12. При аналізі поліморфних варіантів гена виявлений VNTR-поліморфізм, локалізований у 2-му інтроні, з двома типовими (12 і 10 одиниць повтору) і одним «рідкісним» (9 одиниць повтору) алелями, а також поліморфізм в промоторі гена (поділ або інсерція 44 п.п.). При короткому промоторному алелі (S) транспортер серотоніну в меншій мірі транскрибується і відповідно в меншій мірі представлений на

пресинаптичній мембрані, ніж при довгому алелі (L). Ген *5HTT* пов'язують з розвитком депресії і жахом, тому він неофіційно носить відповідні назви – «ген депресії» та «ген жаху».

Ген рецептора серотоніну (*5HT2A*) знаходиться в 13 хромосомі і містить 3 екзона і 2 інтрони. Один з найбільш значущих поліморфізмів – це заміна T102C (rs6313). Аллель T пов'язаний з підвищеною експресією гена в порівнянні з аллелем C. Показано, що у носіїв TT генотипу агресивність вище, ніж у носіїв C алеля. Крім агресивності від щільності рецепторів серотоніну залежить швидкість розвитку втоми. Було виявлено, що при регулярних фізичних навантаженнях щільність *5HT2A* зростає, підвищуються настрої і фізична працездатність. Але при тривалих фізичних навантаженнях високої інтенсивності щільність цих рецепторів падає, погіршується настрої і збільшується загальна втома.

Ген моноаміноксидази А (*MAOA*) знаходиться в X-хромосомі, складається з 15 екзонів і 14 інтронів та кодує білок розміром 527 амінокислот. В гені присутня невелика кількість поліморфних сайтів. Оскільки ген *MAOA* знаходиться в X-хромосомі (чоловіки несуть тільки один варіант гену), то якщо носимий алель пов'язаний з пониженою активністю ферменту, то у чоловіків цей фенотип обов'язково проявляється. З експресією гену пов'язаний тільки один поліморфізм – VNTR 30 п.н. в промоторному регіоні гену. Існують алелі з 2; 3; 3,5; 4; 5 і дуже рідко з 6 повторами. Найбільш часто зустрічаються алелі з 3 і 4 повторами.

Здатність моноаміноксидаз метаболізувати нейротрансмітери дозволяє віднести їх до генів-кандидатів, відповідальних за розвиток поведінкових рис, почуття сприйняття часу і психічних захворювань. *MAOA* є ферментом зовнішньої мембрани мітохондрій, що каталізує окислення аміногруп біогенних і ксенобіотичних амінів. *MAOA* переважно окислює біогенний амін (серотонін, дофамін, адреналін і норадреналін) в ЦНС і периферичних тканинах. Багато антидеприсантів та препаратів, що застосовуються при лікуванні підвищеної збудливості є інгібіторами *MAOA*.

Сильна нестача МАОА призводить до імпульсивної поведінки. Особи з пониженою активністю ферменту часто характеризуються імпульсивністю та агресивною поведінкою. Ген *МАОА* пов'язують з розвитком агресії, тому він неофіційно носить відповідну назву – «ген агресії» або «ген воїна».

1.2. Гени дофамінергічної системи

Гормон дофамін є одним з хімічних факторів внутрішнього підкріплення (ФВП) і служить важливою частиною «системи винагороди» мозку, оскільки викликає почуття задоволення, чим впливає на процеси мотивації і навчання. Дофамін природним чином виробляється у великих кількостях під час позитивного, за суб'єктивним поданням людини, досвіду – наприклад, прийому смачної їжі, приємних тілесних відчуттів, сексу, а також наркотиків. Нейробіологічні експерименти показали, що навіть спогади про позитивне заохочення можуть збільшити рівень дофаміну, тому даний нейромедіатор використовується мозком для оцінки і мотивації, закріплюючи важливі для виживання і продовження роду дії.

Дофамін грає важливу роль в забезпеченні когнітивної діяльності. Активація дофамінергічної передачі необхідна при процесах перемикання уваги людини з одного етапу когнітивної діяльності на інший. Таким чином, недостатність дофамінергічної передачі призводить до підвищеної інертності хворого, яка клінічно проявляється уповільненням когнітивних процесів (брадіфренія) і персевераціями. Дані порушення є найбільш типовими когнітивними симптомами хвороб з дофамінергічною недостатністю – наприклад, хвороби Паркінсона.

Попередником дофаміну є L-тирозин (він синтезується з фенілаланіну), який гідроксильється ферментом тирозингідроксилазою з утворенням L-Диоксифенілаланіну (3,4-диоксифенілаланіну, ДОФА, L-ДОФА), який, в свою чергу, декарбоксильється за допомогою ферменту L-ДОФА-декарбоксилази і перетворюється на дофамін. Цей процес відбувається в цитоплазмі нейрону. Постсинаптичні дофамінові рецептори відносяться до сімейства GPCR. Існує

щонайменше п'ять різних підтипів дофамінових рецепторів – D1-5. Рецептори D1 і D5 володіють досить значною гомологією і пов'язані з білком GS, який стимулює аденілатциклазу, внаслідок чого їх зазвичай розглядають спільно як D1-подібні рецептори. Решта рецепторів підродино подібні D2 і пов'язані з G_i-білком, який інгібує аденілатциклазу, внаслідок чого їх об'єднують під загальною назвою D-2-подібні рецептори. Таким чином, дофамінові рецептори відіграють роль модуляторів довгострокової потенціації. Участь у «внутрішньому підкріпленні» беруть D2 і D4 рецептори. У великих концентраціях дофамін також стимулює α- і β-адренорецептори. Вплив на адренорецептори пов'язаний не стільки з прямою стимуляцією адренорецепторів, скільки зі здатністю дофаміну вивільняти норадреналін із гранулярних пресинаптичних депо, тобто надавати непряму адреноміметичну дію.

З усіх нейронів ЦНС тільки близько 7000 виробляють дофамін. Відомо кілька дофамінових ядер, розташованих в мозку. Це дугоподібне ядро (лат. *nucleus arcuatus*), що дає свої відростки в середині піднесення гіпоталамуса. Дофамінові нейрони чорної субстанції посилають аксони в стриатум (хвостаті і чечевицеподібне ядро). Основними дофаміновими шляхами є:

- мезокортикальний шлях (процеси мотивації та емоційні реакції);
- мезолімбичний шлях (продукування почуттів задоволення, відчуття нагороди і бажання);
- нігостріарний шлях (рухова активність, екстрапірамідна система).

Дофамінергічні підсистеми знаходяться під контролем або самі контролюють норадренергічні, серотонінергічні, ГАМК-ергічні, холінергічні, мелатонінергічні, глутаматергічні, пептидергічні системи. ГАМК-ергічні і серотонінергічні системи знаходяться в антагоністичних відносинах з дофамінергічною системою, а норадренергічна і дофамінергічна системи в різних функціональних станах функціонують однонаправлено: як в період неспання, так і в період сну. Взаємодії дофамінергічної і холінергічної системи складні, в умовах патологічних процесів активність цих систем неоднозначна.

Найбільш відомими патологіями, пов'язаними з дофаміном, є шизофренія і паркінсонізм, а також obsесивно-компульсивний розлад. Різні незалежні дослідження показали, що багато осіб, які страждають на шизофренію, мають підвищену дофамінергічну активність в деяких структурах мозку, знижену дофамінергічну активність в мезокортикальному шляху і префронтальній корі. Паркінсонізм пов'язаний з пониженим вмістом дофаміну в нігростріарному шляху. З порушенням дофамінергічної системи пов'язують такі розлади, як ангедонія, депресія, деменція, патологічна агресивність, фіксація патологічних потягів, синдром персистуючої лактореї-аменореї, імпотенція, акромегалія, синдром неспокійних ніг і періодичних рухів в кінцівках.

Зараз вже не підлягає сумніву важливість ролі дофамінергічної передачі в контролі мотиваційних і пізнавальних процесів, а також адаптації до стресових ситуацій. До дофамінових генів психоемоційних характеристик людини відносяться наступні гени: гени, що кодують 5 основних дофамінових рецепторів (*DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* і *DRD5*); дофаміновий транспортер (*DAT* або *SLC6A3*), який бере участь у вторинному захопленні дофаміну з синаптичної щілини між дофамінергічними нейронами середнього мозку; катехол-О-метилтрансфераза (*COMT*), яка відповідає за інактивацію катехоламінів в головному мозку; тирозингідроксилаза (*TH*), яка є швидкість-лімітуючим ферментом в біохімічному ланцюзі синтезу дофаміну, норадреналіну та адреналіну та деякі інші.

В таблиці 16 представлені головні гени дофамінергічної системи та їх зв'язок з особистими характеристиками та когнитивними здібностями.

Таблиця 16

Поліморфізми генів дофамінергічної системи та їх зв'язок з особистими характеристиками та когнитивними здібностями

Ген	Поліморфізм	Функціональність алеля	Фізіологічний прояв
<i>DRD2</i>	TaqI (T/C)	T (або A1) алель – низька спорідненість <i>DRD2</i> до дофаміну і низька щільність <i>DRD2</i>	Високий рівень інтелекту у жінок, індексу вербальної і загальної креативності, високий коефіцієнт «пошуку новизни», підвищена збудливість та імпульсивність
<i>DRD3</i>	Ser9Gly (A/G)	Ser9 (або A1) – низька спорідненість <i>DRD3</i> до дофаміну	Низький коефіцієнт «пошуку новизни», висока імпульсивність у гетерозигот
<i>DRD4</i>	Повтори по 48 п.н. в 3 екзоні (2-10)	Відмінності у ефективності передачі сигналів	7 повторів – високий коефіцієнт «пошуку новизни», високий ризик

	повторів)		розвитку синдрому дефіциту уваги та гіперактивності
<i>DAT</i>	Повтори по 40 п.н. в 3'UTR області (3-13 повторів)	9 повторів – висока експресія <i>DAT</i> і високий рівень зворотнього захоплення дофаміну (10 повторів – низький рівень)	10 повторів – високі показники швидкості, високий ризик розвитку депресії і синдрому дефіциту уваги та гіперактивності
<i>COMT</i>	Val158Met	158Met алель – низька активність ферменту	158Met алель – високі когнітивні здібності, велика кількість сірої речовини у головному мозку, низький ризик розвитку депресії, знижена фізична агресивність
<i>TH</i>	ТСАТ-повтори в 1 інтроні (5-10 повторів)	Відмінності у експресії <i>TH</i>	8 повторів – високі коефіцієнти «нейротизму» та «ранимості»

Ген катехол-О-метилтрансфераза (англ. catechol-O-methyl transferase – *COMT*) відноситься до сімейства генів дофамінергічних систем і відіграє ключову роль у розпаді дофаміну в префронтальній корі мозку. У 4-му екзоні гена *COMT* зустрічається заміна гуаніну на аденін, яка призводить до заміщення валіну на метіонін в положенні 158 ферменту (Val158Met).

Носійство 158Met алеля асоційоване з більш (в 4 рази) низькою активністю ферменту у порівнянні з Val158 алелем, а значить, і з більшою концентрацією дофаміну в префронтальній корі мозку. Дослідженнями було встановлено, що діти і підлітки у віці 9-17 років з Val/Met генотипом в різних психологічних і моторних (показники пам'яті, уваги, координації рухів, швидкість рухових реакцій) показують кращі результати. Крім того, при вивченні асоціації Val158Met поліморфізму гену *COMT* з емоційними проявами у жінок, було встановлено взаємозв'язок *COMT* Val158 алеля з підвищеною фізичною агресивністю.

Рецептор *AVPR1* відноситься до сигнальних G-білків і є універсальним посередником при передачі гормональних сигналів від рецепторів клітинної мембрани до цитозольних білків, що викликає кінцеву клітинну відповідь. *AVPR1* опосередковує сигнали аргінін-вазопресину, а значить, відповідає за важливі функції головного мозку, пов'язані з емоціями, творчістю, темпераментом, поведінкою в суспільстві та ін.

У промоторі гена рецептора аргінін-вазопресину 1 α типу (*AVPR1*) виявлений мікросателітний поліморфізм, асоційований з соціальною поведінкою і аутизмом. RS1 і RS3 маркери асоціюються з високими

коефіцієнтами духовності (результат тесту Tellegen Absorption Scalt – TAS) і залежністю від винагороди (результат тесту TPQ Reward Dependence).

1.3. Гени розумових здібностей людини

В справжній час ведеться активний пошук молекулярно-генетичних маркерів, асоційованих з показниками інтелектуальної діяльності людини.

В таблиці 17 представлені узагальнені дані по генам розумових здібностей людини. Роль частини цих генів не підтверджена, тому потрібні подальші дослідження в цьому напрямку.

Таблиця 17

Поліморфізми генів розумових здібностей людини

Ген	Продукт гену	Фенотип
<i>5HT2A</i>	Рецептор серотоніну 2A	Результати тестів CPT (Continuous performance test) та WCST (Wisconsin card sorting test)
<i>5HTT</i>	Транспортер сератоніну	IQ
<i>ACE</i>	Ангіотензинперетворюючий фермент	IQ
<i>ADRB2</i>	B-2 адренергічний рецептор	Загальний фактор інтелекту
<i>ALDH5A1</i>	Альдегіддегідрогеназа 5, A1	Загальний фактор інтелекту
<i>APOE</i>	Аліпопротеїн E	Пам'ять
<i>BDNF</i>	Нейротропіновий фактор розвитку мозку	Пам'ять
<i>CAMTA1</i>	Кальцимодулінзв'язуючий транскрипційний активатор, 1	Пам'ять
<i>CCKAR</i>	Рецептор холецистокініну A	Загальний фактор інтелекту
<i>CHRM2</i>	Холінергічний рецептор, тип мускариновий, 2	Загальний фактор інтелекту
<i>CHRNA7</i>	Холінергічний рецептор, тип нікотинний, $\alpha 7$	Пам'ять та увага
<i>COMT</i>	Катехол-О-метилтрансфераза	Результати тесту WCST та логічна пам'ять
<i>CTSD</i>	Капсин D	Загальний фактор інтелекту та швидкість переробки інформації
<i>DISC1</i>	Порушений при шизофренії	IQ
<i>DRD4</i>	Рецептор дофаміну 4	Пам'ять та IQ
<i>DTNBP1</i>	Дисбіндин-1	Загальний фактор інтелекту
<i>FADS2</i>	Десатураза жирних кислот 2 типу	Загальний фактор інтелекту та його зв'язок з грудним вигодовуванням
<i>IGF2R</i>	Рецептор інсуліноподібного фактора росту 2 типу	Загальний фактор інтелекту та математичні здібності
<i>KIBRA (WWC1)</i>	Домен, що містить WW та C2, тип 1	Пам'ять
<i>KL</i>	Пептид клото	Результати тесту МНТ (Moray house test)
<i>NCSTN</i>	Нікастрин	IQ

<i>OXR</i>	Рецептор окситоцину	Загальний фактор інтелекту
<i>PLXNB3</i>	Плексин В3	Загальний фактор інтелекту
<i>PPP1R1B</i>	Фосфопротеїн, що регулюється дофаміном та цАМФ	Загальний фактор інтелекту
<i>PRNP</i>	Пріоновий протеїн	Бали за шкалою MMSE (mini-mental state examination)
<i>S100B</i>	S100 кальційзв'язуючий протеїн В	Бали за шкалою MMSE
<i>SNAP-25</i>	Синаптосомальний протеїн 25	Загальний фактор інтелекту
<i>WRN</i>	Протеїн синдрому Вернера	Загальний фактор інтелекту

Контрольні питання

1. Назвіть предмет психогенетики?
2. Чим займається молекулярна психогенетика?
3. Що представляє собою серотонін?
4. Що лежить в основі функціонування серотонінергічної системи?
5. Скільки типів рецепторів серотоніну Ви знаєте?
6. Які функції виконує серотонінергічна система?
7. Перерахуйте поліморфізми генів серотонінергічної системи та їх зв'язок з особистими характеристиками людини.
8. Що Вам відомо про роботу транспортера серотоніну при rs25531 поліморфізмі гена *5HTT*, *SERT* або *SLC6A4*?
9. Яка здатність моноаміноксидаз, дозволяє віднести їх до генів-кандидатів, відповідальних за розвиток поведінкових рис, почуття сприйняття часу і психічних захворювань?
10. Що представляє собою дофамін?
11. Що лежить в основі функціонування дофамінергічної системи?
12. Які функції виконує дофамінергічна система?
13. Перерахуйте поліморфізми генів дофамінергічної системи та їх зв'язок з особистими характеристиками людини.
14. Що Вам відомо про ген *COMT*?
15. Перерахуйте гени розумових здібностей людини.

РОЗДІЛ VIII

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Глава 1. Забір, транспортування і зберігання біологічного матеріалу

Вихідний етап всіх молекулярно-біологічних досліджень – це отримання зразків ДНК і РНК. Джерелом геномної ДНК можуть бути будь-які клітини, що містять ядро. В практиці молекулярної біології найчастіше використовують епітеліальні або букальні клітини щоки, лейкоцити і епітеліальні клітини волосяної цибулини (при необхідності довготривалого транспортування біоматеріалу). Можливість проведення молекулярно-біологічного аналізу з невеликою кількістю легко доступного біоматеріалу є методичною перевагою методів даної групи. Виділена ДНК однаково придатна для проведення різноманітних досліджень і може довго зберігатися в замороженому виді.

1.1. Зішкріб букального епітелію (букальний зішкріб)

Після гігієни порожнини рота проводять ретельне протирання одноразовим стерильним зонд-тампоном (тупфером або свабом) внутрішніх щічних поверхонь. Процедура зішкрібу триває 2-3 хв. При цьому слід уникати контакту зонда з зубами, оскільки на них присутня мікрофлора.

Після відбору проби вісь зонда відділяють від тампону, залишаючи його зі зразком в пронумерованій стерильній мікропробірці. Подібна технологія дозволяє здійснювати транспортування, зберігання і центрифугування проби в первинній мікропробірці, що значно спрощує процедуру пробопідготовки, а також забезпечує економію місця при транспортуванні проби.

Також використовують стерильні мікропробірки зі специфічним транспортним середовищем, яке містить компоненти, що пригнічують ріст мікроорганізмів обсягом 300 мкл. У цьому випадку активним взобовтуванням клітини переводять з поверхні зонда в транспортну рідину.

Проби до екстракції ДНК зберігають при 20°C.

Букальний зішкріб – найбільш гігієнічний спосіб забору букальних клітин, проте їх виходить значно менше, ніж при змивах за допомогою фізіологічного розчину.

Останньою розробкою для здійснення букального зішкрібу є спеціальний пристрій «EasiCollect™». При виконанні зішкрібу, букальні клітини захоплюються губчастим аплікатором і потім переносяться на індикаторну карту FTA. Карта FTA просочена спеціальним буфером, який лізує клітини і руйнує білки при контакті. ДНК, навпаки, захищається від руйнування мікробами і впливом факторів зовнішнього середовища. Індикаторні FTA карти пофарбовані рожевим барвником, який стає білим при контакті з біологічним зразком (слиною). Таким чином, зазначається місце знаходження зразку. Для використання індикаторних FTA карт достатньо нанести біологічний зразок на карту і просушити її при кімнатній температурі. ДНК, пов'язана з FTA папером, придатна для подальшого аналізу.

1.2. Змив букального епітелію (букальний змив)

Після гігієни порожнини рота проводять інтенсивне, з використанням язика, полоскання рота 8-10 мл ізотонічним розчином хлориду Na (фізіологічним розчином) з додаванням 2 мМ антикоагулянта ЕДТА. Процедура триває 1 хв. Після полоскання рота, розчин акуратно (без утворення бульбашок) через колектор зливається назад в пронумеровану стерильну пробірку.

Проби з біологічним матеріалом зберігають при 20°C до екстракції ДНК. Слід зазначити, що ДНК з такого біоматеріалу необхідно виділяти як можна швидше в зв'язку з наявністю в ньому багатой мікрофлори, яка призводить до деградації ДНК. Істотні недоліки такого способу забору клітин – це висока вірогідність контамінації (змішування) біопроб, а також незручності, що виникають при зливанні суміші фізіологічного розчину і слинної рідини назад у колектор.

1.3. Забір венозної крові (венопункція)

Венозна кров, з якої отримують лейкоцити (у зрілих еритроцитах ядра не містяться), є пріоритетним біоматеріалом для подальшого проведення молекулярно-біологічного аналізу. У нормі вона не містить мікрофлори і з неї отримують достатню кількість лейкоцитів.

Капілярна кров, хоча і містить невелику кількість лейкоцитів, її забір все ж не є ефективним способом отримання достатньої кількості клітин, що містять ядра.

Забір крові проводиться натще з ліктьової вени одноразовим шприцем об'ємом 5 мл з голкою діаметром 0,8-1,1 мм. Після забору, кров зі шприца акуратно (без утворення піни) переноситься в пронумеровану стерильну пробірку з антикоагулянтом (6% розчин ЕДТА у співвідношенні 1:19 або 3,8% розчин цитрату Na у співвідношенні 1:9, гепарин в якості антикоагулянта використовувати не можна). Найкращим способом виконання процедури венопункції є застосування вакутайнера – системи вакуумного забору венозної крові. Пробірка вакутайнера повинна містити антикоагулянти: ЕДТА (пробірка має кришку бузкового коліру) або цитрат Na (пробірка має кришку блакитного коліру).

Після здійснення венопункції одним з вищеописаних способів, пробірка перевертається кілька разів (для перемішування з антикоагулянтом). Пробірку з кров'ю до дослідження зберігають у холодильнику при +4-+8°C (бажано не більше двох діб). Можна виділити з крові лейкоцити, заморозити їх і періодично використовувати їх порції для екстракції з них ДНК.

1.4. Амніоцентез

Для отримання зразка ДНК розвиваючогося плоду людини, використовують процедури амніоцентезу, кордоцентезу та біопсії хоріону, які складають основу пренатальної генетичної діагностики, або преімплантаційної генетичної діагностики – ПГД (англ. **pre-implantation genetic diagnosis – PGD** або **PIGD**). ПГД проводиться з метою отримання

біоматеріалу, екстракції з нього ДНК та її аналізу. ПГД необхідна для виявлення та профілактики хромосомних хвороб, носійства хромосомних аномалій, а також моногенних хвороб.

Амніоцентез (англ. amniocentesis або amniotic fluid test – AFT) представляє собою інвазивну процедуру, яка полягає в пункції амніотичної оболонки з метою отримання амніотичної рідини (навколоплідних вод) для подальшого лабораторного дослідження.

У амніотичній рідині знаходяться клітини плоду, що представляють собою частинки епітелію, які містять повний хромосомний набір майбутньої дитини. Після забору біоматеріалу з амніотичної рідини виділяються клітини плоду і поміщаються в спеціальне живильне середовище, де відбувається їх розмноження. Отримавши потрібну кількість біоматеріалу, фахівці проводять екстракцію з нього ДНК, а потім всі необхідні дослідження. Дана процедура вимагає значних витрат часу і може тривати від 3 до 6 тижнів.

Амніоцентез дозволяє виявити порушення в ДНК і визначити правильність розвитку плоду. Передумовами для призначення діагностичного заходу є наявність аномалій хромосомного набору і спадкових захворювань у членів сім'ї майбутньої дитини, а також можлива генетична схильність плода до розвитку проблем спинного і головного мозку. До групи ризику відносяться вагітні жінки, чий вік перевищує 35-річний рубіж. Крім цього, дослідження амніотичної рідини призначається при отриманні негативних результатів ДНК-тестів крові. В цьому випадку амніоцентез дозволяє отримати найбільш достовірні дані, що свідчать про стан плода. Дослідження амніотичної рідини дає можливість виявити такі серйозні захворювання, як хвороба Дауна, синдром Клайнфельтера і синдром Тернера. Якщо у фахівців є дані про наявність у одного з батьків патології генетичного розвитку, проводиться аналіз на предмет даного захворювання. Крім цього, в ході проведення пренатальної діагностики вдається виявити фенілкетонурию, гемофілію та муковісцидоз. Крім виявлення генетичних порушень, справжнє дослідження дозволяє встановити стать майбутньої дитини. Проведення тесту дає можливість

отримати найбільш достовірні результати. Медична статистика стверджує, що ступінь точності при виконанні амніоцентезу становить приблизно 99,4%.

Амніоцентез можна виконувати в першому, другому і третьому триместрах вагітності (оптимально – в 16-20 тижнів вагітності). Найчастіше діагностика проводиться на 16 тижні вагітності, після проведення УЗД, що дозволяє визначити найбільш безпечно для плода місце забору амніотичної рідини.

Для проведення амніоцентезу необхідно близько 45 хв. Процедура виконується під місцевим наркозом. Під ультразвуковим контролем вибирають місце пункції. Пункцію переважно проводять внеплацентарно, у вільній від петель пуповини найбільшій кишені. Якщо голку необхідно ввести трансплацентарно, вибирають найбільш тонку ділянку плаценти, що не має розширених межворсінкових просторів. Амніоцентез проводять за допомогою голок, які мають діаметр 18-22G. Технічно амніоцентез виконують методом «вільної руки» або з використанням пункційного адаптера, розміщеного на конвексному абдомінальному датчику. Його використання дозволяє контролювати траєкторію руху і глибину занурення пункційної голки за допомогою траси на екрані монітора. Переконавшись в тому, що голка після пункції розташована в порожнині плідного міхура, з неї витягують мандрен, приєднують шприц і аспірують необхідну кількість амніотичної рідини. Після цього в просвіт голки знову поміщають мандрен і видаляють її з порожнини матки. Після закінчення процедури здійснюють оцінку стану плода – наявність і частоту його серцебиття.

Під час проведення процедури, больові відчуття відсутні, проте деякі вагітні жінки відчувають тиск в момент забору рідини з матки.

Після виконання амніоцентеза жінці необхідний спокій. Протягом декількох годин вона повинна уникати серйозних фізичних навантажень.

При проведенні амніоцентезу можливий розвиток ускладнень, але у більшості випадків їх не виникає. Даний захід може стати причиною викидня, однак ризик становить менше 1%. Після виконання забору біоматеріалу в деяких випадках у вагітних жінок спостерігаються кровотечі і судоми, а також

незначна втрата рідини. Крім цього, до ускладнень після амніоцентезу відносяться інфекційне зараження, нанесення ушкоджень плоду голкою і змішування крові при наявності у матері і дитини різних груп крові. Факторами, що збільшують ризик виникнення ускладнень, є ожиріння і перенесені вагітною раніше операції на черевній порожнині.

Абсолютними протипоказаннями для проведення дослідження є наявність у матері гострих запальних процесів або загострення хронічних захворювань.

При виконанні амніоцентезу в третьому триместрі вагітності рекомендують виконання моніторного спостереження за станом і рухами плоду, яке триває на протязі всієї процедури. При необхідності вагітній жінці може бути призначена зберігаюча, антибактеріальна або інтраопераційна терапія.

1.5. Кордоцентез

Кордоцентез (англ. cordocentesis або percutaneous umbilical cord blood sampling – PUBS) представляє собою інвазивну процедуру отримання пуповинної або кордової крові плода для подальшого лабораторного дослідження, яка зазвичай проводиться паралельно процедурі амніоцентезу.

Кордоцентез проводиться не раніше 18 тижнів гестації.

Після проведення інфільтраційної анестезії, під ультразвуковим контролем, через передню черевну стінку вагітної жінки роблять прокол тонкою пункційною голкою. Після того, як голка опиняється у суді пуповини, отримують до 5 мл крові.

1.6. Біопсія хоріону (хоріонбіопсія)

Біопсія хоріону (хоріонбіопсія) (англ. chorionic villus sampling – CVS) представляє собою інвазивну процедуру отримання зразка тканини хоріона для подальшого лабораторного дослідження. Основні переваги хоріонбіопсії – це виконання діагностики в ранні терміни вагітності, швидкість отримання

результату (в середньому 2-3 дні), ДНК-діагностика захворювання і можливе визначення статі плоду.

Тканина хоріона, в основному, має ту ж генетичну структуру, що і плід, тому також придатна для проведення генетичної діагностики. Достатній обсяг тканин хоріона дорівнює 10-15 мг. Частота отримання необхідної кількості плодового матеріалу – 94-99,5%.

Отримання тканини хоріона здійснюють шляхом пункції матки через передню черевну стінку (трансабдомінальна хоріонбіопсія) або через піхву і шийку матки (трансцервікальна хоріонбіопсія) біопсійними щипцями або аспіраційним катетером. Вибір методу залежить від особливостей розташування хоріона в матці.

Контрольні питання

1. Яким чином здійснюється процедура букального зішкрібу?
2. Які варіанти букального зішкрібу Вам відомі?
3. Опишіть процедуру виконання букального змиву.
4. Які умови висуваються для забору венозної крові?
5. Що таке амніоцентез?
6. Як виконується процедура кордоцентезу?
7. Що представляє собою хоріонбіопсія?

Глава 2. Екстракція ДНК з біологічного матеріалу

2.1. Екстракція ДНК з букального епітелію сорбентним методом

Сорбентний метод застосовується для виділення ДНК з епітеліальних клітин, отриманих за допомогою букального зішкрібу.

ДНК виділяють сорбентним методом відповідно з доданою до відповідного комплекту інструкцією щодо застосування. Мікропробірки з пробами (містять зішкріблені клітини і транспортне середовище) центрифугують протягом 10 хв при 12000 об/хв. Супернатант видаляють вакуумним аспіратором з використанням окремого наконечника, а до осаду додають 300 мкл лізуючого розчину. Далі проби ретельно перемішують на вортексі і встановлюють до термостату на 5 хв при 65°C. Лізат центрифугують протягом 5 хв при 12000 об/хв. Супернатант забирають окремим наконечником і переливають у нові маркіровані пробірки, що містять 20 мкл ресуспендованого сорбенту. З сорбентом перемішують на вортексі, залишають на 2 хв на штативі, потім знову перемішують і залишають на 5 хв. Далі проби центрифугують протягом 30 сек при 5000 об/хв, супернатант видаляють вакуумним аспіратором з використанням окремого наконечника, а до осаду додають 500 мкл відмивного розчину і перемішують на вортексі. Після цього проби центрифугують протягом 30 сек при 10000 об/хв, супернатант видаляють вакуумним аспіратором з використанням окремого наконечника, і відмивання повторюють. Супернатант після відмивання видаляють повністю, а мікропробірки з відкритими кришками встановлюють до термостату на 10 хв при 65°C до повного просушування сорбенту, що містить очищену ДНК. Потім в пробірки додають 50-100 мкл TE-буфера для елюції ДНК, перемішують на вортексі і поміщають до термостату при 65°C на 5 хв, періодично струшуючи на вортексі. Мікропробірки центрифугують при 12000 об/хв протягом 1 хв, після чого супернатант містить ДНК, готову до постановки ПЛР.

Мікропробірки з ДНК зберігають при 20°C або при більш низьких температурах у холодильниках та автоматичних системах біобанкінгу. Постійне розморожування розчину з ДНК для подальшої роботи з нею,

призводить до її деградації. Тому відразу після екстракції ДНК загальний розчин необхідно розділити на різні частини (розаліквотити) і розморожувати тільки окремі аліквоти. Термін придатності проб ДНК, виділених сорбентним методом, при дотриманні умов зберігання становить не менше 1 року.

2.2. Виділення ДНК з букального епітелію методом лужної екстракції

Метод лужної екстракції ДНК застосовують у разі використання в якості біоматеріалу букального епітелію, отриманого за допомогою змиву.

Вміст пробірок з сумішшю фізіологічного розчину і слинної рідини зливають у пронумеровані 1,5-міліметрові мікропробірки для накопичення клітин букального епітелію. Для цього клітини осаджують центрифугуванням протягом 10 хв при 12000 об/хв, а супернатант видаляють в колбу-пастку, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремий наконечник для кожної проби. При необхідності цю процедуру повторюють 2-3 рази (для достатнього накопичення клітин). До осаду додають 1 мл фізіологічного розчину, що містить 10 мМ ЕДТА, і перемішують на вортексі. Після подальшого центрифугування проб протягом 10 хв при 12000 об/хв супернатант видаляють вакуумним відсмоктувачем, а до осаду додають 0,5 мл 20 мМ NaOH. Далі проби ретельно перемішують на вортексі і встановлюють у твердотільний термостат на 20 хв при температурі 95°C. Після охолодження проби центрифугують протягом 10 хв при 12000 об/хв для осадження білків і продуктів розпаду клітин. Супернатант з розчищеною в ньому ДНК забирають окремим наконечником і переливають у нові маркеровані пробірки. Для нейтралізації лужного розчину з ДНК в проби додають 4 мкл 1М HCl. Після закінчення цієї процедури проби готові до постановки ПЛР.

Термін придатності проб ДНК, виділених методом лужної екстракції, при дотриманні умов зберігання становить не менше 5 років.

2.3. Екстракція ДНК з лейкоцитів крові сорбентним методом

Сорбентний метод також може застосовуватися для виділення ДНК із лейкоцитів після взяття венозної крові.

У цьому випадку ДНК виділяють сорбентним методом відповідно з доданою до відповідного комплекту інструкцією щодо застосування. Комплект відрізняється наявністю додаткового відмивного розчину. У зв'язку з цим виділення ДНК з лейкоцитів крові аналогічно процедурі, описаній вище, але доповнюється промиванням за допомогою додаткового відмивного розчину.

В справжній час виділення ДНК з отриманих біологічних зразків є автоматичним процесом завдяки існуванню автоматичних систем (станцій або роботів) екстракції і очищення нуклеїнових кислот, які максимально знижують ймовірність контамінації біоматеріалу. Принцип дії даних систем заснований на методі приципітації (осадження) з утворенням супернантанту і приципітату (осаду).

Реакції за участю нуклеїнових кислот часто вимагають точних відомостей про кількість і чистоту препарату. Тому після екстракції проводять **кількісний аналіз нуклеїнових кислот** – визначення концентрації ДНК або РНК в суміші або чистому препараті. Для кількісного аналізу застосовують методи спектрофотометрії і флуориметрії.

Спектрофотометрія – це фізико-хімічний метод дослідження розчинів і твердих речовин, заснований на вивченні спектрів поглинання в ультрафіолетовій (200-400 нм), видимій (400-760 нм) та інфрачервоній (>760 нм) областях спектру. Нуклеїнові кислоти певним чином поглинають ультрафіолет. У спектрофотометрах зразок піддається дії ультрафіолету з довжиною хвилі 260 нм, а фотодетектор вимірює кількість світла, що пройшло через зразок. Чим більше світла поглинено, тим вище концентрація нуклеїнової кислоти у зразку.

Флуориметрія (флуорисцентний аналіз) – це визначення концентрації речовини за інтенсивністю флуоресценції, що виникає при опроміненні речовини УФ-променями. За відповідних умов цим шляхом можна виявити наявність незначних кількостей речовини.

Процес підготовки реакційних сумішей для постановки ПЛР або процес підготовки бібліотек для NGS-секвенування, відносяться до рутинних процедур. Тим не менш, від точності і якості організації даного етапу

пробопідготовки безпосередньо залежить результат подальших експериментів. Таким чином, вкрай важливо використовувати автоматичні рішення для етапів дозування рідини.

Контрольні питання

1. В якому випадку застосовують екстракцію ДНК з букального епітелію сорбентним методом.
2. Опишіть методику проведення екстракції ДНК з букального епітелію сорбентним методом.
3. В якому випадку застосовують виділення ДНК з епітеліальних клітин ротової порожнини методом лужної екстракції?
4. Як проводиться екстракція ДНК з лейкоцитів крові сорбентним методом?
5. Для чого використовують спектрофотометрію? На чому заснований даний метод?
6. Для чого використовують флуориметрію?

Глава 3. Методи роботи з ДНК

3.1. Фрагментування ДНК

Молекула ДНК однієї хромосоми середнього розміру містить 150×10^6 п.н. і має довжину близько 4 см. Молекули такого розміру чутливі до механічних впливів, які виникають у розчині в процесі екстракції, і часто фрагментуються. У ході екстракції отримують молекули ДНК значно менше вихідних, але все одно дуже великі – тисячі або десятки тисяч п.н. Такі молекули незручні для дослідження, і їх доводиться додатково фрагментувати.

Для **фрагментування ДНК** (англ. **DNA fragmentation**) використовують один з найважливіших інструментів генної інженерії – **рестрикцію** (англ. **DNA restriction**).

Рестрикція здійснюється за допомогою ендонуклеаз, ферментів, що розщеплюють ДНК за специфічними послідовностями нуклеотидів всередині ланцюга (на противагу екзонуклеазам, які розщеплюють ДНК з кінців молекули). Ці ферменти отримали назву **рестрикційних ендонуклеаз**, або **рестріктаз** (лат. **restrictio** – **обмеження**), оскільки їх присутність в бактеріальній клітині обмежує ріст певних бактеріальних вірусів, званих бактеріофагами. Рестріктази розщеплюють ДНК на відносно невеликі фрагменти в ділянках послідовності суворо визначеної структури. Цим їх вплив відрізняється від більшості інших ферментативних, хімічних або фізичних впливів, що призводять до випадкових розривів ланцюгів ДНК. Рестріктази (вже відкрито понад 500 типів ферментів цього класу) є частиною захисної системи бактерій, що охороняє власний геном від чужорідної, головним чином вірусної, ДНК. Рестріктази присутні тільки в таких клітинах, які містять і специфічні метилази. Роль цих ферментів – метилювання власної (хазяйської) ДНК клітини і захист її таким чином від дії рестріктаз. Сайт-специфічні метилаза і рестріктази завжди присутні в бактеріях одночасно. Рестріктази прийнято іменувати за назвою бактерій, з яких їх виділяють. Так, назва *EcoRI* свідчить про те, що цей фермент виділений з *Escherichia coli* – *E. Coli* (кишкової палочки). Перша з трьох літер аббревіатури відповідає першій букві

назви роду (*E*). Наступні дві літери є початковими буквами видової назви (*co*). Літера *R* говорить про те, з якого штаму виділений фермент. Римська цифра відповідає порядку номеру рестриктази в ряді аналогічних ферментів, виділених з цього мікроорганізму (наприклад, *EcoRI*, *EcoRII*).

Кожен фермент впізнає свою певну специфічну послідовність з 4-6, рідше 8-12 нуклеотидів в дволанцюговій молекулі ДНК (сайти рестрикції) і «розрізає» її в місцях локалізації цих послідовностей.

Розрізання ДНК по цим сайтам призводить до утворення «тупих» (наприклад, при дії рестриктази *HpaI*), або «липких», тобто перекриваючихся (наприклад, *EcoRI*), кінців. Для конструювання гібридних молекул особливо зручні «липкі» кінці. Кількість утворюючихся рестрикційних фрагментів ДНК при використанні однієї рестриктази залежить від кількості сайтів рестрикції, а розмір фрагментів визначається положенням цих сайтів по всій довжині вихідної молекули ДНК. За допомогою набору рестриктаз можна розрізати молекулу ДНК на фрагменти бажаної довжини. Наприклад, для вивчення первинної структури (метод секвенування) зручні фрагменти розміром близько 300 п.н. Отже, ДНК однієї хромосоми в 150×10^6 п.н. потрібно розрізати на 500000 фрагментів і кожен з фрагментів вивчати окремо.

3.2. Молекулярне клонування ДНК

Для роботи з нуклеотидними послідовностями в генах та інших ділянках ДНК необхідно мати достатню кількість матеріала для дослідження.

Це непросте завдання, особливо якщо джерелом ДНК служать тканини людини. Тому досліджувані фрагменти ДНК зазвичай попередньо ампліфікують (збільшують кількісно в мільйони разів), для того щоб отримувати їх у будь-який час і в необмежаній кількості. Виключно цінним інструментом у вирішенні цієї проблеми виявилось використання рекомбінантних ДНК, тобто ДНК, побудованих з ділянок різного походження.

Для отримання значної кількості біоматеріала, що цікавить дослідника, проводять молекулярне клонування ДНК.

Молекулярне клонування ДНК (англ. molecular cloning або DNA cloning) – це процедура ізоляції певної послідовності ДНК і отримання багатьох копій цієї послідовності *in vivo*.

Поняття «клон» визначається як велика популяція ідентичних молекул, бактерій або клітин-нащадків одного предка. Клонування дозволяє одержувати велику кількість ідентичних молекул ДНК. Метод клонування заснований на тому факті, що рекомбінантні (гібридні або химерні) молекули ДНК можуть бути створені у складі векторів для клонування, до яких відносяться бактеріальні плазмиди, фаги або косміди, здатні до реплікації в хазяйських клітинах під контролем своїх власних регуляторних елементів. Необхідний фрагмент ДНК вбудовується до **векторної молекули ДНК – вектора**. Вектор забезпечує проникнення рекомбінантної ДНК до бактеріальних клітин. Таким шляхом домагаються ампліфікації рекомбінантної ДНК.

У класичних методиках рестрикції і лігування, клонування фрагмента ДНК включає чотири стадії:

- рестрикція ДНК;
- лігування ДНК з вектором;
- трансфекція;
- подальший скринінг (відбір).

Виділення вставки. Спочатку необхідно виділити ділянку ДНК для клонування. Часто препарат ДНК для клонування отримують за допомогою рестрикції, ПЛР, агарозного гель-електрофорезу, обробки ДНК ультразвуком. Виділення вставки може бути зроблено технологією клонування шотган, кДНК, штучним хімічним синтезом.

Трансформація. Після лігування плазмідною трансформують бактерії для нарощування. Далі бактерії вирощують на селективному середовищі для відбору колоній, що містять вставку. Індивідуальні колонії відбирають і вивчають на наявність вставки.

Трансфекція. Після лігування реакційну суміш з вбудованим в необхідній орієнтації вектором поміщають в клітини. В залежності від типу клітин використовують хімічну сенситизацію клітин або електропорацію. Для

хімічної сенситизації не потрібне спеціальне обладнання. Електропорацію використовують у разі необхідності високої ефективності трансфекції.

Відбір. Спочатку отримують культури трансфеткованих клітин. Так як описані вище процедури часто мають низьку ефективність, потрібні способи виявлення клітин, що містять необхідну вставку в правильній орієнтації та відділення таких клітин від тих, що не містять вставки. Сучасні вектори для клонування містять селективні маркери (як правило, гени стійкості до антибіотиків) які дають можливість рости на селективному середовищі (з антибіотиком) тільки клітинам з правильною вставкою. Вектори для клонування також часто містять маркери, що обумовлюють забарвлення колоній, наприклад при вирощуванні на середовищі, що містить 5-бромо-4-хлоро-3-індоіл-бета-D-галактопіранозид або X-gal (англ. bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside – BCIG).

Для точного підтвердження успішного клонування, потрібна перевірка за допомогою ПЛР, ПДРФ або секвенування ДНК.

В якості векторів для проведення молекулярного клонування ДНК, використовують бактеріальні плазміди, фаги та косміди.

Бактеріальні плазміди – це невеликі кільцеві молекули дволанцюгової ДНК, у функції яких входить, наприклад, забезпечення стійкості до антибіотиків для несучих їх хазяйських клітин. Плазміди володіють декількома властивостями, які роблять їх надзвичайно зручними для використання в якості векторів для клонування. Поперше у бактеріальній клітині вони можуть існувати в одній або безлічі копій і подруге, плазміди реплікуються незалежно від хазяйської ДНК. В наш час для багатьох плазмід вже відома повна нуклеотидна послідовність. Це робить можливим точну локалізацію сайтів рестрикції для клонування фрагментів ДНК. Плазміди значно менше хазяйської хромосомної ДНК і тому можуть бути легко відділені від неї. Клонований фрагмент легко виділяється з рекомбінантної плазміди за допомогою її розщеплення тією ж рестриктазою, по сайту якої проводили ковалентне з'єднання «липких» кінців ДНК – лігування.

Фаги зазвичай містять лінійну ДНК, в яку можуть бути вбудовані фрагменти чужорідної ДНК з якого-небудь з доступних сайтів рестрикції. Химерну ДНК виділяють зазвичай після завершення рекомбінантним фагом ліричного циклу і виходу зрілих інфекційних фагових частинок. Основною перевагою фагових векторів перед плазмідними є те, що на відміну від плазмід, здатних нести фрагменти ДНК до 6-10 тис. п.н., у фагову частку вдається вбудовувати фрагменти розміром до 10-20 тис. п.н. Величина клонованого фрагменту визначається загальною кількістю ДНК, що здатне упакуватися в головку фага.

Фрагменти ще більшого розміру можуть бути клоновані в космідах-векторах, поєднуючих переваги плазмід і фагів.

Косміди – це плазміди, які містять специфічні ділянки, що називаються *cos*-сайтами, які необхідні для пакування ДНК фага X в капсид. Ці вектори можуть підтримуватися в бактеріальній клітині в плазмідній формі, але так як більша частина ДНК фага з косміди вилучена, то відповідно збільшується і можлива довжина клонованого фрагмента.

Звичайними для космід є вставки розміром 30-50 тис. п.н.

Підібрав відповідні умови клонування, можна досягнути того, що в наборі клонованих фрагментів будуть присутні практично всі гени даного геному. Такі колекції клонів, отримані для конкретного геному, називають геномними бібліотеками. Геномна бібліотека готується з тотальної ДНК клітинної лінії або тканини.

3.3. Ампліфікація ДНК

Ампліфікація (англ. *DNA amplification*, лат. *amplificatio* – збільшення) – це збільшення кількості копій ДНК.

У клітині ампліфікація відбувається в результаті реплікації ДНК, в штучних умовах збільшення числа копій ДНК домагаються за допомогою полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР.

3.3.1. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) (англ. **polymerase chain reaction – PCR**) була відкрита Кері Мулісом у 1983 р., за що у 1993 р. він отримав Нобелівську премію по хімії.

Метод ПЛР дозволяє піддавати специфічній ампліфікації в умовах *in vitro* ділянки ДНК довжиною від кількох десятків до кількох сотень п.н., використовуючи як матрицю будь-які зразки ДНК. Необхідна умова для проведення ПЛР – знання нуклеотидної послідовності ампліфікуємої ділянки. Ділянку досліджуємої ДНК гібридизують з двома штучно синтезованими праймерами – олігодезоксирибонуклеотидними послідовностями завдовжки від 15 до 30 п.н., які комплементарні 3'-кінцям ампліфікуємої ділянки на кодуючій та некодуючій нитях ДНК. Відстань між праймерами визначає довжину синтезуємих молекул. В якості матриці для синтезу продуктів ПЛР використовують будь-який тип ДНК: геномну ДНК людини, різних видів про- і еукаріотів, ДНК, виділену з культур клітин, «бібліотек» генів і інших джерел. Метод не вимагає великих кількостей досліджуваної ДНК, в принципі, достатньо навіть однієї молекули, що міститься в одному волосі на голові, одній краплі крові або сперми. Успіх у розробці методу в значній мірі обумовлений використанням в якості ферменту термофільної ДНК-полімерази – Таq-полімерази, виділеної з екстремально термофільних бактерій *Thermus aquaticus*, що живуть у гарячих джерелах, і тому стійкі до дії високих температур (витримують 94-96°C). Реакційна суміш для отримання ДНК містить досліджувану ДНК, субстрати реакції – 4 дНТФ, 2 праймери, термостабільну Таq-полімеразу і буфер що містить іони Mg²⁺.

Звичайно під час ПЛР проводять 25-30 циклів полімеризації, кожний з яких включає 3 етапи :

➤ **1 етап – денатурація або плавління.**

На цій стадії реакційну суміш нагрівають до температури 94-96°C (або до 98°C, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) на 0,5-2 хв. Водневі зв'язки між двома ланцюгами ДНК руйнуються. Досліджуєма дволанцюгова ДНК денатурує і переходить до однострессової

форми. Іноді перед першим циклом (до додавання полімерази) проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2-5 хв для повної денатурації матриці і праймерів. Такий прийом називається гарячим стартом і дозволяє знизити кількість неспецифічних продуктів реакції;

➤ **2 етап – гібридизація або відпал ДНК з праймерами.**

Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли комплементарно зв'язатися з одноланцюговою матрицею ДНК. В результаті утворюється дволанцюгова ділянка на кожній з ниток ДНК. Температура відпалу залежить від праймерів і зазвичай вибирається на 4-5°C нижче за їх температуру плавлення. Неправильний вибір температури відпалу призводить або до поганого зв'язування праймерів з матрицею (при завишеній температурі), або до зв'язування в невірному місці і появи неспецифічних продуктів (при заниженій температурі). Час стадії відпалу складає 30 сек. Одночасно, за цей час полімераза вже встигає синтезувати кілька сотень нуклеотидів. Тому рекомендується підбирати праймери з температурою плавлення вище 60°C і проводити відпал і елонгацію одночасно, при 60-72°C;

➤ **3 етап – елонгація.**

ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер в якості затравки. Полімераза починає синтез іншого ланцюга від 3'-кінця праймера, який зв'язався з матрицею, і рухається уздовж матриці в напрямку від 3' до 5'-кінця. Температура елонгації залежить від полімерази. Таq-полімераза найбільш активна при 72°C. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини ампліфікуемого фрагмента. Зазвичай час елонгації приймають рівним одній хвилині на кожен тисячу п.п. Після закінчення всіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати всі одноланцюгові фрагменти. Ця стадія триває 7-10 хв.

Потім знову настає етап плавлення, коли за рахунок підвищення температури синтез ДНК припиняється, і двохниткова ділянка між матричними і знову синтезованими молекулами ДНК денатурує. У другому і наступних циклах праймери гібридизуються з вихідною матричною ДНК і знову синтезованими молекулами ДНК, кількість яких наростає в геометричній

прогресії. В останньому випадку синтез ДНК закінчується не через зміни температурного режиму, а після досягнення ДНК-полімеразою кордону ампліфікованої ділянки, що визначає суворо визначений розмір продукту з точністю до одного нуклеотиду.

Кожен з етапів циклу має продовжність від десятків секунд до 1-3 хв, в результаті повний цикл триває від одної до декількох хвилин. За 25-30 циклів кількість синтезованих копій ДНК (продукт ампліфікації носить назву **амплікону**) досягає кількох мільйонів.

Описану процедуру ампліфікації ДНК проводять в автоматичному режимі в спеціальному приладі – ампліфікаторі, або термоциклері. Такий прилад дозволяє задавати складні програми, в яких враховуються потрібна кількість циклів, оптимальний час і температурні параметри. Є можливість програмувати гарячий старт.

У ампліфікаторі «ProFlex™ PCR System», можна одночасно ставити три різних експеримента у трьох незалежно контролюємих термоблоках, що надає можливість використовувати даний прилад трьом окремим користувачам. А за допомогою спеціального додатку до смартфона, можливо здійснювати управління цим ампліфікатором будь з якого місця.

Існує багато різновидів ПЛР:

- **Мультиплексна або мультипраймерна ПЛР (англ. multiplex PCR)** заснована на одночасній ампліфікації в одній реакції декількох екзонів досліджуваного гена, з використанням декількох праймерів, що дозволяє проводити економний експрес-скринінг найбільш частих мутацій в гені.
- **Алель-специфічна ампліфікація або ПЛР (англ. allele-specific amplification – ASA, allele-specific PCR)** заснована на використанні двох самостійних пар праймерів до конкретної ділянки гена: один праймер в обох парах є загальним, а другий праймер в кожній парі має різну структуру і є комплементарним або нормальним, або мутантної послідовності ДНК. В результаті такої реакції в розчині одночасно можуть синтезуватися два різновиди ПЛР-продуктів – нормальні і мутантні, причому дизайн використовуваних праймерів дає можливість чітко диференціювати нормальні і

мутантні продукти ампліфікації за їх молекулярним розміром. Метод є дуже наочним і дозволяє верифікувати як гомо-, так і гетерозиготне носійство мутантного алеля.

➤ Метод **сайт-направленої модифікації ампліфікованої ДНК (англ. site-directed modification of amplified DNA)** заснований на використанні в ПЛР так званого mismatch-праймера (не повністю комплементарного матриці), який відрізняється від матричної ДНК-послідовності на один нуклеотид. В результаті включення зазначеного праймера до складу мутантного ПЛР-продукту в ньому утворюється штучно створений сайт рестрикції для однієї з рестрикційних ендонуклеаз, що дозволяє провести пряму ДНК-діагностику певної відомої мутації за допомогою рестрикційного аналізу. Створення такого штучного сайту рестрикції буває необхідно в тому випадку, якщо проведений комп'ютерний пошук не виявив існування відомого та доступного ферменту, «природний» сайт рестрикції якого порушується в результаті появи в молекулі ДНК досліджуваної мутації. Іншим варіантом є метод **ПЛР-опосередкованого сайт-спрямованого мутагенезу (англ. PCR-mediated site-directed mutagenesis)**. Ампліфікуємо ділянку ДНК вибирають таким чином, щоб 3'-кінець одного з праймерів безпосередньо примикав до мутантному сайту. У ньому змінюють один з нуклеотидів з 3'-кінця так, щоб у поєднанні з нуклеотидом мутантного сайту в цьому місці утворювався або зникав сайт рестрикції для якої-небудь з ендонуклеаз. Таким чином, ПЛР-продукти з нормального і мутантного алелей відрізняються по наявності індукованого сайту рестрикції. Наприклад, якщо сайт рестрикції індукований в мутантних алелів, то після обробки ПЛР-продукту відповідної ендонуклеазою на електрофореграмі за відсутності мутації визначатиметься один фрагмент, у гетерозигот – два додаткових фрагмента, відповідних по довжині рестрикованим ділянкам ДНК, а у гомозигот будуть присутні тільки ці два фрагменти. Близьким до методу ПЛР-опосередкованого сайт-спрямованого мутагенезу є метод **ампліфікації рефрактерній мутаційної системи (amplification refractory mutation system – ARMS)**. Суть цього методу полягає в паралельній постановці двох ПЛР, для кожної з яких одним з праймерів

служить алель-специфічна мутантна або нормальна олігонуклеотидна послідовність відповідно. При цьому в якості другого праймера в двох реакціях вибирають одну і ту ж олігонуклеотидну послідовність, так що в обох випадках можуть ампліфікувати ділянки ДНК однакової протяжності. При наявності мутації в досліджуваній ДНК ампліфіковані фрагменти утворюються тільки в тому випадку, якщо в якості алель-специфічного праймера вибирається мутантна послідовність, тоді як при використанні нормального олігонуклеотидного праймера ПЛР блокується. Цей метод знайшов широке застосування для детекції мутацій при фенілкетонурії, бета-таласемії, муковісцедозі, при типуванні генів HLA-системи. Однак складності в підборі праймерів і у виборі оптимального режиму ПЛР обмежують широке застосування цього методу. Його безперечною перевагою є можливість застосування повністю автоматичного сканування.

➤ **Метил-специфічна ПЛР – МС-ПЛР (англ. methyl-specific PCR – MS-PCR).** Суть цієї реакції полягає в наступному. ДНК обробляють бісульфітом натрію, в результаті чого всі неметиловані залишки цитозину конвертуються в урацил, а метиловані не змінюються. Після цього проводять ПЛР з праймерами, відповідними метилованій і неметилованій послідовностям. По тому, з якою парою праймерів відбувається ампліфікація, можна судити про метилювання. З недоліків даного методу, можна відзначити складність в підборі праймерів, неповну конверсію, можливість оцінки тільки одиничних CpG-динуклеотидів. Однак метод відносно дешевий, специфічний і простий, що дозволяє його широко використовувати в діагностиці злоякісних новоутворень та хвороб імпринтингу.

➤ **Вкладена ПЛР (англ. nested PCR)** – застосовується для зменшення числа побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК всередині продукту першої реакції.

➤ **Інвертована або зворотна ПЛР (англ. inverse PCR)** – використовується в тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка усередині потрібної послідовності. Цей метод особливо корисний, коли потрібно визначити сусідні

послідовності після вставки ДНК до геному. Для здійснення інвертованої ПЛР проводять ряд розрізань ДНК-рестриктазами з подальшим з'єднанням фрагментів, тобто лігування. У результаті відомі фрагменти виявляються на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити ПЛР за звичайною схемою.

➤ **Асиметрична ПЛР (англ. asymmetric PCR)** – проводиться тоді, коли потрібно ампліфікувати переважно один з ланцюгів вихідної ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридизаційного аналізу. ПЛР проводиться як звичайно, за винятком того, що один з праймерів береться у великому надлишку. Модифікацією цього методу є метод **linear-after-the-exponential-PCR (LATE-PCR)**, в якому використовуються праймери з різною концентрацією, і праймер з низькою концентрацією підбирається з високою температурою плавління, ніж праймер з високою концентрацією. ПЛР проводять при високій температурі відпалу, тим самим вдається підтримати ефективності реакції протягом усіх циклів.

➤ **Ступінчаста ПЛР (touchdown ПЛР)** – за допомогою цього підходу зменшують вплив неспецифічного зв'язування праймерів. Перші цикли проводять при температурі вище оптимальної температури відпалу, потім кожні декілька циклів температуру відпалу поступово знижують до оптимальної. Це робиться для того, щоб праймер гібридувався з комплементарним ланцюгом всією своєю довжиною, тоді як при оптимальній температурі відпалу, праймер частково гібридується з комплементарним ланцюгом. Часткова гібридизація праймера на геномній ДНК призводить до неспецифічної ампліфікації, якщо ділянок зв'язування для праймера достатньо багато. У більшості випадків, перші десять ПЛР-циклів, можна проводити при температурі відпалу в 72-75 °С, а потім відразу понизити до оптимальної температури, наприклад до 60-65 °С.

➤ **ПЛР в гелі або метод молекулярних колоній (англ. PCR colony)** – акріламідний гель полімеризують зі всіма компонентами ПЛР на поверхні і проводять ПЛР. У точках, що містять аналізовану ДНК, відбувається ампліфікація з утворенням молекулярних колоній.

- ПЛР зі швидкою ампліфікацією кінців кДНК (англ. **rapid amplification of cDNA ends – RACE-PCR**).
- ПЛР довгих фрагментів (англ. **long-range PCR**) – модифікація ПЛР для ампліфікації протяжних ділянок ДНК (10000 і більше підстав). Використовують суміш двох полімераз, одна з яких – Taq-полімераза з високою процесивністю (тобто, здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга – ДНК полімераза з 3'-5'-екзонуклеазною активністю, зазвичай це Pfu-полімераза. Друга полімераза необхідна для того, щоб коригувати помилки, внесені першою, так як Taq-полімераза зупиняє синтез ДНК якщо додано некомплементарний нуклеотид. Цей некомплементарний нуклеотид видаляє Pfu- полімераза. Суміш полімераз береться у пропорції 50:1 або навіть менше 100:1, де Taq-полімераза береться в 25-100 разів більше по відношенню до Pfu- полімерази.
- ПЛР з довільною (випадковою) ампліфікацією поліморфної ДНК – ДАПД (англ. **random amplification polymorphic DNA – RAPD**) – використовується тоді, коли потрібно розрізнити близькі по генетичній послідовності організми, наприклад, різні сорти культурних рослин, породи собак або близькоспоріднені мікроорганізми. У цьому методі зазвичай використовують один праймер невеликого розміру (близько 10 п.н). Цей праймер буде частково комплементарний випадковим ділянкам ДНК досліджуваних організмів. Підбираючи умови (довжину праймера, його склад, температуру та ін.), вдається домогтися задовільної відмінності картини ПЛР для двох організмів.
- Груп-специфічна ПЛР (англ. **group-specific PCR**) – ПЛР для родинних послідовностей всередині одного або між різними видами, використовуюча консервативні праймери до цих послідовностей. Наприклад, підбір універсальних праймерів до рибосомальних 18S і 26S генів для ампліфікації видоспецифічного міжгенного спейсера: послідовність генів 18S і 26S консервативна між видами, тому ПЛР між цими генами буде проходити для всіх досліджуваних видів. Протилежним цьому методу є метод **унікальної ПЛР (англ. unique PCR)**, в якому завдання полягає в підборі праймерів для

ампліфікації тільки конкретної послідовності серед споріднених послідовностей.

➤ **ПЛР з використанням гарячого старту (англ. hot-start PCR)** – модифікація ПЛР з використанням ДНК-полімерази, в якій полімеразна активність блокується при кімнатній температурі антитілами або імітують антитіла невеликими молекулами типу Affibody, тобто в момент постановки реакції до першої денатурації в ПЛР. Зазвичай, перша денатурація проводиться при 95°C протягом 10 хв.

➤ **Віртуальна ПЛР (англ. *in silico* PCR, e-PCR)** – математичний метод комп'ютерного аналізу теоретичної ПЛР з використанням списку послідовностей праймерів (або ДНК-зондів) для передбачення потенційної ампліфікації ДНК досліджуваного геному, хромосоми, кільцевої ДНК або будь-якої іншої ділянки ДНК.

3.3.2. ПЛР в реальному часі

ПЛР в реальному часі (англ. real-time PCR – RT-PCR) або **кількісна ПЛР (англ. quantitative PCR – qPCR)** – ще один різновид ПЛР, який використовується для одночасної ампліфікації та вимірювання кількості даної молекули ДНК.

Метод ПЛР в режимі реального часу включає в себе одночасно детекцію та кількісне визначення (вимірювання безпосередньо кількості копій, або вимір копій щодо внесеної ДНК або додаткових калібрувальних генів) специфічної послідовності ДНК у зразку.

Метод використовує загальні принципи ПЛР, основна відмінність полягає в тому, що вимірюється кількість ампліфікованої ДНК в реальному часі після кожного циклу ампліфікації. Для кількісного визначення використовують два методи – флюоресцентні барвники, інтеркалюючі в дволанцюгові молекули ДНК і модифіковані дезоксинуклеотиди, які флюорисцюють після гібридизації з комплементарними ділянками ДНК.

Компанія «Applied Biosystems by Life Technologies» розробила технологію ПЛР, засновану на застосуванні OpenArray-пластин.

Останньою розробкою у методі кількісної ПЛР є **цифрова ПЛР** (англ. **digital PCR – dPCR, dePCR**), яка є абсолютним методом вимірювання. Цифрова ПЛР проводиться в тому разі, коли є необхідність у вкрай високій чутливості і точності у кількісній оцінці нуклеїнових кислот.

Для проведення кількісної ПЛР застосовують нанофлуїдні чіпи, які проходять етап завантаження.

Після завершення завантаження чіпу, проводять процедуру ампліфікації. Концентрація ДНК-мішені визначається в початковому зразку у вигляді числа копій в мікролітр з чутливістю до 1 молекули. Реакційна суміш з досліджуваним матеріалом розділяється на безліч мікрореакторів, в кожному з яких проходить індивідуальна ПЛР. Розподіл молекул ДНК по краплях (або лунках мікрочіпа) відбувається випадковим чином. Певна лунка може містити або не містити молекулу ДНК.

Після ампліфікації оцінюється кількість позитивних (містять молекулу нуклеїнової кислоти) і негативних (що не містять молекул нуклеїнової кислоти) реакцій. Оцінка кількості молекул нуклеїнових кислот в початковому зразку проводиться на підставі розподілу Пуассона. Число позитивних крапель безпосередньо залежить від вихідної концентрації мішені в зразку.

3.3.3. ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР)

ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) (англ. **reverse transcription PCR – RT-PCR**) являє собою метод ампліфікації специфічного фрагменту РНК, заснований на можливості утворення дволанцюгової ДНК на матриці одноланцюгової РНК, тобто зворотній транскрипції – ЗТ (англ. reverse transcription – RT). RT-PCR не слід плутати з ПЛР в реальному часі, яку також іноді скорочують як RT-PCR.

Одноланцюгову молекулу РНК перетворюють в реакції ЗТ в кДНК і далі ампліфікують вже одноланцюгову молекулу ДНК, використовуючи традиційну ПЛР. Для перетворення послідовності РНК в кДНК використовують зворотну транскриптазу або ревертазу.

ЗТ-ПЛР проводиться наступним чином:

- **Реакція першого ланцюжка:** кДНК утворюється на матриці мРНК з дНТФ ферментом ревертазою. Компоненти реакції змішуються з ДНК-праймером і буфером із ревертазою на 1 годину при 37°C;
- **Реакція другого ланцюжка:** після того як зворотна транскрипція закінчена і утворена кДНК на матриці мРНК, наступні цикли проводяться за стандартною методикою ПЛР.

Після 30 циклів ампліфікації утворюються мільйони копій потрібної послідовності.

3.4. Сепарація ДНК

Для сепарації (англ. **DNA separation**) фрагментів ДНК за розміром (довжиною) і формою (у разі, якщо ДНК утворює вторинні структури, наприклад шпильки) використовують аналітичний метод під назвою **гель-електрофорез ДНК** (англ. **DNA gel electrophoresis**).

Гель-електрофорез проводиться в камері, заповненій буферним розчином. Найчастіше використовуються буфери, що містять трис, оцетову кислоту і ЕДТА – (англ. tris-acetic-EDTA buffer – TAE) або трис, борну кислоту і ЕДТА – (англ. tris-borate-EDTA buffer – TBE). Буфер необхідний для підвищення іонної сили розчину, в якому відбуватиметься поділ молекул ДНК під дією прикладеного електричного поля. Сили електричного поля, що прикладається до зразків, змушують фрагменти ДНК мігрувати через гель. Сахарофосфатний остов молекул ДНК заряджений негативно і тому ланцюги ДНК рухаються від катода, зарядженого негативно, до позитивного аноду. Більш довгі молекули мігрують повільніше, тому що затримуються в гелі, більш короткі молекули рухаються швидше.

Для електрофоретичного аналізу ДНК зазвичай використовують агарозний (для відносно довгих молекул ДНК) і поліакриламідний або ПААГ (для високого дозволу коротких молекул ДНК, наприклад, у випадку секвенування) гелі. В залежності від використовуваного геля, електрофорез при цьому носить назву агарозного і поліакриламідного (англ. sodium

dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – SDS-PAGE) відповідно. Агарозний гель-електрофорез проводять в горизонтальній камері (горизонтальний гель-електрофорез), а поліакриламідний – в вертикальній камері (вертикальний гель-електрофорез).

Метод **електрофорезу в пульсуючому полі** або **пульс-електрофорез** (англ. **pulsed field gel electrophoresis – PFGE**) дозволяє проводити поділ фрагментів ДНК практично будь-якого розміру. Суть його полягає в тому, що молекули ДНК мігрують в гелі під впливом періодично змінюваного у напрямку електричного поля.

До зразків зазвичай додають низькомолекулярний кислий барвник (наприклад, динітрофенол, бромфеноловий синій), щоб візуалізувати хід електрофорезу в процесі. Барвник також необхідний для того, щоб визначити, коли варто зупинити процес. Після поділу (іноді барвник вносять у розплавлену агарозу) фрагменти ДНК різної довжини візуалізують за допомогою флуоресцентних барвників, що специфічно взаємодіють з ДНК, наприклад, агарозні гелі зазвичай фарбують бромистим етидієм, який інтеркалює між а.п. дуплексу і флуоресцює в УФ-променях. Для візуалізації результатів проведення гель-електрофорезу застосовують трансїлюмінатори.

Системи гель-документування дозволяють не тільки переглядати, а й зберігати результати проведення гель-електрофорезу.

Визначення розмірів роблять шляхом порівняння на електрофореграмі комерційно доступних фрагментів ДНК або «лінійки» (англ. DNA ladder) – лінійних фрагментів ДНК відомої довжини.

В останній час, поряд з традиційними методами гель-електрофорезу, також застосовують **капілярний гель-електрофорез** (англ. **capillary gel electrophoresis**) – потужний метод, заснований на мікрофлюїдних технологіях, які дозволили перевести електрофоретичне розділення в гелі у формат мікрочіпа. Це дозволяє автоматизувати процес, скоротити час аналізу, підвищити відтворюваність і чутливість методу. Мала довжина капіляра при оптимальній швидкості проходження зразка зменшує побічні ефекти, пов'язані

з впливом прикладеного електричного поля, що особливо важливо при аналізі комплексів біополімерів.

3.5. Гібридизація ДНК

Основним методом виявлення послідовності підстав у ланцюгу ДНК є ядерна проба, або ДНК-проба. В основі цього методу лежить прагнення одноланцюгової ДНК з'єднуватися з ланцюгами ДНК, що мають послідовності, комплементарні послідовності початкового ланцюга.

Якщо йде пошук послідовності А-Т-Ц-Г-Г, то буде використовуватися проба, яка містить послідовність Т-А-Г-Ц-Ц. Подвійний ланцюг ДНК, що утворюється в результаті, називають гібридним, тому що він представляє собою поєднання «натуральної» ДНК і «штучної» ДНК-проби. Стадія **гібридизації ДНК** (англ. **DNA hybridization**) являє собою просте змішування одноланцюгових проб з цільовою ДНК. Спочатку необхідно денатурувати ДНК. Денатурація ДНК відбувається при її нагріванні. При цьому подвійний ланцюг роз'єднується на два ланцюги, що дозволяє одноланцюговим пробам знайти комплементарні ділянки і з'єднатися з ними.

Застосування ядерної проби часто поєднують з методом аналізу фрагментів ДНК, що носить назву Саузерн-блотінгу.

3.5.1. Саузерн-блотінг

Класичним методом ідентифікації певної специфічної послідовності ДНК (ДНК/ДНК), є метод **блот-гібридизації по Саузерну**, або **Саузерн-блотінг (Саузерн-блот)** (англ. **southern blotting (blot): southern – південний і blotter – промокашка**).

Даний метод був запропонований у 1975 р. британським біохіміком Едвіном Саузерном і названий в його честь.

Суть методу полягає в тому, що суцільна «драбина» фрагментів ДНК, що утворилася в результаті їх поділу за молекулярною масою при електрофорезі в агарозному гелі, піддається денатурації і переноситься з гелю на щільний носій (нітроцелюлозний фільтр або нейлонову мембрану). Перенесення, або блотінг,

здійснюється за рахунок капілярних сил, електричного поля або вакуума. Фіксовану на фільтрі ДНК гібридизують з ДНК-або РНК-зондом (англ. DNA probe, RNA probe), що містить позначку. Методом радіоавтографії визначають положення фрагмента геномної ДНК, що шукають на авторадіограмі.

Саузерн-блотінг – високочутливий метод ідентифікації специфічних послідовностей. До справжнього часу розроблено багато модифікацій цього методу. Так, ДНК-зонд не завжди мітять радіоактивними ізотопами, не рідко використовують сполуки, що ковалентно зв'язуються з ДНК. Їх можна виявити за утворенням забарвленого продукту або флюоресценції. Довжина олігонуклеотидів в ДНК-зондах також може сильно варіювати, будучи іноді дуже короткою – в 15-20 п.н. Існують методи дот- (пляма) або слот- (смужка) гібридизації, коли на твердий носій наносять препарати ДНК або РНК без попередньої рестрикції чи гель-електрофорезу і гібридизують їх з міченими ДНК-зондами.

3.5.2. Варіанти блот-гібридизації

При дослідженні РНК (ДНК/іРНК) застосовують **нозерн-блотінг**, або **нозерн-блот** (англ. **northern blotting (blot)**). Даний метод був запропонований у 1977 р. американськими біохіміками Джеймсом Олвайном, Девідом Кемпом и Джорджем Старком і названий по його аналогії з саузерн-блотінгом. Основною відмінністю методу від попереднього є його використання для дослідження РНК замість ДНК, що зумовлює відмінності в методиці – замість нітроцелюлози використовується фільтр з діазобензилоксиметил-целюлози. В якості зондів використовують комплементарні молекули ДНК і т.д.

Для визначення специфічних білків в зразку (антитіло/білок) використовується **вестерн-блотінг**, або **вестерн-блот** (англ. **western blotting (blot)**). Цей метод ще називають **білковим імуноблотінгом (білковим імуноблотом)**. Даний метод був запропонований у 1977 р. Джорджем Старком. На першому етапі проводиться електрофорез білків в ПААГ для поділу денатурованих поліпептидів по довжині (як правило, в присутності лаурилсульфату натрію (англ. sodium lauryl sulfate – SLS) або додецилсульфату

натрію (англ. sodium dodecyl sulfate – SDS)) або по тривимірній структурі білка (в нативному стані). Далі білки переносяться на нітроцелюлозну мембрану або полівініліденфторид – ПВДФ (англ. polyvinylidene fluoride – PVDF), потім детектуються з використанням антитіл, специфічних до заданого білку.

Для вивчення взаємодії ДНК-білок (ДНК/білок) використовується **саузерн-вестерн блотінг**, або **саузерн-вестерн-блот** (англ. **southwestern blotting (blot)**). Даний метод був запропонований у 1980 р. британським біохіміком Б. Боуеном. Цей метод, як можна бачити з назви, поєднує у собі саузерн (для ДНК) і вестерн (для білка) блотінги.

Для вивчення пострансляційних модифікацій білка застосовується **істерн-блотінг**, або **істерн-блот** (англ. **eastern blotting (blot)**). Даний метод був запропонований у 1979р. швейцарським біохіміком Гарі Тоубіном. Цей метод є розширеною версією вестерн-блотінгу. Білки аналізуються на пострансляційні модифікації з використанням датчиків, які можуть виявити ліпіди, вуглеводи, процес фосфорилування або будь-які інші модифікації білків.

3.6. Методи на основі ДНК-маркерів

Найбільш широко використовувані ДНК-маркери умовно можна поділити на наступні типи:

- маркери ділянок структурних генів, що кодують амінокислотні послідовності білків (електрофоретичні варіанти білків);
- маркери некодуючих ділянок структурних генів;
- маркери різних послідовностей ДНК, ставлення яких до структурних генів, як правило, невідомо.

В справжній час існує цілий набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, серед яких можна виділити наступні:

- Маркери на основі ДНК-зондів;
- ПЛР-маркери.

3.6.1. Маркери на основі ДНК-зондів

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів – ПДРФ (англ. restriction fragment length polymorphism – RFLP). Зміни в послідовностях ДНК можуть обумовлювати зміни у розташуванні сайтів рестрикції і тому позначатися на довжині рестрикційних фрагментів. Стійку успадковану зміну у розподілі довжини рестрикційних фрагментів (що спостерігається для більш ніж 1% чисельності популяції) називають **поліморфізмом довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ).** Цей феномен може бути результатом або точкових замін (серповідноклітинна анемія), або делецій і інсерцій (таласемії). Останнім часом ПДРФ стали з успіхом використовувати в діагностичних цілях. Рестрикційний поліморфізм виявлений як в послідовностях відомих генів, так і в ділянках ДНК з невідомою функцією. ПДРФ може порушувати біологічну функцію, а може і не мати ніяких біологічних наслідків. В будь-якому випадку відповідні змінені локуси успадковуються відповідно до законів Менделя.

ПДРФ-аналіз включає наступні етапи:

- екстракція геномної ДНК;
- її рестрикція специфічною ендонуклеазою;
- сепарація фрагментів ДНК, що утворюються, методом гель-електрофорезу;
- ідентифікація цих фрагментів шляхом Саузерн-блотінгу.

На електрофореграмах за відсутності рестрикції в досліджуваній ДНК виявляють один великий фрагмент, відповідний по довжині послідовності ДНК між двома сусідніми ділянками рестрикції для тієї ж ендонуклеази. При наявності рестрикції в поліморфній ділянці на електрофореграмі буде присутній менший за розмірами фрагмент, рівний відстані між поліморфною ділянкою рестрикції і одною з найближчих постійних ділянок рестрикції. ПДРФ-аналіз може бути значно спрощено в тому випадку, якщо можлива специфічна ампліфікація ділянки ДНК, яка містить поліморфний сайт рестрикції. Тестування стану цього локусу можливо шляхом проведення ПЛР і рестрикції ампліфікованого фрагмента. При відсутності сайту впізнання у досліджуваній області ДНК розміри ампліфікованого фрагменту не зміняться

після його обробки рестриктазою. Якщо ділянка впізнавання не змінена, обробка ферментом призведе до утворення 2 маленьких фрагментів з тією ж сумарною довжиною, що й вихідний фрагмент. 20% виявлених випадків ПДРФ відноситься до Х-хромосоми, і саме для неї складено практично повна карта. Використовуючи феномен ПДРФ, можна локалізувати ген будь-якої Х-зчепленої хвороби (наприклад, м'язової дистрофії Дюшена). За допомогою ПДРФ вдалося встановити, що генетичний дефект при хореї Гентінгтона зачіпає кінець короткого плеча хромосоми 4, а ген, що викликає полікістоз нирок, зчеплений з локусом α -глобіну на хромосомі 16.

3.6.2. ПЛР-маркери

Метод ПЛР передбачає використання специфічних праймерів та отримання дискретних ДНК-продуктів ампліфікації окремих ділянок геномної ДНК. На цьому принципі побудовано велика кількість споріднених технологій.

Прості повтори або мікросателіти (англ. **simple sequence repeats – SSR**). ПЛР з фланкуючими праймерами до короткого міні або мікросателітного повтору, дозволяє виявляти маркери з кодомінантним спадкуванням і, відповідно, є зручним для виявлення гетерозигот за даним локусом. Одна пара праймерів для флангів в ПЛР дозволяє розглядати поліморфізм тільки одного локусу. Для багатьох мікросателітних локусів не вдається виявити поліморфізм. Як правило, фланкуючі послідовності для даного мікросателітного локусу виявляються видоспецифічними.

Довільно (випадково) ампліфікована поліморфна ДНК – ДАПД (англ. **random amplified polymorphic DNA – RAPD**), полімеразна ланцюгова реакція з використанням одиничного короткого, зазвичай, 10-членного праймеру, з довільною нуклеотидною послідовністю. Послідовність праймерів не абсолютно будь-яка, а обмежена в межах 40-70% вмісту GC і 50-100% лінгвістичної складності нуклеотидної послідовності. У RAPD можна використовувати як одиночний праймер, так і декілька RAPD-праймерів. Продукт RAPD утворюється в результаті ампліфікації фрагменту геномної ДНК, фланкованої інвертованою послідовністю використовуваного праймера.

Метод є універсальним для досліджень різних видів, при використанні одних і тих же праймерів.

Як правило, праймер що виявляє високий поліморфізм для одного виду, буде також ефективним і для інших видів.

Міжмікросателітні повтори (англ. inter simple sequence repeats – ISSR) представляють собою спеціалізований варіант методу RAPD, в якому праймер складається з мікросателітної послідовності. У цьому методі, також як і в RAPD, використовується один або кілька праймерів, довжиною в 15-24 нуклеотидів. Але в даному випадку, праймери складаються з тандемних коротких 2-4 нуклеотидних повторів, наприклад: 5'-CA CA CA CA CA CA CA CA CA G і одним або двома селективними нуклеотидами на 3'-кінці праймеру. Продукти ISSR-ампліфікації містять на флангах інвертовану мікросателітну послідовність праймера. Так як в даному методі послідовність праймерів є специфічною і підбирається більш строго, ніж в RAPD, тому, температуру відпалу в ПЛР можна проводити вище (55-60 °C), ніж для RAPD-методу, а тому фінгерпринт, зазвичай, краще відтворюється.

Поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів – ПДАФ (англ. amplified fragment length polymorphism – AFLP). Технологія являє собою комбінацію ПЛР- і ПДРФ-методів. AFLP – досить складний метод і складається з декількох етапів: геномна ДНК одночасно рестрикується двома рестриктазами (*EcoRI* і *MseI*), які впізнають 4 і 6 підстав, відповідно, отримуючи фрагменти з виступаючими 3'-кінцями. Потім рестрикована геномна ДНК лігується з адаптором, що містить «липкі» кінці для рестрикційних сайтів (*EcoRI* і *MseI*). Після цього проводиться дві послідовних ПЛР. У першій ПЛР (преампліфікація) використовуються праймери повністю комплементарні адапторам *EcoRI* і *MseI*. Після першої ПЛР утворюється велика кількість продуктів ампліфікації між *EcoRI* і *MseI* адапторами, які важко диференціювати за допомогою електрофорезу. Тому, у другій ПЛР, праймери з *EcoRI* і *MseI* адапторами містять на 3'-кінці додаткові і не комплементарні адаптори від 1 до 3 підстави, для селективної ампліфікації. Поділ фрагментів ДНК виконується в ПААГ, з радіоактивною або флюоресцентною міткою, відповідно.

Поліморфізм специфічно ампліфікованих фрагментів – ПСАФ (англ. sequence specific amplification polymorphism – SSAP) є модифікацією методу AFLP, для виявлення поліморфізму як по сайту рестрикції, так і по вставці в геномну ДНК транспозону або ретротранспозону. Геномна ДНК досліджуваних зразків розщеплюється рестриктазами *PstI* і *MseI*, в результаті чого отримуються фрагменти з виступаючими 3'-кінцями. Потім рестрикована ДНК лігується з *PstI* і *MseI* адапторами. Перша ПЛР (преампліфікація) проводиться з праймерами від *PstI* і *MseI* адапторів, тобто ампліфікують всі можливі комбінації поєднання цих адаптерів в рестрикованій геномній ДНК. Після першої ПЛР утворюється велика кількість продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, локалізованих між праймерами і адапторами. ПЛР продукти розбавляються і використовуються для другої, селективної ПЛР. Друга ПЛР проводиться з міченим праймером до LTR і будь-яким праймером адапторів, або з *PstI* або *MseI*. У другій ПЛР можна використовувати праймери до адапторів з додатковими нуклеотидами на 3'-кінці, наприклад, один, два або три нуклеотида, що не комплементарні адапторам. Електрофорез після другої ПЛР проводять в ПААГ або в секвенаторі, якщо використовувалася флюоресцентна мітка. Продукти ампліфікації після другої ПЛР утворюються в результаті ампліфікації фрагмента ДНК між послідовністю LTR ретротранспозону і адаптором. Отримання продуктів ампліфікації між тільки LTR послідовностями принципово можливе, але, як правило, відстань між двома ретротранспозонами довше зазвичай одержуваних розмірів ПЛР продуктів (2500-3000 п.п). А продукти ампліфікації між адапторами не будуть виявлятися, оскільки використовується мітка тільки для LTR праймера.

Inter retrotransposone amplified polymorphism (IRAP). ПЛР між праймерами, комплементарними послідовностям двох поруч розташованих LTR ретротранспозону. Метод має кілька варіантів. У першому варіанті IRAP використовується одиничний праймер з LTR. Продукти ампліфікації утворюються між двома інвертованими LTR з однаковою послідовністю, тобто у одного ланцюга 5'-кінець одного LTR орієнтований до 3'-кінця іншого LTR.

Якщо центральна частина ретротранспозону довше звичайного розміру ПЛР продуктів (близько 3000 п.п), то ПЛР буде проходити тільки між двома LTR з різних ретротранспозицій. У цьому випадку сусідні LTR повинні розташовуватися в інвертованому положенні. В іншому варіанті IRAP використовуються два різних праймера до інвертованих LTR: один праймер з 5'-кінця, а інший з 3'-кінця LTR, орієнтовані в різні боки від ретротранспозону. В даному випадку сусідні LTR розташовуються як прямі довгі повтори. І, нарешті, в третьому варіанті IRAP використовуються праймери до LTR з різних ретротранспозонів в різній орієнтації. Можна комбінувати праймери з LTR з іншими праймерами з повторюваної ДНК.

Retrotransposone microsatellite amplified polymorphism (REMAP) – це метод ПЛР між праймером до фрагмента LTR ретротранспозону і праймером з поруч розташованого, простого мікросателітного повтору (ISSR праймер). В даному випадку позиція ампліфікуємого фрагмента ретротранспозону «заякорюють» шляхом використання праймера до мікросателітного локусу. Наприклад, у рослин зручним виявляється використання праймера до LTR і праймера до мікросателітів (5'-CA CA CA CA CA CA CA CA CA G) з одиничним селективним нуклеотидом на 3'-кінці праймера. У REMAP застосовують варіанти LTR праймерів як для 5'-кінця, так і для 3'-кінця LTR, як і в IRAP.

Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) – метод, заснований на використанні праймерів до послідовностей ретротранспозонів і виявляє кодомінантність алельних варіантів. Його принцип заснований на мультилокусній ПЛР, в якій використовуються пара праймерів, фланкуючих ділянку ДНК до ретротранспозиції і праймер до LTR ретротранспозону, який вбудований в дану ділянку між першими двома праймерами. В результаті ПЛР буде ампліфікуватися один з варіантів фрагментів, фланкуємих парою праймерів, оскільки послідовність між LTR занадто довга для ПЛР між сайтами геномної ДНК з ретротранспозонів всередині. Цей метод виявляє поліморфізм тільки для даного поліморфного локусу. До його переваг відносять

кододомінантність поліморфних варіантів та можливість використання для дот-блот аналізу великої кількості сортів.

Inter PBS amplification (iPBS). Даний метод, заснований на використанні праймерів до PBS (англ. primer binding site (ділянка зв'язування тРНК)) послідовностям ретротранспозонів. Метод ефективний для виявлення поліморфізму між зразками, а також для клонування нових ретротранспозонів у еукаріот.

3.7. Секвенування ДНК

Секвенування (англ. sequencing, від sequence – послідовність) – це визначення первинної амінокислотної або нуклеотидної послідовності білків і нуклеїнових кислот. Переоцінити значення цієї революційної технології, не представляється можливим. Секвенування є основою предиктивної і прецизійної медицини.

Першим методом секвенування був **метод Максама-Гілберта**. Пізніше з'явився **метод Сенгера**. Метод Сенгера більш швидкий, надійний і простий у виконанні. Даний метод дозволив неймовірно знизити вартість секвенування.

Повногеномне секвенування здійснюється за допомогою **методів секвенування нового покоління – СНП або NGS-секвенування (англ. next-generation sequencing – NGS)**. Технологія методів СНП дозволяє «прочитати» одноразово відразу кілька ділянок геному, що є головною відмінністю від більш ранніх методів секвенування. СНП здійснюється за допомогою повторюваних циклів подовження ланцюга, індукованого полімеразою, або багаторазового лігування олігонуклеотидів. У ході СНП можуть генеруватися до сотень мегабаз і гігабаз нуклеотидних послідовностей за один робочий цикл. Всі основні принципи роботи технологій СНП базуються на секвенуванні ДНК-чипів, використовуючи інтерактивні циклічні ферментативні реакції з подальшим збором отриманої інформації у вигляді ілюстрацій. Отримані дані використовуються для відновлення нуклеотидної послідовності або, як для технології «SOLiD», динуклеотидних «кольорів». Незважаючи на різні методи отримання копій (ампліфікація) ділянок геному і на технічну різницю

диференціації різних нуклеотидів у прочитаних послідовностях, загальна схема роботи для всіх секвенаторів одна. Перший етап секвенування – створення бібліотеки випадкових послідовностей ДНК, які можна буде зшити з загальнодоступними адаптерними послідовностями. Другий етап – створення ампліконів за допомогою ПЛР, які будуть використані як зразки. Третій останній етап – визначення первинної структури всіх фрагментів.

3.7.1. Метод Максама-Гілберта

Метод Максама-Гілберта носить назву хімічного і заснований на хімічній деградації ДНК.

Він був запропонований у 1976 р. Аланом Максамом та Уолтером Гілбертом і названий в їхню честь.

Суть методу зводиться до наступного: один з кінців фрагменту ДНК мітять за допомогою ізотопу фосфору ^{32}P . Останнім часом замість радіоактивної вводять флюоресцентну позначку. Її можна «чіпляти» і до нуклеотидів, причому для кожного типу нуклеотидів підбирати різне забарвлення. Препарат міченої ДНК ділять на чотири порції і кожен з них обробляють реагентом, специфічно руйнуючим одну або дві з чотирьох підстав, причому умови реакції підбирають таким чином, щоб на кожен молекулу ДНК доводилося лише кілька ушкоджень. Руйнування йде в 2 етапи. На першому етапі відбувається модифікація а.п. і подальше її відщеплення. На другому етапі проводять гідроліз ДНК в місцях відщеплення підстав. Пуринові основи модифікуються диметилсульфатом. Аденинові залишки етилюють по третьому атому азоту, гуанінові – по положенню N7. Якщо таку модифікацію обробити 0,1 М HCl при 0°C , то вищеплюється метиладенін. При подальшій інкубації в лужному середовищі (0,1 М NaOH) при температурі $+90^{\circ}\text{C}$ відбувається руйнування цукрово-фосфатного зв'язку в місцях відщеплення підстав. Обробка пошкоджених молекул піперидином призводить до гідролізу ДНК по залишках метилгуаніну. Піримідинові підстави модифікуються гідразинном. У безсільовому середовищі модифікується і цитозин, і тимін, у присутності 2 М NaCl модифікується тільки цитозин. При подальшій обробці піперидином

відбувається розщеплення ДНК по точках модифікації. Можна використовувати і інші реакції хімічної модифікації підстав і розщеплення по них молекул ДНК. У результаті виходить набір мічених фрагментів, довжини яких визначаються відстанню від зруйнованої підстави до кінця молекули. Фрагменти, що утворилися у всіх чотирьох реакціях, піддають електрофорезу в чотирьох сусідніх доріжках; потім проводять радіоавтографію, і ті фрагменти, які містять радіоактивну мітку, залишають «відбитки» на рентгенівській плівці. За положенням відбитків можна визначити, на якій відстані від міченого кінця знаходилася зруйнована підстава, а знаючи цю підставу – її положення. Так набір смуг на рентгенівській плівці визначає нуклеотидну послідовність ДНК. Аналогічно спостерігають флюоресцентне фарбування. Якщо для кожного з чотирьох нуклеотидів був підібраний свій колір флюоресцентної мітки, то при електрофорезі їх наносять на 1 доріжку. Тоді розташування нуклеотидів зазначено штрихами різного кольору, а процедуру зчитування легко автоматизувати.

3.7.2. Метод Сенгера

Метод Сенгера був розроблений Фредеріком Сенгером у 1977 р. і носить його ім'я.

Даний метод заснований не на хімічному, а на ферментативному підході, тому носить назву ферментативного, або дезоксинуклеотидного. Також його називають методом полімеразного копіювання.

Сенгер використовував ДНК-полімеразу I. У клітині цей фермент бере участь у процесі реплікації, заповнюючи прогалини між знову синтезованими фрагментами ДНК (фрагментами Оказакі). Для роботи ферменту в пробірці потрібні попередники ДНК – дНТФ, а також одноланцюгова матриця, на якій має бути невелика дволанцюгова ділянка – запал, з якого починається синтез. Були також синтезовані модифіковані дідезоксирибонуклеотиди, в яких дезоксирибоза 3'-ОН відсутня, для кожної з чотирьох підстав ДНК. ДНК-полімераза включає ці попередники в ДНК. Однак, включившись в ДНК, модифікована підстава не може утворити фосфодієфірний зв'язок з наступним

дезоксирибонуклеотидом. У результаті зростання (елонгація) даного ланцюга зупиняється (термінується) в тому місці, де в ДНК включився дідезоксирибонуклеотид. Тому їх називають термінаторами елонгації. Реакційна суміш по Сенгеру складається з ланцюга ДНК, нуклеотидну послідовність якої треба визначити, короткого фрагмента «міченої» ДНК, комплементарної кінцевому відрізку цього ланцюга (запал), одного з чотирьох дідезоксирибонуклеотидів та відповідного дНТФ в строго визначеному співвідношенні (щоб вони конкурували), а також інших трьох дНТФ. Готують чотири суміші, кожна з яких містить один з чотирьох дідезоксирибонуклеотидів. У кожній з пробірок утворюється набір мічених фрагментів різної довжини. Довжина їх залежить від того, в якому місці в ланцюг включений дефектний нуклеотид. Отримані мічені фрагменти ДНК розділяють у ПААГ (з точністю до одного нуклеотиду), проводять радіоавтографію і по картині розподілу фрагментів у чотирьох пробах встановлюють нуклеотидну послідовність ДНК.

Метод Сенгера був істотно поліпшений в лабораторії австралійського біохіміка Лероя Худа, де в 1985 р. радіоактивну мітку змогли замінити, флуоресцентною міткою. Це дало можливість американській компанії «Applied Biosystems» (в справжній час входить до складу теж американської компанії «Life Technologies») у 1987 р. створити перший автоматичний ДНК-секвенатор. Кожен відрізок ДНК забарвлюють різними кольорами залежно від того, якою є остання буква (мічений кольором нуклеотид, який обриває ланцюг). Фрагменти поділяються на гелі за розмірами, і машина автоматично зчитує спектр світіння поступаючих смуг, видаючи результати на комп'ютер. У результаті такої процедури виходить хроматограма, за якою легко встановити послідовність ДНК довжиною до 1000 «літер» з дуже невеликою кількістю помилок.

3.7.3. NGS-секвенування

Метод ДНК-секвенування «Illumina/Solexa» – це метод секвенування нового покоління, розроблений американською компанією «Solexa», яку пізніше придбала теж американська компанія, «Illumina». В справжній час

даний метод є «золотим стандартом» високопродуктивного секвенування і не має конкурентів, а компанія «Illumina», відповідно, є лідером в цієї галузі. В основі методу лежить принцип **секвенування шляхом синтезу з циклічною зворотною термінацією (англ. sequencing-by-synthesis (SBS) with cyclic reversible termination – (CRT))**. Спочатку одноланцюгові фрагменти ДНК закріплюються на твердій підкладці. Потім ДНК-залежна полімераза синтезує комплементарний ланцюг. Вбудовування кожного нового нуклеотиду реєструється за допомогою камери. У методі «Illumina/Solexa» використовуються 3'-модифіковані нуклеотиди з приєднаними флюоресцентними мітками різних кольорів. Модифікація нуклеотидів не дозволяє ДНК-полімеразі приєднати більше одного нуклеотиду. Флюоресценція ініціюється коротким імпульсом лазера і тип приєданого нуклеотиду визначається за кольором флюоресцентної мітки. Модифікація нуклеотиду блокується (полімераза тепер може рухатися далі) і цикл повторюється знову. В результаті вдається визначити послідовність ДНК довжиною до 250 нуклеотидів. Таку послідовність ДНК називають прочитанням або рідом (англ. reading – читання).

Метод **іонного напівпровідникового секвенування (англ. (англ. ion semiconductor sequencing))** був розроблений американською компанією «Ion Torrent», яку пізніше придбала компанія «Life Technologies». Метод заснований на виявленні іонів водню, які виділяються під час полімеризації ДНК. Це метод «секвенування при синтезі», в ході якого комплементарний ланцюг будується на основі послідовності матричного ланцюга.

Мікролунки, що містять призначену для секвенування молекулу матричної ДНК, наповнюють дезоксирибонуклеотидтрифосфатом (dNTP) одного виду. Якщо введений dNTP є комплементарним до ведучого нуклеотиду шаблону, він включається до зростаючого комплементарного ланцюга. Це викликає вивільнення іонів водню, який викликає спрацьовування іонного датчика ISFET, який вказує, що реакція відбулася. Якщо в послідовності матричного ланцюга присутній повтор одного нуклеотиду, кілька молекул dNTP будуть приєднані в одному циклі. Це призводить до збільшення кількості

утворених іонів водню і пропорційно більш високому електричному сигналу. Ця технологія відрізняється від інших технологій секвенування тим, що не використовує модифіковані нуклеотиди і оптичні датчики.

Метод ДНК-секвенування «SOLiD» (англ. sequencing by oligonucleotide ligation and detection) – технологія секвенування нового покоління на основі лігування, що розвивається компанією «Life Technologies».

«SOLiD» дозволяє секвенувати разом сотні мільйонів і навіть мільярди коротких послідовностей. Секвенування проходить за допомогою лігування 8 нуклеотидних зондів, мічених на 5'-кінці одним з чотирьох різних флуорофорів. Послідовність зондів несе сайт гідролізу, що знаходиться між п'ятим і шостим нуклеотидами. Перші дві підстави (рахуючи з 3'-кінця) комплементарні двом нуклеотидам секвенуємої послідовності. З третьої по п'яту підстави зонда можуть гібридизуватися з будь-якими трьома нуклеотидами секвенуємої ДНК. 6-8 підстави зонда також можуть гібридизуватися з будь-якою послідовністю, проте вони разом з флуоресцентним барвником відщеплюються від зонда в ході реакції. Відщеплення флуоресцентної мітки разом з підставами 6-8 відбувається таким чином, що на 5'-кінці зонда залишається фосфатна група, яка сприяє наступному циклу лігування зонду. Так, дві підстави кожного зонду точно комплементарні підставам секвенуємої послідовності в позиціях $n+1$ і $n+2$, $n+6$ і $n+7$ і т.д. Процес секвенування складається з п'яти раундів, кожен раунд складається з 6-7 циклів. Кожен раунд починається з додавання універсального праймера довжини n , комплементарного P1. У кожному циклі 8-ми нуклеотидні зонди додаються і лігуються до праймеру, їх перші два нуклеотиди комплементарні двом нуклеотидам секвенуємої послідовності. Потім відмивають від залишившихся незв'язаних зондів, вимірюють флуоресценцію лігovanого зонду і розрізають його між 5 і 6 підставами. Після закінчення останнього циклу проводять дисоціацію синтезованого ланцюга ДНК від матриці, прикріпленої до намистини. Це необхідно для того, щоб в наступному раунді вже використовувати нові праймер й зонди. Праймер тепер беруть довжини $n-1$. Отже, в ході п'яти раундів використовуються праймери, комплементарні P1, довжини n , $n-1$, $n-2$, $n-3$, $n-4$ щодо 3'-кінця P1. Таким чином

можна секвенувати приблизно 25 нуклеотидів послідовності. На виході отримують дані по флуоресценції. Простір кольорів і простір нуклеотидів містять по 4 елементи. Кожен колір кодує собою 4 з 16 можливих динуклеотидів. Наприклад, «синій» колір флуоресцентної мітки відповідає парі однакових нуклеотидів (тобто AA, GG, TT або CC). Дизайн матриці перетворень кольору сприяє корекції помилок. Одним кольором кодується: пара нуклеотидів і вона ж у зворотному порядку (наприклад, CA і AC); пара нуклеотидів і комплементарна їй пара (наприклад, CA і GT); пара нуклеотидів і назад комплементарна їй пара (наприклад, CA і TG). Послідовність нуклеотидів може бути єдиним чином перетворена в послідовність кольорів. Але послідовність кольорів може бути перетворена в послідовність нуклеотидів 4 різними способами. Це схоже на взаємовідповідність між нуклеотидами і амінокислотами (кольору). Для розшифровки послідовності нуклеотидів за кольорами необхідно знати один нуклеотид. У цьому методі кожен нуклеотид прочитується двічі, що підвищує точність секвенування. Відповідно щоб допустити помилку секвенування (пропустити SNP) необхідно обидва рази неправильно визначити колір флуоресцентної мітки при секвенуванні сусідніх нуклеотидів.

Американська компанія «Helicos Bioscience» розробила революційно нову технологію секвенування одиничних молекул під назвою «**true Single Molecule Sequencing – tSMS™**».

«tSMS™» дозволяє проводити одночасне пряме секвенування мільярда ланцюгів ДНК. Процес секвенування включає в себе кілька етапів. На першому кроці підготовляються зразки за рахунок розрізання ДНК на фрагменти. Далі до кожного фрагменту приєднується поліаденозинівий хвіст за допомогою аденозин-кінцевої трансферази. На наступному етапі денатурована ДНК з поліаденозинівим хвостом гібридизуються на політимінових олігонуклеотидах, які з'єднані з проточною кюветою. Цикл секвенування складається з подовження за рахунок одного з чотирьох флуоресцентно-мічених нуклеотидів, приєднання якого детектується на секвенаторі.

Подальше відщеплення флуорофора дозволяє запустити наступний цикл приєднання флуоресцентно-мічених нуклеотидів, які дозволяють визначити послідовність ДНК.

Одномолекулярне секвенування в реальному часі (англ. single molecule real time sequencing – SMRT) являє собою метод секвенування ДНК нового покоління, розроблений американською компанією «Pacific Biosciences». Ідея методу полягає у визначенні послідовності ДНК за рахунок спостереження за роботою одиничної молекули ДНК-полімерази у реальному часі. При цьому ДНК-полімераза добудовує другий ланцюг досліджуваної молекули ДНК, використовуючи нуклеотиди, мічені різними флуоресцентними мітками, реєструючи які можна зрозуміти, який нуклеотид ДНК-полімераза вбудовує зараз. Пристрій секвенаторів даного типу дозволяє спостерігати на рівні одиничної молекули за синтезом комплементарного ланцюга однієї молекули одноланцюгової ДНК за допомогою однієї молекули ДНК-полімерази. У цій технології флуоресцентно мічені нуклеотиди і конфокальна мікроскопія високого дозволу дозволяють секвенувати послідовність в реальному часі і одночасно для багатьох полімераз.

Піросеквенування (англ. pyrosequencing) – це метод синтетичного секвенування. Ця технологія використовує систему білкового каскаду, що складається з 4 білків і специфічних субстратів, яка генерує випромінювання, коли нуклеотид комплементарен ланцюгу ДНК.

Цей сигнал детектується, реєструється в базі, і додається наступний нуклеотид. Детекція заснована на пірофосфатній властивості ДНК-полімерази.

Платформа «GS FLX», що працює за методикою «454», може отримувати інформацію про 400 млн нуклеотидів за 10-годинний період роботи.

Нанопорове секвенування (англ. nanopore sequencing) – це сімейство вискоелективних методів визначення послідовності молекул ДНК або РНК з використанням білкових або твердотільних пір діаметром у кілька нанометрів. Нанопорові системи являють собою реакційну камеру, усередині якої знаходиться розчин електроліту. Камера розділена на дві частини ліпідної мембранною чи іншою тонкою непровідящою поверхнею, в яку впроваджена

одиночна нанопора. До частин камери прикладають напругу, через що виникає струм іонів через пору. Коли досліджувані молекули проходять через пору у напрямку поля, вони зменшують перетин, доступний для іонів, і сила струму падає. Аналізуючи зміну сили струму, можна визначити властивості молекули, що проходить через пору. У разі нуклеїнових кислот, діаметр використовуваних нанопор становить кілька нанометрів, через що ДНК і РНК здатні проходити крізь пору тільки в одноланцюговій формі, але не в двохланцюговій. При проходженні молекули нуклеїнової кислоти через пору окремі нуклеотиди затримуються в певних сайтах всередині пори, в результаті чого відбувається вимірюєме падіння сили струму. Залежно від того, чи зберігають секвенуємі молекули нуклеїнових кислот свою хімічну цілісність, виділяють наступні методи:

➤ **Секвенування цілих ланцюжків.** У цьому методі ланцюги нуклеїнових кислот не розщеплюються. Перенесення цілих молекул ДНК і РНК через пору може здійснюватися такими способами:

- **Транспорт під дією напруги.** Так як ДНК і РНК несуть на собі негативний заряд, то найпростішим способом транспорту молекули нуклеїнової кислоти через пору є їх електрофоретичне перенесення разом з іонами. Проблемою даного методу є те, що для вимірювання падіння струму іонів через пору спочатку потрібен великий струм, щоб отримати хороше співвідношення сигнал/шум. Але при збільшенні прикладеної напруги збільшується і швидкість, з якою молекула нуклеїнової кислоти долає пору, а значить зменшується час розпізнавання кожної окремої підстави, через що якість розпізнавання падає;
- **Транспорт під дією напруги з розплітанням дуплексів.** Сповільнити швидкість проходження одноланцюгової ДНК через пору можна, утворюючи з нею дволанцюгові ділянки за допомогою комплементарних фрагментів ДНК. Тоді в ході транспорту відбуватиметься розплітання даної ділянки, що і дозволить довше затримувати окремі нуклеотиди в порі. Тим не менше, оскільки розплітання відбувається не понуклеотидно, то час затримки нуклеотиду в порі не є постійним для всієї послідовності;

- Транспорт з використанням ферментів. Для того, щоб кожен нуклеотид затримувався в порі на фіксований час, можна використовувати різні ферменти, які пропускають нуклеотиди через пору по одному. Прикладом такого ферменту є ДНК-полімераза. За рахунок прикладеної напруги комплекс ДНК-фермент спочатку притягується до пори. Але тепер, перш, ніж черговий нуклеотид молекули ДНК пройде через пору, повинен відбутися один крок синтезу другого ланцюга ДНК. Виникає затримка підстав всередині пори, що дозволяє більш точно розрізнити їх.
- **Екзонуклеазне секвенування.** У цьому методі ланцюг нуклеїнової кислоти нарізається на одиничні нуклеотиди екзонуклеазою, розташованої в безпосередній близькості від пори. Під дією поля негативно заряджені нуклеотиди самостійно потрапляють в пору, де відбувається визначення підстав.

Шотган-секвенування (англ. shotgun sequencing), або метод дробовика – метод, який використовується для секвенування довгих ділянок ДНК.

Суть методу полягає в отриманні випадкової масованої вибірки клонованих фрагментів ДНК даного організму, на основі яких може бути складена його геномна бібліотека.

Оскільки звичайні методи секвенування можуть бути застосовані лише для коротких відрізків ДНК (100-1000 п.п.), більш довгі послідовності можна розділити на фрагменти, а потім зібрати заново, щоб отримати повну послідовність великої ділянки ДНК. Для цього використовуються два основні методи: **хромосомна ходьба (англ. chromosome walking)**, який дозволяє визначити крок за кроком послідовність великої ділянки ДНК, і даний метод, який набагато швидший, але і складніший, так як використовуються випадкові фрагменти ДНК, які потім необхідно зібрати разом.

При секвенуванні методом дробовика ДНК випадковим чином фрагментується на дрібні ділянки, які потім секвенують звичайними методами, наприклад, методом Сенгера. Отримані випадкові фрагменти ДНК, що перекриваються потім збирають за допомогою спеціальних програм в одну цілу

велику послідовність, однак, при складанні деякі труднощі представляють послідовності ДНК, що повторюються.

Метод шотган-секвенування застосовували для отримання перших повних геномів організмів.

В даний час визначення точної нуклеотидної послідовності будь-якого сегменту ДНК помірної довжини – цілком здійсненне завдання. Вже визначено послідовність кількох сотень генів про- і еукаріотів. Знаючи послідовність гена і генетичний код, легко визначити амінокислотну послідовність кодованого їм білка. Раніше для визначення структури білка доводилося робити ретельний і вельми трудомісткий аналіз виділеного та очищеного білка. Зараз часто буває простіше визначити структуру білка через нуклеотидну послідовність, ніж за допомогою прямого секвенування. Якщо секвенування білка займає місяці і навіть роки, то ДНК вдається секвенувати за кілька тижнів. Визначення послідовності ДНК призвело також до того, що були виявлені області, які не кодують білки, але беруть участь у регуляції експресії генів і реплікації ДНК. У 1996 р. був секвенований геном дріжджів, у 1998 р. – геном арабідопсису, а у 2000 р. – геном людини, проте в даному випадку мова йде тільки про встановлення послідовності нуклеотидів, так як генетична структура і функції окремих ділянок геному ще не ідентифіковані, це більш складне завдання. Відразу слідом за розробкою нових методів секвенування з'явилися настільки ж швидкі і прості методи синтезу порівняно довгих олігонуклеотидів з певною, задалегідь заданою послідовністю. Тепер за три-чотири дні можна синтезувати послідовність з 12-20 нуклеотидів. Автоматизація цієї процедури ще більш полегшує і прискорює синтез. ДНК-секвенатори виконують цю роботу за кілька годин.

3.8. Генотипування

Генотипування (англ. **genotyping**) – це аналіз персональної генетичної структури людини.

3.8.1. SNP-генотипування

В справжній час все більша увага приділяється генотипуванню SNP.

За минулі роки з'явилося безліч різних методик **SNP-генотипування (англ. SNP genotyping)**, які засновані на різних методах дискримінації алелів. Щоб зрозуміти кожен з технологій, необхідно розділяти реакцію дискримінації алелів і метод детекції. Продукти реакції дискримінації алелів можуть бути детектовані більш ніж одним методом і тими ж методами може бути проведена детекція продуктів, отриманих за допомогою інших реакцій і зразків. Більшість методів генотипування SNP можуть бути згруповані в чотири групи, виходячи з їх молекулярного механізму дії:

- **алель-специфічна гібридизація (англ. allele specific hybridization);**
- **подовження (добудова) праймерів (англ. primer extension);**
- **алель-специфічне лігування олігонуклеотидів (англ. oligonucleotide ligation);**
- **рестриктазний аналіз (англ. restrictase analysis).**

Існує кілька методів виявлення продуктів і їх аналізу по кожній групі перерахованих вище реакцій (флюоресценція, люмінесценція і т.д.). Так само існують дві категорії реакцій залежно від їх типу: гомогенні реакції, тобто реакції в розчинах і реакції, що відбуваються на твердій поверхні, як, наприклад, адсорбція на поверхні скла. Гомогенні реакції більше сприяють автоматизації процесу дискримінації алелів, тому що не вимагають після себе етапу сепарації і/або очищення. Однак основна перешкода – це обмежена здатність до мультиплексного аналізу, тоді як реакції на твердих поверхнях мають більше можливостей для мультиплексного аналізу, хоча й потребують додаткових маніпуляцій.

Алель-специфічна гібридизація

Алель-специфічна гібридизація, також відома як **алель-специфічна олігонуклеотидна гібридизація (англ. allele specific oligonucleotide hybridization – ASO)**, заснована на поділі двох ДНК-мішеней в одному локусі за допомогою гібридизації.

Конструюються два алель-специфічних зонди, з поліморфною підставою в центрі послідовності зонду. При оптимальних умовах реакції стабільні гібридизовані зонди утворюються за умови повної відповідності підстав, а при невідповідності навіть однієї п.п. зонд є нестабільним. ASO-зонди зі зворотною дот-блот послідовністю використовувалися для детекції перших поліморфізмів, що аналізувалися за допомогою методу ПЛР в судово-медичній експертизі. Ці зонди до сих пір використовуються в ряді лабораторій, хоча зараз все більше замість них використовують метод STR-аналізу. Щоб отримати перевагу при використанні методу ASO-зондів при типуванні SNP необхідно, щоб використовувалися методи детекції, що забезпечують високу точність, чутливість і продуктивність.

Виділяють наступні види алель-специфічної гібридизації:

➤ **Гомогенна гібридизація з використанням системи перенесення енергії за допомогою флуоресцентного резонансу (англ. fluorescence resonance energy transfer – FRET).**

Перенесення енергії за допомогою флуоресцентного резонансу відбувається, коли два флуоресцентних барвника знаходяться дуже близько один до одного і спектр випромінювання одного перекриває спектр збудження іншого. Ці методи генотипування об'єднують і дискримінацію алелей з використанням методу ASO-зондів за допомогою ПЛР в реальному часі, і кількісний аналіз. Тому на додаток до ASO-зондів потрібно два праймери. Збільшити силу флуоресценції можна під час ПЛР в реальному часі або після її закінчення. Існують кілька варіантів, заснованих на даному принципі:

1. Метод лайтциклеру (англ. LightCycler).

Метод був розроблений, запатентований і впроваджений швейцарською компанією «Roche». Він заснований на тому, що два спеціально синтезованих специфічних олігонуклеотиди мітяться флуоресцентними барвниками (флюорофорами). Перший зонд несе флуоресцентну мітку на своєму 3'-кінці (флуоресцеїн), а другий зонд несе іншу мітку (LightCycler Red – LC Red) на 5'-кінці. Послідовності двох олігонуклеотидів підбираються з розрахунку повної їх відповідності обраному фрагменту ДНК. При гібридизації

цих двох олігонуклеотидів два флуоресцентних барвника виявляються дуже близько один до одного. Один з них (флуоресцеїн) випромінює зелене світіння. Енергія, яка виділяється в результаті, передається іншому барвнику (LC Red). Цей перехід енергії, відомий як FRET, є високо залежним від відстані між двома барвниками. Енергія передається з високою ефективністю тільки коли відстань між двома молекулами відповідає інтервалу 1-5 нуклеотидів.

Інтенсивність свічення барвника LC Red визначається за допомогою системи ПЛР в реальному часі «LightCycler[®]».

Посилення флуоресценції пропорційно утворенню ДНК при проведенні ПЛР. Вимірювання ступеня флуоресценції проводиться відразу після того, як отриманий сигнал від барвника про гібридизацію нуклеотидів. Один з зондів пов'язаний з поліморфною підставою в центрі, інший же повинен перебувати поруч, щоб відбувся перенос енергії. Добре відомо, що помилкове спарювання п.п. веде до зменшення температури відпалу олігонуклеотидів. І ступінь зменшення безпосередньо залежить від того, яка довжина олігонуклеотидного фрагменту, і місця, де відбулося неправильне спарювання. Для вимірювання змін в температурі відпалу будують криву відпалу. Таким чином, даний метод також можна використовувати при гібридизації, виявляючи мутантів і встановлюючи помилки спарювання підстав. Одночасно можна генотипувати більше одного SNP, з використанням різних флуоресцентних міток на різних температурах відпалу. Головна перевага цього методу – це його чутливість.

2. TaqMan-генотипування (англ. TaqMan genotyping).

Метод був розроблений, запатентований і впроваджений компанією «Applied Biosystems».

TaqMan-генотипування засноване на 5'-нуклеазній активності Taq-полімерази, яка відщеплює нуклеотиди від олігонуклеотидних зондів, гібридизованих з ДНК, викликаючи флуоресцентний імпульс. Необхідно два TaqMan-зонди з різними поліморфними сайтами. Один зонд повинен бути комплементарен дикому алелю, інший – поліморфним варіантам. Ці зонди мають різні флуоресцентні барвники на 5'-кінці і гасники флуоресценції на 3'-кінці. Коли зонди неактивні, то гасники взаємодіють з барвником за допомогою

механізму FRET, блокуючи флуоресцентну активність. На етапі відпалу праймерів в процесі проведення ПЛР TaqMan-зонди гібридизуються з молекулою ДНК. На етапі розплітання 5'-кінець барвника відщеплюється, завдяки 5'-нуклеазній активності Taq-полімерази, що призводить до збільшення рівня флуоресценції барвника. Помилкове спарювання підстав в зондах призводить до відщеплення цілого зонда без вивільнення барвника.

Генотип зразка визначається відношенням інтенсивностей світіння двох різних барвників.

Інший метод детекції, який може застосовуватися з використанням 5'-нуклеазного аналізу, називається флуоресцентною поляризацією.

3. Метод молекулярних маячків (англ. *molecular beacons*).

Молекулярні маячки представляють собою олігонуклеотидні зонди, які мають два кінці, що фланкують комплементарній ділянці ДНК. На 5'-кінці у них є флуоресцентний барвник, на 3'-кінці – гасник. Зонд, перебуваючи у формі «шпильки», не гібридує, а барвник «гаситься» за допомогою гасника і, таким чином, флуоресценції не відбувається. Коли молекулярний маячок приєднується до повністю комплементарної ділянки, барвник і гасник виявляються далеко один від одного, в результаті чого виникає флуоресценція. Для типування SNP використовуються два молекулярних маячка. Один специфічний для дикого алеля, інший – для поліморфного варіанта. Кожен з них позначений різними барвниками, які дозволяють дискримінувати алелі за один цикл ПЛР. Різні мішені можуть бути детектовані в одній реакції. Це досягається використанням різних молекулярних маячків для кожної мішені і приєднанням флуоресцентних барвників з різними спектрами флуоресценції. Число різних барвників, які можуть бути використані в одній реакції, обмежено визначальною здатністю сучасних апаратів. Апарати, що використовують технологію ПЛР в реальному часі з одночасним флуоресцентним аналізом, використовують монохромне джерело світла, таке як лазер або діоди. З використанням змінюючих довжину хвилі молекулярних маячків дана проблема стає вирішеною. Ці зонди випускають флуоресцентне випромінювання в індивідуальному діапазоні, хоча порушуються одним

монохромним джерелом. Цей підхід збільшує здатність мультиплексного типування SNP.

Принципова перевага методів гомогенної гібридизації полягає в тому, що вони не вимагають пост-ПЛР процедур, т.я. ПЛР і детекція відбуваються протягом однієї і тієї ж реакції. Це дозволяє визначати SNP в безлічі зразків і різко знижує ймовірність контамінації.

➤ **Гібридизація на мікрочіпах (англ. array hybridization).**

У цьому підході короткі олігонуклеотидні фрагменти прикріплюються до твердої поверхні, щоб створити мікромасив, і гібридизуються з флуоресцентно-міченими ПЛР продуктами, що містять SNP. Це допомагає аналізувати безліч SNP одночасно. Проте ефективність гібридизації залежить не тільки від поліморфних сайтів SNP, а й від їх фланкуючих послідовностей. Таким чином, стає складно підібрати оптимальні умови для одночасного аналізу великої кількості SNP. Ця складність вирішується за рахунок системи «GeneChip®» американської компанії «Affymetrix» з використанням десятків ASO-зондів для кожного SNP. Зонди включають в себе всі можливі варіанти поліморфізмів. Цей метод розроблений для типування безлічі SNP, що необхідно для судової медицини. Детальніше цей метод описаний нижче.

Подовження (добудова) праймерів

Подовження праймерів засновано на здатності ДНК-полімерази включати до синтезуемого ланцюга дНТФ, комплементарні матриці. Існує кілька способів подовження праймерів. Всі вони, однак, можуть бути згруповані у дві основні групи. До першої належать процеси подовження за допомогою окремих нуклеотидів (мінісеквенування), де поліморфна підстава визначається за рахунок включення ДНК-полімеразою ддНТФ, комплементарного поліморфній підставі матриці. Інша група заснована на алель-специфічному подовженні, при якому ДНК-полімераза працює лише в разі повної відповідності праймера послідовності ланцюга.

Виділяють наступні види подовження праймерів:

➤ **Флуорисцентна детекція (англ. fluorescence detection).**

Існують кілька варіантів, заснованих на даному принципі.

1. Мультиплексне генотипування SNaPshot.

Однією з найбільш звичайних комерційних технологій, заснованих на реакції мінісеквенування з подальшим аналізом методом гель-електрофорезу і флуоресцентної детекції є набір «SNaPshot[®] Multiplex Kit» компанії «Applied Biosystems».

Для мультиплексного аналізу в наборі використовуються флуоресцентні ддНТФ. Немічений праймер знаходиться на 3'-кінці поруч з сайтом SNP. В праймері є ддНТФ, мічений флуоресцентним барвником. Мультиплекс може бути отриманий шляхом просторового розподілу продуктів мінісеквенування при використанні «хвостів» різної довжини на 5'-кінці праймерів з набору SNaPshot. Продукти можна виявити за допомогою гель-електрофорезу.

2. Гібридація на мікрочіпах (англ. array hybridization).

Мікрочіпи є зручними для генотипування SNP за допомогою мікросеквенування. Вони можуть бути створені на твердій поверхні або в розчині. У першому випадку праймери мікросеквенування приєднані до поверхні біочіпа. Праймери марковані ддНТФ, а мікромассив сканується на предмет флуоресценції. У другому випадку генотипування проводиться за допомогою окремих підстав, що додаються до унікального кінця праймерів мікросеквенування. Продукт мультиплексу гібридується в розчині за принципом комплементарності. Детальніше цей метод описаний нижче.

3. MALDI-TOF мас-спектрометрія (англ. MALDI-TOF mass spectrometry).

Для визначення молекулярної ваги продуктів з використанням мінісеквенування може бути використані технології матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації, або МАЛДІ (англ. matrix assisted laser desorption/ionization – MALDI) та часопролітної мас-спектрометрії (англ. time-of-flight mass spectrometry – TOF). Детальніше цей метод описаний нижче.

4. Флуоресцентна поляризація (англ. fluorescence polarization).

Як було описано раніше, флуоресцентна поляризація може бути використана для визначення будь-яких алельних продуктів, які мають різні в порівнянні з початковим продуктом маси. У разі мінісеквенування, праймер

працює завдяки алель-специфічному блокатору барвника, збільшуючи вагу флуорофорного білка приблизно в 10 разів.

- **Піросеквенування (англ. pyrosequencing)** (див. 3.7.3. Технології секвенування нового покоління).
- **Алель-специфічне приєднання (англ. allele-specific accession).**

Алель-специфічне приєднання засноване на різниці в ефективності приєднання ДНК-полімеразою праймерів, пов'язаного зі збігом і розбіжністю 3'-кінця. ДНК-полімераза приєднує праймер тільки коли 3'-кінець повністю комплементарен ділянці ДНК. Для кожного визначення необхідно два праймери.

Алель-специфічне лігування олігонуклеотидів

ДНК лігаза є дуже специфічним ферментом, який усуває одноланцюжкові розриви в ДНК. Був описаний метод лігування одноланцюгових розривів, як метод типування SNP. Він заснований на здатності ферменту ковалентно зшивати розташовані один за одним нуклеотиди. Метод вимагає створення трьох зондів. Одного звичайного і двох алель-специфічних. Перший зонд віджигается відразу з SNP. Два інших фланкують 3'-ділянки алелів. Це створює одноланцюговий розрив у структурі ДНК. Тільки алельний зонд може злипнутися з основним.

Рестриктазний аналіз

Аналізатор «Invader[®]» американської компанії «Third Wave Technology» заснований на специфічному впізнаванні і розрізанні, завдяки ендонуклеазній активності, тривимірної структури, утвореної в результаті повної гібридизації олігонуклеотидів з ДНК.

Необхідна наявність двох олігонуклеотидів, званих «внутрішній олігонуклеотид» і «зонд», які відпалюються з ДНК неповністю. Внутрішній нуклеотид комплементарен послідовності 3'-кінця SNP. Зонд зроблений з фрагментарною ділянкою, що несе алельну підставу. Таким чином, зонд має два регіони, один з яких комплементарен одному з алелів SNP і послідовності 5'-кінця поліморфного сайту і некомплементарен послідовності 5'-плеча. Коли

алельна підстава комплементарна підставі зонду, зонд неповністю злучається з 3'-кінцем внутрішнього олігонуклеотиду, утворюючи структуру, яка впізнається Flap-ендонуклеазою і вирізається, звільняючи 5'-кінець зонду. Якщо сталася помилка, то утворена структура не впізнається ферментом і вирізання не відбувається. Цей метод дозволяє точно визначати однонуклеотидні мутації.

Гібридизація на мікрочіпах

В справжній час SNP-генотипування головним чином проводять методом гібридизації на мікрочіпах.

Система гібридизації на мікрочіпах була розроблена, запатентована і впроваджена компанією «Affymetrix» у 1989р.

ДНК-мікрочіп (англ. DNA microarray) складається з тисяч мікроскопічних крапок дезоксиолігонуклеотидів. Кожна крапка містить порядку пікомолей ДНК специфічної послідовності.

Олігонуклеотид може бути короткою ділянкою гена чи іншого компонента ДНК, і використовується для гібридизації з кДНК.

Гібридизація зонда і мішені реєструється і кількісно визначається за допомогою флюоресценції або хемолюмінесценції, що дозволяє визначати відносну кількість нуклеїнової кислоти із заданою послідовністю у зразку.

Останнім часом, компанією «Affymetrix» були розроблені нові формати ДНК-мікрочіпів.

У звичайному ДНК-мікрочіпі зонди ковалентно прикріплюються до твердої поверхні скляного або кремнієвого чіпу. Інші платформи, наприклад компанії «Illumina», використовують мікроскопічні кульки замість великих твердих поверхонь.

ДНК мікрочіпи відрізняються від інших мікрочіпів тільки тим, що їх застосовують для вимірювання ДНК або як частину більш складної системи детекції та аналізу ДНК. Окрім генотипування, ДНК-мікрочіпи використовують для аналізу зміни експресії генів і повторного секвенування мутантних геномів. Мікрочіпи відрізняються по конструкції, особливостям роботи, точності, ефективності і вартості.

Американська компанія «Fluidigm» створила систему для SNP-генотипування «Juno». Дана система побудована на мікрофлюїдних технологіях. У мікрофлюїдних чипах, основні стадії аналізу (завантаження, транспортування проби і реагентів, фільтрація і концентрування проби, хімічні реакції, розподіл продуктів, детектування аналіту і т.д.) можна реалізувати на одній, компактній підложці. Це значно спрощує і прискорює процес генотипування, оскільки виключає додаткові маніпуляції із застосуванням відповідного лабораторного обладнання.

**Денатуруюча вискоефективна рідинна хроматографія (ДВЕЖХ)
(англ. denaturing high performance liquid chromatography – DHPLC)**

Вискоефективна рідинна хроматографія – ВЕЖХ (англ. high performance liquid chromatography – HPLC) є одним з ефективних методів розділення складних сумішей речовин, що широко застосовується як в аналітичній хімії, так і в хімічній технології. Основою хроматографічного розділення є участь компонентів суміші, в складній системі Ван-дер-ваальсових взаємодій (переважно міжмолекулярних) на межі розділу фаз. Як спосіб аналізу, ВЕЖХ входить до складу групи методів, яка, зважаючи на складність досліджуваних об'єктів, включає попереднє розділення вихідної складної суміші на відносно прості. Отримані прості суміші аналізуються потім звичайними фізико-хімічними методами або спеціальними методами, створеними для хроматографії. Принцип рідинної хроматографії полягає в поділі компонентів суміші, заснованому на різниці в рівноважному розподілі їх між двома незмішуваними фазами, одна з яких нерухома, а інша рухома (елюент). Відмінною особливістю ВЕЖХ є використання високого тиску (до 400 бар) і дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3-5 мкм, а зараз до 1,8 мкм). Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко і повно (середній час аналізу від 3 до 30 хв).

Денатуруюча вискоефективна рідинна хроматографія (ДВЕЖХ) є різновидом ВЕЖХ. Принцип методу полягає в тому, що двохланцюгова молекула ДНК, що має навіть одиничне помилкове спарування підстав, має

менший час утримування на хроматографічній колонці при температурі, достатньої для часткової денатурації зразка.

MALDI-TOF мас-спектрометрія

Ефективною і високопродуктивною технологією, що дозволяє швидко і відносно недорого ідентифікувати поодинокі SNP, є метод MALDI-TOF мас-спектрометрії.

МАЛДІ представляє собою десорбційний метод «м'якої» іонізації, зумовленої впливом імпульсів лазерного випромінювання на матрицю з аналізуємою речовиною. Матриця являє собою матеріал, властивості якого зумовлюють зниження деструктивних властивостей лазерного випромінювання і іонізацію аналізованої речовини.

Метод MALDI-TOF мас-спектрометрії являє собою поєднання реакції мінісеквенування ДНК і мас-спектрометричного аналізу продуктів цієї реакції. Такий підхід дозволяє досягти високої точності аналізу в поєднанні з високою продуктивністю і низькою собівартістю витратних матеріалів. Принциповою перевагою даного способу є висока чутливість визначення генотипів навіть при використанні малих кількостей ДНК і її деградації. Технологія дозволяє ідентифікувати до 3000-4000 SNP на добу.

MALDI-TOF мас-спектрометрія нуклеїнових кислот для визначення генотипів SNP передбачає постановку реакції мінісеквенування, що складається з наступних етапів:

- **1 етап – проведення ПЛР** для напрацювання амплікону, н.п. якого включає досліджуваний поліморфізм. ПЛР заснована на циклічній ферментативній добудові олігонуклеотидної затравки-праймера на вихідній ДНК-матриці. У реакції ПЛР-ампліфікації використовуються два праймери, комплементарних фланкуючій точці поліморфізму послідовності ДНК;
- **2 етап – дефосфорилювання продуктів ПЛР реакції** за допомогою ферменту термолабільної фосфатази (SAP). В результаті подібної обробки в місці не залишається дезокситринуклеотидів здатних вступати в реакцію ампліфікації, що дозволяє якісно проводити наступні етапи протоколу;

- **3 етап – постановка реакції мінісеквенування**, де в якості матриці використовується ПЛР-продукт. Суть реакції полягає в проведенні реакції ампліфікації з використанням олігонуклеотидного зонду, 3'-кінець якого віджигається безпосередньо перед нуклеотидом в якому відбувається заміна (поліморфізм). Крім того, використовується певний набір 2'-дезокси і 2',3'-дідезокситринуклеотидів (dNTP і ddNTP). ddNTP є термінаторами ампліфікаційних реакцій, оскільки не здатні створювати фосфодієфірний зв'язок з наступним нуклеотидом. В ході мінісеквенування високоточна полімераза подовжує зонд компліментарно матриці, в ролі якої виступає ПЛР-продукт потрібної ділянки гена. Таким чином, для послідовності 5'-ACCGATGGCCGATGCATC [C/t] GTC-3' (заміна C>T), при використанні олігонуклеотидного зонду з 5'-ACCGATGGCCGATGCATC-3' і набору з наступних букв: dT, ddC, ddG, продуктом реакції при наявності алеля «С» буде 5'-ACCGATGGCCGATGCATC+ddC-3', а в разі алеля «Т» - 5'-ACCGATGGCCGATGCATC+dT +ddG-3'. При гетерозиготному генотипі утворюються обидва продукти;
- **4 етап – очищення продуктів мінісеквенування від позитивно заряджених іонів** за допомогою катіон-обмінної смоли. Даний етап необхідний для позбавлення від шумів на мас-спектрі, внаслідок наявності іонів Na, Ca і K в буферному розчині;
- **5 етап – нанесення отриманого розчину аналіту на металеву пластину (анкор-чип)** з попередньо нанесеною мас-спектрометричною матрицею (3-НРА, 3-гідроксіпіколінова кислота);
- **6 етап – мас-спектрометричний аналіз.** Реєстрація продуктів виконується на часопролітному MALDI мас-спектрометрі. Для вищерозглянутого прикладу олігонуклеотидного зонду 5'-ACCGATGGCCGATGCATC-3' має масу 5485 Da, а продукти реакції 5758 Da і 6102 Da для алелів «С» і «Т», відповідно. Таким чином, досліджуючи спектр мас зразка після реакції мінісеквенування можна визначити генотип SNP для будь-якого зразка ДНК. Аналіз результатів може бути здійснено як в ручному, так і автоматичному режимах.

MALDI-TOF мас-спектрометрію проводять на часопротітних MALDI мас-спектрометрах.

3.8.2. ДНК-фінгерпринтінг

ДНК-фінгерпринтінг (англ. DNA fingerprinting) або генетичний фінгерпринтінг, ДНК-дактилоскопія, ДНК-тестування, ДНК-типування, ДНК-профільювання (англ. genetic fingerprinting, DNA dactyloscopy, DNA testing, DNA typing, DNA profiling) – метод, який використовується в судово-медичній експертизі і антропології, для ідентифікації осіб на основі унікальності послідовностей ДНК індивідуума.

Метод був відкритий в 1984р. британським генетиком Алеком Джеффризом і вперше був використаний як доказ в суді над Коліном Пітчфорком в справі, де він був звинувачений у зґвалтуванні та вбивстві.

Розглядаючи рентгенівські знімки ДНК, Джеффриз виявив, що ДНК різних людей мають унікальні послідовності нуклеотидів. Послідовності ДНК конкретної людини складають його ДНК-профіль або генетичний паспорт, який можна використовувати для ідентифікації особи. Складання ДНК-профілю людини (ДНК-профільювання) не слід плутати з повною рашифровкою його геному.

Хоча 99,9% послідовностей ДНК людини збігаються за складом, тим не менш ДНК різних людей досить індивідуальні. В ДНК-профільюванні аналізується кількість повторюваних елементів в обраній ділянці генома. Ця кількість називається коротким тандемним повтором або КТП (англ. short tandem repeats – STR) і є варіабельною, тому має ще одну назву – віриабельний тандемний повтор (англ. variable number tandem repeat – VNTR).

Чим більше ділянок геному (або локусів) аналізується при складанні ДНК-профілю, тим вище точність ідентифікації особи. В даний час кількість локусів для складання ДНК-профілю досягає 16 і більше.

Процес починається з підготовки зразка ДНК індивідуума (зазвичай званий «контрольним зразком»). Найбільш доцільним методом відбору еталонного зразка є використання букального зішкрібу, тому що при такому

способі знижується ймовірність його забруднення. Якщо це не представляється можливим (наприклад, якщо для такої процедури потрібно рішення суду, яке відсутнє) можна скористатися іншими методами для збору зразків слини, крові, сперми або інших відповідних рідин або тканин від особистих речей (наприклад, від зубної щітки, бритви і т.п.). Можна також скористатися зразками зі сховищ (наприклад, з банку сперми або зі сховища біопсії тканин). Зразки, отримані з крові біологічних родичів, можуть служити індикатором профілю індивідуума, так само як і людські останки, які були раніше профільовані.

Контрольний зразок аналізується для створення ДНК-профілю людини, використовуючи один з методів, описаних нижче. ДНК-профіль потім можна порівняти з іншим зразком, щоб визначити, чи є генетична схожість.

➤ **ПДРФ-аналіз (англ. RFLP analysis).** Першими методами генетичного аналізу, що використовувалися для ДНК-профілювання, були розпізнавання ендонуклеази рестрикції, а потім Саузерн-блотінг. Хоча в позиціях розщеплення ендонуклеази рестрикції може проявлятися поліморфізм, найчастіше саме ензими і ДНК-проби використовуються для аналізу локусів тандемного повтору. Однак Саузерн-блотінг є трудомістким методом і вимагає великої кількості зразків ДНК. Крім того, оригінальна методика перегляду багатьох мінісателітів локусів одночасно збільшує спостережувану варіабельність, але це створює труднощі в розрізненні окремих алелів (і тим самим виключає цей метод для тестування на батьківство). Ці ранні методи були витіснені методами ПЛР аналізу.

➤ **ПЛР-аналіз (англ. PCR analysis).** З винаходом методу ПЛР ДНК-профілювання зробило величезний крок вперед як щодо диференціації, так і в можливості відновлення інформації по дуже малим (або деградуючим) зразкам. ПЛР в значній мірі посилює важливість конкретного регіону ДНК, використовуючи олігонуклеотидні праймери і термостабільні ДНК-полімерази. Перші методи аналізу, такі як дот- блот-гібридизація, були дуже популярні завдяки своїй простоті і швидкості, з якою можна було отримати результат. Проте вони не володіли такою диференціацією, як ПДРФ. Крім того, було

важко визначити ДНК-профілі для суміші зразків, таких як вагінальний мазок у жертв сексуального насильства. Метод ПЛР був легко адаптований для аналізу локусів тандемного повтору. У США ФБР стандартизований набір з 13 тандемних повторів для ДНК-профілювання, а також організувало базу даних CODIS для судово-медичної ідентифікації в кримінальних справах. Подібні аналізи і бази даних були створені і в інших країнах. Крім того, розроблено комплекти інструментальних засобів, які дозволяють аналізувати SNP.

➤ **КТП-аналіз (англ. STR analysis).**

Метод ДНК-профілювання, що застосовується в даний час, заснований на ПЛР і використовує КТП.

У цьому методі аналізуються ділянки з високим ступенем поліморфізму, які мають короткі повторювані послідовності ДНК (найбільш поширеним є 4 базових повтори, але зустрічаються й інші довжини повтору, у тому числі 3 та 5 п.п.). Оскільки різні люди мають різну кількість повторюваних ланок, ці ділянки ДНК можуть використовуватися для встановлення відмінностей між індивідуумами. Ці КТП-локуси є метою спеціальних праймерів і посилюються за допомогою ПЛР. Результуючі фрагменти ДНК потім відділяються і розпізнаються за допомогою капілярного гель-електрофорезу.

➤ **Мітохондріальний аналіз (англ. mitochondrial analysis).**

Для сильно деградованих зразків іноді буває неможливо отримати повну інформацію про КТП. В таких ситуаціях аналізується мтДНК, оскільки в клітині існує багато копій мтДНК, тоді як ядерної ДНК може бути не більше 1-2 копій. Мітохондріальний аналіз є корисним доповненням у визначенні чіткої ідентифікації в таких випадках, як пошук зниклих без весті осіб, коли є тільки родичі, пов'язані по материнській лінії. мтДНК може бути отримана з такого матеріалу, як волосся, старі кістки або зуби. ДНК-фінгерпринтинг проводять з використанням генетичних аналізаторів. Найбільший банк даних ДНК в світі – Національна база Великобританії, яка заснована в 1995р. і містить 2700000 проб. У ній зберігається інформація про ДНК не тільки засуджених, а й підозрюваних. За даними британських криміналістів, щотижня розкривається до 2000 злочинів, за якими з місця події вилучався генетичний матеріал. Даний

вид експертизи дозволив значно підвищити розкриваємість таких видів злочинів, як крадіжки зі зломом, пограбування, угони автомашин – всього 90% розкритих справ. З 1998р. обговорюється питання про введення генної паспортизації всього населення.

У США Національна база даних з генетичної інформації створена в 1998р. До 2002р. в ній зберігалось понад 800000 генотипів. Обліку підлягають особи, засуджені за вчинення тяжких та особливо тяжких злочинів.

У базі даних Ісландії містяться генотипи всього населення країни (близько 300000 чоловік).

3.9. Генетичне картування

Під генетичним або геномним картуванням (англ. **gene mapping** або **genome mapping**) розуміють сукупність підходів і методів, за допомогою яких можна кожен ген віднести до певної хромосоми, тобто скласти генетичну або геномну карту організму.

Завдяки застосуванню двох основних методів гібридизації соматичних клітин і гібридизації *in situ*, у людини встановлена хромосомна локалізація ряду генів, відповідальних за деякі захворювання. При гібридизації *in situ* препарат метафазних хромосом на поверхні скляної пластини інкубують з радіоактивно міченим зондом. Точну область гібридизації визначають за допомогою радіоавтографії. Утворення зерен над гістологічно ідентифікованою хромосомою дозволяє зробити висновок про належність даного гена до конкретної хромосоми, а часто і до певної її ділянки.

Завдяки використанню клонованих фрагментів встановлена хромосомна локалізація багатьох генетичних порушень, для яких не вдавалося виявити недостатності по яким-небудь специфічним білкам. До таких захворювань належать: хорея Гентінгтона (хромосома 4), муковісцидоз (хромосома 7), поликістозна нефропатія дорослих (хромосома 16), м'язова дистрофія Дюшена (X-хромосома).

Якщо область ДНК, в якій локалізований дефект, має характерну структуру гена, то можна синтезувати цей ген, ввести у відповідний вектор,

домогтися експресії і вивчати функцію. Крім того, можна синтезувати олігопептиди, послідовність амінокислот в яких визначається відповідно до встановленої відкритої рамки зчитування в кодуєчій області. Антитіла, отримані проти цього пептиду, являють собою інструмент для виявлення експресії даного пептиду (або констатації її відсутності) у здорових і хворих людей. Все це є складовою частиною генної терапії.

Генна терапія (генотерапія) – це сукупність генноінженерних (біотехнологічних) і медичних методів, спрямованих на внесення змін в генетичний апарат соматичних клітин людини з метою лікування певних захворювань. Генна терапія спрямована на виключення дефектних генів або відновлення їх нормальної функції при захворюваннях, на течію яких впливає елімінація або надання відповідних генів/білків, а інші методи лікування є неефективними.

Теоретично генна терапія може бути проведена у відношенні і соматичних, і статевих клітин. При соматичній генній терапії зміни, внесені до генома пацієнта, не передаються потомству. Аналогічні дії на статеві клітини з метою передачі генетичної інформації наступним поколінням нині не застосовують, в т.ч. і з етичних міркувань.

Серед методів модифікації генної функції найчастіше використовують внесення (перенесення) терапевтичного гена. Розробляються методи корекції дефектних генів (при мутаціях, що змінюють невелику ділянку ДНК), заміни дефектних генів нормальними або блокади їх експресії, методи посилення експресії нормальних генів і відновлення експресії блокованих генів. Перспективно і «нарощування» гена, при якому до нього додається частина, що змінює його функцію. Розробляється метод, при якому вектор міститиме ген, що кодує продукцію необхідного білку, а також молекулярну структуру, здатну регулювати експресію гена залежно від прийому всередину спеціального лікарського засобу. Йдуть дослідження специфічних лікарських препаратів на основі нуклеїнових кислот: РНК-ферменти, модифіковані методами генної інженерії олігонуклеотиди, коригувальні генні мутації *in vivo* і т.д.

Існує кілька способів введення нової генетичної інформації в клітини людини. Це дозволяє розробляти прямі методи лікування спадкових хвороб – методи генотерапії. Використовують два основних підходи, що розрізняються природою клітин-мішеней:

- фетальна генотерапія, при якій чужорідну ДНК вводять в зиготу або ембріон на ранній стадії розвитку. При цьому очікується, що введений матеріал потрапить в усі клітини реципієнта (і навіть в статеві клітини, забезпечивши тим самим передачу наступному поколінню);
- соматична генотерапія, при якій генетичний матеріал вводять тільки в соматичні клітини і він не передається статевим клітинам.

Розрізняють непряму або клітинну (*ex vivo*) і пряму (*in vivo*) генну терапію.

При терапії *ex vivo* специфічні типи клітин виділяють з організму і культивують поза ним, потім в них вводять сторонні терапевтичні гени, відбирають трансформовані клітинні клони і вводять їх тій же людині. Цей вид генної терапії використовується для генетичної трансформації ендотеліальних клітин і наступного покриття ними венозних шунтів і внутрішньосудинних стентів.

Генна терапія *in vivo* заснована на прямому введенні терапевтичних генів за допомогою векторних систем в стінку судини, міокард або скелетні м'язи.

Для введення генів в клітини-мішені судин використовують обидва підходи, але значно частіше застосовують пряму методику. Окрім вибору потенційно терапевтичних генів, успіх лікування залежить від характеристик спеціальних генних носіїв (векторних систем – векторів) і від засобів механічної доставки векторів до клітин-мішеней. У ідеалі вектори повинні забезпечувати ефективне і безпечне проникнення і експресію терапевтичних генів в клітинах-мішенях, а засоби механічної доставки векторів до цих клітин – легко і нетравматично поміщати вектор в потрібну ділянку судини, уникаючи попадання генетичного матеріалу в системний кровотік. Обмежена місткість векторів ускладнює доставку великих генів.

Векторні системи бувають вірусними і невірусними. Для клінічного застосування вони повинні мати певні якості, і слід зазначити, що

універсальних векторів не існує. Вибір вектора і методу його доставки визначається конкретним завданням генної терапії (у які клітини вимагається ввести терапевтичний ген, як довго вимагається його експресія і в якій кількості і так далі). Більшість доступних на сьогодні векторів для терапії *in vivo* забезпечують тимчасову експресію перенесених генів в клітині, тому і кращі результати генної терапії отримані при захворюваннях і станах, що не вимагають довічної активності терапевтичних генів (наприклад, при рестенозах просвіту артерій, що розвиваються після балонної ангіопластики, стентування або атеректомії).

Невірусні вектори представлені або плазмідною ДНК, або комплексами ДНК з ліпосомами, аденовірусними білками, трансферином, полілізином і т.д. Плазмідна ДНК не вбудовується в геном хазяїна і забезпечує лише 2-4-тижневу експресію гена. Крім того, трансфекція клітин плазмідної ДНК *in vivo* складає всього 0,1 %, і тому метод використовують при необхідності деякий час секретувати білок, здатний по паракринному механізму діяти на інші клітини. Якщо ж вимагається тривала експресія білку, активного тільки в тій клітині, де він синтезований, використовують модифікації вектора. Так, для підвищення трансфекції клітин судин *in vivo* до 4-5 % застосовують ліпосомальний плазмідний вектор, при цьому позитивний заряд обволікаючої ДНК ліпідних бульбашок сприяє проникненню ДНК через негативно заряджену мембрану клітини-мішені.

Вірусні вектори представлені ослабленими або модифікованими ретровірусами, аденовірусами, аденоасоційованими вірусами, вірусом герпесу 1-го типу, лентивірусами і т.д. Ретровірусні вектори застосовуються тільки для судинної генної терапії *ex vivo*, а невикористання *in vivo* обумовлене їх певними недоліками. Аденовірусні векторні системи в сотні і тисячі разів ефективніші, ніж плазмідні і ретровірусні, але забезпечують лише короточасну експресію введених генів (до 4 тижнів), а повторні введення багаті наслідками розвитком запальних і імунних реакцій, особливо у разі 1-го покоління аденовірусів. Розвиток імунної відповіді на вірусні білки може супроводжуватися елімінацією внесених терапевтичних генів. Лентивіруси (ВІЛ) також здатні до

трансфекції клітин, що не діляться, але вони потенційно небезпечні для людини. Ефективне і перенесення генів за допомогою гемаглютинуючих вірусів, але застосування цього вектора обмежене неспецифічним зв'язуванням вірусів з еритроцитами.

Перспективне використання аденоасоційованих вірусів – непатогенних, здатних до трансфекції клітин, що не діляться, і забезпеченню тривалої експресії введених терапевтичних генів.

В цілому вірусні вектори генної терапії характеризуються високою ефективністю (але низьким тропізмом до судин), можливістю застосування як високих, так і середніх доз вірусів-«переносників», а також варіабельної ядерної спрямованості. Можливо і системне, і локальне застосування вірусних векторів. Найбільш ефективним вважається Ad/lenti, а негативні результати отримані при спробах застосування аденоасоційованого вірусу AAV-2. Ефективність, селективність і ядерна спрямованість невірусних переносників генів істотно нижчі.

Короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами (англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR) представляють собою прямі повтори і унікальні послідовності, що розділяють їх, в ДНК бактерій і архей, які спільно з асоційованими генами (Cas, англ. CRISPR – associated genes) забезпечують захист клітини від сторонніх генетичних елементів (бактеріофагів, плазмід).

CRISPR-касети виявлені в геномах багатьох бактерій і більшості архей. Повтори мають довжину від 24 до 48 п.н. У результаті досліджень механізму дії CRISPR-системи було зроблене припущення, що вона є прокаріотичним аналогом системи РНК-інтерференції еукаріот і забезпечує бактеріям і археям захист від бактеріофагів.

Патогенні і синантропні бактерії містять велику кількість білка Cas9 (англ. CRISPR-associated 9). Було показано, що система CRISPR/Cas9 може брати активну участь в регуляції ендогенних бактерійних генів, зокрема, при взаємодії бактерій з еукаріотичним організмом, в якому вони паразитують. Наприклад, білок Cas9 з *Francisella novicida* використовує унікальну,

CRISPR/Cas-асоційовану малу РНК (англ. Small Cajal body-specific RNA – scaRNA) для пригнічення ендогенного транскрипту мРНК, що кодує бактерійний ліпопротеїн, що дозволяє їй ослабити імунну відповідь хазяїна і підвищити її вірулентність.

Ферменти рестрикції використовуються біологами для «монтажу» ДНК виключно *ex vivo*: треба спочатку виготовити потрібний фрагмент (наприклад, модифікований ген), і вже потім вводити його в клітину або організм.

«Кріспером» можна різати ДНК на місці, прямо в живій клітині – тобто *in vivo*. Це дозволяє не просто виготовляти гени, що штучно вводяться, але і «редагувати» цілі геноми: наприклад, видаляти одні гени і вставляти замість них нові. Як стало зрозуміле, система CRISPR невибаглива і може працювати в будь-якій клітині, не лише бактерійній, але і мишачій або людській. «Встановити» її в потрібну клітину досить просто. Принципово це можна робити навіть на рівні цілих тканин і організмів. У майбутньому це дозволить цілком видаляти з геному дорослої людини дефектні гени – наприклад, що викликають рак.

Але цінність «Кріспера» не обмежується рестриктазною функцією. Як відмічають багато авторів, ця система – перший відомий нам інструмент, за допомогою якого можна організувати «зустріч» певного білку, визначеної РНК і певної ДНК одночасно. Це само по собі відкриває величезні можливості для біології і медицини. Наприклад, у білку Cas9 можна відключити рестриктазну функцію, а замість цього прив'язати до нього інший білок – скажімо, активатор гена. За допомогою відповідного РНК-зонду пару, що вийшла, можна відправляти в потрібну точку геному: наприклад, до погано працюючого гена інсуліну у деяких діабетиків. Організуючи таким чином зустріч активуючого білка і вимкненого гена, можна прицільно і тонко настроювати роботу організму. Прив'язувати можна не лише активатори, а взагалі усе що завгодно – скажімо, білок, здатний замінити дефектний ген на його «резервну копію» з іншої хромосоми. Таким чином в перспективі можна буде вилікувати, наприклад, хворобу Хантингтона. Головне достоїнство системи CRISPR в даному випадку – саме її здатність «відправляти експедиції» до будь-якої точки

ДНК, яку ми можемо запрограмувати без особливих утруднень. У чому полягає завдання кожної конкретної експедиції – визначається тільки фантазією дослідників.

В справжній час розроблені способи високовибірчого активування і інгібування генів, що базуються на системі CRISPR/Cas9 (CRISPR-системі II типу). Основними компонентами CRISPR-системи II типу є CRISPR-касета, на основі якої синтезуються направляючі crРНК (англ. CRISPR RNA – crRNA), нуклеаза Cas9 (Csn1) і tracrРНК (англ. trans-activating crRNA – tracrRNA), необхідна для процесінгу що направляє РНК. Для спрямованого редагування геному еукаріотичних клітин використовують Cas9 *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus* або *Neisseria meningitidis*. Модифікація ДНК-з'язуючого домену Cas9 і його злиття з різними регуляторними доменами дозволяє отримати вибірково направляємі на потрібні ділянки геному за допомогою РНК-зондів штучні чинники транскрипції (crisprTF) і ефектори, штучні ендонуклеази рестрикції, репресори, а також ферменти, модифікуючі епігеном, такі як ДНК-метилази і деметилази. Крім того знайдені аналоги Cas9, які здатні розщепляти замість ДНК молекули РНК, що дозволить редагувати або вибірково пригнічувати активність мікроРНК.

Метод сайт-селективного редагування геному за допомогою ферменту, що впізнає необхідну послідовність ланцюга ДНК «по наведенню» комплементного їй РНК-зонду, обіцяє революційні зміни в молекулярно-генетичних дослідженнях і лікуванні цілого ряду захворювань, від раку і невиліковних вірусних хвороб до спадкових генетичних розладів на зразок серповидноклітинної анемії і синдрому Дауна. Він дозволив здешевити, спростити і прискорити розробку генномодифікованих мікроорганізмів, рослин і худоби, а також допоможе розробці генної терапії спадкових захворювань у людських ембріонів. Прикріпивши до білку Cas9 дефектному по ендонуклеазній активності Зелений флуоресцентний білок EGFP можна отримати інструмент для візуалізації послідовностей геномів в живих клітинах ссавців і візуального визначення довжини теломер хромосоми, а також відстежувати динаміку генних локусів протягом клітинного циклу.

Контрольні питання

1. Що представляє собою фрагментування ДНК?
2. Як працює рестриктаза?
3. У чому полягає молекулярне клонування?
4. Скільки стадій включає клонування фрагмента ДНК? Опишіть ці стадії.
5. Для чого використовують ампліфікацію ДНК?
6. Коли і ким був відкритий метод ПЛР?
7. У чому полягає метод ПЛР?
8. Скільки стадій включає ПЛР? Опишіть ці стадії.
9. На якому обладнанні проводять ПЛР?
10. Які різновиди ПЛР Вам відомі?
11. Що представляє собою ПЛР у реальному часі? У чому її переваги?
12. У чому полягає цифрова ПЛР?
13. Опишіть метод ПЛР зі зворотною транскрипцією.
14. Який метод використовують для сепарації ДНК?
15. На якому обладнанні проводять агарозний гель-електрофорез, а на якому поліакриламідний?
16. Що представляє собою капілярний гель-електрофорез? У чому його переваги?
17. Яке обладнання застосовують для візуалізації результатів проведення гель-електрофорезу?
18. Що представляє собою гібридизація ДНК?
19. Як проводиться Саузерн-блотінг?
20. Які варіанти блот-гібридизації Ви знаєте?
21. Які методи на основі ДНК-маркерів Вам відомі?
22. Опишіть схему проведення ПДРФ-аналізу.
23. Перерахуйте відомі Вам ПЛР-маркери.
24. Що представляє собою секвенування ДНК?
25. Перерахуйте методи секвенування.
26. У чому полягає метод секвенування Максама-Гілберта?
27. Опишіть метод секвенування за Сенгером.

28. Які методи NGS-секвенування Вам відомі?
29. Що таке генотипування?
30. Генотипуванню чого, в справжній час приділяється все більша увага?
31. Опишіть відомі Вам методи SNP-генотипування.
32. Якою компанією і коли була розроблена, запатентована і впроваджена система гібридизації на мікрочіпах?
33. Опишіть методику проведення гібридації на мікрочіпах.
34. Що таке ДНК-фінгерпринтинг?
35. Які методи застосовують для ДНК-профілювання?
36. За допомогою сукупності яких підходів і методів, можна кожен ген віднести до певної хромосоми, тобто скласти генетичну або геномну карту організму.
37. Що представляє собою генна терапія?
38. Які різновиди генотерапії Вам відомі?
39. Як працює система CRISPR?
40. У чому полягає цінність системи CRISPR?

ЗАКЛЮЧЕННЯ

В останні десятиліття змінився сам підхід до вирішення основоположних проблем біології. Один із засновників молекулярної біології, британський біохімік, лауреат Нобелівської премії Джон Кендрю сказав: «Біологи колишніх років в цілому просувалися зверху вниз. Вони починали з цілого організму, потім рознімали його на частини і розглядали окремі органи і тканини. Далі вони вивчали окремі клітини під мікроскопом. Так мало-помалу вони просувалися вниз від складного до простого. Нова біологія починає з іншого кінця і просувається з самого низу вгору. Вона почала з найпростіших компонентів живого організму, стала вивчати окремі молекули і їх взаємодію всередині клітин, нехтуючи всім іншим. Тепер прийшла пора звернутися до цієї решти і рухатися вздовж ієрархії біологічної організації».

За останні чверть століття на цьому шляху були зроблені блискучі, іноді навіть сенсаційні відкриття. Є всі підстави вважати, що низка цих відкриттів ще не закінчилася, як не закінчилася ще революція в біології.

Майбутнє медицини належить молекулярній біології і генетиці. Саме вони стануть основою профілактики і лікування захворювань, у тому числі серцево-судинних і онкологічних. Генна терапія відкриває необмежені можливості лікування таких хвороб. Перевага генетичної діагностики полягає в тому, що вона дає можливість виявити схильність до того чи іншого захворювання задовго до його клінічних проявів, вчасно прийняти профілактичні заходи, запобігти його розвиток або полегшивши його перебіг, та з урахуванням індивідуальних особливостей застосовувати терапію. Генотип людини не змінюється протягом життя і може бути визначений ще в дитячому віці. Він є постійним фактором ризику захворювань, на відміну від таких факторів, як екологічна обстановка, стреси, алкоголь, паління, вживання наркотичних засобів.

Одна із задач молекулярної генетики полягає в тому, щоб забезпечити кожній людині умови, необхідні для повної реалізації його генетичного потенціалу. Розроблені із застосуванням сумарного підходу принципи

молекулярної діагностики спадкової схильності людини до рухової та психічної діяльності можуть бути використані для створення діагностичних комплексів, спрямованих на оцінку генетичного потенціалу в розвитку і прояві фізичних і психічних здібностей та інших ознак, які є значущими в умовах професійної та спортивної діяльності, в підборі найбільш оптимальних їх видів. Саме тому кожна людина повинна мати генетичний паспорт, в якому повинні бути зазначені варіанти генів, необхідних для досягнення високих професійних і спортивних результатів, рівні експресії цих генів у спокої і при фізичному навантаженні, а також гени ризику виникнення і розвитку професійних паталогій.

Але можливості молекулярної генетики не обмежуються тільки професійною орієнтацією і відбором. Окрім геноміки використовують й інші напрямлення молекулярних досліджень.

Поява услід за геномом і протеомом великої кількості нових ОМів – свідоцтво важливої тенденції у світі сучасної біології. Все більше проводиться великомасштабних досліджень, результатом яких стає не опис окремих молекул, а великі масиви складно організованих даних. У зв'язку з цим, в останній час стрімко розвиваються різноманітні нові ОМІКи.

Нутригенетика прагне зрозуміти, як генетичний статус людини координує відповідь організму на їжу і дозволяє визначити оптимальну дієту для конкретної людини на основі його генотипу. Нутригеноміка вивчає вплив компонентів їжі на експресію генів.

Фармакогенетика надає можливість індивідуалізації вибору фармпрепаратів і їх режимів дозування на підставі вивчення генотипу конкретної людини. Фармакогеноміка досліджує вплив генетичної варіації кожної людини в його відповіді на певний лікарський засіб. Фармакогеноміка зв'язує експресію конкретного гена або одонуклеотидного поліморфізму в геномі людини з ефективністю або токсичністю ліків, для того, щоб розробити раціональні засоби оптимізації фармакотерапії. Фармакологічне забезпечення передбачає застосування біологічно активних добавок до їжі – нутрицевтиків і парафармацевтиків.

Визначення епігенетичного статусу людини (епігенетика) дозволяє виявити як активні, так і «сплячі», іншими словами, неактивні (метиловані) гени індивіда, відповідальні за розвиток функцій м'язової, серцево-судинної та інших функціональних систем організму, що важливо для прогнозу професійних і спортивних можливостей організму.

Визначення транскрипційного профілю (активація яких генів і в якій мірі) скелетних м'язів дозволить оцінити, наскільки ефективно відбувається адаптація організму людини до певних фізичних навантажень, а також прогнозувати їх успішність. Даними дослідженнями займається транскриптоміка.

Одним з перспективних маркерів, які можуть бути використані для розробки ранньої діагностики та прогнозування перевтоми, є циркулюючі в крові ДНК.

Для пошуку нових біомаркерів, що вказують на зміни функціонального стану організму людини, використовують постгеномні методи аналізу, серед яких протеомні технології (протеоміка) займають провідні позиції. Одним з підходів контролю організму, що піддається інтенсивним фізичним навантаженням, є оцінка комплексу білків і пептидів, що відповідають за реалізацію тієї чи іншої фізіологічної функції, що знаходяться в кров'яному руслі, в ході фізичного навантаження і в період відновлення, і в порівнянні з профілем людини, що не піддається навантаженням такого рівню.

Визначення метаболомних показників (метаболоміка) дозволяє вирішувати наступні завдання комплексного обстеження: контроль за функціональним станом, який відображає ефективність і раціональність праці і виконуваної індивідуальної тренувальної програми, спостереження за адаптаційними змінами основних енергетичних систем та функціональною перебудовою організму в процесі фізичного навантаження, діагностика предпатологічних і патологічних змін метаболізму. Метаболічний контроль дозволяє також вирішувати такі приватні задачі, як виявлення реакції організму на фізичні навантаження, оцінка рівня тренуваності, адекватності застосування

фармакологічних та інших засобів, що відновлюють, ролі енергетичних метаболічних систем в м'язовій діяльності, впливу кліматичних факторів та ін.

Для прогнозу аеробних можливостей, патологій скелетних м'язів і схильності до довгої трудової і спортивної кар'єри, представляється перспективним використання інформації про довжину теломер і активності теломерази.

СЛОВНИК ТЕРМІНІВ

Адитивна взаємодія генів (полімерія, полігенія) – тип взаємодії генів, при якому ступень розвитку кількісної ознаки визначається впливом декількох неалельних генів, дія яких шумується в ознаці (полімерні гени, або полігени).

Алель – альтернативна форма гена, що визначає його прояв у фенотипі.

Альтернативний сплайсинг – форма сплайсингу, що забезпечує кодування одним геном різних кінцевих продуктів, що визначається специфікою тканини.

Амплікон – поза хромосомна одиниця ампліфікації.

Ампліфікація – збільшення кількості копій ДНК.

Анеуплоїдія – спадкова зміна, при якій число хромосом в клітинах не кратно основному набору.

Антикодон – специфічний триплет нуклеотидів, взаємодіючий комплементарно з кодоном мРНК.

Апуриновий сайт (АП-сайт) – ділянка ДНК, позбавлена а.п.

Аутосома – хромосома, яка гомологічна іншій. Будь-яка нестатева хромосома.

Білки високої рухомості (HMG-білки) – структурні та регуляторні білки, які постійно асоційовані з хроматином.

Біоінформатика – сукупність методів і підходів, що включають в себе: математичні методи комп'ютерного аналізу в порівняльній геноміці (геномна біоінформатика); розробку алгоритмів і програм для передбачення просторової структури білків (структурна біоінформатика); дослідження стратегій, відповідних обчислювальних методологій, а також загальне управління інформаційної складності біологічних систем.

Біосинтез білка – складний багатостадійний процес синтезу поліпептидного ланцюга з амінокислотних залишків, що відбувається на рибосомах клітин живих організмів за участю молекул м- і тРНК.

Відкрита рамка зчитування – інтервал між старт- і стоп-кодонами.

Гамета – зріла статеві клітина.

Гаплогрупа – велика група схожих гаплотипів, які є рядом алелей в певних локусах Y-хромосоми і мтДНК.

Гаплоїд – організм або клітина з одинарним набором генів або хромосом.

Гаплотип (гаплоїдний генотип) – комбінація алелей генів на одній хромосомі.

Ген – сукупність геномних послідовностей, що кодують зчеплений набір потенційно перекриваючихся функціональних продуктів.

Ген-кандидат – ген в геномі людини, мутація в якому імовірно є причиною конкретної спадкової хвороби.

Ген-регулятор – ген, кодуючий регуляторний білок, активуючий або пригнічуючий транскрипцію інших генів.

Ген-модифікатор – ген, що не має власного прояву у фенотипі, але надає послабляючий або підсилюючий вплив на експресію інших генів.

Генетика (грец. γενετικός – той, що породжує, що походить від когось) – наука, що вивчає закономірності спадковості і мінливості.

Генетична інженерія (генна інженерія) – сукупність прийомів, методів і технологій екстракції генів з організму (клітин) і здійснення з ними різноманітних маніпуляцій.

Генетичне картування – сукупність підходів і методів, за допомогою яких можна кожен ген віднести до певної хромосоми, тобто скласти генетичну карту організму.

Генетичний аналіз – сукупність методів дослідження спадкових властивостей організму (його генотипу).

Генетичний (геномний, батьківський) імпринтинг – залежність експресуємості гену від того, яким з батьків він переданий.

Генетичний код – система запису спадкової інформації в послідовності нуклеотидів, при якому кожним трьом нуклеотидам (триплетам) відповідає одна молекула амінокислоти.

Генетичний маркер – ділянка ДНК з відомою локалізацією.

Генетичний паспорт – документ, який містить індивідуальну базу ДНК-даних, що відображають унікальні генетичні особливості кожної окремої

людини, його схильність до розвитку і прояву фізичних і психічних здібностей, а також спадкових та мультифакторіальних захворювань.

Генний допінг – нетерапевтичне застосування генів, генетичних елементів або модуляторів генної експресії, що мають здатність підвищувати спортивні результати.

Генна терапія (генотерапія) – сукупність генноінженерних (біотехнологічних) і медичних методів, спрямованих на внесення змін в генетичний апарат соматичних клітин людини з метою лікування певних захворювань.

Генні хвороби – велика група захворювань, що виникають в результаті пошкодження ДНК на рівні гена.

Геном – повна генетична система клітини, яка визначає характер онтогенетичного розвитку організму і спадкову передачу в ряді поколінь усіх його структурних і функціональних ознак.

Геноміка – наука, основним предметом вивчення якої є гени і геном живих організмів.

Генотип (грец. *genos* – рід, народження, походження + *typos* – відбиток, зразок, тип) – сукупність генів даного організму.

Генотипування – аналіз персональної генетичної структури людини.

Гетерозигота – клітина (або організм), який містить два різних алеля в конкретному локусі гомологічних хромосом.

Гетерозиготність – наявність різних алелей в диплоїдній клітині.

Гетерохроматин (конденсований хроматин) – щільно упакований хроматин.

Гібридизація – з'єднання *in vitro* комплементарних одноланцюгових нуклеїнових кислот в одну молекулу.

Гістони – білки з молекулярною масою 11-21 кД., що містять багато залишків амінокислот аргініну і лізину.

Гомодимери – сайт-специфічні білки.

Гомозигота – клітина (або організм), який містить два однакових алеля в конкретному локусі гомологічних хромосом.

Гомозиготність – наявність однакових алелей в диплоїдній клітині.

Гомологічні хромосоми – хромосоми, однакові за набором складаючих їх генів.

Дезоксирибонуклеотид – нуклеотид, в якому є пентози представлені дезоксирибозою.

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) – нуклеїнова кислота, побудована з дезоксирибонуклеотидів.

Делеція – втрата ділянки хромосоми.

Диплоїд – організм або клітина з подвійним (диплоїдним) набором хромосом.

Диспермія – запліднення двома сперматозоїдами.

Діапазоном реакції – різниця між значеннями певного генотипу, що знаходиться в збідненому або збагаченому середовищі.

ДНК-дуплекс – молекула ДНК, яка має форму спіралі, що утворена двома полінуклеотидними ланцюгами, закрученими відносно один одного і навколо загальної осі.

Домен білка – елемент третинної структури білка, що представляє собою досить стабільну і незалежну підструктуру білка, чий фолдінг проходить незалежно від решти частин.

Дуплікація – подвоєння ділянки хромосоми, що містить гени.

Екзон – кодуюча послідовність нуклеотидів.

Екзонуклеаза – білок з групи нуклеаз, який відщеплює кінцевий мононуклеотид від полинуклеотидного ланцюга шляхом гідролізу фосфодієфірних зв'язків між нуклеотидами.

Експресія – процес, в ході якого спадкова інформація від гена перетворюється на функціональний продукт – РНК або білок.

Елементи відповіді (cis-елементи) – регуляторні послідовності ДНК, загальні для групи генів.

Елонгація – друга стадія реплікації, транскрипції і трансляції.

Ендонуклеаза – білок з групи нуклеаз, що розщеплює фосфодієфірні зв'язки в середині полинуклеотидного ланцюга.

Енхансер – ділянка ДНК, яка посилює процес транскрипції з найближчого до неї промотору.

Епігенетика – (грец. *επί* – над, вище, зовнішній) – галузь генетичної науки, яка вивчає закономірностей епігенетичного успадкування – зміни експресії генів або фенотипу клітини, викликаних механізмами, не порушують послідовності ДНК.

Епістаз – явище пригнічування дії одного гену іншим, неалельним йому геном.

Еухроматин (інтерхроматин) – нещільно упакований хроматин.

Здвиг рамки – мутація, в результаті якої вставляється або видаляється один нуклеотид і змінюється рамка зчитування.

Зигота – клітина, що утворюється в результаті злиття чоловічої та жіночої гамет при заплідненні.

Зчеплення генів – явище спільного (зчепленого) успадкування генів, які розташовані на одній хромосомі.

Зчеплення зі статтю – локалізація гена на одній зі статевих хромосом.

Ідіограма – візуальне подання повного хромосомного набору.

Інверсія – поворот окремої ділянки хромосоми на 180°.

Ініціація – перша стадія реплікації, транскрипції і трансляції.

Інсерція – вставка фрагментів ДНК.

Інсулятор – регуляторний елемент, які блокує взаємодію між енхансером і промотором, якщо знаходиться між ними.

Інтрон – некодуюча послідовність нуклеотидів, ділянка ДНК, яка розташована між екзонами.

Каріограма – візуальне подання повного каріотипу.

Каріотип – сукупність ознак (кількість, розміри, форма і т.д.) повного набору хромосом, притаманна клітинам даного біологічного виду (видовий каріотип), даного організму (індивідуальний каріотип) або лінії (клону) клітин.

Каріотипування – процес вивчення будови і кількості хромосом, і графічний запис результатів (визначення каріотипу).

Кеп – модифікований нуклеотид 7-метилгуанозин-5'-трифосфат присутній на 5'-кінці мРНК.

Кінезіогенетика – галузь генетичної науки, яка вивчає гени відповідальні за розвиток і прояв фізичних здібностей людини.

Кінезіоеноміка – розділ геноміки, який вивчає вплив фізичного навантаження на експресію генів.

Кросинговер (перехрест) – процес обміну ділянками гомологічних хромосом під час кон'югації.

Кластер – група повторів одного і того ж або споріднених генів, розташованих поруч на хромосомі, що входять до складу мультигенного сімейства.

Кодони (кодуєчі тринуклеотиди) – трійки нуклеотидів (триплети), що кодуєчі включення однієї амінокислоти.

Комплементарність – суворя відповідність з'єднання а.п., що з'єднані водневими зв'язками, в якому: аденін з'єднується з тиміном, а гуанін – з цитозином.

Контрольний регіон (петля зсуву, або D-петля) – найбільш мінлива область мітохондріального геному.

Кон'югація – процес злиття гомологічних хромосом в профазі першого поділу мейозу.

Ліганд – молекула, що впізнається специфічною структурою, наприклад клітинним рецептором.

Лінкерна ДНК – ДНК, що зв'язує нуклеосомні частинки.

Локус – положення певного гена в хромосомі.

Мейоз (редукційний поділ клітини) – поділ ядра еукаріотичної клітини із зменшенням числа хромосом в два рази. Відбувається в два етапи – редукційний і екваційний етапи мейозу.

Метаболом – сукупність всіх метаболітів, які є кінцевим продуктом метаболізму в клітині, тканині, органі або організмі.

Метаболоміка – наука, що займається вивченням усіх метаболічних реакцій, які властиві даному виду організмів і відбуваються в нормальному

стані, під контролем навколишнього середовища або генетичних модифікацій, а також при різного роду патологіях.

Мітоз (грец. *mitos* – нитка) (каріокінез) – непрямий поділ клітини. Найбільш поширений спосіб репродукції еукаріотичних клітин.

Молекулярна біологія – комплекс біологічних наук, які вивчають механізми зберігання, передачі та реалізації генетичної (спадкової) інформації, будову, властивості і функції нерегулярних біополімерів – білків і нуклеїнових кислот, а також молекулярних комплексів (молекулярних машин) на їх основі.

Молекулярна генетика – галузь генетичної науки, яка вивчає структури, що зберігають та формують генетичну інформацію (гени та інші структури, котрі беруть участь у генетичних процесах на субклітинному й молекулярному рівнях) та їх функціональні властивості. У центрі цієї науки лежить концепція генетичного коду, який первинно зумовлює такі ознаки живої матерії, як спадковість і мінливість.

Молекулярно-генетичний маркер (ДНК-маркер) – певний алель гена (або генотип, різноманітні комбінації алелей і генотипів), асоційований з розвитком і проявом певних фізичних якостей (рухових здатностей), антропометричними, композиційними, фізіологічними, біохімічними, психологічними та іншими показниками.

Моногенні захворювання – див. **Спадкові захворювання**.

Моносомія – наявність всього однієї з пари гомологічних хромосом.

Мультифакторіальні захворювання (МФЗ) або хвороби зі спадковою схильністю – захворювання, які для свого прояву потребують дії факторів зовнішнього середовища, чим відрізняються від генних хвороб. МФЗ також носять назву **полігенних захворювань** (див. спадкові захворювання).

Мутація – зміни в послідовності ДНК.

Нонсенс-кодон (безглуздий кодон) – кодон, що не здійснює шифрування амінокислоти.

Нонсенс мутація – мутація при якій утворюються передчасні термінуючі кодони.

Нуклеосома – комплекс гістонових білків з ДНК.

Нуклеотид – мономер нуклеїнових кислот, який складається з а.п., вуглеводного компоненту та залишку фосфорної кислоти.

Нуклеофіламент (нуклеосомна нитка) – послідовність нуклеосом, з'єднаних білком H1.

Нутригенетика (лат. nutritio – харчування + генетика) – галузь генетичної науки, яка вивчає гени відповідальні за метаболізм та засвоюваність їжі.

Нутригеноміка (лат. nutritio – харчування + геноміка) – розділ геноміки, який вивчає вплив харчування на експресію генів.

Оогенез або овогенез (ст. грец. ὄβον – яйце + γένεσις – виникнення) – розвиток жіночої статеві клітини (яйцеклітини, яйця).

Однонуклеотидний поліморфізм (сніп) – відмінності послідовності ДНК розміром в один нуклеотид.

Октомер (нуклеосомний кор) – білковий комплекс гістонів H2A, H2B, H3 та H4.

Олігонуклеотид – ланцюг, який складається з кількох (від 2 до 40 і більше) нуклеотидних залишків.

Пентасомія – наявність 5 гомологічних хромосом замість 2-х.

Первинний транскрипт – суворо комплементарна матриці нуклеїнова кислота (пре-мРНК).

Персональна геноміка – розділом геноміки, пов'язаний з секвенуванням і аналізом генома людини. Після розшифровки генотипу його можна проаналізувати за допомогою опублікованої літератури для визначення рівню схильності до розвитку і прояву певних фізичних та психічних здібностей людини, а також ймовірності ризику виникнення і розвитку спадкових і мультифакторіальних захворювань.

Піримідини – піримідинові а.п.

Плейотропія – багато чисельна дія гена, його здатність впливати на декілька ознак.

Полігенні захворювання – див. **Спадкові захворювання**.

Полімераза – фермент, який веде матричний синтез нуклеїнових кислот.

Поліморф – білковий продукт, який утворюється під час експресії поліморфних варіантів генів.

Поліморфізм (алелеморфізм) – існування в популяції двох і більшого числа алелей одного гену.

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) – стійка успадкована зміна у розподілі довжини рестрикційних фрагментів.

Поліпептид – полімер, що складається з амінокислотних залишків, зв'язаних пептидними зв'язками.

Предиктивна медицина – медицина, яка використовує інформацію, що надається персональною геномікою при виборі медичних процедур (наприклад, вибір найбільш відповідного лікарського препарату) необхідних для конкретної людини.

Прецизійна медицина – медицина, яка заснована на новій систематиці людських хвороб, що базується на молекулярній біології.

Промотор – ділянка гена, до якої приєднується РНК-полімераза для початку процесу транскрипції. Промотор розташований на початку гена – 5'-кінці.

Протеом – сукупність всіх білків, клітин, тканин, організму або популяції, що експресуються за певними, чітко визначеними умовами.

Протеоміка – наука, основним предметом вивчення якої є білки і їх взаємодії в живих організмах.

Процесінг – сукупність процесів, які призводять до перетворення пре-мРНК в зрілу мРНК.

Психогенетика (грец. psyche – душа і genesis – походження) – наука про спадковість і мінливість психічних і психофізіологічних властивостей, що виникла на стиці психології і генетики. Психогенетика вивчає гени відповідальні за розвиток і прояв психічних здібностей людини. У західній літературі частіше застосовується термін «генетика поведінки» (англ. behavioral genetics).

Психогеноміка – розділ геноміки, який вивчає вплив психічного фенотипу на експресію генів.

Пурини – пуринові а.п.

Рамка зчитування – нуклеотидна послідовність, яка починається з ініціюючого кодону, поділяє наступні нуклеотиди на триплети, які кодують амінокислоти, і завершується термінуючим кодоном.

Рекомбінація – перерозподіл генетичного матеріалу (ДНК), що приводить до виникнення нових комбінацій генів.

Репарація – процес, що дозволяє живим організмам відновлювати пошкодження в ДНК.

Реплікація (редуплікація) – процес подвоєння хромосом. Реплікація представляє собою синтез ДНК.

Реплікони – одиниця реплікації, послідовність ДНК, обмежена двома орижинами реплікації.

Репресія – пригнічення активності генів, частіше всього блокуванням їх транскрипції.

Репресор – білок або антисенсова РНК, що пригнічує активність генів.

Рестриктаза (рестрикційна ендонуклеаза) – фермент, який впізнає специфічні нуклеотидні послідовності довжиною від 4 до 10 п.н. і «розрізає» молекулу ДНК в цьому місці.

Рецесивна ознака – ознака, що не проявляється в гетерозиготних особин внаслідок придушення прояви рецесивного алеля.

Рецесивність – неучасть алеля в формуванні ознаки у гетерозиготній клітині.

Рецесивний алель – алель, що фенотипічно проявляється тільки в гомозиготному стані і який маскується в присутності домінантного алеля.

Рибонуклеотид – нуклеотид, в якому є пентози представлені рибозою.

Рибонуклеїнова кислота (РНК) – нуклеїнова кислота, побудована з рибонуклеотидів.

Рибосома – комплекс рРНК з білками.

РНК-праймер (РНК-затравка) – короткий фрагмент нуклеїнової кислоти, який служить стартовою точкою при реплікації ДНК.

Сайленсінг – процес пригнічення експресії певного гену або групи генів.

Сайленсер – ділянка ДНК, яка пригнічує процес транскрипції з найближчого до неї промотору.

Сайт – ділянка молекули ДНК, білка і т.п.

Сайт ініціації реплікації (оріджин реплікації) – точка початку реплікації.

Сайт рестрикції – певна специфічна послідовність з 4-6, рідше 8-12 нуклеотидів в дволанцюговій молекулі ДНК, яка впізнається рестриктазою.

Сайт термінації (термінуюча ділянка) – ділянка, де завершується транскрипція.

Сателітна ДНК – клас високоповторюючих послідовностей.

Секвенування (англ. sequence – послідовність) – визначення первинної амінокислотної або нуклеотидної послідовності білків і нуклеїнових кислот.

Синонімічні (сене) мутації – мутації, які не призводять до заміщення амінокислот в силу вираженості генетичного коду.

Спадкові захворювання – захворювання, виникнення і розвиток яких пов'язаний з дефектами в спадковому апараті клітин, переданими у спадок через гамети. Розрізняють **моногенні захворювання**, при яких спадкова схильність обумовлена одним патологічно зміненим геном, і **полігенні**, які визначаються багатьма генами, які в нормальному стані, але при певній взаємодії між собою і з чинниками середовища створюють схильність до появи захворювання. Полігенні захворювання, також носять назву **мультифакторіальних захворювань (МФЗ)** (див. мультифакторіальні захворювання (МФЗ)).

Сплайсинг – процес вирізання певних нуклеотидних послідовностей з молекул РНК і з'єднання послідовностей, що зберігаються в «зрілій» молекулі, в ході процесингу РНК.

Спейсер – протяжний проміжок, який відокремлює гени один від одного.

Стоп-кодон (термінуючий кодон) – кодон, який сигналізує про завершення трансляції.

Структури Холідея – структури ДНК, що утворюються при рекомбінації.

Структурний ген – будь-який ген, що кодує який-небудь поліпептидний ланцюг або молекулу РНК.

Супергени – дуже великі кластери із сотень функціонально і структурно родинних генів.

Супутник (сателіт) – ділянка відокремлена від тіла хромосоми вторинною перетяжкою.

Термінатор – ділянка ДНК, яка термінує процес транскрипції. Термінатор розташований на 3'-кінці гену.

Термінація – третя стадія реплікації, транскрипції і трансляції.

Тетрасомія – наявність 4 гомологічних хромосом замість пари в диплоїдному набірі.

Транскрипція – процес синтезу РНК з використанням ДНК в якості матриці.

Транскрипт – продукт транскрипції, РНК, яка синтезована на даній ділянці ДНК як на матриці і комплементарна одній з її нитей.

Транскриптом – сукупність експресуючихся нуклеотидних послідовностей генома.

Транскриптоміка – наука, що займається вивченням транскриптома різних видів організмів.

Транскриптон – одиниця транскрипції, ділянка ДНК, обмежена промотором і сайтом термінації.

Транслокація – обмін ділянками хромосом, при якому відбувається переміщення генетичного матеріалу без його втрати, або з втратою.

Трансляція – здійснюємий рибосомою синтез білка з амінокислот на матриці мРНК.

Транспозиція – перенесення ділянки хромосоми на інше місце на одній хромосомі.

Транспозон – ділянка, що переміщується в результаті транспозиції.

Трисомія – наявність трьох гомологічних хромосом замість пари в нормі.

Триплоїдія – наявність повного додаткового комплекту хромосом.

Фармакогенетика (грец. *φάρμακον* – ліки + *γενετική*) – галузь генетичної науки, що вивчає характер реакцій організму на лікарські засоби в залежності від спадкових факторів.

Фармакогеноміка – розділ геноміки, який досліджує вплив генетичної варіації кожної людини в його відповіді на певний лікарський засіб.

Фолдінг білка – процес спонтанного згортання поліпептидного ланцюга в унікальну нативну просторову структуру – третинну структуру.

Хроматида – дезоксирибонуклеопротейд, який є складовою частиною хромосоми. Хромосома складається з двох сестринських хроматид.

Хроматин – дезоксирибонуклеопротейд, що виявляється під світловим мікроскопом у вигляді тонких ниток і гранул.

Хромосома (грец. *χρῶμα* – колір і *σῶμα* – тіло) – нуклеопротейдна структура в ядрі еукаріотичної клітини.

Хромосомні аберації (хромосомні мутації) – внутрішньо- і міжхромосомні структурні перебудови, що супроводжуються порушенням порядку фрагментів хромосом.

Хромосомні хвороби – спадкові захворювання, зумовлені зміною числа або структури хромосом. До хромосомних відносяться хвороби, обумовлені геномними мутаціями або структурними змінами окремих хромосом.

Центромера – особливим чином організована ділянка хромосоми, спільна для обох сестринських хроматид.

Ex vivo (лат. «з життя»), тобто «те, що відбувається поза організмом» – проведення експериментів у живій тканині, перенесеної з організму в штучну зовнішню середу. Найбільш поширена техніка *ex vivo* використовує живі клітини або тканини, витягнуті з живого організму і вирощені (збережені) в стерильних лабораторних умовах протягом декількох днів або тижнів. Такі клітини служать зразками поведінки організму в цілому, як наслідок – скорочується потреба в експериментах над тваринами і людиною. Експерименти *ex vivo*, як правило, проводяться *in vitro*, однак два ці терміни не є синонімами.

In silico – комп'ютерне моделювання (симуляція) біологічного експерименту. Фраза була створена за аналогією з фразами *in vivo* (в живому організмі) і *in vitro* (у пробірці), які часто використовуються в біології, і сама не є латинською. Термін з написання близький до латинського виразу «*in silicio*» – «в кремнії», оскільки кремній як напівпровідниковий матеріал відіграє важливу роль у виробництві комп'ютерного обладнання.

In situ (лат. «на місці») – розгляд явища саме в місці, де воно відбувається, тобто без переміщення в спеціальну середу.

In vitro (лат. «в склі») – технологія виконання експериментів, коли досліди проводяться «у пробірці» – поза живого організму. У загальному значенні цей термін протиставляється терміну *in vivo* – експеримент на живому організмі (на тваринній моделі або людині). Багато експериментів, що мають відношення до біохімії, молекулярної біології, генетики, фармакології, медицини, та ін., проводяться поза організмом, на культурі живих клітин або в безклітинній моделі. Експерименти *in vitro*, в тих випадках, коли альтернативою є дослідження на тваринах або людині, вважаються менш достовірними, ніж *in vivo* і часто бувають лише необхідною попередньою стадією для оцінки можливості і необхідності подальших досліджень *in vivo*. Однак вони часто здешевлюють попередні стадії дослідження і дозволяють зберегти життя піддослідних тварин.

In vivo (лат. «в (на) живому»), тобто «всередині живого організму» або «всередині клітини» – проведення експериментів на (або всередині) живій тканині при живому організмі. Таке використання терміну виключає використання частини живого організму (так, як це робиться при тестах *in vitro*) або використання мертвого організму. Тестування на тваринах і клінічні випробування є формами дослідження *in vivo*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ахметов И.И. Использование ДНК-технологий для определения предрасположенности к оптимальной двигательной деятельности / И.И. Ахметов // Медицина труда и промышленная экология. 2009. – № 6. – С. 28–32.
2. Ахметов И.И. Молекулярная генетика спорта / И.И. Ахметов. – М: Советский спорт, 2009.
3. Баранов В.С. Генетический паспорт / В.С. Баранов. – СПб: Н-Л, 2009.
4. Гоженко А.І. Оксид азоту та імунна система організму / А.І. Гоженко, І.В. Ніколаєвська, С.Г. Котюжинська, В.П. Бабій // Медична хімія, 2001. – Т.3, – № 3. – С. 5-9.
5. Гоженко А.И. Цикл оксида азота и деятельность центральной нервной системы / А.И. Гоженко, Б.А. Насибуллин // Патология. – 2005. – Т. 2, № 3. – С. 15-19.
6. Гоженко А.И. Роль оксида азота в физиологии и патологии системы гемостаза / С.Г. Котюжинская, В.П. Реутов. – Одесса, 2005.
7. Гоженко А.И. Роль оксида азота в физиологии и патологии человека / А.И. Гоженко, Е.А. Гоженко, В.В. Бабиенко, А.М. Зацерклянный // Людина та навколишнє середовище – проблеми безперервної екологічної освіти в ВУЗах: XIII міжвузівська наук.-практ. конф.-ція: Зб. наук. праць (16-18 вересня 2009 р., м. Одеса). – Одеса, Видавництво ОДАХ, 2009. – С. 3.
8. Казанцева А.В. Роль генетических факторов в формировании свойств личности и темперамента / А.В. Казанцева, Д.А. Гайсина, С.Б. Малых, Э.К. Хуснутдинова // Медицинская генетика. – 2008. – №3. – С. 3-13.
9. Козирев А.В. Роль генів *ACE*, *ACTN3* та *ADRB2* у схильності до занять академічним веслуванням / А.В. Козирев, О.І. Цебржинський // X Міжнародні новорічні біологічні читання. – Миколаїв. – 2010. – №10. – С.200-203.
10. Козырев А.В. Гены семейства ядерных рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом и предрасположенность к занятиям

- академической греблей / А.В. Козырев, И.И. Ахметов, О.И. Цебржинский // Ученые записки университета имени П.Ф. Лесгафта. – СПб.– 2010. – 1(71). – С. 54-58.
11. Козырев А.В. Гени *EPAS*, *HIF1A* та *MB* у схильності до занять академічним веслуванням / А.В. Козырев // Спортивна наука України. – Львів. – 2011. – №1. – С. 101-106.
12. Козырев А.В. Роль генів *NOS*, *UCP2* и *UCP3* в предрасположенности к занятиям академической греблей / А.В. Козырев // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. – Казань. – 2011. №1 (18). – С. 1-6.
13. Козырев А.В. Застосування молекулярно-генетичного аналізу генів *ACE*, *ACTN3*, *ADRB2*, *AMPD1*, *CNB*, *COL1A1*, *EPAS1* та *HIF1A* при проведенні спортивного відбору до академічного веслування / А.В. Козырев // Психолого-педагогические и медико-биологические вопросы организации занятий в физическом воспитании и спорте. – Одеса. – 2011. – С. 293-297.
14. Козырев А.В. Роль генів *AMPD1*, *CNB* та *COL1A1* у схильності до занять академічним веслуванням / А.В. Козырев // 3. Педагогика, психология и медико-биологические проблемы физического воспитания и спорта. – Харьков. – 2011. – С. 77-79.
15. Козырев А.В. Використання молекулярно-генетичного аналізу генів *NOS*, *PPARA*, *PPARD*, *PPARG*, *PPARGC1A*, *UCP2* і *UCP3* при проведенні спортивного відбору до академічного веслування / А.В. Козырев, О.І. Цебржинський // Сучасні проблеми фізики, хімії та біології – «ФізХімБіо – 2012». – Севастополь. – 2012. – С. 211-212.
16. Козырев А.В. Применение молекулярно-генетической диагностики в спортивном отборе в академическую греблю / А.В. Козырев, О.И. Цебржинский // Международная научно-практическая конференция «Теоретические и практические научные инновации». – Польша, Краков. – 2013. – С. 17-19.
17. Козырев А.В. ALU I/D полиморфизм гена ангиотензин-1 конвертирующего фермента – *ACE* как критерий спортивного отбора в академическую греблю /

- А.В. Козырев, О.И. Цебржинский // VIII Международная научно-практическая конференция «Перспективные научные исследования– 2013». – Болгария, София. – 2013. – С. 65-66.
18. Козирев А.В. Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізмів генів схильності до прояву і розвитку фізичних здібностей у спортсменів, що спеціалізуються в академічному веслуванні / А.В. Козирев, О.І. Цебржинський // Вісник проблем біології і медицини – Полтава. – 2014. – Вип. 2. – Т. 3 (109). – С. 310-313.
19. Козирев А.В. Застосування іноваційних методів молекулярної діагностики в спорті / А.В. Козирев // Науково-практична конференція «Методи і технології фізичної та медико-психологічної реабілітації людини». – Миколаїв. – 2014. – С. 14-16.
20. Козирев А.В. Молекулярно-генетичні маркери схильності до розвитку і прояву фізичних здібностей людини / А.В. Козирев, А.І. Гоженко, В. Жуков // Journal of Health Sciences. – Radom. – 2014. – Vol. 2. – № 11. – P. 203-211.
21. Козирев А.В., Гоженко А.І., Сикора К., Жуков В. Роль полиморфизма A1470T гена *MCT1* в развитии выносливости и скорости у спортсменов / А.В. Козирев, А.І. Гоженко, К. Сикора, В. Жуков // Journal of Education, Health and Sport. – Bydgoszcz. – 2016. – Vol. 6. – № 10. – P. 253-262.
22. Меньшиков В.В. Клинико-лабораторные аналитические технологии и оборудование / В.В. Меньшиков. – М.: АCADEMIA, 2007.
23. Моган Р. Биохимия мышечной деятельности и физической тренировки / Р. Моган, М. Глессон, П. Гринхафф. – К: Олимпийская литература, 2001.
24. Патрушев Л.И. Экспрессия генов / Л.И. Патрушев. – М: Наука, 2000.
25. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы / Л.И. Патрушев. – М: Наука, 2004.
26. Рогозкин В.А. Генетические маркеры физической работоспособности человека / В.А. Рогозкин, И.Б. Назаров, В.И. Казаков // Теория и практика физической культуры. 2000. – №12. – С. 34–36.

27. Рогозкин В.А. Мышечная деятельность и полиморфизм генов / В.А. Рогозкин, И.В. Астратенкова // Медико-биологические технологии повышения работоспособности в условиях напряжённых физических нагрузок. Сб. ст. под ред. А.И. Григорьева. 2004. Вып. 1. – С. 57–65.
28. Северин Е.С. Биохимия / Е.С. Северин. – М: Гэотар-мед, 2004.
29. Сингер М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. – М: Мир, 1998., Т. 1-2.
30. Сычев Д.А. Фармакогенетическое тестирование / Д.А. Сычев. – М., 2011.
31. Цебржинский О.И. Изменение содержания минорных оснований ДНК при воспалении слюнной железы и коррекции антиоксидантами / О.И. Цебржинский, О.В. Шевченко // Стоматология. – 1999. – Т. 78, №6. – С. 31-33.
32. Цебржинский О.И. Роль изменений антиоксидантного статуса организма и окислительных повреждений ДНК в жизненном цикле клеток / О.И. Цебржинский // Научный вестник Тюменского ГУ. – 1999. – №4. – С.35-38.
33. Цебржинський О.І. Модифікація основ ДНК печінки при різних джерелах активних форм кисню в печінці при експериментальних інтоксикаціях / О.І. Цебржинський // Медична хімія. – 2000. – Т. 2. – № 3. – С. 33-36.
34. Цебржинський О.І. Біохімія опорно-рухового апарату та біохімія спорту (вибрані лекції) / О.І. Цебржинський. – Полтава: АСМІ, 2005.
35. Цебржинский О.И. Теоретическая биология и философия / О.И. Цебржинский. – Полтава–Николаев: Полімет, 2008.
36. Цебржинський О.І. Психогенетика / О.І. Цебржинський. – Полтава–Миколаїв: Полімет, 2008.
37. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2004.
38. Alberts B. Essential cell biology / B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. – NY: Garland Science, 2014.
39. Alberts B. Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. – NY: Garland Science, 2015.
40. Allison L.A. Fundamental molecular biology / L.A. Allison. – Malden: Blackwell Publishing, 2011.

41. Andersen J.L. Muscle, genes and athletic performance / J.L. Andersen, P.Schjerling, B. Saltin // *Scientific American*, 2000. – V. 283(3). – P. 48–55.
42. Arango V. Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior / V. Arango. Y.Y. Huang, M.D. Underwood // *J Psychiatr Res*, 2003. – V. 37 (5). – P. 375-386.
43. Armstrong L. *Epigenetics* / L. Armstrong. – NY: Garland Science, 2014.
44. Auerbach J. Dopamine D4 receptor (D4DR) and serotonin transporter promoter (5-HTTLPR) polymorphisms in the determination of temperament in 2-month-old infants / J. Auerbach, V. Geller, S. Lezer // *Mol Psychiatry*, 1999. – V. 4 (4). – P. 369-373.
45. Barh D. *OMICS* / D. Barh, V. Zambare, V. Azevedo – NY: CRC Press, 2013.
46. Bloomfield V.A. *Nucleic acids* / V.A. Bloomfield, D.M. Crothers, I. Tinoco. – Mill Valley: University science books, 2000.
47. Bouchard C. Muscle genetic variants and relationship with performance and trainability / C. Bouchard, M. Chagnon, M.C. Thibault, M.R. Boulay, M. Maccotte, C. Cote, J- A. Simoneau // *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 1989. – V. 21(1). – P.71–78.
48. Bouchard C. *Genetics of Fitness and Physical Performance* / C. Bouchard, R.M. Malina, L. Perusse. – Champaign: Human Kinetics, 1997.
49. Bouchard C. Individual differences in the response to regular physical activity/ C. Bouchard, T. Rankinen // *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2001. – V. 33. – P.446–451.
50. Bouchard C. *Genetic Differences, Fitness and Performance* / C. Bouchard, T. Rankinen, L. Perusse, F. Booth, S. Britton, // *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2002. – V. 34(5). – P. 46–48.
51. Bouchard C. *Genetic and molecular aspects of sport performance* / C. Bouchard, E.P. Hoffman. – N.Y: Wiley-Blackwell, 2011.
52. Brooker R.J. *Genetics* / R.J. Brooker. – NY: McGraw-Hill, 2012.
53. Brown T.A. *Genomes* / T.A. Brown. – Chichester: Wiley-Blackwell, 2010.
54. Brown T.A. *Gene cloning & DNA analysis* / T.A. Brown. – Abingdon: BIOS scientific, 2010.

55. Buckingham L. Molecular diagnostics / L. Buckingham, M.L. Flaws. – Philadelphia: F.A. Davis Company, 2011.
56. Carlsson S. Genetic Effects on Physical Activity: Results from the Swedish Twin Registry / S. Carlsson, T. Andersson, P Lichtenstein, K. Michaelson, A. Ahlbom // *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2006. – V. 38(8). – P. 1396–1401.
57. Chen J. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain / J. Chen, B.K. Lipska, N. Halim // *Am J Hum Genet*, 2004. – V. 75(5). – P. 807-821.
58. Collins M. Genetics and sports / M. Collins, J. Borms, M. Hebbelinck, A.P. Hills, T. Noakes. – Basel: Karger, 2009.
59. Craig N. Molecular Biology: Principles of Genome Function / N. Craig, R. Green, C. Greider, G. Storz. – Oxford: Oxford University Press, 2014
60. Dale J.W. From genes to genomes / J.W. Dale, M.V. Schantz, N. Plant. – Chichester: John Wiley & Sons, 2012.
61. Devaney J.M. Discovery of Snps in Genes Involved in Muscle Function: Comparison of Sequencing To Snp Databases / J.M. Devaney, B.T. Harmon, E.P. Hoffman // *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2003. – V. 35(5), – P. 56–57.
62. Devaney J.M. Novel Genetic Variation in Muscle Genes Correlated with Muscle Strength, Size and Response to Resistance Training (FAMuSS) / J.M. Devaney, B. Harmon, P. Thompson, N. Moyna, R. Seip, T. Price, P. Clarkson, T. Angelopoulos, H. Gordish, E.P. Hoffman // *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2004. – V. 36(5). – P. 260–262.
63. Dickenson J. Molecular pharmacology / J. Dickenson. – Oxford: John Wiley & Sons, 2014.
64. Ferguson L.R. Nutrigenomics and nutrigenetics in functional foods and personalized nutrition / L.R. Ferguson. – NY: CRC Press, 2014.
65. Garrett R.H. Biochemistry / R.H. Garrett, C.M. Grisham. – Belmont: BROOKS COLE CENGAGE Learning, 2013. – 1280 p.

66. Glick B.R. Molecular biotechnology / B.R. Glick, J.J. Pasternak, C.L. Patten. – Herndon: ASM Press, 2010.
67. Hamilton M.T. Defining the Physical Inactivity Genome. Inactivity Genome / M.T. Hamilton, T. Zderic, L. Bey, N. Akunuri // Medicine & Science in Sports & Exercise, 2004. – V. 36(5). – P. 270–272.
68. Harmon B.T. Association Between Polymorphic Variation in the Carp Gene and Muscle Size and Strength / B.T. Harmon, J.M. Devaney, E.P. Hoffman // Medicine & Science in Sports & Exercise, 2003. – V. 35(5). – P. 56–57.
69. Hartwell L.H. Genetics / L.H. Hartwell, M.L. Goldberg, J. Fisher, L. Hood. – NY: McGraw-Hill, 2014.
70. Hitner H. Pharmacology / H. Hitner. – NY: McGraw-Hill, 2012.
71. Hoppeler H. Gene Expression in Working Skeletal Muscle / H. Hoppeler, S. Klossner, M. Fluck // Adv. Exp. Med. Biol, 2007. – V. 618. – P. 245–254.
72. Khan F.A. Biotechnology in medical sciences / F.A. Khan. – NY: CRC Press, 2014.
73. Klug W.S. Concepts of Genetics / W.S. Klug, M.R. Cummings, C.A. Spencer // – SF: Benjamin Cummings, 2014.
74. Kohlmeier M. Nutrigenetics. / M. Kohlmeier. – Waltham: ELSEVIER, 2013.
75. Lam Y.W.F. Pharmacogenomics / Y.W.F. Lam, L.H. Cavallari – Waltham: ELSEVIER, 2013.
76. Lesk A.M. Introduction to genomics / A.M. Lesk. – Oxford: Oxford University Press, 2012.
77. Li Q. Brain region-specific alterations of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in serotonin transporter knockout mice / Q. Li, C.H. Wichems, L. Ma // J Neurochem, 2003. – V. 84(6). – P. 1256-1265.
78. Liu Y. OMICS in clinical practice / Y. Liu. – Toronto: Apple Academic Press, 2014.
79. Lodish H. Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell // – Bedford: W.H. Freeman, 2013.

80. Krebs J.E. Lewin's genes / J.E. Krebs. E.S. Goldstein, S.T. Kilpatrick. – Burlington: Jones and Bartlett Learning, 2014.
81. Michels A. Genetic Techniques for Biological Research / A. Michels. – NY: Garland Science, 2009.
82. Montgomery H.E. Human gene for physical performance / H.E. Montgomery, R. Marshall, H. Hemingway, S. Myerson, P. Clarkson, C. Dollery, M. Hayward, D.E. Holliman, M. Jubb, M. World, E.L. Thomas, A.E. Brynes, N. Saeed, M. Barnard, J.D. Bell, K. Prasad, M. Rayson, P.J. Talmud, S.E. Humphries // Nature, 1998. – V. 393. – P. 221–222.
83. Montgomery H.E. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training / H.E. Montgomery, P. Clarkson, M. Barnard // Lancet, 1999. – V. 53. – P. 541–545.
84. Necholl D.S.T. An introduction to genetic engineering / D.S.T. Necholl. – Cambridge: Cambridge university press, 2008.
85. Nelson D.L. Lehninger principles of biochemistry / D.L. Nelson, M.M. Cox. – NY: W.H. Freeman, 2012.
86. Pescatello L.S. Exercise Genomics / L.S. Pescatello, S.M. Roth. – NY: Humana Press, 2011.
87. Plomin R. The genetic basis of complex human behaviors / R. Plomin, M.J. Owen, P. McGuffin // Science, 1994. – V. 264 (5166). – P. 1733-1739.
88. Plopper G. Lewin's cell / G. Plopper, D. Sharp, E. Sikorski // – Burlington: Jones and Bartlett Learning, 2015.
89. Primrose S.B. Principles of gene manipulation and genomics / S.B. Primrose, R.M. Twyman. – Malden: Blackwell Publishing, 2006.
90. Rankinen T. The Human Gene Map for Performance and Health-Related Fitness Phenotypes: The 2005 Update / T. Rankinen, M. Bray, J.M. Hagberg, L. Perusse, S.M. Roth, B. Wolfarth, C. Bouchard // Medicine & Science in Sports & Exercise, 2006. – V. 38(11). – P. 1863–1888.
91. Reece R.J. Analysis of genes and genomes / R.J. Reece. – Chichester: John Wiley & Sons, 2004.

92. Richards J.E. The human genome / J.E. Richards, R.S. Hawley. – London: Academic Press, 2011.
93. Roth S.M. Genetics Primer for Exercise Science and Health / S.M. Roth. – NY: John Wiley & Sons, 2007.
94. Sanoudou D. Clinical applications of pharmacogenetics / D. Sanoudou. – Rijeka: InTech, 2012.
95. Scherman D. Advanced textbook on gene transfer, gene therapy and genetic pharmacology / D. Scherman. – London: Imperial College Press, 2014.
- 96.Sizer F. Nutrition: Concepts and Controversies / F. Sizer, E. Whitney. – Belmont: WADSWORTH CENGAGE Learning, 2014. – 848 p.
97. Stepto N.K. Global Gene Expression in Skeletal Muscle from Well-Trained Strength and Endurance Athletes / N.K. Stepto, V.G. Coffey, A.P. Ponnampalan, D.J. Canny, D. Powwel, J.A. Hawley // Med. Sci. Sports Exerc, 2009. – V. 41. – P. 546–565.
98. Watson J.D. Molecular biology of the gene / J.D. Watson, T.A. Baker, S.P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick. – San Francisco: Benjamin Cummings, 2014.
99. Weaver R.F. Molecular biology / R.F. Weaver. – NY: McGraw-Hill, 2012.
100. Wilson K. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology / K. Wilson, J. Walker. – Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
101. Xu J. Next-generation Sequencing: Current Technologies and Applications / J. Xu. – Norfolk: Caister Academic Press, 2014.

ПРО АВТОРІВ



Гоженко Анатолій Іванович – доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України, директор ДП «Український НДІ медицини транспорту», член правління Українського товариства патофізіологів, голова Одеського товариства патофізіологів, головний редактор 3 наукових журналів, міжнародний редактор журналу «Авіаційна, морська і космічна медицина» (Болгарія), член 12 вітчизняних і 3 закордонних

наукових журналів, головний позаштатний спеціаліст МОЗ України з суднової медицини, автор 46 монографій, понад 1300 наукових робіт, понад 20 методичних рекомендацій і інформаційних листів, понад 70 патентів наукових винаходів. Під керівництвом Анатолія Івановича було успішно захищено 27 докторських і 50 кандидатських дисертацій.



Козирєв Андрій Віталійович – магістр з фізичного виховання та спорту, член Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавілова, член Українського біофізичного товариства, викладач кафедри фізичної реабілітації Міжнародного технологічного університету «Миколаївська політехніка», автор понад 30 наукових праць. Сфера наукових інтересів:

фізичне виховання і спорт; відновлювальна медицина і фізична реабілітація; кінезіо-, психо-, нутри- і фармакогенетика та геноміка; нутриціологія і фармакологія. Особливу увагу приділяє предиктивній генетиці та вивченню зв'язку молекулярно-генетичних поліморфізмів з розвитком і проявом фізичних і психічних здібностей людини.



Цебржинський Олег Ігорович (19.03.1947 р.-28.04.2016 р.) – доктор біологічних наук, професор, автор понад 450 друкованих наукових робіт. Основні напрямки наукових інтересів: теоретична біологія, фізіологія, біохімія, патофізіологія, вільнорадикальна біологія і токсикологія. Особливу увагу приділяв вивченню проблем дії прооксидантно-антиоксидантної системи і мелатоніну та механізмів інтоксикації

організму неорганічними речовинами. Був ініціатором створення і першим керівником ЦНДЛ УМСА, 5 років був головою Полтавського обласного осередку наукового товариства токсикологів України. Останні роки завідував кафедрою біології та основ здоров'я людини Полтавського національного педагогічного університету імені В.Г. Короленка. Справжній навчальний посібник відображає досвід Олега Ігоровича у викладанні молекулярної біології у вищих навчальних закладах країни.



Гоженко Олена Анатоліївна – доктор медичних наук, професор кафедри фізичної реабілітації Міжнародного технологічного університету «Миколаївська політехніка», заступник начальника з медичної частини санаторію СБУ «Одеса», автор понад 215 наукових праць та 3 патентів наукових винаходів.



Жуков Валерій Анатолійович – доктор медичних наук, професор Університету Казимира Великого в Бидгощі, Польща. Член Українського товариства патофізіологів, член Одеського товариства патофізіологів, головний редактор 1 наукового журналу, редактор 2 наукових журналів, автор і соавтор 12 монографій, понад 850 наукових робіт, 5 методичних рекомендацій і інформаційних листів.

Gozhenko A., Kozyrev A., Tsebrzhinsky O., Gozhenko E. Zukow W. Основи молекулярної біології та персональна геноміка фізичних і психічних здібностей людини = Basis molecular biology and genomics personal physical and mental faculties of man. RSW.Odesa, Bydgoszcz. 2017. 340 p. Bibliography of 101 items. ISBN 9781365585838. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.192685>

© The Author(s) 2017.

This monograph is published with Open Access.
Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.



Attribution — You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work). Noncommercial — You may not use this work for commercial purposes. Share Alike — If you alter, transform, or build upon this work, you may distribute the resulting work only under the same or similar license to this one.
Zawartość jest objęta licencją Creative Commons Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne-Na tych samych warunkach 4.0

ISBN 9781365585838

DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.192685>

340 s. Liczba znaków: 583 387 (ze streszczeniami i okładką). Liczba grafik: 13 x 1 000 znaków (ryczalt) = 13 000 znaków.
Razem: Liczba znaków: 596 387 (ze streszczeniami, okładką i grafikami) = 14,9 arkuszy wydawniczych.
340 p. Number of characters: 583 387 (with abstracts). Number of images: 13 x 1000 characters (lump sum) = 13 000 characters.
Total: Number of characters: 583 387 (with abstracts, summaries and graphics) = 14,9 sheet publications.

ISBN 9781365585838



ISBN 9781365585838

