

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ

**ВИЩИЙ ПРИВАТНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ЛЬВІВСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»**

**КАФЕДРА МЕДИЧНОЇ БІОЛОГІЇ, МІКРОБІОЛОГІЇ ТА
ГІСТОЛОГІЇ**

**ІНСТИТУТ ЕКОЛОГІЇ КАРПАТ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ**



НАВЧАЛЬНО–МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК

для практичних занять з дисципліни

«СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ»

(Курс за вибором) ВБ1.25, що викладається в межах ОПП другого

(магістерського) рівня вищої освіти для студентів 3 курсу

фармацевтичного факультету

галузь знань 22 «Охорона здоров'я»

Спеціальність: 226 «Фармація, промислова фармація»

Львів – 2024

УДК 582. 32. 575. 17

Баїк О.Л. «СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ». Навчальний посібник. – Львів, 2024. – 168 с.

Баїк О.Л. – кандидат біологічних наук, старший дослідник, завідувач кафедри медичної біології, мікробіології та гістології Львівського медичного університету, старший науковий співробітник Інституту екології Карпат НАН України.

Ухвалено та рекомендовано до друку на засіданні кафедри медичної біології, мікробіології та гістології (Протокол №9 від 17 червня 2024 р.).

Ухвалено та рекомендовано до друку на засіданні ПМК (Протокол №4 від 18 червня 2024 р.).

Рецензент:

Корчинська О.С. – кандидат біологічних наук, доцент кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

За загальною редакцією:

Гуменюк О.М. – проректора з навчальної роботи Львівського медичного університету, кандидата педагогічних наук, доцента, заслуженого лікаря України.

ЗМІСТ

Лекції

- 1. Тема 1.** Нуклеїнові кислоти як об'єкти вивчення молекулярної генетики. Реплікація та репарація ДНК. Експресія генів та її регуляція **3**
- 2. Тема 2.** Загальна характеристика моногенної патології. Генетика окремих форм моногенних хвороб. Спадкові хвороби обміну. Сучасна класифікація, коротка характеристика груп. **36**
- 3. Тема 3.** Хромосомні хвороби та методи їх діагностики. Уроджені вади розвитку. Класифікація, етіологія, діагностика та профілактика. **53**
- 4. Тема 4.** Основи екологічної генетики, фармакогенетики. Спадкові гемоглобінопатії і таласемії. **60**
- 5. Тема 5.** Дерматогліфіка – метод дослідження спадковості людини. Перспективи генетичної інженерії. **73**

Практичні заняття

- 6. Тема 1.** Молекулярні механізми реплікації ДНК. **84**
- 7. Тема 2.** Репарація ДНК. Механізми репарації ушкодженої ДНК Спадкові хвороби репарації ДНК. **91**
- 8. Тема 3.** Структура геномів та молекулярні механізми експресії генів у вірусів **98**
- 9. Тема 4.** Структура геному та молекулярні механізми експресії генів у прокариотів. **105**
- 10. Тема 5.** Структура геному та молекулярні механізми експресії генів у еукаріотів. **110**
- 11. Тема 6.** Організація геному людини **117**
- 12. Тема 7.** Молекулярні механізми мутацій. **126**
- 13. Тема 8.** Регуляція клітинного циклу. Молекулярні основи онкогенетики **134**
- 14. Тема 9.** Генна терапія. Трансгенні організми. Перспективи генетичної інженерії. **146**
- 15. Тема 10.** Клонування організмів та клітин. Терапевтичне клонування та його перспективи у медицині та фармації. **157**
- 16. Література.** **168**

Лекція 1.

Тема 1. Нуклеїнові кислоти як об'єкти вивчення молекулярної генетики.

Реплікація та репарація ДНК. Експресія генів та її регуляція

План.

1. Характеристика нуклеїнових кислот.
2. Будова ДНК та РНК. Реплікація ДНК.
3. Експресія генів та її регуляція.
4. Епігенетична регуляція експресії генів.

Характеристика нуклеїнових кислот.

У клітині в потоці інформації послідовно беруть участь ДНК хромосом ядра, молекули і-РНК, які переносять її у цитоплазму; рибосоми, т-РНК і ферменти активації амінокислот. Нарешті синтезуються білки з певною структурою і функціями.

Головна роль у збереженні і перенесенні інформації належить нуклеїновим кислотам. Нуклеїнові кислоти відкриті І.Мішлером (1844-1895) у 1869 р. Нуклеїнові кислоти забезпечують процеси синтезу білка, чим визначають характер обміну речовин, закономірності росту і розвитку, Явища спадковості і мінливості. Зміна структури нуклеїнових кислот веде до патологічного стану. Є 2 групи нуклеїнових кислот – РНК і ДНК. Вони відмінні хімічною будовою і біологічними властивостями.

Деякі віруси містять тільки РНК або ДНК, але клітини бактерій і всіх еукаріот містять нуклеїнові кислоти обох типів. ДНК і РНК у клітині локалізовані по-різному. ДНК знаходиться переважно у ядрі, входить до складу хроматину, зосереджена у хромосомах. У ядрі ДНК сполучена з пістонами і протамінами, тобто утворюють нуклеопротейди. ДНК входить до складу мітохондрій, центросом і пластид. РНК знаходиться в ядерці ядра і рибосомах, і ще у цитоплазматичному матриксі.

Нуклеїнові кислоти є біологічними полімерами. Мономерними ланками НК є нуклеотиди – фосфорні ефіри нуклеозидів, які побудовані з пентози і

гетероциклічної основи. У РНК вуглеводний компонент – D-рибоза, в ДНК – D-2-дезоксирибоза. Зв'язок між вуглеводним залишком і гетероциклічною основою в нуклеотиді здійснюється за допомогою N-глікозидного зв'язку. В якості гетероциклічних основ ДНК містить два пурина: аденін (А) і гуанін (G) і два піримідини: тимін (Т) і цитозин (С). У РНК замість тиміну міститься урацил (U). До складу ДНК входять 4 нуклеотида.

РНК містить моносахариди рибозу ($C_5H_{10}O_5$), ДНК – моносахариди дезоксирибозу ($C_5H_{10}O_4$). Азотисті основи А, Г, і Ц входять до складу обох кислот, а Т – до складу тільки ДНК; У – тільки до складу РНК. Окремі нуклеотиди при полімеризації сполучаються між собою залишками фосфорної кислоти. При цьому утворюються ди-, три-, тетра-, пента-, гекса-, полінуклеотида, молекули яких утворені десятками, сотнями і тисячами нуклеотидів. Їх відносна молекулярна маса 1500000 – 2000000 і більше. Нуклеотида можуть розташовуватися у будь-якій послідовності, що забезпечує їх велику різноманітність.

Основна біологічна функція ДНК полягає у зберіганні, самовідновленні, само відтворенні(реплікація) і передавання генетичної(спадкової) інформації у клітині. Біологічна роль РНК пов'язана з синтезом білка, тобто реалізацією спадкової інформації. РНК є посередником між ДНК і молекулою білка, яка синтезується.

ДНК.

Макромолекулярна організація ДНК. У 1953 р. Дж.Уотсон і Ф.Крік запропонували модель структури ДНК. При побудові моделі вчені ґрунтувалися на таких даних: ДНК є полімером, що складається з нуклеотидів, сполучених 3'-5'-фосфодіефірними зв'язками. Склад нуклеотидів ДНК підкоряється правилам Чаргафа: у ДНК вміст пуринових нуклеотидів (А+G) завжди дорівнює вмісту піримідинових нуклеотидів (Т+С); число залишків А завжди дорівнює числу залишків Т, число залишків G – числу залишків С. Рентгенограми ДНК, уперше отримані М. Уілкінсом і Р. Франклін, вказують на те, що молекула має спіральну структуру і містить більше ніж один

полінуклеотидний ланцюг. Кислотно-лужне титрування ДНК доводить, що її структура стабілізується водневими зв'язками. Титрування і нагрівання нативної ДНК викликає помітні зміни її фізичних властивостей, зокрема в'язкість, переводячи її в «денатуровану» форму, без втрати ковалентних зв'язків. На основі цих даних Д.Уотсон і Ф.Крік запропонували тривимірну модель ДНК, яка пояснювала результати рентгеноструктурного аналізу і характерну для ДНК парність основ. Згідно їх моделі молекула ДНК є правильною правогвинтовою спіраллю, утвореною двома полінуклеотидними ланцюгами, закрученими один відносно одного і навколо загальної осі. Два полінуклеотидні ланцюги, розташовані по периферії молекули, мають антипаралельну орієнтацію. Це означає, що якщо рухатися уздовж осі спіралі від одного її кінця до іншого в одному ланцюзі, фосфодиефірині зв'язки мають напрям $3' \rightarrow 5'$, а в іншій – $5' \rightarrow 3'$, тобто на кожному з кінців лінійної молекули ДНК розташовані $5'$ -кінець одного ланцюга і $3'$ -кінець іншого ланцюга. Діаметр спіралі постійний уздовж усієї її довжини і дорівнює $\approx 2,0$ нм. Гідрофільні пентозофосфатні остови ланцюгів розташовані на зовнішній стороні подвійної спіралі. Гідрофобні пуринові і піримідинові основи обох ланцюгів укладені стопкою з інтервалом $0,34$ нм і спрямовані всередину спіралі; площини кілець гетероциклічних основ перпендикулярні головній осі спіралі. Довжина витка спіралі, який відповідає її періоду ідентичності, складає $3,40$ нм. На один виток спіралі припадає 10 нуклеотидних залишків в одному ланцюзі. Подвійна спіраль стабілізується за допомогою водневих зв'язків між пуринами одного ланцюга ДНК і піримідинами іншого, а саме, між $A = T$, $G = C$. Основи, що утворюють пари, об'єднані водневими зв'язками, дістали назву комплементарних пар. У АТ-парі основи сполучені за допомогою двох водневих зв'язків: одна – між аміно- і кетогрупами, інша – між двома атомами азоту пурину і піримідину відповідно. У ГЦ-парі є три водневих зв'язки: два з них утворюються між аміно- і кетогрупами відповідних основ, а третя – між атомами азоту пурину і піримідину. У зв'язку з цим послідовність основ в одному ланцюзі визначає їх послідовність в іншому.

Здатність ДНК до авторепродукції і її здатність бути носієм інформації пов'язані з особливостями структури її молекул. Молекула ДНК складається з двох спіральних розкручених ниток. Азотисті основи однієї нитки ДНК сполучені водневими «містками» з основами іншої, причому А зв'язується тільки з Т, а Ц – з Г. Вони комплементарні. На цьому ґрунтується властивість ДНК до авторепродукції (самовідтворення). Авторепродукція молекул ДНК відбувається під впливом ферменту ДНК–полімерази. При цьому комплементарні ланцюги молекул ДНК розкручуються і розходяться. Потім кожна з них починає синтезувати нову. Відбувається точне відтворення материнської молекули(за принципом компліментарності). Утворюються 2 ідентичні біоспіралі, у кожній з яких 1 нитка материнська, а друга – нова.

При поділі клітин подвоєння молекул ДНК відбувається так, що нові молекули мають ту ж структуру, що й вихідні. Цим пояснюється передавання спадкової інформації від клітини до клітини, з покоління в покоління.

В ДНК закодована програма синтезу багатьох білків. Місце кожної амінокислоти у поліпептидному ланцюгу кодується нуклеотидами молекул ДНК (триплет або кодон). ДНК кожного виду характеризується великою постійністю і видовою специфічністю. Відношення А+Т/Г+Ц у різних видів різне (у бактерії А+Т/Г+Ц=0,42; у людини – 1,53). Біохіміком А.М.Білозерським (1905-1972) встановлено, що відношення пар азотистих основ є видовою ознакою.

Кількість ДНК у прокариот у сотні разів менша, ніж у ядрах клітин еукаріот. ДНК еукаріот неоднорідна і поділена на 3 класи: клас часто повторюваних послідовностей нуклеотидів, що зустрічаються у геномі до 10^6 разів; клас помірно повторюваних послідовностей, що зустрічається у геномі 10^2 – 10^3 разів; клас унікальних ділянок ДНК з неповторюваним сполученням нуклеотидів. У ядрі клітини кількість ДНК кожного класу неоднакова. Так, у миші до 1-го класу відносять ~10% загальної кількості ДНК; до 2-го – ~15%, решта 75% ДНК – унікальні ділянки. Такими є більшість генів. Подібне співвідношення і у інших організмів.

ДНК з часто повторюваними послідовностями нуклеотидів не зв'язана з синтезом білка, але може бути роздільною ланкою між окремими генами, або виконувати інші функції. Клас помірно повторюваних послідовностей включає різні гени, у тому числі гени синтезу т-РНК, білків, що входять до складу рибосом і хроматину. Вони повторюються до 400 разів.

РНК.

Побудована подібно до однієї з ниток ДНК. Якщо вміст ДНК в клітині постійний, то вміст РНК коливається, особливо багато її в клітинах з інтенсивним синтезом білка. Є 3 види РНК: рибосомальна, інформаційна (матрична) і транспортна.

Рибосомальна (р-РНК) найбільша за розмірами і включає 3000-4000 нуклеотидів. Входить до складу рибосом. В клітині із загальної маси РНК 90% припадає на р-РНК. Із р-РНК побудований структурний каркас рибосом, важлива її роль у ініціації і закінченні синтезу і відщепленні готових молекул білка від рибосом.

Інформаційна (і-РНК) несе у собі генетичну інформацію для побудови білка. Її ще називають матричною (м-РНК). На м-РНК будуються поліпептиди відповідно до закладеної в ній генетичної інформації. Молекула і-РНК складається з триплетів (кодонів). Кожній амінокислоті відповідає свій кодон. Молекули і-РНК містять 300-3000 нуклеотидів; відносна молекулярна маса від сотень тисяч до 2000000. і-РНК складає 0,5 – 1 % загальної маси РНК. І-РНК існує у двох функціях : у вигляді зрілої і-РНК прикріплюються до рибосом, де починається зчитування інформації. Іноді у клітинах може нагромадитись зріла і-РНК зв'язана з білком.

Молекули т-РНК – найкоротші і складаються з 70 – 100 нуклеотидів і мають найменшу молекулярну масу. т-РНК «підбирає» у цитоплазмі певні амінокислоти і «підносить» їх до рибосом з і-РНК. Для кожної амінокислоти існує свій тип т-РНК. На одному з кінців молекули т-РНК ділянка, до якої прикріплюється певна амінокислота, на іншому – ділянка, де розташовується

триплет вільних азотистих основ (антикодон). При комплементарному співпаданні антикодону т-РНК з триплетом і-РНК (кодоном) амінокислота займає певне місце у білковій молекулі, яка синтезується.

Реплікація ДНК.

Генетична інформація клітинних організмів – нуклеотидна послідовність ДНК. Для збереження унікальних властивостей організму необхідне точне відтворення цієї послідовності в кожному поколінні. Під час ділення клітини кожна з 2-х дочірніх клітин повинна отримати точну копію ДНК, це означає, що перед діленням ДНК повинна подвоїтися. Так, кишкова паличка при утворенні кожного покоління повинна подвоювати повний геном розміром 4×10^6 н.п., а соматичні клітини людини – копіювати 6 млрд. н.п.

Реплікація – складний біологічний процес реакції матричного синтезу, який забезпечує подвоєння молекули ДНК. Відбувається за напівконсервативним механізмом та за принципом комплементарності. Реплікація – ферментативний, енергозалежний процес. Реплікація визначає саморепродукцію на молекулярному рівні і лежить в основі розвитку та розмноженні організмів, забезпечення існування окремих організмів, популяцій та видів.

Модель ДНК Уотсона і Кріка, дозволила зрозуміти принцип реплікації ДНК. Оскільки кожен з ланцюгів ДНК має послідовність нуклеотидів комплементарну другому ланцюгу, то при подвоєнні ДНК ланцюги повинні розходитися, а потім кожен стає матрицею для побудови нового комплементарного ланцюга (напівконсервативний механізм).

Механізм ДНК хімічної реакції, який відбувається при реплікації, полягає в перенесенні залишку дезоксирибонуклеозидмонофосфату від дезоксирибонуклеозид-трифосфату на кінцевий нуклеотидний залишок зростаючого в процесі синтезу нуклеотидного ланцюга. Оскільки формування нового полінуклеотиду йде на полірибонуклеотидній матриці при безперервному замиканні водневих зв'язків між комплементарними

пуриновими і піримідиновими основами матриці і дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, то умовою функціонування цього механізму є одноланцюгова структура матриці. У зв'язку з цим істотним моментом в біосинтезі є розщеплення подвійної спіралі ДНК на два ланцюги, на яких буде здійснюватися комплементарний синтез дочірніх ланцюгів. У результаті з однієї молекули ДНК утворюються дві молекули, абсолютно ідентичні материнській молекулі ДНК. Після одного раунду реплікації один ланцюг в кожній з двох дочірніх ДНК є материнським (консервативним), а інший — новосинтезованим. Такий спосіб подвоєння молекул ДНК називається **напівконсервативним** (у 1958 р. М.Мезельсон і Ф.Сталь отримали експериментальний доказ напівконсервативного механізму реплікації ДНК).

Білки і ферменти, що беруть участь в реплікації ДНК.

Процес реплікації ДНК здійснюється за участю великої кількості білків, які утворюють складний і ефективно працюючий реплікативний комплекс.

ДНК-полімерази. Комплементарне копіювання одноланцюгової матриці каталізують ДНК-залежні ДНК-полімерази (ДНК-полімерази). Деякі ДНК-полімерази отримані в чистому вигляді, описані їх фізичні і ферментативні властивості. Хоча ці властивості не зовсім ідентичні, механізм каталізу всіх ферментів у загальних рисах однаковий.

Полімеризація нуклеотидів в процесі реплікації відбувається тільки в одному напрямку: від 5'-кінця до 3'-кінця (5'→3') ланцюга, а ланцюг ДНК що синтезується буде антипаралельним по відношенню до ДНК-матриці. ДНК-полімераза байдужа до послідовності нуклеотидів матриці. ДНК синтезується надзвичайно швидко: в межах від 50 нуклеотидів/с у еукаріот і до 500 нуклеотидів/с у бактерій.

Нормальне розмноження клітин вимагає високої точності копіювання ДНК-матриці, для цього існують спеціальні механізми, один з яких – механізм самокорекції. ДНК-полімераза перевіряє комплементарність кожного нуклеотида матриці двічі: один раз перед включенням його до складу

зростаючого ланцюга і другий раз – перед тим, як вставити наступний нуклеотид.

ДНК-праймаза. ДНК-полімерази не здатні ініціювати синтез нових ланцюгів ДНК, вони можуть лише додавати дезоксирибонуклеотиди до 3'-кінця наявного ланцюга. Щоб молекули ДНК-полімерази могли почати синтез ДНК, їй необхідна приманка (праймер – primer), короткий олігодезоксирибонуклеотид або олігорибонуклеотид, комплементарний відповідній ділянці ДНК-матриці, у якої на кінці є вільна 3'-ОН-група. Нездатність молекул ДНК-полімераз самостійно, без приманки синтезувати ДНК принципово відрізняє їх від інших ферментів матричного синтезу – РНК-полімераз.

На стадії ініціації реплікації коротку РНК-приманку з рибонуклеозидтрифосфатів синтезує фермент ДНК-праймаза. ДНК-праймаза може бути окремим ферментом (у бактерій) або входити як субодиниця в ДНК-полімеразу (у еукаріот). Праймаза – це фермент, відмінний від РНК-полімераз, які синтезують різні клітинні РНК. Після синтезу РНК-праймера, ДНК-полімераза продовжує нарощувати дочірній ланцюг. Новосинтезований ланцюг ДНК містять на 5'-кінці декілька рибонуклеотидів: у прокариот – від двох до п'яти нуклеотидів, у еукаріот їх у два рази більше. Надалі праймери заміщаються сегментами ДНК.

ДНК-лігаза. ДНК-лігази сполучають 5'-фосфатну і 3'-гідроксильну групи нуклеотидів, що знаходяться на протилежних кінцях одноланцюгового розриву в дуплексі ДНК. В результаті утворюється фосфодіефірний зв'язок, що ліквідує цей розрив.

ДНК-хеліказа. Для здійснення комплементарного копіювання дволанцюгової ДНК вона повинна поступово розкручуватися. Розкручування (розплітання), спіралі відбувається тільки в локальній ділянці ДНК. Цю реакцію здійснює хеліказа (ДНК-залежна АТФ-аза), що використовує енергію гідролізу АТР (АТФ) для розплітання подвійної спіралі ДНК.

Реплікація ДНК. Початок реплікації. Ділянка ДНК, здатна до автономної реплікації, отримала назву *реплікона*. Реплікон містить всі необхідні гени і регуляторні послідовності, які забезпечують регульоване подвоєння ДНК. Ділянка реплікона, в якій починається реплікація, називається репліка тором – областю початку реплікації (replication origin), у *E.coli* – *oriC*. При ініціації реплікації ініціатор, що кодується репліконом (у *E.coli* – білок Dna A), взаємодіє з реплікатором. Ціла хромосома *E.coli* є репліконом; у еукаріот репліконом називають ділянку ДНК, реплікація якого протікає під контролем єдиної точки початку реплікації. Точка початку реплікації має специфічну послідовність основ, багату парами А-Т, що, ймовірно, полегшує розділення ланцюгів. В результаті ініціації раунду реплікації в точці *ori* утворюється одна або дві реплікативні вилки. При однонаправленій реплікації виникає одна реплікативна вилка (плазмідна ColF1) і синтез закінчується в точці *ori*. При двонаправленій реплікації (хромосома *E.coli*) ініціюється дві реплікативні вилки, які переміщуються в протилежних напрямках до тих пір, доки вони не зустрінуться.

Для геномів еукаріотичних хромосом характерна наявність множинних точок початку реплікації, розкиданих по хромосомі на відстані 20 тис. н.п. (поліреплікаційна організація). Після ініціації реплікація продовжується в двох напрямках від кожної точки до тих пір, поки реплікативні вилки двох сусідніх точок реплікації не зіллються.

Елонгація реплікації. Дуплекс батьківської молекули ДНК розплітає АТР-залежна хеліказа. Одноланцюгові ділянки, що утворюються, кооперативно покриває SSB-білок. ДНК-полімераза III рухається по одному з матричних ланцюгів у напрямку розкриття вилки і синтезує провідний ланцюг ДНК. По іншому, матричному ланцюгу в тому ж напрямку рухається праймосома. Час від часу праймаза, що входить до складу праймосоми (білок Dna G), синтезує РНК-приманки для відстаючого ланцюга. Друга молекула холофермента ДНК-полімерази III подовжує ці приманки – синтезує фрагменти Оказакі завдовжки

від 1000 до 2000 нуклеотидів до тих пір, поки не досягне попередньої приманки.

Термінація реплікації відбувається тоді, коли зустрічаються дві реплікативні вилки при подвоєнні кільцевих молекул ДНК. Безперервне зростання лідируючого і відстаючого ланцюгів уздовж кільцевої матриці неминуче приводить до поєднання 3'-гідрокси- і 5'-фосфорильного кінців одного ланцюга, або в точці початку реплікації (однонаправлена реплікація), або – при двонаправленій реплікації – в середині кільця. Кільця в цих місцях зустрічі з'єднуються ДНК-лігазою. ДНК-гіраза може розчепити зачеплені кільця, використовуючи свою можливість вносити тимчасовий дволанцюговий розрив.

Регуляція реплікації. При кожному клітинному поділі кожна молекула ДНК повинна подвоюватися, тобто на кожному *oriC* повинен відбуватися в точності один акт ініціації реплікації. Інакше поступово відбувалася б втрата реплікона або його неконтрольоване накопичення. Таким чином, до регуляції реплікації пред'являються досить жорсткі вимоги: регуляторна система повинна відчувати відхилення в обидві сторони від середнього числа копій даного реплікона і відповідним чином міняти частоту ініціації на *oriC*. Очевидно, що частота ініціації має бути узгоджена також із швидкістю зростання клітин. Існують тонкі механізми регуляції реплікації на рівні ініціації нових раундів.

Реплікація хромосом у еукаріот. Механізми реплікації ДНК у еукаріот менш вивчений із-за більшої складності. Основні результати отримані на модельній системі з ДНК вірусу SV40, а процес реплікації досліджували в заражених клітинах людини *in vitro*. У цій системі вірусний білок – Т-антиген виконує багато функцій, необхідних для реплікації вірусної ДНК. Він є білком-ініціатором, має ДНК-хеліказну активність і необхідний для правильної взаємодії з ДНК ферментним комплексом, що синтезує праймери. В той же час вірус SV40 використовує для реплікації своєї невеликої хромосоми багато білків клітин-хазяїна, що дозволяє досліджувати функціонування реплікативного комплексу клітин людини в такій відносно простій системі.

ДНК-полімерази еукаріот. У клітинах еукаріот є щонайменше шість різних ДНК-залежних ДНК-полімераз: α , β , δ , ϵ , γ , ξ . Чотири з них – α , β , δ , ϵ – безпосередньо беруть участь в реплікації хромосомної ДНК.

ДНК-полімераза α – перша ДНК-полімераза, виявлена в клітинах еукаріот. Вона представлена в клітині у вигляді міцного комплексу з ДНК-праймазою, що здійснює синтез РНК-приманок. Комплекс ДНК-полімераза α -праймаза є єдиним у еукаріот ферментативним ансамблем, здатним ініціювати синтез ДНК *de novo*. На багатих піримідином ділянках матриці праймаза комплексу синтезує РНК-приманки довжиною приблизно 10 нуклеотидів, які потім елонгуються ДНК-полімеразою без дисоціації комплексу від матриці. В ході реплікації в клітинних ядрах ДНК-полімераза α -праймаза синтезує приманку лідируючої нитки в ділянці *огі* і приманки фрагментів Оказакі відстаючого ланцюга. Як правило, ДНК-полімераза α не має коректорської 3'→5'-екзонуклеазної активності, екзонуклеазний центр в даному ферменті редукувався.

ДНК-полімераза β є найменшою за розміром і найпростішою по будові ДНК-полімеразою в клітинах еукаріот. Основна функція ДНК-полімерази у клітині пов'язана з ексцизійною репарацією ядерної ДНК. Існують експериментальні вказівки на можливість участі цього ферменту в рекомбінаційних подіях і в реплікації ДНК, зокрема в процесингу фрагментів Оказакі. Так, ДНК-полімераза здатна замінити ДНК-полімеразу 1 в клітинах *E.coli*, мутантах по гену ДНК-полімерази 1, ініціюючи реплікацію із 3'-кінця РНК/ДНК гібрида в районі *огі*.

ДНК-полімераза δ – гетеродимер, що складається з каталітичної субодиниці (125–130 кДа) і субодиниці 48-55 кДа, є необхідною для подолання ферментом структурних бар'єрів в природних одноланцюгових матрицях і для зв'язку з чинником процесивності PCNA. Обидві ферментативні активності – ДНК-полімеразна і 3'→5'-екзонуклеазна – пов'язані з високомолекулярним поліпептидом.

Окрім чинника, у присутності якого процесивність цього ферменту збільшується на два порядки, холофермент включає чинники RFC і RPA. Три молекули PCNA утворюють кільцевий тример з отвором для двониткової ДНК в центральній частині, який є рухомою платформою, що переміщується по ДНК, або «ковзаючою скріпкою» у формі тора (бублика), утримуючу ДНК-полімеразу в ході полімеризації на матриці, що забезпечує високопроцесивний синтез ДНК. Хоча PCNA і прокаріотичний чинник процесивності субоддиниця в ДНК-полімерази III *E.coli* мають низьку гомологію на рівні первинної структури, обидва білки формують близькі по просторовій геометрії структури «ковзаючої скріпки».

ДНК-полімераза ϵ виділена з клітин HeLa, містить два поліпептиди – каталітичний 261 кДа і поліпептид 55 кДа. Каталітичний поліпептид має ДНК-полімеразну і 3'→5'-екзонуклеазну активність. Особливістю холофермента ДНК-полімерази в порівнянні з ДНК-полімеразою δ є його менша залежність від допоміжних чинників (PCNA, RFC і RPA), а також низька (майже на порядок) швидкість синтезу ДНК.

Ця відмінність, можливо, пов'язана з різною функцією ДНК-полімераз в реплікативній вилці. Один холофермент, ДНК-полімераза ξ , здійснює швидкий і процесивний синтез лідируючого ланцюга, використовуючи для елонгації єдину приманку синтезовану ДНК-полімеразною δ -праймазою в районі огі, і дисоціює тільки після досягнення кінця реплікона, тоді як декілька холоферментів ДНК-полімерази можуть одночасно синтезувати фрагменти Оказакі в «зоні Оказакі», подовжуючи приманки, що синтезуються ДНК-полімеразною β -праймазою на початку кожного фрагмента.

Слід зазначити, що у вищих еукаріот участь ДНК-полімерази ϵ в синтезі ланцюга, що запізнюється, не доведено. Так, при реплікації ДНК вірусу SV40 в безклітинній системі обидва ланцюга на етапі елонгації синтезує ДНК-полімераза δ .

ДНК-полімераза γ локалізована в мітохондріях, її функція пов'язана з реплікацією і репарацією мітохондріальної ДНК, вона кодується ядерним

геномом. ДНК-полімераза γ здатна направляти високопроцесивну полімеризацію на одноланцюгових ДНК-матрицях у відсутності допоміжних чинників. Охарактеризовані також інші ДНК-полімерази еукаріот: η , θ , τ , REVI. Всі ці ферменти беруть участь в репарації ДНК.

Останніми роками разом з поглибленим вивченням будови і властивостей окремих ДНК-полімераз еукаріот велика увага приділяється взаємодії цих ферментів з допоміжними чинниками і механізму функціонування їх у складі багатокомпонентних реплікативних і репаративних комплексів. Список білків, що взаємодіють з ДНК-полімеразами, постійно росте і включає не тільки відомі чинники PCNA, RFC і RPA, але і ключові чинники регуляції клітинного метаболізму, такі, як білки групи MCM (minichromosome maintenance factors), чинники розпізнавання ділянок ori реплікації ORC (origin recognition complex) і інші.

Принципове значення має встановлення того факту, що функціонування реплікативних ДНК-полімераз α, δ, ϵ в ході клітинного циклу регулюється за допомогою специфічних модифікацій посттрансляцій, зокрема фосфорилування. У клітинах еукаріот синтез ДНК відбувається в основному в специфічних щільних структурах («реплікативних фабриках»), приєднаних до дифузного ядерного матриксу. У складі «реплікативних фабрик», пов'язаних з ядерним матриксом, виявлений мультибілковий 21S комплекс («синтесома»), що включає не менш ніж 30 білків.

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

Ініціація реплікації у еукаріот відбувається на специфічних множинних послідовностях нуклеотидів – реплікаторах, або оріджинах реплікації. Найбільш вивчені реплікатори дріжджів (ARS – autonomously replicating sequences). У дріжджів на ділянці ДНК завдовжки 5 тис. н.п. знаходиться три окремі реплікатори (ARS). У ссавців області початку реплікації

розташовуються на відстані ~ 100 тис.н.п. один від одного. Встановлено, що синтез ДНК в окремих репліконах відбувається в двох напрямках, причому переміщення реплікативної вилки здійснюється переважно в одному напрямку, який може змінюватися залежно від стадії розвитку організму. Частота використання окремих реплікаторів змінюється в онтогенезі, зменшуючись в клітинах дорослого організму. Реплікатори еукаріот різні між собою по послідовності, але мають декілька ділянок гомології: ДНК-розщеплюючі елементи, ділянки прикріплення до ядерного матриксу, піримідинові тракти, канонічні послідовності, що взаємодіють з білками реплікативного комплексу, АТ-багаті послідовності, ділянки вигинів ДНК та інші. Ініціація реплікації чітко регулюється. Полірепліконна організація вимагає, щоб в кожному циклі клітинного ділення кожен реплікатор «спрацював» тільки один раз, інакше на хромосомі утворюються розгалужені структури.

Для дріжджових ARS-послідовностей ініціація відбувається один раз в кожній S-фазі клітинного циклу. У вищих еукаріот достатньо довгі ділянки хромосом, що містять декілька сусідніх репліконів, починають синтез ДНК в S-фазі приблизно одночасно, але кожна така ділянка має характерний для нього час ініціації реплікації: одні активуються на початку S-фази, інші – пізніше, а треті – в кінці. Таким чином, існує заборона на повторну ініціацію реплікації в тому ж циклі клітинного ділення, хоча одночасно може відбуватися ініціація на інших, реплікаторах, що не спрацювали раніше.

Деякі дані вказують на те, що подібна заборона знімається в ході мітозу, коли ядерна оболонка розпадається. Порушення заборони на повторну ініціацію призводить до ампліфікації (появі множинних копій) тієї або іншої ділянки хромосоми, де відбулася «зайва» ініціація реплікації.

Елонгація реплікації. Чотирьохсубодинична ДНК-полімераза α утворює функціональні комплекси з рядом ферментів і допоміжних білків. У комплексі, що здійснює реплікацію лідируючого ланцюга, ДНК-полімераза α пов'язана з ДНК-полімеразою δ , а в комплексі, що синтезує відстаючий ланцюг, – з ДНК-полімеразою ϵ . У еукаріот обидва комплекси зв'язано один з одним в

реплікативній вилці подібно до того, як зв'язані холоферменти синтезу лідируючого і відстаючого ланцюгів у прокариот.

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

Білок PCNA і чинник реплікації C (RFC) також утворюють стабільний комплекс з ДНК-полімеразою δ , а в певних умовах стимулюють і активність ДНК-полімерази ϵ . У багатьох відношеннях PCNA і RFC є функціональними аналогами відповідно β -білка і білків γ -комплексу E.coli. Механізми реплікації ДНК про- і еукаріот істотно відрізняються в тому відношенні, що в другому випадку синтез лідируючого і відстаючого ланцюгів ДНК здійснюють різні ДНК-полімерази, тоді як у E.coli обидва ланцюги ДНК синтезуються диміром ДНК-полімерази III. Дозрівання фрагментів Оказаки у еукаріот вимагає вирізання РНК-приманок за допомогою 5'→3'-екзонуклеази (білкові чинники FEN1 або MF1) і РНКазы H1. ДНК-полімераза β заповнює проломи, рівні вирізаним праймерам, а ДНК-лігаза I сполучає фрагменти відстаючого ланцюга.

Термінація реплікації. Просування реплікативної вилки припиняється тільки при зіткненні з іншою вилкою, що рухається в протилежному напрямку, або після досягнення кінця хромосоми. Після збірки на молекулі ДНК хромосомних білків кожна пара хромосом в процесі мітозу впорядковано розділяється по дочірнім клітинам. Реплікація відбувається в S-фазу клітинного циклу. Відомо, що в регуляції клітинного циклу беруть участь білки цикліни (A, B, D, E). Вони активують циклінзалежні протеїнкінази, і ті можуть фосфорилувати специфічні білки (цикліни), що беруть участь в підготовці клітини до ділення. Так, циклін D регулює перехід клітини з G₁-фази в S-фазу; циклін A і E – активують синтез ДНК на початковій стадії S-фази; циклін B регулює перехід клітини з G₂-фази в M-фазу.

Системи виправлення помилок реплікації. Механізми репарації пошкодженої ДНК.

Передача спадкової інформації в неспотвореному вигляді – найважливіша умова виживання як окремого організму, так і виду в цілому. Більшість змін в структурі ДНК небажані: вони призводять до шкідливих мутацій або блокують реплікацію ДНК і викликають загибель клітин. ДНК постійно піддається хімічним змінам в результаті дії спонтанних і індукованих чинників середовища: УФ-випромінення, іонізуюча радіація, хімічні мутагени, температура та ін. До спонтанних ушкоджень відносяться: помилки реплікації (утворюються пари некомплементарних нуклеотидів – місметчі); апуринізація (відщеплення азотистих основ від сахаро-фосфатного остову – утворення AP-сайтів) і дезамінування (відщеплення аміногрупи від азотистої основи).

До індукованих ушкоджень відносять: димеризацію (зшивання сусідніх піримідинових основ з утворенням димера); розмикання пуринового кільця; одноланцюгові і дволанцюгові розриви в ДНК; зшивання між ланцюгами ДНК. В ході еволюції виробилася система, що дозволяє виправляти порушення в ДНК, викликані помилками реплікації або ушкоджувальними агентами зовнішнього середовища – система репарації ДНК. В результаті її активності на 1000 ушкоджень в ДНК тільки одна призводить до мутації. Порушення в системі репарації можуть призводити до передчасного старіння, розвитку онкологічних захворювань, хвороб аутоімунної системи і цілого ряду інших генетично обумовлених дефектів. Так, у людей, що страждають пігментною ксеродермою (спадкове захворювання, проявляється вогнищами раку шкіри), порушення системи репарації призводить до того, що вони не можуть перебувати на сонячному світлі через повну незахищеність від УФ-випромінення. Частота захворювання раком збільшується з віком, ймовірно, за рахунок накопичень ушкоджень в ДНК, пов'язаних з послабленням системи репарації.

Встановлено, що в геномі зародкової лінії клітин ссавців і людини відбувається в середньому 6 нуклеотидних замін в рік. Ймовірно, і в

соматичних клітинах відбувається така кількість мутацій. Їх накопичення з віком підвищує вірогідність ракового переродження клітин. В цілому вважають, що 80-90% усіх ракових захворювань і деякі спадкові хвороби людини пов'язані з порушеннями роботи системи репарації. До них відносять триходистрофію (нестача сірки в клітинах волосся, що веде до їх ламкості; аномалії шкіри і зубів; дефекти статевого розвитку), синдром Кокейна (карликовість, глухота, атрофія зору та ін.), анемія Фанконі (зменшення кількості усіх клітинних елементів крові, скелетні порушення, мікроцефалія, втрата слуху).

Відомі чотири основні типи ушкоджень в ДНК: ушкодження поодиноких нуклеотидів; ушкодження пари нуклеотидів; розрив ланцюгів ДНК; утворення поперечних зшивань між основами одного ланцюга або різних ланцюгів ДНК. Система репарації здатна виправляти усі пошкодження в ДНК, проте механізми репарації вивчені тільки відносно перших двох типів, в основі яких лежать зміни структури гетероциклічних азотистих основ. Усунення розривів в ланцюгах ДНК, ймовірно, досягається прямим лігуванням за участю ДНК-лігаз або в процесі рекомбінації молекул ДНК, а механізми усунення поперечних зшивань доки не вивчені.

Репарація помилок реплікації ДНК. Помилки спаровування азотистих основ під час реплікації ДНК відбуваються досить часто (у бактерій один раз на 10000 н.), в результаті яких дочірній ланцюг ДНК включається некомплементарні материнському ланцюгу нуклеотиди – місметчі (англ. mismatch). Незважаючи на те що ДНК-полімераза I прокариот має здатність до самокорекції, її зусилля по усуненню помилок іноді виявляються недостатні, і тоді в ДНК залишаються деякі некомплементарні пари. В цьому випадку репарація відбувається з використанням системи, пов'язаної з метилуванням ДНК. Дія цієї системи репарації заснована на тому, що після реплікації через декілька хвилин ДНК піддається метилуванню. У *E.coli* метилується в основному аденін з утворенням N⁶-метил-аденіна (N⁶-mA). До цього знову синтезований ланцюг залишається неметильованим. Якщо в такому ланцюзі є

неспарені нуклеотиди, то вона піддається репарації: метилування мітить ДНК і включає систему виправлення помилок реплікації. У цій системі репарації впізнаються особливі структури: послідовність G-N6-mA-T-C і деформація в подвійній спіралі в ділянці де відсутня комплементарність. В усуненні неспарених нуклеотидів в напівметильованій молекулі ДНК бере участь досить складний комплекс ферментів репарації, який сканує ДНК, вирізує ділянку дочірнього ланцюга, прилеглого до місметча, а потім створює умови для забудовування його комплементарними нуклеотидами. Різні компоненти цього комплексу володіють різними активностями (нуклеазною, хеліказною, АТРазною), необхідними для внесення розривів в ДНК і відщеплення нуклеотидів, розплітання подвійної спіралі ДНК і енергетичного забезпечення руху комплексу вздовж ділянки молекули, що репарується. Схожий по структурі і функціям комплекс ферментів репарації виявлений і у людини.

Рекомбінантна (постреплікативна) репарація. У тих випадках, коли системи репарації виявляються порушеними, в ланцюгах ДНК можуть утворюватися проломи (недорепаровані ділянки) іноді дуже істотних розмірів, що значно порушують системи реплікації і можуть привести до загибелі клітин. В цьому випадку клітина в змозі використовувати для репарації однієї молекули ДНК іншу молекулу ДНК, тобто використати механізм рекомбінації.

У бактерій в рекомбінативній репарації бере участь білок Rec A. Він зв'язується з одноланцюговою ділянкою ДНК і залучає її до рекомбінації з гомологічними ділянками неушкоджених ланцюгів іншої молекули ДНК. В результаті і розірваний, і непошкоджений ланцюги ДНК виявляються спареними з неушкодженими ділянками комплементарної ДНК, що відкриває можливість репарації різними системами. При цьому відбувається вирізання певного фрагмента і заповнення з його допомогою пролому в дефектному ланцюзі. Пропуски, що виникають при цьому, і розриви в ланцюгах ДНК заповнюються за участю ДНК-полімерази I і ДНК-лігази.

SOS-репарація. На існування цієї системи уперше вказував М.Радман (1974 р.). Він же дав назву цьому механізму, включивши в нього міжнародний

сигнал лиха "SOS" (врятуйте наші душі). І дійсно, ця система включається тоді, коли ушкоджень в ДНК стає настільки багато, що це загрожує життю клітини. В цьому випадку відбувається активація групи генів, задіяних в різних клітинних процесах, зв'язаних з репарацією ДНК.

Включення тих або інших генів, визначається кількістю пошкоджень в ДНК, це приводить до різних за значимістю клітинних відповідей: починаючи із стандартної репарації пошкоджених нуклеотидів і закінчуючи припиненням мітозу. Найбільш вивчена SOS-репарація у *E.coli*, головними є білки, що кодуються генами *hcs A* і *lex A*. Перший з них є поліфункціональний білок *Rec A*, що бере участь в рекомбінації ДНК і також в регуляції транскрипції генів фага X, вражаючого *E. coli*, а білок *Lex A* є репресором транскрипції великої групи генів, призначених для репарації ДНК бактерій. Зв'язування *Rec A* з *Lex A* призводить до розщеплення останнього і відповідно до активації генів репарації. У свою чергу, індукція SOS-системи бактерії служить для фага X сигналом небезпеки і призводить до того, що профаг з пасивного перетворюється на літичний шлях існування, викликаючи тим самим загибель клітини-хазяїна. SOS-система репарації виявлена у бактерій, у тварин і людини.

Виправлення ушкоджень в ДНК тісно пов'язане з іншими фундаментальними молекулярно-генетичними процесами: реплікацією, транскрипцією і рекомбінацією. Усі ці процеси виявляються переплетеними в загальну систему взаємодій, що обслуговується великим числом різноманітних білків, багато з них є поліфункціональними молекулами, задіяними в контролі реалізації генетичної інформації в клітинах про- і еукаріот. В той же час очевидно, що природа "не скупилася" на елементах контролю, створюючи складні системи корекції тих ушкоджень в ДНК, які несуть небезпеку для організму і для його потомства. З іншого боку, коли репараційних можливостей недостатньо для збереження спадкового матеріалу, настає необхідність в програмованій клітинній смерті – апоптозі.

Експресія генів

Генна експресія – це складний молекулярний механізм реалізації спадкової інформації в конкретну фенотипову ознаку.

Процес експресії гена включає такі етапи:

Транскрипція – складний біологічний процес реакцій матричного синтезу, який забезпечує передачу інформації з послідовності нуклеотидів ДНК на послідовність нуклеотидів РНК.

Процесинг – процес дозрівання зрілої іРНК (або тРНК). Про-іРНК зазнає модифікації та сплайсінгу, що забезпечує стабільність іРНК та здатність до поєднання з рибосомами

Трансляція – складний біологічний процес реакцій матричного синтезу, який забезпечує передачу інформації з послідовності нуклеотидів РНК на послідовність амінокислот в поліпептидах.

Фолдінг та модифікація поліпептидів в клітині (в цитоплазмі та вакуолярній системі), які приводять до структурної організації білків та набуттю ними функціональної активності.

Експресія в ознаку. Утворений білок виконує свою функцію, яка на морфологічному рівні визначає конкретну ознаку (ген) або фенотип (при взаємодії з іншими генами).

Всі етапи експресії генів відбуваються з використанням енергії під впливом десятків ферментів. Основою експресії генів є молекулярні процеси транскрипції, процесінгу, трансляції і модифікації.

Генетичний код.

Ще на початку 50-х років ХХ ст. Г.Гамов запропонував, що генетичний код є триплетним: три сусідніх нуклеотида в полінуклеотидному ланцюзі програмують включення однієї амінокислоти в поліпептидний ланцюг білку. В середині 60-х років ХХ ст. в серії оригінальних експериментів (Ф.Крік, С.Бренер, Г.Вітман і інші дослідники) було встановлено, що код є *триплетним і безперервним*. Повна розшифровка генетичного коду,

проведена М.Ніренбергом, С.Очоа і Н.Г.Корана з використанням безклітинних систем, була завершена в 1966 р.

Відповідно до коду при використанні кополімера полі(UC)_n в якості матриці в цих системах утворювався поліпептид, побудований із залишків серину і лейцину, а полі(UG)_n служив матрицею для синтезу кополімера із залишками Val і Cys, які чергуються. Ця робота показала, що 61 з 64 можливих комбінацій трьох нуклеотидів чотирьох типів (4x4x4) кодують одну з двадцяти протеїногенних амінокислот. Інші три кодони – UAA, UGA і UAG – не кодують жодну з канонічних амінокислот. Ці кодони є сигналами зупинки (термінації) трансляції і тому називаються стоп-кодонами або кодонами-термінаторами. Термінальні кодони не завжди однозначно розпізнаються системою трансляції і тому у складі м-РНК вони нерідко дублюються. Першим (основним) стоп-кодоном зазвичай є кодон UAA, а на невеликій відстані слідом за ним розташовується один з інших термінуючих триплетів (UGA або UAG). Слід також враховувати, що при синтезі ряду білків кодон UGA використовується для включення у білок амінокислотного залишку селеноцистеїна. При синтезі білку триплети нуклеотидів мРНК (кодони) транслуються у відповідні ним амінокислоти. Наприклад, кодони AUG і GUG детермінують включення у білок метіоніну і валіну відповідно.

Оскільки число кодуючих триплетів (61) в три рази більше числа протеїногенних амінокислот, генетичний код **вироджений**, тому багато амінокислот кодуються двома і більше кодонами. Тільки дві амінокислоти (Met і Trp) кодуються одним кодоном (AUG і UGG відповідно) і тому зустрічаються у білках рідше за інші.

Виродженість генетичного коду полягає в тому, що для кожної амінокислоти існує більше однієї тРНК, і одна тРНК може взаємодіяти більш ніж з одним кодоном мРНК. У трьох-літерному генетичному коді найбільш важливі перші дві, тоді як третя літера часто буває різною. Так, наприклад, гліцин кодується чотирма синонімічними кодонами: GGA, GGC, GGG і GGU, у зв'язку з переважаючою роллю перших двох букв кодонів (вважаючи з 5'-кінця

триплета мРНК) генетичний код іноді називають *квазидуплетним*. Ця особливість коду дозволяє використати меншу кількість т-РНК: для взаємодії з 61 кодоном досить 31 т-РНК в цитоплазмі і всього 22 т-РНК у білоксинтезуючій системі мітохондрій тварин.

Генетичний код майже завжди **універсальний**, тобто єдиний для всіх організмів, які живуть на Землі, від бактерій до людини. Невеликі відмінності є, проте, в генетичному коді мітохондрій і хлоропластів. Немає ніяких даних про те, що коли-небудь існували організми з іншим кодом або іншими амінокислотами. Генетичний код ретельно зберігається в еволюції і зміни в коді, а також в рибосомальному апараті клітин слід визнати сильно загальмованими.

Генетичний код – система розташування нуклеотидів в ДНК (або РНК), яка визначає послідовність нуклеотидів РНК і амінокислот у поліпептидах.

Транскрипція.

Транскрипція – перша стадія реалізації генетичної інформації, процес «переписування» послідовності ДНК в одноланцюгову молекулу комплементарної РНК. В результаті транскрипції утворюються м-РНК, які кодують амінокислотні послідовності білків, а також т-РНК, р-РНК і інші види РНК, що виконують структурні, регуляторні і каталітичні функції. В основі транскрипції лежить принцип комплементарності азотистих основ полінуклеотидних ланцюгів ДНК і РНК, а сам процес здійснюється за участю ферментів – РНК-полімераз, і великої групи білків – регуляторів транскрипції.

Досконало вивчені етапи і механізми регуляції транскрипції прокариотичних геномів, проте деталі транскрипції у еукаріот відомі не повністю. В той же час в загальній системі контролю реалізації генетичної інформації контроль на рівні транскрипції є найбільш важливим етапом, відповідальним за диференціальну активність генів в онтогенезі будь-якого організму, і складність організації цього контролю, зайвий раз підтверджує фундаментальне значення транскрипції в реалізації програми життя.

Оскільки ДНК у переважної більшості організмів являють собою дволанцюгові молекули, складені з комплементарних і антипаралельних не ідентичних ланцюгів, транскрипції піддається зазвичай один з них, який називають *матричним* (матрицею):

ДНК **5' - ATGATTGGGGCTCTA - 3'** змістовний ланцюг

3' - TACTAACCCCGAGAT - 5' матричний ланцюг

Транскрипція

РНК **AUGAUUGGGGCUCUA**

Синтез РНК на матриці ДНК ведуть ДНК-залежні-РНК-полімерази, які відносяться до групи нуклеотидилтрансфераз і які використовують нуклеозид-5'-трифосфати. РНК-полімерази активні тільки у присутності іонів Mg^{2+} , для зв'язування яких в молекулі існує консенсусна амінокислотна послідовність з 10 амінокислотних залишків. РНК-полімерази на відміну від ДНК-полімераз не потребують праймера і використовують рибонуклеозид-5'-трифосфати (АТР, ГТР, СТР, УТР). Зростання ланцюга РНК відбувається шляхом послідовного приєднання рибонуклеозид-5'-монофосфатів до 3'-гідроксильної групи рибози попереднього нуклеотиду (тобто у напрямі 5'→3'). Послідовність нуклеотидів в синтезованому РНК-транскрипті визначається комплементарними азотистими основами матричного ланцюга ДНК. Різні види РНК у еукаріот синтезуються різними РНК-полімеразами, тоді як у бактерій усі види РНК синтезує один фермент. У всіх без виключення організмів процес транскрипції відбувається тільки на певних ділянках – **транскриптонах**. Вони обмежені двома послідовностями – **промотором** (зона початку транскрипції) і **термінатором** (зона зупинки транскрипції). Транскриптони бактерій називають *оперонами*. Оперони включають нуклеотидні послідовності – цистрони, або *структурні гени*, які кодують структуру декількох білків. М-РНК синтезована на оперонах *поліцистронна* і синтезує декілька білків, на відміну від моноцистронних м-РНК вищих організмів, які служать матрицями для синтезу одного білка.

Послідовність нуклеотидів в синтезованій молекулі РНК визначається нуклеотидною послідовністю матричного ланцюга ДНК. Транскрипція відбувається за принципом компліментарності. Субстратами для синтезу служать рибонуклеозидтрифосфати. До 3'-кінця зростаючого ланцюга РНК приєднується нуклеозидмонофосфат, а звільнений пірофосфат гідролізується на дві молекули неорганічного фосфату, що робить реакцію енергетично вигідною і безповоротною. Самі білки-регулятори транскрипції набувають або втрачають функціональну активність в результаті модифікацій каталітично активними білками-ферментами, або речовинами небілкової природи, які модулюють їх регуляторні властивості. У примітивних формах життя в регуляції транскрипції безпосередньо беруть участь різні клітинні метаболіти (вуглеводи, амінокислоти, нуклеотиди та ін.). У еукаріот транскрипція безпосередньо пов'язана зі змінами структури хроматину. Перехід хроматину в активну форму (здатну до транскрипції) є додатковим елементом регуляції транскрипції у вищих організмів.

Транскрипція у еукаріот.

РНК-полімерази еукаріот вивчені значно менше, ніж відповідні ферменти бактерій. Синтез РНК у еукаріот здійснюють три різні ферменти: РНК-полімерази I, II і III, структура яких вивчена далеко не повністю. Спочатку еукаріотичні РНК-полімерази були ідентифіковані на основі їх чутливості до аманітину – високотоксичному антибіотику, що міститься у блідій поганці. Пізніше було встановлено, що РНК-полімераза I (не чутлива до аманітину) синтезує великі (28S і 18S) рибосомальні РНК, РНК-полімераза II (найбільш чутлива до аманітину) транскрибує гени, що кодують білки, а також гени малих ядерних РНК, а РНК-полімераза III відповідає за синтез 5S рРНК і тРНК.

РНК-полімерази I, II і III дріжджів мають три ідентичні по молекулярній масі субодиниці (27, 23 і 14,5 кДа). Дріжджові РНК-полімерази I і II містять також дві інші однакові по масі субодиниці (14 і 40 кДа). Інші відомі субодиниці у усіх трьох РНК-полімераз дріжджів помітно розрізняються за

молекулярною масою: 135 і 190 кДа – у РНК-полімерази I; 146, 150, 220 і 445 кДа – у РНК-полімерази II; 82, 128 і 160 кДа – у РНК-полімерази III.

Жодна з РНК-полімераз еукаріот не здатна самостійно зв'язуватися з промоторами генів, які транскрибує. Для приєднання до транскриптона еукаріот служать специфічні для кожної РНК-полімерази білкові чинники транскрипції (TF-чинники): РНК-полімерази I, II і III вимагають участі факторів транскрипції – TF1, TFII і TFIII відповідно. Велика латинська буква, яка зазвичай йде за римською цифрою, означає, яким за рахунком був виявлений цей чинник, наприклад, першим був виділений чинник транскрипції гена 5S рРНК, який транскрибується РНК-полімеразою III – TFIIIА.

Різні чинники транскрипції приєднуються до ДНК в різних місцях відносно точки початку транскрипції. Так, чинники TFID і TFIID зв'язуються з ДНК і утворюють комплекси з РНК-полімеразами перед сайтом початку транскрипції, а чинник TFIIС – відразу після відповідного сайту. Чинник TFIID, необхідний для багатьох промоторів РНК-полімерази II, називають ще ТАТА-чинником, оскільки він зв'язується з ТАТА-боксом, розташованим за 25 н.п. до сайту початку транскрипції.

Процесинг РНК.

Первинні РНК-транскрипти, які утворюються в результаті транскрипції, не завжди є функціонально активними молекулами РНК. Перш ніж стати активними вони повинні зазнати ряд модифікацій і перетворитися на зрілі РНК. Цей процес посттранскрипційної модифікації первинних транскриптів (РНК-попередників) називається процесингом і відбувається досить специфічно у різних видів РНК про- і еукаріот. У зв'язку з відмінностями реалізації генетичної інформації у прокариот і еукаріот, процесинг у прокариот обмежений, тоді як у еукаріот він є складно організованим процесом, який безпосередньо впливає на регуляцію експресії генетичного матеріалу в диференційованих клітинах вищих організмів. Найдетальніше вивчений процесинг м-РНК еукаріот, який включає три головні моменти: сплайсинг, кепірування 5'-кінця і поліаденілування 3'-кінця первинних транскриптів.

Сплайсинг (від англ. splice – сполучати кінці) полягає у вирізанні з про-м-РНК некодуючих ділянок – інтронів і зшивання кодуєчих ділянок – екзонів. Розрізняють декілька різних механізмів сплайсингу.

Кепірування – це утворенням на 5'-кінці мРНК особливої структури – кепа (шапочки). Кепірування відбувається незабаром після початку синтезу м-РНК і здійснюється за участю GTP, із складу якого GMP переноситься на 5'-дифосфат першого нуклеотиду м-РНК.

Поліаденілірування здійснюється ферментом полі (А)-полімеразою і призводить до утворення на 3'-кінці оліго(А)-фрагменту, який містить 100-200 залишків аденілової кислоти – «полі(А) – хвіст». Полі(А) – хвіст визначає стабільність мРНК і час її життя в клітині. Крім того, у еукаріот полі(А) – хвіст можливо сприяє виходу м-РНК з ядра в цитоплазму, а також є важливим для регуляції трансляції м-РНК.

Процесинг т-РНК і р-РНК у еукаріот.

Процесинг у еукаріот зачіпає усі види первинних транскриптів еукаріотних генів. Продукти транскрипції (про-т-РНК), містять інтрон поблизу антикодону. Вирізування цього інтрону і лігірування (зшивання) іншої частини молекули-попередника призводить до утворення зрілої т-РНК.

Процесинг м-РНК у еукаріот.

Посттранскрипційні модифікації про-м-РНК особливо важливі для еукаріот, що пов'язано з мозаїчною будовою їх генів, які містять некодуючі послідовності – інтрони. Чисельність інтронів в генах еукаріот може досягати декількох десятків, що диктує необхідність існування чіткої системи сплайсингу первинних транскриптів. У сплайсингу про-м-РНК у вищих еукаріот задіяний ряд білків, а також – малі ядерні РНК (мя-РНК). Малі ядерні РНК мають послідовності від 65 до 1000 і більше нуклеотидів (10S-90S), багатих уридиловими нуклеотидами, і тому називаються уРНК (U1, U2 і так далі). У дріжджів виявлене 25 різних мяРНК, у хребетних тварин – 15. У жаби

Xenopus laevis ряд малих ядерних РНК (мя-РНК) (U3, U8, U14 і U22) беруть участь в процесингу рибосомальних РНК, зв'язуючись з кінцевими ділянками спейсерів. Малі ядерні РНК виявлені не лише у хребетних тварин і дріжджів, а також у комах і архібактерій. Нуклеотидна послідовність усіх іРНК еукаріот співпадає більш ніж на 90%, що також відноситься до U1 людини і дрозофіли. Високий консерватизм структури іРНК говорить про те, що сплайсинг дуже давній процес, який почався з аутосплайсинга і трансформувався в сплайсинг за участю мяРНК. Гени мя-РНК транскрибуються РНК-полімеразою II і мають різну локалізацію в геномі: частина з них є дискретними незалежними генами, які не мають інтронів, тоді як гени інших мя-РНК розташовуються усередині інтронів генів, що кодують білки.

Альтернативний сплайсинг. Декілька інтронів, що містяться в м-РНК, можуть зшиватися в різних комбінаціях з утворенням різних матричних послідовностей. Така диференціація шляхів дозрівання м-РНК дістала назву альтернативного сплайсинга. Цей сплайсинг був вперше відкритий у аденовірусів, у яких частина кодуєчих послідовностей віддаляється подібно до інтронів, а 5'-кеп з'єднується з будь-яким з інших екзонів, і, таким чином, утворюються різні мРНК, які кодують різні білки. Цей вид сплайсингу дозволяє невеликої кількості первинних вірусних транскриптів кодувати значну кількість білків, необхідних для існування вірусу.

У еукаріот альтернативний сплайсинг м-РНК, які містять велику кількість інтронів, є ефективним способом регуляції активності генів, створює можливість для виникнення ізоформ білків, які можуть істотно розрізнятися в різних клітинах, тканинах і органах багатоклітинних організмів. Альтернативний сплайсинг дозволяє організму синтезувати різні за структурою та властивостями білки на базі одного гена. Такі гени кодують родини споріднених білків, що беруть участь в м'язових скороченнях, формуванні цитоскелету, нервових волокон, молекул імуноглобулінів, пептидних гормонів та ін.

Регуляція експресії генів

Контроль експресії генів здійснюється на усіх етапах експресії генів:

- на рівні транскрипції (контролюється час і характер транскрипції гена);
- на рівні процесингу первинного транскрипту;
- при транспорті зрілих м-РНК в цитоплазму;
- на рівні трансляції – відбір в цитоплазмі мРНК для трансляції на рибосомах
- на рівні деградації – вибіркова дестабілізація певних типів мРНК в цитоплазмі,
- на рівні активності білка – селективна активація, інактивація або компартментація молекул білка після їх синтезу.

Регуляція транскрипції. Регуляція транскрипції має важливе значення для розуміння механізмів диференціальної активності (експресії) генів в онтогенезі будь-якого про- і еукаріотичного організму. Шляхом регуляції генної експресії клітини пристосовуються до змін зовнішнього і внутрішнього середовища. Фенотип клітин визначається кількістю і властивостями продукованих ними структурних, каталітичних, регуляторних або інших класів білків. Повинна існувати ефективна система контролю реалізації генетичної інформації в клітині, яка б дозволяла в кожен момент підтримувати її функціональну активність синтезуючи достатню кількість різних білків.

Регуляція транскрипції у еукаріот. Інтенсивність транскрипції визначається просторовою структурою ДНК, в якій нерідко спостерігаються вигини, петлі (домени), а також надспіралізовані ділянки. Усі ці мотивні структури ДНК сприяють посиленню транскрипції, оскільки створюють додаткові можливості для приєднання до ДНК різноманітних білків-регуляторів транскрипції. Ці білки здатні зв'язуватися з певними нуклеотидними послідовностями ДНК, розташованими як в самих транскриптонах, так і в інших, нерідко досить віддалених від зони транскрипції областях, що носять назву енхансерів (підсилювачів) адапторних елементів. У останньому випадку

дія регуляторних елементів генома може опосередкуватися особливими білками, сприяючими посиленню або послабленню інтенсивності транскрипції. Самі білки-регулятори транскрипції набувають або втрачають функціональну активність в результаті модифікацій, що викликають каталітично активні білки-ферменти, або виникають при з'єднанні з речовинами небілкової природи, які модулюють їх регуляторні властивості. У прокариот в регуляції транскрипції безпосередньо беруть участь різні клітинні метаболіти і транскрипція безпосередньо пов'язана з змінами структури хроматину. Перехід цього комплексу в активну форму є додатковим елементом регуляції транскрипції у вищих організмів.

Адапторні елементи генома еукаріот проявляють вибіркова чутливість по відношенню до стероїдних гормонів, cAMP, глюкокортикоїдів. Вони специфічно регулюють клітинну відповідь на тепловий шок, дію металів (Cd^{2+} , Zn^{2+}) і деяких хімічних сполук (нп., діоксину).

Адапторні елементи мають специфічні нуклеотидні послідовності, які впізнають білки. Так, наприклад, чинник транскрипції білків теплового шоку впізнає в ДНК послідовність CNNGAANNTTCNNG (де N – будь-який нуклеотид), а глюкокортикоїдний білок-рецептор зв'язується з ДНК в області послідовності TGTTCST. В області промоторів багатьох еукаріотичних генів виявлений СААТ-бокс – елемент, що регулює частоту ініціації транскрипції. Результати вивчення енхансерів, які видалені іноді на значні відстані (до 20 тис. н.п.) від промоторів, а також регуляторних ділянок поблизу промоторів, дозволили зробити деякі узагальнення. По-перше, регуляторні послідовності в ДНК мають модульну будову і складаються з серії певних нуклеотидних послідовностей.

Епігенетична регуляція експресії генів.

Епігенетика вивчає спадкові зміни в фенотипі або в експресії генів, що зумовлені іншими, не генетичними механізмами. Найкращим прикладом епігенетичних змін у еукаріот є процес диференціації клітин. На сучасному етапі розвитку науки виявлена низка епігенетичних феноменів, до яких

належать ефект положення, парамутація, трансвенція, РНК-інтерференція, пріонізації білків, супресія транспозонів, геномний імпринтинг, особливий стан хроматину, метилювання ДНК і інактивація X-хромосоми.

Процеси, що керують програмою розвитку, називаються *епігенетичними*. Можливо, програма розвитку, закладена в генах зародка, «включає» або «вимикає» їх (на певний час або назавжди) у заздалегідь заданій послідовності. При цьому змінюється склад білків у клітинах, що знову формуються, і тим самим змінюються властивості клітин. Наявність програми розвитку не пояснює, чому доля перших клітин різна. На ДНК повинен діяти якийсь процес, що керує розгортанням програми, та відбирає ті або інші гени для «включення» або «вимкнення» в даній клітині на цей час. Без цього всі соматичні клітини тіла, які мають одноковий геном, розвивалися б однаково. Крім того, щось повинно керувати передачею розподілу станів «включений-вимкнений» між генами від одного покоління клітин до іншого. Дочірнім клітинам призначається зберегти рівень диференціювання батьківської клітини або перейти до спеціалізації.

З генетичної точки зору питання про причини диференціювання трильйонів (10^{12}) тотипотентних клітин організму людини зводиться до проблеми диференціальної експресії генів у різних клітинах організму, який розвивається. Зрозуміло, що стабільна підтримка цих відмінностей зумовлена епігенетичним контролем генної експресії. На теперішній час під епігенетичною мінливістю розуміють зміну експресії генів без зміни первинної структури ДНК. Епігенетична регуляція – це модифікація генної експресії, яка зумовлена потенційно зворотними змінами у структурі хроматину в результаті метилювання ДНК.

Інтенсивні дослідження регуляції активності генів різних видів мікроорганізмів, рослин, комах, тварин і людини, секвенування геномів, привели до відкриття різних епігенетичних процесів. Експресія генів в багатьох випадках активно регулюється, змінюючи час та кількість синтезованого генетичного продукту. Кілька етапів у процесі експресії генів можуть

модулюватися, зокрема транскрипція і посттрансляційна модифікація. Регулювання експресії генів надає клітині контроль за кількістю та структурою синтезованих біополімерів і основою диференціації клітин, морфогенезу і адаптації організму до умов навколишнього середовища. Більшість генів людини здатні продукувати різні поліпептиди в клітинах різних тканин і на різних стадіях онтогенезу. Наприклад, один з генів у клітинах щитоподібної залози продукує фермент, який знижує вміст кальцію в крові, а в клітинах гіпоталамуса він утворює поліпептид, який розширює судини.

Лекція 2.

Тема 2. Загальна характеристика моногенної патології. Генетика окремих форм моногенних хвороб. Спадкові хвороби обміну. Сучасна класифікація, коротка характеристика груп.

План.

1. Загальна характеристика моногенної патології. Генетика окремих форм моногенних хвороб.
2. Спадкові хвороби обміну. Генетичні розлади обміну амінокислот. Генетичні розлади обміну вуглеводів. Генетичні розлади обміну ліпідів.

У цій категорії відправною точкою є мутація – зміна одного гена. Наступне питання, як зміни в послідовності одного гена можуть привести до серйозних розладів. Гени кодують білки, які є одними з найбільш важливих інструментів для живих істот, та є складовими в структурі клітин. В результаті мутації, що відбувається в частині гена, який кодує функціональну частину білка, міняється структура білка. Білок вже не виконує свої функції коректно, внаслідок чого відбуваються важкі зміни в організмі. На сьогодні відомо близько 6000 моногенних порушень, і за підрахунками вчених, 1 із 200 новонароджених дітей має таку хворобу. Приклади можуть слугувати такі захворювання, як серповидноклітинна анемія, муковісцидоз, синдром Айкарді, хвороба Хантінгтона.

Серповидно-клітинна хвороба (СКХ) або серповидно-клітинна анемія (або анемія, СКА) або дрепаноцитоз – це аутосомно-рецесивне наддомінантне генетичне захворювання крові, яке характеризується неправильною, стійкою, серповидною формою червоних кров'яних клітин (еритроцитів). Серповидність клітин зменшує їх гнучкість та еластичність, що збільшує ризик виникнення різних ускладнень. Причиною появи клітин серповидної форми є мутації в гені гемоглобіну. Як наслідок скорочується очікувана тривалість життя, в середньому вона складає 42 роки у чоловіків і 48 у жінок.

Серповидно-клітинна анемія, як правило, проявляється в дитинстві, частіше зустрічається у людей (або їх нащадків) з *тропічних та субтропічних*

регіонів, які є ендемічними, щодо малярії. Одна третина всіх корінних жителів Африки на південь від Сахари є носіями гену. У зв'язку з тим, що малярія є поширеним захворюванням у цьому регіоні носії одного гену хвороби володіють підвищеною стійкістю до виживання (серповидно-клітинна особливість). Ті, у кого є тільки одна з двох алелей серповидно-клітинної анемії, хоча є менш стійкими у них спостерігається більша стійкість організму до інфекції при зараженні.

За даними Національного інституту здоров'я поширеність цього захворювання в США складає приблизно 1 випадок на 5000 жителів, переважно ураженими є американці африканського походження з півдня Сахари. У Сполучених Штатах приблизно у однієї особи з 500 новонароджених негроїдної раси мають серповидно-клітинну анемію.

Дрепаноцитоз (серповидно-клітинна анемія) – назва специфічної форми серповидно-клітинної хвороби, при якій гомозиготність мутації спричиняє появу гемоглобіну S (HbS). Цей тип серповидно-клітинної анемії, також відомий як «HbSS», «SS хвороба», «гемоглобін S», дрепаноцитарна анемія, серповидноклітинна гемолітична анемія, африканська анемія, меніскоцитоз або синдром Херіка (Геріка). Гетерозиготи, які мають тільки один серповидний ген та один нормальний ген гемоглобіну, називають "HbAS". Інші, більш *рідкісні форми захворювання* включають: серповидне захворювання гемоглобіну C (HbSC), серповидну бета-плюс (HbS/β+) та бета-нуль (HbS/β0) таласемії. Ці форми серповидно-клітинної анемії характеризуються явищем поєднаної гетерозиготності, при якій особа має тільки одну копію мутованого гена, який спричиняє HbS та одну копію іншої дефектної алелі гемоглобіну.

Серповидно-клітинне захворювання може призвести до виникнення різних гострих і хронічних ускладнень, деякі з них є потенційно смертельними.

Серповидно-клітинна анемія може призвести до різних ускладнень, в тому числі: нездоланної пост-(авто) спленектомічної інфекції (OPSI), яка пов'язана з функціональною аспленією, яка викликана інкапсульованими організмами, такими як пневмокок (*Streptococcus pneumoniae*) та гемофільною

паличкою (*Haemophilus influenzae*). Поширеним засобом профілактики виникнення цих захворювань у дитинстві є щоденне вживання пеніциліну (або інших антибіотиків з цієї групи), але деякі лікарі гематологи продовжують курс лікування на невизначений термін. Пацієнти сьогодні отримують користь від планової вакцинації, яка проводиться проти *H. Influenzae* (гемофілійної палички), *S. Pneumoniae* (пневмококу) і *Neisseria meningitidis* (менінгококу); В результаті прогресивного звуження кровоносних судин, що призводить до порушення процесу надходження кисню в мозок, може виникнути інсульт. У дітей зустрічається інфаркт мозку (ішемічний інсульт), а у дорослих трапляються випадки крововиливу в мозок; жовчнокам'яна хвороба (камені в жовчному міхурі) і холецистит, можуть виникнути в результаті надмірного утворення і випадіння осаду білірубіну спричинений довготривалим гемолізом; асептичний некроз (асептичний некроз кістки) стегна та ділянок кісток поблизу інших великих суглобів, може бути спричинений ішемією; зниження імунних реакцій у зв'язку з гіпоспленізмом (*hyposplenism*) (який має наслідком порушення роботи селезінки); пріапізм (тривала, зазвичай болюча ерекція, не пов'язана з статевим збудженням) та інфаркт пеніса (перманентна імпотенція); остеомієліт (інфекційне захворювання кісткової тканини); найбільш поширеною причиною остеомієліту при серповидно-клітинній анемії є дія *сальмонели* (*Salmonella*), (особливо нестандартних серотипів таких як *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* і *Salmonella paratyphi B*), вплив *золотистого стафілококу* і *грамнегативних кишкових бацил* призводить до внутрішньосудинного утворення серповидно-клітинних еритроцитів у судинах кишки, що іноді спричиняє ішемічний інфаркт; гострий папілярний некроз нирок; трофічні виразки на ногах; щодо очей, то тут спостерігається фонова ретинопатія, проліферативна ретинопатія, крововилив у скловидне тіло, розшарування сітківки, що в результаті призводить до сліпоти. Саме тому, хворим рекомендується проходити щорічну перевірку очей; легенева гіпертензія (підвищений тиск у легеневій артерії), призводить до деформації (гіпертрофії та дилатації) правого шлуночка і

підвищує ризик виникнення серцевої недостатності; типовими симптомами є задишка, зниження толерантності до фізичного навантаження та напади непритомності, зустрічаються периферичні набряки. Хронічна ниркова недостатність при серповидно-клітинній нефропатії- проявляється гіпертонією (високим кров'яним тиском), протеїнурією (наявність білка в сечі), гематурією (наявність еритроцитів у сечі) і прогресивною анемією. Якщо вона прогресує на кінцевій стадії ниркової недостатності, то прогноз розвитку захворювання у таких хворих дуже негативний.

Гетерозиготні форми захворювання майже завжди протікають безсимптомно, для них характерні лише прояви ниркової концентрації, які проявляються у вигляді ізостенурії.

Серповидно-клітинна анемія викликана точковою мутацією ланцюга β -глобіну у гемоглобіні. Ця мутація полягає у тому, що у шостій позиції гідрофільні амінокислоти глютамінової кислоти замінюються гідрофобними амінокислотами валіну. Ген β -глобіну знаходиться на короткому плечі 11 хромосоми. Об'єднання двох субодиниць α -глобіну дикого типу з двома мутантними субодиницями β -глобіну призводить до утворення гемоглобіну S (HbS). У ситуаціях коли вміст кисню у повітрі дуже низький (наприклад на великій висоті), відсутність полярної амінокислоти на шостій позиції у ланцюзі β -глобіну призводить до нековалентної полімеризації (агрегації) гемоглобіну, внаслідок чого змінюється форма червоних кров'яних тілець (вони стають схожими на серп) та суттєво зменшується їх еластичність. Втрата еластичності червоних клітин крові займає центральне місце у патофізіології серповидно-клітинної анемії. *Нормальні червоні кров'яні клітини* досить еластичні, це дає їм змогу змінювати форму для того, щоб пройти через капіляри. При серповидно-клітинній анемії, недостатність кисню сприяє утворенню серповидно-клітинних еритроцитів, повторення таких процесів призводить до пошкодження клітинної мембрани і зниження еластичності клітин. Тобто, ці клітини не можуть повернутися до своєї нормальної форми навіть після того, як рівень кисню стане нормальним. Як наслідок, новоутворені клітини – дуже жорсткі і не

можуть змінювати свою форму, а оскільки вони проходять через вузькі капіляри, то це спричиняє оклюзію судин та ішемію.

Генна мутація, яка викликає серповидно-клітинну анемію, ймовірно виникла спонтанно в різних географічних районах, це припущення ґрунтується на *рестрикційному аналізі ендонуклеази*. Ці варіації зустрічаються серед населення Камеруну, Сенегалу, Беніну, народів банту та азіатів Саудівської Аравії. Їх клінічне значення полягає в тому, що для деяких з них характерний більш високий рівень HbF, наприклад, при мутації, яка поширена в Сенегалі та Саудівсько-азіатському регіоні, захворювання, як правило, має більш м'яку форму. У людей, гетерозиготних за HgbS (носії захворювання), проблеми, які виникають через полімеризацію - незначні, адже нормальна алель може виробляти більше 50% гемоглобіну. В осіб, гомозиготних за HgbS, наявність довгих HbS полімерів призводить до спотворення форми еритроцитів. Форма двояко-ввігнутого диска з гладкою поверхнею змінюється на нерівну з великою кількістю шипів, це призводить до того що клітини стають крихкими і тріскають в капілярах.

Муковісцидоз

Генетично детерміноване захворювання, яке виникає внаслідок порушення видільної функції екзокринних залоз та у першу чергу уражає дихальну систему та шлунково-кишковий тракт. Спричинюється мутацією гену, котрий кодує мембранний білок «трансмембранний регулятор муковісцидозу» (CFTR), який є каналом іонів хлору у мембранах епітеліальних клітин, регулятором інших іонних каналів і відповідає за транспортування бікарбонатів. Найбільш поширеною ($\approx 66\%$) аномалією гена CFTR є F508del. Внаслідок відсутності синтезу або синтезу патологічного білка блокується або порушується транспорт хлору з клітини і збільшення абсорбції натрію у клітину, що призводить до зменшення вмісту води у секретах екзокринних залоз. Невеликий об'єм періапікальної епітеліальної рідини запобігає правильному мукоциліарному кліренсу, а велика концентрація NaCl та зміна рН рідини зменшує активність ферментів, що беруть участь у захисті від інфекцій.

Муковісцидоз – аутосомне, рецесивне, спадкове захворювання екзокринної залози. Воно уражає легені, потові залози та травну систему, спричинюючи хронічні респіраторні та травні проблеми. Муковісцидоз породжує мутація у протеїні *ABCC7* (інша назва *CFTR* (англ. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Це найчастіше фетальне аутосомне захворювання в осіб європеїдної раси.

Муковісцидоз – найпоширеніше моногенне спадкове захворювання з аутосомно-рецесивним типом успадкування, яке можна охарактеризувати як універсальну екзокринопатію. Основними проявами є: хронічний обструктивний процес в дихальних шляхах, що супроводжується рекурентною бактеріальною інфекцією, порушення травної системи з недостатністю екзокринної функції підшлункової залози, підвищений вміст електролітів в потовій рідині та обструктивна азооспермія у чоловіків, що обумовлена вродженою агенезією сім'явиносних протоків.

В Україні частота муковісцидозу становить 1 на 2300 новонароджених, тобто, кожний рік народжується 250-300 хворих дітей. У світі щороку реєструють більш 45000 випадків муковісцидозу у дітей. Частота носіїв гена муковісцидозу – 3-4 %. Всього на Землі близько 275 млн людей-носіїв цього гена. Етіологічно причиною характерних патологічних змін в організмі хворого є наявність мутацій в обох алелях гена, локалізованого на довгому плечі хромосоми 7 (7q31). Цей ген контролює синтез трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу (*CFTR*), який функціонує, як регульований циклічним аденозинмонофосфатом хлорний канал на апікальній поверхні епітеліальних клітин. Основний ферментативний дефект при МВ невідомий. Є докази, що це спадкова хвороба, яка передається по аутосомно-рецесивному типу. У патогенезі ведучим є порушення іонного транспорту через апікальну мембрану клітин епітелію спричиняє зневоднення секрету екзокринних залоз. Порушення підшлункової залози призводить до згущення секрету і закупорки вивідних проток, зменшення кількості бікарбонатів, зниження активності

панкреатичної ліпази. Стадія повного рубцювання підшлункової залози може спостерігатися у дітей вже у віці 2-3 років.

Хвороба Гантінгтона (ХГ) є хронічним, нейро-дегенеративним захворюванням головного мозку. Це означає, що нервові клітини мозку руйнуються протягом тривалого часу. Зазвичай, хвороба починається у віці від 30 до 50 років, але може виникнути і в молодшому віці. ХГ впливає на такі речі, як: рухи, поведінку, мислення, розуміння, навчання, пам'ять. Найбільш поширеним симптомом є неконтрольовані рухи, що називаються «хорея». Рухи під час хореї виглядають дещо схожими на танець. Інші симптоми можуть включати в себе проблеми з мовленням та ходою. Можуть виникнути також і наступні ускладнення, такі як втрата пам'яті, погана концентрація уваги, надмірна імпульсивність, депресія та відсутність інтересу до життя, порушення сну, проблеми сексуального характеру, труднощі з ковтанням, падіння. На початку захворювання легкі когнітивні, емоційні чи поведінкові порушення можуть виникнути задовго до симптомів, які виявляються під час лікарського огляду. ХГ може бути викликана змінами в структурі ділянки певного гена. Це спричиняє поширену загибель нервових клітин мозку. Чим більші повторні збільшення цієї патологічно зміненої ділянки, тим раніше починається ХГ. Генетичне тестування на наявність таких дефектних генів може підтвердити діагноз. ХГ може бути успадкованою. Успадковуються набори генів: один ген матері і один – батька. Якщо один з батьків є носієм ураженого гену, то кожна його дитина має 50% шанс успадкувати ХГ.

Генні (молекулярні) хвороби.

Причиною є порушення структури ДНК на молекулярному рівні. Наслідком цього є генні хвороби, пов'язані з генетичними розладами обміну амінокислот, вуглеводів та ліпідів.

Генетичні розлади обміну амінокислот.

1. Фенілкетонурія.

Захворювання викликане нестачею ферменту фенілаланінгідроксилози, що перетворює фенілаланін в тирозин. При цьому фенілаланін переходить в

фенілпіровиноградну кислоту, що виділяється з сечею. Хвороба вперше описана в 1934 р. Фелінгом у двох братів з слабим розумовим і фізичним розвитком. При реакції сечі з FeCl_3 з'являється оливково-зеленого колір – позитивна проба Фелінга. Частота фенілкетонурії – $8-10^5$, серед психічно хворих – 0,5–1%.

Клінічні симптоми: стан загального збудження, м'язова гіпертонія, гіперрефлексія, тремор, аномалії енцефалограм, гіперкінезія, мікроенцефалія. Часто не можуть ходити і говорити. Характерне світле забарвлення волосся, голубі очі, блідість шкір. Найважливіше – розумова відсталість, оскільки в тканинах мозку нагромаджується α -фенілаланін, що поступає з білком їжі. Раннє лікування може попередити недугу мозку. Фенілкетонурія – важке захворювання, для ранньої діагностики в пологових будинках застосовують пробу Фелінга. Раннє лікування дає можливість через кілька років полегшити дієту або згодом відмінити її. Дієтичне харчування включає 19 амінокислот, за виключенням фенілаланіну.

2. Тирозиноз.

Дефект – зниження активності або нестача тирозинтрансамінази, при цьому блокується основний метаболічний шлях тирозин-парагідрооксифенілпіровиноградна кислота не переходить в гомогентизинову, внаслідок чого збільшується виділення з сечею 3,4-диоксифенілаланіну (ДОФА). Клінічні симптоми: блювота, пронос, відставання фізичного розвитку; при гострій формі смерть в 6–7 місяців, При хронічній – через печінку, зміни в кістках. У крові високий вміст тирозину. Діагностують за надміром в сечі параоксифенілпіровиноградної кислоти. Успадковується за аутосомно-рецесивним типом.

3. Алкаптонурия.

Зумовлена нестачею ферменту оксидази гомогентизинової кислоти. Вперше описано Схрібоніусом у 1584р. Часто діагностується у старших дітей і зберігається протягом життя. Сполучна тканина темніє. Охроноз спостерігається в хрящах вуха, носа, суглобах внаслідок відкладання

гомогентизинової кислоти. У молодому віці алкаптонурія проходить безсимптомно. У зрілому – розвивається алкаптонуричні артрити, тупі болі в попереку, рухомість суглобів поперекового відділу хребта обмежена, рентгенографічно виявляється кальцифікація міжхребцевих дисків і звуження міжхребцевих щілин в грудному і поперековому відділах. Після 50 років розвиваються артрити великих суглобів. У хрящах відкладається як аутосомно-рецесивний, не виключений неповний прояв гена. Частота хвороби. 5×10^6 . Хлопчики хворіють удвічі частіше. Хвороба відома ~3,5 тисяч років.

4. Альбінізм.

Недостатня активність ферменту тирозинази перешкоджає перетворенню тирозину в меланін. Вперше хвороба описано Плінієм. Частоти 1:10000 – 1:120000. Альбінізм описаний у всіх народів, зустрічається і в тварин. Хвороба обумовлена не повною відсутністю тирозинази, а значним зменшенням її активності. Клінічні симптоми: молочно-білий колір шкіри, світле волосся, брови, вії, блідо-голуба райдужна оболонка, часто короткозорість, іноді мікроофтальмія, відсутність кристалика. Для альбіносів властива фотофобія – ходять з опущеною головою, напівзакритими очима, часто кон'юнктивіт. Розумовий розвиток не змінений, але може бути сповільнений в зв'язку з погіршенням зору. Успадковується аутосомно-рецесивно. Є генетична гетерогенність. Виявлено альбінізм з нормальною активністю тирозинази. Часом при шлюбі альбіносів народжується пігментовані діти – це випадок неалельності генів альбінізму (генокопія). Частота альбінізму 1:5000–1:25000. Альбінізм має генокопії, тобто фенотипові (клінічні) ознаки однакові, але причина хвороби залежить від мутації різних генів. Успадкування як аутосомно-домінантна або аутосомно-рецесивна ознака.

5. Цистиноз.

Порушений обмін цистину, що нагромаджується у великих кількостях в тканинах і органах (перевищує норму цистину в 100-300 разів).

Клінічні симптоми: нагадує синдром Фалконі: рахіт, резистентність до вітаміну D, гіперфосфатомія, ацидоз. Захворювання виявляється в 4-6 місяці:

загальмований ріст, блювота, лихоманка, поліурія, обезводнення організму, а у дорослих – множинні переломи. Успадкування за аутосомно–рецесивним типом.

6. Лейциноз (хвороба клинового сиропу).

Блокується декарбоксілювання α -кетокислот. Наслідок – нагромадження α -кетокислот та амінокислот з розгалуженим ланцюгом, що надає сечі солодкий запах.

Клінічні симптоми: блювота, ригідність м'язів. Смерть настає в перші тижні життя від дегенеративних змін в мозку. Успадкування за аутосомно–рецесивним типом.

7. Гістидинемія.

Недостача ферменту гістадази, тому гістидин не перетворюється в уроканінову кислоту. Продукти похідних гістидину збільшуються, що токсично впливає на центральну нервову систему.

Клінічні симптоми: голубоокі, з світлим волоссям, відставання у фізичному та розумовому розвитку. При позитивній реакції з хлорним залізом не виявляється фенілаланіну, лише гістидин і його похідні. У плазмі крові – збільшений вміст гістидину. Лікування дієтичне: з харчування виключають продукти, що містять гістидин. Успадкування за аутосомно–рецесивним типом.

8. Цитрулінемія.

Нестача ферменту синтезу аргініноянтарної кислоти. Цитрулін не перетворюється в аргініноянтарну кислоту.

Клінічні симптоми: розумова відсталість, затримка росту кісток скелета, збільшення печінки, атрофія мозку. У плазмі крові – підвищений вміст цитруліну. Успадкування за аутосомно-рецесивним типом.

9. Гіперпролінемія.

Розлад обміну проліну. Для одної форми властива розумова відсталість і відставання у масі тіла та рості; в плазмі високий вміст проліну. Для іншої форми властива розумова відсталість, глухота, електро–енцефалографічні зміни. Успадкування аутосомно–рецесивне, іноді домінантний тип.

10. Гомоцистинурія.

Нестача ферменту цистатіонсинтетази, що змінює обмін метіоніну. В організм нагромаджується гомоцистин. Клінічні симптоми: дефект зору, катаракта, глаукома, атрофія зорового нерва, зміни в будові скелета. Є різні фенотипові форми – і клінічний поліморфізм. Характерна ознака: розумова відсталість.

Фенотипово гомоцистинурію легко сплутати з синдромом Морфана, однак при цьому синдромі є високий інтелект. За даними В.Ефроміна синдром Морфана був у Г.Андерсена і А. Лінкольна. Синдром Морфана успадкування як аутосомно–домінантна, а гомоцистинурія як аутосомно–рецесивна ознака.

Генетичні розлади обміну вуглеводів.

1. Цукровий діабет.

Підвищена концентрація цукру в крові. Гострий діабет розвивається при недостатньому утворенні інсуліну в клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. У родичів хворих на діабет рівень синальбуміну в крові вищий. Успадкування за аутосомно–рецесивним типом або неповне домінантне успадкування. Частота мутантного гена – 4-5%. Пенетрантність гена для жінок – 90%, для чоловіків – 70%. Є генокопії. Популяційний та близнюковий методи дослідження вказують на роль спадковості в прояві хвороби. Діабетом хворіє 58% партнерів хворого серед однойцевих близнюків, а серед двояцевих – 18%. Допускають, що існує генетична різнорідність між його ювенільною формою і діабетом у зрілому віці. Ювенільна форма успадковується за аутосомно–рецесивним типом, у зрілому віці – за аутосомно–домінантним, оскільки захворювання проявляється в гетерозиготному стані. Допускають неповне домінування.

Є 3 генні форми діабету:

- Ювенільна з аутосомно–рецесивним типом успадкування
- Діабет середнього віку, зумовлений гетерозиготним станом рецесивного гена

- Діабет похилого віку, що успадковується полігенно і супроводжується атеросклерозом і гіпертонією

2. Фруктозурія.

Нестача ферменту фруктозо-1-фосфатаальдолази печінки, при якій не засвоюється глюкоза. В гомозигот під час вживання продуктів з фруктозою розвивається гіпоглікемія, нудота, блювота, пітливість, корчі, у малих дітей – затримка росту, розумового розвитку, жовтяниця, можлива смерть. При усуненні з харчів фруктози стан поліпшується. Діагноз ставлять на основі виявлення фруктози в сечі. При вчасній діагностиці затримку фізичного і розумового розвитку можна попередити.

3. Галактоземія.

Нестача ферменту галактозо-1-фосфатуридилтрансферази, не проходить перетворення галактозо-1-фосфату. Організм не здатен використовувати галактозу. З сечею виділяються амінокислоти, білки. Виявляють хворобу у дітей – непереносимість лактози. При годуванні молоком у дитини виникає блювота, пронос, зневоднення, слабкий розвиток внутрішніх органів, смерть. Спостерігається гіпоглікемія, В еритроцитах нема галактозо-1-фосфатуридилтрансферази. При вчасній діагностиці дитина розвивається нормально. З віком дефект обміну слабшає і набуває здатності утилізувати галактозу. Успадкування за аутосомно-рецесивним типом.

4. Глікогенози.

Є 7 різних аутосомно-рецесивних форм розладу циклу глікогену. Всім формам властива хвороба Гірке.

Хвороба Гірке.

Дефект глюкозо-6-фосфатази, внаслідок чого глюкозо-6-фосфат не перетворюється в глюкозу.

В гомозигот хвороба виявляється на 1-му році життя. Симптоми хвороби: слабкість, кволість, зниження м'язової активності, відставання росту, збільшення печінки і нирок. Часто жовтяниця, схильність до ожиріння. В лейкоцитах надмір глікогену. В печінці і нирках відкладається глікоген, що

веде до їх збільшення. В гетерозигот клінічних ознак нема, проте в еритроцитах є надмір глюкозо–6–фосфату.

Хвороба Помпе.

Хвороба Форбса.

Хвороба Андерсена.

Хвороба Мак–Ардля–Шмід–Пірсона

Хвороба – глікогеноз, спричинений нестачею фосфофруктокінази.

5. Целіакія.

Хвороба індукована глютеїном, зміною слизової кишківника. Клінічні ознаки проявляються, коли харчування містить глютеїн, при його виключенні з раціону здоров'я відновлюється. За сучасними даними у виникненні целіакії велике значення мають імунні механізми.

Дослідження вказують, що фараон Тутанхамон хворів целіакією (помер у віці 18 років). В усипальні знайдено мумії двох новонароджених дітей від шлюбу Тутанхамона з Аксенамон, яка була його племінницею, вони теж загинули від цієї недуги.

6. Мукополісахаридози – гаргоїлізм.

Причина – нагромадження мукополісахаридів в різних органах. Успадкування за аутосомно–рецесивним типом, винятком є синдром Гентера, зчеплений зі статтю. Клінічні симптоми: множинний дизостоз, аномальна мукополісахаридурія; карликовий зріст, непропорційно велика голова з деформованими обрисами, коротка і товста шия, грубі риси обличчя, деформація скелету, обмежена рухливість суглобів, психічна відсталість, пахвинні і пупкові грижі, помутніння рогівки, вади серця, глухота. Підвищений вміст в сечі кислих мукополісахаридів.

Ознаки хвороби виявляються на першому році життя, рідше у 3–4 роки. Є 6 типів мукополісахаридозів. Успадковуються аутосомно–рецесивно, крім синдрому Гентера, який успадковується зчеплено з X–хромосою. Вирізняють:

- Синдром Гентера: хворі доживають до 30-35 років, успадкування рецесивне, зчеплено з X-хромосоною.

- Синдром Гурлера.
- Тип Санфіліно.
- Тип Моркіо.
- Тип Ульріх–Шейє.
- Тип Марто–Гамі.
- ***Синдром Гурлера.***

Порушується синтез α -ідуронідази, при цьому в організмі нагромаджується гепарин, дерматансульфат (мукополісахариди). Хвороба проявляється на 2-му році життя у вигляді порушення психічного розвитку та змін скелету. Ознаками хвороби є: випуклий лоб, плоский ніс, товсті губи і шия, збільшений язик, дрібні зуби, деформовані вушні раковини, короткий тулуб, деформована грудна клітка. Крім цього, обмежена рухливість, гепатоспленомегалія, пахові та пупкові грижі, помутніння рогівки, вади серця. Діагностується методом дослідження сечі, в якій підвищений вміст кислих мукополісахаридів. Понижений вміст α -ідуронідази в лейкоцитах, фібробластах, в клітинах амніотичної рідини.

Генетичні розлади обміну ліпідів

Розлади обміну жирів – фосфо- і гліколіпідів – зумовлені генетично детермінованою нестачею ферментів, що беруть участь в їх метаболізмі. Нестача ферментів призводить до нагромадження ліпідів всередині клітини або розладу провідних шляхів мозку.

Ліпідози – хвороби внутрішньоклітинного нагромадження ліпідів. Сюди відносять різні форми: гангліозидози (амавротична ідіопатія Тея–Сакса, GM₁, GM₂, ювенільна ідіопатія Шпільмельєра–Фогта), сфінгомелідоз (хвороба Німана–Піка), глюкоцереброзидоз (хвороба Гоше). Хвороби з розладом обміну ліпідів, що пов'язані з розладом мієліну утворює групу лейкодистрофій (метахроматична, глобоїдноклітинна, судинофільна).

Гіперліпідемія – це група недуг, для яких властивий високий вміст ліпідів в крові, їх є 5 основних типів.

1. Інфантильна амавротична ідіотія – хвороба Тея–Сакса (гангліозидоз).

Нестача ферменту гексозамінідази А, що бере участь і обміні гангліозидів в клітині гангліїв. Фермент блокує обмін гангліозидів і вони відкладаються в надмірі в клітинах гангліїв і спричинюється їх розпад. Ліпіди захоплюються клітинами нейроглії, які проліферують, відкладаються в клітині сірої речовини головного мозку, печінки, селезінки, сітківки. Це веде до розумової відсталості, парезу кінцівок, послаблення зору до повної сліпоти. Відзначається посилена рухова реакція на слухові подразники – здригання, піднімання рук догори, розгинання ніг. Властиві напади сміху або плачу із судомами.

Хворобою страждають лише гомозиготи за рецесивним геном. Тип успадкування – аутосомно–рецесивний. Частота хвороби 1:5000, смерть настає в 2–4 роки.

2. Ювенільна амавротична ідіопатія Шпільмелера–Фогта (гангліозидоз).

Хвороба починається у дітей 6–10 років із стрімким падінням зору, послаблення розумових здібностей. На кінець настає повна сліпота і ідіотія. У хворих підсилюється м'язовий тонус, епілептичні напади, обтяжена ходьба, погіршена мова. Смерть між 14–20 роками життя. Збільшення в нейронах β -гангліозидів в 5–10 разів у порівнянні з нормою. Частота захворювань 1:40000, хвороба проявляється при кровноспоріднених шлюбах. Тип успадкування аутосомно–рецесивний. Є 4 типи: I – ранній інфантильний, II – пізній інфантильний (Більшовського–Янського), III – ювенільна ідіопатія Шпільмелера–Фогта, IV – дорослий тип Куфса.

3. Сфінгомієлідоз – хвороба Німана – Піка.

Послаблення ферменту (в 15раз) виключає нагромадження сфінгомієліна в нервових та інших тканинах. З'являються великі ретикулоендотеліальні клітини. Німана–Піка, що мають пінистий вигляд і містять велику кількість

жирових крапель. У хворих дітей проходять зміни травлення, зникає підшкірна жирова клітковина, погіршується координація, з'являється тремтіння, судоми. Вишнево-червона пляма на очному дні – у 20–60% хворих. Вмирають через 2–3 роки після початку хвороби. Тип успадкування аутосомно-рецесивний, у 30% хворих – кровна спорідненість батьків.

4. Глюцереброзидоз – хвороба Гоше.

Нестача ферментативної активності глюкоцеребразидази (β -глюкозидази), що зумовлює розпад глюкоцеребридів. Церамідглюкозида відкладаються у клітинах печінки, селезінки, кісткового та головного мозку, лімфовузлах. Захворювання проявляється в 3–4 типах:

I – Хронічний вісцеральний у дорослих розвивається з дитинства, перебіг повільний, смерть в 20–50 років

II – гострий ранньо-дитячий, починається з 1-го року і закінчується смертю в 2 роки.

III – Підгострий юнацький, починається в підлітковому віці. Ці форми зумовлені різними неалельними генами, клінічні прояви різні. Ознаки спільні для двох форм – ураження кісток і нервової системи, затримка фізичного і психічного розвитку.

Захворювання успадковується за аутосомно-рецесивним типом, часом у гетерозигот (пізня форма) буває домінуючий тип успадкування. Ранньо-дитяче успадкування аутосомно-рецесивне. При хронічно-вісцеральному типі захворювання – аутосомно-домінуючий тип успадкування.

5. Гліколіпідний ліпідоз – хвороба Фарбі.

Нестача α -галактозидази, що гідролізує церамідтригексозиди. Клінічні симптоми: болі в животі і кінцівках, лихоманка. На губах кон'юктиви, шкірно – судинні зміни, пурпурово-червона висипка. Пізня фаза хвороби виявляється гіпертонією, уремією, ураженням нервової системи, помутнінням рогівки. В кістковому мозку, печінці, селезінці наявні піністі макрофаги, іноді й в сечі. Захворювання зчеплене з X-хромосомою. Не повністю рецесивне, бо хворіють і жінки.

6. Лейкодистрофія.

Група дифузних склерозів, які розвиваються внаслідок розладу метаболізму жирів, що містяться в мієліні. Ліпіди нагромаджуються в нервових волокнах, і клітини гинуть. Головний мозок уражається. Клінічні симптоми: спастичні паралічі, мозочкові розлади, атрофія зорового нерва, послаблення слуху, прогресуюча розумова відсталість. Успадкування за аутосомно-рецесивним типом рідше зчеплене зі статтю. Є декілька типів лейкодистрофій.

Лекція 3.

Тема 3. Хромосомні хвороби та методи їх діагностики. Уроджені вади розвитку. Класифікація, етіологія, діагностика та профілактика.

План.

1. Хромосомні хвороби, їх класифікація та методи їх діагностики.
2. Синдроми, зумовлені порушенням кількості статевих хромосом.
3. Синдроми, зумовлені розладами аутосом.
4. Синдроми, зумовлені делецією.
5. Транслоковані синдроми.

До спадкових хвороб людини відносять генні (точкові або молекулярні) та хромосомні хвороби людини. Такі форми патології клінічно виражаються множинними вродженими вадами розвитку, генетичною основою їх є відхилення від нормального вмісту в клітині організму кількості генетичного матеріалу, тобто обумовлені геномними чи хромосомними мутаціями. Більшість хромосомних хвороб є спорадичними і виникають знов внаслідок геномної (хромосомної) мутації в гаметі здорового батька або в перших поділах зиготи, а не успадковують в поколіннях, що пов'язане з великою смертністю хворих в дорепродуктивний період. Фенотипову основу хромосомних хвороб складають порушення раннього ембріонального розвитку. Тому патологічні зміни виникають ще в пренатальному періоді (плід гине або народжується з патологією).

Хромосомні хвороби об'єднують в дві великі групи: зумовлені зміною кількістю хромосом в каріотипі (геномні мутації) і зміною структури окремої хромосоми (хромосомні аберації).

Бувають особини з мозаїчним набором хромосом – при цьому частина клітин містить нормальний $2n$ набір хромосом, а частина – аномальний. Явище мозаїцизму у статевих хромосомах називається гінандроморфізмом. Механізми геномних мутацій (аномалій числа хромосом) наступні:

1. Нерозходження – хромосоми в анафазі відходять до одного з полюсів.
2. Соматичне нерозходження в мітозі може призводити до мозаїцизму, трисоміків та моносоміків.
3. Втрата окремої хромосоми внаслідок «анафазного відставання». Це веде до мозаїцизму.
4. Поліплоїдизація. При цьому в кожній клітині геном повністю представлений більш, ніж двічі. У людини зустрічається триплоїдія $3n=69$.

В гаметогенезі неправильне розходження статевих хромосом призводить до утворення аномальних статевих клітин: половина має 22 аутосоми; 2 статеві хромосоми, а друга – зовсім не має статевої хромосоми. Тому у процесі запліднення таких гамет можуть утворюватися різні типи зигот: з моносемією (X0), з трисомією (XXX) або полісомією (XXXX). Хромосомний дисбаланс статевих хромосом веде до фізичних і психічних розладів.

Синдроми, зумовлені порушенням кількості статевих хромосом.

1. Синдром Шершевського – Тернера.

Моносомія X-хромосом. Загальна кількість хромосом 45: 22 пари аутосом і 1 X-хромосома. В соматичних клітинах відсутнє тільце Барра. Розвиток плоду йде за жіночим типом: невисокий зріст(до 148 см), фізична інфантильність, відсутність гонад, гіпоплазія матки, недорозвиток грудних залоз, відсутність оволосіння на лобку, аксиллярних ямках, безпліддя, вади внутрішніх органів (серця, нирок, ін.), недостатність естрогенів. Інтелект у більшості нормальний, іноді психічний інфантилізм, емоційна лабільність. Частота синдрому 0,03%.

2. Синдром трипло-X.

Трисомія X-хромосом – супержіночий тип. Загальна кількість хромосом 47:22 пари аутосом і 3-х хромосоми. В соматичних клітинах 2 тільця Барра. Характерна дисплазія різних систем органів. Затримка росту, високе тверде піднебіння, клинодактилія мізинців. У 75% жінок – розумова відсталість, ризик шизофренії. Недостатня функція яєчників з відсутністю фолікул – безпліддя і прискорений клімакс. Зустрічається жінка без конституційних, фізичних чи

психічних розладів. Вони частіше фертильні з посиленням лібідо. Іноді народжують здорових дітей з нормальним каріотипом. Частота синдрому 0,01%.

3. Полісомія.

Полісомія за статевими хромосомами різноманітна: вони відрізняються числом додаткових хромосом, їх типом і комбінацією різних клонових ліній у випадку мозаїцизму. Описані тетра- та пентасомія X-хромосом. При збільшенні кількості хромосом зростає ступінь розумової відсталості та психічних розладів. Частота полісомій X-хромосом серед психічно хворих – 0,24%, розумово відсталих 0,59%. Кількість тілець Барра в соматичних клітин на 1 менша від кількості X-хромосом. При тетрасомії – 3, при пентасомії є черепно-лицеві деформації, аномалії зубів, зміни інших частин скелета, відхилення в системі статевих органів.

4. Тетрасомія X. Каріотип 48, XXXX.

Такі жінки мають низький інтелект, щелепно-лицеві аномалії. Інколи косоокість. Дисфункція яєчників. В соматичних клітинах – 3 тільця Барра.

5. Пентасомія X. Каріотип 49, XXXXX.

Жінки розумово відсталі. Часто косоокість, укісна щілина ока, широке перенісся, маленькі кисті і стопи, аномалії зубів, клинодактилія мізинця, коротка шия. Зниження кількості гребенів на пальцевих візерунках.

6. Синдром Клайнфельтера. Каріотип 47, XXY.

Наявність Y-хромосоми веде до народження хлопчика. В соматичних клітинах – 1 тільце Барра. До періоду статевого дозрівання мало відрізнятися від осіб з нормальним каріотипом 46, XY. Спостерігається євнухоподібна будова тіла, м'язова система розвинута слабо, розміщення жирової клітковини та облісіння жіночого типу, відсутній заріст на щоках. Геніталії не розвинуті, сім'яні анальні атрофовані, сперматогенез не відбувається. Чоловіки неплідні. Розумова відсталість, рідше дебільність. Якщо хлопчики з нормальним інтелектом, то малоініціативні, не здатні до творчої діяльності, схильні до агресії. Частота синдрому 1:850. Зменшення гребенів і збільшення дуг на

пальцях. Зустрічаються індивіди з статевим хроматином: XXXY, XXXXY, XXXXXY, що веде до зростання патології..

7. Синдром дубель Y. Каріотип 47, XYY.

Частота синдрому 1:1000. В соматичних клітинах 2 тільця Барра. Чоловіки з нормальним фізичним і розумовим розвитком, високого зросту. Немає помітних відхилень і репродуктивно здатні (фертильні). Часто імпульсивні, афективно нестійкі, гіперсексуальні. Індивідууми з каріотипом 48, XYYY зустрічаються рідко, що супроводжується відхиленнями в статевому і соматичному розвитку.

8. Синдром дубель XY. Каріотип 48 XXYY.

Широке квадратне обличчя, сплюснутий корінь носа, широкий рот, низько розташовані вушні раковини. Високий зріст, висока талія, широкий таз, схильність до ожиріння за жіночим типом. Оволодіння на лобку за жіночим типом, гіпогонадізм. Розумова відсталість, схильність до агресії. Частота синдрому 1:25000.

Гінандроморфи – мозаїки статевих хромосом.

Ці індивідууми з мозаїкою статевих хромосом. Запліднена клітина на стадії бластомерів дробиться і статеві хромосоми не розходяться в дочірні клітини. Тому виникають різні мозаїчні комплекси. Вони мають різні конституційні відхилення.

9. Каріотип 45 0X/46XY.

Від мінімальних відхилень до синдрому Тернера–Шерашевського. Фенотип залежить від розподілу мозаїчних ліній у тканинах. Всі гінандроморфні особи розділяють на 3 групи : з жіночими статевими органами; з бісексуальною будовою; з нормальною будовою чоловічих органів.

9.1. Жіночі зовнішні статеві органи. Каріотип 45X0/46XY.

Жінки фенотипово нагадують синдром Тернера–Шерашевського. Соматичні аномалії відсутні. Піхва розвинена слабо, нестача стероїдних гормонів веде до недорозвитку молочних залоз, оволодіння в аксиллярних ямках

і на лобку слабе або відсутнє. Пухлини утворюються у 20% випадків і розвиваються до 20 років. Визначення Х–хроматину недостатнє.

9.2. . Бісексуальна будова статевих органів. Каріотип 45X0/46XY.

Асиметрична або змішана дисгенезія статевих залоз. Індивіди можуть мати мозаїчний каріотип, тому будова зовнішніх статевих органів бісексуальна. Наявна матка, в той час як при генних формах чоловічого псевдогермафродитизму матка відсутня.

9.3. Чоловічі статеві органи. Каріотип 45X0/46XY.

При наявності гінадроморфізму і зовнішніх статевих органів чоловічого типу матка відсутня і пухлини не розвиваються.

Синдроми, зумовлені розладами аутосом.

Ряд анеуплоїдій зумовлює неправильне розходження під час гаметогенезу. Анеуплоїдія – наявність у клітинах зруйнованого набору хромосом, не кратного гаплоїдному, у зв'язку із втратою чи додаванням однієї чи кількох хромосом. Якщо цей процес відбувається в мейозі, то виникають організми – анеуплоїди (каріотип $2n+1$, $2n-1$; $2n+2$; $2n+3$ і т.д.). Такі аномалії у людини викликають синдроми.

1. Синдром Дауна.

Причина – нерозходження 21 пари аутосом. Комплекс статевих хромосом не змінюється. При заплідненні аномальних статевих клітин утворюється зигота з трисомією 21-ї хромосоми або моносомією 21-ї хромосоми, причому останні гинуть під час ембріонального розвитку. Частота синдрому 1:800. Характерні ознаки при трисомії 21-ї хромосоми: мала голова, вузькі очні щілини, монголоїдні очі, плоске обличчя, маленький ніс, рот напіввідкритий, розлади мови і координації рухів. У дітей виражена розумова відсталість. Відхилення дерматогліфіки. За останні роки кількість дітей з синдромом Дауна зростає в 5–6 разів, що очевидно пов'язано з екологічними умовами довкілля.

2. Синдром Патау. Трисомія 13-ї аутосоми з групи D.

Частота синдрому 1:7600. причина – нерозходження хромосом 13-ї пари в гаметогенезі одного з батьків. Характерні ознаки: щілини верхньої губи і

піднебіння, мікроенцефалія, недорозвиток мозку, полідактилія. У 50% – вади серця, нирок, статевих органів, подвоєння матки і піхви. Висока рання смертність. Живуть до 3 місяців, іноді декілька років.

3. Синдром Едварда. Трисомія 18-ї пари з групи E.

Частота синдрому 1:8000. У дівчаток втричі частіше. Смертність до 90%. Живуть до 1 року. Характерні ознаки: виступаюча потилиця, видовжена голова, низько розміщені і асиметричні вуха, високе піднебіння, скошене підборіддя, вади серця. В 50% – підковоподібна нирка, подвоєння сечоводів, розпади органів травної системи, іноді відсутність 1-го пальця.

Синдроми, зумовлені делецією.

Делеція – втрата середньої частини хромосом.

1. Синдром „котячого крику”. Делеція 5-ї хромосоми з групи C.

Тривалість життя – кілька років. Характерні ознаки: своєрідний крик, розумова відсталість, мікроцефалія, антимонголоїдний розріз очних щілин,, високе дуговидне піднебіння, гіпоплазія зовнішніх статевих органів. У 25% – вади серця.

2. Синдром Орбелі. Делеція довгих плечей хромосоми 13 групи D.

Смерть настає на першому році життя. Характерні ознаки: мікроцефалія, трикутна голова, котячі очі, слаборозвинутий великий палець кисті, крило– і синдактилія, клишоногість, часто є пухлина сітківки. Неправильно сформований головний мозок. У 40% – вади серця, у 50% – слабо розвинуті або відсутні нирки.

3. Делеція короткого плеча хромосоми 18 групи E.

Вперше описана в 1963. де Гроу у 6-ти річного хлопця з слабим розумовим розвитком. Виділяють дві групи захворювання: для першої - характерне роздвоєння мозку, зміни лицевої частини черепа (циклопія); гинуть до народження; для другої – слабкий розвиток щелепи, клинодактилія, крилоподібні складки на шиї.

4. Філадельфійська хромосома. Делеція 21 хромосоми групи G.

За назвою міста, де була виявлена хвороба. Появляється філадельфійська хромосома тільки в клітинах кровотворної системи: кістковому мозку, гранулоцитах. Мутантна клітина з філадельфійською хромосомою розмножується і витісняє кровотворні клітини, тому зя”вляється багато клітин з хромосомною аберацією у периферичній кров. Серед хворих синдромом Дауна, де є трисомія 21-ої хромосоми виникає в 10–20 разів частіше.

Транслоковані синдроми.

Транслокації пов’язані з обміном ділянками між негомологічними хромосомами або прикріпленням ділянки хромосоми однієї пари до хромосоми другої пари.

1. Транслокований синдром Дауна.

Кількість хромосом 46, але одна з аутосом несе на собі 21-шу хромосому. Особливістю є те, що загальна кількість хромосом не відхиляється від норми: маленька 21-ша хромосома прикріплюється до 15-ї хромосоми з групи D. Описаний хлопчик з нормальним каріотипом 46, а не 47 як при синдромі Дауна. Транслокація є причиною захворювання, в каріотипі є дві 21-ші хромосоми вільні і третя транслокована на 15-у хромосому.

В мейозі при довільному розходженні гомологічних хромосом утворюється 4 типи гамет: $15/21+21$; $15/21+0$; $15+21$; $15+0$. При заплідненні гамет першого типу $15/21+21$ утворюються зиготи, що мають загальну кількість хромосом 46 і три 21-ші хромосоми (як у хлопчика). Гамети другого типу $15/21+0$ утворюють зиготи, що мають 45 хромосом, в тому числі дві 21-ші : одну вільну одну транслоковану – фенотипово здорові, проте в гаметогенезі утворюються аномальні гамети. При заплідненні яйцеклітин $15+21$ народжуються здорові діти, а при заплідненні $15+0$ з’являється моносомія 21-ї хромосоми – це леталь.

2. Транслокований синдром Патау.

Може виникнути при транслокації акроцентричних хромосом Д/Д ($15/15$). Застосовують цитогенетичний і генеалогічний методи для прогнозу цієї аномалії.

Лекція 4.

Тема 4. Основи екологічної генетики, фармакогенетики. Спадкові гемоглобінопатії і таласемії.

План.

1. Екологічна генетика, фармакогенетика.
2. Спадкові гемоглобінопатії і таласемії.

Екологічна генетика – це область знання, що досліджує взаємовплив генетичних процесів і екологічних відносин. Як розділ генетики ця наука спирається на методологію генетичного аналізу і використовує весь методичний арсенал екології. Вперше її принципи сформулював у 1960-х роках Едмунд Бріско Форд як про генетику популяцій в природних умовах.

Генетичні підходи в екологічній генетиці базуються на двоєдності методології генетичного аналізу, що оперує поняттями спадковості та мінливості. Насамперед спадковість – це властивість подібності споріднених організмів, їх здатність передавати певні ознаки з покоління в покоління. При цьому ознаками можуть бути наявність або відсутність органів, їх число, розмір, колір; здатність проводити ті чи інші біохімічні реакції; властивості нервової системи, тип поведінки. Генетичний аналіз розкриває гени, контролюючі усе це розмаїття ознак, вивчає їх успадкування та локалізацію в геномі. Генетичний аналіз розкриває причини мінливості, тобто відповідає на питання: «Чому організми мають схожість між собою?» та «Чому організми відрізняються один від одного?» Мутаційний процес пов'язують з так званими генетичними процесами. До них відносять «реплікацію» – відтворення генетичного матеріалу; «рекомбінацію» – різні способи пересортовування генів та їх частин, що відбуваються при зміні поколінь, «репарацію» – процеси, що підтримують нативну структуру генетичного матеріалу, що постійно ушкоджується під впливом як внутрішніх факторів (фізіологічних,

метаболічних), так і зовнішніх факторів (температури, випромінювань, хімічних впливів).

Екологічні відносини поділяються на «сінекологічні», тобто відносини між організмами, і «аутекологічні», тобто відносини організмів з навколишнім середовищем.

Сінекологія досліджує як відносини між організмами одного виду, так і відносини між організмами різних видів, що об'єднуються в екосистеми. Найчастіше ці відносини ґрунтуються на взаємозалежності різних видів, складових різних етапів харчових ланцюгів. Знання харчових ланцюгів в природі необхідне для прогнозування наслідків будь-яких впливів на екосистеми.

Аутекологія розглядає відносини живих істот з факторами навколишнього середовища переважно абіотичного походження. При цьому подібні абіотичні фактори можуть бути природними, з якими живі організми стикалися неодноразово в ході еволюції. Це різні температурні дії, земне тяжіння, різні види випромінювань – від видимої частини спектру до рентгенівських променів. Також суттєву роль відіграють антропогенні фактори, тобто ті, що пов'язані із діяльністю людини. Забруднення навколишнього середовища небезпечно не тільки нині живе поколінню, але часто становить небезпеку для прийдешніх поколінь, оскільки багато забруднювачів є мутагенами (генетично активними). Виявлення та усунення генетично активних факторів з середовища проживання людини – завдання генетичної токсикології, яка являє собою розділ екологічної генетики.

Генетично активні фактори діляться на фізичні, хімічні та біологічні. До фізичних факторів належать температура, іонізуюча радіація, ультрафіолетове світло, високочастотне електромагнітне випромінювання, ультразвук.

Хімічні генетично активні фактори – це будь-які речовини, що прямо або побічно порушують структуру і відтворення молекул ДНК. Вихлопні гази автотранспорту та викиди в атмосферу виробничих підприємств містять алкілюючі сполуки (радіоміметики), органічні сполуки ртуті, поліциклічні

вуглеводні, що мають генетичну активність. Багато хімічні сполуки самі по собі не виявляють генетичної активності, але їх легко активують внутрішньоклітинні метаболіти, а іноді сполуки, що знаходяться в навколишньому середовищі.

На сьогодні постало завдання захисту здоров'я населення від загрози, пов'язаної з впливом чинників довкілля. Основною профілактичною дисципліною, що розробляє заходи для безпеки населення в зв'язку з цим є гігієна. В той же час захист геному людини, попередження прискорення мутаційного процесу, патологічних змін в експресії генів, що, ймовірно, відбуваються під впливом антропогенних забруднювачів, неможливе без застосування досягнень генетики.

Методи генетики можуть бути використані для:

- визначення генетичного ризику чинників середовища для здоров'я;
- формування груп ризику з осіб, що мають генетично обумовлену підвищену чутливість до дії факторів довкілля;
- зміцнення резистентності організму до впливу мутагенів шляхом застосування фармпрепаратів і харчових домішок з антимуtagenними властивостями.

У вирішенні першого завдання в Україні увага, головним чином, приділяється ідентифікації мутагенної, тератогенної і канцерогенної небезпеки. Слід зазначити, що при цьому не завжди використовуються оптимальні тест-системи і тест-об'єкти. Розрахунок індивідуального і/або популяційного генетичного ризику в зв'язку з дією негативних чинників довкілля, як правило, не проводиться. Виключенням є тільки окремі дослідження з впливу іонізуючої радіації. Таке становище не дозволяє належним чином визначати пріоритети, обґрунтовувати управлінські рішення щодо зниження шкоди від забруднювачів і потребує виправлення. Так, Указом Президента від 4.02.99 № 118/99 затверджено Цільову Комплексну програму генетичного моніторингу в Україні на 1999-2003 роки, в рамках якої створюється служба генетичного моніторингу. За кілька років діяльності такої служби можуть бути зібрані матеріали для

оцінки темпу мутаційного процесу і розрахунку генетичного вантажу в популяціях.

Завдання з визначення генетичної чутливості до дії чинників навколишнього середовища, яке визнано Європейським комітетом з питань навколишнього середовища і здоров'я одним з кількох пріоритетних в галузі гігієни навколишнього середовища, в Україні не вирішується. Між тим чисельність відповідного населення може виявитись значною.

Щодо фармакологічної профілактики соматичного мутагенезу, то робота в цьому напрямку в Україні, головним чином, зосереджена на скринінгу антимутагенних властивостей речовин, часто *in vivo*, а лікарські препарати з антимутагенною направленістю практично відсутні. Не ведеться санітарно-освітня робота серед населення, що проживає в екологічно несприятливих зонах, про нагальну необхідність застосування фармпрепаратів і харчових домішок з антимутагенними властивостями. Відсутність спеціальних освітніх програм в цій галузі створює передумови для підвищення онкологічної захворюваності.

Враховуючи вищевикладене, можна зробити висновок, що можливості екогенетичних досліджень у вивченні шкідливого впливу чинників довкілля на здоров'я населення далеко не вичерпані. Між тим їх розвиток може забезпечити вирішення питань профілактики деяких захворювань, пов'язаних з пошкодженням геному соматичних і статевих клітин.

Фармакогенетика (грец. *pharmakon* – ліки, отрута + *genesis* – походження) – розділ медичної генетики і фармакології, що вивчає особливості реакцій організму на лікарські препарати (ЛП) залежно від його генетичних особливостей. Основним завданням фармакогенетики є вивчення цих реакцій, розробка методів їх діагностики, корекції і профілактики. Фармакогенетика – наука, що вивчає спадкові реакції організму на вплив певного лікарського засобу. Це розділ медичної генетики і фармакології, завданням якого є вивчення цих реакцій, розробка методів їх діагностики, корекції і профілактики.

Про те, що характер реакцій організму на лікарські засоби залежить від особливостей метаболізму конкретного пацієнта, лікарі знали давно, але вивчати генетичні чинники, які впливають на хімічні перетворення в організмі, почали тільки в 20-му столітті.

Внаслідок парадигми «лікувати пацієнта, а не хворобу» з'явилося поняття «персоніфікованої медицини». Суть персоніфікованої медицини – в індивідуалізації лікарської терапії. Реакція на лікарський препарат, оптимальний клас препарату, його доза і режим застосування визначаються, принаймні частково, генетичними детермінантами. Фармакогенетика прагне виявити гени і їх варіанти, що визначають адекватність фармакотерапії і зменшують ризик розвитку побічних ефектів.

Різними авторами дається різна інформація про те, хто ввів термін фармакогенетика: за одними джерелами це був Ф. Фогель (1959), за іншими – Арно Мотульський (1957). З цього часу фармакогенетика пройшла ряд етапів:

- I етап накопичення фармакогенетичних феноменів (1932 – початок 1960-х);
- II етап становлення фармакогенетики як фундаментальної науки (початок 1960-х – 1990-х років);
- III етап становлення фармакогенетики як прикладної клінічної науки, перехід від фармакогенетики до фармакогеноміки (початок 2000-х років).

Своїми коренями фармакогенетика сягає 1902 р., коли англійський лікар А. Геррод припустив, що генетичні чинники впливають на хімічні перетворення в організмі людини і лежать в основі індивідуальних розбіжностей у метаболізмі речовин. Першою встановленою фармакогенетичною ознакою була нечутливість до фенілтіокарбаміду. Популяційні частоти нечутливих до цієї гіркої речовини осіб на Землі варіюють від 40% серед ескімосів до 6% серед китайців. У 1957 р. А. Мотульські виявив зв'язок між побічними ефектами ліків і генотипічними особливостями людей. У 1959 р. Ф. Фогель увів термін «фармакогенетика». У 1962 р. В. Калоу відкрив,

що аномальна форма сироваткової холінестерази призводить до значних побічних ефектів від уведення сукцинілхоліну, і вперше провів систематичний огляд відомостей у сфері фармакогенетики, накопичених на той час.

Завершення проекту зі секвенування геному людини вплинуло на сучасний етап розвитку фармакогенетики. У фармакогенетиці існують 2 основні стратегії при скринінгу на поліморфізм – фенотипування та генотипування. Фенотипування має реальний біохімічний вимір і дозволяє встановити присутність або активність досліджуваного ферменту в організмі людини. Воно дозволяє встановити рівень метаболітів у людини після прийому досліджуваного ЛП. Фенотипування дає більш однозначні висновки, однак воно й небезпечніше через безпосереднє застосування ліків і виникнення побічних ефектів. Генотипування визначає в людини наявність конкретного гена. Генотипування менш небезпечне, оскільки воно виконується на легкодоступному зразку тканини, наприклад, на клітинах буккального епітелію або крові. Якщо фенотипування дає остаточну відповідь про фармакогенетичні розбіжності між людьми, то генотипування дозволяє встановити причину таких різних реакцій на ліки. Ефективність дії ЛП в організмі може залежати від таких процесів, як біотрансформація, всмоктування, розподіл по органах, взаємодія з рецепторами, метаболізм і виведення. Ці процеси залежать від багатьох ферментів, синтез яких знаходиться під контролем генів. У свою чергу, будь-які фармакогенетичні реакції розвиваються на підставі широкого генетичного поліморфізму в людських популяціях, що еволюційно сформувався до появи ЛП, які застосовуються сьогодні, і визначає на цей час різноманітність відповідних реакцій людей на них. Кожна популяція є поліморфною і представлена фенотипами швидких та повільних метаболізаторів певних ліків. Існує залежність між метаболічним фенотипом людини і частотою виникнення побічних явищ при застосуванні ЛЗ. Так, частота ураження периферичної нервової системи у повільних метаболізаторів (у даному випадку за ферментом М-ацетилтрансфераза) протитуберкульозного препарату ізоніазид в 7 раз вище, ніж у швидких метаболізаторів. Частоти

певних фенотипів у різних популяціях різні, напр., у європеїдній повільних метаболізаторів близько 59%, в негроїдній – близько 55%, у монголоїдних – 10–22%. Ефективність ліків визначається сумісною дією багатьох генів, тому певні параметри, пов'язані із застосуванням ЛП, часто відповідають полігенному типу спадкування, для якого визначаються коефіцієнти успадкування.

Розширення генетичних знань дозволяє вірогідно виявляти різницю у ступені та якості сприйняття одних і тих самих ліків як представниками різних рас, так і різних етнічних груп. Так, негроїди, у яких в цілому вдвічі частіше діагностують серцеву недостатність, порівняно з європеїдами менш сприйнятливі до дії препаратів, що часто застосовуються для лікування гіпертонічної хвороби. З урахуванням їх генетичних особливостей (нестача в організмі оксиду азоту, який розширює судини) розроблений препарат ViDil, ефективний, зокрема, при лікуванні представників негроїдної раси, але не має лікувального ефекту у європеїдів. У євреїв ашкеназі, в цілому схильних до шизофренії (популяційна частота хвороби 10–12%), підвищений ризик серйозних побічних ефектів з боку крові, що призводять до смерті при застосуванні препарату клозапін. Генетичні особливості перебігу виразкової хвороби у японців і шведів призводять до різної реакції на антихелікобактерну терапію омепразолом і кларитроміцином, що ефективна практично для всіх представників шведської популяції, але набагато менш ефективна для японців. Антидепресивний препарат Прозак ефективний лише для 40% популяції, очевидно через розбіжності в сімействі генів цитохромів P-450. У людей з визначеним алелем гена ApoE, пов'язаним з високим ризиком хвороби Альцгеймера в літньому віці, практично не відзначається ефект від застосування широко розповсюдженого препарату Такрин для лікування цього захворювання. Причинами атипових реакцій організму на ЛП є не тільки спадкові зміни ферментів, але й деякі спадкові хвороби обміну речовин. У таких випадках розвивається підвищена чутливість організму до певних хімічних речовин, зокрема ліків. Наприклад, при недостатності глюкозо-6-

фосфатдегідрогенази (Г-6-ФД) еритроцитів, що успадковується за Х-зчепленим рецесивним механізмом, багато ліків, напр. фурадонін, стрептоцид, хінін, примахін, викликають гемоліз. При недостатності сироваткової псевдохолінестерази, що успадковується за аутосомно-рецесивним типом, міорелаксант дитилін викликає тривалий сон. У хворих онкологічного профілю з генетично зумовленою недостатністю дигідропіримідиндегідрогенази відзначаються нейротоксичні ефекти при лікуванні препаратом 5-фторурацил, тому такі хворі мають потребу в інших ліках. Дія широко розповсюдженого антипсихотичного препарату галоперидол залежить від його здатності зв'язуватися з рецепторами дофаміну D₂, кількість яких визначається генетично, а отже терапевтичний ефект різний в осіб з їх малою і великою кількістю. Широке використання принципів фармакогенетики. стосовно всіх біологічних видів, а не тільки людини, часто не враховується з лінгвістичних причин. У сучасному житті префікс «фармако-» багатьма прирівнюється лише до значення «ліки», а не «ксенобіотики», тобто набуває більш вузького значення. Існують значні генетично зумовлені розбіжності у відповідній реакції на продукти харчування, харчові добавки, алкоголь, компоненти сигаретного диму і багато інших речовин. Так, у країнах Північної Європи від 80 до 100% дорослого населення мають алель гена лактази, що сприяє засвоєнню свіжого молока, а лактазна недостатність відзначається дуже рідко. У той же час певна частина корінного дорослого населення Америки, Австралії, Африки, Азії і Південної Європи здатна вживати в їжу тільки кисломолочні продукти, в яких молочний цукор розщеплено бактеріями. Генетичний контроль метаболізму алкоголю є однією із серйозних причин, що впливають на схильність до алкоголізму. Перетворення алкоголю в альдегід контролюється ферментом алкогольдегідрогеназою, а перетворення альдегіду в оцтову кислоту – ферментом альдегіддегідрогеназою. За активністю обох ферментів виявлений поліморфізм, пов'язаний з етнічними розбіжностями. Популяційні дослідження показали, що приблизно 40–50% жителів Південного Китаю і Японії відрізняються різкою недостатністю ферменту альдегіддегідрогенази, що

призводить до накопичення альдегіду в крові, прояву його токсичних ефектів, це вважається фактором низького ризику схильності до споживання алкоголю. Дефіцитом цього ферменту характеризується 40% представників племен південноамериканських індіанців, тоді як у племенах сіу і навахо, що живуть у Північній Америці, частота його недостатності становить тільки 5%. Серед популяцій європейців і африканців дефіцит альдегіддегідрогенази практично не відзначається. У детоксикації багатьох шкідливих речовин, у т.ч. й компонентів сигаретного диму, бере участь фермент глутатіон-S-трансфераза. Індивіди з мутантною неактивною формою ферменту більшою мірою піддаються різним формам раку. Серед негроїдів, які проживають у США, частота гена глутатіон-S-трансферази приблизно дорівнює 0,31, а в різних європейців частота цього гена коливається в межах від 0,39 до 0,54. Цей феномен може служити поясненням різної міжпопуляційної захворюваності на рак. Доцільно проводити фармакогенетичні дослідження всіх нових ліків. Результати таких досліджень дозволять проводити менш масштабні, більш швидкі, а відповідно і більш дешеві клінічні випробування і відсівати пацієнтів, для яких той чи інший препарат, швидше за все, виявиться недостатньо ефективним чи навіть небезпечним. Визначення етнічних категорій хворих стосовно метаболізму ліків дозволить модифікувати вже існуючі і препарати, що розробляються, з урахуванням генетичних особливостей кожної групи пацієнтів. З урахуванням даних епідеміологічних досліджень такий підхід дозволить оптимізувати і регіональні фармацевтичні ринки, що також сприятиме зниженню витрат фармацевтичних компаній на випуск нових препаратів, а отже, – зниженню вартості ліків.

Гемоглобінопатії.

При гемоглобінопатіях настають зміни в гені, який несе інформацію про синтез гемоглобіну. При серпоподібно-клітинній анемії в β -ланцюзі гемоглобіну глютамінова кислота замінена на валін. Якщо заміна пройде у двох β -ланцюгах, то еритроцити змінюють форму, мають вигляд серпа (HbS), змінюються біохімічні та фізіологічні властивості гемоглобіну. Розвивається

важка хвороба, яка закінчується у дітей смертю від інфаркту внутрішніх органів. При заміні глютамінової кислоти на валін в одному β – ланцюзі еритроцити мають нормальну форму, але в умовах гіпоксії набувають форми серпа, гемолізуються, що призводить до важкої хвороби і навіть смерті. Успадковується хвороба за типом неповного домінування. При порушенні синтезу α – або β –ланцюгів виникає таласемія. Недостатній синтез β –ланцюгів призводить до нестабільного гемоглобіну і еритроцити руйнуються. У гомозигот розвивається хвороба Кулі або велика таласемія. При порушенні α –ланцюгів розвивається α –таласемія. Гомозиготи гинуть в ембріогенезі. У гетерозигот анемія протікає у важкій формі, тому діти помирають у ранньому віці.

Для діагностики хромосомних хвороб використовують цитогенетичний метод: беруть кров із вени (у новонароджених з п'ятки), потім вирощують культуру клітин і досліджують хромосоми на метафазних пластинках.

Для виявлення змін комплексу статевих хромосом використовують бліц-метод і проводять цитогенетичні дослідження каріотипу. Лікування симптоматичне. Синдроми з розладами статевих хромосом лікують гормонотерапією. При аномаліях будови – хірургічно. Однак, ефект частковий.

В медичній практиці широко використовують метод просіювання – скринінг – метод, який дає змогу серед великої вибірки людей виявити ймовірно хворих, розподілити їх на групи з високою і низькою ймовірністю захворювання [Бочкова, 1982]. Потім проводяться більш детальні біохімічні, рентгенологічні та інші обстеження. Так діагностують фенілкетонурію, галактоземію та інші спадкові вади обміну.

Для профілактики захворювань застосовують методи пренатальної діагностики. Це, зокрема, метод амніоцентезу – дослідження амніотичної рідини. Його проводять в умовах абсолютної стерильності. Це дороговартісний та трудоемкий метод. Тому вдаються до нього у випадках, коли є підвищений ризик спадкової патології. Крім того, застосовують ультразвукову діагностику, яка вважається безпечною як для матері, так і для плоду.

Таласемія (Середземноморська анемія, анемія Кулі, від грец. *θαλασσα* – «море», термін, яким у Стародавній Греції позначали Середземне море) – це спадкове захворювання крові, яке характеризується продукцією аномального гемоглобіну, що спричинює делеція генів, які відповідають за його синтез.

Таласемії – це група захворювань, які виникають внаслідок вродженого патологічного синтезу гемоглобіну. Дефект полягає у зменшенні продукування одного чи декількох глобінових ланцюгів α (при α -таласемії)чи β (при β -таласемії) або ж повній їх відсутності. Причому молекулярна структура глобінових ланцюгів при цьому не порушується. Альфа-таласемію спричиняє делеція одного з генів 11-ї хромосоми. β -таласемія, яка зустрічається частіше, виникає внаслідок спадкових мутацій у гені HBB, локалізованому на 16-ій хромосомі. Важкість клінічних проявів при цій патології корелює із типом мутацій та, відповідно, ступенем дисбалансу глобінових ланцюгів. Залежно від рівня зниження синтезу β -глобінових ланцюгів виділяють цілу низку нозологій, які різняться фенотиповими проявами та важкістю перебігу захворювання. Таким чином, молекулярно-генетичний аналіз гена HBB є важливим для верифікації діагнозу та прогнозування клінічного перебігу захворювання. Значна кількість (понад 100) та гетерогенність мутацій, які були описані в межах гена HBB, ускладнює генетичну діагностику. Різні протоколи передбачають дослідження найбільш поширених для даної популяції мутацій гена HBB, і часто доцільним є проведення повного секвенування гена. Частота розповсюдження різних типів мутацій гена HBB, як і поширеність гетерозиготного носійства мутацій гена, в Україні невідома.

Існує також група синдромів, що за клінічним перебігом подібні до великої β -таласемії, які називають проміжною таласемією. Генетичною її особливістю є наявність комбінації «слабких» β -таласемічних мутацій, а іноді β -мутація виступає у сполученні з α -мутацією. У таких хворих, як правило, значення гемоглобіну коливається на рівні 60–70 г/л без гемотрансфузійної підтримки. Функція еритроцитів при проміжній таласемії знижена внаслідок переважання фракції гемоглобіну F (HbF), який погано переносить кисень. Як і

при великій β -таласемії, внаслідок інтенсивної проліферації кісткового мозку у цих хворих розвиваються псевдопухлини. Порівняно з хворобою Кулі потреба у гемотрансфузіях у пацієнтів з проміжною таласемією виникає пізніше. Хоча таласемічні синдроми можуть зустрічатися у всіх етнічних групах, найчастіше їх діагностують у вихідців із Середземноморського басейну, Африки, Близького Сходу, Південної та Південно-Східної Азії, Південного Китаю та островів Тихого океану. Вогнища таласемії є і в Азербайджані, в рівнинних районах якого гетерозиготна β -таласемія зустрічається у 7–10% населення. Внаслідок інтенсивної міграції населення захворювання реєструється практично в усіх регіонах планети. За даними літератури, щороку у світі народжується близько 100000 дітей із важкими формами таласемії. Залежно від ступеня пригнічення синтезу β -ланцюгів розрізняють β -таласемію плюс (зі зменшеною кількістю β -ланцюгів) та β -таласемію мінус (із відсутністю β -ланцюгів). При β -таласемії інтенсивно продукуються еритрокаріоцити, у яких накопичуються ланцюги α , що є причиною посиленого руйнування цих клітин у кістковому мозку, а ретикулоцитів та еритроцитів периферійної крові – у селезінці. Таким чином, у хворого розвивається анемія. Додатковим фактором тканинної гіпоксії при β -таласемії є підвищений вміст фетального гемоглобіну F в еритроцитах хворого. Основним проявом таласемії є гіпохромна мікроцитарна гіперрегенераторна анемія з характерними морфологічними особливостями еритроцитів, такими як гіпохромія, мікроцитоз, базофільна пунктація, у периферійній крові виявляють мішенеподібні еритроцити та ядровмісні клітини – попередники еритроїдного ряду.

Таласемія є найчастішою спадковою причиною мікроцитозу, а залізодефіцитна анемія – набутого. Внаслідок підвищеного розпаду клітин еритрону у хворих відмічається підвищення рівня білірубіну за рахунок непрямої його фракції, а також лактатдегідрогенази та сироваткового заліза. Таласемія може перебігати у важкій (гомозиготна велика β -таласемія або хвороба Кулі) чи легкій формі (гетерозиготна мала β -таласемія). Велика β -таласемія характеризується розвитком гіпохромної мікроцитарної анемії

важкого ступеня вже у перші роки життя дитини із формуванням гемотрансфузійної залежності, внаслідок чого розвивається гемосидероз внутрішніх органів з характерними клінічними ознаками (гепатоспленомегалія, цукровий діабет внаслідок фіброзу підшлункової залози). Нефективний еритропоез спричиняє у цих хворих характерні деформації скелету: гіпертрофію нижньої щелепи з порушенням прикусу, баштоподібний череп, остеопороз, відставання у фізичному розвитку. Гетерозиготна мала β -таласемія може перебігати безсимптомно або ж проявлятися легкою чи середньоважкою анемією з характерним мікроцитозом, гіпохромією та водночас дещо підвищеним або нормальним вмістом заліза у крові. Діагностика таласемії включає вивчення сімейного анамнезу, етнічного походження, наявність характерних ознак гіпохромної мікроцитарної анемії з мішенеподібними еритроцитами за відсутності дефіциту заліза. Проводять також визначення рівнів фетального гемоглобіну F і гемоглобіну A₂ та дослідження специфічних генних мутацій. Хоча Україна не належить до регіонів, де часто реєструють таласемічні синдроми, зареєстровано два випадки гетерозиготної β -таласемії у жителів Прикарпаття впродовж одного року.

Лекція 5.

Тема 5. Дерматогліфіка – метод дослідження спадковості людини. Перспективи генетичної інженерії.

План.

1. Дерматогліфіка – метод дослідження спадковості людини.
2. Методи генної інженерії.
3. Скринінг за допомогою гібридизації.

Дерматогліфіка (гр. *дерматос* – шкіра, і гр., видовбую, вирізьблюю) – розділ морфології людини, який вивчає шкірний рельєф долонних і підошовних поверхонь, де шкіра вкрита численними папілярними лініями, що утворюють певні візерунки. Дані дерматогліфіки використовуються в криміналістиці (дактилоскопія), судовій, клінічній медицині, медичній генетиці. Цей метод запропонував у 1892 Ф. Гальтон для дослідження шкірних гребінчастих візерунків пальців і долонь, а також згинальних долонних борозен.

Дерматогліфіка поділяється на:

- дактилоскопію – вивчення малюнка пальців;
- пальмоскопію – вивчення особливостей будови долонь;
- плантоскопію – вивчення особливостей будови підошов.

Дерматогліфічні методи використовують у визначенні зиготності близнюків, для діагностування багатьох спадкових захворювань, а також в окремих випадках встановлення спірного батьківства. Дослідження показали, що при хворобі Дауна, синдромах Клайнфельтера, Шерешевського – Тернера відбуваються специфічні зміни не тільки візерунків пальців і долонь, але й характер основних згинальних борозен на шкірі долонь.

Встановлено, що візерунки є індивідуальною характеристикою людини і не змінюються впродовж життя. Дерматогліфічні дослідження мають важливе значення у визначенні зиготності близнюків, у діагностиці багатьох спадкових захворювань, а також в окремих випадках спірного батьківства.

Долонний рельєф дуже складний. У ньому виділяють багато полів, подушечок і долонних ліній. Подушечок на долоні 11 і їх поділяють на три групи:

1. П'ять кінцевих (апикальних) подушечок на кінцевих фалангах пальців.

2. Чотири міжпальцеві подушечки розміщуються навпроти міжпальцевих проміжків.

3. Дві долонні проксимальні подушечки – тенар і гіпотенар.

Долоня дистально обмежена п'ястково-фаланговими згинальними складками, а проксимально – зап'ястковою, або браслетною, згинальними складками. Як на долонях, так і на пальцевих подушечках шкірні гребінці розміщені потоками. Точки зустрічі цих потоків утворюють трирадіуси, або дельти. На кожній із 4 міжпальцевих подушечок звичайно є трирадіуси, їх позначають малими літерами латинського алфавіту (a, b, c, d), починаючи від вказівного пальця (a) і закінчуючи мізинцем (d). Поблизу браслетної складки розташований головний (осьовий) долонний трирадіус t. Якщо провести лінії від трирадіусів a і d до t, то утворюється кут долоні $\angle atd$, який в нормі не перевищує 57° .

Гребінчасті візерунки зазвичай вивчають під лупою. Як на кінчиках пальців, так і на долонних підвищеннях можуть спостерігатися різноманітні папілярні візерунки у вигляді завитків, петель і дуг, відкритих в ульнарний або радіальний бік. Те ж саме спостерігається на тенарі й гіпотенарі. Проте тут частіше бувають дуги.

На середній і головній фалангах пальців гребінчасті лінії знаходяться поперек пальців, створюючи різноманітні візерунки – прямі, серпоподібні, хвилеподібні, дугоподібні.

Більша кількість праць присвячена вивченню візерунків на кінчиках пальців. Ф. Гальтон виділив три форми папілярних візерунків: завитки, петлі і дуги. Їх позначають відповідно: W; L; A. Петлі бувають відкриті як в ульнарний, так і в радіальний бік. Їх напрямок позначають першою літерою цих слів. Символом и позначають петлю, відкриту в ульнарний бік, символом R –

петлю, відкриту в радіальний бік. Виділяють чотири головних пальцевих папілярних візерунки – W; R; U; A. У дугах потоки гребінчастих ліній не перетинаються. Отже, в дузі немає трирадіуса, або дельти. У петлі є одна дельта, а в завитку дві дельти.

Загальноприйнятими показниками особливостей шкірних візерунків на пальцях є:

1. Загальний гребінцевий рахунок (загальна кількість папілярних ліній) – сума на всіх 10 пальцях папілярних ліній між центром візерунка і дельтою.
2. Індекс інтенсивності візерунка – сума дельт на 10 пальцях обох рук.
3. Частота окремих візерунків – співвідношення кількості візерунків того чи іншого типу (дуги, петлі радіальні, петлі ульнарні, завитки) до загальної кількості всіх візерунків.

У популяційних дослідженнях обчислюють індекси, що відображають в основному дельтовий показник, тобто співвідношення петель і завитків на всіх 10 пальцях за формулою $A+2W/10$. Найчастіше застосовується формула $Dt\ 10 = A\ 2W/(A+L+W)\ 10$.

У групових дослідженнях користуються вивченням кількісного значення візерунка, тобто числа гребінців від дельти до центру візерунка (гребінцевий рахунок). У середньому на одному пальці буває 15-20 гребінців, на всіх 10 пальцях у чоловіків – 144,98, а у жінок – 127,23.

При вивченні шкірного рельєфу долоні досліджують:

1. Хід головних долонних ліній A, Y, C, D.
2. Долонні візерунки на тенарі і гіпотенарі.
3. Пальцеві візерунки (форму візерунків і гребінцевий рахунок).
4. Осьові трирадіуси.

На характер пальцевого і долонного візерунків впливають механізми цитоплазматичної спадковості. Дослідження людей з хромосомними захворюваннями дозволило виявити специфічні зміни не тільки візерунків пальців і долонь, але й характер основних згинальних борозен на шкірі долонь. Характерні зміни даних показників спостерігаються при хворобі Дауна,

синдромах Клайнфельтера, Шерешевського–Тернера, що дозволяє використовувати методи дерматогліфіки та пальмоскопії для діагностики цих захворювань.

Трисомія 18 (Синдром Едвардса). При цьому захворюванні є переважання на пальцях дуг. Часто поява варіанта 4-пальцевої поперечної борозни. Зменшення числа гребінцевих ліній.

Трисомія 21 (Синдром Дауна). При цьому захворюванні є переважання на пальцях ульнарних петель. Поперечна 4-пальцева борозна. Дистальне зміщення осевого трирадіуса.

Синдром Шерешевського–Тернера. При цьому захворюванні є переважання на пальцях петель і завитків. Дистальне зміщення осевого трирадіуса. Збільшення числа гребінцевих ліній. Ульнарне зміщення трирадіуса. Поява на гіпотенарі V – подібного візерунка.

Дерматогліфічний малюнок генетично зумовлений, носить індивідуальний характер і не міняється протягом життя. Не існує двох людей з однаковими малюнками (крім монозиготних близнят). Дерматогліфічні дослідження мають важливе значення у визначенні зиготності близнят, у діагностиці деяких спадкових хвороб, у судовій медицині, для ідентифікації особистості в криміналістиці.

Дактилоскопія це розділ дерматогліфіки, який вивчає візерунки на пальцях. Гребені на пальцях рук відповідають сосочкам дерми, тому їх називають папілярними лініями. Виділяють три основні типи папілярних візерунків: 1) завитки W (англ. whorl – завиток); 2) петлі L (англ. loop – петля): радіальні L_r і ульнарні L_u і 3) дуги A (arch – дуга). Папілярні лінії різних потоків ніколи не пересікаються, але можуть зближуватися, утворюючи трирадіуси (дельти). Гребеневий рахунок – число папілярних ліній між дельтою і центром візерунка. У нормі він дорівнює в жінок 135, чоловіків – 151, для кожного пальця – 15-20. При синдромі Шерешевського–Тернера (45, X0) гребеневий рахунок високий (180), при синдромі Клайнфельтера (47, XXY) – низький (до 50).

Пальмоскопія – розділ дерматогліфіки, який вивчає візерунки на долонях. На долоні розрізняють 14 полів і 11 подушечок (5 на нігтьових фалангах, 4 – в міжпальцевих проміжках, 1 – біля основи великого пальця (тенар), 1 – біля протилежного краю долоні (гіпотенар). Крім того, на долоні є трирадіуси в ділянках сходження потоків гребенів. Міжпальцеві подушечки оточують трирадіуси – a, b, c, d. Їх проксимальні кінці утворюють головні лінії долоні – A, B, C, D. Поблизу складки, якою закінчується долоня, проходить головний долонний трирадіус t. Для клінічної практики має значення величина кута atd, який переважно складає 42-52°. Зміщення трирадіуса t, збільшення кута atd можуть опосередковано свідчити про наявність спадкової патології. На шкірі долоні відомо ще три великі складки: складка великого пальця, проксимальна і дистальна згинальні. Останні можуть зливатись, утворюючи одну 4-пальцеву, що є характерною ознакою деяких спадкових хвороб і синдромів (трисомії 13, 18, 21, частково 9).

Плантоскопія вивчає візерунки на підшві. При деяких хромосомних хворобах відмічена зміна типових дугових візерунків.

Методи генної інженерії

Генна інженерія займається конструюванням *in vitro* функціонально активних штучних генетичних програм (рекомбінантних ДНК). Завдяки генній інженерії з'явилася можливість не лише детального вивчення гігантських геномів вищих організмів, але і цілеспрямованої зміни їх структури. Виникли умови для створення генетично трансформованих видів мікроорганізмів, рослин і тваринних, здатних стати продуцентами біологічноактивних сполук (ферментів, гормонів, антибіотиків і тому подібне), тобто була створена база для розвитку нової біотехнології.

Датою народження генної інженерії можна вважати 1972 р., коли П.Берг і співробітники отримали першу рекомбінантну ДНК, яка складалася з ДНК вірусу SV40 і бактеріофага. Виникнення генної інженерії мало величезне значення для молекулярної біології в цілому. Завдяки її методам структура і функції будь-якого гена і продуктів його експресії (РНК і білки) стали

практично доступні для дослідження. Молекулярні біологи розробили принципово нові технології, засновані на відкриттях у біохімії і молекулярній генетиці. Це надало величезні можливості маніпулювання генетичним матеріалом. Нові підходи і методи отримали назву «Технології рекомбінантних ДНК», які часто називають «генною інженерією». Ці технології революціонізували біологію і зробили величезний вплив на медицину. З їх допомогою можна проводити обмін генетичною інформацією між хромосомами, створюючи нові гени і геноми. Наприклад, можна отримувати організми, наприклад, бактерії, експресуючи гени людини, проводити генну терапію людини та ін. Таким чином, в генній інженерії використовуються різні технології створення рекомбінантних ДНК для цілеспрямованої зміни генетичних програм і створення нових генів і генотипів. Генна інженерія включає декілька основних етапів:

а) отримання генетичного матеріалу з потрібними генами;

б) включення цих генів в автономну генетичну систему (вектор), здібну до реплікації і вбудовування в чужий геном;

в) введення цієї системи в реципієнтну клітину, де нові гени входять до складу ДНК. На вказаних етапах використовується багато молекулярно-генетичних підходів і методів.

Генетичний матеріал можна отримувати декількома методами: шляхом хімічного синтезу і шляхом ферментативної рестрикції ДНК. Розвиток і успіхи генної інженерії пов'язані з вдосконаленням методів досліджень і серед них виділяють п'ять основних:

1 – рестрикція ДНК, що необхідна для виділення генів і маніпуляцій з ними;

2 – гібридизація нуклеїнових кислот для видалення специфічної послідовності ДНК;

3 – клонування ДНК шляхом введення отриманих фрагментів в швидкореплікуючі генетичні структури (плазмід, віруси), що дає можливість розмножувати їх у прокариот, одноклітинних грибів або еукаріот:

4 – визначення нуклеотидних послідовностей – секвенування в клонах фрагментів ДНК, що дозволяє визначити структуру генів і амінокислотні послідовності поліпептидів;

5 – хіміко-ферментативний синтез, необхідний для модифікації генів і роботи з ними. Хімічний синтез ДНК здійснюється з нуклеотидів у спеціальних умовах на основі розшифрованої нуклеотидної послідовності певної ділянки ДНК. Штучний ген аланінової т-РНК був вперше синтезований в 1970 р. (Г.Корана). Цей ген складався з 77 пар нуклеотидів, але не мав регуляторних відділів і тому не функціонував. Опісля кількох років Г.Корана синтезував ген тирозинової тРНК, що містила промотор і термінатор. Цей ген, введений бактеріям, функціонував. В даний час синтезовано вже багато різноманітних генів.

При високому числі генів у еукаріот (від 6 200 у дріжджів, до 30 000 і більше у людини) виникає необхідність у використанні спеціальної техніки для одночасного отримання експериментальної інформації про активність великого числа генів в клітині.

Сучасна експериментальна техніка дозволяє створити матрицю – біочіп, розміром всього декілька сантиметрів, за допомогою якої можна отримати дані про функціональну активність багатьох (якщо не усіх) генів організму. У цьому методі на спеціальну (скляну) підкладку за допомогою роботів наносять зразки ДНК, які є або окремими генами, або молекулами кодогенної ДНК, отриманими в достатній кількості для приготування біочіпів з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Після іммобілізації ДНК на матриці за допомогою ультрафіолету проводять гібридизацію генів, які містяться на чіпах, з утворюваними РНК, що виділяються з об'єкту, який вивчається. Для аналізу результатів гібридизації використовують флуоресцентні барвники. Після того, як флуоресціюючі зразки РНК прореагували з біочіпом, чіп сканують лазером і оцінюють інтенсивність сигналу флуоресценції, мірою функціональної активності генів, що служить. Використання біочіпів перспективне в різних напрямках, і зокрема для виявлення генів, що реагують на негативну

(стресову) дію докільця і здійснюють захисні функції в організмі. Так, за допомогою біочіпів підтверджена видатна роль гена, що кодує білок p53, в захисті організму від різноманітних ушкоджувальних реагентів.

Одним з найважливіших інструментів генної інженерії є ендонуклеази – ферменти, що розщеплюють ДНК по специфічних послідовностях нуклеотидів ланцюга. Рестрикція ДНК – процес «розрізання» молекул ДНК прокариот і еукаріот спеціальними ферментами-рестриктазами, що дозволяє отримувати ділянки з певними генами. Рестриктази розщеплюють ДНК на відносно невеликі фрагменти в ділянках певних послідовностей. Цим їх дія відрізняється від більшості інших ферментативних, хімічних або фізичних дій, які приводять до випадкових розривів ланцюгів ДНК.

Виникнення генетичної інженерії було безпосередньо пов'язане з відкриттям цілої серії ферментів, які є незамінними інструментами для маніпулювання з генами, зважаючи на практично повну відсутність відповідних хімічних методів, що дозволяють отримувати, модифікувати і ампліфікувати рекомбінантні молекули ДНК.

Гібридизація широко використовується для виявлення певних нуклеотидних послідовностей в суміші рестрикційних фрагментів. Такий прийом носить назву «блоттинг» (від англ. blot – промокати). З цією метою рестрикційні фрагменти фракціонують методом електрофорезу в 0,8% агарозі, що дозволяє розділити до 500 фрагментів, які відрізняються за розміром всього на один нуклеотид. Потім гель поєднують з аркушем паперу нітроцелюлози і в результаті дифузії фрагменти частково переходять на цей лист (blot), і таким чином, виходить реплікат (відбиток) з гелю. Потім методом радіоавтографії з використанням радіоактивного ДНК-зонду і рентгенівської плівки визначають на репліці положення фрагментів, які гібридизуються із зондом. Виявлення фрагментів ДНК з використанням ДНК-зондів, що призводить до утворення гібридів ДНК:ДНК, носить назву саузерн-блоттингу.

За методом нозерн-блоттингу ДНК-зонди гібридизують з реплікатами гелю, в якому фракціонують РНК, що призводить до утворення гібридів

ДНК:РНК. Гібридизацію (блоттинг) зондів можна здійснювати на цілих хромосомах, які вдається фракціонувати в крупнопористих агарозних гелях методом пульс-електрофорезу, змінюючи напрям електричного поля, що дозволяє фракціонувати величезні молекули ДНК.

Клонування фрагментів нуклеїнових кислот *in vivo* (інфекція, трансфекція і клонування). Перенесення рекомбінантних молекул з пробірки в клітину відбувається шляхом інфекції або трансфекції. Сконструйовані рекомбінантні молекули ДНК вводять в клітини або вірусні частинки для клонування та ампліфікації. Для різних систем хазяїн-вектор застосовуються різні методи. Нагадаємо, що рекомбінантні ДНК, сконструйовані на основі бактеріальних і дріжджових плазмід або вірусів еукаріотів, трансфікуються в господарські клітини тільки після того, як клітинні мембрани стають проникними. Рекомбінанти, сконструйовані з використанням λ -векторів чи космід, упаковуються в фагові часточки, які потім використовуються для інфікування пермісивних клітин *E.coli* K12. Зазвичай трансфекція відбувається не дуже ефективно. Рекомбінантний геном включається лише в частину оброблених клітин. Вирощуючи клітини в умовах, при яких проявляється залежність від векторних генів, можна ідентифікувати потрібні клітини, і відібрати їх.

При плануванні експерименту по молекулярному клонуванню і його проведенню необхідно дотримуватися два основних принципи. По-перше, після конструювання *in vitro* окремі молекули рекомбінантних ДНК повинні бути введені в різні структури. Жодна з клітин не повинна отримати більше однієї плазмідної молекули або вірусної частинки. По-друге, ці структури повинні бути здатні до реплікації. В результаті трансфекції та інфекції утворюються популяції самих різних клітин або популяції вірусів або бактеріофагів. Одні члени популяції містять потрібні рекомбінантні молекули, інші несуть рекомбінантів, що містять небажані вставки, чи векторні молекули взагалі без вставки, треті являють собою незмінені клітини. Крім того, можуть зустрічатися різноманітні непередбачувані і аберантні рекомбінанти, в тому

числі вектори, в які включені дві або більше вставок, і рекомбінантів, у яких в результаті рекомбінації вже в клітині-хазяїна відбулася зміна вставки. Таким чином, трансфекція і інфекція не є останнім етапом експерименту з отримання рекомбінантної ДНК, а лише один з його етапів. Далі потрібно провести клонування і ідентифікацію потрібних рекомбінантів.

Клонування. Необхідною умовою успішного клонування є можливість поділу всіх трансфікованих або інфікованих клітин. Тільки в цьому випадку кожен клон буде представлений окремою колонією бактеріальних або тваринних клітин або негативно фаговою або вірусною колонією і буде містити певну рекомбіновану ДНК.

Плазмідні вектори. Трансфіцеровані клітини висівають на агар таким чином, щоб вони були повністю ізольовані одна від одної і кожна могла дати початок окремої колонії. Зазвичай вектори містять принаймні один селективний маркер, за яким проводиться відбір трансфіцерованих клітин. При цьому нетрансфіцеровані клітини не можуть утворювати колонії у використуваному середовищі.

Фагові вектори. Інфіковані клітини висівають на середовищі чутливих клітин, на якому в результаті інфікування сусідніх клітин утворюються фагові бляшки. Деякі векторні системи мають вбудовані маркери, які дозволяють легко відбирати рекомбінантів серед реконструйованих інтактних векторів.

Найчастіше для клонування ДНК використовують прокаріотичні системи хазяїн-вектор. Проте зараз починають розвиватися відповідні еукаріотичні системи клонування, в яких використовують клітини дріжджів, рослин і тварин.

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* – перспективні моделі для експериментів з рекомбінантною ДНК. Їх гаплоїдний геном містить $1,4 \times 10^7$ н.п. (у 3 рази більше, ніж у *E. coli*), розподілених по 17 хромосомах. Дріжджі не інфікуються вірусами, але в їх клітинах виявлена плазмідна ДНК, яка використовується як вектор – 2 мкм-плазмідна ДНК. Ця дволанцюгова плазмідна ДНК має довжину в 318 н.п., на одну дріжджову клітину приходиться 50 копій. Дикий тип цієї плазмідної ДНК не має маркерних генів, що не дозволяє відбирати

клітини, які її містять. Проте 2 мкм-плазмідна була використана для створення так званого човникового вектора, отриманого шляхом об'єднання її частини з плазмідною рBR322, яка містить дріжджовий ген. Ген дріжджової клітини кодує фермент, необхідний для біосинтезу гістидину, завдяки чому вдається проводити відбір клітин, які ростуть в відсутності гістидину. Для введення вектора, жорстку полісахаридну стінку дріжджових клітин руйнують за допомогою відповідних ферментів або обробляють їх ацетатом літію, що відкриває можливість для проникнення ДНК в клітини.

При введенні ДНК в клітини тварин часто використовують віруси, в які заздалегідь вводять необхідний сегмент ДНК. Після утворення віріонів віруси проникають в клітини шляхом інфікування. Упаковка відбувається зазвичай *in vivo*, оскільки *in vitro*, на відміну від бактеріофагів, цей процес здійснити не можливо. Можна проводити і пряму ін'єкцію ДНК в клітини і їх ядра, але при цьому трансформується тільки мала частина досліджуваних клітин (не більше 10%). У ряді випадків використовується електропорація - обробка суміші клітин і ДНК, які вводяться, високовольтним (2-4 тис. вольт) електричним розрядом, що призводить до утворення в мембранах клітин отворів (пор), необхідних для проникнення ДНК. Вектори для трансформації клітин тварин найчастіше створюють на основі вірусу SV40 і вірусу папіломи. На основі вірусу SV40, аналогічно вищезгаданій процедурі конструювання векторів на основі фага X, створено декілька типів векторів: трансдукуючі, плазмідні і пасивні. Трансдукуючі вектори реплікуються в клітинах бруньок мавпи і упаковуються у віріони. Плазмідні SV40 – вектори реплікуються, але не упаковуються в білкові оболонки. Пасивні трансформуючі вектори не можуть ні реплікуватися, ні упаковуватися, проте містять ділянки генома вірусу, які сприяють експресії інших генів. Стабільна трансформація в клітинах тварин відбувається тоді, коли плазмідні вектори SV40 інтегруються в геном клітини-хазяїна. Частота цієї інтеграції складає не більше 10⁻⁵-10⁻³.

Скринінг за допомогою гібридизації. Після поділу рекомбінантних молекул і отримання окремих клонів постає важке завдання – виявлення

потрібного клону або клонів. Ідентифікація клону ґрунтується на тому, що вставка в рекомбінантній ДНК детермінує яку унікальну властивість містять її клітини. Ця властивість може визначатися структурою самої вставки або бути пов'язана з її функцією. На ньому ґрунтується скринінг популяції клонів з метою ідентифікації одного потрібного клону. Методи скринінгу повинні бути дуже чутливими, оскільки іноді доводиться ідентифікувати один клон із сотень тисяч або навіть мільйонів клонів.

Гібридизація використовується для виявлення послідовностей в ДНК, які транскрибуються і не транскрибуються. При цьому аналізуються продукти гібридизації ДНК і матричних РНК, що дозволяє виявити активні (що транскрибуються) ділянки в молекулах ДНК. Саме аналіз результатів гібридизації ДНК:РНК дозволив У. Гілберту виявити мозаїчну будову генів еукаріот, що стало одним з найважливіших відкриттів в молекулярній біології.

Гібридизація використовується для знаходження певних нуклеотидних послідовностей (генів) в ДНК. З цією метою застосовують ДНК-зонди – радіоактивні фрагменти ДНК з відомою нуклеотидною послідовністю. Мітку в зонд вводять шляхом нік-трансляції. Оскільки швидкість ренатурації (гібридизація) денатурованої нагріванням ДНК лімітується вірогідністю зіткнення послідовностей комплементарності, швидкість гібридизації. ДНК-зондом вдається визначити число копій генів в ДНК. Це дуже точний метод, який дозволяє виявити один єдиний ген в клітині. Так виявляють унікальні гени, а також гени, представлені в геномі десятками або сотнями копій.

Практична робота №1.

Тема: Молекулярні механізми реплікації ДНК.

Мета: Вивчити молекулярні механізми реплікації ДНК, основні етапи реплікації та її біологічне значення.

Унікальна властивість молекули ДНК подвоюватися перед поділом клітини називається *реплікацією*. Ця властивість зумовлена особливістю будови молекули ДНК, що складається з двох комплементарних ланцюгів. Реплікація відбувається в ядрі під час S-періоду інтерфази. На цей час хромосоми під світловим мікроскопом не виявляються.

Реплікація ДНК – найважливіший молекулярний процес, що є в основі всіх різновидів поділу клітин, усіх типів розмноження, а, значить, в основі забезпечення тривалого існування окремих індивідуумів, популяцій і всіх видів живих організмів. Для кожного виду дуже важливо підтримувати сталість свого генотипу та фенотипу, а значить, зберігати незмінність нуклеотидної послідовності генетичного коду. Для цього необхідно абсолютно точно відтворювати молекули ДНК перед кожним поділом клітини, тобто основне функціональне значення реплікації – забезпечення нащадка стабільною генетичною інформацією розвитку, функціонування і поведінки.

Напівконсервативний шлях реплікації ДНК. Встановлено (М. Мезельсон, Ф. Сталь), що в процесі реплікації дві нитки ДНК розділяються, кожна з них є шаблоном (матрицею) для синтезу вздовж неї нової нитки. Послідовність основ, що повинні бути в нових нитках, можна легко передбачити, тому що вони комплементарні основам, що присутні у старих нитках. Таким чином, утворюються дві дочірні молекули, ідентичні материнській. Кожна дочірня молекула складається з однієї старої (материнської) нитки й однієї нової нитки. Оскільки тільки одна материнська нитка збережена в кожній дочірній молекулі, такий тип реплікації має назву **напівконсервативного**.

Кожен з двох ланцюгів материнської молекули ДНК використовується як матриця для синтезу нових комплементарних ланцюгів.

Механізм реплікації ДНК. Реплікація ДНК – складний, багатоступеневий процес, що вимагає залучення великої кількості спеціальних білків і ферментів. Наприклад, ініціаторні білки утворюють реплікаційну вилку, ДНК-топоізомерази розкручують ланцюги, ДНК-геліказа і дестабілізуючий білок розщеплюють ДНК на два окремих ланцюги, ДНК-полімераза і ДНК-праймаза каталізують полімеризацію нуклеотидтрифосфатів і утворення нового ланцюга, ДНК-лігази руйнують РНК-затравки на відстаючих ланцюгах ДНК та ін. Процес відбувається аналогічно як у прокаріотів, так і в еукаріотів, хоча дещо відрізняється за швидкістю, спрямованістю, кількістю точок реплікації тощо. Швидкість реплікації в еукаріотів дуже велика і складає 50 нуклеотидів за секунду, а в прокаріотів ще вища – до 2000 нуклеотидів за секунду.

Точність реплікації забезпечується комплементарною взаємодією азотистих основ матричного ланцюга і ланцюга, що будується. Крім цього, весь процес контролюється ДНК-полімеразою, що самокорегує та усуває помилки синтезу.

Основні етапи реплікації:

1. **Ініціація** (від лат. *initialis* – первинний, початковий). Активація дезоксирибонуклеотидів. Монофосфати дезоксирибонуклеотидів (АМФ, ГМФ, ЦМФ, ТМФ) знаходяться у стані «вільного плавання» в ядрі і є «сировиною» для синтезу ДНК. Для включення в ДНК вони активуються в результаті взаємодії з АТФ. Ця реакція називається *фосфорилуванням* і каталізується ферментом фосфорилазою. При цьому утворюються трифосфати дезоксирибонуклеотидів, такі як АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ. У такому вигляді вони енергезовані та здатні до полімеризації.

Розпізнавання точки ініціації. Розкручування ДНК починається з певної точки. Така особлива точка називається *точкою ініціації реплікації* (спеціальна послідовність нуклеотидів). Для визначення точки ініціації необхідні специфічні білки-ініціатори. У вірусів і прокариотів є тільки одна точка ініціації. В еукаріотів, що мають великі молекули ДНК, може бути багато точок ініціації реплікації, що, зрештою, зливаються одна з одною при повному роз'єднанні ланцюгів ДНК.

Реплікація обох ланцюгів ДНК відбувається одночасно і безупинно.

Розкручування молекули ДНК. Подвійна спіраль ДНК розкручується і розгортається на окремі нитки ДНК шляхом розриву слабких водневих зв'язків між комплементарними нуклеотидами. Цей процес забезпечують ферменти - гелікази. Оголені основи А, Т, Г і Ц обох ланцюгів проектується в каріоплазму.

Ферменти, що названі топоізомеразами, розривають і заново зшивають окремі нитки ДНК, допомагають розкручуванню спіралі. Завдяки роз'єднанню ланцюгів ДНК виникають реплікаційні вилки. Нові нитки ДНК утворюються на кожному із звільнених ланцюгів, їх ріст відбувається в протилежних напрямках.

2. **Елонгація.** Вільні трифосфати дезоксирибонуклеотидів своїми азотистими основами приєднуються водневими зв'язками до азотистих основ обох ланцюгів ДНК, відповідно до правила комплементарності, тобто А-Т, Ц-Г.

Елонгація - це додавання дезоксирибонуклеотиду до 3'-кінця ланцюга, що росте. Процес каталізується ДНК-полімеразою.

Трифосфати дезоксирибонуклеотидів (тринуклеотиди), приєднуючись до кожного ланцюга ДНК, розривають свої внутрішні високоенергетичні зв'язки й утворюють монофосфати дезоксирибонуклеотидів (мононуклеотиди), що є звичайними компонентами ДНК. При цьому в нуклеоплазму надходять пірофосфатні молекули, що звільнилися (P~P).

Утворення нових ланцюгів ДНК. У подальшому приєднані сусідні нуклеотиди зв'язуються між собою фосфорними залишками та утворюють новий ланцюг ДНК. Процес каталізується ферментом ДНК-полімеразою. При цьому необхідна присутність іонів металів Mn^{2+} або Mg^{2+} . ДНК-полімераза

може полімеризувати дезоксирибонуклеотиди в напрямку 5'-3', тобто від вуглецевого 5'-кінця до вуглецевого 3'-кінця молекул ДНК. Оскільки дві нитки ДНК є антипаралельними, нові нитки повинні утворюватися на старих (материнських) нитках у протилежних напрямках. Одна нова нитка утворюється в напрямку 5'-3'. Ця нитка називається *провідною*. На другій материнській нитці утворюються короткі сегменти ДНК у напрямку 3'-5'. Згодом вони з'єднуються разом, утворюючи довгу відстаючу нитку.

Утворення праймерів. На відстаючій нитці спочатку утворюється короткий ланцюг РНК за шаблоном ДНК. Вона називається *РНК-праймером* і містить послідовність із 10-60 нуклеотидів. Фермент праймаза каталізує полімеризацію блоків РНК (А, У, Г, Ц) у праймері. РНК-праймер утворюється тому, що ДНК-полімераза не може ініціювати синтез нової нитки ДНК у відстаючому ланцюгу в напрямку 3'-5', вона тільки може каталізувати її ріст. Праймери пізніше віддаляються, а порожнини, які утворилися, заповнюються дезоксирибонуклеотидами ДНК у напрямку 5'-3', що завершує побудову другого ланцюга. На місці праймерів утворюються фрагменти нового ланцюга ДНК, які називаються *фрагментами Окадзакі* і складаються із 100200 нуклеотидів. Ці фрагменти легуються (зшиваються) полінуклеотидлігазами, в результаті чого утворюється другий повноцінний ланцюг. Цей процес називається *дозріванням*.

Редугування. Чітка комплементарність пар основ забезпечує точну реплікацію ДНК. Однак іноді виникають помилки в приєднанні основ. Вони видаляються ДНК-полімеразою, яка для цього знову зв'язується з молекулами ДНК (репарація).

3. **Термінація** (від лат. *terminalis* — кінцевий). Після завершення процесу реплікації молекули, що утворилися, розділяються, і кожна дочірня нитка ДНК скручується разом з материнською в подвійну спіраль. Так утворюються дві молекули ДНК, ідентичні материнській. Вони формуються окремими фрагментами по довжині хромосоми. Такий окремий фрагмент ДНК, що подвоюється на одній хромосомі, називається *репліконом*. Виникає відразу декілька репліконів, причому асинхронно й у різних її ділянках. Процес реплікації стосується всієї хромосоми та перебігає практично одночасно, з однаковою швидкістю. Після завершення реплікації в репліконах вони зшиваються ферментами в одну молекулу ДНК. У клітині людини, що ділиться, утворюється більше 50000 репліконів одночасно. Довжина кожного з них 30 мкм. Завдяки великій кількості репліконів швидкість реплікації збільшується в тисячі разів. Тривалість процесу подвоєння генетичного матеріалу складає приблизно 10 год. Ділянки хромосом, де починається реплікація, називаються точками ініціації. Вважають, що це, ймовірно, місця прикріплення інтерфазних хромосом до білків ламели ядерної оболонки. Процес включається цитоплазматичним фактором невідомої природи, що надходить в ядро. Реплікація перебігає в строго визначеному порядку, тобто спочатку починають реплікуватись одні ділянки хромосом, а пізніше – інші. У синтетичному періоді інтерфази подвоюється також і кількість гістонових білків, що асоціюються із синтезованими ДНК і утворюють класичну структуру хроматину. Порушення

точності реплікації призводить до порушення синтезу білків і розвитку патологічних змін клітин і органів.

Значення реплікації: а) процес є важливим молекулярним механізмом, що лежить в основі всіх різновидів поділу клітин про- й еукаріотів; б) забезпечує всі типи розмноження як одноклітинних, так і багатоклітинних організмів; в) підтримує сталість клітинного складу органів, тканин і організму внаслідок фізіологічної регенерації; г) забезпечує тривале існування окремих індивідуумів; д) забезпечує тривале існування видів організмів; е) процес сприяє точному подвоєнню інформації; ж) у процесі реплікації можливі помилки (мутації), що може призводити до порушень синтезу білків з розвитком патологічних змін.

РЕПЛІКАЦІЯ ДНК

Основні етапи реплікації реплікації

Ферменти реплікації

Значення



Ініціація Елонгація Термінація

Хід роботи:

Завдання 1. Розгляньте фрагмент молекули ДНК. Намалюйте його у протоколі. Відшукайте комплементарні пари азотисних основ, що мають два і три водневі зв'язки. Позначте їх на рисунку 1.

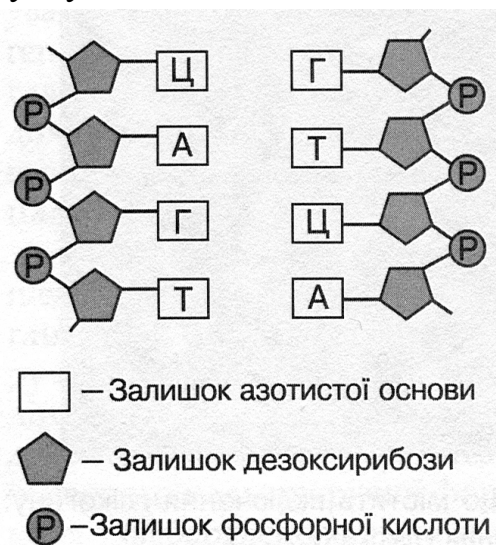


Рис. 1. Схематичний рисунок фрагмента молекули ДНК.

Завдання 2. Охарактеризуйте нуклеїнову кислоту – ДНК за такими ознаками:

- а) кількість полімерних ланцюгів;
- б) склад нуклеотиду;
- в) типи азотистих основ, що входять до складу нуклеотиду;
- г) локалізація в клітині;
- д) функція.

Завдання 3. В одному із ланцюгів фрагмента ДНК нуклеотиди розміщені в такому порядку: 5' ГТЦ-ЦЦЦ-ЦАА-ГГА-ТГЦ 3'. Визначте послідовність нуклеотидів у комплементарному ланцюгу ДНК. Покажіть стрілкою напрямок синтезу нових ланцюгів ДНК під час її реплікації .

Питання для самоконтролю:

1. Що таке нуклеїнові кислоти? Які типи нуклеїнових кислот вам відомі?
2. Що спільного та відмінного в будові молекул ДНК і РНК?
3. Що таке нуклеотид?
4. Яка просторова структура молекули ДНК? Хто вперше запропонував її модель?
5. Як відбувається процес подвоєння ДНК? Чому процес подвоєння ДНК називають напівконсервативним?
6. Назвіть основні послідовні етапи реплікації ДНК. Дайте їх коротку характеристику.
7. Назвіть ферменти, які беруть участь у реплікації ДНК. Яку функцію вони виконують?
8. Що таке точка ініціації реплікації, яка її роль? Скільки точок ініціації є у прокариотів та в еукаріотів?
9. Яку функцію виконують ферменти гелікази?
10. Яку функцію виконують ДНК-полімерази? В якому напрямку ДНК-полімераза полімеризує нуклеотиди під час реплікації на кожному з ланцюгів? Яку назву при цьому має кожен ланцюг?
11. Що таке праймери? Яка їх роль?
12. Що таке елонгація реплікації? Коротко охарактеризуйте процес елонгації реплікації.
13. Як здійснюється термінація реплікації? Що таке реплікон?

Тестові питання:

1. ДНК – це:
 - а) біополімер;
 - б) поліпептид;
 - в) мономер;

г) полісахарид.

2. Скільки водневих зв'язків утворюється між гуаніном і цитозином у молекулі ДНК?

а) один; б) три; в) два; г) чотири.

3. Скільки водневих зв'язків утворюється між аденіном і тиміном у молекулі ДНК?

а) один; б) три; в) два; г) чотири.

4. Перевагою молекули ДНК як носія генетичної інформації над РНК є те, що ДНК здатна до:

а) репарації;

б) транскрипції;

в) реплікації;

г) трансляції.

5. Скільки полінуклеотидних ланцюгів має молекула ДНК?

а) один;

б) три;

в) два;

г) чотири.

6. Первинна структура молекули ДНК має такі особливості:

а) складається з одного полінуклеотидного ланцюга;

б) складається з двох антипаралельних полінуклеотидних ланцюгів;

в) при формуванні первинної структури утворюються водневі зв'язки між азотистими основами;

г) при формуванні первинної структури утворюються ковалентні зв'язки між двома дезоксирибонуклеотидами;

7. Синтез ДНК відбувається в:

а) ядрі;

б) цитоплазмі;

в) комплексі Гольджі;

г) ендоплазматичній сітці.

8. Вторинна структура молекули ДНК має такі особливості:

а) складається з одного полінуклеотидного ланцюга;

- б) складається з двох антипаралельних полінуклеотидних ланцюгів;
- в) при формуванні вторинної структури утворюються ковалентні зв'язки двома дезоксирибонуклеотидами.

9. Процес репарації ДНК:

- а) усуває спонтанні пошкодження ДНК;
- б) відбувається в ядрі;
- в) відбувається за участю ферменту аміноацил-т-РНК-синтетази;
- г) необхідний для збереження генетичного матеріалу протягом усього життя організму.

10. ДНК можна знайти в:

- а) лізосомах;
- б) мітохондріях;
- в) ядрі;
- г) ендоплазматичному ретикулумі;
- д) пластидах.

Практична робота № 2.

Тема: Репарація ДНК. Механізми репарації ушкодженої ДНК. Спадкові хвороби репарації ДНК.

Мета: Вивчити типи репарації, механізми репарації ушкодженої ДНК та спадкові хвороби репарації ДНК.

Під дією фізичних і хімічних агентів, а також при нормальному біосинтезі ДНК у ній можуть виникати ушкодження. Виявилося, що клітини мають механізми виправлення пошкоджень у нитках ДНК. Здатність клітин до виправлення пошкоджень у молекулах ДНК одержала назву *репарації* (від. лат. *reparation* – відновлення).

Процес репарації ДНК полягає в тому, що генетична інформація подана в ДНК двома копіями – по одній в кожному з двох ланцюгів подвійної спіралі ДНК. Завдяки цьому випадкове пошкодження в одному з ланцюгів може бути видалено реплікаційним ферментом і ушкоджена ділянка ланцюга ресинтезована у своєму нормальному вигляді за рахунок інформації, що міститься в неушкодженому ланцюгу.

За часом здійснення у клітинному циклі розрізняють *дореплікативну, реплікативну і постреплікативну* репарацію.

Дореплікативна репарація. Це процес відновлення пошкодженої ДНК до її подвоєння. У найпростіших випадках розриви можуть бути відновлені ферментом лігазою.

Реплікативна репарація. Це сукупність процесів відновлення ДНК у ході реплікації. При цьому ушкоджена ділянка видаляється впродовж реплікації у зоні росту ланцюга. У забезпеченні високої точності реплікації значна роль належить механізму самокорекції, який здійснюється ДНК-полімеразою або тісно зв'язаним з нею ферментом ендонуклеазою. Цей процес пов'язаний із визначенням помилково включеного в ланцюг нуклеотиду, відщепленням його і заміною на відповідний. В результаті цього частота помилок знижується в 10 разів (з 10^{-5} - 10^{-6}).

Постреплікативна репарація. Механізм її точно не вивчений. При постреплікативній репарації відбувається вирізання пошкодженої ділянки і зшивання кінців. При цьому клітина може зберігати життєздатність і передавати дефектну ДНК дочірнім клітинам. Припускають можливість різних варіантів синтезу ДНК на пошкодженій матриці.

За механізмами розвитку репарації розрізняють: *ексцизійну, неексцизійну, рекомбінативну* репарацію.

Ексцизійна репарація (вирізаюча). При ексцизійній репарації усуваються пошкодження, які з'явилися під впливом іонізуючої радіації, хімічних речовин та інших чинників. Це основний тип репарації, виявлений як у прокаріотів, так і у клітинах еукаріотів.

Експізіційна репарація ДНК відрізняється тим, що не тільки розрізаються димери (як при світловій), але й вирізаються великі ділянки молекули ДНК (до кількох сотень нуклеотидів). Очевидно, можуть видалятися цілі гени, після чого відбувається репаративний комплементарний матричний синтез за допомогою ферменту ДНК-полімерази.

На основі однієї з запропонованих моделей встановлено п'ять послідовних етапів експізіційної репарації: 1) «розпізнавання» пошкодження ДНК ендонуклеазою; 2) розрізування ендонуклеазою одного з ланцюгів молекули ДНК поблизу пошкодження; 3) «вирізання» пошкодженої ділянки та її розширення екзонуклеазою; 4) матричний синтез нового ланцюга ДНК-полімеразою (репаративна реплікація); 5) з'єднання новоутвореної ділянки з ниткою ДНК під впливом фермента ДНК-лігази.

Неекспізіційна репарація. Фоторепарація. Здатність до репарації була виявлена у бактерій, які зазнавали впливу ультрафіолетових променів. В результаті опромінення цілісність молекул ДНК порушується, тому що в них виникають димери, тобто зчеплені між собою сусідні піримідинові основи. Димери можуть формуватися між двома тимінами, тиміном і цитозином, двома цитозинами, тиміном і урацилом, двома урацилами. Однак опромінені клітини на світлі виживають набагато краще, ніж у темряві. Після ретельного аналізу причин цього явища встановлено, що в пошкоджених клітинах на світлі відбувається репарація ДНК (фоторепарація). Вона здійснюється спеціальним ферментом ДНК-фотолігазою, яка активується квантами видимого світла. Фермент з'єднується з пошкодженою ДНК, роз'єднує зв'язки в димерах і відновлює цілісність нитки ДНК. Фермент ДНК-фотолігаза, що фотореактивує, не є видоспецифічним, тобто діє на різні види ДНК. У ньому є ціанокобаламін (вітамін В₁₂), що поглинає кванти видимого світла та передає енергію молекулі ферменту. На ранніх стадіях еволюції живих організмів, коли був відсутній озоновий екран, який затримує велику частину потоку згубних для організмів сонячних ультрафіолетових променів, фоторепарація відігравала особливо важливу роль.

Рекомбінаційна репарація. Якщо, наприклад, димери тиміну не усунуті до рекомбінації, то це призводить до зміни структури дочірніх ДНК. Такі порушення можуть усуватися безпосередньо в процесі кросинговеру, але при цьому не відбувається усунення димеру, він видаляється вже після реплікації.

Наслідки порушення процесу репарації.

Виявлено кілька мутацій, які викликають тяжкі природжені захворювання внаслідок порушення процесу репарації. Прикладом може бути пігментна ксеродерма – рецесивна аутосомна мутація, що зустрічається досить рідко. Діти, гомозиготні за геном цієї мутації, при народженні виглядають нормально, але вже в ранньому віці під впливом ультрафіолетових променів сонячного світла у них з'являються зміни шкіри: ластовиння, розширення капілярів, оро-

говіння шкіри, ураження очей, що пов'язано з пошкодженням ДНК. У фібробластах, взятих із шкіри хворих на пігментну ксеродерму, процес репарації після ультрафіолетового опромінювання затягується до 30 год (у клітинах здорових людей – 6 год) і не досягає рівня нормального. Тривалий вплив ультрафіолету призводить, зрештою, до виникнення раку шкіри і летального кінця. У таких дітей відсутній один із ферментів репарації ДНК.

Здатність клітин здійснювати ефективну репарацію генетичного матеріалу може мати значення також у клітинних механізмах старіння. Існують спостереження, що лінії мишей–довгожителів відрізняються більш стабільними хромосомами, а в мишей із нетривалим терміном життя хромосоми характеризуються більшим пошкодженням, виникненням структурних аберацій, які є наслідком порушення процесів репарації. Існують спостереження, які свідчать про зниження інтенсивності процесів репарації ДНК з віком. Але важко сказати, чи ці зміни – причина старіння організму, чи його наслідок.

Спадкові хвороби, що пов'язані з порушенням процесів репарації ДНК, посідають окреме місце серед хронічної патології дитячого віку. Необхідність ранньої своєчасної діагностики цієї групи захворювань зумовлена тим, що зниження репаративної здатності ДНК у клітинах і прогресування патологічного процесу може стати причиною інвалідності і навіть смерті дитини. Нині генетично детерміновані хвороби, при яких дефект пов'язаний з порушенням процесів репарації ДНК, поділяють на три групи. *До першої групи* належить рідкісна спадкова патологія – пігментна ксеродерма. *Другу групу* становлять хвороби, поєднані назвою «синдром спонтанної хромосомної нестабільності», або «синдром ламкості хромосом». До неї включено атаксію-телеангіектазію (синдром Луї–Бар), анемію Фанконі та синдром Блума. *Третя група* – хвороби передчасного старіння шкіри – прогерія Хатчінсона–Гілфорда, синдром Вернера та синдром Коккейна. Усі перераховані хвороби характеризуються вираженим порушенням росту та розвитку дітей.

Окремі з названих патологічних станів супроводжуються вираженою вродженою фоточутливістю і можуть спостерігатися на прийомі у лікаря-дерматовенеролога.

Пігментна ксеродерма

Пігментна ксеродерма – рідкісний генодерматоз, що характеризується вираженою фотофобією, гіперпігментацією шкіри та дистрофією з розвитком неоплазій. Уперше описана М. Karosi в 1870 р. Частота виявлення захворювання становить 1:1 000 000. Характеризується пігментною дисхромією та дистрофією шкіри з розвитком неоплазм унаслідок підвищеної чутливості до сонячного випромінювання, що зумовлено спадковим дефектом репаративних ферментів. Тип успадковування автосомно-рецесивний.

Існує дві форми цього захворювання: класична (кілька типів, іноді пов'язані з неврологічними порушеннями) та варіантна.

Синдром Коккейна

Синдром Коккейна (Cockayne syndrome) отримав свою назву у 1946 р. на честь лондонського лікаря Едварда Альфреда Коккейна, який досліджував спадкову патологію у дітей. На теперішній час відомо 180 випадків цієї хвороби. Тип успадковування автосомно-рецесивний. Розрізняють **2 типи захворювання**: А та В, або синдром Коккейна I та II типу. Тип В спостерігається частіше: 80% усіх випадків захворювання.

Ген синдрому Коккейна картований на довгому плечі 10-ї хромосоми в локусі 10q11. Цей тип захворювання зумовлений мутаціями в гені ERCC6. Зазначений ген кодує білок, який належить до хеліказ і бере участь у процесах розплітання подвійної спіралі ДНК.

Перші ознаки захворювання можуть з'явитися у 5–6-місячному віці, але, як правило, захворювання маніфестує на 2–3-му році життя появою фоточутливості шкіри. Після інсоляції на відкритих ділянках шкіри, частіше на обличчі, з'являється еритема у формі метелика, іноді бульозні висипання. Також спостерігають прояви, подібні до пойкилодермії зі стоншенням підшкірної жирової клітковини.

Поступово з'являються ознаки затримки росту, нестача маси тіла, затримки психічного розвитку, порушення ходи. Хворі мають вигляд людей похилого віку, низькі на зріст, кахектичні, з маленькою головою (до мікроцефалії), пташиним носом, великими вухами, прогнатією, з довгими кінцівками та контрактурами у суглобах, великими кистями та стопами, вузькою грудною кліткою. Контрактури у колінних суглобах спричинюють «ходу кавалериста». Пото- та слезовиділення знижені, волосся тонке, рідке, рано сивіє. Часто спостерігається артеріальна гіпертензія та патологія нирок. Типові порушення органів зору та слуху, наявні фотофобія, помутніння рогівки та кришталика, ністагм, атрофія зорового нерва, дегенерація сітківки, глухота.

Синдром Блума

Синдром Блума (вроджена телеангіектатична еритема, вроджена телеангіектатична еритема і нанізм) – рідкісне спадкове автосомно-рецесивне захворювання. Характеризується підвищеною фоточутливістю, телеангіектатичною еритемою на обличчі, низькою масою тіла при народженні, повільним ростом. Спостерігається у родинах з високою частотою інбридингу. Частіше хворіють хлопчики.

Лімфоцити та фібробласти хворих мають високу кількість хромосомних аберацій і високу чутливість до УФ-опромінення; відмічено недостатність ферменту ДНК-лігази I. Клітини при синдромі Блума виявляють хромосомну нестабільність, що призводить до збільшення соматичних мутацій як під час внутрішньоутробного, так і постнатального життя. У пацієнтів відмічається порушення з боку В- і Т-системи імунітету. Високу онкологічну захворюваність при синдромі Блума пов'язують з пригніченням проліферативної реакції лімфоцитів на мітогени. Ген синдрому Блума досі не клонований.

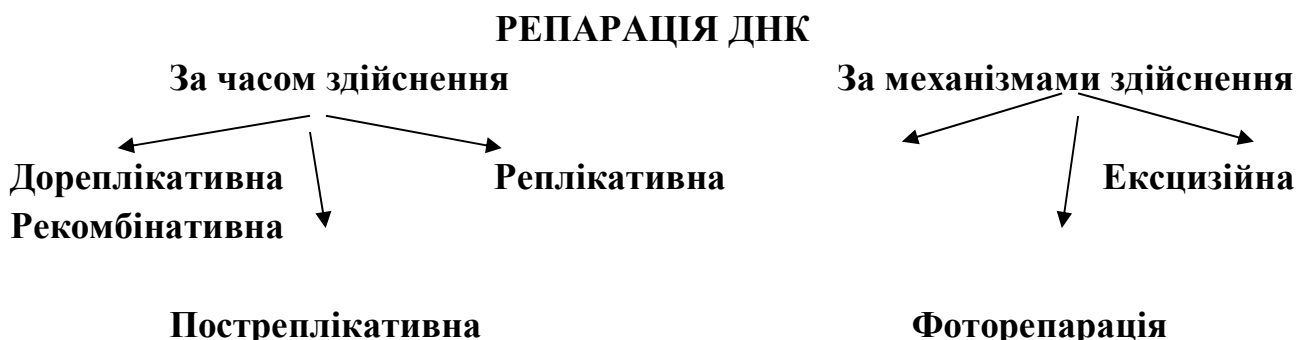
Прояви синдрому спостерігаються у перші місяці життя. Відмічається фоточутливість навіть після мінімального УФ-опромінення. З'являється почервоніння шкіри обличчя (ніс, щоки), вушних раковин, тильної поверхні кистей. Сонячне опромінення може спричинити бульозну та пурпурозну висипку, що супроводжується значною кількістю телеангіектазій, підвищеною уразливістю шкіри, розвитком бульозного хейліту, який призводить до рубцювання. З часом інтенсивність еритеми зменшується, але з'являється атрофія, гіперпігментація, плями кольору кави з молоком. Загострення захворювання спостерігають восени та навесні.

Синдром Ротмунда–Томсона

Синдром Ротмунда–Томсона (вроджена пойкилодермія) – рідкісний спадковий синдром, що характеризується специфічним ураженням шкіри (пойкилодермія, гіперкератоз), катарактою, фоточутливістю, дистрофією волосся, нігтів, зубів, низьким ростом, гіпогонадизмом, порушенням осифікації, великим ризиком розвитку злоякісних неоплазій. У рідкісних випадках можлива затримка розумового розвитку. Тип передачі – автосомно-рецесивний. Частіше відзначається у дівчаток (14:1). Генетичні та біохімічні дефекти при синдромі не визначені, але відмічено зниження репарації ДНК у культивованих фібробластах після УФ- і гамма-опромінення. Наявність хромосомної нестабільності передбачається з огляду на високу частоту асоціації синдрому зі злоякісними новоутвореннями.

Трихотіодистрофія

Це спадкове захворювання з рецесивним типом успадковування, пов'язане з порушенням репарації ДНК, хоча цей зв'язок менш вагомий, ніж при пігментній ксеродермі. Захворювання увійшло в історію медицини під назвою «тигровий хвіст» у 1968 р., оскільки при мікроскопії волосся спостерігають поперечні смуги, які з'являються внаслідок нестачі білків, багатих на сірку. Дефіцит сірки у волоссі призводить до його ламкості та розрідження, проте це – не єдина ознака захворювання. Спостерігаються порушення інтелектуальних функцій, іхтіоз, фертильна недостатність, маленький зріст, редуковане підборіддя, великі вуха та мікроцефалія; збільшена чутливість до УФ-опромінення, що підтверджує ураження системи репарації ДНК. Однак при трихотіодистрофії немає схильності до раку шкіри.



Хід роботи:

Завдання 1. Вивчити типи репарації за часом здійснення.

Завдання 2. Вивчити типи репарації за механізмами розвитку.

Завдання 3. Спадкові хвороби, що пов'язані з порушенням процесів репарації ДНК, їх клінічна характеристика.

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть основні послідовні етапи репарації ДНК. Дайте їх коротку характеристику.
2. Назвіть ферменти, які забезпечують репарацію ДНК? Яка їх функція?
3. Перечисліть послідовні етапи ексцизійної (вирізаючої) репарації. Дайте їх коротку характеристику.
4. Як здійснюється неексцизійна репарація ДНК (фоторепарація)? Дайте їх коротку характеристику.

Тестові питання:

1. Що транспортують до рибосом тРНК?
 - а) амінокислоти;
 - б) АТФ;
 - в) іРНК;
 - г) синтетази;
 - д) іони металів.
2. Яку назву мають змістовні ділянки ДНК хромосом?
 - а) мутони;
 - б) рекони;
 - в) екзони;
 - г) інтрони;
 - д) сайти.
3. З чого побудована молекула ДНК?
 - а) з амінокислот;
 - б) з гістонів;
 - в) з нуклеусом;
 - г) з ліпідів;
 - д) з нуклеотидів.
4. Що таке триплет ДНК?
 - а) послідовність трьох нуклеотидів;
 - б) азотиста основа;
 - в) нуклеотид;
 - г) молекула нуклеїнової кислоти;

д) локус хромосоми.

5. Послідовність триплетів нуклеотидів суворо відповідає послідовності амінокислот у поліпептидному ланцюзі. Як називається така властивість генетичного коду?

- а) колінеарність;
- б) триплетність;
- в) виродженість;
- г) неперекривність;
- д) універсальність.

6. Для кожного рівня структури білка характерні певні види хімічних зв'язків. Який зв'язок забезпечує первинну структуру білка?

- а) дисульфідний;
- б) водневий;
- в) іонний;
- г) пептидний;
- д) ковалентний.

7. Згідно з моделлю подвійної спіралі ДНК, запропонованої Уотсоном і Кріком, встановлено, що один з ланцюгів зберігається при реплікації, а інший синтезується комплементарно першому. Як називається цей спосіб реплікації?

- а) напівконсервативний;
- б) аналогічний;
- в) ідентичний;
- г) дисперсний;
- д) консервативний

Практична робота № 3.

Тема: Структура геномів та молекулярні механізми експресії генів у вірусів

Мета: Вивчити структуру геномів та молекулярні механізми експресії генів у вірусів

Експресія генів – процес, при якому спадкова інформація генів (нуклеотидна послідовність) використовується для синтезу функціонального продукту: білка або РНК.

Якщо кінцевим продуктом є білок, процес експресії генів називається біосинтезом білків а ген – білок-кодуючим (англ. *protein-encoding gene*). Процес складається із кроків транскрипції мРНК та її процесингу (кепування, сплайсингу, постратранскрипційних модифікацій мРНК), трансляції та посттрансляційної модифікації. В інших випадках, для генів, що не кодують білки, а кодують так звані некодуючі РНК (наприклад, тРНК чи рРНК), набір кроків дещо відрізняється. Для експресії генів може використовуватися як генетична інформація, так і епігенетична. Застарілий термін «реалізація генетичної інформації» посилається тільки на інформацію першого типу, якої, проте, може бути недостатньо для отримання функціонального продукту.

Експресія генів в багатьох випадках активно регулюється, змінюючи час та кількість синтезованого генетичного продукту. Кілька кроків у процесі експресії генів можуть модулюватися, зокрема транскрипція і посттрансляційна модифікація. Регуляція експресії генів надає клітині контроль за кількістю та структурою синтезованих біополімерів і є основою диференціації клітин, морфогенезу і адаптації організму до умов навколишнього середовища. Регулювання експресії генів також може приводити до еволюційних змін.

Процес експресії генів відбувається в організмах усіх живих істот: еукаріотів (у тому числі в багатоклітинних організмах), прокаріотів (у бактерій і архей), а також вірусів – для створення макромолекулярних основ для їх життєдіяльності. Деякі процеси, які відбуваються під час експресії генів можуть модулюватися певними чинниками, наприклад транскрипція, сплайсинг РНК, трансляція і посттрансляційна модифікація білка.

Експресія генів забезпечує підтримання структури та функції клітини, що є основою для диференціації клітин, морфогенезу, а також універсальної адаптованості будь-якого організму до умов існування. Регуляція генів може також служити як субстрат для еволюційних змін, оскільки контроль за часом, місцем і інтенсивністю експресії генів може мати величезний вплив на функції (дію) генів у клітині або у багатоклітинному організмі.

У генетиці, вплив експресії генів розглядається на фундаментальному рівні, адже під час цього процесу під дією генотипу формується фенотип. Генетичний код зберігається у ДНК у вигляді нуклеотидної послідовності «яка інтерпретується» під час експресії генів, а властивості продуктів експресії генів призводить до формування фенотипу організму.

Деякі гени експресуються в певних типах клітин, тоді як інші можуть бути виражені на певних стадіях розвитку. Клітини також повинні мати можливість змінювати свої моделі експресії генів у відповідь на внутрішні та зовнішні сигнали, контролюючи вироблення білків у міру необхідності. Отже, регулювання експресії генів має вирішальне значення. Відомо багато регуляторних механізмів, кожен з яких діє на різному етапі шляху від ДНК до білка.

Регуляція експресії генів.

Контроль експресії генів здійснюється на усіх етапах експресії генів:

- на рівні транскрипції (контролюється час і характер транскрипції гена);
- на рівні процесінгу первинного транскрипту;
- при транспорті зрілих мРНК в цитоплазму;
- на рівні трансляції
- відбір в цитоплазмі мРНК для трансляції на рибосомах
- на рівні деградації – вибіркова дестабілізація певних типів мРНК в цитоплазмі,
- на рівні активності білка – селективна активація, інактивація або компартименталізація молекул білка після їх синтезу.

Регуляція транскрипції. Регуляція транскрипції має важливе значення для розуміння механізмів диференціальної активності (експресії) генів в онтогенезі будь-кого про- і еукаріотичного організму. Шляхом регуляції генної експресії клітини пристосовуються до змін зовнішнього і внутрішнього середовища. Фенотип клітин визначається кількістю і властивостями продукованих ними структурних, каталітичних, регуляторних або інших класів білків. Повинна існувати ефективна система контролю реалізації генетичної інформації в клітині, яка б дозволяла в кожен момент підтримувати її функціональну активність синтезуючи достатню кількість різних білків.

У бактерій набір білків регулюється в основному наявністю мРНК, придатних для біосинтезу білка (трансляції), регуляцією самого процесу трансляції в рибосомальному апараті клітини, а також регуляцією процесів деградації (протеолізу) білків. У еукаріот білковий пул в клітині може додатково контролюватися за допомогою процесів дозрівання (процесінгу) первинних транскриптів і транспорту зрілих РНК з ядра в цитоплазму. Додаткові можливості контролю клітини еукаріот придбали в результаті роз'єднання у просторі та часі процесів транскрипції (в ядрі) і трансляції (в цитоплазмі). У прокаріот транскрипція і трансляція відбуваються практично одноразово в єдиному неструктурованому клітинному вмісті: синтез РНК на ДНК-матриці ще триває, а вже починається трансляція за участю рибосом, тРНК і білкових чинників трансляції. Першим і головним етапом контролю реалізації потоку генетичної інформації на шляху від ДНК до білку у усіх організмів є контроль на рівні транскрипції.

Геноміка. Організація геномів неклітинних організмів і прокаріот.

Геноміка. У 1920 році Ганс Вінклер запропонував поняття геном, як систему генів локалізовану в гаплоїдному наборі хромосом. В сучасному розумінні «геном» – сукупність спадкового матеріалу, який знаходиться в клітині організму. Геном містить генетичну інформацію необхідну для побудови організму та його функціонування. Більшість геномів (прокаріот і еукаріот) побудовані з ДНК, але деякі віруси мають РНК-геноми.

Геноміка сформувалася як розділ молекулярної біології в 1980-1990-х роках разом з виникненням перших проектів по секвенуванню геномів деяких видів організмів. Першим був секвенований у 1977 році геном бактеріофага Ф-Х174 (5368 нуклеотидів). Наступним етапом було секвенування геному бактерії *Haemophilus influenzae* (1.8 Mb) (1995). Пізніше були повністю секвеновані геноми ще декількох видів, включаючи геном людини (2001 рік – чорновий варіант, 2003 рік – завершення проекту).

Розвиток геноміки відбувся завдяки вдосконаленню методів дослідження НК, а також завдяки появі могутньої обчислювальної техніки, що дозволило працювати з великим обсягом даних. На сучасному етапі розвитку молекулярної біології сформувалися нові розділи геноміки: структурна геноміка, функціональна, інформаційна, порівняльна, еволюційна, медична, фармакогеноміка та ін.

Основою молекулярної медицини, яка розробляє методи діагностики, лікування і профілактики спадкових (генних і хромосомних), інфекційних та інвазійних хвороб є геноміка людини. Для медицини особливе значення мають дослідження геноміки в медичній мікробіології, вірусології, оскільки вони розкривають природу інфекції і надають перспективи для створення специфічних ліків, для лікування різних захворювань.

Організація генома вірусів. Віруси – це неклітинні форми життя, які мають власний геномом і здатні до відтворення тільки в клітинах про- і еукаріот. Віріон (або вірусна частка) складається з однієї або декількох молекул ДНК або РНК, вкритий білковою оболонкою (капсид), що іноді містить також ліпідні й вуглеводні компоненти. Віруси розмножуються тільки після інфікування живих клітин. Віруси здатні проникати у тваринні й рослинні клітини, а також бактерії (віруси бактерій називаються *бактеріофагами*). Віруси є внутрішньоклітинними паразитами, на генетичному рівні вони використовують для свого розмноження білоксинтезуючий апарат клітини-хазяїна.

Геном вірусів представлений ДНК або РНК, які можуть бути одно- і дволанцюговими, кільцевими й лінійними. Молекулярна маса ДНК вірусів перебуває у межах 1×10^6 - 200×10^6 ; РНК - 1×10^6 - 15×10^6 дальтона.

За складністю будови генома віруси широко варіюють – від фага Q ϕ (РНК-вмісний вірус бактерій), що має 4 гена, до вірусу віспи (ДНК-вмісний вірус), геном якого нараховує близько 250 генів. Крім того, усі гени вірусів можуть бути упаковані в одній молекулі нуклеїнової кислоти або розподілені по декільком молекулам, які разом представляють геном такого вірусу. Наприклад, у реовірусів геном представлений дволанцюговою РНК і

складається з 10 молекул (або сегментів). Геноми одноланцюгових РНК-вмісних вірусів, можуть бути або суцільними (ретровірус), або сегментованими (вірус грипу). Геном РНК-вмісних вірусів тільки лінійний.

ДНК-вмісні віруси хребетних мають геном, представлений однією молекулою ДНК, лінійною або кільцевою, одно- або дволанцюговою. У деяких вірусів, наприклад у вірусу гепатиту В, геном представлений кільцевою молекулою дволанцюгової ДНК, в обох ланцюгах якої в різних місцях виявлені одноланцюгові ділянки.

Типи генетичного матеріалу і механізми реплікації у різних вірусів.

РНК-вмісні віруси (РНК ^ РНК). Геноми майже всіх відомих РНК-вмісних вірусів – це лінійні молекули, їх розділяють на три групи.

Перша група – це одноланцюгові геноми, з нуклеотидною послідовністю, що відповідає мРНК. Такі геноми позначають (+) РНК. Одноланцюговий (+) РНК геном характерний для вірусів тютюнової мозаїки, поліомієліту, кліщового енцефаліту.

Друга група – це одноланцюгові геноми з негативною полярністю, тобто (-) РНК геноми. До вірусів з негативним РНК геномом відносяться віруси грипу, кору, сказу, жовтої карликовості картоплі й ін.

Третю групу становлять дволанцюгові геноми, (±)РНК геноми. Дволанцюгові геноми завжди сегментовані (складаються з декількох різних молекул). Сюди відносяться реовіруси, їх розмноження подібне до попереднього. Разом з вірусною РНК у клітину попадає й вірусна РНК-залежна РНК-полімераза, яка забезпечує синтез (+)РНК. (+)РНК забезпечує синтез вірусних білків на рибосомах клітини хазяїна й служить матрицею для синтезу нових (-)РНК ланцюгів вірусної РНК: Ланцюги (+) і (-) РНК, комплементарно з'єднуються утворюючи двонитковий (±) РНК-геном, який упаковується в білкову оболонку.

РНК-вмісні віруси (РНК ^ ДНК ^ РНК). До них відносять віруси, у яких цикл реплікації генома включає дві головні реакції: синтез РНК на матриці ДНК і синтез ДНК на матриці РНК. При цьому до складу вірусного генома може входити або РНК (ретровіруси), або ДНК (ретроїдні віруси). У цю групу входять вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) і деякі збудники злоякісних новоутворень. Вірусна частка містить дві молекули геномної одноланцюгової (+) РНК. У вірусному геномі закодований незвичайний фермент (зворотна ревертаза), який має властивості як РНК-залежної, так і ДНК-залежної ДНК-полімерази.

Вірусний геном у формі дуплекса ДНК (провірусна ДНК) вбудовується в хромосому клітини хазяїна. ДНК вірусу при діленні клітини реплікується разом із ДНК хазяїна. Для утворення нових провірусні гени (гени вірусу в хромосомах хазяїна) транскрибуються в ядрі клітини транскрипційним апаратом хазяїна в (+)РНК-транскрипти. Одні з них стають геномом нових ретровірусів, а інші зазнають процесінгу й утворюють мРНК, які використовуються для трансляції білків вірусних часток. До цієї групи відносять онкогенні ретровіруси: вірус

саркоми Рауса (птахів), вірус лейкозу мишей і т.д. Розвиток пухлини визначає один ген ретровіруса — онкоген.

ДНК-вмісні віруси. *Перша група* – віруси із дволанцюговою ДНК, реплікація яких здійснюється за схемою: ДНК \rightarrow РНК \rightarrow ДНК. Вони одержали назву *ретроїдні віруси*. Представниками цієї групи вірусів є вірус гепатиту В і вірус мозаїки цвітної капусти. Реплікація ДНК-генома цих вірусів здійснюється за допомогою проміжних молекул РНК:

Друга група – віруси із дволанцюговою ДНК, реплікація яких здійснюється за схемою ДНК \rightarrow ДНК. У зараженій клітині ДНК-залежна РНК-полімераза транскрибує з генома цих вірусів молекули мРНК (тобто (+) РНК), які приймають участь у синтезі вірусних білків, а розмноження вірусного генома здійснює фермент ДНК-залежна полімераза.

У ретровірусах (РНК-вмісні віруси: вірус саркоми Рауса, вірус СНІДу та ін.) ревертаза перетворює їх РНК у форму ДНК, яка вбудовується в клітинну хромосому. У результаті транскрипції інтегрованої вірусної ДНК клітинною ДНК-залежною РНК-полімеразою утворюється велика кількість молекул вірусної РНК, ідентичних вихідному інфікуючому геному. Завершується процес трансляцією цих молекул РНК із утворенням капсидних і мембранних білків, а також зворотньої транскриптази; нарешті, відбувається складання нових вірусних часток, які включають вірусний РНК-геном і зворотну транскриптазу. Вірусні частки залишають клітину, не вбиваючи її. Виникає особлива форма хронічної інфекції, при якій працюючий вірусний геном, включений до складу клітинної хромосоми, передається дочірнім клітинам. Таке співіснування впливає на клітину. Властивості її під впливом вірусних білків, що перебувають у ній, можуть змінюватися, і в деяких випадках заражена клітина стає раковою.

Хід роботи:

Завдання 1. Вивчити організацію генома вірусів.

Завдання 2. Вивчити механізми реплікації у *РНК-вмісних вірусів (РНК \rightarrow РНК)*.

Завдання 3. Вивчити механізми реплікації у *РНК-вмісних вірусів (РНК \rightarrow ДНК \rightarrow РНК)*.

Завдання 4. Вивчити механізми реплікації у *ДНК-вмісних вірусів*.

Питання для самоконтролю:

1. Які механізми саморегуляції існують у клітині?
2. Чи можуть генетично ідентичні клітини синтезувати різні білки?
3. У чому різниця між геном, транскриптомом, опероном?
4. Яка структура оперона прокаріот?
5. Яку функцію виконує промотор?
6. Яку функцію виконує термінатор?
7. У яких станах може перебувати репресор?
8. Скільки молекул іРНК утворюється на опероні, що має 10 структурних генів?

9. Чи можна побачити в світловому мікроскопі ділянку хромосом з неактивними генами?
10. Що таке еухроматин?
11. Що таке гетерохроматин?

Тестові питання:

1. Ділянка ДНК, до якої приєднується білок-репресор, це:
- а) промотор;
 - б) оператор
 - в) ген-регулятор;
 - г) термінатор.
2. Ділянка ДНК, що містить інформацію про структуру білка-репресора, це:
- а) оперон;
 - б) оператор;
 - в) ген-регулятор
 - г) промотор.
3. Гетерохроматин – це:
- а) функціонально неактивна ділянка хромосоми
 - б) функціонально активна ділянка хромосоми;
 - в) спіралізована ділянка хромосоми;
 - г) деспіралізована ділянка хромосоми.
4. Еухроматин – це:
- а) функціонально активна ділянка хромосоми
 - б) функціонально неактивна ділянка хромосоми;
 - в) спіралізована ділянка хромосоми;
 - г) деспіралізована ділянка хромосоми.
5. Розрізняють такі види гетерохроматину:
- а) конститутивний
 - б) факультативний
 - в) адаптивний.
6. Конститутивний гетерохроматин бере участь у:
- а) підтриманні загальної структури ядра
 - б) прикріпленні хроматину до ядерної оболонки;
 - в) взаємному впізнанні гомологічних хромосом у мейозі;
 - г) процесах транскрипції.
7. Який вид хроматину є функціонально активним в інтерфазі:
- а) еухроматин
 - б) Х-хроматин;
 - в) конститутивний гетерохроматин;

г) факультативний гетеро хроматин.

8. Транскрипцію лактозного оперону пригнічує:

- а) комплекс активного репресора з неактивним репресором;
- б) активний індуктор;
- в) комплекс індуктора з активним репресором;
- г) активний репресор

9. Оперон – це:

- а) група структурних генів та пов'язаних з ними регуляторних ділянок, що контролюють утворення про-іРНК
- б) група регуляторних генів, що контролюють утворення кількох молекул про-іРНК;
- в) група регуляторних ділянок, представлених промотором, оператором та термінатором, що контролюють утворення про-іРНК.

10. Промотор – це:

- а) послідовність нуклеотидів, до якої приєднується ДНК-залежна РНК-полімераза
- б) послідовність нуклеотидів, споріднена з білком-репресором;
- в) послідовність нуклеотидів, у якій міститься інформація про білок-репресор;
- г) послідовність нуклеотидів, яка забезпечує припинення синтезу про-іРНК.

Практична робота № 4.

Тема: Структура геному та молекулярні механізми експресії генів у прокаріотів.

Мета: Вивчити структуру геному та молекулярні механізми експресії генів у прокаріотів

Першим і головним етапом контролю реалізації потоку генетичної інформації на шляху від ДНК до білку в усіх організмів є контроль на рівні транскрипції. Транскрипція це перший крок експресії генів, тому регуляція транскрипції є очевидним способом вплинути на вираженість гена.

Транскрипція у прокаріот регулюється переважно на стадії ініціації. У прокаріот (бактерій) гени часто згруповані в групи, так що гени, які потрібно експресувати одночасно, знаходяться поруч один з одним, і всі вони контролюються як єдина одиниця одним і тим же промотором. Групи генів, які координатно регулюються одним промотором, називаються оперонами. Весь набір генів в опероні можна контролювати за допомогою дії білків, що зв'язують ДНК, які діють як репресори (запобігаючи транскрипції генів), так і активатори (збільшення транскрипції генів). Зв'язування цих білків з їх мішенями ДНК аллостерично контролюється зв'язуванням специфічних малих молекул, які сигналізують про стан клітини.

Геном прокаріот.

Прокаріоти не мають в клітинах ядра. Геном прокаріот побудований компактно, кількість некодуючих послідовностей нуклеотидів мінімальна. Простота геному прокаріот пояснюється їх спрощеним життєвим циклом.

Структура бактеріальної хромосоми. П'ятдесят років тому усі хромосоми прокаріот вважалися лінійними. В 1956 р. Ф.Жакоб і Е.Вільман запропонували кільцеву модель бактеріальної хромосоми. Ця модель вважалася загальноприйнятою до появи методу прямого аналізу фізичної структури хромосом. У 1989 р. уперше цим методом була ідентифікована лінійна бактеріальна хромосома у збудника кліщового спірохетозу *Borrelia burgdorferi*. Незабаром встановили, що лінійна і кільцева хромосоми співіснують одночасно у *Agrobacterium tumefaciens*, а у грампозитивних бактерій роду *Streptomyces*, що мають один з найбільших бактерійних геномів (=8000 тис. н.п.), є одна лінійна хромосома. Лінійні хромосоми у бактерій часто співіснують з лінійними плазмідами і широко розповсюджені в природі.

Розмір геному у різних бактерій коливається від 580 тис. н.п. у *Mycoplasma genitalium* до 9 500 тис. н.п. у *Mycobacterium xanthus*. Для кишкової палички *E.coli* розмір геному складає 4600 тис. н.п. (мол. маса близько 3×10^9 Да, довжина ДНК =1,5 мм). У бактеріальних клітинах хромосома сильно компактизована. Так, кільцева молекула ДНК *E.coli* довжиною – 1,5мм знаходиться в клітині у формі палички, що має діаметр 1 мкм і завдовжки 2 мкм. В останні роки спостерігається прогрес в дослідженні первинної

структури бактеріальних хромосом. На кінець вже 2011 р. була визначена повна нуклеотидна послідовність 200 прокариотичних геномів.

Бактерійні плазмідні.

Окрім хромосоми у більшості бактерій існують структури здатні до автономної реплікації – плазмідні. Це дволанцюгові кільцеві ДНК розміром від 0,1 до 5% розміру хромосоми, які мають гени, необов'язкові для клітини-хазяїна, або гени, необхідні лише в певному середовищі. Плазмідні містять гени, які надають клітинам спадкову стійкість до одного або декількох антибіотиків. Вони дістали назву чинників резистентності, або R-факторів. Інші плазмідні визначають хвороботворність патогенних бактерій, наприклад, патогенних штамів *B.coli*, збудників чуми і правця. Треті – визначають здатність ґрунтових бактерій використовувати незвичайні джерела вуглецю, наприклад, вуглеводи нафти.

Плазмідні контролюють синтез різних чинників патогенності багатьох видів бактерій (у збудників чуми, сибірської виразки, ієрсиніозів, дизентерії та ін.).

Важливу роль відіграють R-плазмідні. В умовах широкого застосування антибіотиків і інших препаратів відбувається утворення патогенних штамів бактерій резистентних до них. Відомо, що створені антибіотики втрачають свою ефективність за рік і необхідно створювати нові, щоб подолати інфекцію. Формуються нові епідемічні клони патогенних бактерій. На теперішній час вони відіграють провідну роль в епідеміології інфекційних хвороб, від їх розповсюдження залежить ефективність лікування і здоров'я людей.

Наявність у мікроорганізмів додаткових джерел генів патогенності, носіями яких є віруси й плазмідні, безсумнівно, стало одним із чинників виникнення бактерій патогенних для людини і тварин.

Хід роботи:

Завдання 1. Вивчити структуру бактеріальної хромосоми.

Завдання 2. Вивчити структуру бактерійної плазмідні.

Питання для самоконтролю:

1. У чому суть транскрипції у прокариот?
2. Охарактеризуйте геном прокариот.
3. Яка структура бактеріальної хромосоми?
4. Що являють собою бактерійні плазмідні?

Тестові питання:

1. Де синтезується реп ресор:
 - а) в ядрі
 - б) на рибосомах;
 - в) на гені-регуляторі;

г) на операторі.

2. Корепресор – це:

- а) речовина, яка є наслідком роботи оперона;
- б) речовина, яка має специфічну спорідненість до промотора;
- в) речовина, яка забезпечує активацію білка-репресора;
- г) речовина, яка забезпечує синтез білка-репресора

3. Індуктор – це:

- а) речовина, яка змінює конформацію білка-репресора
- б) речовина, яка є наслідком індукції роботи оперона;
- в) речовина, яка має специфічну спорідненість;
- г) речовина, яка забезпечує синтез білка-репресора.

4. Оператор – це:

- а) ділянка молекули ДНК, що містить інформацію про структуру білка-репресора;
- б) ділянка молекули ДНК, яку впізнають специфічні білки-репресори і яка регулює транскрипцію оперона або окремих генів
- в) ділянка молекули ДНК, яка сигналізує про закінчення транскрипції;
- г) ділянка молекули ДНК, до якої приєднується фермент ДНК-залежної РНК-полімерази.

5. Оператор, пов'язаний із репресором:

- а) протидіє транскрипції наступної за оператором ділянки ДНК;
- б) посилює транскрипцію наступної за оператором ділянки ДНК;
- в) забезпечує синтез ферментів, інформація про структуру яких закована в структурних генах;
- г) протидіє синтезу ферментів, інформація про структуру яких закована в структурних генах

6. Процес дозрівання про-мРНК називають:

- а) реплікацією;
- б) репарацією;
- в) процесингом
- г) транскрипцією;
- д) мутацією.

7. Процесинг – це:

- а) сукупність реакцій, наслідком яких є перетворення первинних продуктів транскрипції на функціональні молекули
- б) сукупність реакцій, що протидіють перетворенню первинних продуктів транскрипції і трансляції на функціональні молекули;
- в) сукупність реакцій, що забезпечують формування третинної структури білкової молекули;
- г) сукупність реакцій, що забезпечують формування четвертинної структури білкової молекули.

8. Одиницею транскрипції є:

- а) реплікон;
- б) мутон;
- в) транскриптон
- г) оперон;
- д) цитрон.

9. Речовини небілкової природи, які активують репресор і перешкоджають транскрипції:

- а) індуктори;
- б) корепресори
- в) модифікатори;
- г) термінатори;
- д) енхансери.

10. Транскрипцію лактозного оперону «виключає»:

- а) білок-репресор;
- б) промотор;
- в) комплекс РНК-полімерази з промотором;
- г) взаємодія білка-репресора з оператором
- д) оператор.

11. Ділянка оперону, що зв'язується з білком-репресором, називається:

- а) ген-регулятор;
- б) промотор;
- в) оператор
- г) термінатор;
- д) цитрон.

12. . Процес дозрівання про-мРНК називають:

- а) реплікацією;
- б) репарацією;
- в) процесингом
- г) транскрипцією;
- д) мутацією.

13. Одиницею транскрипції є:

- а) реплікон;
- б) мутон;
- в) транскриптон
- г) оперон;
- д) цитрон.

14. Ділянка ДНК, що містить інформацію про структуру білка-репресора:

- а) оперон;
- б) оператор;

- в) ген-регулятор
- г) промотор;
- д) транс криптон.

15. Хімічна природа репресора:

- а) вуглевод;
- б) ліпід;
- в) білок
- г) ДНК;
- д) РНК.

Практична робота № 5.

Тема: Структура геному та молекулярні механізми експресії генів у еукаріотів.

Мета: Вивчити структуру геному та молекулярні механізми експресії генів у еукаріотів.

Генна експресія – це складний молекулярний механізм реалізації спадкової інформації в конкретну фенотипову ознаку.

Процес експресії гена включає такі етапи:

1. Транскрипція – складний біологічний процес реакцій матричного синтезу, який забезпечує передачу інформації з послідовності нуклеотидів ДНК на послідовність нуклеотидів РНК.

2. Процесинг – процес дозрівання зрілої іРНК (або тРНК). Про-іРНК зазнає модифікації та сплайсінгу, що забезпечує стабільність іРНК та здатність до поєднання з рибосомами.

3. Трансляція – складний біологічний процес реакцій матричного синтезу, який забезпечує передачу інформації з послідовності нуклеотидів РНК на послідовність амінокислот в поліпептидах.

4. Фолдінг та модифікація поліпептидів в клітині (в цитоплазмі та вакуолярній системі), які приводять до структурної організації білків та набуттю ними функціональної активності.

5. Експресія в ознаку. Утворений білок виконує свою функцію, яка на морфологічному рівні визначає конкретну ознаку (ген) або фенотип (при взаємодії з іншими генами).

Всі етапи експресії генів відбуваються з використанням енергії під впливом десятків ферментів. Основою експресії генів є молекулярні процеси транскрипції, процесингу, трансляції і модифікації.

Транскрипція у еукаріот.

РНК-полімерази еукаріот вивчені значно менше, ніж відповідні ферменти бактерій. Синтез РНК у еукаріот здійснюють три різні ферменти: РНК-полімерази I, II і III, структура яких вивчена далеко не повністю. Спочатку еукаріотичні РНК-полімерази були ідентифіковані на основі їх чутливості до аманітину – високотоксичного антибіотику, що міститься у блідій поганці. Пізніше було встановлено, що РНК-полімераза I (не чутлива до аманітину) синтезує великі (28S і 18S) рибосомальні РНК, РНК-полімераза II (найбільш чутлива до аманітину) транскрибує гени, що кодують білки, а також гени малих ядерних РНК, а РНК-полімераза III відповідає за синтез 5S рРНК і тРНК.

РНК-полімерази I, II і III дріжджів мають три ідентичні по молекулярній масі субодиниці (27, 23 і 14,5 кДа). Дріжджові РНК-полімерази I і II містять також дві інші однакові по масі субодиниці (14 і 40 кДа). Інші відомі субодиниці у усіх трьох РНК-полімераз дріжджів помітно розрізняються за молекулярною масою: 135 і 190 кДа – у РНК-полімерази I; 146, 150, 220 і 445 кДа – у РНК-полімерази II; 82, 128 і 160 кДа – у РНК-полімерази III. Жодна з РНК-полімераз еукаріот не здатна самотійно зв'язуватися з промоторами генів,

які транскрибує. Для приєднання до транскриптона еукаріот служать специфічні для кожної РНК-полімерази білкові чинники транскрипції (ТР-чинники): РНК-полімерази I, II і III вимагають участі факторів транскрипції – TF1, TFII і TFIII відповідно. Велика латинська буква, яка зазвичай йде за римською цифрою, означає, яким за рахунком був виявлений цей чинник, наприклад, першим був виділений чинник транскрипції гена 5S рРНК, який транскрибується РНК-полімеразою III – TFIIIА. Різні чинники транскрипції приєднуються до ДНК в різних місцях відносно точки початку транскрипції. Так, чинники TFID і TFIID зв'язуються з ДНК і утворюють комплекси з РНК-полімеразами перед сайтом початку транскрипції, а чинник TFIC – відразу після відповідного сайту. Чинник TFIID, необхідний для багатьох промоторів РНК-полімерази II, називають ще ТАТА-чинником, оскільки він зв'язується з ТАТА-боксом, розташованим за 25 н.п. до сайту початку транскрипції.

Незважаючи на те, що вивчення білкових чинників транскрипції еукаріот ще далеко не закінчене, виявлені деякі особливості структури цих білків, здатних забезпечувати специфічні взаємодії їх амінокислотних послідовностей з азотистими основами ДНК. У цих білках зазвичай є два домени, один з яких відповідає за зв'язування ДНК, а другий – за регуляцію транскрипції. Наприклад, у білку GAL 4, що регулює транскрипцію в дріжджових клітинах,

Генетичний код. Ще на початку 50-х років ХХ ст. Г.Гамов запропонував, що генетичний код є триплетним: три сусідніх нуклеотида в полінуклеотидному ланцюзі програмує включення однієї амінокислоти в поліпептидний ланцюг білку. В середині 60-х років ХХ ст. в серії оригінальних експериментів (Ф.Крік, С.Бренер, Г.Вітман і інші дослідники) було встановлено, що код є *триплетним і безперервним*. Повна розшифровка генетичного коду, проведена М.Ніренбергом, С.Очоа і Н.Г.Корана з використанням безклітинних систем, була завершена в 1966 р.

Відповідно до коду при використанні кополімера полі(ЦС)_n в якості матриці в цих системах утворювався поліпептид, побудований із залишків серину і лейцину, а полі(ОЄ)_n служив матрицею для синтезу кополімера із залишками Val і Cys, які чергуються. Ця робота показала, що 61 з 64 можливих комбінацій трьох нуклеотидів чотирьох типів (4x4x4) кодують одну з двадцяти протеїногенних амінокислот. Інші три кодони – UAA, UGA і UAG – не кодують жодну з канонічних амінокислот. Ці кодони є сигналами зупинки (термінації) трансляції і тому називаються *стоп-кодонами*, або *кодонами-термінаторами*. Термінальні кодони не завжди однозначно розпізнаються системою трансляції і тому у складі мРНК вони нерідко дублюються. Першим (основним) стоп-кодоном зазвичай є кодон UAA, а на невеликій відстані слідом за ним розташовується один з інших термінуючих триплетів (UGA або UAG). Слід також враховувати, що при синтезі ряду білків кодон UGA використовується для включення у білок амінокислотного залишку селеноцистеїна. При синтезі білку триплети нуклеотидів мРНК (кодони) транслуються у відповідні ним амінокислоти. Наприклад, кодони AUG і GUG детермінують включення у білок метіоніну і валіну відповідно.

Оскільки число кодуєчих триплетів (61) в три рази більше числа протеїногенних амінокислот, генетичний код *вироджений*, тому багато амінокислот кодуються двома і більше кодонами. Тільки дві амінокислоти (Met і Trp) кодуються одним кодоном (AUG і UGG відповідно) і тому зустрічаються у білках рідше за інші.

Виродженість генетичного коду полягає в тому, що для кожної амінокислоти існує більше однієї тРНК, і одна тРНК може взаємодіяти більш ніж з одним кодоном мРНК. У трьох-літерному генетичному коді найбільш важливі перші дві, тоді як третя літера часто буває різною. Так, наприклад, гліцин кодується чотирма *синонімічними кодонами*: GGA, GGC, GGG і GGU, у зв'язку з переважаючою роллю перших двох букв кодонів (вважаючи з 5'-кінця триплету мРНК) генетичний код іноді називають *квазидуплетним*. Ця особливість коду дозволяє використати меншу кількість тРНК: для взаємодії з 61 кодоном досить 31 тРНК в цитоплазмі і всього 22 тРНК у білоксинтезуючій системі мітохондрій тварин.

Генетичний код майже завжди *універсальний*, тобто єдиний для всіх організмів, які живуть на Землі, - від бактерій до людини. Невеликі відмінності є, проте, в генетичному коді мітохондрій і хлоропластів. Немає ніяких даних про те, що коли-небудь існували організми з іншим кодом або іншими амінокислотами. Генетичний код ретельно зберігається в еволюції і зміни в коді, а також в рибосомальному апараті клітин слід визнати сильно загальмованими

Генетичний код – система розташування нуклеотидів в ДНК (або РНК), яка визначає послідовність нуклеотидів РНК і амінокислот у поліпептидах (Табл. 1).

Таблиця 1

Перша основа	Друга основа				Третя основа
	У (А)*	Ц (Г)	А (Т)	Г (Ц)	
У (А)*	Фен	Сер	Тир	Цис	У (А)*
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц (Г)
	Лей	Сер	--	--	А (Т)
	Лей	Сер	--	Три	Г (Ц)
Ц (Г)	Лей	Про	Гіс	Арг	У (А)
	Лей	Про	Гіс	Арг	Ц (Г)
	Лей	Про	Глн	Арг	А (Т)
	Лей	Про	Глн	Арг	Г (Ц)
А (Т)	Іле	Тре	Асн	Сер	У (А)
	Іле	Тре	Асн	Сер	Ц (Г)
	Іле	Тре	Ліз	Арг	А (Т)
	Мет	Тре	Ліз	Арг	Г (Ц)
Г (Ц)	Вал	Ала	Асп	Глі	У (А)
	Вал	Ала	Асп	Глі	Ц (Г)
	Вал	Ала	Глу	Глі	А (Т)
	Вал	Ала	Глу	Глі	Г (Ц)

*В дужках – кодони ДНК, перші нуклеотиди – кодони іРНК.

Транскрипція.

Транскрипція – перша стадія реалізації генетичної інформації, процес «переписування» послідовності ДНК в одноланцюгову молекулу комплементарної РНК. В результаті транскрипції утворюються мРНК, які кодуєть амінокислотні послідовності білків, а також тРНК, рРНК і інші види РНК, що виконують структурні, регуляторні і каталітичні функції. У основі транскрипції лежить *принцип комплементарності* азотистих основ полінуклеотидних ланцюгів ДНК і РНК, а сам процес здійснюється за участю ферментів – РНК-полімераз, і великої групи білків – регуляторів транскрипції.

Досконало вивчені етапи і механізми регуляції транскрипції прокариотичних геномів, проте деталі транскрипції у еукаріот відомі не повністю. В той же час в загальній системі контролю реалізації генетичної інформації контроль на рівні транскрипції є найбільш важливим етапом, відповідальним за диференціальну активність генів в онтогенезі будь-якого організму, і складність організації цього контролю, зайвий раз підтверджує фундаментальне значення транскрипції в реалізації програми життя.

Синтез РНК на матриці ДНК ведуть ДНК-залежні-РНК-полімерази, які відносяться до групи нуклеотидилтрансфераз і які використовують нуклеозид-5'-трифосфати. РНК-полімерази активні тільки у присутності іонів Mg^{2+} , для зв'язування яких в молекулі існує консенсусна амінокислотна послідовність з 10 амінокислотних залишків. РНК-полімерази на відміну від ДНК-полімераз не потребують праймера і використовують рибонуклеозид-5'-трифосфати (АТР, ГТР, СТР, УТР). Зростання ланцюга РНК відбувається шляхом послідовного приєднання рибонуклеозид-5'-монофосфатів до 3'-гідроксильної групи рибози попереднього нуклеотиду (тобто у напрямі 5'→3'). Послідовність нуклеотидів в синтезованому РНК-транскрипті визначається комплементарними азотистими основами матричного ланцюга ДНК. Різні види РНК у еукаріот синтезуються різними РНК-полімеразами, тоді як у бактерій усі види РНК синтезує один фермент.

У всіх без виключення організмів процес транскрипції відбувається тільки на певних ділянках – *транскриптонах*. Вони обмежені двома послідовностями – *промотором* (зона початку транскрипції) і *термінатором* (зона зупинки транскрипції). Транскриптони бактерій називають *оперонами*. Оперони включають нуклеотидні послідовності – цистрони, або *структурні гени*, які кодуєть структуру декількох білків. мРНК синтезована на оперонах *поліцистронна* і синтезує декілька білків, на відміну від *моноцистронних* мРНК вищих організмів, які служать матрицями для синтезу одного білка.

Послідовність нуклеотидів в синтезованій молекулі РНК визначається нуклеотидною послідовністю матричного ланцюга ДНК. Транскрипція відбувається за принципом компліментарності. Субстратами для синтезу служать рибонуклеозидтрифосфати. До 3'-кінця зростаючого ланцюга РНК приєднується нуклеозидмонофосфат, а звільнений пірофосфат гідролізується на дві молекули неорганічного фосфату, що робить реакцію енергетично вигідною і безповоротною. Самі білки-регулятори транскрипції набувають або втрачають функціональну активність в результаті модифікацій каталітично активними

білками- ферментами, або речовинами небілкової природи, які модулюють їх регуляторні властивості. У примітивних формах життя в регуляції транскрипції безпосередньо беруть участь різні клітинні метаболіти (вуглеводи, амінокислоти, нуклеотиди та ін.). У еукаріот транскрипція безпосередньо пов'язана зі змінами структури хроматину. Перехід хроматину в активну форму (здатну до транскрипції) є додатковим елементом регуляції транскрипції у вищих організмів.

Хід роботи:

Завдання 1. На рис.1 схематично зображено фрагмент молекули ДНК під час транскрипції. Намалюйте його у протоколі. Визначте, який з двох ланцюгів ДНК є матрицею для синтезу і-РНК у процесі транскрипції. Покажіть стрілочкою напрямок пересування ферменту ДНК-залежної РНК-полімерази.

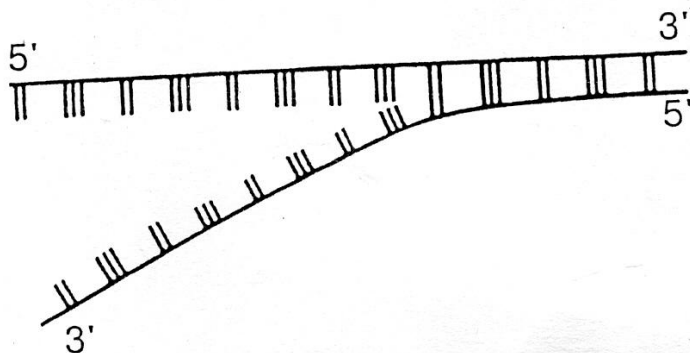


Рис.1 Фрагмент молекули ДНК під час транскрипції.

Завдання 2. Некодуючий ланцюг фрагмента молекули ДНК має таку будову: ТТТ–ТГЦ–АГА–ТАТ. За таблицею 1 визначте амінокислотний склад відповідного поліпептиду, синтезованого за участю кодуєчого ланцюга ДНК.

Завдання 3. Визначте антикодони для т-РНК, що беруть участь у синтезі білка, інформація про фрагмент первинної структури якого міститься в ділянці кодогенного ланцюга ДНК: ЦАЦ–ГАЦ–ЦАА–АЦГ–ГГТ–АГА.

Завдання 4. Амінокислоту кодує триплет ЦАТ. Який антикодон має т-РНК цієї амінокислоти?

Завдання 5. Ген має триплет ГАТ. Визначте склад триплету, що утвориться на ньому в процесі транскрипції, і назвіть відповідний фермент, який це забезпечуватиме.

Завдання 6. Ген має триплет ТАТ. Визначте склад антикодону т-РНК, що транспортує амінокислоту, яка кодується цим триплетом

Завдання 7. Унаслідок мутації гена його траплет ТАТ перетворився на траплет ТАЦ. Чи зміниться від цього структура поліпептиду, закодованого в ділянці нуклеїнової кислоти, яка включає цей триплет?

Питання для самоконтролю:

1. Які є види РНК? Яка їх роль у біосинтезі білка?
2. Які властивості має генетичний код?
3. Які кодони є беззмистовними?
4. Що є матрицею для синтезу іРНК?
5. Як називається послідовність нуклеотидів тРНК, комплементарна кодону іРНК?

Тестові питання:

1. Триплет нуклеотидів ДНК, що припиняє транскрипцію, називається:
 - а) промотором;
 - б) оператором;
 - в) термінатором.
2. Які з названих речовин належать до амінокислот:
 - а) метіонін;
 - б) гліцерин;
 - в) серин;
 - г) урацил;
3. Як називаються триплети, які не кодують амінокислот, а є знаками припинення синтезу поліпептидного ланцюга на РНК – матриці:
 - а) термінуючі;
 - б) змістовні;
 - в) незмістовні;
 - г) нонсенс – кодони?
4. Генетичний код вироджений, тому що:
 - а) кожний триплет кодує тільки дві амінокислоти;
 - б) кожна амінокислота, за винятком метіоніну і триптофану, кодується більше ніж одним триплетом;
 - в) кожний триплет кодує тільки одну амінокислоту.
5. Термінуючими кодонами є:
 - а) УАА;
 - б) УАГ;
 - в) ЦАЦ;
 - г) АУА?
6. Процес переписування інформації з і-РНК – це:
 - а) транскрипція;
 - б) трансляція;
 - в) сплайсинг;

г) процесинг.

7. Білок – репресор потрібен для:

- а) функціонування оперона ;
- б) регулювання транскрипції;
- в) регулювання реплікації ДНК ;
- г) транспортування амінокислот до рибосом .

8. Ділянка ДНК, до якої приєднується білок репресор, це:

- а) промотор;
- б) оператор;
- в) ген регулятор;
- г) термінатор.

9. Гетерохроматин – це :

- а) функціонально неактивна ділянка хромосоми;
- б) функціонально активна ділянка хромосоми;
- в) спіралізована ділянка хромосоми;
- г) деспіралізована ділянка хромосоми.

10. Еухроматин – це:

- а) функціонально активна ділянка хромосоми;
- б) функціонально неактивна ділянка хромосоми;

11. У клітинах еукаріотів, на відміну від прокаріотів, існує особливий тип процесингу:

- а) сплайсинг;
- б) репарація;
- в) реплікація;
- г) делеція.

Практична робота № 6.

Тема: Організація геному людини.

Мета: Вивчити структуру геному людини. Значення геноміки як науки, що вирішує прикладні питання клінічної і профілактичної медицини та фармацевтики.

Для всебічного дослідження генома людини в 1990 р. була розроблена і нині втілюється в життя міжнародна програма «Геном людини» («Human Genome Project») – це один з найвідважніших, дорогих і потенційно важливих проектів в історії цивілізації. У ядрі кожної соматичної клітини людини знаходиться 23 пари хромосом: на кожному хромосому припадає по одній молекулі ДНК. Довжина усіх 46 молекул ДНК в одній клітині людини дорівнює майже 2 м, кількість нуклеотидних пар складає 6,4 млрд.

Основним завданням програми була побудова досконалих генетичних карт високого ступеню розрізнюваності кожної з 24 груп зчеплення людини, яке повинне завершитися визначенням повної первинної структури ДНК усіх хромосом. Для вирішення цього завдання виник Міжнародний консорціум по вивченню генома людини, що об'єднав 20 лабораторій і сотні вчених у всьому світі. Успішне завершення програми дало людству перспективи для розуміння механізмів функціонування кожного з генів, принципів розвитку організму, встановлення генетичних причин багатьох спадкових хвороб і механізмів старіння.

Під геномом еукаріотичного організму розуміють сумарну ДНК гаплоїдного набору хромосом і позахромосомних генетичних елементів, які містяться в окремій клітині зародкової лінії багатоклітинного організму. Сумарну кількість ДНК в гаплоїдному геномі прийнято позначати латинським символом *C*. Вона вимірюється в пікограмах (пг), нуклеотидних парах (н.п.) або дальтонах (1 пг – 0,965 – 10⁹ н.п. – 6,1 – 10⁹ Da). Розмір генома еукаріот в середньому на 2-3 порядки вище, ніж у прокаріот

Геном еукаріот істотно відрізняється від геному прокаріот за рядом ознак, серед яких необхідно відмітити його надлишковість. Еукаріотична клітина містить у багато разів більше генів, ніж прокаріотична. Підвищений вміст ДНК в геномі еукаріот не можна пояснити лише збільшенням потреби цих організмів в додатковій генетичній інформації у зв'язку з ускладненням організації, оскільки велика частина їх ДНК генома, як правило, представлена такими, що не кодують послідовності нуклеотидів. Феномен значної надмірності генома еукаріот відносно некодуючих послідовностей нуклеотидів відомий під назвою «парадокс *C*».

Вирішення основної задачі програми «Геном людини» включало наступні етапи:

- На першому етапі необхідно було завершити складання детальної генетичної карти і відмітити гени, віддалені один від одного на відстані, яка не перевищує в середньому 2 млн основ (1 млн. основ дорівнює 1 мегабайт – 1 Мб, від англ. base – основа).

- Другий етап припускав складання фізичних карт низького ступеню розрізнюваності зображення кожної хромосоми (дозвіл 0,1 Мб).
- На третьому етапі слід було отримати фізичну карту високого ступеню розрізнюваності усього генома у вигляді охарактеризованих окремих клонів (клон містить 5 Кб).
- Четвертий етап – секвенування усієї ДНК генома людини (з дозволом в 1 основу).
- На п'ятому, завершальному, етапі необхідно було в знайдених послідовностях нуклеотидів локалізувати усі гени організму та визначити їх функціональне значення.

Генетичні карти зчеплення. Генетичні карти зчеплення визначають хромосомну належність і взаємне розташування генетичних маркерів один відносно другого. Картування у вузькому сенсі – визначення положення гена або мутації в хромосомі, ділянці ДНК з невизначеною функцією, точку розщеплення ДНК рестриктазами. Таким чином, маркер – це будь-яка успадкована ознака, доступна ідентифікації. Встановлення локалізації якогось маркера дозволяє використовувати його для визначення положення іншого маркера.

Генетичні ознаки, локалізовані в різних хромосомах, не зчеплені один з одним, тобто передаються від батьків дітям незалежно. Гени, локалізовані в одній хромосомі, рекомбінують за рахунок кросинговера, обміну ділянками гомологічних хромосом в процесі їх спаровування при мейозі. Вірогідність кросинговера між генами залежить від відстані між ними. Чим ближче гени розташовані, тим сильніше вони зчеплені (1% кросинговеру = сантиморганіда (сМ)). Генетична відстань в 1 сМ приблизно дорівнює фізичній протяжності в 1 млн н.п. = 1 Мб. Загальна довжина генома людини в цих одиницях складає близько 3 300 сМ. Генетичні карти зчеплення правильно відображають порядок розташування генетичних маркерів на хромосомах, але значення відстаней між ними приблизні і не відповідають реальним фізичним відстаням. Це визначається тим, що ефективність рекомбінації на окремих ділянках хромосом може сильно розрізнятися. Існують так звані «гарячі» точки рекомбінації і області генома, де рекомбінація пригнічена (центромерні, теломерні і гетерохроматинові ділянки хромосом). Крім того, частота рекомбінації у чоловіків менша, ніж у жінок, так що загальна довжина чоловічого генома, виміряна в одиницях рекомбінації, є меншою. Таким чином, генетичні карти зчеплення є найменш точними. Проте на практиці саме вони і тільки вони дозволяють локалізувати складні генетичні маркери (н., асоційовані з симптомами захворювання).

До початку 70-х років ХХ ст. побудова генетичних карт людини просувалася дуже повільними темпами (н., ген кольорової сліпоти був картований на Х-хромосомі в 1911 р.), а перший аутосомний ген – в 1968 р. До 1994 р. на хромосомах людини було картовано 5 тис. структурних генів і понад 60 000 маркерних ДНК-послідовностей. Такий стрімкий прогрес в картуванні генів людини пов'язаний з появою нових технологій в цитогенетиці, в клітинних культурах і особливо в молекулярній генетиці.

Гібридизація соматичних клітин. Одним з найбільш популярних методів віднесення генетичного маркера (функціонально активного гена) до конкретної групи зчеплення є гібридизація соматичних клітин різних біологічних видів організмів, один з яких – досліджуваний. Гібридні клони отримують шляхом штучного злиття клітин людини і різних гризунів: китайського хом'яка, миші, пацюка. Культивування таких соматичних гібридів, як виявилось, супроводжується втратою хромосом людини. Втрата хромосом має випадковий характер, і клони клітин, які утворюються, містять хромосоми, що залишилися, в різних поєднаннях. Так отримують панелі гібридних клітинних клонів, які містять одну або декілька хромосом людини і повний набір хромосом іншого виду. Знаходження людських білків, специфічних мРНК або послідовностей ДНК в таких клонах дозволяє однозначно визначити хромосому належність відповідних генів.

Структура генома людини (за даними секвенування).

Щоб встановити послідовність генома людини, знадобилося об'єднати зусилля безлічі груп вчених з різних країн. Починаючи з 1998 р. роботи по секвенуванню генома людини проводять паралельно Міжнародний консорціум і приватна комерційна компанія Celera Genomics (президент Крейг Вентор). В лютому 2001 р. були опубліковані дві попередні версії структури генома людини. Опис генома людини поки що не відрізняється високою точністю, але вже зараз можна зробити ряд важливих заключень. Велике значення набуває порівняння генома людини з секвенованими геномами інших еукаріотичних організмів.

На основі комп'ютерних алгоритмів, побудованих на сучасних уявленнях про структуру гена і про білкові домени, була розрахована кількість генів в геномі людини, які кодують білки. Міжнародний консорціум визначив 31 780 білоккодуєчих генів, а фірма Целера Геномікс виявила 39 114 генів. Ці величини є попередніми, і вони набагато менші від раніше постульованого числа білок-кодуєчих генів (=100000). Відзначається нижча щільність білок-кодуєчих генів в геномі людини.

В порівнянні з геномами інших еукаріотів у людини більш поширені гени, які беруть участь в забезпеченні імунного захисту; у розвитку нервової системи (нейротрофічні чинники, чинники зростання нервів), сигнальних молекул, мієлінових білків, потенціал-керуючих іонних каналів і синаптичних рецепторних білків; у побудові цитоскелета і русі везикул, забезпеченні внутрішньо- та міжклітинної сигналізації, підтримці гомеостазу. У людини значно більша кількість генів бере участь в транскрипції і трансляції. Із 2000 таких генів 900 відносяться до родини білків, які містять «цинкові пальці».

У геномі людини число генів, які кодують білки, всього в 2 рази більше числа генів в геномі черв'яка, мушки, рослини. Це обумовлено виникненням у людини великої кількості нових білків. Існує припущення, що *Homo sapiens* не «винайшов» нові гени, а використовував існуючі структурні домени, збираючи з них нові білки з новими функціями. Геном людини кодує більше паралогів і багатодомених білків з великою різноманітністю функцій і архітектурою доменів в порівнянні з геномами інших еукаріот. В цілому на долю генів, які

кодують білки, доводиться 2% генома; на ділянки, які кодують РНК, – =20% генома, повторювані послідовності займають більше 50 % генома, причому значна частина цієї ДНК виникла за рахунок зворотної транскрипції РНК.

До 10 % генома людини складають елементи, які повторюються та за своєю будовою нагадують інтегровану форму інфекційних ретровірусів птахів і ссавців. Число виявлених родин ендегенних ретровірусів в геномі людини більше 30, їх біологічна роль в геномі невідома. Цікаво, що у мавп ендегенних вірусів набагато менше або немає взагалі. Виходить, що за сторонніми елементами геноми людини і мавпи розрізняються набагато сильніше, ніж по самих геномах. Це дало основу одному з відомих дослідників генома академікові Е.Д.Свердлову висловити думку про те, що віруси могли зіграти важливу роль в «олюдненні» мавпи. У зв'язку з цим проблема походження людини отримала нове звучання.

Ідентифіковані гени практично усіх спадкових захворювань, які часто зустрічаються (=320) і порівняно рідкісних (=170), 30 рецесивних і більше 100 доміантних онкогенів. Проте на сьогодні не можна виключити вірогідність того, що додаткові гени розташовуються у ділянках генома, які досі не секвеновані. Міжнародний консорціум 14 квітня 2003 р. повідомив, що розшифровано 99,99 % геному людини. Отримали завершену послідовність генома, яка має мінімальне число помилок (< 1 на 10 000 ланок ДНК), вона максимально повна - пропуски залишаються тільки там, де послідовність не може бути встановлена сучасними технологіями.

Зроблені узагальнення по структурі генома людини:

1. Геном вражає різноманітністю розподілу різних елементів: генів, псевдогенів, мобільних елементів, змісту G+C, острівців CpG і швидкостей рекомбінації. Цей розподіл відрізняється від миші і навіть від мавпи.

2. 20000-30000 генів, які кодують білки, ніяк не пояснюють відмінностей в складності людини і черв'яка або дрозофіли.

3. Сотні генів людини, можливо, є результатом їх горизонтального перенесення від бактерій. Більшість інших є продуктами транспозонів.

4. Геном, особливо в періцентромерних і прителомерних областях, наповнений дуплікаціями довгих сегментів, які є поліморфними в людській популяції і, можливо, відіграли істотну роль в еволюції. Сегментні дуплікації у людини значно більше поширені, чим у дріжджів, мухи або черв'яка.

5. Швидкості рекомбінацій, як правило, вище в кінцевих ділянках хромосом, на коротких плечах і на менших хромосомах, забезпечуючи, принаймні, один кросинговер на мейоз на кожне плече хромосом.

6. Геном надзвичайно варіабельний, різні індивідууми відрізняються величезною кількістю нуклеотидних замін, положенням транспозонів і навіть довгими сегментними повторами.

7. Геном насичений різними елементами, які повторюються, деякі з них здатні переміщатися в геномі, створюючи нові гени і нові регуляторні

елементи.

Дослідження структури генома ряду прокариот і еукаріот, і людини зокрема, сприяло створенню науки – геноміки, яка вивчає геноми на молекулярному, хромосомному, біохімічному і фенотиповому рівнях. Початок ХХІ ст., як вважають сучасні дослідники, які працюють в області геноміки, буде ерою функціональної геноміки і біоінформатики.

Геноміка сформувалася як розділ молекулярної біології в 1980-1990-х роках разом з виникненням перших проектів по секвенуванню геномів деяких видів організмів. Першим був секвенований у 1977 році геном бактеріофага Ф-Х174 (5368 нуклеотидів). Наступним етапом було секвенування геному бактерії *Haemophilus influenzae* (1.8 Mb) (1995). Пізніше були повністю секвеновані геноми ще декількох видів, включаючи геном людини (2001 рік – чорновий варіант, 2003 рік – завершення проекту).

Розвиток геноміки відбувся завдяки вдосконаленню методів дослідження НК, а також завдяки появі могутньої обчислювальної техніки, що дозволило працювати з великим обсягом даних. На сучасному етапі розвитку молекулярної біології сформувалися нові розділи геноміки: структурна геноміка, функціональна, інформаційна, порівняльна, еволюційна, медична, фармакогеноміка та ін.

Основою молекулярної медицини, яка розробляє методи діагностики, лікування і профілактики спадкових (генних і хромосомних), інфекційних та інвазійних хвороб є геноміка людини. Для медицини особливе значення мають дослідження геноміки в медичній мікробіології, вірусології, оскільки вони розкривають природу інфекції і надають перспективи для створення специфічних ліків, для лікування різних захворювань.

Структурна геноміка вивчає нуклеотидні послідовності геномів, структурну організацію генів організмів, міжгенних ділянок, регуляторних структурних елементів (промоторів, енхансерів та ін.), на основі яких складаються генетичні, фізичні і транскрипційні карти організму.

Функціональна геноміка вивчає реалізацію генетичної інформації, записаної в геномі, від гена – до ознаки. Проводяться дослідження по ідентифікації функцій кожного гена і ділянки генома, їх взаємодію в клітинній системі.

Еволюційна геноміка з'ясовує шляхи формування та еволюцію геномів, походження генетичного поліморфізму і біологічної різноманітності.

Медична геноміка вирішує прикладні питання клінічної і профілактичної медицини на основі знання геномів людини і патогенних організмів (наприклад, діагностика спадкових хвороб, перспективи генотерапії, причини вірулентності хвороботворних мікроорганізмів).

Фармакогеноміка вивчає індивідуальну варіабельність реакції організму на дію лікарських засобів, яка обумовлена генетично, чутливість організму та відповідь на фармакопрепарати. Поліморфізм (наявність алелів, множинних алелів гена, рідкісних генів) в популяціях людини вимагає нового підходу до створення лікарських засобів. Встановлені гени, які кодують синтез білків, що

впливають на процеси всмоктування, розподілу, метаболізму і виведення лікарських засобів. У зв'язку з поліморфізмом таких генів для деяких пацієнтів лікарські препарати можуть бути неефективними, або мати токсичну дію. Наприклад, в нормі у різних груп людей швидкість елімінації ліків з організму може відрізнятись в 4-40 разів, а 10-40% людей не реагують на фармакотерапію. Це змушує розробляти лікарські препарати з урахуванням індивідуальних генетичних особливостей. Виявлення генів, які детермінують реакції на фармакологічні засоби, дозволять розробити прогностичні тести. У перспективі можлива розробка тестів, які визначали б «генетичний профіль» пацієнта та тестів, за допомогою яких можна окреслити ефективність ліків для конкретної людини.

Хід роботи:

Завдання 1. На рис. 1. зображено схему механізму репресії синтезу ферментів триптофанового оперона кишкової палички (*Escherichia coli*). Бактерія *Escherichia coli* може синтезувати аміноміслоту триптофан за участю ферменту триптофансинтетази. Якщо клітина містить надлишок триптофану, то деяка його частина діє як корепресор, зв'язуючись із молекулою репресора. Молекула репресора, активована корепресором, з'єднується з оператором. ДНК-залежна РНК-полімераза не може рухатися від промотора в напрямку структурних генів цього оперона. Намалюйте в протоколі схему механізму репресії синтезу ферментів триптофанового оперону. На схемі позначте корепресор і цифрами покажіть етапи репресії синтезу ферментів.

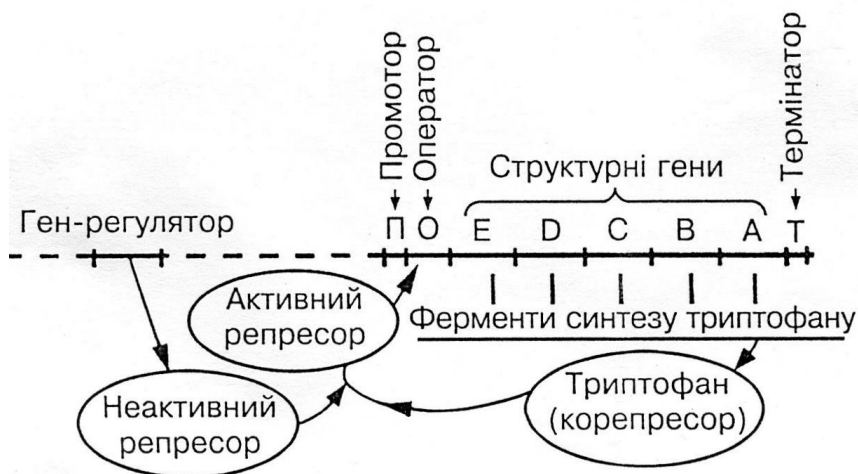


Рис. 1. Схема механізму репресії синтезу ферментів триптофанового оперону.

Завдання 2. Приготуйте тимчасовий мікропрепарат клітин букального епітелію. Для цього стерильним шпателем візьміть зіскріб клітин епітелію слизової оболонки щоки. Клітини зіскрібка рівномірно тонким шаром розмістіть на поверхні чистого сухого предметного скла, нанесіть на мікропрепарат 1–2 краплини 1% розчину ацетоорсеїну. Мікропрепарат

накрійте накривним скельцем через 1–2 хв (для інтенсивного забарвлення хроматину ядра). Розгляньте мікропрепарат спочатку при середньому (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 40$) збільшенні світлового мікроскопа. Відшукайте шар епітеліальних клітин, які містять кулясті ядра. Розгляньте ці клітини під імерсійним обе'ктивом (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 90$). Зверніть увагу на оболонку ядра (її товщину, форму). У ядрах чітко видно гетерохроматин (грудочки різних розмірів), що знаходяться в каріоплазмі й примембранно. Еухроматинових ділянок у світловому мікроскопі не видно. Намалюйте в протоколі 2–3 інтерфазних ядра. На рисунку 2 позначте гетерохроматин.

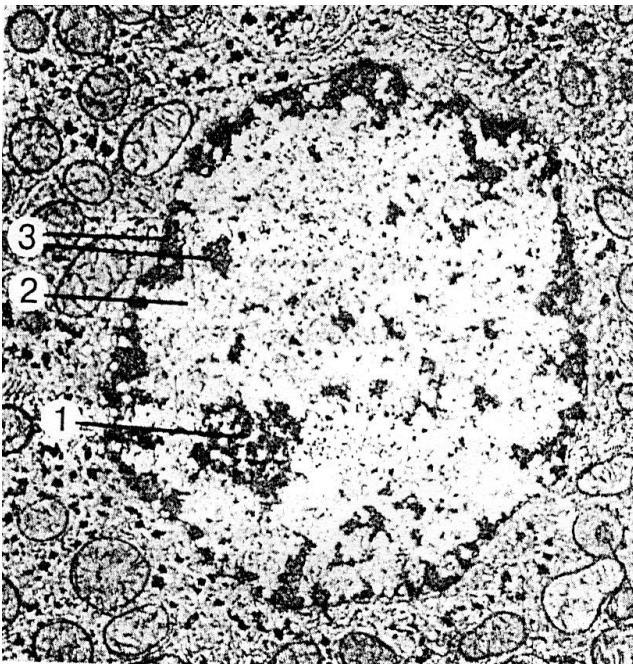


Рис. 2. Електронограма ядра тваринної клітини

Питання для самоконтролю:

1. Що таке промотор ?
2. Яку функцію виконує термінатор ?
3. У яких станах може перебувати репресор ?
4. Що таке еухроматин ?
5. Що таке гетерохроматин ?

Тестові питання:

1. Що є первинною ознакою організму, тобто первинним продуктом гена?
 - а) нуклеотид;
 - б) нуклеїнова кислота;
 - в) ген;
 - г) амінокислота;
 - д) поліпептидний ланцюг

2. Процес дозрівання про-мРНК називають:
- а) реплікацією;
 - б) репарацією;
 - в) процесингом
 - г) транскрипцією;
 - д) мутацією.
3. Одиницею транскрипції є:
- а) реплікон;
 - б) мутон;
 - в) транскриптон
 - г) оперон;
 - д) цитрон.
3. Процес вирізання інтронів ферментами рестриктазами та зшивання екзонів ферментами лігазами називають:
- а) метилуванням;
 - б) транскрипцією;
 - в) сплайсингом
 - г) кепуванням;
 - д) реплікацією.
4. Процес вирізання різних нуклеотидних послідовностей з первинного транскрипту і утворення різних зрілих мРНК називають:
- а) репарацією;
 - б) сплайсингом;
 - в) альтернативним сплайсингом
 - г) трансляцією;
 - д) ініціацією.
5. Речовини небілкової природи, які активують репресор і перешкоджають транскрипції:
- а) індуктори;
 - б) корепресори
 - в) модифікатори;
 - г) термінатори;
 - д) енхансери.
6. Транскрипцію лактозного оперону «виключає»:
- а) білок-репресор;
 - б) промотор;
 - в) комплекс РНК-полімерази з промотором;
 - г) взаємодія білка-репресора з оператором
 - д) оператор.

7. Ділянка оперону, що зв'язується з білком-репресором, називається:
- а) ген-регулятор;
 - б) промотор;
 - в) оператор
 - г) термінатор;
 - д) цитрон.
8. Процес дозрівання іРНК включає такі реакції:
- а) сплайсинг;
 - б) метилування;
 - в) кепування;
 - г) поліаденілування;
 - д) А+Б+В+Г.
9. Процес зміни первинної структури і конформації поліпептидів називають:
- а) репарацією;
 - б) процесингом;
 - в) посттрансляційною модифікацією
 - г) трансляцією;
 - д) модифікацією первинного транс крипту.

Практична робота № 7.

Тема: Молекулярні механізми мутацій

Мета: Вивчити основні типи мутацій, їх причини та механізми виникнення.

Внаслідок досліджень елементарних одиниць спадковості виникли поняття, що носять загальну назву **теорії гена**. Основні положення цієї теорії такі:

1. Ген займає певну ділянку (локус) у хромосомі.
2. Ген (цистрон) – частина молекули ДНК, що має певну послідовність нуклеотидів і є функціональною одиницею спадкової інформації. Кількість нуклеотидів, які входять до складу різноманітних генів, різна.
3. Всередині гена можуть відбуватися рекомбінації (відповідні ділянки цистрона – рекони) і мутації (відповідні ділянки цистрона – мутони).
4. Існують структурні і регуляторні гени.
5. Структурні гени кодують синтез білків.
6. Регуляторні гени контролюють і спрямовують діяльність структурних генів.
7. Ген не бере участі в синтезі білків, він є матрицею для утворення посередників – різних молекул РНК, які безпосередньо беруть участь у синтезі.
8. Розташування триплетів із нуклеотидів у структурних генах колінеарне до амінокислот у поліпептидному ланцюгу, який кодується даним геном.
9. Молекули ДНК здатні до репарації, тому не всі пошкодження гена ведуть до мутації.
10. Генотип є дискретним (складається з окремих генів), але функціонує як єдине ціле. На функцію генів впливають фактори як внутрішнього, так і зовнішнього середовища.

Під впливом різних фізико-хімічних факторів у молекулах ДНК можуть відбуватися порушення структурної організації. Такі зміни, якщо вони торкаються функціонально активних генів, призводять до порушень метаболізму або функцій (ознак). Якщо ці зміни не викликають загибелі організму або клітини, вони передаються нащадкам. Таким чином, генними мутаціями називаються стабільні зміни хімічної структури генів, що повторюються в наступних циклах реплікації та виявляються в нащадків у вигляді нових варіантів ознак. Усі різновиди мутацій пов'язані зі зміною нуклеотидної послідовності генів.

Причини мутацій:

1. **Помилки реплікації.** Вони виникають у випадку некомплементарного приєднання азотистих основ у процесі реплікації. Якщо помилки не були виправлені ДНК-полімеразою, вони передаються наступним поколінням у процесі реплікації.
2. **Помилки рекомбінації.** Порушення точності рекомбінацій ділянок ДНК при кросинговері веде до обміну невідповідними ділянками хромосом. Це призводить до порушення генного складу хромосом – хромосомних мутацій.
3. **Хімічні мутагени.** Багато хімічних речовин можуть змінювати

структуру ДНК. Наприклад, аналоги азотистих основ, включаючись у ДНК, можуть зупиняти реплікацію або порушувати комплементарність ланцюгів; формальдегід (НСОН) може "зшивати" між собою ДНК, РНК, білки; гідроксиламін (NH₂ОН) – специфічно реагує з цитозином, а його деривати замість гуаніну зв'язують аденін; азотиста кислота (HNО₂) окиснює й пошкоджує азотисту основу ДНК.

4. **Фізичні мутагени.** Зокрема, ультрафіолетове випромінювання (200-400 нм) викликає утворення димерів тиміну, що порушує структуру ДНК. В результаті зупиняється транскрипція, порушується реплікація. Іонізуюча радіація (рентгенівські промені, УФ-промені) порушують структуру пуринових основ і фосфодієфірні зв'язки ДНК.

5. **Біологічні мутагени** (наприклад, віруси, які мають здатність вмонтовувати свій ген у ДНК клітини-хазяїна і змінювати вихідну структуру генетичного матеріалу).

6. **Спонтанні зміни** (без видимих причин). Наприклад, спонтанне дезамінування цитозину й утворення при цьому урацилу призводить до порушення комплементарності і заміни однієї пари основ на іншу.

Мутації гена здебільшого є наслідком зміни послідовності нуклеотидів ДНК. Структурна класифікація мутацій гена така: 1) заміна одних азотних основ іншими (транспозиція); 2) зміна кількості нуклеотидних пар у структурі гена; 3) зміна порядку послідовності нуклеотидів у складі гена (інверсії, дуплікації, делеції, інсерція); 4) розрив ланцюгів; 5) утворення зшивок.

Заміна азотистих основ. Причинами таких мутацій є: а) помилки реплікації, б) вплив певних хімічних агентів.

Під впливом хімічних агентів може відбуватися порушення структури азотистої основи вже приєднаного нуклеотиду. Наприклад, під впливом азотистої кислоти може відбуватися спонтанне дезамінування цитозину. В результаті цього цитозин перетворюється в урацил. Надалі у циклі реплікації урацил з'єднується з аденіном, що в наступному циклі приєднує тимідиновий нуклеотид (рис. 1).

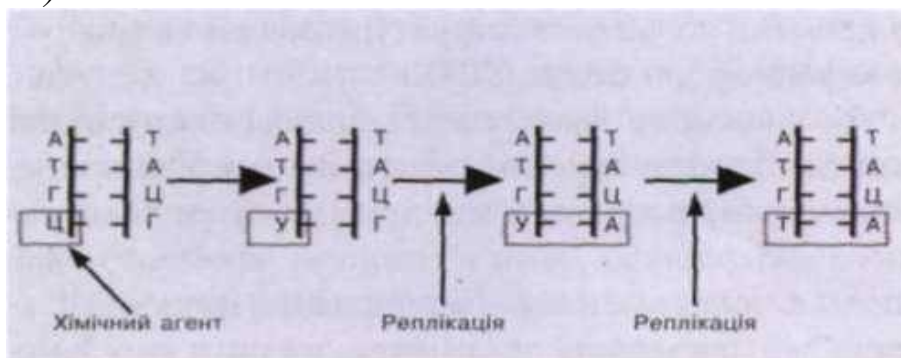


Рис. 1. Виникнення мутації за механізмом заміни однієї азотистої основи іншою.

Ще однією причиною може бути помилкове включення в ланцюг ДНК, що утворюється, нуклеотиду зі зміненою основою або його аналога. Якщо це залишається невиправленим ферментами репарації, змінена основа включається

в процес реплікації, що може призвести до заміни основної пари на іншу. Помилки реплікації виникають дуже рідко, тому що ДНК-полімерази мають здатність до контролю комплементарності та встановлення помилкових приєднань невідповідних нуклеотидів.

Таким чином, мутації за типом заміни азотистих основ виникають спочатку в одному із ланцюгів ДНК. Якщо вони не виправляються в ході репарації, то при наступних реплікаціях закріплюються в обох ланцюгах молекули. Наслідком цього є утворення нового триплету в генетичному коді ДНК. Це може позначитися на первинній структурі кодованого білка, його просторовій організації і функції. Зміни первинної структури пептиду не відбудеться в тому випадку, якщо новий триплет є синонімом колишнього, тобто буде кодувати ту ж амінокислоту. Наприклад, амінокислота лейцин кодується шістьма триплетами: УУА, УУГ, ЦУУ, ЦУЦ, ЦУА, ЦУГ. Заміна одного з нуклеотидів у цих триплетатах не змінить їх змісту. Цей приклад демонструє важливе значення надмірності генетичного коду. Однак у деяких випадках заміна однієї амінокислоти іншою призводить до серйозних наслідків. Наприклад, заміна глутамінової кислоти валіном у молекулі гемоглобіну змінює його структуру і функції. Внаслідок у людини розвивається хвороба – серпоподібноклітинна анемія.

Здебільшого заміна азотистих основ може призвести до появи нонсенс-кодонів, які не кодують амінокислот. Внаслідок цього буде спостерігатися передчасне переривання процесу синтезу. Вважається, що заміна азотистих основ призводить у 25 % випадків до утворення триплетів-синонімів, у 5 % випадків – до утворення нонсенс-кодонів і в 70 % – до виникнення генних мутацій.

Зміна кількості нуклеотидів у гені.

Цей вид мутацій відбувається в результаті випадання (делеції) або вставки однієї чи декількох пар нуклеотидів у молекулі ДНК (рис.2).

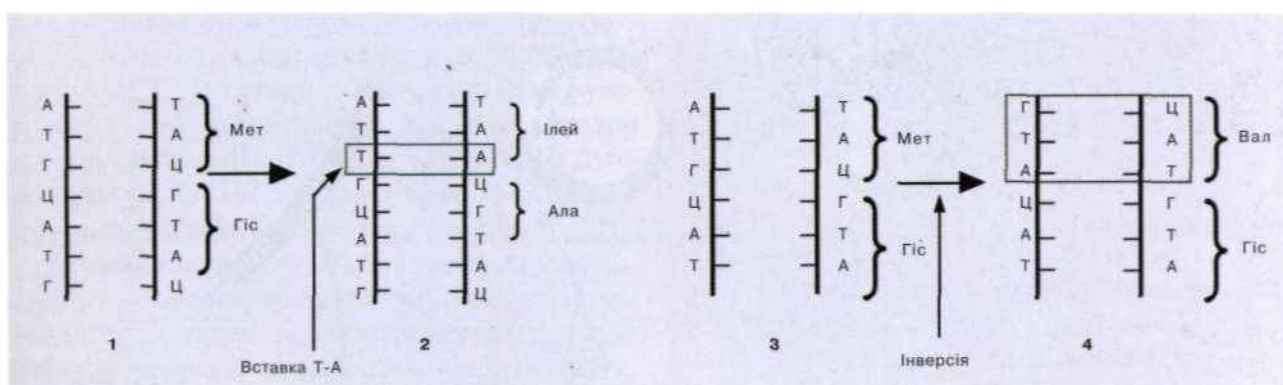


Рис. 2. Виникнення мутації: 1-2 – внаслідок зміни кількості нуклеотидів; 3-4 – в результаті інверсії.

Такий тип мутацій зустрічається досить часто. Зазначена зміна відбувається внаслідок впливу на ДНК деяких хімічних агентів, радіоактивного

опромінювання. Результатом цієї мутації є зрушення рамки зчитування інформації з генетичного коду. Наслідком цього є синтез поліпептидів із зміненою амінокислотою послідовністю, порушення структури і функцій білків, зміна фенотипу. Отже, якщо кількість встановлених або втрачених нуклеотидів кратна трьом, то зрушення рамки не відбувається. У цьому випадку в білку може з'явитися зайва амінокислота або їх буде на одну менше. Однією з причин мутацій, що призводять до зміни кількості нуклеотидів, є вставки або делеції в результаті активності рухливих генетичних елементів. Це певні нуклеотидні послідовності, вмонтовані в геноми багатьох організмів. Дані структури ДНК здатні спонтанно змінювати своє положення внаслідок помилок при рекомбінації.

Зміна нуклеотидної послідовності гена (інверсія).

Цей тип мутації пов'язаний з поворотом певної ділянки ДНК на 180° . Такі порушення відбуваються внаслідок дії хімічних агентів і фізичних факторів на молекулярно-генетичні процеси реплікації і рекомбінації. Наслідком цього є порушення нуклеотидної послідовності гена, що призводить до зміни первинної структури поліпептиду, порушення структури і функції білка і зміни фенотипу. Розриви одного з ланцюгів можуть відбуватися під дією іонізуючої радіації, внаслідок ушкодження хімічних зв'язків між молекулами. Вони можуть відновлюватися ферментом лігазою. Зшивання нуклеотидів, наприклад, двох поруч розташованих тимінів, відбувається під дією ультрафіолетового опромінення. Це призводить до помилок транскрипції.

Хід роботи:

Завдання 1. Розглянути і розв'язати наступні задачі:

Задача 1. За допомогою каріотипування у дитини виявили не дві, а три хромосоми тринадцятої пари:

1. Визначте тип мутаційної мінливості
2. Дайте пояснення явищу.

Задача 2. Мати і батько здорові. Методом амніоцентезу визначено каріотип плода: 45, X0:

1. Який тип мутації у плода?
2. Визначте стать.

Завдання 2. Заповнити таблицю 1:

Зміна генотипу людини при захворюваннях:

№ п/п	Синдром	Кількість аутосом	Кількість статевих хромосом	Вид мутації
	Патау			
	Едвардса			
	Дауна			
	Тернера– Шерешевського			
	Клайнфельтера			
	Трисомія-Х			
	Дубль Х, Y			

Питання для самоконтролю:

1. Як називаються мутації: а) що виникли в соматичних клітинах, б) що виникли в статевих клітинах, в) одержані штучним шляхом, г) що виникли самовільно?

2. Які зміни генетичного матеріалу проходять при поліплоїдії і гетероплоїдії?

3. Які зміни каріотипу: а) при моносомії, б) нулеосомії, в) полісомії?

4. Пояснити появу зміни кількості хромосом в каріотипах: ХХУ, ХУУ, ХХХХУ, ХХХ, ХХХХ, ХХХХХ. До якої форми належать ці зміни?

5. В хромосомах послідовність лінійно розташованих генів наступна: ABCDEFMNK. Яка форма мутації, якщо хромосома втратила ділянки з генами ABC. Яка хвороба є наслідком втрати частини хромосоми?

6. Ділянка хромосоми 21 прикріпилась до хромосоми 15. Яка це форма мінливості? Навести приклад захворювання, що є наслідком прикріплення одної хромосоми до іншої.

Тестові питання:

1. Що таке мутація?

- а) зміна фенотипу в межах норми реакції;
- б) незначна модифікація;
- в) значна модифікація;
- г) раптова зміна матеріалу спадковості;
- д) раптова зміна фенотипу.

2. Мутації, які спричинюють зміну кількості хромосом, називаються:
- а) генними;
 - б) хромосомними;
 - в) геномними.
 - г) аутомні
 - д) митохондриальними
3. До геномних мутацій відносять:
- а) транслокацію.
 - б) гетероплоїдію;
 - в) делецію;
 - г) поліплоїдію;
 - д) б+г.
4. Що таке хромосомні аберації?
- а) незалежне розходження хромосом;
 - б) зміна структури хромосом;
 - в) мутації на молекулярному рівні;
 - г) порушення нормальної кількості хромосом;
 - д) виникнення нових комбінацій генів у хромосомі.
- 5.. Що таке геномні мутації?
- а) зміна структури хромосом;
 - б) генокопії;
 - в) порушення нормальної кількості хромосом;
 - г) фенкопії;
 - д) зміна структури гена.
6. Хромосомними абераціями є:
- а) делеція;
 - б) триплоїдія;
 - в) інверсія;
 - г) дуплікація;
 - д) а+в+г.
7. Генна мутація – це зміна:
- а) структури молекули ДНК у межах гена;
 - б) структури будь-якої хромосоми;
 - в) загальної кількості хромосом у каріотипі;
 - г) кількості статевих хромосом у каріотипі.
 - д) а+в+г
8. Що таке спонтанні мутації?
- а) що виникають під впливом невідомих природних факторів;
 - б) ті, що призводять до зміни геному;

- в) ті що відбуваються на молекулярному рівні;
 - г) ті, що мають назву хромосомних аберацій;
 - д) викликані спрямованою дією певних факторів.
9. Які мутації називають індукованими?
- а) мутації, що призводять до зміни геному
 - б) ті, що викликані спрямованою дією певних факторів.
 - в) відбуваються на молекулярному рівні;
 - г) виникають під впливом невідомих природних факторів;
 - д) ті, що мають назву хромосомних аберацій;
10. Які мутації мають назву соматичних?
- а) відбуваються в гаметах;
 - б) ті, що стосуються аутосом;
 - в) стосуються гетеросом;
 - г) відбуваються у клітинах тіла;
 - д) ті, що змінюють структуру хромосом.
11. Які мутації мають назву генеративних?
- а) відбуваються в гаметах;
 - б) змінюють структуру хромосом;
 - в) відбуваються в соматичних клітинах;
 - г) ті що змінюють структуру гена;
 - д) відбуваються внаслідок спонтанного мутагенезу.
12. Поліплоїдія це:
- а) збільшення числа хромосом у каріотипі на величину, кратну гаплоїдному набору хромосом;
 - б) збільшення числа хромосом у каріотипі на одну;
 - в) зменшення числа хромосом у каріотипі на одну;
 - г) зміна числа хромосом у каріотипі на величину, не кратну гаплоїдному набору.
13. Гетероплоїдія – це:
- а) зміна структури хромосом;
 - б) інверсія;
 - в) явище, коли кількість хромосом стає некратною гаплоїдному набору;
 - г) незалежне розходження хромосом;
 - д) явище, коли кількість хромосом збільшується в декілька раз.
14. Анеуплоїдія – це:
- а) збільшення числа хромосом у каріотипі на величину, кратну гаплоїдному набору;
 - б) зміна структури хромосом;
 - в) зменшення числа хромосом у каріотипі на одну;

- г) повна відсутність однієї пари гомологічних хромосом у каріотипі.
- д) зміна кількості хромосом у каріотипі

15. Що таке мутагенез?

- а) виникнення нових комбінацій генів;
- б) зміна фенотипу в межах норми реакції;
- в) виникнення мутацій;
- г) виникнення тривалих модифікацій;
- д) виникнення фенкопій.

16. Які з названих захворювань можуть діагностуватися за допомогою методів ДНК-діагностики ?

- а) синдром Марфана;
- б) фенілкетонурія;
- в) серпоподібноклітинна анемія;
- г) синдром Дауна;
- д) б + в.

Практична робота № 8.

Тема: Регуляція клітинного циклу. Молекулярні основи онкогенетики.

Мета: Вивчити екзогенні та ендогенні регулятори клітинного циклу. Засвоїти механізми апоптозу. Вивчити причини виникнення пухлин.

Клітина – елементарна структурно-функціональна і генетична одиниця всього живого. Поза клітиною життя немає. Розмноження клітин відбувається тільки шляхом поділу початкової клітини, якому передують відтворення її генетичного матеріалу. Активація поділу клітини відбувається внаслідок дії на неї зовнішніх або внутрішніх чинників. Процес поділу клітини з моменту її активації називається проліферацією. Іншими словами, проліферація – це розмноження клітин – збільшення числа клітин, що відбувається шляхом мітотичних ділень. Період від ділення до ділення клітини, зазвичай називають клітинним циклом або мітотичним циклом. У дорослому організмі людини клітини різних тканин і органів мають неоднакову здатність до ділення. Крім того, при старінні інтенсивність проліферації клітин знижується (тобто збільшується інтервал між мітозами). Зустрічаються популяції клітин, що повністю втратили властивість ділитися. Це, як правило, клітини, що знаходяться на термінальній стадії диференціювання, нп., зрілі нейрони. В організмі людини є тканини, що постійно оновлюються, – різні типи епітелію, кровотворні тканини. У таких тканинах існує пул клітин, які постійно діляться, замінюючи типи клітин (нп., клітини крипт кишківника, клітини базального шару покривного епітелію, кровотворні клітини кісткового мозку), які відпрацювали або загинули. Також в організмі існують клітини, які не розмножуються в звичайних умовах, але знову набувають цю властивість за певних умов, зокрема при необхідності регенерації тканин і органів. Процес проліферації клітин жорстко регулюється, як самою клітиною (регуляція клітинного циклу, припинення або уповільнення синтезу аутокринних ростових чинників і їх рецепторів), так і її мікрооточенням (відсутність стимулюючих контактів з сусідніми клітинами і матриксом, припинення секреції або синтезу паракринних ростових чинників).

Порушення регуляції проліферації призводить до необмеженого поділу клітини, що у свою чергу ініціює розвиток онкологічного процесу.

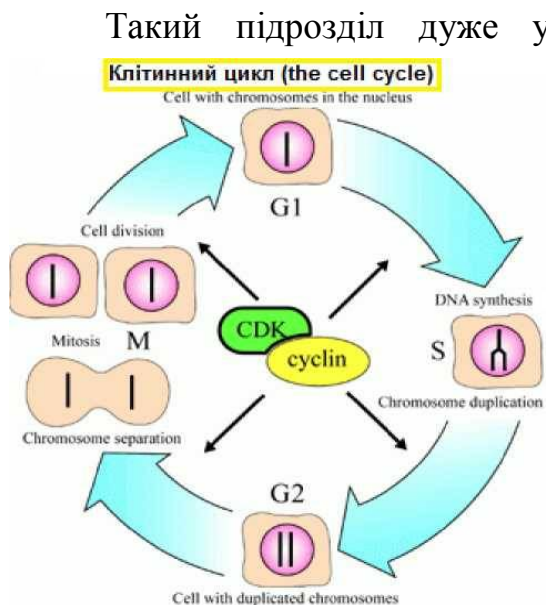
Клітинний цикл складається з 4 періодів: пресинтетичного (G_1 -період), синтетичного (S-період), постсинтетичного (G_2 -період) і власне мітоза (M). Крім того, існує так званий G_0 -період, що характеризує стан спокою клітини.

Перші три періоди – інтерфаза, мітоз і цитокінез складають M-фазу клітинного (мітотичного) циклу, який завершується утворенням двох дочірніх клітин. Кожна дочірня клітина вступає в G_1 -період інтерфази і може почати новий клітинний цикл. За періодом G_1 починається S-фаза, під час якої ДНК і хромосоми подвоюються (реплікуються), і далі – фаза G_2 . Початок мітозу означає кінець інтерфази. Клітини, що знаходяться у стані спокою, затримуються у фазі G_1 і, переходять у фазу G_0 . Зазвичай еукаріотичні клітини, які не зупинилися у фазі G_0 , завершують цикл за 24 год..

У G_1 періоді клітини мають диплоїдну кількість ДНК в одному ядрі. У цей період починається ріст клітин за рахунок синтезу і накопичення клітинних білків, що обумовлено збільшенням кількості РНК в клітині. Крім того, починається підготовка до синтезу ДНК. У наступному S-періоді відбувається реплікація ДНК і, відповідно, подвоєння хромосом (кожна хромосома утворена двома хроматидами). Постсинтетична G_2 фаза називається також премітотичною. У цій фазі відбувається активний синтез мРНК, потім починається власне мітоз (Рис. 1).

Ділення усіх еукаріотичних клітин пов'язане з конденсацією подвоєних (реплікованих) хромосом. В результаті ділення хромосоми передаються в дочірні клітини. Такий тип ділення еукаріотичних клітин називається мітоз (від грец. *mitos* – нитки) – є єдиним повноцінним способом збільшення числа клітин і збереження спадкового матеріалу. Процес мітотичного поділу підрозділяють на декілька етапів: профаза, прометафаза, метафаза, анафаза, телофаза.

Призначення регуляторних механізмів клітинного циклу полягає не в регуляції проходження клітинного циклу як такого, а в тому, щоб забезпечити безпомилковість розподілу спадкового матеріалу в процесі репродукції клітин. В основі регуляції розмноження клітин лежить зміна станів активної проліферації і проліферативного спокою. Регуляторні чинники, що контролюють розмноження клітин можна умовно розділити на дві групи: позаклітинні (екзогенні) та внутрішньоклітинні (ендогенні). Екзогенні чинники знаходяться в мікрооточенні клітини і взаємодіють з поверхнею клітини. Чинники, які синтезуються самою клітиною і діють усередині неї, відносяться до ендогенних.



Такий підрозділ дуже умовний, оскільки деякі чинники, будучи ендогенними по відношенню до клітини, що продукує їх, можуть виходити з неї і діяти як екзогенні регулятори на інші клітини. Якщо регуляторні чинники взаємодіють з тими ж клітинами, які їх продукують, то такий тип контролю називається аутокринним. При паракринному контролі синтез регуляторів здійснюється іншими клітинами.

Екзогенні регулятори проліферації.

У багатоклітинних організмів регуляція проліферації різних типів клітин відбувається внаслідок дії не одного будь-якого ростового чинника, а їх сукупності. Крім того, деякі ростові чинники, будучи стимуляторами для одних типів клітин, поведуться як інгібітори по відношенню до інших.

Рис. 1. Клітинний (мітотичний) цикл

Класичні ростові чинники є поліпептидами з молекулярною масою 7-70 кДа. Вже відомо більше сотні таких ростових чинників.

Ендогенні регулятори клітинного циклу. У нормальних еукаріотичних клітинах проходження клітинного циклу строго регулюється. Причиною онкологічних захворювань є трансформація клітин, яка пов'язана з порушеннями регуляторних механізмів клітинного циклу. Одним з основних результатів дефективності клітинного циклу є генетична нестабільність, оскільки клітини з неповноцінним контролем клітинного циклу втрачають здатність коректно подвоювати і точно розподіляти між дочірніми клітинами свій геном. Генетична нестабільність приводить до придбання нових особливостей, які відповідають за прогрес пухлині.

Роль білку p53 («Вартовий генома», «Диспетчер апоптозу», «Пухлинний супресор»). Білок p53 контролює виключно важливі клітинні процеси і, завдяки цьому, залучений у велику кількість всяких регуляторних ланцюгів. Він (чи його ген) активується у відповідь на різноманітні ушкодження клітинної структури: нерепаровані розриви і інші ушкодження ДНК, порушення розходження хромосом в мітозі, руйнування мікротрубочок і т. д.

Сам же білок p53 регулює активність, принаймні, трьох груп генів:

1) активує гени (P21, GADD45 і інші), що відповідають за зупинку клітинного ділення;

2) активує гени (BAX, KILLER/DR5, PIG і інші), що запускають апоптоз – процес, який призводить шляхом активації спеціальних ферментів, до загибелі клітини; а також саморепресує гени (BCL2, RELA), які стримулюють апоптоз;

3) активує гени (TSP1, BAI1 і інші), що гальмують ангиогенез (утворення нових судин).

У результаті через посередництво білку p53 клітина у відповідь на ушкодження своєї структури або затримується на тій чи іншій стадії мітотичного циклу і виправляє ці ушкодження; або (при неможливості виправлень) взагалі припиняє ділення і вступає в процес клітинного старіння (фаза III по Хейфліку); або (при потенційній небезпеці пошкодженої клітини для її оточення) здійснює апоптоз. Апоптозу, окрім інших, піддаються і клітини, в яких відбулася пухлинна трансформація.

Апоптоз.

Існує багато визначень поняття «апоптоз»:

– програмована клітинна смерть, що супроводжується характерними цитологічними ознаками (маркери апоптозу) і молекулярними процесами;

– форма загибелі клітини, що проявляється зменшенням її розміру, конденсацією (ущільнення) і фрагментацією хроматину, ущільненню зовнішньої і цитоплазматичної мембран без виходу вмісту клітини в довкілля. У багатоклітинному організмі апоптозом гинуть клітини в процесі ембріогенезу, T-клітини в процесі диференціювання в тимусі, клітини, заражені вірусами, змінені клітини (при недостатній інтенсивності апоптотичних процесів розвиваються онкологічні захворювання) і багато інших. Основне біологічне призначення апоптозу полягає в тому, щоб в процесі ембріонального морфогенезу створювати органи і тканини з еволюційно

закріпленими конфігураціями і розмірами і потім підтримувати ці параметри з допустимими варіантами впродовж життя.

Найважливішим проявом цієї функції апоптозу після закінчення розвитку людини і інших ссавців є його участь в процесі фізіологічної регенерації (оновлення) клітин різних тканин і органів і підтримці клітинного гомеостазу. Регенерації у різному ступені упродовж усього життя схильні практично усі клітини нашого організму. Особливо інтенсивно клітинне оновлення протікає в клітинах епітелію, дотичних до зовнішнього середовища, шкіри, шлунково-кишкового тракту, сечостатевої і легеневої систем, а також в клітинах крові, імунної системи.

Іншою найважливішою функцією апоптозу є контроль за внутрішнім середовищем клітини, у тому числі клітинного ядра з його вмістом. Зараз доведено, що апоптоз може протікати і в клітинах, позбавлених ядра. При виникненні в клітині порушень, що перевищують допустимі межі, клітина піддається самознищенню. Апоптоз виникає при дії різних ушкоджуючих чинників, які здатні викликати некроз, але в невеликих дозах, наприклад, при дії високої температури, іонізуючого випромінювання, протипухлинних препаратів. Апоптоз бере активну участь у ряді фізіологічних і патологічних процесів. Наприклад, при гормонзалежній інволюції органів у дорослих, зокрема, відторгнення ендометрію під час менструального циклу, атрезії (зарощуванні) фолікулів в яєчниках в менопаузі і регресії (зворотному розвитку) молочної залози після припинення лактації.

Велика роль апоптозу і при патологічній атрофії гормонзалежних органів, наприклад, атрофії передміхурової залози після кастрації і виснаженні лімфоцитів в тимусі при терапії глюкокортикоїдами. А також при патологічній атрофії паренхіматозних органів після obturaції (закупорки) вивідних проток, що спостерігається в підшлунковій і слинних залозах, нирках. Загибель клітин в процесі атрофії спостерігається і в корі надниркових залоз при дії глюкокортикоїдів або при атрофії ендокринзалежних тканин.

У багатьох випадках гострої або хронічної ішемічної або токсичної дії загибель клітин відбувається шляхом апоптозу. Така картина спостерігається при інсульті, інфаркті не лише міокарду, але і у нирках, при діабеті, окремих формах нефриту, нейродегенеративних захворюваннях, таких як хвороба Альцгеймера і Паркінсона. У патогенезі токсичних ушкоджень печінки, підшлункової залози і нирок активація апоптозу має важливе значення.

Форми клітинної загибелі, їх відмінності. Існує дві форми загибелі клітини – некроз і апоптоз. Некроз – це патологічний процес, що виражається в місцевій загибелі тканини в живому організмі в результаті її ушкодження або екзо- (зовнішнього) або ендогенного (внутрішнього) фактора. Некроз проявляється в набряканні, денатурації і коагуляції (злипання) цитоплазматичних білків, руйнуванні клітинних органел і усієї клітини.

Головна відмінність некрозу і апоптозу полягає в тому, що апоптоз – це програмована загибель клітини, а некроз – патологічний процес, що запускається у відповідь на яку-небудь ушкоджуючу дію (інфекцію, хімічна дія, опромінення, недостатнє кровопостачання і ін.).

В процесі апоптозу в клітині задіяні складні молекулярні каскади, в результаті реалізації яких відбувається зморщування цитоплазматичної мембрани, зменшення об'єму клітини, розриви ниток ядерної ДНК, конденсація хроматину по периферії ядра, подальший розпад ядра на частини, фрагментація клітин на везикули (бульбашки) з внутрішньоклітинним вмістом – апоптотичні тільця, які захоплюються сусідніми клітинами, можуть і фагоцитами, як у разі некрозу. Викиду клітинного вмісту не відбувається, запалення не виникає. При некрозі, навпаки, відбувається вихід лізосомальних ферментів з лізосом, які і переварюють вміст клітини, клітина набрякає і лопається. Вміст клітини викидається в позаклітинне середовище, де поглинається фагоцитами, розвивається запалення.

Існують і інші форми програмованої загибелі, наприклад, аутофагія. Процес аутофагії полягає в тому, що органели з'єднуються з лізосомами, де перетравлюються лізосомальними ферментами. Потім залишки клітини поглинають макрофаги. Взаємозв'язок апоптозу і аутофагії :

а) – кінетична модель балансу апоптозу і аутофагії. Одно з летальних дій активує в

клітині програму і клітина вирішує «померти». Якщо вистачає апоптотичних ефекторів (молекул, задіяних в процесі апоптозу), то апоптоз є єдиною відповіддю більшості клітин на летальну дію. Пригнічення апоптотичних ефекторів запускає альтернативний шлях - аутофагію;

б) – інгібіторна модель. Коли летальна дія активує BAX/BAK– залежний мітохондріальний внемембранній шлях (BAX/BAK– dependent mitochondrial outer – membrane permeabilization pathway) запускається апоптоз. BAX/BAK, так само як і каспази, є активним інгібітором BCL2/BCL – XL. що полегшує аутофагію. Активний апоптоз пригнічує аутофагію.

Механізми апоптозу. Механізми апоптозу складні і різноманітні, є складним молекулярним каскадом, вивченням якого займається багато хто і багато лабораторій по всьому світу. Безперечна важливість цих досліджень в аспекті онкології і геронтології доведена успіхами терапії онкологічних захворювань індукторами апоптозу ракових клітин.

Апоптоз і старіння. Відомий американський вчений Л.Хейфлик уперше довів, що природна тривалість життя людини обумовлена числом мітозів, яке можуть вчинити клітини цього організму. Він брав шматочки шкіри від ембріона, новонародженої і дорослої людини, розбивав їх на окремі клітини і культивував в спеціальному поживному середовищі. Виявилось, що клітини ембріона можуть вчинити близько 50 ділень, а потім в них спостерігаються усі ознаки апоптотичної смерті. У дорослої людини клітини можуть дати не 50 а значно менше ділень, залежно від віку обстежуваного пацієнта. Згодом було показано, що механізм старечого апоптозу запускається і знаходиться в ядрі. Нині для пояснення молекулярно-генетичних механізмів старіння організму запропоновано три гіпотези.

Перша гіпотеза розвинена в працях професора Ж.Медведева, а також Л. Орджелом. Ці дослідники вважають, що старіння це процес накопичення

помилки в процесах транскрипції і трансляції і виникненні ферментів з дефектним функціонуванням і послабленням репарації.

Згідно з другою гіпотезою, запропонованою також Ж.Медведевим 0,4% інформації, що міститься в ДНК клітинного ядра, використовується клітиною постійно упродовж її життя. Крім того, багато генів в молекулі ДНК повторюються, роблячи генетичну інформацію у високому ступені надмірною. Ж.Медведев припустив, що послідовності, що повторюються, зазвичай репресовані, але у разі значного ушкодження активного гена вони замінюються одним з ідентичних резервних генів. Надмірність ДНК може служити гарантією проти внутрішньо властивої схильності системи випадковим молекулярним ушкодженням. Проте поступово увесь резерв генів буде вичерпаний і тоді починають виникати зміни, які приведуть до загибелі клітини. Таким чином, чим більше надмірної ДНК, тим більша тривалість життя цього виду.

Третя гіпотеза постулювала, що вікові зміни є продовженням нормальних генетичних сигналів, що регулюють розвиток тварини від моменту його зачаття до статевого дозрівання. Можливо навіть є «гени старіння» які уповільнюють або навіть закривають біохімічні шляхи один за іншим і ведуть до передбачуваних вікових змін. При цьому знижуються функціональні можливості клітин. Старіння організму – це по суті старіння і апоптоз ключових клітин, загибель яких здатна вплинути на фізіологію усього організму.

Інтенсивні дослідження механізмів клітинної проліферації і апоптозу тривають. В основному це пов'язано з онкологією – індукція апоптозу ракових клітин. Нині йде розробка методів пригнічення апоптозу залежного від віку в постмітотичних і слабoproліферуючих тканинах.

Онкогенетика (онко+генетика) – розділ онкології, який вивчає роль генетичних чинників в етіології і патогенезі пухлин. Одночасно онкогенетика є також розділом медичної генетики і молекулярної біології.

За статистикою у світі щорічно виявляють більше 10 млн. випадків захворювань раком (легенів, шлунку, грудей, прямої кишки, шийки матки), а в 2020 очікується близько 16 млн. захворювань. Кожен п'ятий житель розвинених країн помирає від онкологічних захворювань (від грец. «онкос» – пухлина). Тому дуже важливий інтерес фахівців-онкологів, медиків, та і кожної людини до встановлення першопричин канцерогенезу і реальних можливостей лікування онкологічних захворювань. Дослідження змін у функціонуванні клітин, що виникають при злоякісному переродженні, мають фундаментальне теоретичне і практичне значення.

Число клітин в кожній тканині, також як і об'єм тканини приблизно постійні. Природний спад клітин поповнюється з молодих відділів тканини, які містять низько спеціалізовані клітини, що діляться. Темп заповнення втрачених клітин контролюється ростовими чинниками. Якщо баланс спад-поповнення з деяких причин порушується на користь поповнення, виникає надлишкова маса клітин і в місці порушення балансу утворюється пухлина. Пухлина може бути

доброякісною і злоякісною. Доброякісною пухлина називається, якщо вона не виходить за межі своєї тканини і не вростає у сусідні тканини.

Головною ознакою злоякісної пухлини є її вихід за межі території даної тканини. Якщо пухлина вростає в прилежну тканину, відбувається інвазія пухлинних клітин – перша ознака злоякісної пухлини. Якщо пухлинні клітини відриваються від основного вогнища, розносяться лімфою або кров'ю по організму, осідають в інших, віддалених органах (найчастіше в лімфатичних вузлах, печінці, легенях), і утворюють в цих місцях вогнища пухлинного зростання, відбувається метастазування – поширення пухлинного процесу по організму

Невід'ємними властивостями злоякісної пухлини є автономність розвитку і безсмертя її клітин. Нормальні клітини смертні, їх життєвий цикл включає апоптоз. Клітини пухлини не знають межі для розмноження. Дуже важливою і обов'язковою ознакою злоякісної пухлини є її моноклональність – розвиток з однієї генетично зміненої клітини. У цьому сенсі вона є клоном - потомство генетично однорідних клітин, у яких поступово зникають ознаки початкової тканини (але не до кінця).

Причини виникнення пухлин. Добре відомі чинники, які можуть індукувати пухлини. Проте, основна частина пухлин виникає спонтанно.

1. Канцерогенні речовини дуже різноманітні – від таких простих, як чотирихлористий вуглець (CCl_4) до дуже складних поліциклічних гетероциклічних з'єднань як метихолантрен або бензантрацен. Найчастіше вони викликають схожі біологічні ефекти – стимулюють розмноження клітин-попередниць пухлини.

До канцерогенних речовин відносять речовини, які сприяють зростанню виниклих поодиноких пухлинних клітин, – це так звані промотори канцерогенезу. Ці речовини є надзвичайно важливим компонентом хімічного канцерогенезу, оскільки поодинокі пухлинні клітини, знаходячись в оточенні нормальної тканини, як правило, не в змозі здолати її стримуючого впливу і роками здатні зберігатися в латентному стані, не проявляючись у вигляді пухлини. Промотори знімають цей вплив, що зовні виглядає як сильний канцерогенний ефект.

Канцерогенні речовини (включаючи промотори) є причиною багатьох пухлин людини, наприклад, кам'яновугільний дьоготь викликає так званий «рак сажотрусів», анілін викликає у працівників анілінової промисловості рак сечового пухиря, куріння – рак легенів.

2. Віруси, які спричиняють пухлини (пухлиноутворюючі). Це можуть бути великі віруси або РНК-вмісні ДНК-вмісні ретровіруси. Усі вони мають унікальну здатність до інтеграції з геномом клітини-хазяїна. Ця дивна особливість пухлинних вірусів була передбачена вірусологом Л. А. Зильбером.

Перший пухлиноутворюючий вірус був відкритий в 1910 році Ф.П. Раусом у курей. Інфекції ним викликали саркому, тому його назвали вірусом саркоми Рауса. Це РНК-вмісний ретровірус, по матриці РНК синтезується ДНК

за допомогою зворотної транскриптази, яка вбудовується в геном клітини-хазяїна.

3. Променевий канцерогенез. Це одна з форм канцерогенезу, яка супроводжувала перших радіологів, що працювали з радієм і променями Рентгена без захисту від опромінення. Звичайно це був рак шкіри. Найбільш частим при загальному опроміненні організму є лейкоз, тобто різні форми пухлин кровотворної системи.

4. Роль генотипу. Ще одна важлива причина раку – генетична. У мишей шляхом відбору отримані чисті лінії з 100% вірогідністю виникнення певних форм пухлин – лейкозу, раку молочних залоз і раку легенів. В перших двох випадках має місце поєднання генотипу тварин і вірусу, а у разі спадкового раку легенів йдеться про поєднання канцерогенної дії і генома тварини. У людини чисто генетично обумовлено формування дитячої пухлини сітківки ока (ретинобластоми), що виникає у дитини, якщо мутації є хоч би у одного з батьків.

Механізми канцерогенезу.

Канцерогенез – багатоетапний процес накопичення мутацій і інших генетичних змін, який призводять до порушень регуляції проліферації і диференціювання, природної загибелі клітин (апоптоз), морфогенетичних реакцій клітини, а також, ймовірно, до неефективного функціонування чинників специфічного і неспецифічного протипухлинного імунітету. Сукупність таких змін, які надбані, як правило, в результаті досить тривалої еволюції неопластичних клонів, в ході якої відбувається відбір клітин з необхідними ознаками, може забезпечити розвиток злякисного новоутворення. Вірогідність виникнення в одній клітині декількох генетичних змін різко підвищується при порушеннях роботи систем, що контролюють цілісність генома. Тому мутації, які ведуть до генетичної нестабільності, також є невід'ємним етапом пухлинної прогресії. Деякі природжені аномалії систем генетичного контролю також є чинниками, які збільшують частоту і вірогідність виникнення онкогенних мутацій і новоутворень.

Значний прогрес в розумінні механізмів канцерогенезу пов'язаний з відкриттям спочатку онкогенів і протонкогенів, а потім – пухлинних супресорів і мутаторних генів. Онкогени – це клітинні або вірусні гени, експресія яких може привести до канцерогенезу. Протоонкогени – нормальні клітинні гени, посилення або модифікація функції яких перетворює їх на онкогени. Пухлинні супресори (антионкогени, рецесивні пухлинні гени) – клітинні гени, інактивація яких різко збільшує вірогідність виникнення новоутворень, а відновлення функції, навпаки, може подавити ріст пухлинних клітин. «Мутаторні» гени, що зараховуються до пухлинних супресорів, збільшують темп виникнення генетичних змін, не впливають на зростання неопластичних клітин, але їх інактивація сильно збільшує вірогідність появи різних онкогенних мутацій.

Належність до онкогенів або пухлинних супресорів визначається декількома критеріями: а) закономірним характером змін структури або

експресії цього гена в клітинах новоутворень; б) виникненням в юному або молодому віці певних форм пухлин у індивідів з гаметопатіями; в) різким підвищенням частоти появи пухлин у трансгенних тварин, або що експресують активовану форму цього гена - у разі онкогенів, або носіїв інактивуючої мутації («нокаут») цього гена - у разі пухлинних супресорів; г) здатністю викликати в культивованих *in vitro* клітинах морфологічну трансформацію або необмежений ріст (онкогени), пригнічувати клітинне зростання або трансформацію (пухлинні супресори).

До теперішнього часу відомо більше 150 потенційних клітинних і вірусних онкогенів і більше двох десятків пухлинних супресорів. Виявлено, що механізм дії вірусних онкогенів пов'язаний з активацією клітинних протоонкогенів (ретровірусів) або інактивацією пухлинних супресорів (ДНК-вмісні віруси). Виявлені характерні форми новоутворень людини і зміни онкогенів і пухлинних супресорів, які можна використовувати для постановки діагнозу

Протоонкогени і пухлинні супресорів є компонентами декількох загальних сигнальних шляхів, контролюючих клітинний цикл, апоптоз, цілісність генома, морфогенетичні реакції і диференціювання клітин.

Хід роботи:

Завдання 1. Дати характеристику інтерфази та стадій мітозу. Заповнити таблицю 1.

Таблиця 1.

№ п/п	Структура, процес	Інтерфаза	Стадії мітозу			
			профаза	метафаза	анафаза	телофаза
1.	Хромосоми					
2.	Хроматиди					
3.	Ядерце					
4.	Кліт. центр					
5.	Особливості обміну речовин і енергії					

Питання для самоконтролю:

1. Що називаємо мітотичним циклом?
2. Що таке мітоз і яке біологічне значення?
3. Як змінюється вміст ДНК при підготовці до поділу?
4. Опишіть механізм переміщення хромосом у цитоплазмі клітини при мітозі.
5. Охарактеризуйте будову метафазних хромосом.
6. Дайте характеристику мітотичного циклу.
7. Яке біологічне значення мітозу?

8. Дайте характеристику фаз мітозу?
9. В чому відмінність цитокінізу рослинних і тваринних клітин?
10. Що таке амітоз?
11. Яке біологічне значення мейозу?
12. Дайте характеристику I і II мейотичних поділів.

Тестові питання:

1. Введення хворому генетичних конструкцій *ex vivo* передбачає:
 - а) видалення клітин-мішеней з організму, введення у них потрібних генів і повернення клітин у організм хазяїна
 - б) локальне введення потрібних генів у тканину або пухлину;
 - в) введення генетичних конструкцій у ембріон;
 - г) вірно а+б;
 - д) жодна відповідь не вірна.
2. Введення хворому генетичних конструкцій *in vivo* передбачає:
 - а) видалення клітин-мішеней з організму, введення у них потрібних генів і повернення клітин у організм хазяїна;
 - б) локальне введення потрібних генів у тканину або пухлину;
 - в) введення генетичних конструкцій у ембріон;
 - г) клітини не видаляються з організму, а потрібні гени вводяться у них за допомогою відповідних векторів
 - д) вірно б+в+г.
3. Введення хворому генетичних конструкцій *in situ* передбачає:
 - а) видалення клітин-мішеней з організму, введення у них потрібних генів і повернення клітин у організм хазяїна;
 - б) локальне введення потрібних генів у тканину або пухлину
 - в) введення генетичних конструкцій у ембріон;
 - г) вірно а+в;
 - д) жодна відповідь не вірна.
4. Назвіть напрямки молекулярної онкогенетики:
 - а) молекулярна діагностика спадкових форм рака;
 - б) діагностика і з'ясування молекулярних механізмів вірусіндукованих форм раку;
 - в) пошук та діагностика молекулярних маркерів несприятливого прогнозу при ракових захворюваннях;
 - г) діагностика мікрометастазів;
 - д) пошук та діагностика полімерних ДНК-маркерів для виявлення схильності до раку;
 - е) всі відповіді вірні

5. Перерахуйте принципи конструювання трансгенних організмів:
- а) виділення або штучний синтез потрібного гена (генів);
 - б) знаходження і конструювання «вектора»;
 - в) введення вектора-носія гена у організм-реципієнт;
 - г) відбір клітин або особин-носіїв даного гена;
 - д) всі відповіді вірні
6. Які ви знаєте обмеження генної терапії?
- а) коротко тривалість;
 - б) імунна відповідь;
 - в) внесений мутагенез;
 - г) важкість лікування мультигенних захворювань;
 - д) всі відповіді вірні
7. Назвіть напрямки використання трансгенних тварин у народному господарстві та у медицині:
- а) моделювання хвороб людини;
 - б) вивчення дії нових ліків;
 - в) дослідження експресії генів на гібридних геномах;
 - г) можливості синтезу лікарських та біологічно активних речовин;
 - д) використання органів трансгенних тварин для трансплантації;
 - е) всі відповіді вірні
8. Назвіть напрямки використання трансгенних бактерій та вірусів у народному господарстві та у медицині:
- а) оздоровлення рослин;
 - б) можливості синтезу лікарських та біологічно активних речовин;
 - в) вектори для генної терапії;
 - г) вивчення дії нових ліків;
 - д) всі відповіді вірні;
 - е) вірно а+б+в
9. Назвіть шляхи застосування біотехнологій у народному господарстві та медицині:
- а) створення рекомбінантних лікарських препаратів;
 - б) створення вакцин;
 - в) використання у харчовій промисловості;
 - г) створення рослини і тварини з новими властивостями рекомбінантних ДНК;
 - д) вірно а+б+в
10. Сайт рестрикції, або сайт вбудовування (клонування) – це:
- а) впізнана рестриктазою нуклеотидна послідовність в молекулі ДНК
 - б) ген;

- в) оперон;
- г) вектор;
- д) мічена двохланцюгова ділянка ДНК.

11. Рекомбінантна ДНК – це:

- а) одноланцюгова ДНК;
- б) дволанцюгова ДНК;
- в) штучна молекула ДНК, яка складена із фрагментів різних видів ДНК і не існуюча в природі
- г) дволанцюгова ДНК існуюча в природі;
- д) одноланцюгова ДНК не існуюча в природі.

Практична робота № 9.

Тема: Генна терапія. Трансгенні організми. Перспективи генетичної інженерії.

Мета: Засвоїти суть генної терапії та значення біоінженерії тварин. Вивчити принципи та перспективи генетичної інженерії.

Генна терапія – заміна дефектних генів нормальними. Вона включає також використання генів для лікування цукрового діабету і СНІДу. Питання можливості лікування спадкових захворювань виникло після того, як учені розробили шляхи перенесення генів у певні клітини, де вони транскрибуються і транслуються. З урахуванням того, що генна терапія пов'язана зі зміною спадкового апарату людини, потрібно дотримуватися особливих вимог при клінічному дослідженні: 1) чітке знання дефекту гена і того, яким чином формуються симптоми хвороби; 2) відтворення генетичної моделі у тварин; 3) відсутність альтернативної терапії або існуюча терапія неможлива чи неефективна; 4) безпека для хворого. При розробці генної терапії також вирішуються такі питання: 1) які клітини необхідно використовувати; 2) яку частину клітини необхідно вилікувати, щоб зменшити або зупинити прогресування хвороби; 3) чи буде небезпечною надекспресія введеного гена; 4) чи є безпечним потрапляння реконструйованого гена в інші тканини; 5) як довго буде функціонувати змінена клітина; 5) чи будуть атаковані нові клітини імунною системою.

Спадкова генна терапія є трансгенною і змінює всі клітини організму. У людини вона не використовується. Неспадкова (соматична) генна терапія коригує тільки соматичні клітини, уражені внаслідок генетичного дефекту. Неспадкова генна терапія може допомогти індивідууму, але вона не покращить стан майбутніх поколінь, тому що мутантний ген не змінений у гаметах. На жаль, про більшість спадкових хвороб поки що мало інформації (зокрема, які тканини уражені), тому введення нормального гена в них ускладнене. Незважаючи на це, медична генетика досягла значних успіхів у лікуванні окремих захворювань. При цьому використовуються 2 підходи. Перший із них передбачає виділення клітин із тіла пацієнта для введення в них необхідного гена (*ex vivo*), після чого вони повертаються в організм хворого. Як вектор використовують ретровіруси, що містять генетичну інформацію у вигляді РНК. Ретровірус забезпечується рекомбінантною РНК (РНК вірусу + РНК копія гена людини). Після надходження рекомбінантної РНК у клітину людини, напр. у стовбурову клітину червоного кісткового мозку, відбувається зворотна транскрипція, і рекомбінантна ДНК, що несе нормальний ген, потрапляє в хромосому людини. Так було проведено лікування тяжкого імунодефіциту внаслідок відсутності аденозиндезамінази (АДА) у декількох дітей. Паралельно вони отримали фермент АДА, виділений з крові, як лікувальний препарат. Використовуючи як вектор аденовірус (AVV), учені розробили метод генної терапії серпоподібно-клітинної анемії. За природних умов AVV уражає тільки ті клітини червоного кісткового мозку, які є попередниками еритроцитів.

Функціональний ген β -глобуліну ввели в AVV, а вірус переніс його в незрілі еритроцити. Останні наповнюються нормальним гемоглобіном і спрямовуються у кров'яне русло.

Інший підхід у генної терапії передбачає використання вірусів; клітин, вирощених у лабораторії; штучних носіїв для введення генів безпосередньо в організм хворого. Наприклад, позбавлений хвороботворних властивостей аденовірус міститься у флаконі з аерозолем. При вдиханні хворим аерозольної суспензії вірус проникає в клітини легень і приносить до них функціональний ген муковісцидозу. Якщо клітини стійкі до генетичних маніпуляцій, учені впливають на клітини, що знаходяться поруч. Останні мають вплив на клітини, дефектні за певним геном. Так апробується генна терапія мишей, в яких ушкоджена та ж ділянка мозку, що й у пацієнтів із хворобою Альцгеймера. У фіброласти проникає ген фактора росту нервів. Ці клітини імплантуються у розріз мозку і секретують фактор росту, необхідний нейронам. Нейрони починають рости і продукувати відповідні нейромедіатори. Передбачається, що схожий тип генної терапії може бути використаний для лікування хвороби Гентінгтона, хвороби Паркінсона, депресії та ін.

Певних успіхів досягнуто при використанні генної терапії у лікуванні злякисних новоутворень. Виділяється пухлинна клітина, в яку вводять гени, що кодують такі протиракові речовини імунної системи, як інтерферони, інтерлейкіни. Клітини, введені заново у пухлину, починають продукувати ці речовини, вбивають і себе, і навколишні злякисні клітини.

Трансгенні організми. За допомогою методів генної інженерії можна одержати різні організми, які мають у складі свого геному чужорідні гени інших організмів. Такі організми називаються трансгенними. У даний час ця галузь науки швидко розвивається. У різних галузях господарської діяльності людини використовуються трансгенні бактерії. Крім того, що бактерії використовуються для клонування генів і виробництва білка, вони реконструюються і для інших цілей. Так, біоінженерні бактерії використовуються для оздоровлення рослин. Бактерії, що живуть у рослинах і стимулюють утворення кристаликів льоду, були змінені з холод-плюс на холод-мінус рослини. Такі бактерії почали захищати вегетативні частини рослин від морозу. У бактерій, що утворюють симбіоз з коренями кукурудзи, були введені, гени (від інших бактерій), що кодують токсин для шкідливих комах.

У природі існують бактерії, що можуть розщепити будь-яку органічну речовину. Бактерії відбираються за здатністю розщеплювати певну речовину, а згодом ця здатність підсилюється внаслідок біотехнології. Таким шляхом були створені бактерії, які поїдають нафту, що розлилася внаслідок техногенних катастроф. Бактерії використовують для бактеріального синтезу. Так, були реконструйовані бактерії для виробництва амінокислоти фенілаланіну.

Широке використання рекомбінантних бактерій у сільському господарстві, промисловості, захисті навколишнього середовища обмежувалося побоюванням того, що такі бактерії можуть замінити природні мікроорганізми

в екосистемах з виникненням несприятливих наслідків. На даний час розроблено методи визначення, виміру і навіть блокування діяльності цих клітин у навколишньому середовищі. Зручним об'єктом для генетичних маніпуляцій виявилися рослини, тому що рослинні клітини можна вирощувати в культурі, де із кожної клітини отримують цілу рослину. Ведуться роботи зі створення біоінженерних рослин, що могли б мати наступні властивості: 1) високу пристосованість до умов зовнішнього середовища; 2) містити більшу кількість необхідних для людини поживних речовин; 3) тривалий час зберігатися без псування.

Розробляються трансгенні рослини, здатні продукувати в інтересах людини хімічні речовини й ліки. Реконструйовано картоплю для продукції альбуміну людини. Передбачається, що в майбутньому рослини зможуть утворювати у своїх насіннях такі білки, як гормони людини.

Швидкими темпами розвивається біоінженерія тварин. Яйцеклітину поміщають у спеціальну мішалку разом з чужорідною ДНК і дрібними силікон-карбідними голками. Голки роблять множинні отвори в оболонці, крізь які ДНК попадає в клітину. За допомогою цієї технології бичачий гормон росту був введений у яйцеклітини багатьох видів тварин. Завдяки цій технології отримані великі риби, корови, свині, кролики, вівці. Трансгенні тварини створені для виробництва продуктів медичного значення

Ланцюговим інструментом для генетичних досліджень стали трансгенні миші. Вони дають важливу інформацію при плануванні генної терапії у людини. Вчені, що вивчають м'язову дистрофію Дюшена, виділили ген і його продукт – нормальний білок дистрофін, що відсутній у хворих. Запропоновано спосіб забезпечення хворих дітей дистрофіном. Але що буде, якщо дистрофін потрапить в інші тканини, або його буде утворюватися занадто багато? Для вирішення цих питань були створені трансгенні миші, у м'язах яких міститься дистрофіну в 50 разів більше, а також відбувається продукція цього білка в інших тканинах. Дистрофін не викликає у таких мишей патологічних відхилень. Трансгенні миші виявилися вкрай необхідними при вивченні моногенних хвороб, злоякісних пухлин і навіть мультифакторіальних хвороб людини.

Проте трансгенна технологія є неточною, тому що введення ДНК не спрямоване у визначений локус хромосоми. Ген, що переноситься, може порушити функцію іншого гена або потрапити під контроль інших генів. Навіть якщо трансген вставляється в хромосому й експресується, його ефект може бути перекритий таким же геном клітини-хазяїна. Тому була розроблена технологія більш точного «націлювання» гена (gene targeting), при якій ген, що вводиться, займає місце свого двійника у хромосомі клітини-хазяїна. При цьому використовується природний процес гомологічної рекомбінації. Внаслідок такої технології заміняють інактивованим геном активний ген у мишей і простежують ефект його відсутності навіть в ембріона. Так вивчають функцію білків імунної системи, механізм взаємодії онкогенів у виникненні пухлини, розвиток генетичних захворювань.

«Націлювання» гена – складна методологія, вона не працює у заплідненій яйцеклітині ссавців. Ген можна впровадити тільки в клітини на ранніх етапах розвитку зародка, до його імплантації у стінку матки. Клітини такого зародка тотипотентні і багато генів у них ще не експресовані. «Націлювання» гена має велике значення при створенні моделей генетичної патології у тварин. Важливо те, що вчені ідентифікують версію людського алеля, який викликає хворобу у тварин. Потім відповідний людський мутантний алель переноситься в ембріональні стовбурові клітини і, нарешті, схрещують тварин, гомозиготних за інактивованим геном. Тварин з «виключеним» геном використовують у вивченні складних хвороб, у які задіяно багато генів. Так, наприклад, вивчають атеросклероз шляхом інактивації сполучення генів, продукти яких контролюють ліпідний метаболізм.

Генна інженерія – галузь молекулярної біології і генетики, завдання якої – конструювання генетичних структур за заздалегідь наміченим планом, створення організмів із новою генетичною програмою. Виникнення генної інженерії стало можливим завдяки синтезу ідей і методів молекулярної біології, генетики, біохімії і мікробіології. Основні принципи генної інженерії були розроблені в 60-70-х роках ХХ сторіччя. Вони включали три основних етапи:

а) отримання генетичного матеріалу (штучний синтез або виділення природних генів); б) включення цих генів у генетичну структуру, яка реплікується автономно (векторну молекулу ДНК), тобто створення рекомбінантної молекули ДНК; в) введення векторної молекули (з включеним у неї геном) у клітину-реципієнта, де вона вмонтовується в хромосомний апарат. Експериментальне перенесення генів в інший геном називається *трансгенозом*. Він ґрунтується на технології рекомбінантної ДНК. В основі генної інженерії лежать різні методи маніпуляцій із молекулами ДНК.

Отримання генетичного матеріалу. У сучасній генетиці використовуються два способи синтезу генів поза організмом – хімічний і ферментативний. Для хімічного синтезу необхідно мати повністю розшифровану послідовність нуклеотидів ДНК. Вперше штучний ген синтезував індійський вчений Г. Корана (1970). Це був ген аланінової тРНК дріжджів, який складався з 77 нуклеотидів. У перших дослідах він не виявляв функціональної активності, бо не мав регуляторних ділянок. У 1976 р. вдалося синтезувати ген тирозинової тРНК кишкової палички, який складається не тільки із структурної ділянки (126 нуклеотидних пар), а й регуляторних частин – промотора і термінатора. Цей штучно створений за спеціальною програмою ген був трансплантований у бактеріальну клітину і функціонував як природний.

Іншим прикладом хімічного синтезу є синтез гена, який кодує фермент розщеплення лактози. Синтезований у пробірці ген був вмонтований у плазмід у бактерію; кишкова паличка набула здатності засвоювати лактозу. Проте хімічним шляхом можна синтезувати невеликі за розміром гени прокариотів. Синтез генів еукаріотів, які складаються з тисячі й більше нуклеотидів, шляхом хімічного синтезу створити поки що не вдалося.

Ферментативний синтез генів здійснюють за допомогою процесу зворотної транскрипції. Відкриття цього процесу зроблено на

пухлиноутворювальних РНК-вмісних вірусах. Проте згодом виявилось, що передавання генетичної інформації з іРНК на ДНК може відбуватися в умовах експерименту і з іншими РНК. Саме це лежить в основі ферментативного синтезу гена. Спрощено це можна подати таким чином: у пробірці на матриці іРНК за допомогою ферменту зворотної транскриптази (ревертази) синтезується комплементарна до неї нитка ДНК, потім утворюється двониткова молекула ДНК. Після цього іРНК руйнується ферментом рибонуклеазою, отриману ДНК називають ДНК-копією (кДНК). Така кДНК не має вставок-інтронів, тобто схема її будови не відрізняється від бактеріального гена. Матричну (інформаційну) РНК (мРНК) виділяють із клітин або тканин, в яких експресується потрібний ген. Так, для клонування проінсулінового гена використовують В-клітини підшлункової залози, тому що саме для них характерний високий вміст проінсулінової мРНК. Ген, отриманий внаслідок ферментативного синтезу, може функціонувати в бактеріальній клітині. На ньому синтезується іРНК, а потім білок. Під керівництвом В. Енгельгардта був отриманий ген, який визначає синтез ферменту галактозидази. Цей ген вводили у фаг, при розмноженні якого в клітині одержали безліч копій, що забезпечило синтез великої кількості ферменту. Це має не тільки теоретичне, але й практичне значення, тому що галактозидаза застосовується в харчовій промисловості. Синтезовано гени глобіну людини, кроля, голуба, деякі гени мітохондрій печінки пацюків і багато інших.

Гени, синтезовані за допомогою ревертази, не мають регуляторної частини і промотора. Відсутність регуляторних ділянок перешкоджає функціонуванню цих штучних генів у тваринних клітинах. При перенесенні в мікробну клітину до структурних генів експериментально, за допомогою ферментів, приєднують промотор, який добувають з мікробної клітини. Так були синтезовані два гени, відповідальні за синтез ланцюгів інсуліну. Їх вводили в геном кишкової палички, яка почала продукувати інсулін. Важливим досягненням генної інженерії є синтез гена соматостатину, який може функціонувати у мікробній клітині. Таким же методом під керівництвом Ю.О.Овчиннікова і М.П.Дубініна здійснений синтез генів, які кодують нейрогормони людини (лейцин-енкефалін і брадикінін). Ферментативний синтез генів має велике значення, тому що принципово можливо проводити штучний синтез будь-яких індивідуальних генів шляхом транскрибування їх із відповідних матричних РНК. Основною перешкодою є синтез не структурних, а регуляторних частин генів, необхідних для їх нормальної роботи. Це здебільшого обмежує використання штучно синтезованих генів. У генній інженерії широко використовують так само і виділення природних генів з метою створення рекомбінативних молекул ДНК.

Включення отриманого гена у вектор. Вектор – це щось подібне до молекулярного «таксі», здатного переносити чужу ДНК всередину бактеріальної клітини таким чином, щоб вона там змогла реплікуватися. Існує два основних типи векторів: бактеріальні плазмиди і бактеріофаги. Після виділення або синтезу гена його зшивають з векторною (спрямовуючою) молекулою ДНК. З цією метою використовують особливі бактеріальні

ферменти. Такі ферменти є у бактерій, у яких вони зупиняють репродукцію вірусу, вирізаючи вірусну ДНК із геному бактерії. Вони називаються *рестриктазами*, оскільки обмежують розмноження вірусів. Кожен тип ферментів рестрикції, а їх відомо близько 100, розділяє ДНК у специфічному місці, що називається *сайтом рестрикції*. У проміжку, що з'явився, може бути розміщена ділянка чужорідної ДНК. Таку ДНК можна розрізати за допомогою того ж ферменту рестрикції. Одноланцюгові комплементарні кінці двох ДНК називають «липкими кінцями», тому що вони з'єднуються внаслідок комплементарного спарювання азотистих основ. Вони полегшують вставку чужорідної ДНК у векторну. Таким чином, можна поєднувати відрізки ДНК, отримані з різних джерел, і створювати комбінації генів в одній довгій молекулі. Оскільки водневі зв'язки легко розриваються, для з'єднання ділянок застосовують фермент лігазу – один із ферментів репарації. Комбінуючи різні рестриктази і лігази, можна розрізати нитку ДНК у різних місцях і одержувати рекомбінантні молекули (наприклад, плазмідну ДНК з вмонтованим чужим геном).

Вмонтовування в геном реципієнта. Векторні молекули, які містять у собі фрагменти чужорідної ДНК, повинні мати властивість, яка забезпечує третій етап генної інженерії – проникнення в клітину-реципієнта і вмонтовування в її геном. Реципієнтні клітини, тобто клітини, обрані для клонування гена, можуть бути як про-, так і еукаріотичними. Найчастіше для цієї мети використовують бактерії, оскільки їх легко одержувати у великих кількостях. Перенесення генів може здійснюватися з однієї бактерії в іншу за допомогою плазмід. Рекомбінантні молекули ДНК відокремлюють від молекул, що містять тільки донорську або тільки плазмідну ДНК. Для їхнього поділу використовується плазмід, що має два гени стійкості до двох визначених антибіотиків. При цьому клітини, що ростуть за наявності двох антибіотиків, містять тільки вихідну плазмід. Клітини, що гинуть під дією двох антибіотиків, позбавлені плазмід і містять тільки донорську ДНК. Клітини, що ростуть за наявності одного антибіотика і гинуть за наявності іншого, – містять рекомбінантну плазмід. Якщо в плазміді вмонтовані інші гени, вони передаються в клітину-хазяїна шляхом трансдукції і вмонтовуються в її геном, де здатні до швидкої реплікації за допомогою ферментативної системи клітини-хазяїна. Цей процес швидкого одержання великої кількості однакових копій називається клонуванням. Клон – це велика популяція ідентичних молекул, бактерій, клітин, організмів, які отримані від одного предка. Клонування генів – це процес, що включає виділення й ампліфікацію (дублювання великої кількості) окремих генів у реципієнтних про- й еукаріотичних клітинах. Ці клітини, які містять потрібний ген, можна використовувати для одержання:

а) великої кількості білка, що кодується даним геном, або б) великої кількості самого гена у високоочищеному вигляді.

Крім плазмід, як вектор використовуються фаги (фаг лямбда), віруси (мавпячий вірус SV40). У випадку використання фагів і вірусів перенесення генетичного матеріалу здійснюється за допомогою трансдукції. Особливим випадком трансдукції є перенесення чужорідних генів в еукаріотичні клітини за

допомогою неонкогенних вірусів і фагів. Вперше припущення, що трансдукція можлива в еукаріотів, було висловлено С.М.Гершензоном у 1966 р. під час дослідів на шовковичному шовкопряді.

Рекомбінантна ДНК-технологія має як наукове значення (дозволяє виділити окремий ген складного організму і вивчити його функцію на молекулярному рівні), так і практичне застосування. За допомогою рекомбінантної ДНК-технології можна виробляти різні білки для медичної практики. Такі ліки більш безпечні, ніж аналогічні білки, отримані безпосередньо з організмів. Першим таким рекомбінантним препаратом став інсулін. Інший важливий напрямок біотехнології – виробництво вакцин. Такі вакцини не можуть викликати хвороб, тому що виготовляються з одного із поверхневих білків. Ген такого білка використовується для біореконструкції бактерії. Так створена вакцина проти гепатиту В. Успішно ведеться робота над вакцинами для гепатитів А, С, хламідіозів, герпесу й інших захворювань.

Практичні і теоретичні результати генної інженерії. В результаті інтенсивного розвитку методів генної інженерії отримані клони безлічі генів рибосомальної, транспортної і 5S РНК, гістонів, глобіну миші, кролика, людини, колагену, овальбуміну, інтерферону, інсуліну людини і інших пептидних гормонів. Це дозволило створювати штами бактерій для виробництва багатьох біологічно активних речовин, які використовуються в медицині, сільському господарстві і мікробіологічній промисловості.

Крім того, на основі численних мутантів по окремим генам, що виявляються при їх вивченні, створені високоефективні тест-системи для оцінювання мутагенної активності факторів середовища, зокрема для виявлення канцерогенних чинників.

За короткий час гена інженерія суттєво вплинула на розвиток молекулярно-генетичних методів і створила можливість одержати нові фундаментальні знання про організацію і функціонування генетичного апарату.

В Україні дослідження в галузі генної терапії проводяться під керівництвом В.А.Кордюма - член-кор. НАН України, академіка АМН України, завідувача відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Зокрема розробляється гена терапія гіперхолестеринемії. Виділений ген апопротеїну-1 (апо-1) ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), створена невірусна молекулярна конструкція його транспорту в клітини печінки та підібрані умови ефективної експресії апопротеїну. Виділений ген інсуліну, створено невірусну молекулярну конструкцію, що забезпечує його транспорт в клітини-мішені та підібрані умови ефективної експресії гена інсуліну. Спільно з науковцями Ізраїлю розробляються підходи генної терапії інсулінозалежного цукрового діабету.

Хід роботи:

Завдання 1. Засвоїти суть генної терапії та значення біоінженерії тварин.

Завдання 2. Вивчити принципи та перспективи генетичної інженерії.

Завдання 3. Вивчити значення практичних і теоретичних результатів генної інженерії.

Питання для самоконтролю:

1. Які клітини організму людини використовуються для вивчення каріотипу?
2. Що таке структурні зміни хромосоми?
3. Чим відрізняється модифікаційна мінливість від мутаційної?
4. Назвіть методи експериментального отримання мутацій.
5. Яку роль в еволюційному процесі відіграють мутації?
6. Яке практичне значення має генетичний моніторинг?
7. Що таке антимулагени?
8. Що таке клітинна інженерія?
9. Вкажіть принципи пренатальної діагностики спадкової патології.
10. Який зв'язок між віком батьків та частотою спадкових хвороб у дітей?
11. Які методи антропогенетики можна застосувати для діагностики хромосомної патології?
12. Які загальні принципи лікування хвороб обміну речовин?
13. Які методи антропогенетики можна застосувати для лабораторної діагностики генних хвороб?
14. Що таке фено- та генокопії?
15. Що таке пенетрантність?
16. Який принцип аналізу родоводів?
17. В чому полягає реальна небезпека шлюбів між кровними родичами?
18. В чому полягає значення генної інженерії і які її етичні проблеми?
19. Яке завдання і значення медико-генетичного консультування?
20. Які існують методи пренатальної діагностики спадкової патології? Що таке амніоцентез?

Тестові питання:

1. Основою створення трансгенних організмів є генна інженерія. Її завдання – це:
 - а) конструювання генетичних структур за заздалегідь наміченим планом
 - б) створення організмів із новою генетичною програмою;
 - в) зміна кількості нуклеотидів у гені;
 - г) боротьба з інфекціями;
 - д) вірно а+б+в.
2. Генна терапія базується на принципах генної інженерії. Це:
 - а) отримання генетичного матеріалу
 - б) включення отриманих генів у генетичну структуру, яка реплікується автономно
 - в) введення векторної молекули у клітину–реципієнт
 - г) вірно а+б+в

- д) вірно а+б.
3. Трансгенез – це:
- а) перехід генів з одного організму у інший;
 - б) експериментальне перенесення генів у інший геном
 - в) бактеріальна трансдукція;
 - г) жодна відповідь не вірна.
4. Генна терапія передбачає:
- а) репарацію пошкодженого гена;
 - б) введення в організм нормального гена для заміни аномального гена;
 - в) можливість використання функціональних генів у якості лікарських засобів;
 - г) регуляцію роботи аномального гена введеними генами-регуляторами;
 - д) вірно а+б+в+г
5. За типом клітин-мішеней генна терапія поділяється на:
- а) нервову та пухлинну;
 - б) соматичну та фетальну
 - в) ex vivo та in vivo;
 - г) in situ та ex vivo;
 - д) м'язову та епітеліальну.
6. Введення хворому генетичних конструкцій ex vivo передбачає:
- а) видалення клітин-мішеней з організму, введення у них потрібних генів і повернення клітин у організм хазяїна
 - б) локальне введення потрібних генів у тканину або пухлину;
 - в) введення генетичних конструкцій у ембріон;
 - г) вірно а+б;
 - д) жодна відповідь не вірна.
7. Введення хворому генетичних конструкцій in vivo передбачає:
- а) видалення клітин-мішеней з організму, введення у них потрібних генів і повернення клітин у організм хазяїна;
 - б) локальне введення потрібних генів у тканину або пухлину;
 - в) введення генетичних конструкцій у ембріон;
 - г) клітини не видаляються з організму, а потрібні гени вводяться у них за допомогою відповідних векторів
 - д) вірно б+в+г.
8. Введення хворому генетичних конструкцій in situ передбачає:
- а) видалення клітин-мішеней з організму, введення у них потрібних генів і повернення клітин у організм хазяїна;
 - б) локальне введення потрібних генів у тканину або пухлину
 - в) введення генетичних конструкцій у ембріон;

- г) вірно а+в;
- д) жодна відповідь не вірна.

9. Назвіть напрямки молекулярної онкогенетики:

- а) молекулярна діагностика спадкових форм раку;
- б) діагностика і з'ясування молекулярних механізмів вірусіндукованих форм раку;
- в) пошук та діагностика молекулярних маркерів несприятливого прогнозу при ракових захворюваннях;
- г) діагностика мікрометастазів;
- д) пошук та діагностика полімерних ДНК-маркерів для виявлення схильності до раку;
- е) всі відповіді вірні

10. Перерахуйте принципи конструювання трансгенних організмів:

- а) виділення або штучний синтез потрібного гена (генів);
- б) знаходження і конструювання «вектора»;
- в) введення вектора-носія гена у організм-реципієнт;
- г) відбір клітин або особин-носіїв даного гена;
- д) всі відповіді вірні

11. Які ви знаєте обмеження генної терапії?

- а) коротко тривалість;
- б) імунна відповідь;
- в) внесений мутагенез;
- г) важкість лікування мультигенних захворювань;
- д) всі відповіді вірні

12. Назвіть напрямки використання трансгенних тварин у народному господарстві та у медицині:

- а) моделювання хвороб людини;
- б) вивчення дії нових ліків;
- в) дослідження експресії генів на гібридних геномах;
- г) можливості синтезу лікарських та біологічно активних речовин;
- д) використання органів трансгенних тварин для трансплантації;
- е) всі відповіді вірні

13. Назвіть напрямки використання трансгенних бактерій та вірусів у народному господарстві та у медицині:

- а) оздоровлення рослин;
- б) можливості синтезу лікарських та біологічно активних речовин;
- в) вектори для генної терапії;
- г) вивчення дії нових ліків;
- д) всі відповіді вірні;

е) вірно $a+b+v$

14. Назвіть шляхи застосування біотехнологій у народному господарстві та медицині:

а) створення рекомбінантних лікарських препаратів;

б) створення вакцин;

в) використання у харчовій промисловості;

г) створення рослин і тварини з новими властивостями рекомбінантних ДНК;

д) вірно $a+b+v$

Практична робота № 10.

Тема: Клонування організмів та клітин. Терапевтичне клонування та його перспективи у медицині та фармації.

Мета: Вивчити особливості клонування організмів та клітин. Засвоїти значення терапевтичного клонування і його перспективи в медицині та фармації.

Клітинна інженерія – сукупність методів конструювання нових клітин на основі їх культивування, гібридизації та реконструкції. За допомогою клітинної інженерії вдається поєднати геноми різних видів (навіть тих, які належать до різних царств). Клітинну інженерію використовують для вирішення багатьох теоретичних та практичних проблем біології, промислової мікробіології, біотехнології (н., використання гібридів для отримання моноклональних антитіл, які використовують у медицині, науці і виробництві).

Клітинна інженерія формувалася, як розділ сучасної молекулярної біології - генетичної інженерії, який вивчає процес і наслідки перенесення генетичного матеріалу від однієї клітини до другої. Клітинна інженерія розділяється на геномну (повний перенос генома) та хромосомну (перенос великих груп генів або хромосом) інженерію.

Завдяки бурхливому розвитку та значній кількості досліджень, які проводяться з використанням методів клітинної інженерії, вона трансформувалася в окрему галузь біотехнології і біологічної науки в цілому. Клітинна інженерія виділилася як самостійна галузь біологічних та медичних наук (Сассон, 1987). Історично клітинна інженерія пройшла наступні етапи: 1) розробка методів штучного злиття клітин, що ростуть в культурі; 2) отримання реконструйованих клітин шляхом злиття – об'єднання ядра та цитоплазми від різних клітин у раніше невідомих комбінаціях; 3) ефективна трансфекція соматичних та статевих клітин.

У завдання клітинної інженерії входить: отримання соматичних клітин різних видів, створення культурних клітин (тканин) для отримання цінних речовин; клонування організмів – перспективний напрям клітинної інженерії; гібридизація соматичних клітин – дає можливість створювати препарати, що підвищують стійкість організму проти різних інфекцій.

Основним методом клітинної інженерії є гібридизація клітин мікроорганізмів та соматичних клітин тварин і рослин. Розрізняють наступні гібридні клітини:

1) Типові гібридні клітини: гетерокаріон – це гібридна клітина, яка містить у своїй цитоплазмі два або декілька різних чи однакових ядер, гетерокаріони не діляться; синкаріон – це гібридна клітина, в якій пройшло об'єднання хромосом різних клітин в одне ядро. Синкаріон часто дає початок проліферуючому клітинному клону.

2) Особливі типи гібридних клітин: а) гібридна клітина, що включає в себе каріопласт (ядро, оточене тонким шаром цитоплазми) + цитопласт (без'ядерна цитоплазма);

б) цибрид – гібридна клітина, що включає в себе цілу клітину + цитопласт іншої клітини; в) каріобрид — гібридна клітина, що включає в себе цілу клітину + каріопласт іншої клітини (Герасименко, 1989).

Гібридизація проводиться декількома способами з використанням фузогенних агентів різного походження: фізичного (змінне електричне або магнітне поле), хімічного (катиони, поліетиленгліколь), біологічного (віруси). Існують такі методи гібридизації клітин:

1. Використання інактивованого УФ-випромінюванням вірусу Сендай, який відноситься до групи вірусів парагрипу. Цей метод вже майже не використовується (лише у тих випадках, коли клітини іншими методами не зливаються – наприклад, при роботі з ядерними еритроцитами птахів).

2. Основний метод – використання поліетиленгліколю (ПЕГ). Це стандартний спосіб, який використовується при злитті клітин тварин та рослин, між собою та один з одним, а також при отриманні гібридом.

3. Злиття клітин з використанням лазерного та нейтронного опромінення.

4. Електрозлиття – на клітини попередньо зближені між собою, впливають електричним полем; спочатку відбувається об'єднання мембран, потім об'єднуються цитоплазми і формується гібридна клітина.

Розробляються та впроваджуються також нові методи гібридизації клітин.

1. Авдин-біоновий метод. Клітини одного типу (міелома) з'єднують з авдином, клітини іншого типу (імунні лімфоцити) безпосередньо або через антитіла з'єднують з біотином (вітамін Н). Такі мічені клітини у суспензії з'єднуються попарно і в результаті дії електричного поля, в яке їх поміщають, утворюються гібридомні клітини.

2. Метод проточної цитометрії. Цей метод застосовують:

а) для виділення клітин, що знаходяться на певній стадії клітинного циклу та їх синхронізації. Отримані таким шляхом клони життєздатні і дають початок клітинним клонам;

б) для відбору (селекції гібридних клітин). Не всі клітини, що піддаються різним впливам для злиття, зливаються. Для видалення клітин, що не злилися, суміш гібридних клітин і клітин, що не злилися, вирощують на селективному середовищі, де виживають лише гібридні клітини (Герасименко, 1989).

Рослинні і бактеріальні клітини перед злиттям перетворюють в протопласти (клітини, які не мають зовнішньої клітинної оболонки). Потім проводиться скринінг отриманих гібридних клітин, який дозволяє відібрати ті, які об'єднали геноми чи фрагменти ДНК батьківських клітин. У разі неповного злиття клітин (тобто клітина-реципієнт отримує окремі ділянки ядерного генетичного матеріалу або частини клітини-донора (органели)) виходять асиметричні гібриди. Це розширює можливості отримання нових сортів сільськогосподарських рослин, для створення яких раніше використовувалися методи класичної селекції.

Досягнення клітинної інженерії:

- отримання довгоживучих гібридних клітин, у тому числі, клонів, що розмножуються;

- встановлення правил комплементациї генів у гібридних соматичних клітинах;
- формулювання поняття про гени «розкоші» і гени «необхідності» та встановлення методик пригнічення функцій генів «розкоші» у гібридах;
- встановлення факту вибіркової втрати хромосом (сегрегації) у міжвидових гібридах та розробка підходів координування даного процесу;
- реконструкція клітин, створення реконструйованих клітин (гібридів та каріогібридів);
- отримання фактів про позитивний та негативний контроль проліферації гібридних клітин;
- отримання гібридних клітин між віддаленими організмами різних видів, класів та царств (наприклад, гібридів клітин рослин і тварин; гібридів тварин та дріжджів).

Першим практичним застосуванням досягнень клітинної інженерії стала розробка гібридомної технології та отримання з її допомогою моноклональних антитіл. Другим практичним застосуванням досягнень клітинної інженерії є доказ можливості направленої генетичної трансформації соматичних та статевих клітин тварин і рослин та отримання таким шляхом клітин-продуцентів заданих білкових продуктів.

Гібридома – це результат злиття злоякісних клітин та клітин імунної системи, які секретують імуноглобуліни. Гібридома має ряд селективних переваг: тривале розмноження в культурі; здатність синтезувати моноклональні антитіла. Мілетейн та Келер (лабораторія молекулярної біології Медичної науково-дослідної ради Кембриджського університету) першими запропонували спосіб отримання гібридом. Келер запропонував злити мієломну клітину з лімфоцитами із популяції, яка б мала попередній контакт з певним антигеном. За його розрахунками, отримана таким чином клітина повинна синтезувати антитіла відповідної специфічності, і одночасно бути здатною до необмеженого росту, що характерно для злоякісної мієломної батьківської клітини. У 1974 р. Келеру вдалось отримати гібридому, яка здатна продукувати антитіла певної специфічності (моноклональні антитіла) внаслідок злиття клітин мієломи та лімфоцитів селезінки миші, яка була імунізована еритроцитами барана з додаванням поліетиленгліколю (Єссон, 1987).

Застосування моноклональних антитіл – один із варіантів використання культури клітин в біотехнології. За допомогою гібридомної біотехнології стає можливою регуляція імунної відповіді завдяки отриманню моноклональних антитіл заданої специфічності. Гібридоми можна зберігати у замороженому стані. У деяких інститутах та лабораторіях для наукових цілей створені гібридомні банки.

Моноклональні антитіла використовують:

- 1) для ідентифікації певного гормону, вірусних або бактеріальних антигенів, антигенів групи крові та тканинних антигенів;
- 2) для визначення доз ліків;
- 3) для «впізнання» злоякісних пухлин товстої та прямої кишки,

діагностики деяких форм раку щитоподібної залози, епітеліальної форми раку;

- 4) для виділення біологічно активних речовин (білків, гормонів, токсинів) із складних сумішей;
- 5) для нейтралізації дії лімфоцитів, що відповідають за відторгнення трансплантату, а також аутоантитіл, які утворюються при аутоімунних захворюваннях (деякі форми діабету, розсіяний склероз, ревматичні хвороби);
- 6) у поєднанні з лікарськими препаратами моноклональні антитіла можуть значно посилювати ефективність дії останніх на клітини-мішені, дозволяючи при цьому уникати серйозних побічних явищ, які, як правило, супроводжують хіміотерапію раку;
- 7) для діагностики та лікування захворювань, які викликаються патогенами, перш за все мікроорганізмами та їх токсинами;
- 8) для діагностики вагітності, виявлення схильності до діабету, ревматоїдного артрити, спадкових захворювань.

Клонування – це процес отримання ідентичних за організацією і функціями генетично однакових нащадків за допомогою безстатевого розмноження. Термін «клон» походить від грецького слова «klon», що означає гілочка, нащадок і має відношення до вегетативного розмноження. Розмноження мікроорганізмів діленням (дробінням) можна також назвати клонуванням, як і вегетативне розмноження рослин.

Клонування – це система методів, які застосовуються для отримання клонів. З точки зору молекулярної біології – це система методів, що застосовуються для отримання клонованої ДНК, або отримання генетично ідентичного матеріалу у великому обсязі. Розрізняють клонування генів, молекулярне клонування та клонування клітин та організмів. При клонуванні генів виділяють та багато разів копіюють окремі гени клітини. Цю технологію можна використовувати для отримання великої кількості білка, що кодується цим геном. Такий підхід є цінним для фармації, бо дозволяє штучно створити необхідний для організму білок, якщо його природний синтез пошкоджений. При молекулярному клонуванні здійснюється розмноження молекул ДНК у складі вектора, який є плазмідною або фагом (DNA cloning). Цю технологію використовують з подальшим уведенням клонованої ДНК у певну клітину – хазяїна, наприклад, у клітину кишкової палички *E.coli*, яка починає продукувати невластивий їй білок. Перше практичне використання рекомбінантної ДНК пов'язано з отриманням у промислових масштабах деяких важливих білків. У 1982 р. у США був отриманий патент на виробництво першого такого білка – інсуліну, який необхідний для мільйонів хворих на діабет. Клоновану рекомбінантну ДНК використовують також для отримання інтерферонів, вакцин та інших фармацевтичних препаратів.

Клітинне клонування – клонування, при якому відбувається виведення популяції клітин із однієї клітини. В клітинній інженерії широко використовують методи клонування. У випадку простих одноклітинних організмів, чи то бактерій, чи то дріжджів, цей процес є достатньо простим.

Однак, для клонування клітин багатоклітинних організмів докладається значно більше зусиль – такі клітини розвиваються дуже повільно у звичайних умовах.

Клонування багатоклітинних організмів базується на тотипотентності клітин. Клонування тварин – це процес пересадки донорського ядра у реципієнтну клітину, активація цього гібриду до поділу, його розвиток поза організмом та трансплантація у матку тварини для подальшого розвитку. Клонування буває ембріональне та соматичне. Як клітини–реципієнти в обох випадках використовують еноклейовані ооцити (з видаленим ядерним матеріалом). При ембріональному клонуванні донорами ядер є клітини морул або бластоцист, а при соматичному клонуванні – соматичні клітини. Соматичне клонування – більш молодий напрямок порівняно з ембріональним. Перше успішне соматичне клонування пов'язано з отриманням вівці Доллі. Була також клонована трансгенна вівця Поллі, у якої активним ген фактора згортання крові людини, при цьому продукт цього гена виділявся з молоком. При клонуванні кіз були створені генетично модифіковані тварини, у яких активно працював трансген синтезу людського тромбіну. Таким чином, клоновані трансгенні організми можуть служити живим «фармацевтичним заводом», що природним шляхом виробляє ті чи інші біологічно активні речовини (БАР), і використовуються у фармації для лікування генетично обумовлених або набутих хвороб людини.

Природні і штучні клони. У природі є випадки клонування організмів, в основі якого лежить нестатеве розмноження шляхом ділення однієї клітини або вегетативне (з групи клітин одного організму). Клонування рослин – це їх вегетативне розмноження, яке широко розповсюджено у природі та здавна використовується людиною. У рослин на відміну від тварин по мірі їх росту, в ході клітинної спеціалізації – диференціювання – клітини не втрачають тотипотентні властивості, тобто, вони не втрачають здатності реалізувати генетичну інформацію, закладену в ядрі. Тому практично будь-яка рослинна клітина, що зберегла в процесі диференціювання своє ядро, може дати початок новому організму. Ця особливість рослинних клітин лежить в основі багатьох методів генетики і селекції.

У природі також є випадки клонування ссавців і людини, це утворення монозиготних близнюків – справжніх клонів з одним і тим же геномом, що виникають при розділенні однієї зиготи на ранній стадії бластогенезу. Монозиготні близнюки мають однакову стать і завжди схожі один на одного. Відомо також, що у ссавців, у тому числі і людини на самих ранніх стадіях розвитку (до стадії 8 бластомерів), зародок може бути без видимих негативних наслідків розділений на окремі бластомери. З них можуть розвинутися особини з ідентичним генотипом – монозиготні (однойцеві) близнюки.

При вегетативному розмноженні і при клонуванні спадковий матеріал (гени, хромосоми) не розподіляються по потоках, як у разі статевого розмноження, а зберігаються у повному складі протягом багатьох поколінь. Всі організми, що входять до складу клона мають однаковий генотип і фенотипово не розрізняються між собою.

В процесі диференціювання клітини тварин, позбавляються тотипотентності, і в цьому, одна з суттєвих відмінностей їх від рослинних клітин. Саме в цьому є головна перешкода для клонування дорослих хребетних тварин.

Штучне клонування – це створення людиною ідентичних (генетично однакових з материнською) копій клітин або організмів без їх статевого розмноження.

Терапевтичне клонування і його перспективи в медицині. Існують два різновиди клонування людини: репродуктивне клонування і терапевтичне. Репродуктивне клонування людини передбачає, що індивід, який народився в результаті клонування, отримує ім'я, громадянські права, освіту, тобто, все як звичайні люди. Але таке клонування потребує вирішення великої кількості етичних, релігійних і юридичних проблем. Більшість держав своїм законодавством заборонили розробки з репродуктивного клонування людини.

Терапевтичне клонування передбачає, що розвиток ембріона людини зупиняється до 14 діб і подальші використовується для отримання стовбурових клітин. Законодавці багатьох країн побоюються що легалізація терапевтичного методу клонування призведе до переходу в репродуктивне, проте в деяких країнах (США і Великобританія) терапевтичне клонування дозволено. Терапевтичне клонування клітин людини викликає науковий інтерес серед вчених і медиків, тому що отримані шляхом клонування стовбурові клітини, недиференційовані, і можуть перетворюватися на клітини потрібних тканин. В результаті клонування отримують генетично ідентичні клітини пацієнта, і їх трансплантація не приведе до гістонесумісності і не потребуватиме застосування імунодепресантів (препарати, які перешкоджають відторгненню пересаджених органів чи тканин) та інших побічних ефектів.

Для «терапевтичного клонування» використовують метод створення клітинних культур-трансплантатів, який полягає у перенесенні ядра соматичної клітини пацієнта (н., шкірних фібробластів, лімфоцитів) в ооцит. Після такої реконструкції ядро набуває тотипотентності і визначає формування ембріона, який на початкових стадіях розвитку може бути використаний для створення культури ембріональних стовбурових клітин, які мають ядерний геном пацієнта. На ембріональні стовбурові клітини діють індукторами - речовинами, що викликають спрямовану диференціацію клітин. Наприклад, в кардіоміоцити для відновлення пошкодженого міокарду або в секреторні бета-клітини острівців Лангерганса, які синтезують інсулін. Розроблені і продовжують розроблятися інші методи отримання культур стовбурових клітин, наприклад, з використанням технології генетичної модифікації генома, а також методи діагностики з використанням різноманітних маркерів.

Успішно проведені експерименти по клонуванню макак-резус американськими ученими (Л. Менг і ін., Національний центр досліджень приматів в м. Орегон), що вказує на потенційну можливість перенесення технології трансплантації ядер на людину. Отримано дві макаки-резус в результаті перенесення ядер бластомерів з ранніх ембріонів. Зважаючи на значну схожість фізіології і генетики у людини і решти приматів для вивчення

процесів репрограмування генома, розвитку клонів, як під час протікання вагітності, так і в постнатальний період і їх епігенетичній стабільності нелюдські примати можуть служити оптимальнішою моделлю.

В травні 2013 року здійснено терапевтичне клонування клітин дорослої людини. Клоновані ембріональні стовбурові клітини людини, джерелом для яких стали клітини дорослої людини. Шухрат Міталіпов (керівник досліджень з Орегонського національного центру досліджень приматів), ще в 2007 році отримав стовбурові клітини ембріона макаки. Він запропонував новий метод виробництва стовбурових клітин для пацієнтів з пошкодженими або нездоровими органами і тканинами. Такі стовбурові клітини можуть регенерувати і замінити пошкоджені клітини, поліпшувати стан при поширених хворобах людей. Ш.Міталіпов і його колеги використовують технологію перенесення ядра клітини. Вчені пояснюють, що це не клонування людини, в Орегоні просто застосували методи клонування, для отримання стовбурових ембріональних клітин на базі донорської яйцеклітини і клітини шкіри пацієнта. У результаті вдалося виростити ембріон, з якого взяли стовбурові клітини.

Феліпе Проспер (Наварський університет, Іспанія) відзначив, що вже існує інший простий і дешевий метод створення тотипотентних стовбурових клітин, який був розроблений нобелівським лауреатом С.Яманакою.

Технологія перенесення незначної кількості цитоплазми від ооциту здорового донора в реципієнтну яйцеклітину пацієнта в даний час піддається активній критиці через можливу дисрегуляцію у взаємовідносинах між ДНК ядра і мітохондрій. Негативний ефект генетичного химеризму може бути ще сильнішим при тотальній заміні оточення цитоплазми каріопласта і виявитися у вигляді порушень різної природи як у пренатальний період онтогенезу, так і після народження організму.

Створення *ембріональних стовбурових клітин* (ЕС) відкривають величезні можливості для лікування багатьох захворювань, пов'язаних з дегенерацією певних типів клітин, втратою функцій тканин і цілих органів. Мільйони людей у всьому світі страждають нейродегенеративними захворюваннями, такими як хвороба Альцгеймера і Паркінсона, діабет і артрит, СНІД, інфаркт і інші захворювання, які можуть бути виліковані за допомогою застосування клітинних трансплантатів.

Прогнозується, що найбільш поширені захворювання невдовзі можуть бути вилікованими з впровадженням клітинної терапії. Методи терапевтичного клонування дозволяють уникнути імунного відторгнення трансплантатів, оскільки ЕС клітини мають такий же геном. Низька ефективність трансплантації ядер не важлива для здійснення клітинної терапії, оскільки для отримання лінії ЕС клітин достатньо одного або декількох передімплантаційних ембріонів. Розглядається питання про використання як цитопласти енуклеювані яйцеклітини тварин, наприклад, великої рогатої худоби, які підтримують реалізацію генетичного матеріалу ядра людської соматичної клітини до стадії 5-денного ембріона.

Перспективний напрямок одержання стовбурових клітин – використання пуповинної крові. Пуповинна кров відіграє важливу роль у внутрішньоутробному розвитку дитини. Вона, проходячи по судинах пуповини, забезпечує малюка киснем і необхідними поживними речовинами. Після народження дитини лікар перерізує пуповину, в якій зазвичай залишається 50-150 мл пуповинної крові. Саме ця кров, завдяки наявності в ній стовбурових клітин, стає цінним матеріалом для лікування багатьох хвороб. І якщо раніше пуповинна кров разом з пуповиною утилізувалися одразу ж після пологів, то сьогодні батьки все частіше зберігають її стовбурові клітини, щоб забезпечити свого малюка персональним запасом лікувального матеріалу на випадок захворювання.

Вперше лікування стовбуровими клітинами пуповинної крові було застосовано в 1988 році у Франції. Сьогодні цей природний матеріал вже активно використовується у всьому світі. Тільки за перші три квартали 2013 року у світі здійснено близько 5 500 застосувань стовбурових клітин пуповинної крові з метою лікування. Лікарі називають пуповинну кров рідким золотом медицини, а вчені – найбільшою історією успіху у сфері клітинних технологій. У всьому світі, зокрема в Україні, вивчення властивостей стовбурових клітин пуповинної крові не припиняється.

Слід розмежовувати поняття репродуктивне клонування та терапевтичне (медичне) клонування. Результатом репродуктивного клонування є створення нової людини, яка є генетично ідентична іншій людській істоті. Терапевтичне клонування ставить за мету не народження нової людини, а лікування важкохворих людей за допомогою створення стовбурових або зародкових клітин, які потім використовуються для заміщення будь-яких тканин. ООН відхилила ініціативу США повністю заборонити клонування. Таким чином юридично в багатьох країнах залишається можливість експериментувати і проводити терапевтичне клонування.

Отже, клітинна інженерія та клонування організмів на сучасному етапі розвитку молекулярної біології мають значні успіхи і перспективи практичного застосування в селекції, господарстві та практичній медицині. Але існують певні проблеми, які пов'язані з недосконалими методиками клонування, які мають низьку ефективність та неточність прогнозування одержання необхідних клонів. Виникають також етичні, юридичні та соціальні проблеми, особливо стосовно клонування ембріонів людини з метою одержання терапевтичного матеріалу. Зрозуміло, що з часом, в майбутньому методики клонування організмів і клітин удосконаляться і людство прийде до вирішення не тільки наукових, а й етичних та соціальних проблем.

Хід роботи:

Завдання 1. Вивчити особливості клонування організмів та клітин.

Завдання 2. Засвоїти значення терапевтичного клонування і його перспективи в медицині та фармації.

Тестові питання:

1. Сайт рестрикції, або сайт вбудовування (клонування) – це:
 - а) впізнана рестриктазою нуклеотидна послідовність в молекулі ДНК
 - б) ген;
 - в) оперон;
 - г) вектор;
 - д) мічена двохланцюгова ділянка ДНК.
2. Рекombінантна ДНК – це:
 - а) одноланцюгова ДНК;
 - б) дволанцюгова ДНК;
 - в) штучна молекула ДНК, яка складена із фрагментів різних видів ДНК і не існуюча в природі
 - г) дволанцюгова ДНК існуюча в природі;
 - д) одноланцюгова ДНК не існуюча в природі.
3. Тотіпотентні СК – це:
 - а) клітини, що здатні надавати початок усім типам клітин організму
 - б) спеціалізовані клітини;
 - в) спеціалізовані клітини плода
 - г) недиференційовані клітини, не здатні до самооновлення;
 - д) клітини нервової тканини
 - г) вірної відповіді немає
4. Стовбурові клітини – це:
 - а) неспеціалізовані клітини, які здатні до необмеженого мітотичного поділу;
 - б) неспеціалізовані клітини, здатні до обмеженого мітотичного поділу;
 - в) неспеціалізовані клітини, що дають початок новим клітинам при формуванні тканин
 - г) спеціалізовані клітини;
 - д) вірно а) +в).
5. Уніпотентні стовбурові клітини – це:
 - а) попередники тільки одного типу клітин, що здатні до обмеженого мітотичного поділу;
 - б) попередники тільки одного типу клітин, що здатні до необмеженого самооновлення
 - в) здатні надавати початок усім типам клітин організму;
 - г) попередники декількох, але не усіх типів клітин;
 - д) стовбурові клітини печінки.
6. Приклади стовбурових клітин у людини:
 - а) епітелій гонад;

- б) базальний шар епідерміса хребетних;
 - в) клітини кісткового мозоку ссавців, з яких утворюються клітини крові
 - г) зигота;
 - д) всі варіанти вірні.
7. Шляхами отримання клітин для терапевтичного клонування є:
- а) отримання генетичного матеріалу;
 - б) отримання ембріональних стовбурових клітин з ембріонів;
 - в) введення векторної молекули у клітину-реципієнта;
 - г) пересадження ядер соматичних клітин дорослого організму;
 - д) вірно б)+г)
8. Коммітовані (або напівстовбурові) клітини – це:
- а) попередниці диференційованих соматичних клітин, є спеціалізованими, але менш диференційовані та здатними до активного поділу
 - б) спеціалізовані клітини;
 - в) нездатні до активного поділу;
 - г) недиференційовані соматичні клітини;
 - д) диференційовані соматичні клітини.
9. Здатність організмів до відновлення втрачених частин тіла за рахунок коммітованих клітин це:
- а) отримання генетичного матеріалу;
 - б) отримання ембріональних стовбурових клітин з ембріонів;
 - в) введення векторної молекули у клітину-реципієнта;
 - г) регенерація
 - д) пересадження ядер соматичних клітин дорослого організму.
10. Які з стовбурових клітин (СК) при клонуванні здатні утворювати організм?
- а) Тотіпотентні СК
 - б) Уніпотентні СК;
 - в) поліпотентні СК, або ембріональні СК;
 - г) регіональні СК;
 - д) соматичні СК.
11. На яких принципах генної інженерії базується генна терапія?
- а) на отриманні генетичного матеріалу;
 - б) на включенні отриманих генів у генетичну структуру, яка реплікується автономно;
 - в) на введенні векторної молекули у клітину-реципієнт;
 - г) вірно а+б+в
 - д) вірно а+б.
12. Властивість тотіпотентності для ембріональних клітин людини зберігається до:

- а) 4-клітинної стадії;
- б) 8-клітинної стадії;
- в) 14-клітинної стадії;
- г) 32-клітинної стадії
- д) 56-клітинної стадії.

13. В основі створення рекомбінантних плазмід є етапи:

- а) рестрикція – розрізання молекули ДНК на фрагменти;
- б) зшивання – фрагмент с потрібним геном включають в плазміді та зшивають їх;
- в) трансформація – введення рекомбінантних плазмід в бактеріальні клітини;
- г) скрінінг – відбір серед клонів трансформованих бактерій таких, в яких плазміді мають потрібний людині ген;
- д) всі варіанти вірні

14. Стовбурові клітини діляться на:

- а) дочірні СК;
- б) коммітовані (напівстовбурові);
- в) вірно а) +б)
- г) диференційовані соматичні клітини;
- д) спеціалізовані, не здатними до активного поділу.

ЛІТЕРАТУРА

Базова література

1. Медична біологія / За ред. В. П. Пішака, Ю. І. Бажори. Підручник/ Видання 3-є, перероблене і доповнене. – Вінниця: Нова книга, 2017. – 608 с.; іл.
2. Павліченко В.І., Пішак В.П., Булик Р.Є. Основи молекулярної біології: Навчальний посібник. – Чернівці: Медуніверситет, 2012. – 388 с.; іл.

Допоміжна література

1. Дубінін С. І., Пілюгін В.О., Ваценко А.В., Улановська-Циба Н.А., Передерій Н.О. Сучасні проблеми молекулярної біології. Підручник для студентів. ВНМЗ України III-IV рівнів акредитації. Полтава, 2016. – 395 с.
2. Генетична медицина / В.Н. Запорожан, В.А. Кордюм, Ю.І. Бажора та ін.; За ред. В.Н. Запорожана. – Одеса: Одес. держ. ун-т, 2008. – 432 с.
3. Коломієць Н.Г. / За загальною редакцією Р.П.Піскун. Молекулярні основи спадковості та мінливості (посібник для самоконтролю, самоконсультації та контролю). – Вінниця: Нова книга, 2005. – 144 с.
4. Молекулярные основы генетики. Г.Ф.Жегунов, Б.И.Кулаченко. Учебное пособие для студентов 1 курса. Харьков, 2001. – 74 с.
5. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: підручник/ А.В. Сиволоб. – К. : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. – 384 с.
6. **Інформаційні ресурси:**
7. Центр тестування – база ліцензійних тестових завдань «Крок» – 1 <http://testcentr.org.ua/>
8. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) – An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders <http://omim.org/>