

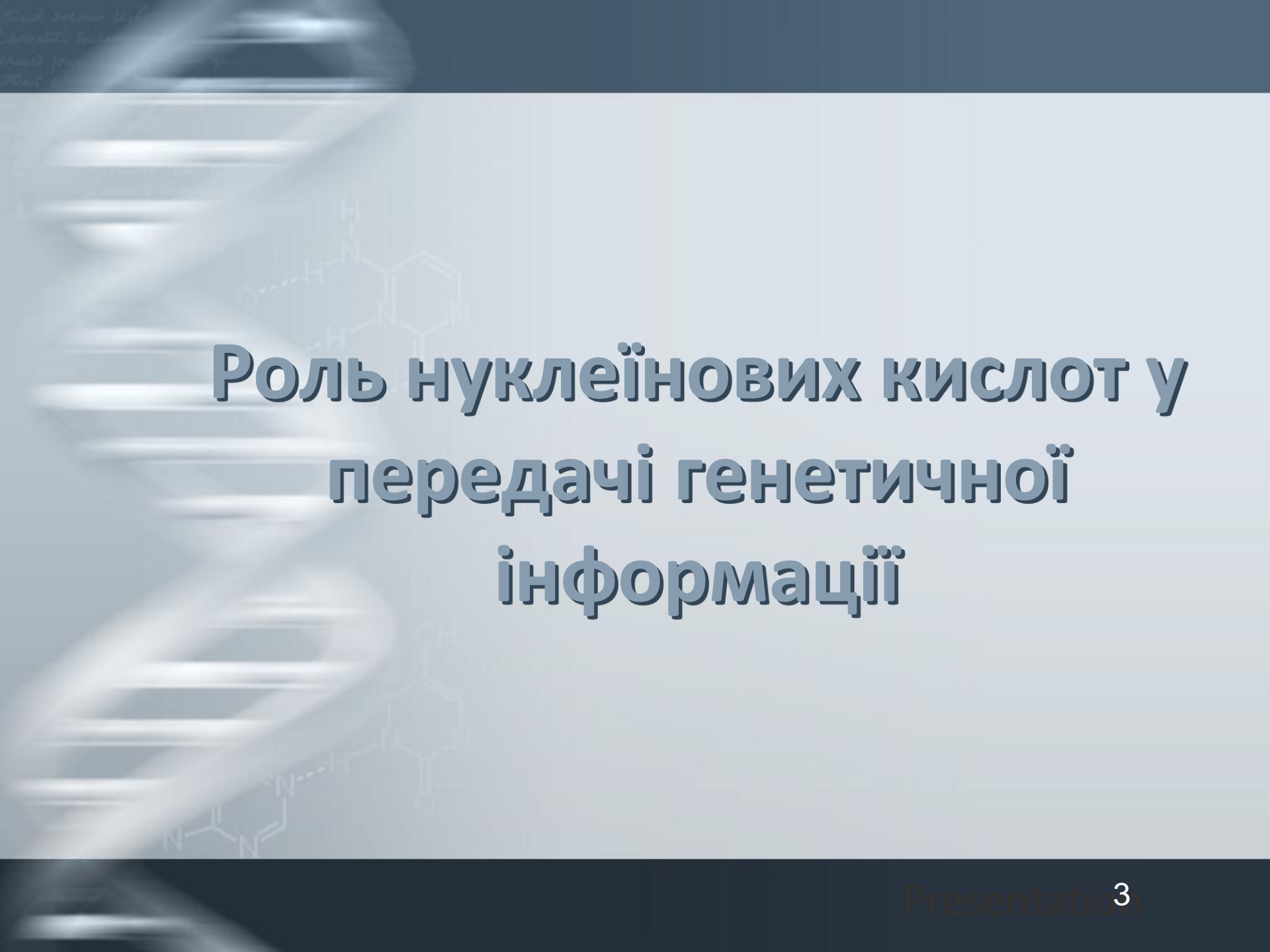
# Молекулярні механізми спадковості

Кафедра медичної біології ХНМУ

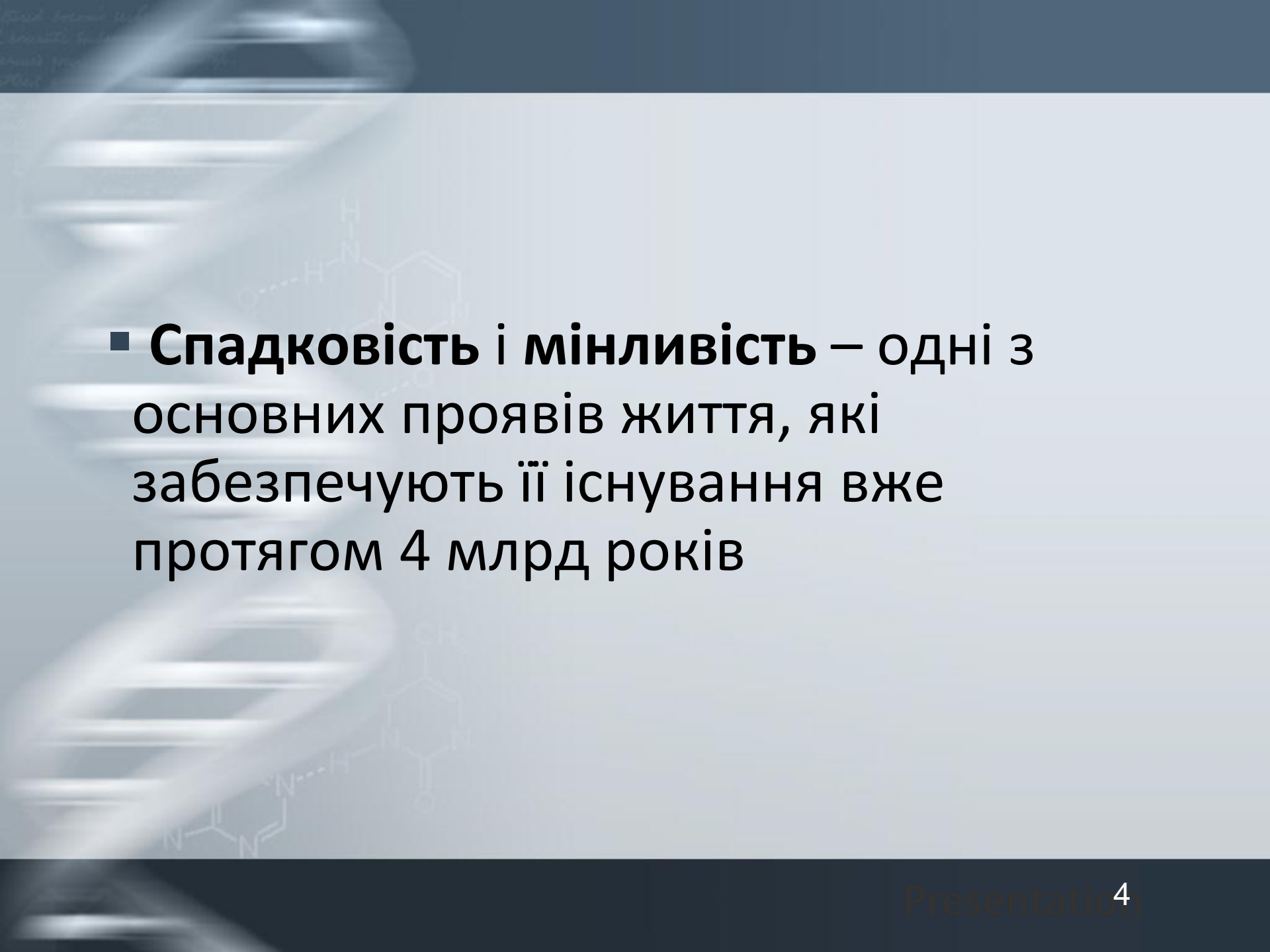
2015

# Питання лекції

1. Роль нуклеїнових кислот у передачі спадкової інформації
2. Геном людини. Види і структура генів
3. Реплікація ДНК
4. Експресія генів: транскрипція, трансляція
5. Найважливіші методи молекулярної біології



# Роль нуклеїнових кислот у передачі генетичної інформації

- 
- **Спадковість і мінливість** – одні з основних проявів життя, які забезпечують її існування вже протягом 4 млрд років

# Спадковість

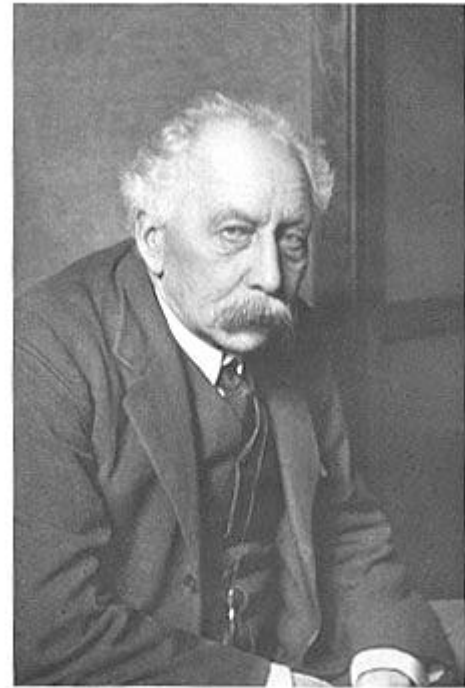
- **Спадковість** – це властивість клітин і організмів у процесі самовідтворення передавати новому поколінню **програму розвитку**, тобто здатність до певного типу обміну речовин та індивідуального розвитку

# Мінливість

- **Мінливість** – властивість, протилежна спадковості, полягає у здатності організмів набувати змін й існувати у різних варіантах

# Генетика – наука про спадковість та мінливість живих організмів

- Термін «генетика» був запропонований **Вільямом Бетсоном** у 1906 р.



*W. Bateson*

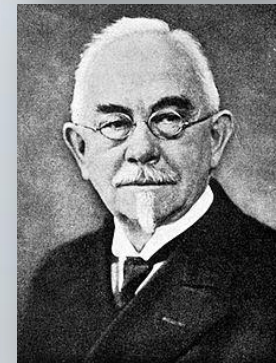
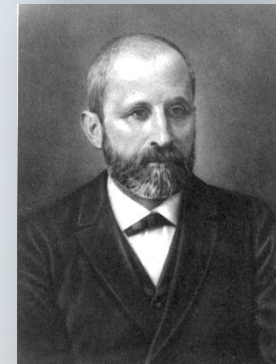
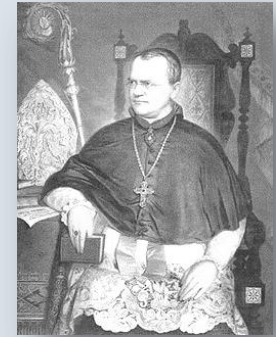
## Спадковість та мінливість пов'язані з однаковим матеріальним субстратом

- Пошукам цього субстрату були присвячені роботи науковців 19 – 20 сторіч

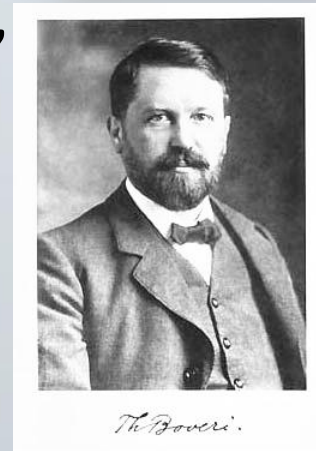
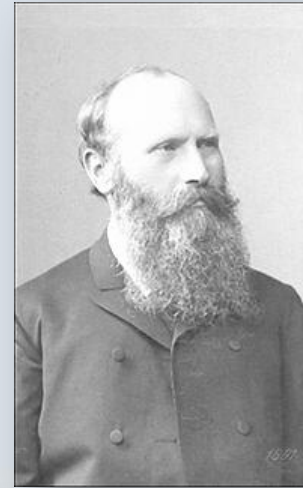


# Історія пошуку матеріального субстрату спадковості

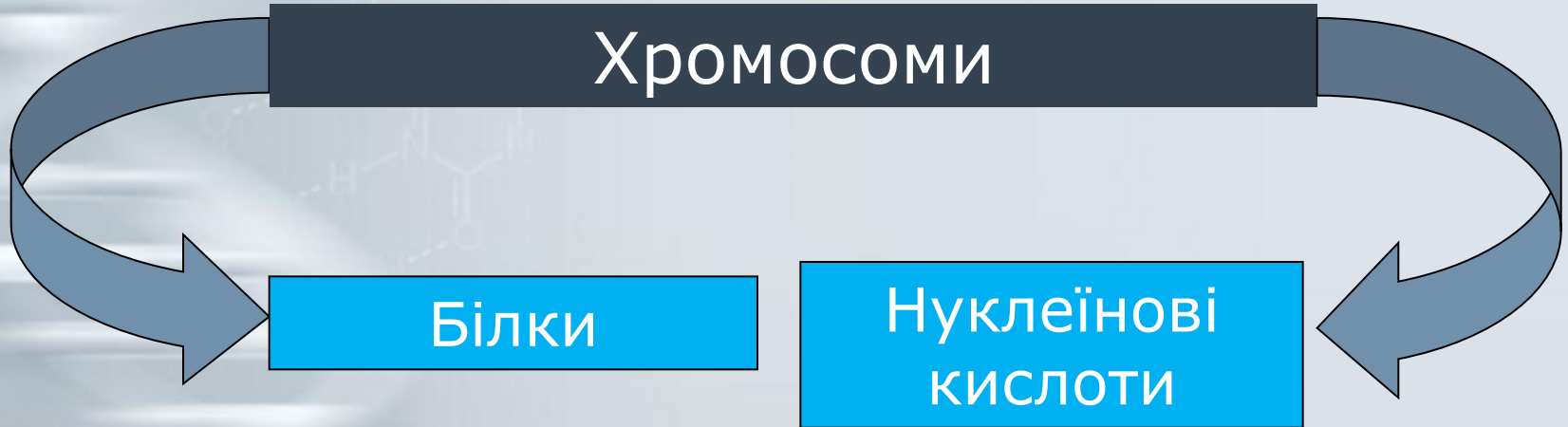
- **1865 р.** – Грегор Мендель – відкриття законів спадковості (передача «спадкових задатків»)
- **1869 р.** – Іоганн Фридрих Мішер – відкрив нуклеїнові кислоти в ядрах клітин гною
- **80-і роки 19 сторіччя** – опис явищ мітозу й мейозу
- **1909 р.** – Вільгельм Йогансен – увів термін «ген»



- **1888 р.** – Генрих Вільгельм Вальдейєр – увів термін «хромосоми» для внутрішньоядерних структур, що фарбуються
- **1902-1907 рр.** – Теодор Бовері, Уолтер Сеттон – пов'язали спадкоємність поколінь із передачею хромосом
- **1910-1916 рр.** – Т. Морган – хромосомна теорія спадковості



# Хромосоми – носії спадкової інформації

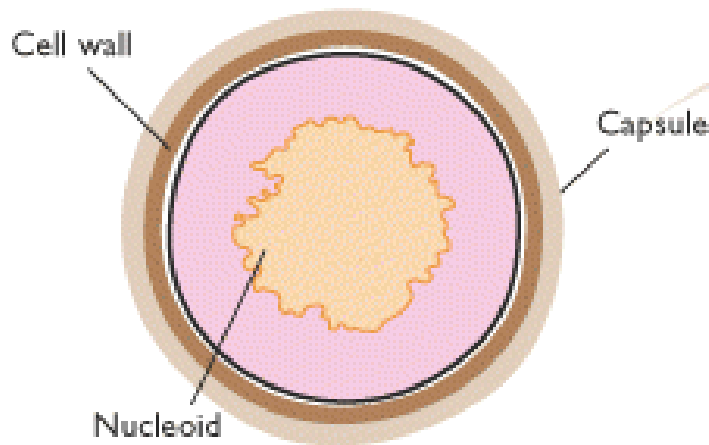


**Із чим пов'язана спадковість – із білками або нуклеїновими кислотами ?**

Спочатку перевагу надавали білкам.

# Явище трансформації

## Експерименти Фредерика Гріффіта (1928 р.)



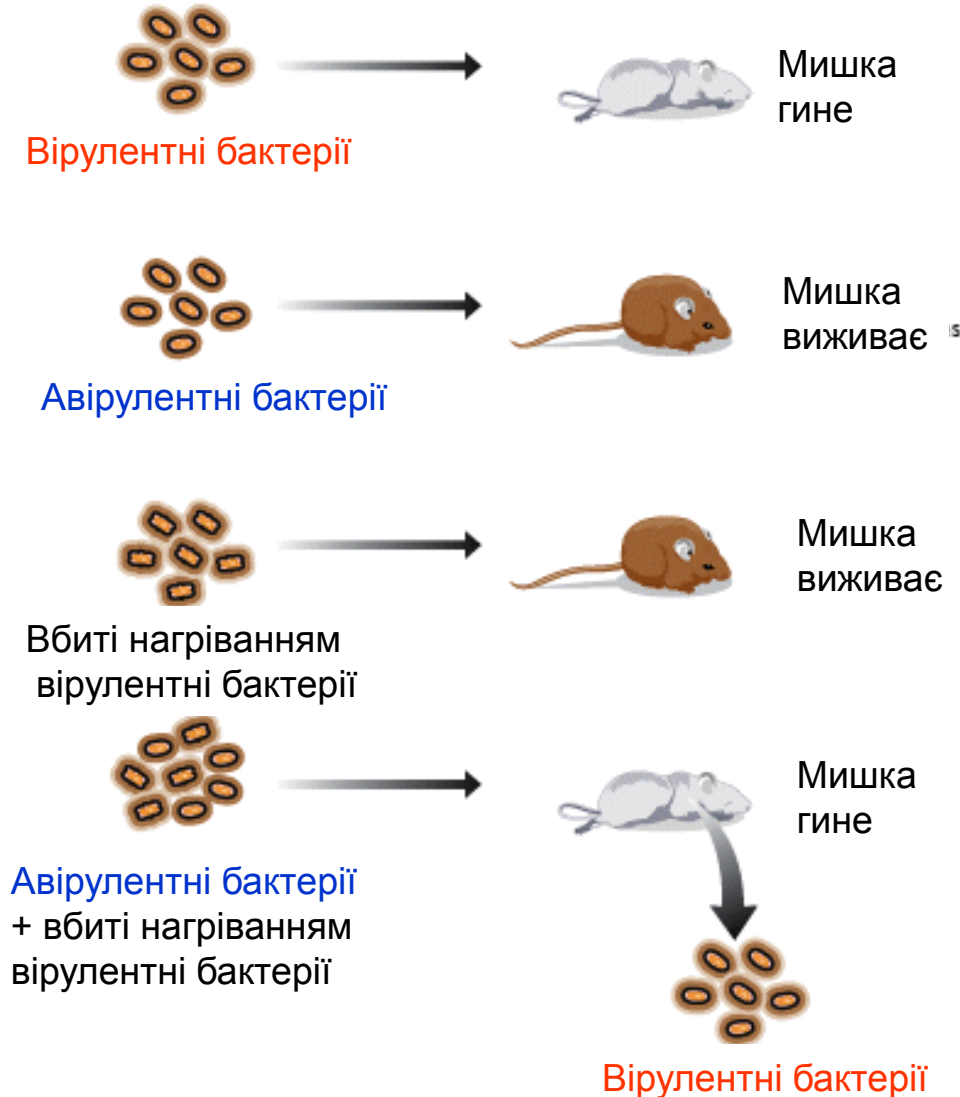
Serotype	Capsule components
II	Rhamnose, glucose, glucuronic acid
III	Glucose, glucuronic acid
VI	Galactose, glucose, mannose

**Streptococcus pneumoniae**

вірулентні  
штами

авірулентні  
штами

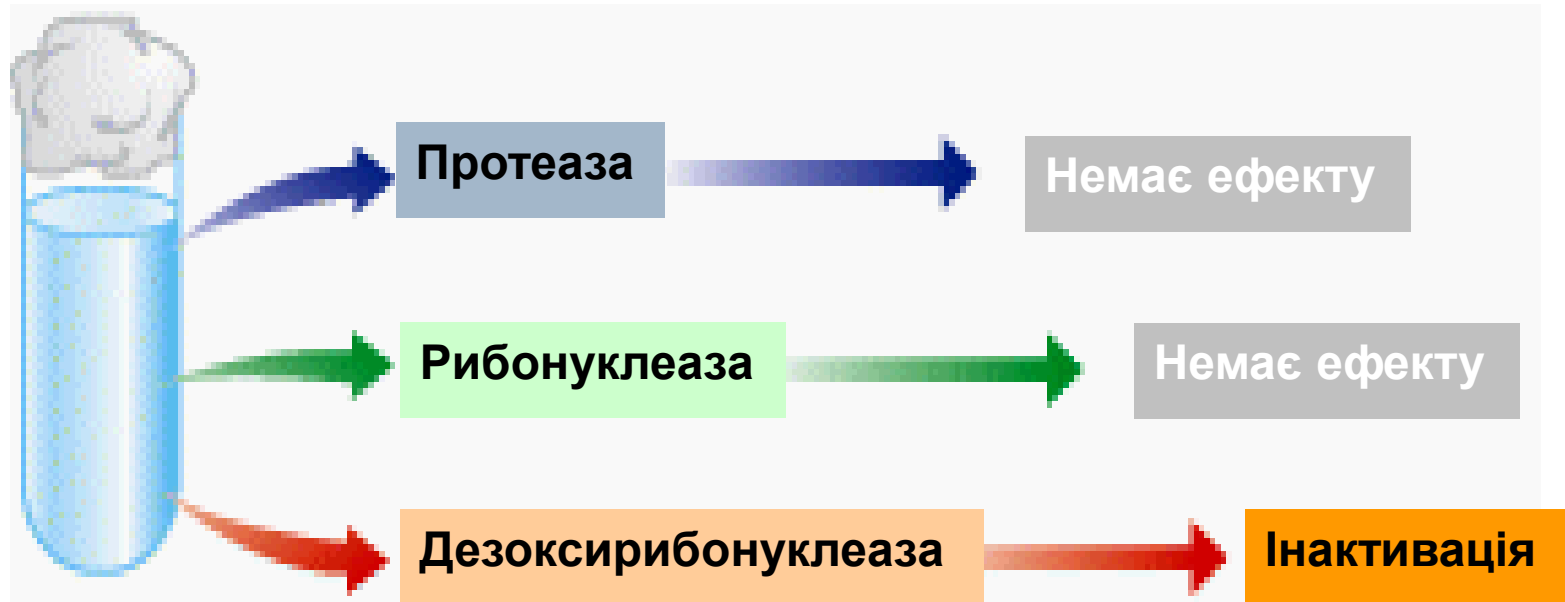
# Експерименти Ф. Гріффіта (1928 р.)



- **Висновок:** від убитих вірулентних бактерій до живих авірулентних передається **трансформуючий фактор**, що перетворює авірулентні штами у вірулентні

- **Трансформація** - це набуття одним організмом певних ознак іншого організма за рахунок захоплення частини його генетичної інформації

# Трансформуючий фактор – ДНК !



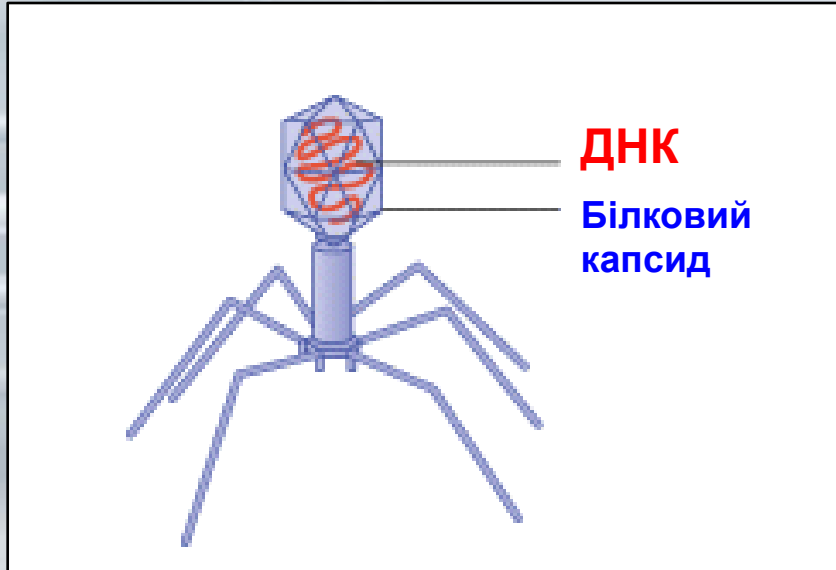
- 1944 р. – **Освальд Ейвері** й співробітники повторили експерименти Гріффіта й довели, що **трансформуючим фактором є ДНК**
- ДНК виконує головну роль у реалізації генетичної інформації





# Експеримент Альфреда Херші та Марти Чейз (1952)

Фаги (бактеріофаги) - це віруси,  
що розмножуються в бактеріях

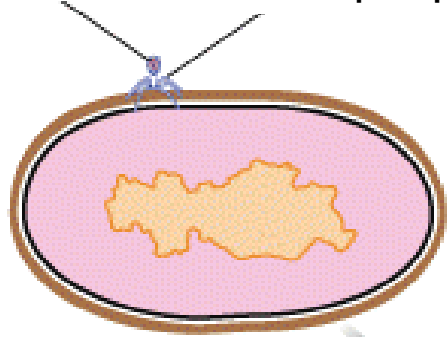


Що  
відповідає  
за розмноження фагів?

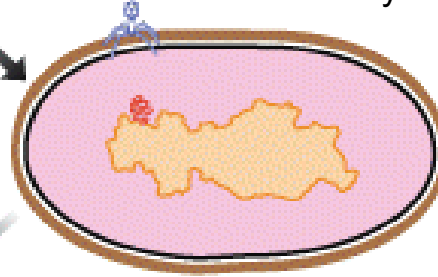


ДНК фага

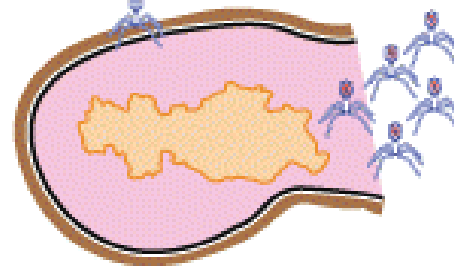
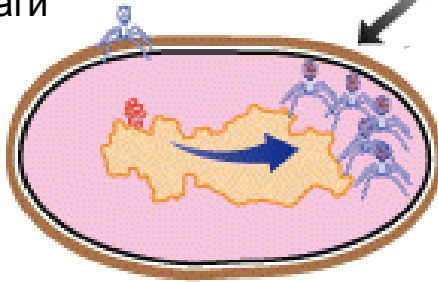
Бактеріофаг



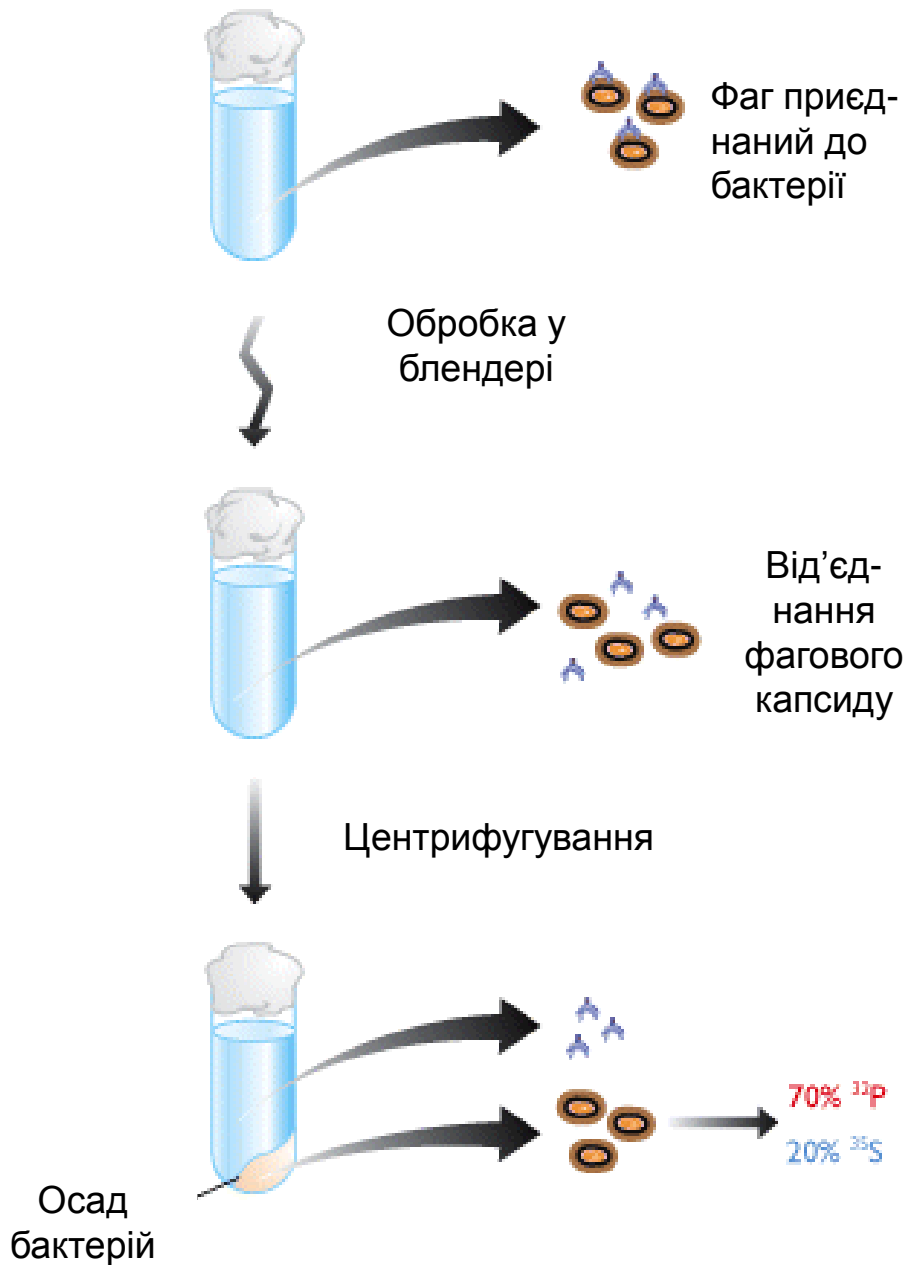
Бактеріофаг впорскує свою ДНК у бактерію



Утворюються нові фаги



Розрив бактерії з вивільненням нових фагів



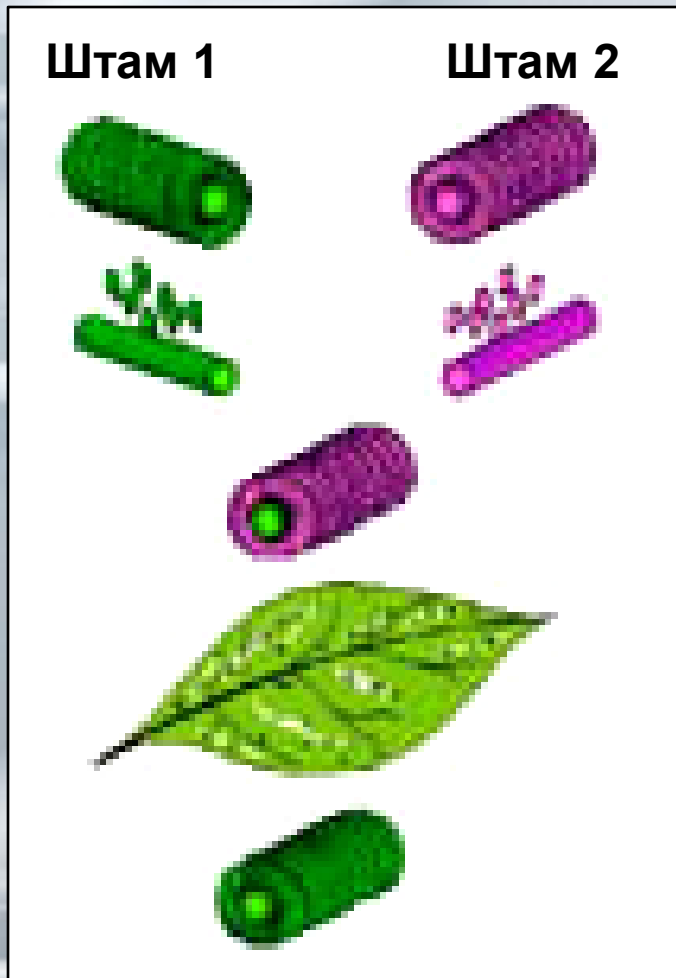
**Зміст експерименту:**  
 фаги T2, у яких **білкова оболонка** була помічена радіоактивною сіркою ( $\text{S}^{35}$ ), а **ДНК** - радіоактивним фосфором ( $\text{P}^{32}$ ), інкубували із бактеріями.  
 Потім бактерії відмивали.  
 У смивних водах не знаходили  $\text{P}^{32}$ , а в бактеріях – дуже мало  $\text{S}^{35}$ . Отже, **усередину потрапила лише ДНК**.  
 Через декілька хвилин із бактерії виходили десятки повноцінних фагів, що містили і білкову оболонку, і ДНК.

**Висновок: саме ДНК виконує генетичну функцію - несе інформацію і про створення нових копій ДНК, і про синтез фагових білків**

# Експерименти з фагами відкрили явище трансдукції

- **Трансдукція** – зміна спадкових властивостей бактеріальних клітин шляхом перенесення ДНК від одного штаму до іншого за допомогою ДНК-фага

# Досліди Хейнца Френкеля-Конрада (1957)



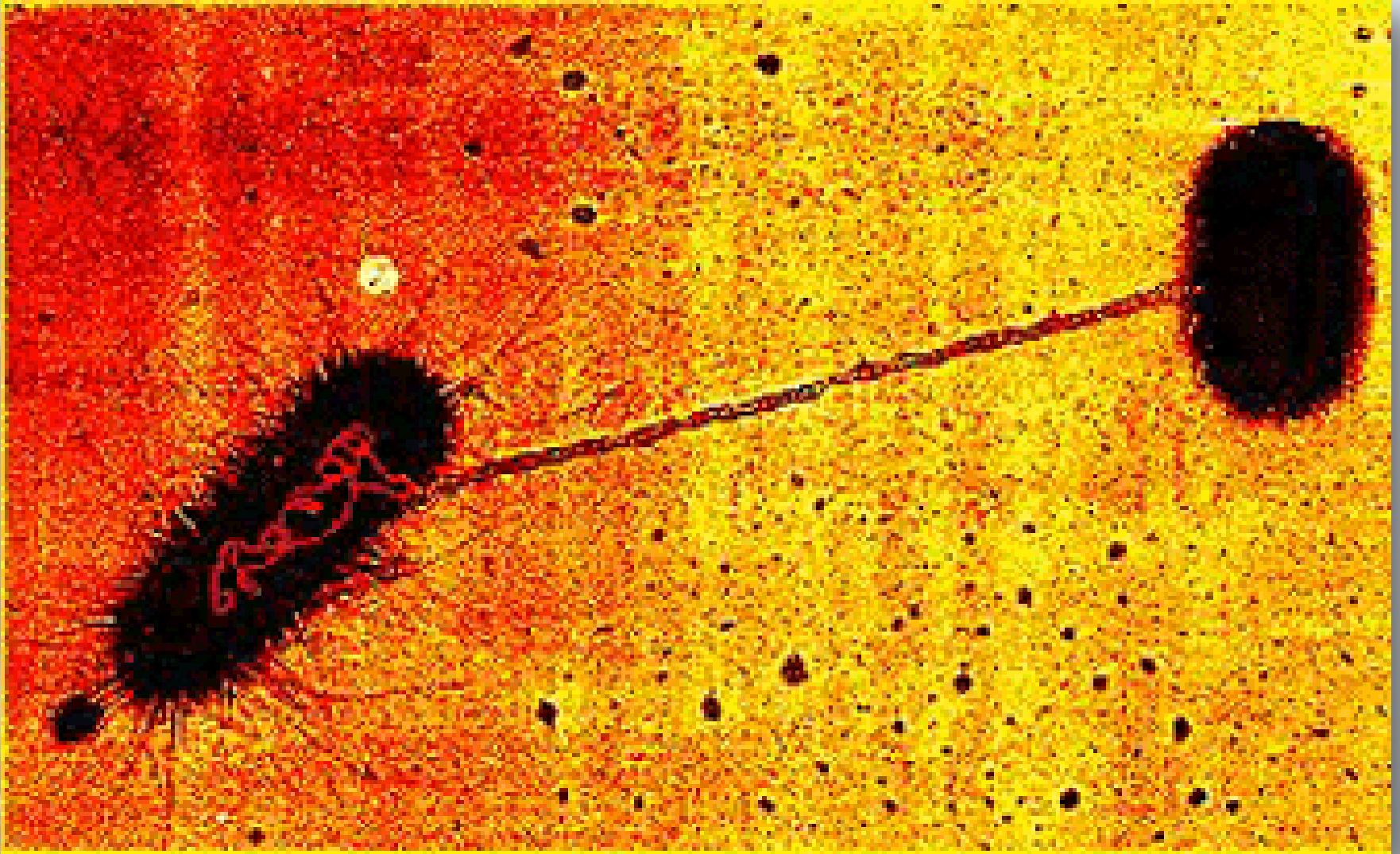
- Х. Френкель-Конрад працював із вірусом **мозаїки тютюну**. Цей вірус містить РНК, а не ДНК. Було відомо, що різні штами віруса викликають різну картину ураження листків тютюну. Після зміни білкової оболонки «перевдягнуті» віруси викликали картину ураження, характерну для того штаму, чия РНК була вкрита чужим білком

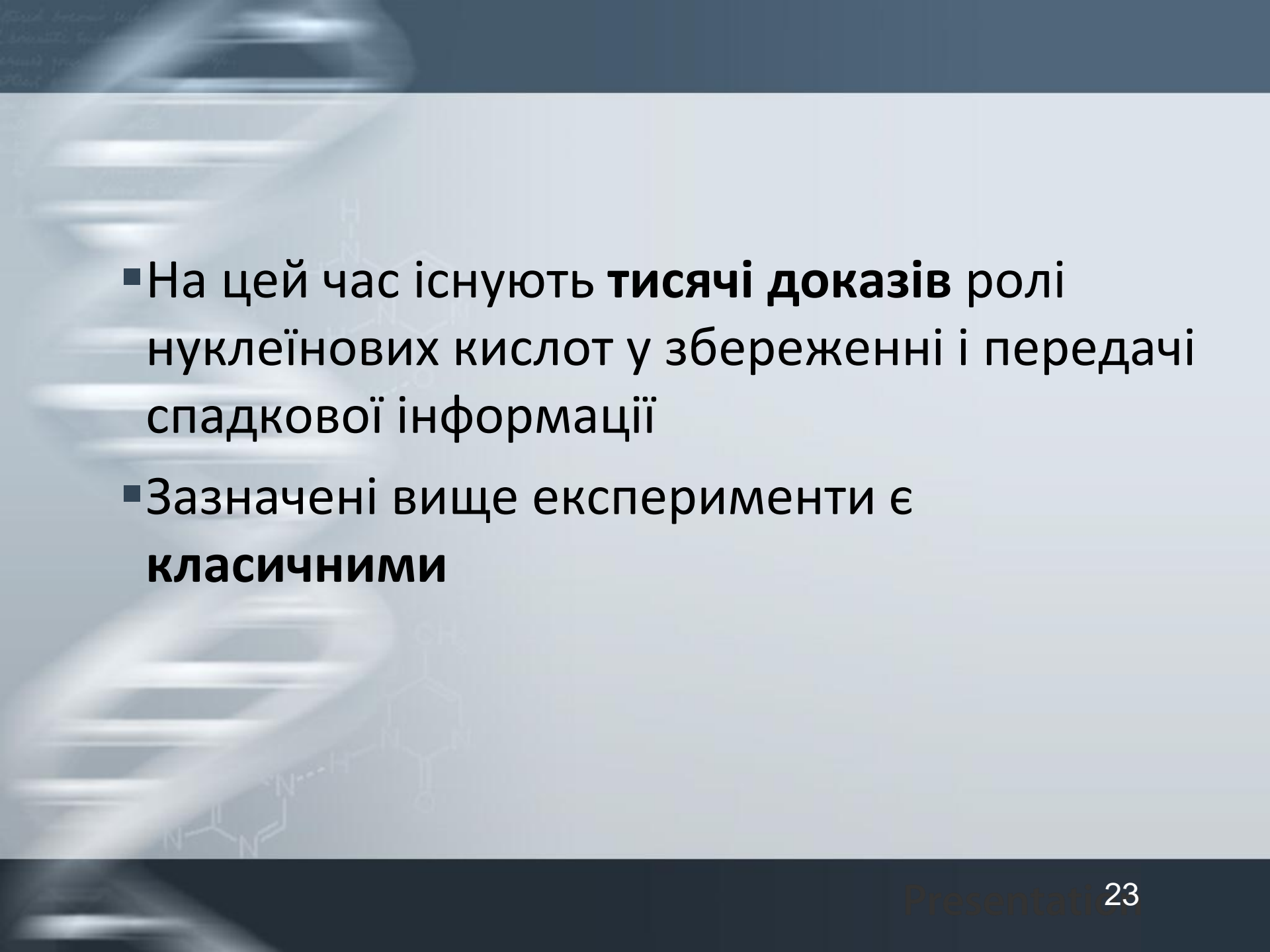
*Не лише ДНК, але й РНК може бути носієм генетичної інформації*

# Явище генетичної рекомбінації у бактерій

- **Генетична рекомбінація у бактерій при кон'югації** – передача частини ДНК із однієї клітини до іншої та зміна властивостей останньої (наприклад, стійкості до антибіотиків – **антибіотикорезистентності**)

# Явище генетичної рекомбінації у бактерій



- 
- На цей час існують **тисячі доказів** ролі нуклеїнових кислот у збереженні і передачі спадкової інформації
  - Зазначені вище експерименти є **класичними**

# Молекулярна біологія

- *Молекулярна біологія* - це наука про механізми зберігання, відтворення, передачі й реалізації генетичної інформації, про структуру і функції нерегулярних біополімерів - нуклеїнових кислот і білків
- Автор терміну **Френсис Крік**





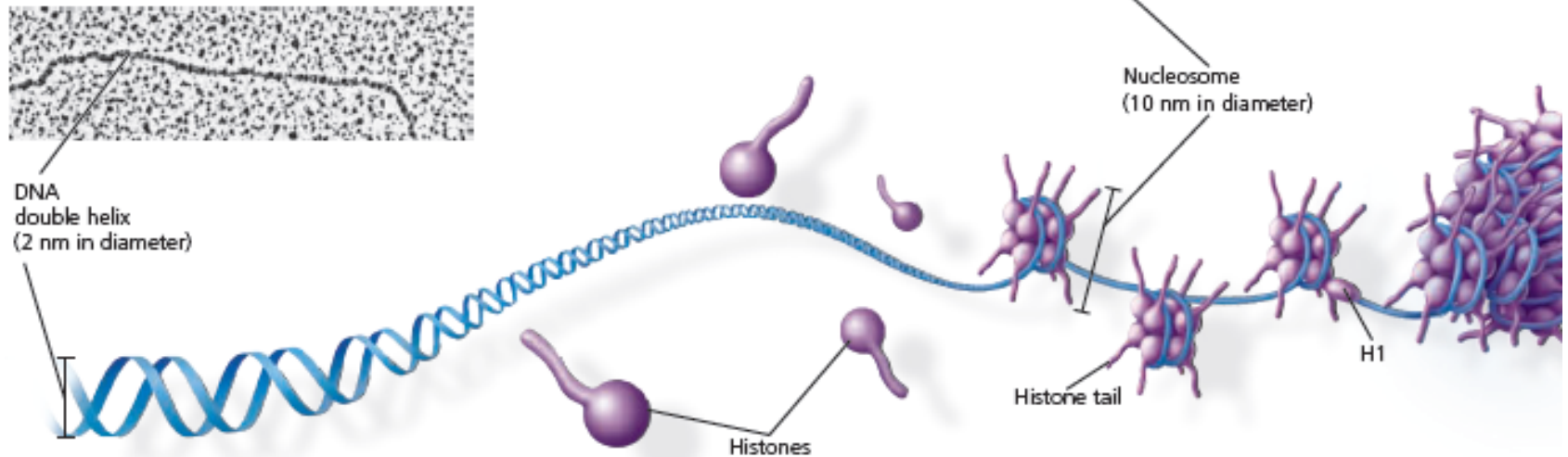
**Ервін Шредингер,**  
*What is Life? The Physical Aspect  
of the Living Cell, 1944*



# Рівні організації генетичного апарату

- Генний
- Хромосомний
- Геномний

This series of diagrams and transmission electron micrographs depicts a current model for the progressive levels of DNA coiling and folding. The illustration zooms out from a single molecule of DNA to a metaphase chromosome, which is large enough to be seen with a light microscope.



## DNA, the double helix

Shown here is a ribbon model of DNA, with each ribbon representing one of the sugar-phosphate backbones. Recall that the phosphate groups along the backbone contribute a negative charge along the outside of each strand. The TEM shows a molecule of naked (protein-free) DNA; the double helix alone is 2 nm across.

## Histones

Proteins called **histones** are responsible for the first level of DNA packing in chromatin. Although each histone is small—containing only about 100 amino acids—the total mass of histone in chromatin roughly equals the mass of DNA. More than a fifth of a histone's amino acids are positively charged (lysine or arginine) and therefore bind tightly to the negatively charged DNA.

Four types of histones are most common in chromatin: H2A, H2B, H3, and H4. The histones are very similar among eukaryotes; for example, all but two of the amino acids in cow H4 are identical to those in pea H4. The apparent conservation of histone genes during evolution probably reflects the important role of histones in organizing DNA within cells.

These four types of histones are critical to the next level of DNA packing. (A fifth type of histone, called H1, is involved in a further stage of packing.)

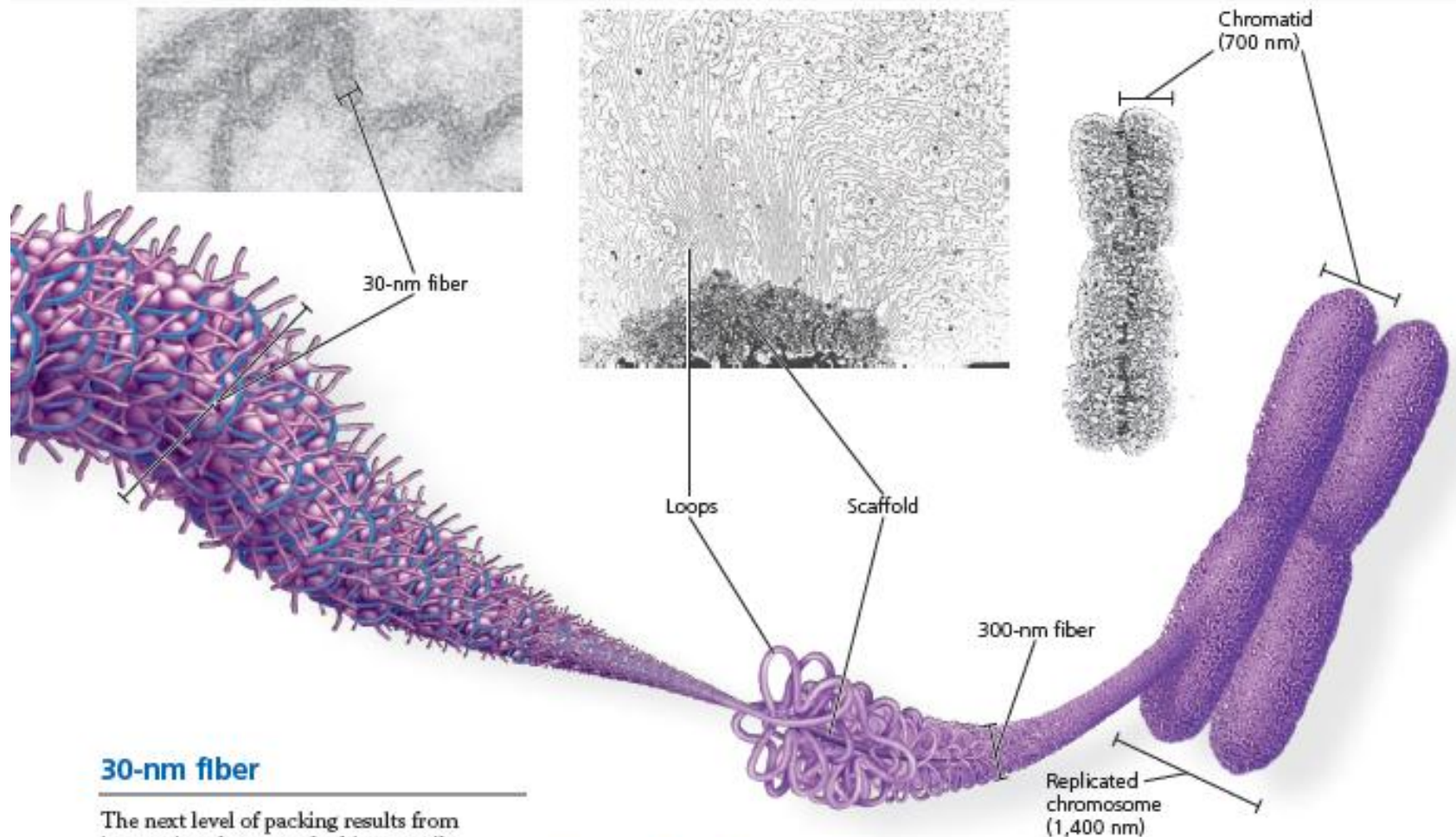
## Nucleosomes, or “beads on a string” (10-nm fiber)

In electron micrographs, unfolded chromatin is 10 nm in diameter (the *10-nm fiber*). Such chromatin resembles beads on a string (see the TEM). Each “bead” is a **nucleosome**, the basic unit of DNA packing; the “string” between beads is called *linker DNA*.

A nucleosome consists of DNA wound twice around a protein core of eight histones, two each of the main histone types (H2A, H2B, H3, and H4). The amino end (N-terminus) of each histone (the *histone tail*) extends outward from the nucleosome.

In the cell cycle, the histones leave the DNA only briefly during DNA replication. Generally, they do the same during transcription, another process that requires access to the DNA by the cell's molecular machinery. Nucleosomes, and in particular their histone tails, are involved in the regulation of gene expression.





### 30-nm fiber

The next level of packing results from interactions between the histone tails of one nucleosome and the linker DNA and nucleosomes on either side. The fifth histone, H1, is involved at this level. These interactions cause the extended 10-nm fiber to coil or fold, forming a chromatin fiber roughly 30 nm in thickness, the *30-nm fiber*. Although the 30-nm fiber is quite prevalent in the interphase nucleus, the packing arrangement of nucleosomes in this form of chromatin is still a matter of some debate.

### Looped domains (300-nm fiber)

The 30-nm fiber, in turn, forms loops called *looped domains* attached to a chromosome scaffold composed of proteins, thus making up a *300-nm fiber*. The scaffold is rich in one type of topoisomerase, and H1 molecules also appear to be present.

### Metaphase chromosome

In a mitotic chromosome, the looped domains themselves coil and fold in a manner not yet fully understood, further compacting all the chromatin to produce the characteristic metaphase chromosome (also shown in the micrograph above). The width of one chromatid is 700 nm. Particular genes always end up located at the same places in metaphase chromosomes, indicating that the packing steps are highly specific and precise.

# Визначення поняття «ген»

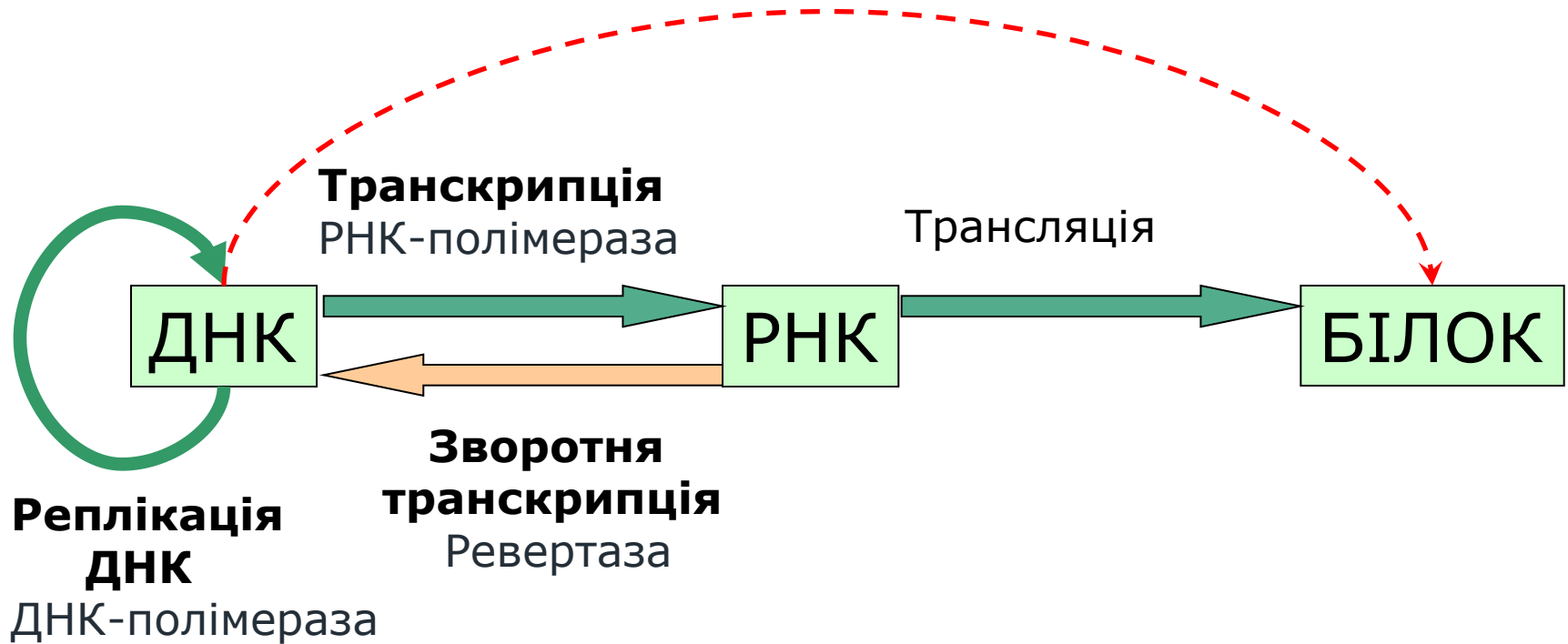
- **Ген** (грец. *генос – рід, походження*) – це елементарна функціональна одиниця спадковості, що визначає розвиток ознаки
- **Ген** – це фрагмент молекули ДНК, що кодує:
  - *структуру білка,*
  - *pРНК*
  - *або тРНК*

Успадкування ознак у ряду поколінь  
забезпечується **передачею генів**

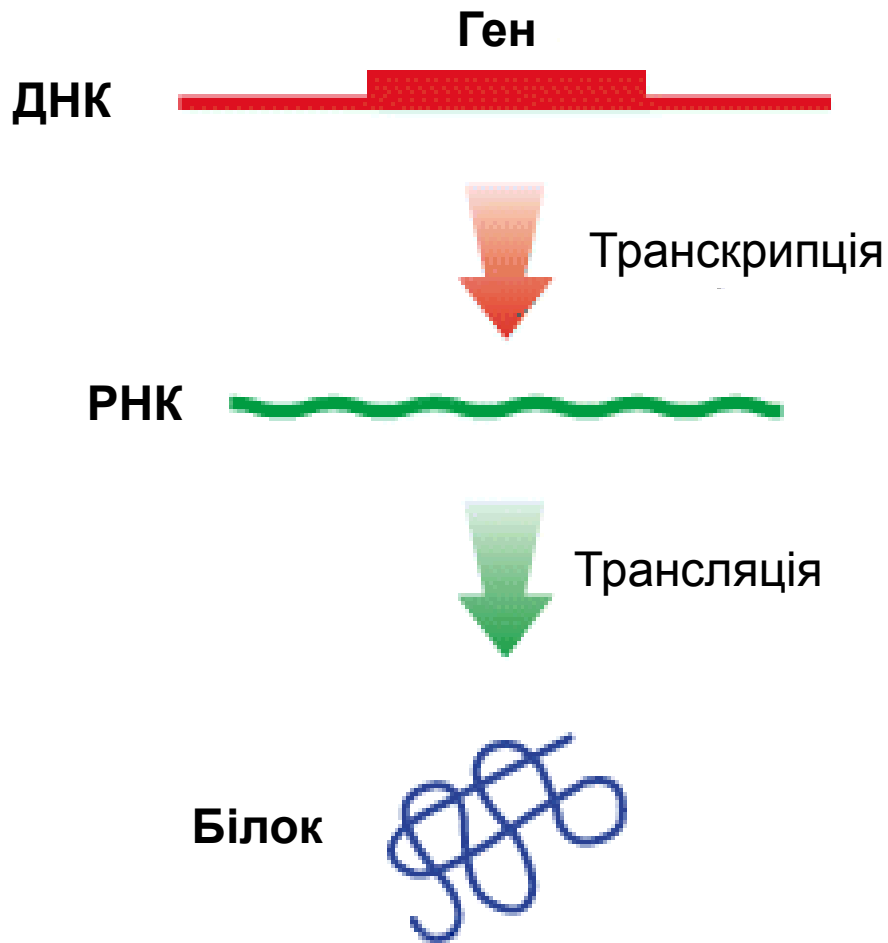
# Схема реалізації генетичної інформації



# Центральна догма молекулярної біології (Ф.Крік, 1958)



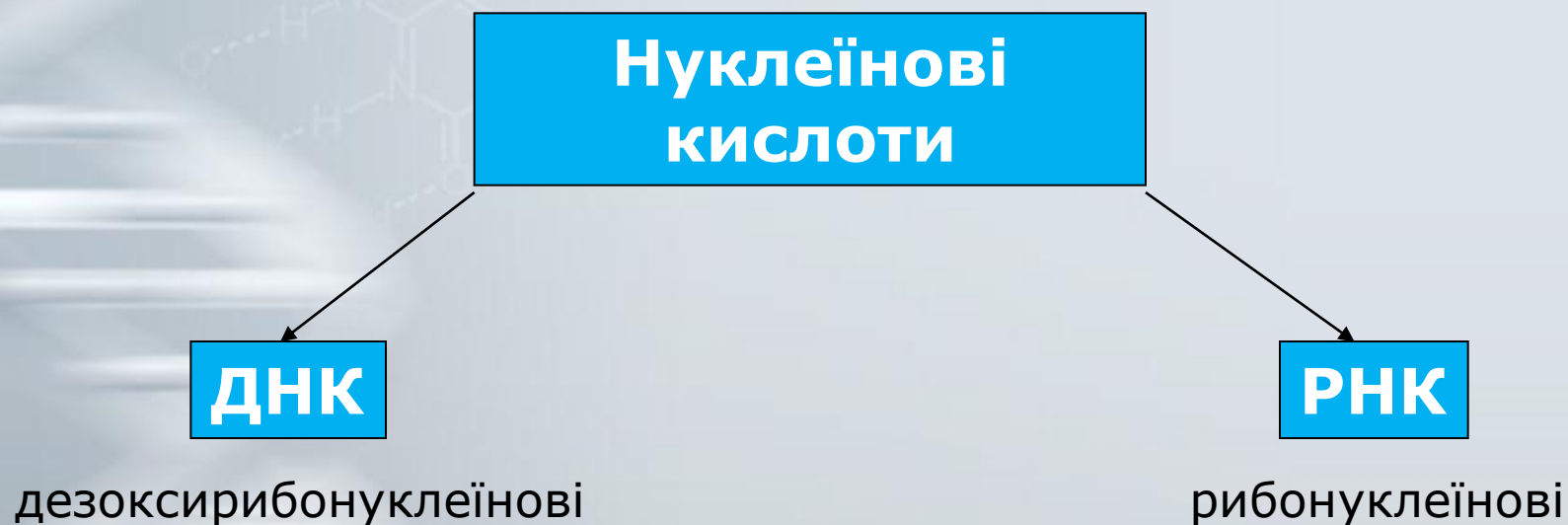
Білок – реціпієнт генетичної інформації



Властивості кожного **білка** визначаються його **амінокислотним складом**, закодованим **послідовністю нуклеотидів ДНК**

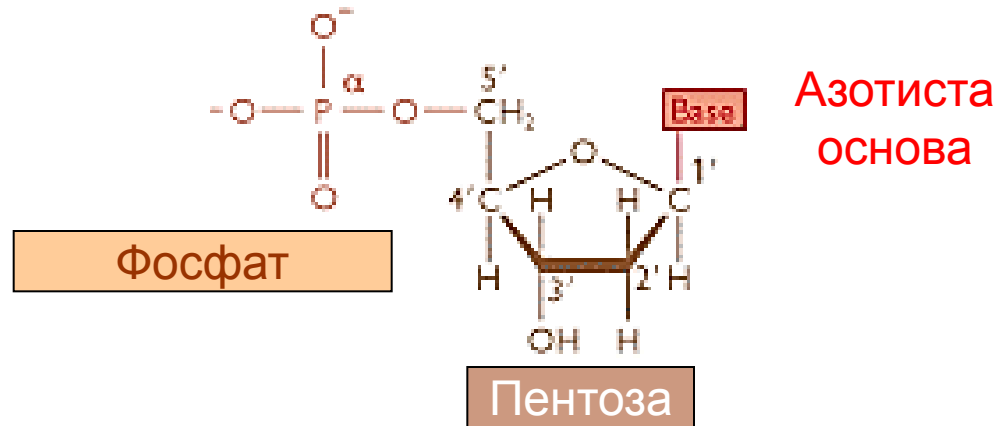


# Хімічний склад і будова нуклеїнових кислот



***Нуклеїнові кислоти – це високомолекулярні біополімери, мономерами яких є нуклеотиди***

**НУКЛЕОТИД = Азотиста основа + пентоза + фосфат**



**ДНК**

**Азотисті основи**  
**Аденін (A), Гуанін (G),  
Цитозин (C), Тимін (T)**

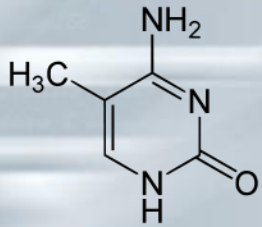
**Пентоза**  
**Дезоксирибоза**

**РНК**

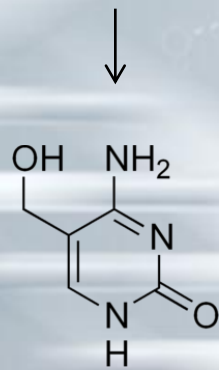
**Аденін (A), Гуанін (G),  
Цитозин (C), Урацил (U)**

**Рибоза**

# «Нові» азотисті основи ДНК



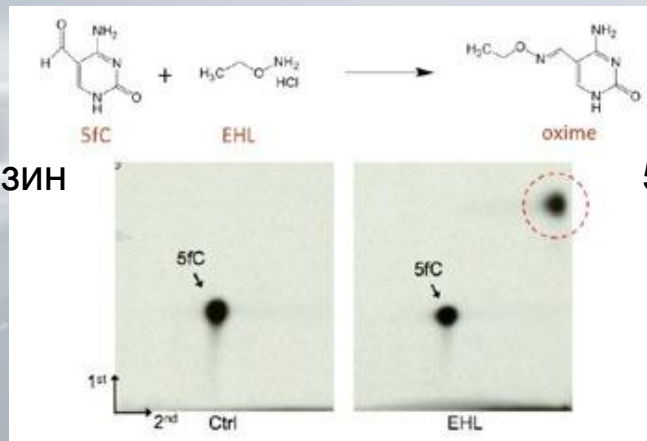
5-метилцитозин – метильована форма цитозину



5-гідроксиметилцитозин

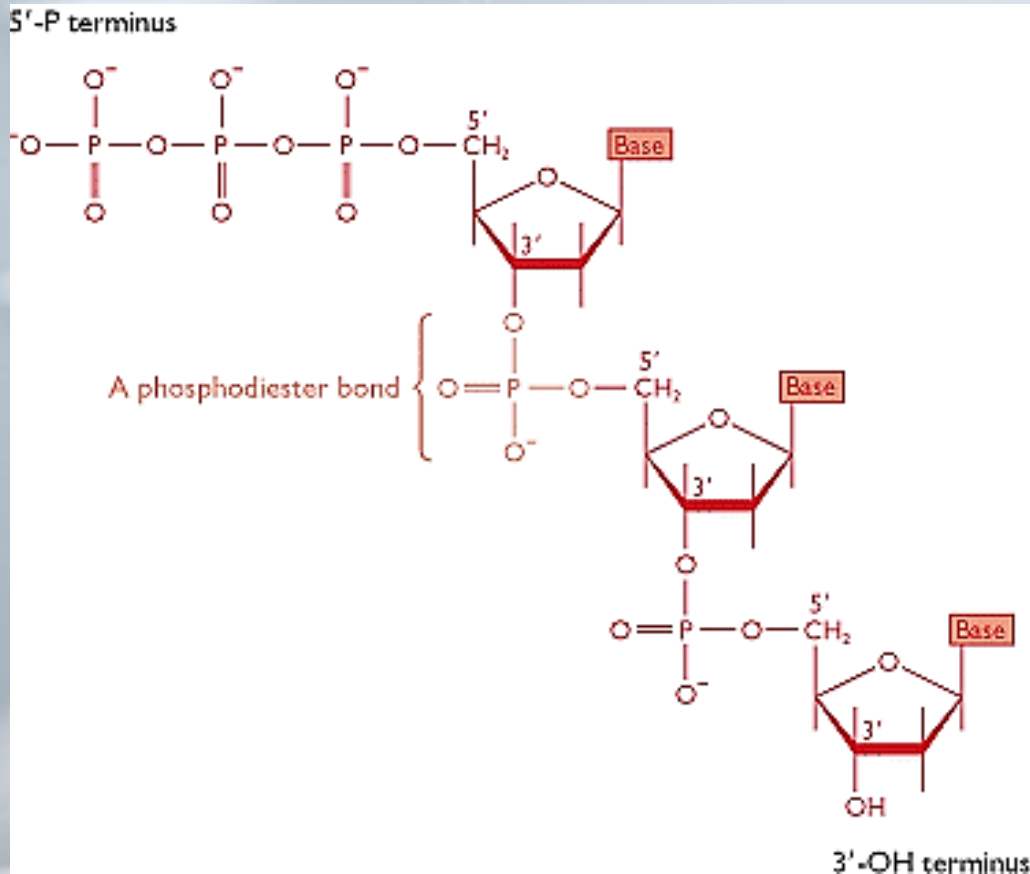


5-формілцитозин



- Беруть участь в епігенетичній регуляції експресії генів шляхом метилювання-деметилювання азотистих основ

# ДНК і РНК - полінуклеотиди



- Нуклеотиди в ланцюгах сполучаються **фосфодієфірними зв'язками**

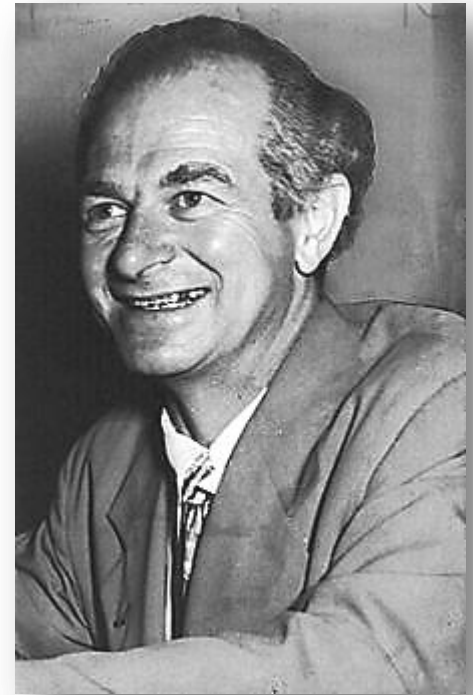
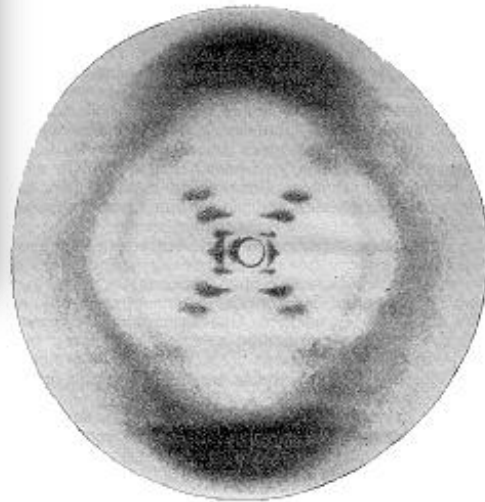
# Відкриття подвійної спіралі ДНК

- 7 березня 1953 року **Джеймс Уотсон і Френсис Крік** запропонували модель **подвійної спіралі ДНК**
- Відкриття базувалося на наступних даних:
  - Біофізичні дані (*про вміст води*)
  - Картина дифракції рентгенівських променів (*регулярність структури*)
  - Співвідношення азотистих основ
  - Побудування моделей молекул



**Розалінд Френклін**

Рентгенограма В-форми ДНК, отримана  
Розалінд Френклін наприкінці 1952 р.



**Лайнус Полінг**



# Правила Е. Чаргаффа

- В ДНК завжди  
 $A / T = 1; G / C = 1;$
- $(G + C) / (A + T) = K$  - коефіцієнт специфічності, є сталим для кожного виду

Клітини людини

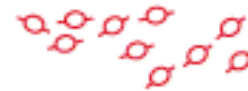
Escherichia coli  
bacteria



Очистка ДНК



Помірний кислотний вплив розриває фосфодієфірні зв'язки



Хроматографія для кількісного визначення кожного нуклеотида

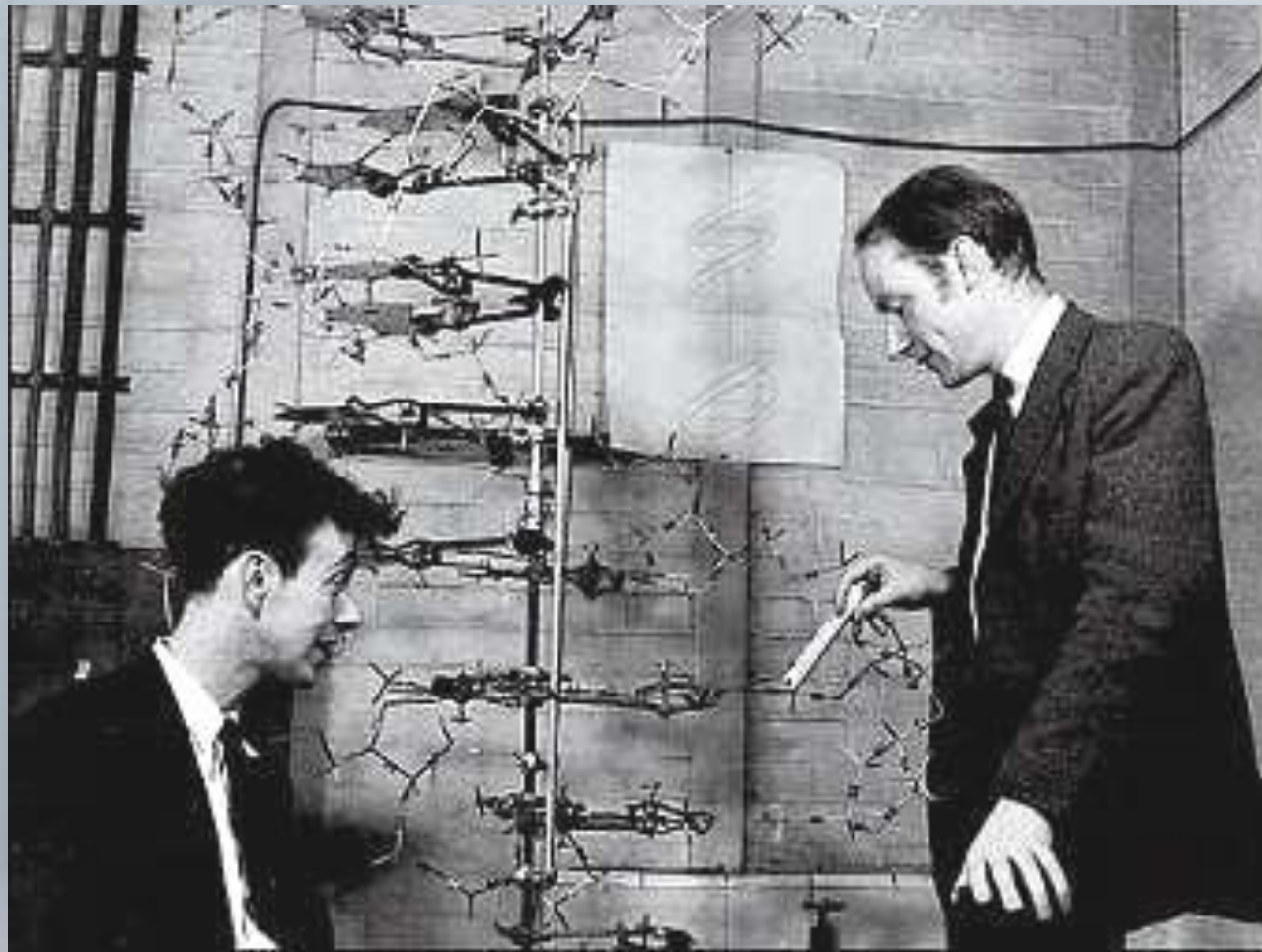
Base ratio

A : T	1.00
G : C	1.00

Base ratio

A : T	1.09
G : C	0.99

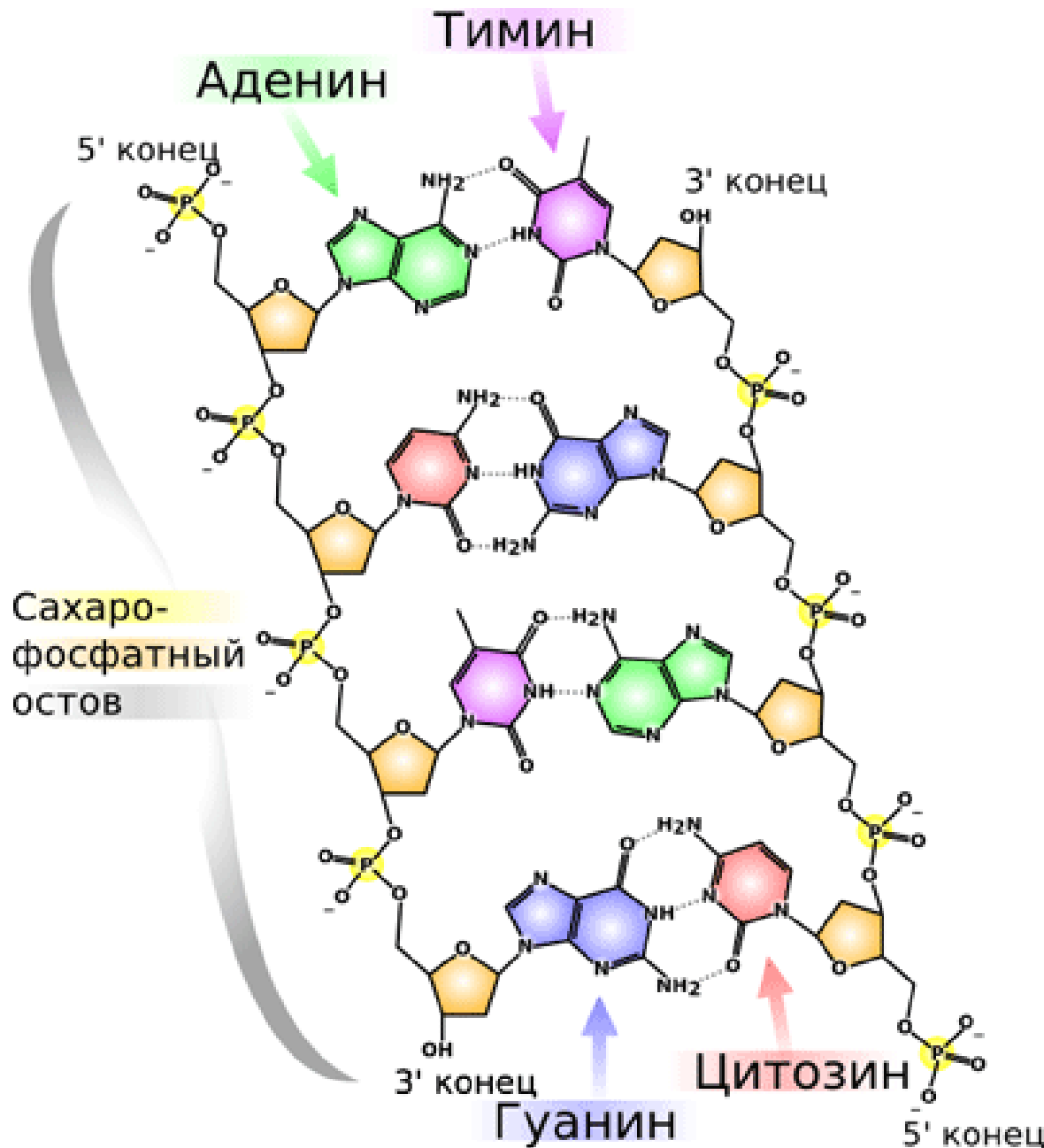




**Джеймс Уотсон і Френсис Крік біля моделі ДНК**



## Принципи будови ДНК



### 1. *Нерегулярність*

До регулярного цукрофосфатного остову приєднані азотисті основи, які нерегулярно чергуються

### 2. *Антипаралельність*

ДНК складається з двох антипаралельних полінуклеотидних ланцюгів. 3`-кінець одного ланцюга розташований напроти 5`-кінця другого – голова до хвоста (інь та янь)

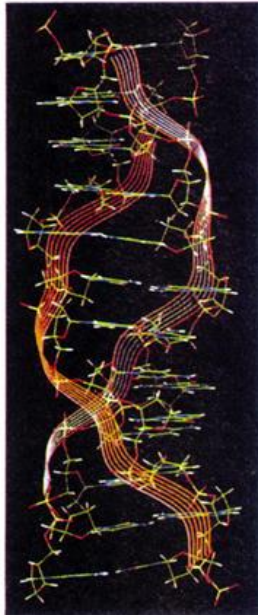
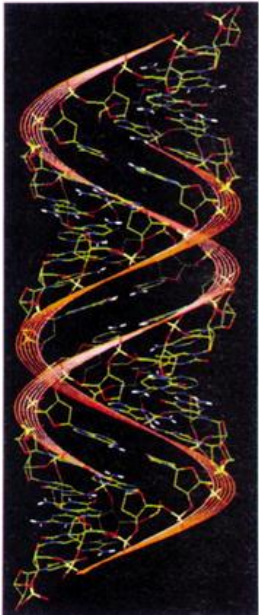
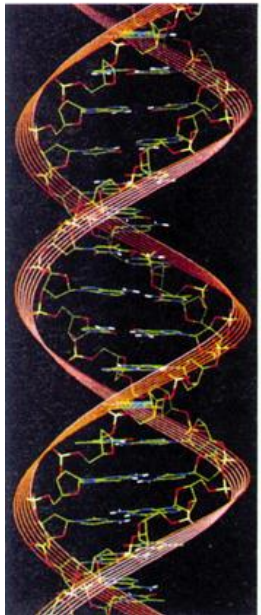
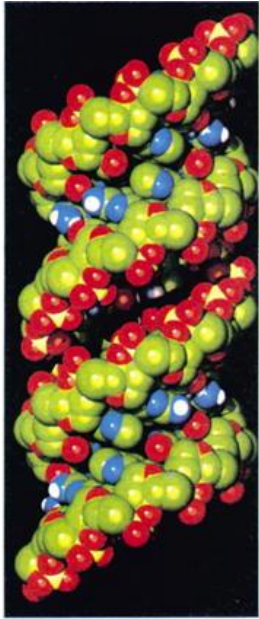
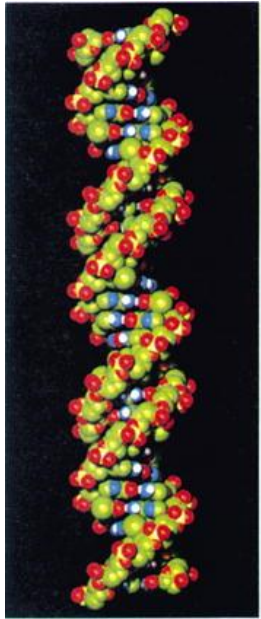
### 3. *Комплементарність*

$A=T$ ,  $G \equiv C$ .

Пурин і піримідин у парі утворюють водневі зв'язки.

### 4. *Наявність регулярної вторинної структури*

Два полінуклеотидні ланцюги утворюють **праві спіралі** із загальною віссю



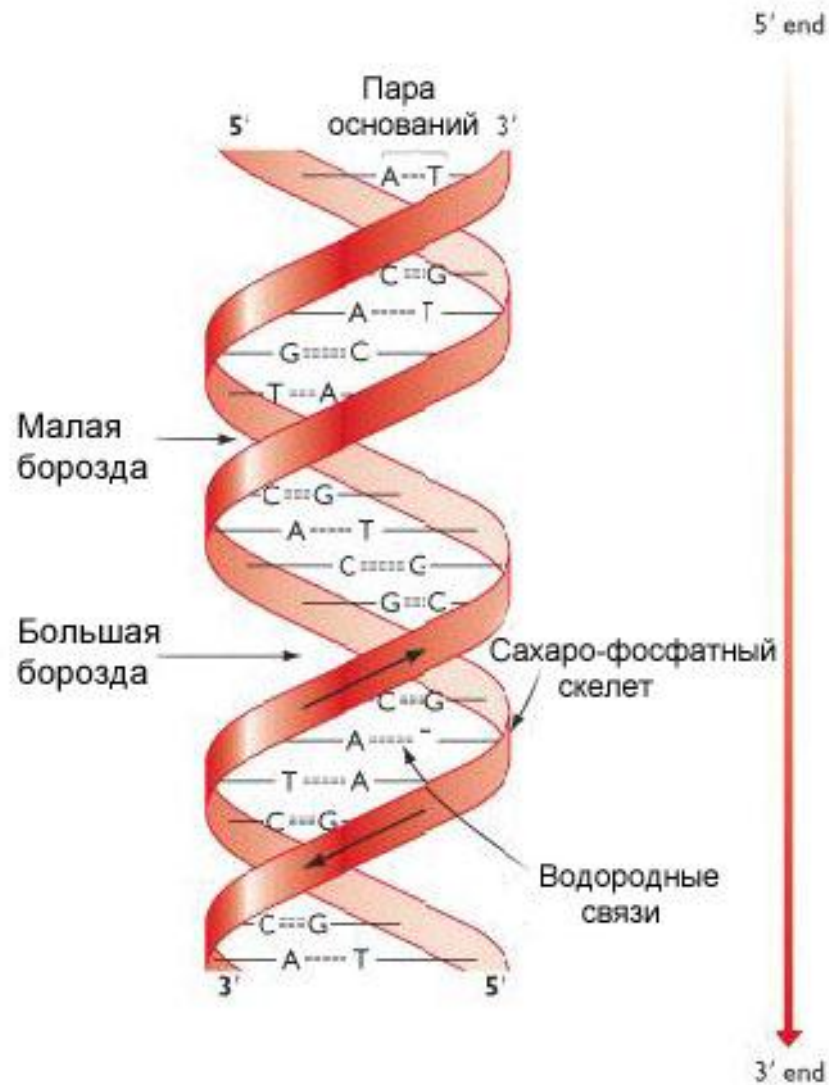
В-форма

А-форма

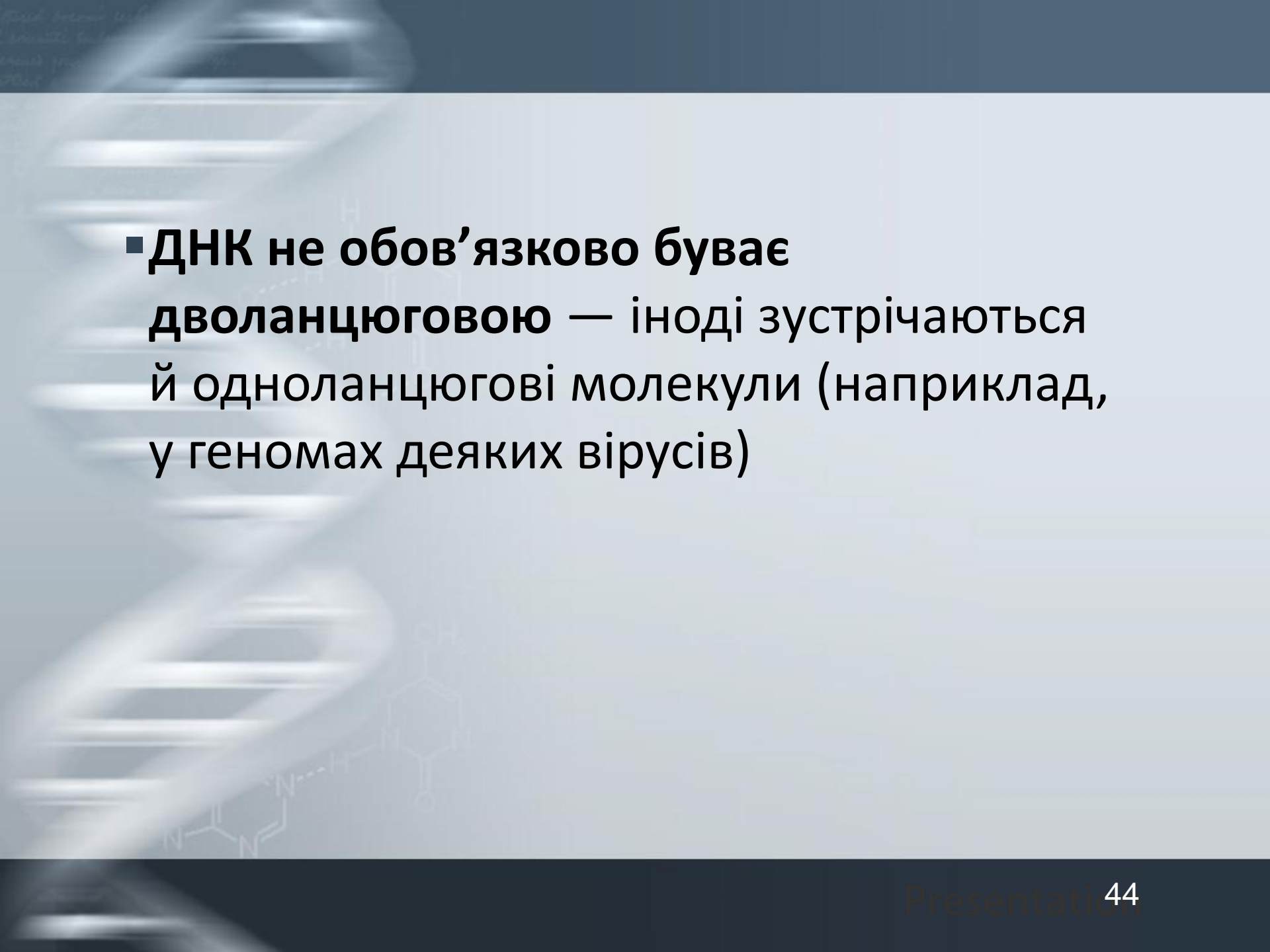
З-форма

## Подвійна спіраль структурно рухлива

- Спіраль Уотсона і Кріка – **В-форма**: діаметр спіралі 2,37 нм, висота основи 0,34 нм, крок спіралі 3,4 нм (10 пар основ). Основна форма ДНК у клітинах
- **А-форма**: 2,55 нм, 0,29 нм, 3,2 нм (11 пар основ)
- **З-форма**: єдина ліва спіраль



ДНК має **борозни:**  
**велику і малу** –  
 для посадки на них  
 білків, що працюють  
 із ДНК:  
*ДНК-полімерази,*  
*РНК-полімерази,*  
*регуляторних білків і*  
 Т.П.

- 
- **ДНК не обов'язково буває дволанцюговою** — іноді зустрічаються й одноланцюгові молекули (наприклад, у геномах деяких вірусів)

# Функції ДНК

## 1. *ДНК є носієм генетичної інформації*

Функція забезпечується фактом існування генетичного кода

## 2. *Відтворення і передача генетичної інформації у поколіннях клітин і організмів*

Функція забезпечується процесом реплікації

## 3. *Реалізація генетичної інформації у вигляді білків, а також будь-яких інших сполук*

Функція забезпечується процесами транскрипції і трансляції

# Види РНК

Види РНК	Розмір у нуклеотидах
<b>мРНК</b> - інформаційні (матричні) РНК	100-100000
<b>тРНК</b> - транспортні РНК	70-90
<b>рРНК</b> - рибосомні РНК	декілька дискретних класів від 100 до 500000
<b>гяРНК</b> – гетерогенна ядерна РНК	попередник мРНК
<b>мяРНК</b> - мала ядерна РНК	бере участь у перетворенні гяРНК в мРНК
<b>мядрРНК</b> - мала ядерцева РНК	бере участь у формуванні рибосом





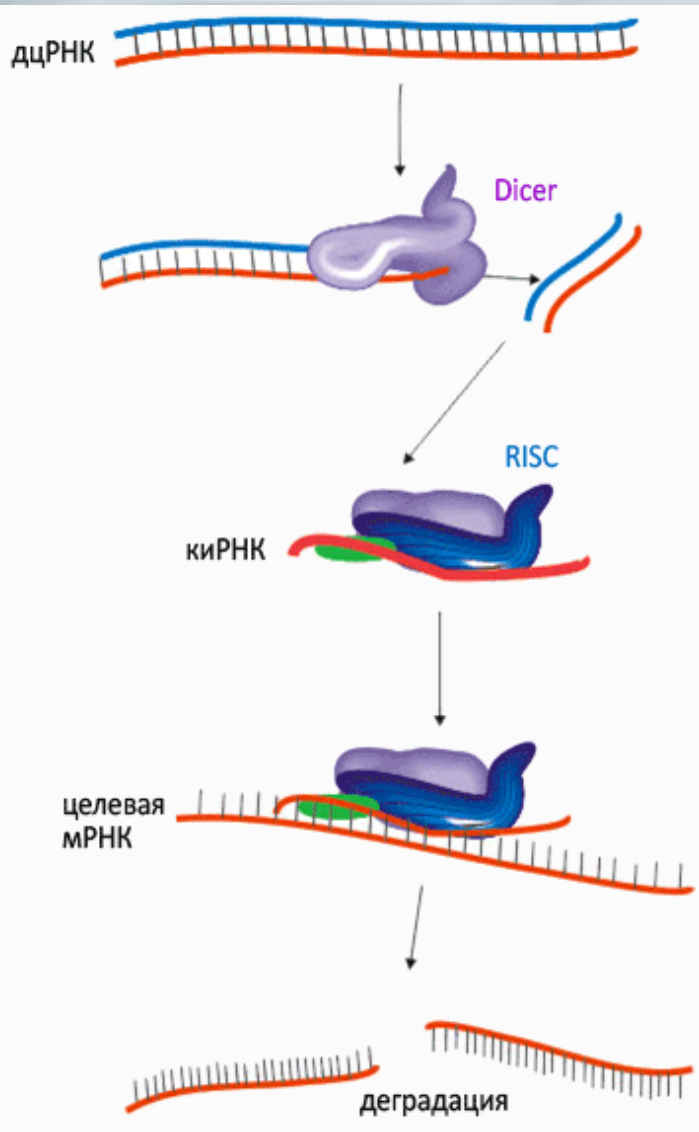
Ендрю Файр

Крейг Меллоу

- Нобелівські лауреати 2006 року в галузі медицини та фізіології “за відкриття РНК інтерференції — пригнічення генів дволанцюгової РНК»
- **Мала інтерферуюча (антисенсорна) – si-РНК**



# Механізм РНК-інтерференції



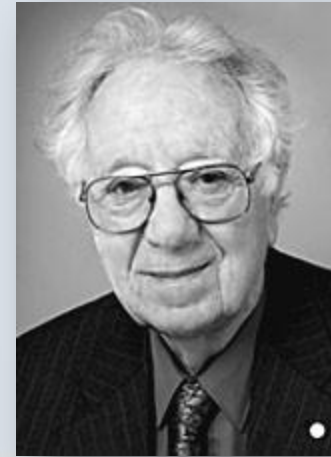
- Дволанцюгові молекули РНК (длРНК) нехарактерні для нормальних клітин, але вони є обов'язковим етапом життєвого циклу багатьох вірусів
- Спеціальний білок **Dicer**, виявивши в клітині длРНК, «розрізає» її на невеликі фрагменти
- Антисенсорний ланцюг такого фрагмента, який можна називати *короткою інтерферуючою РНК* (**кіРНК**, від siRNA — small interference RNA), зв'язується комплексом білків під назвою **RISC** (RNA-induced silencing complex), центральний елемент якого — ендонуклеаза родини **Argonaute**
- Зв'язування з кіРНК активує RISC і запускає в клітині пошук молекул ДНК і РНК, комплементарних «шаблонній» кіРНК. Доля таких молекул — бути знищеними або інактивованими комплексом RISC
- Для багатьох організмів — найпростіших, молюсків, червей, комах, рослин — цей феномен є одним із основних способів імунного захисту від інфекцій



**Mario R. Capecchi**



**Sir Martin J. Evans**



**Oliver Smithies**

- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007 was awarded jointly to Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans and Oliver Smithies *"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells"*



**Elizabeth H. Blackburn**



**Carol W. Greider**

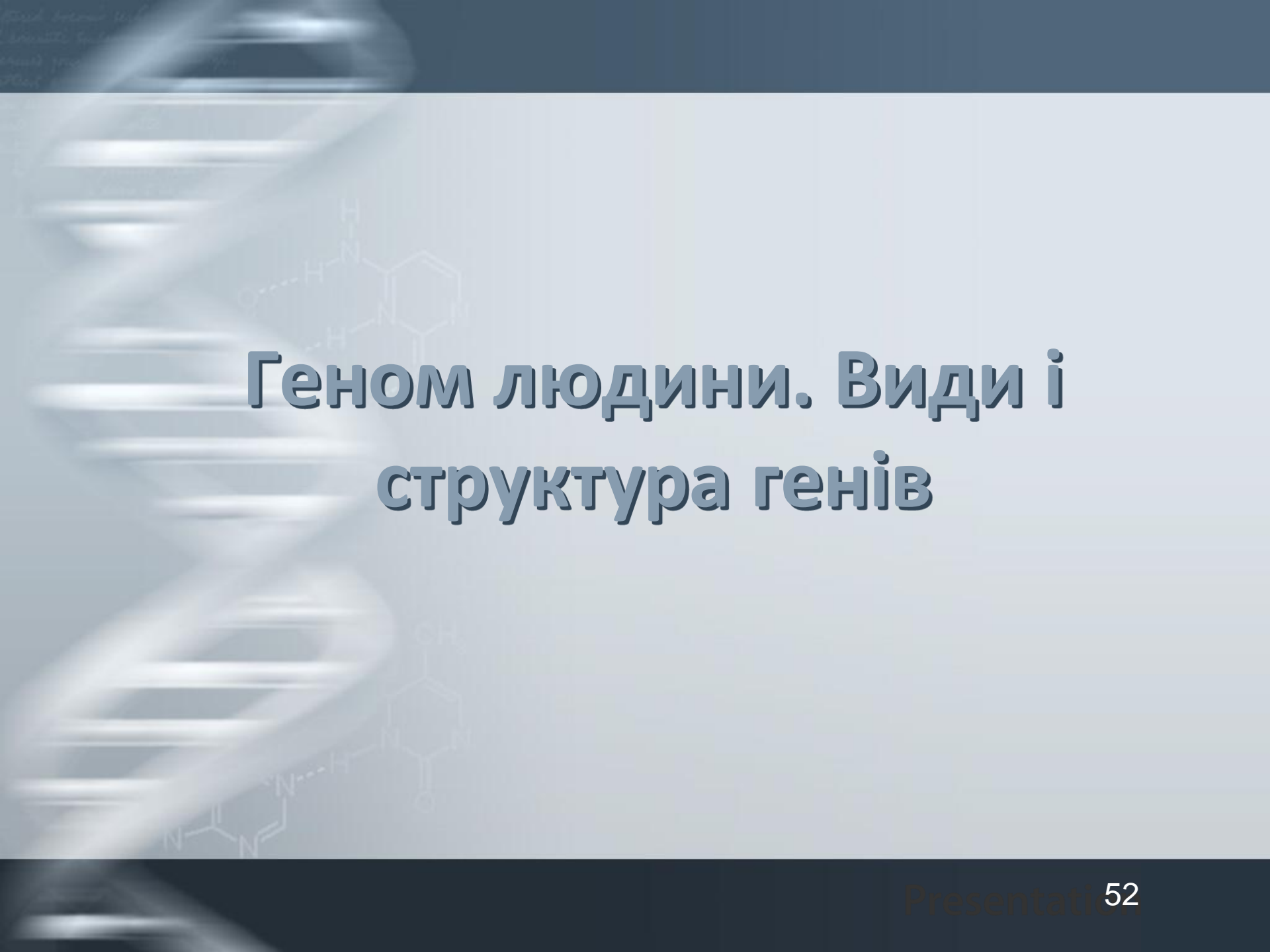


**Jack W. Szostak**

- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009 was awarded jointly to Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider and Jack W. Szostak *"for the discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase"*

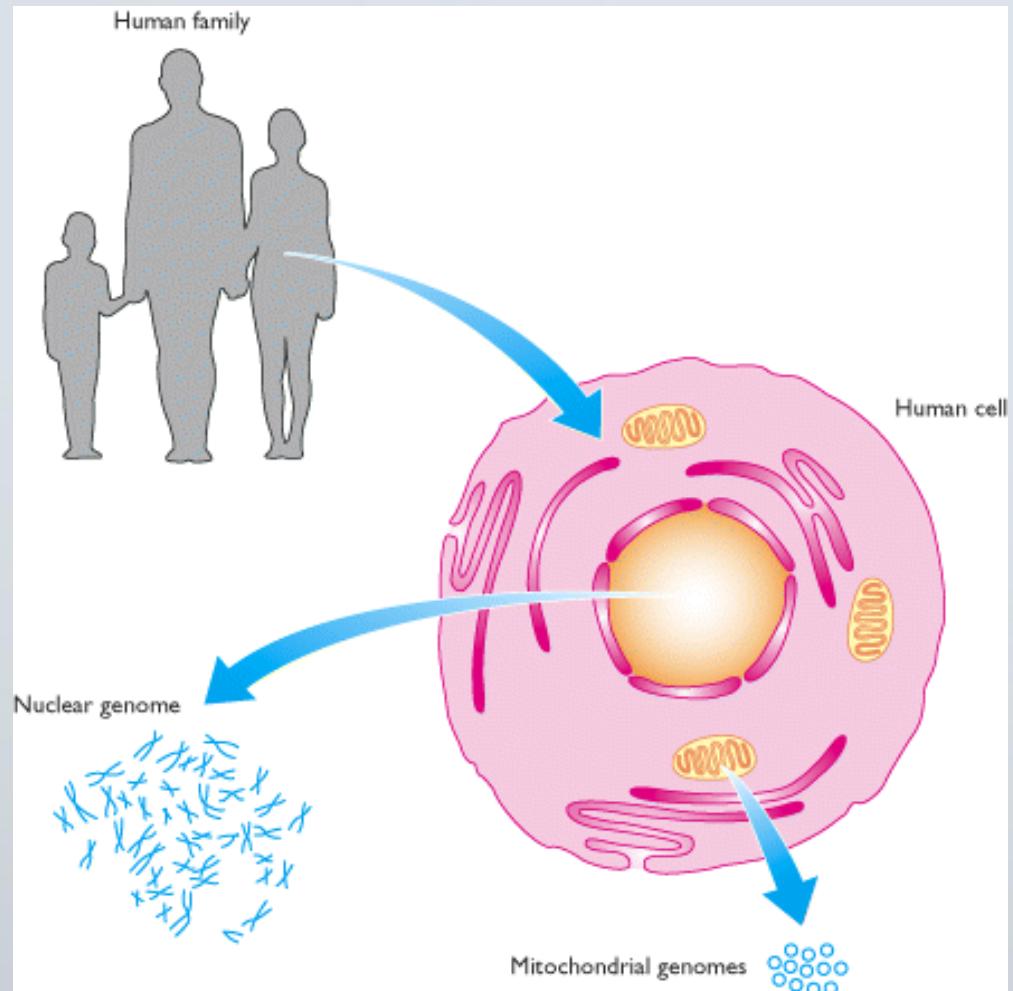
# Одиниці вимірювання довжини нуклеїнових кислот

- Одиниця вимірювання дволанцюгової молекули ДНК – **пари основ (bp)** – base pairs
  - Кілобази (Kb) =  $10^3$  bp
  - Мегабази (Mb) =  $10^6$  bp
  - Гігабази (Gb) =  $10^9$  bp
- Довжина одноланцюгової РНК вимірюється в нуклеотидах, а не в парах нуклеотидів



# Геном людини. Види і структура генів

- **Геном** – це повний генетичний склад клітини або живого організму
- Геноми вивчає **геноміка**



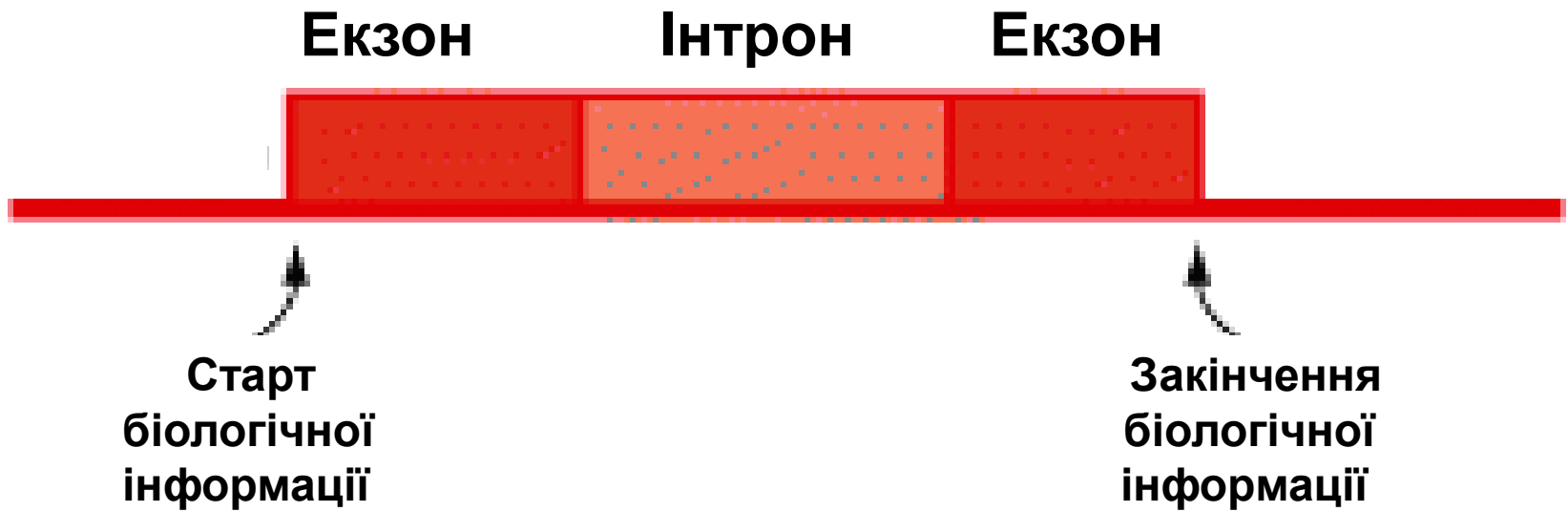


- Основна характеристика ДНК – послідовність нуклеотидів
- Проект «**Геном людини**» був розроблений у 1984 році, почав реалізовуватися в 1990 році
- Головна мета проекту:  
**визначення нуклеотидної послідовності ядерного геному людини**





- У **2001 році** було отримано чорнову послідовність генома людини
- **Установлено:**
  - У людини **біля 25 000 генів**
  - Гени включають **екзони й інтрони** (у середньому на 1 ген – 4 екзони)
  - Багато генів кодують **понад 1 білок** (у середньому 3) – результат альтернативного сплайсингу
  - У людини багато генів, **не виявлених у безхребетних** (генів антитіл, комплекса гістосумісності)



**Структура «середнього» гена людини**

- Дві будь-яких особи на **99,9 % є ідентичними** за нуклеотидними послідовностями, і лише **0,1% відмін** у послідовності забезпечують фенотипові відміни (**однонуклеотидний поліморфізм** – місця в геномі, де у однієї людини А, а у іншої G)
- Наявність в ДНК великого числа **елементів, що повторюються**

## Хромосомна ДНК

50%

Ділянки з унікальною  
послідовністю  
нуклеотидів

- **гени**

50%

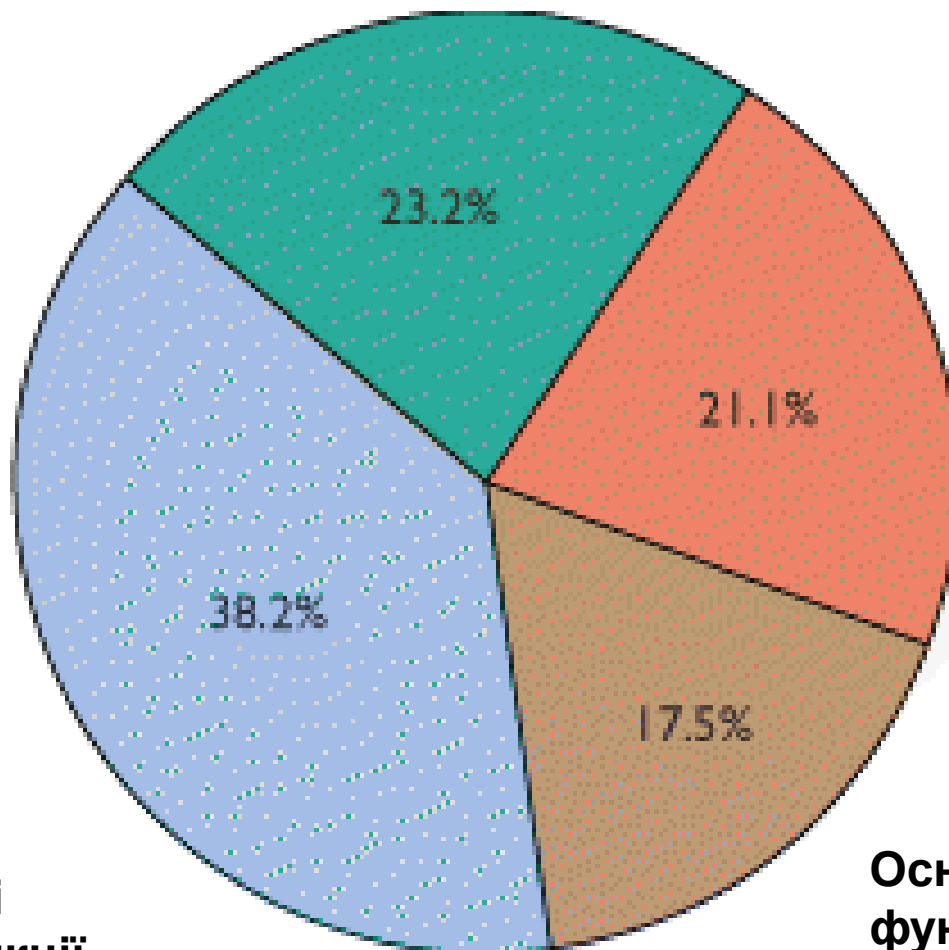
Ділянки з послідовністю  
нуклеотидів, що  
повторюються

- **мікросателіти** – короткі тандемні повтори (наприклад, САСАСАСАСА)
- **розкидані по геному послідовності, що повторюються**
  - **LINE** – довгі розкидані ядерні елементи
  - **SINE** – короткі – II –
  - **LTR – елементи** – довгі термінальні повтори
  - **ДНК-транспозони**

## Геном людини виявився складніше

- Тривалий час науковці вважали, що лише 2% генів людини визначають нашу природу, кодуючи білки, у той час як більша частина геному, названа **СМІТТЄВОЮ ДНК**, не несе жодної функції
- Нові дослідження в рамках масштабного міжнародного проекту «Енциклопедія елементів ДНК» (ENCODE) спростовують цю думку
- Учені встановили призначення майже 80% генів, більшість з яких біологічно активні

**Експресія, реплікація  
і збереження генома**



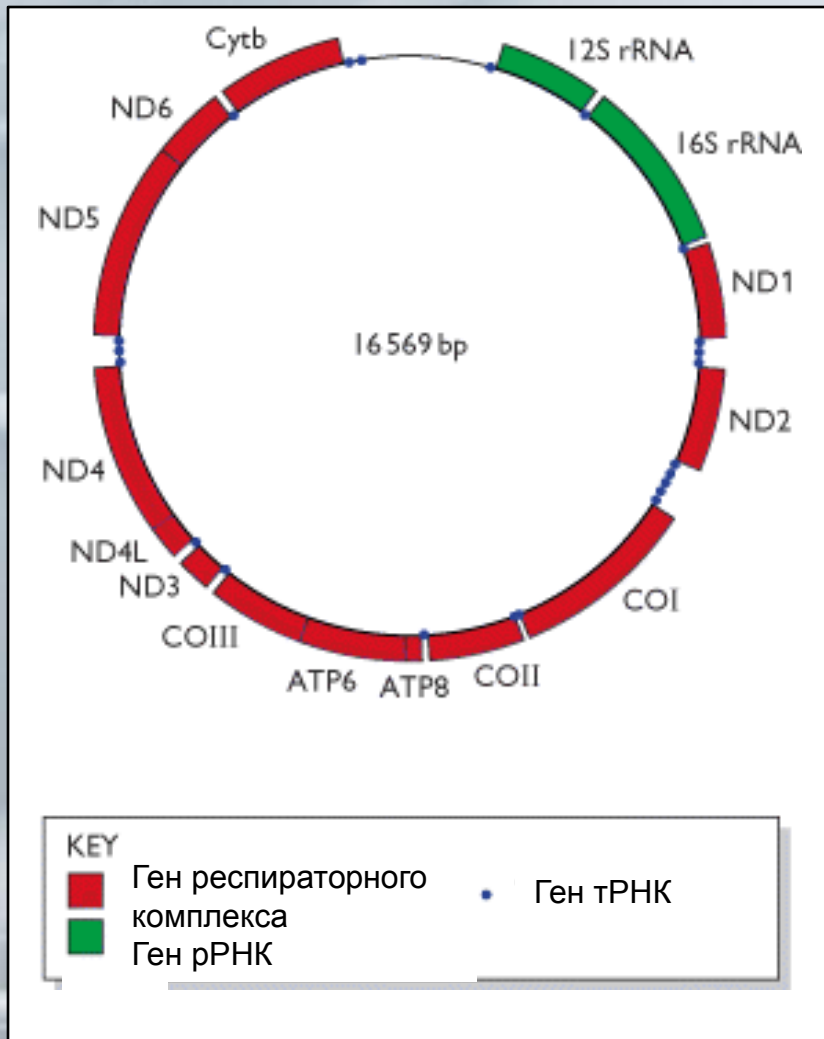
**Сигнальна  
трансдукція**

**Категорії генів  
людини**

**Інші  
функції**

**Основні біохімічні  
функції клітини**

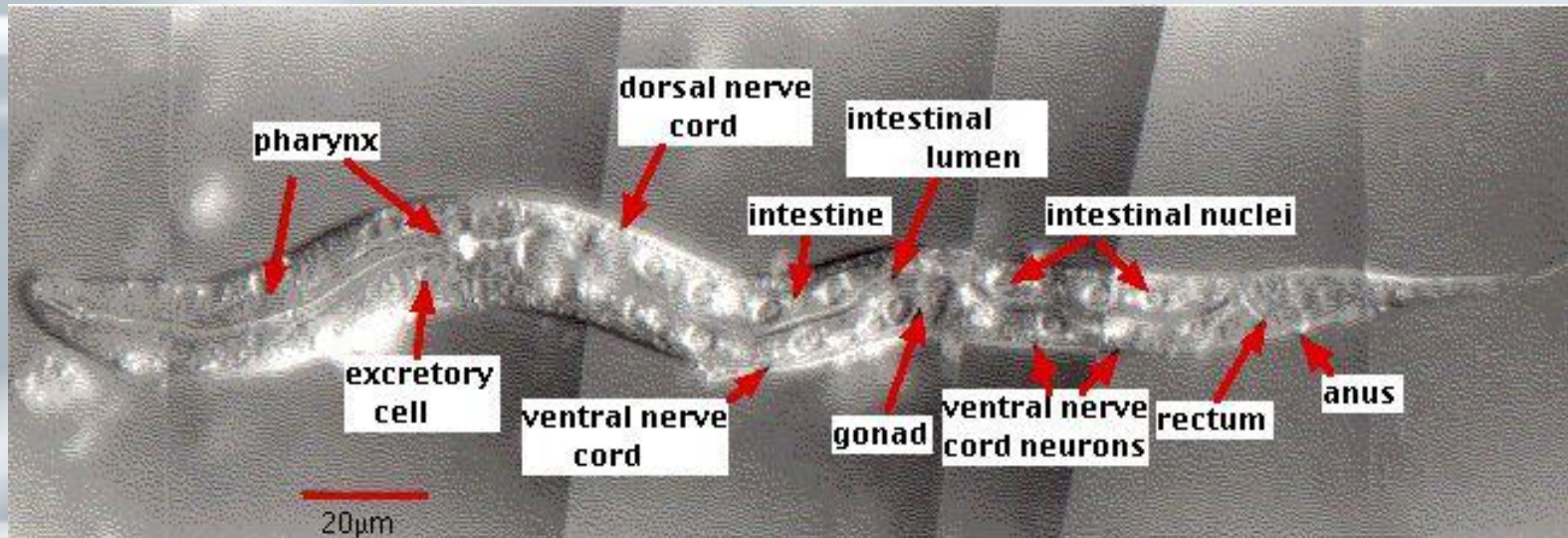
# Мітохондріальний геном людини

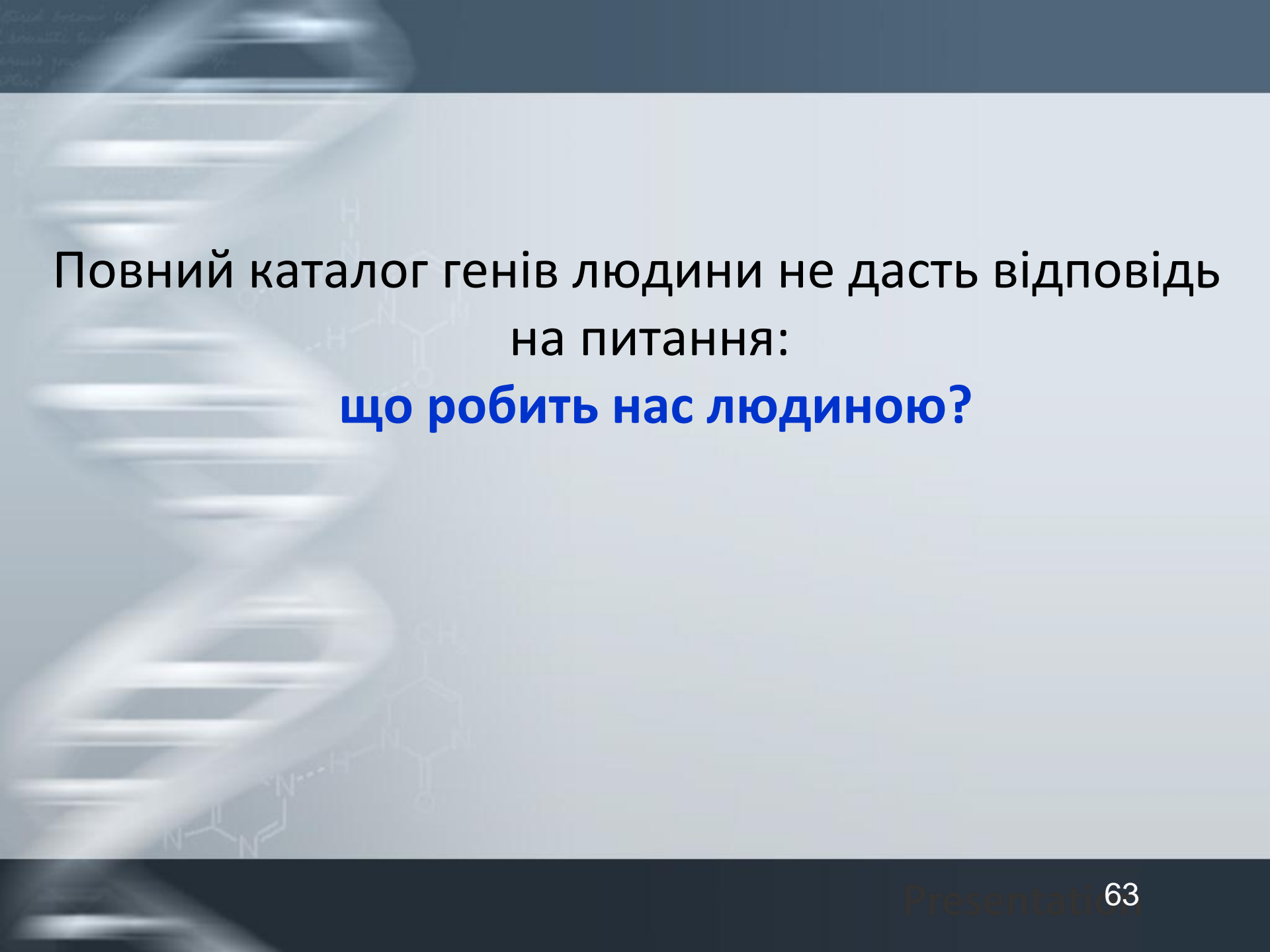


- Кожна клітина містить  $\approx$  8000 копій мітохондріальних геномів
- Мх геном містить **37 генів** (13 кодують ОВ ферменти, 24 – рРНК і тРНК)
- Повністю секвенований у 1981 році **С. Андерсоном**



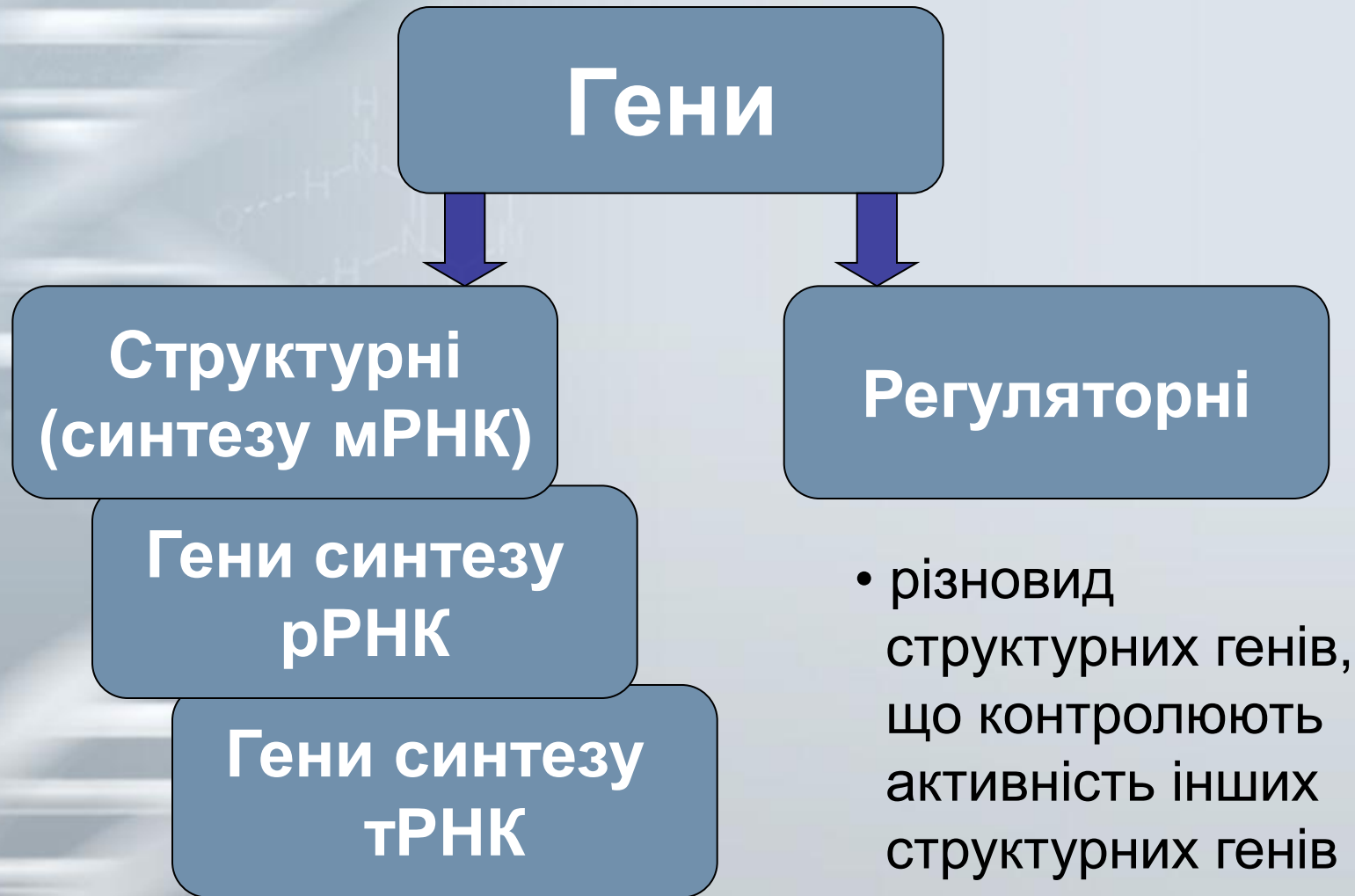
- За числом генів ми втричі складніші від плодової мушки і вдвічі складніші від мікроскопічного черв'яка *Caenorhabditis elegans*





Повний каталог генів людини не дасть відповідь  
на питання:  
**що робить нас людиною?**

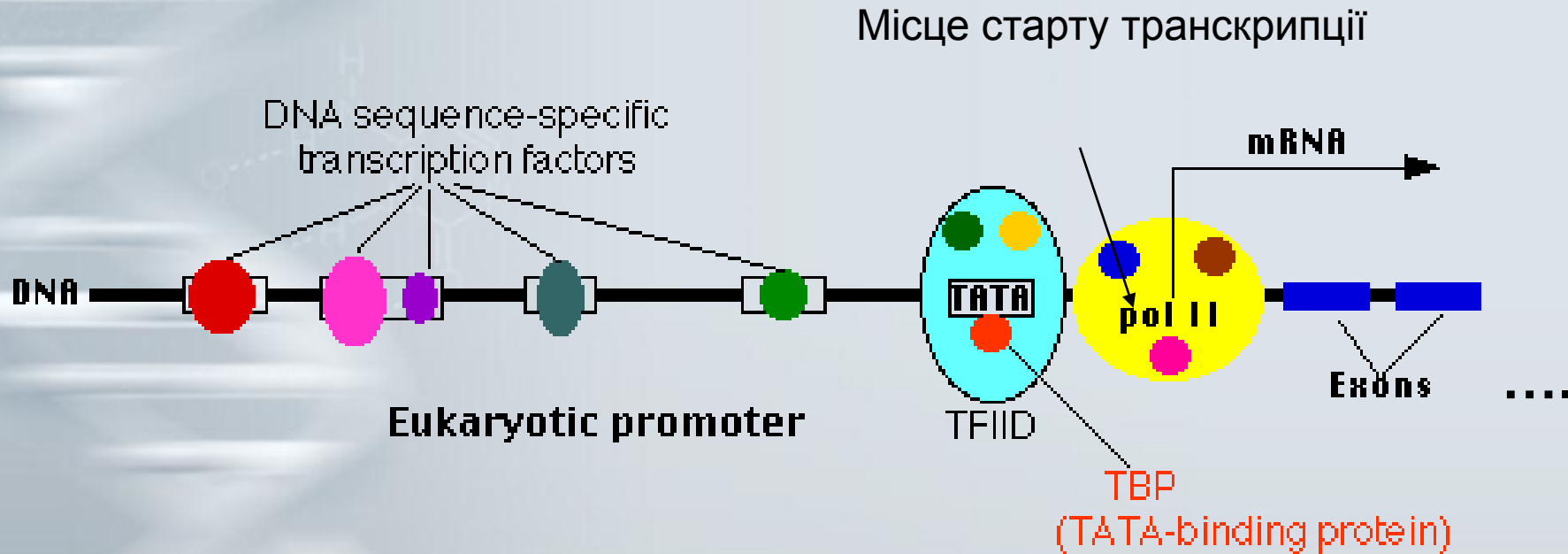
# Види і структура генів



# Гени «домашнього господарства» і гени «розкоші»

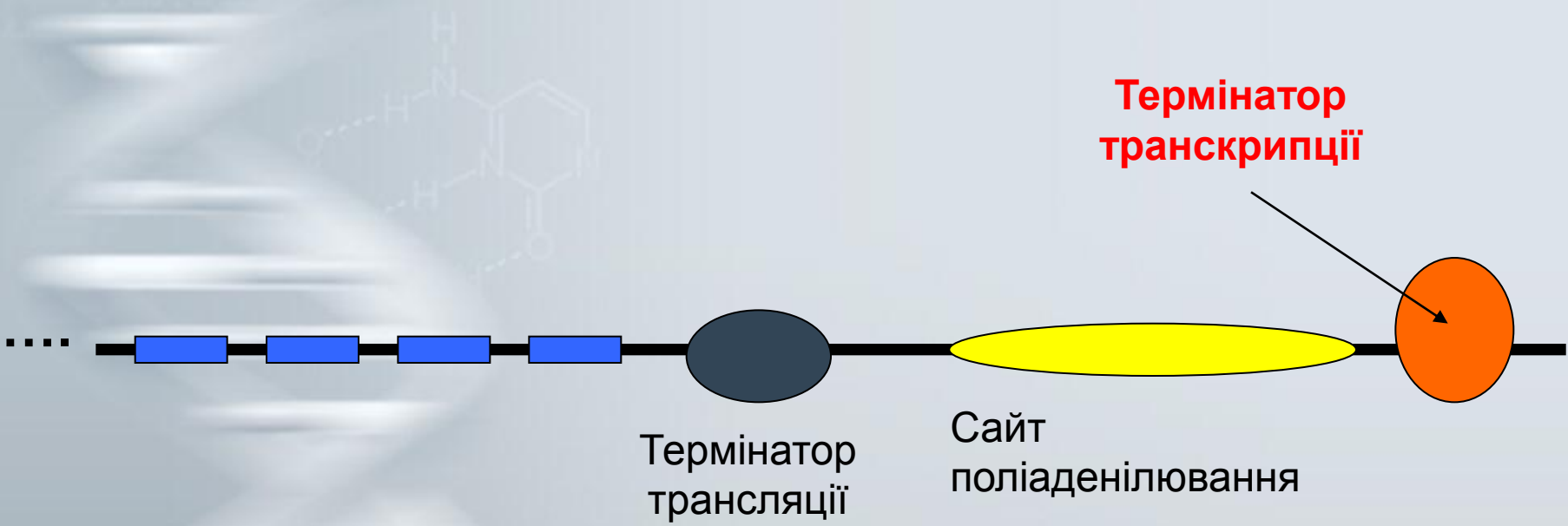
- ***Гени "домашнього господарства" кодують те, що завжди потрібно будь-якій клітині незалежно від тканини***
  - Гени гістонових білків
  - Гени тРНК
  - Гени рРНК
- ***Гени «розкоші» експресуються в клітинах певної тканини і лише у певний час***
  - Гени синтезу білкових гормонів та ін.

# Структура типового білок-кодуючого гена еукаріот



**Промотор** – особлива послідовність нуклеотидів ДНК, що впізнається РНК-полімеразою як посадкова площадка і старт синтезу РНК

**ТАТА-бокс** – місце зв'язування великого комплексу з 50 білків, включаючи фактори транскрипції  
**Базальний або кóровий промотор**



**Термінатор  
транскрипції**

Термінатор  
трансляції

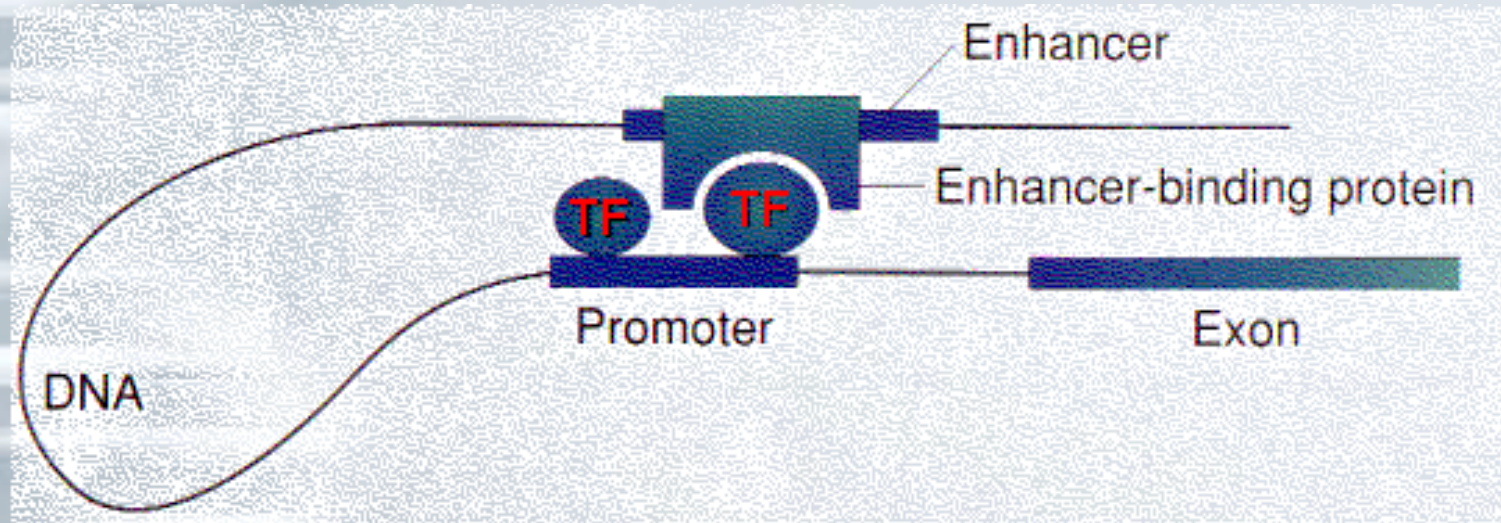
Сайт  
поліаденілювання

# Регуляторні ділянки ДНК еукаріот

- Енхансери
- Сайленсери
- Інсулятори



# Енхансери



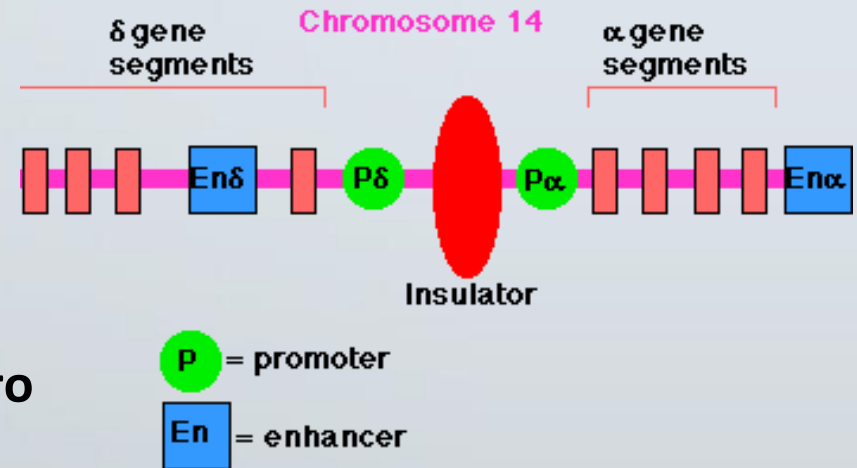
- Низка факторів транскрипції («Білок, що зв'язує енхансер») зв'язується із регіонами ДНК, розташованими на відстані тисяч bp від контрольованого гена. Зв'язування підвищує рівень транскрипції гена
- Енхансери можуть розташовуватися перед, за і навіть всередині гена, що контролюється
- Дія енхансера, можливо, пов'язана із тим, що білок, який зв'язує енхансер «затримує» фактори транскрипції (TF) на промоторі гена

# Сайленсери

- Сайленсери – це контролюючі регіони ДНК, які подібно до енансерів можуть локалізуватися дуже далеко від контрольованого гена
- Зв'язування фактора транскрипції із сайленсером призводить до пригнічення експресії

# Інсулятори

- Для **запобігання** випадковому впливу енансерів і сайленсерів на гени, розташовані поруч із контрольованим, існують **інсулятори**
- Інсулятори – це ділянки ДНК, розташовані поміж:
  - енансером і промотором або
  - сайленсером і промоторомгенів, які **прилягають один до одного** або кластерів генів, що прилягають.





# Реплікація ДНК

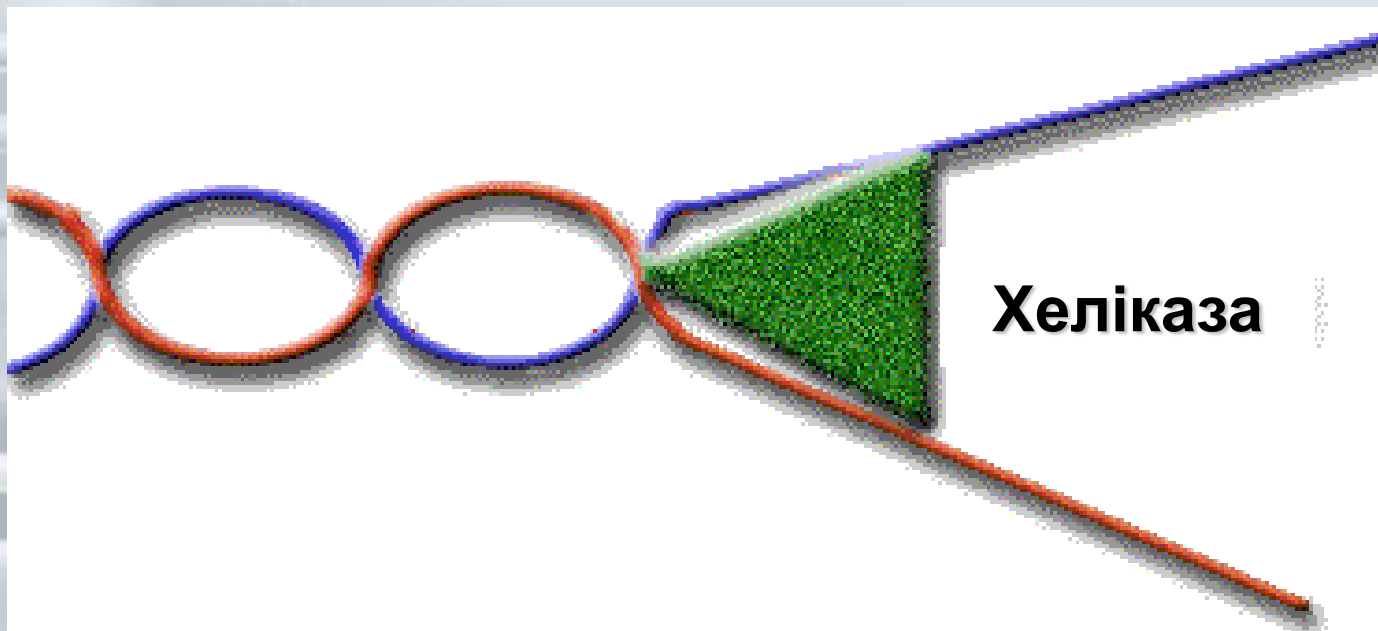
- **Реплікація ДНК** – це процес, що полягає в утворенні ідентичних копій ДНК для передачі генетичної інформації у поколіннях клітин і організмів

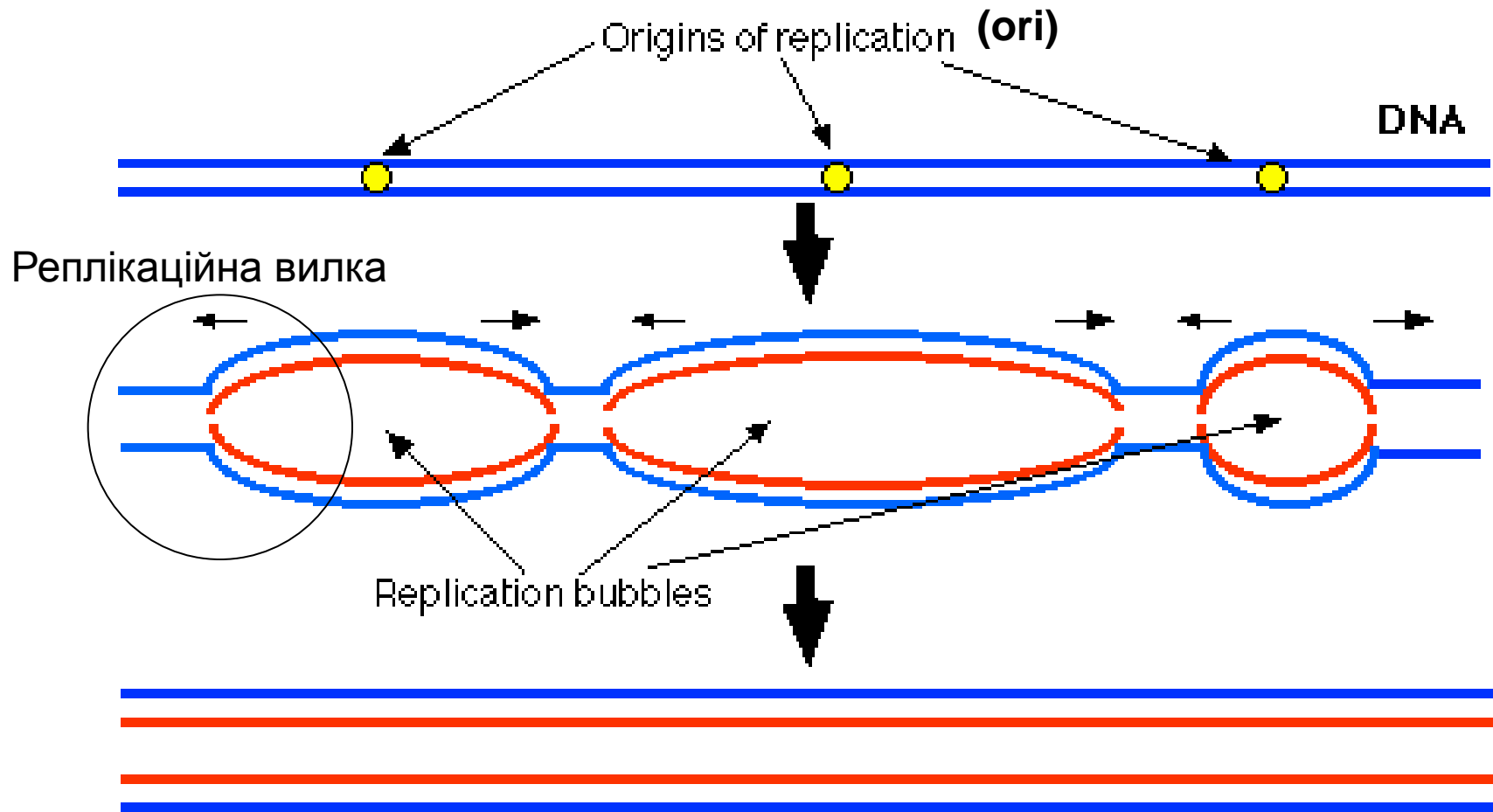
**ДНК → 2 ДНК**

- Основний фермент процесу – **ДНК-залежна ДНК-полімераза**

# Етапи реплікації

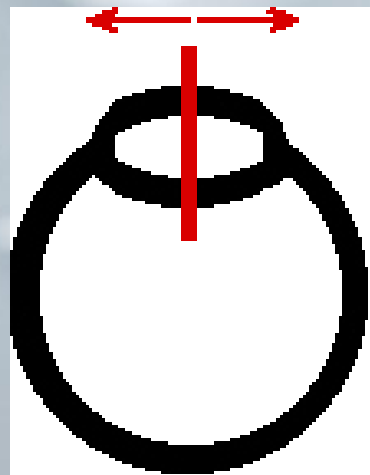
- Подвійна спіраль розплетається ферментом **хеліказою**



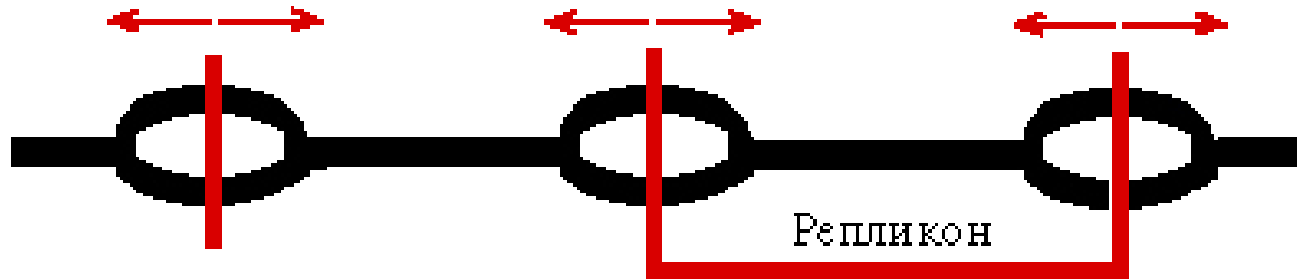


- У молекулі ДНК еукаріот одночасно утворюється декілька місць початку реплікації – **«реплікаційні пухирці»**





*E. coli*

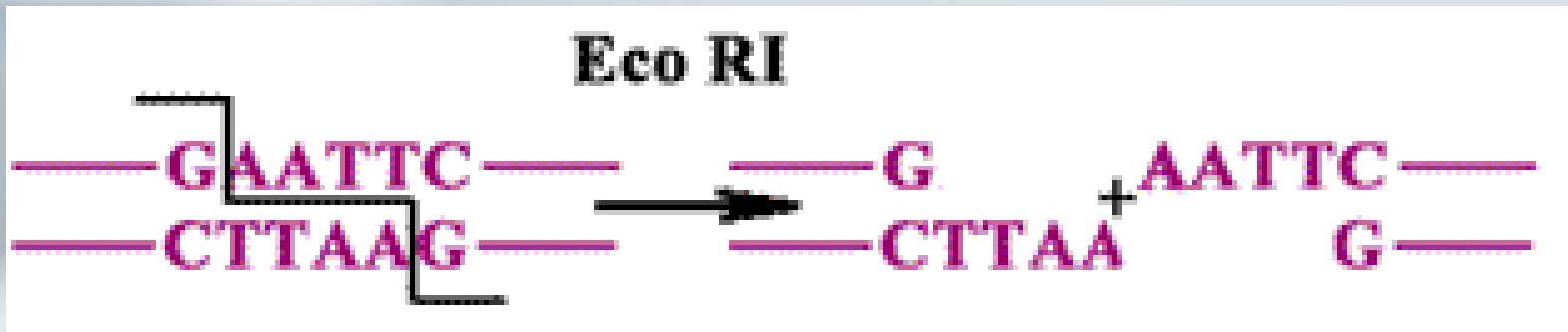


Эукариоты

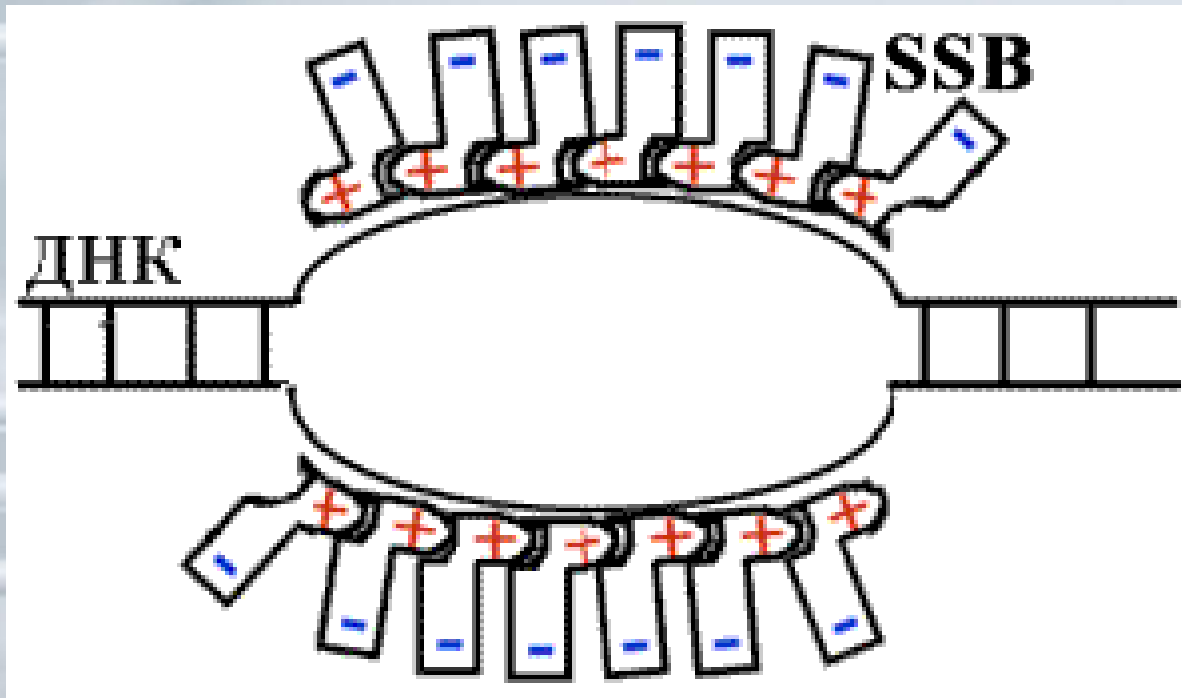
**Репликон** - ділянка ДНК між двома *ori*

# Топоізомерази

- Знижують напруження у молекулі ДНК, що розкручується, видаленням петель ДНК
- Працюють за принципом ферментів **рестриктаз** (що розрізають два ланцюги ДНК)



# SSB – білки зв'язують одинарні ланцюги ДНК

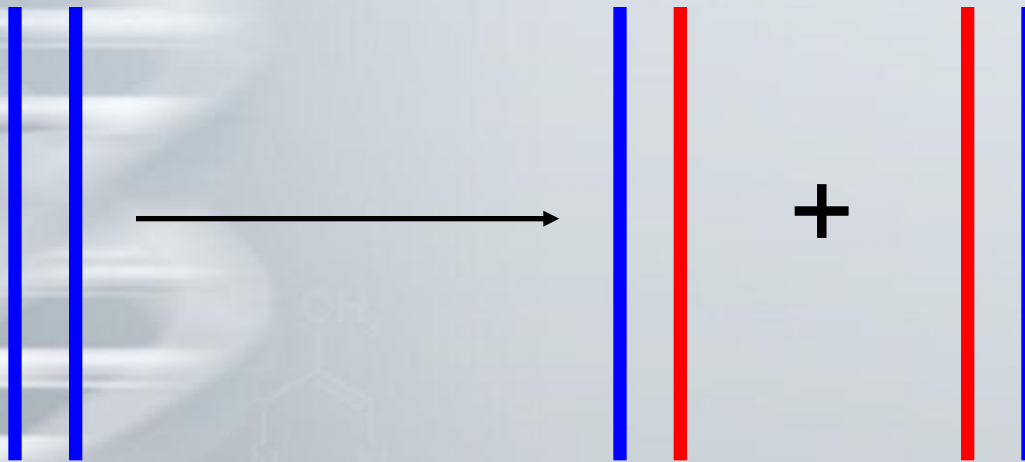


Коли в ДНК утворюється розплавлена ділянка, білок вкриває його за рахунок електростатичних взаємодій. При цьому проявляється спорідненість білків один до одного. Вони вкривають ДНК суцільним шаром.

**Запобігання склеюванню одинарних ланцюгів у подвійний**

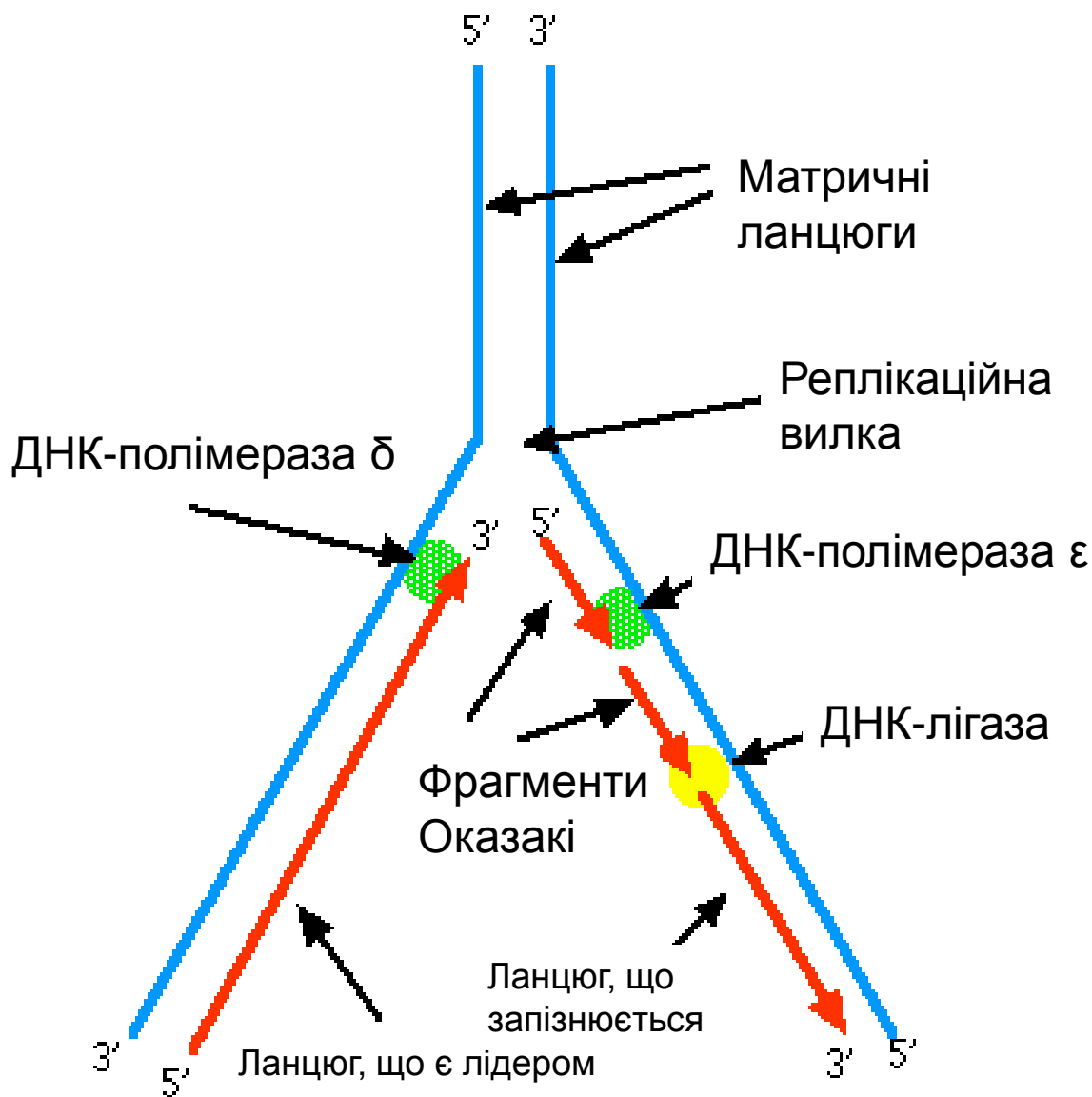
# Синтез ДНК - напівконсервативний

- Напівконсервативність означає, що кожна дочірня ДНК складається з одного матричного (материнського) ланцюга та одного нового синтезованого (дочірнього)



- **Синтез кожного дочірнього ланцюга ДНК проходить комплементарно і антипаралельно до матричного ланцюга і завжди у напрямку**

**5' → 3'**

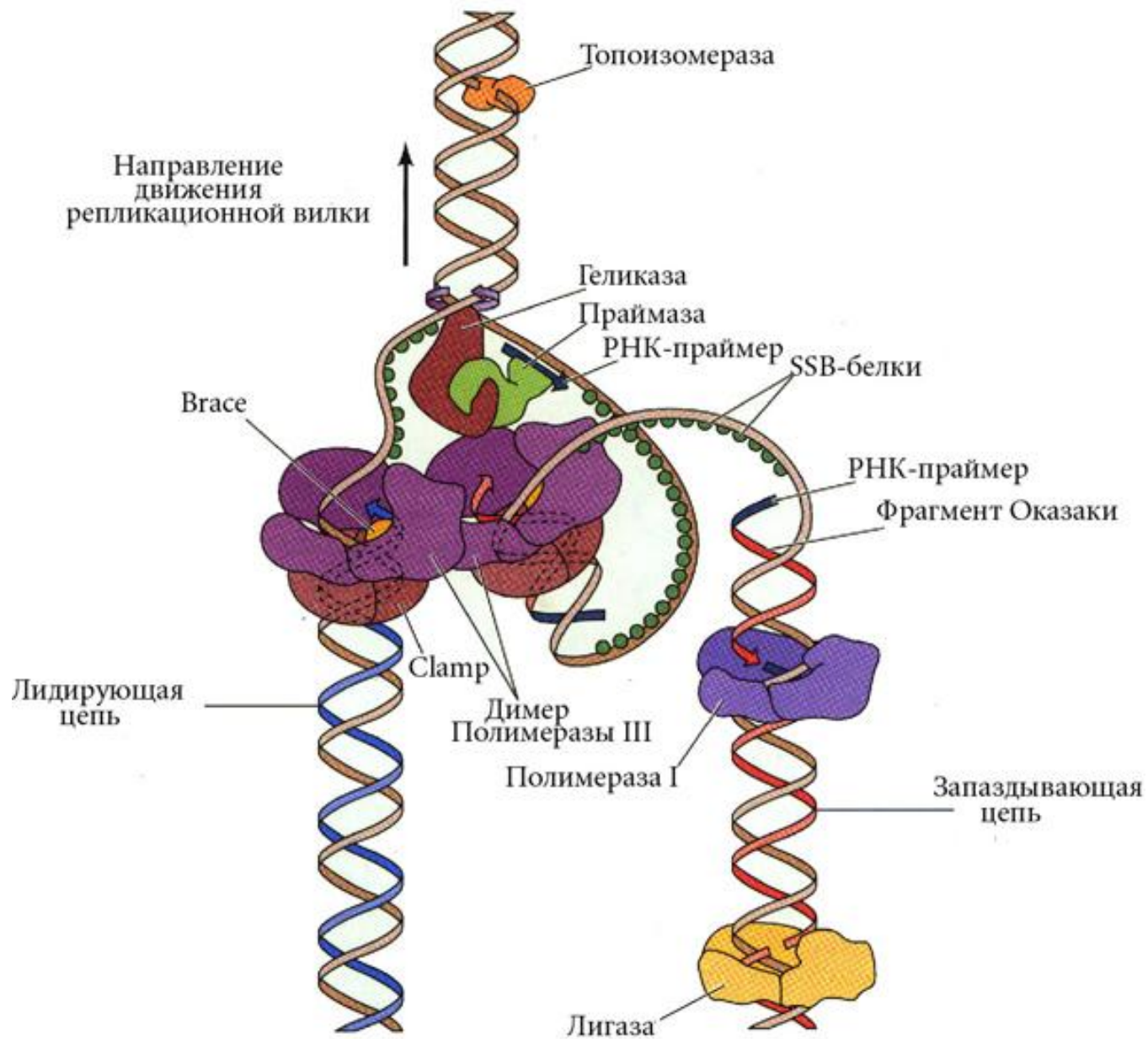


- **ДНК-полімераза** зв'язується із одним ланцюгом ДНК і починає рух у напрямку  $5' \rightarrow 3'$ , використовуючи її як матрицю і збираючи з нуклеотидів ланцюг, що є лідером, і формуючи подвійну спіраль. У еукаріот ця молекула має назву *ДНК полімераза дельта* ( $\delta$ ).

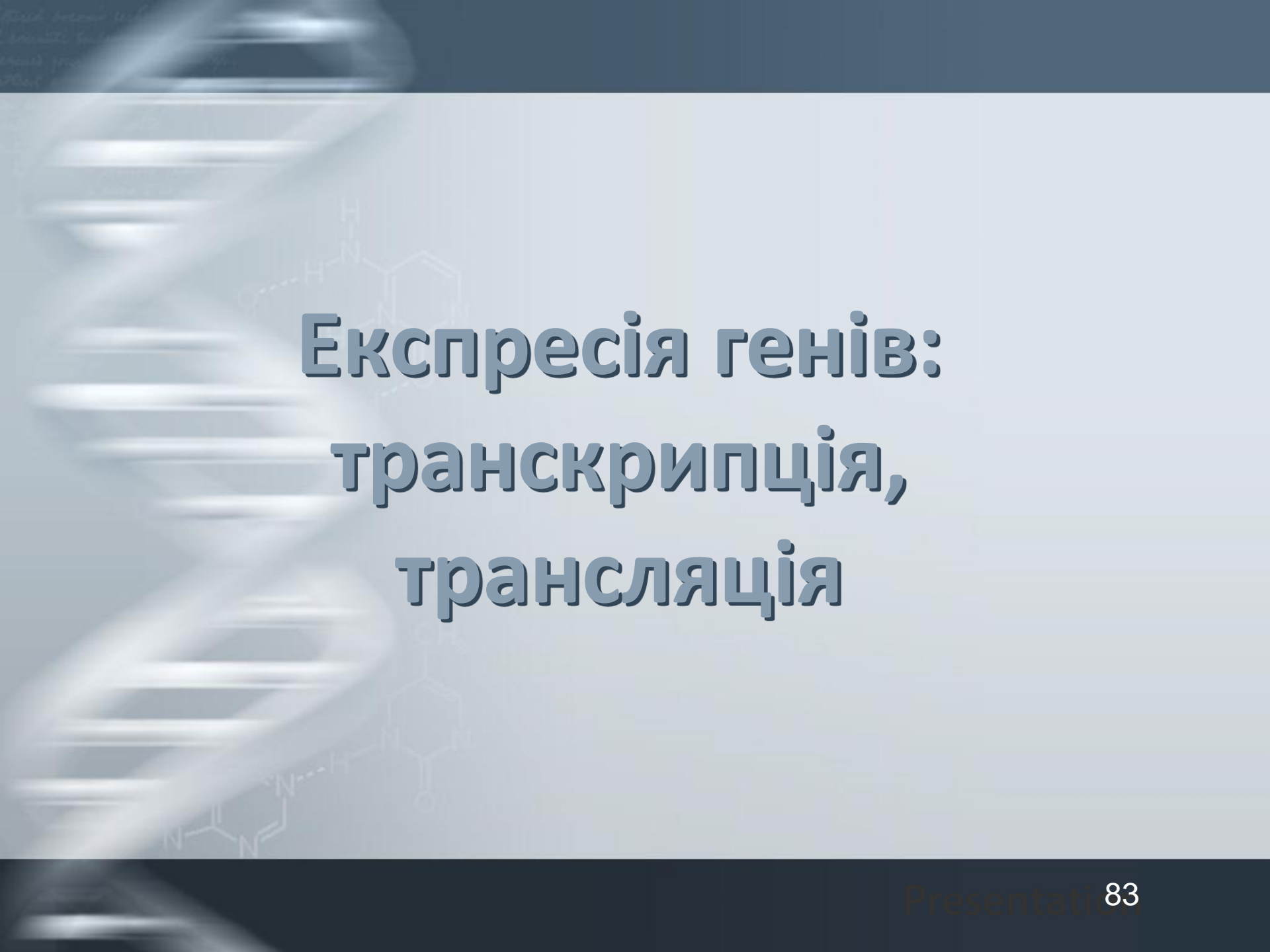
- Позаяк синтез ДНК можливий лише у напрямку  $5' \rightarrow 3'$ , **ДНК-полімераза другого типу** (епсilon,  $\epsilon$ , у еукаріот) зв'язується з іншим матричним ланцюгом. Цей фермент синтезує переривчасті фрагменти полінуклеотидів (фрагменти Оказакі).

- Фермент **ДНК-лігаза** заповнює проломи у ланцюгу, що запізнюється.

## Синтез ДНК - напівнепереривний





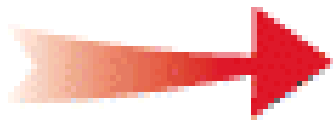


# Експресія генів: транскрипція, трансляція

# Експресія генів

- Експресія генів – це реалізація (відтворення) інформації, закованої у послідовності нуклеотидів

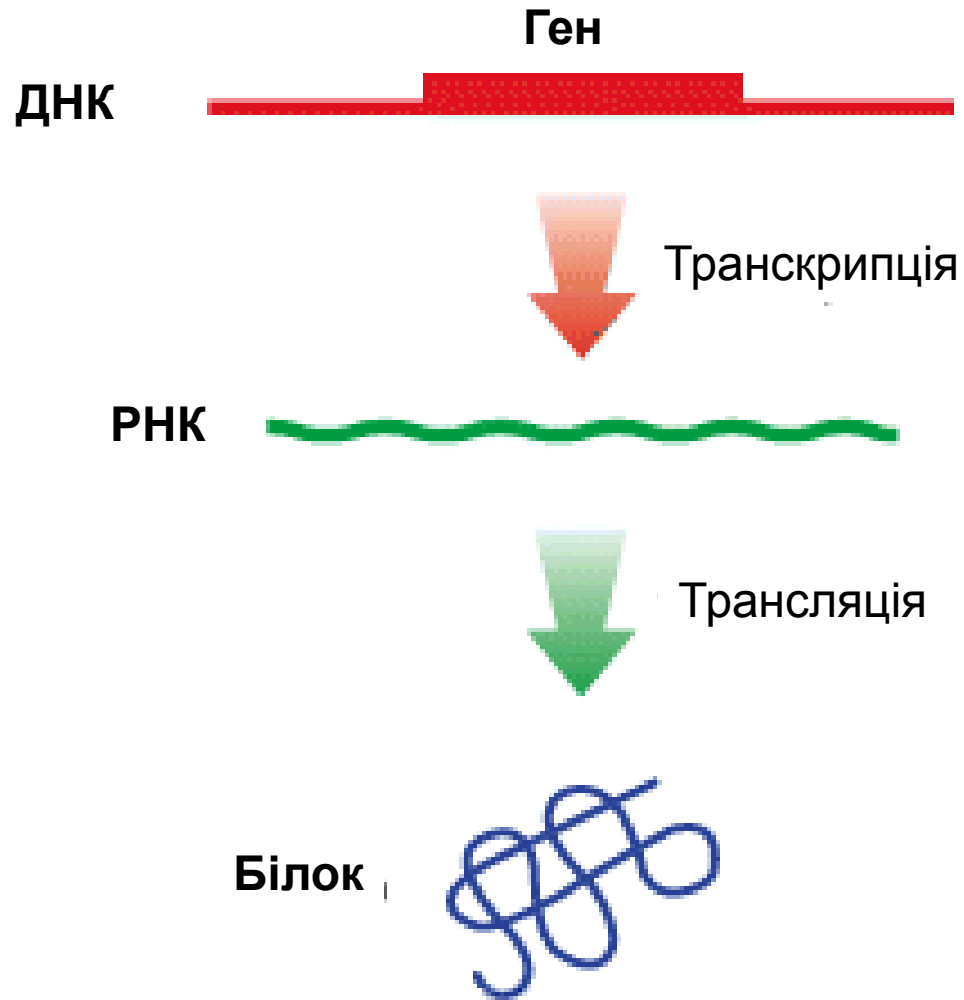
**Експресія  
геному**



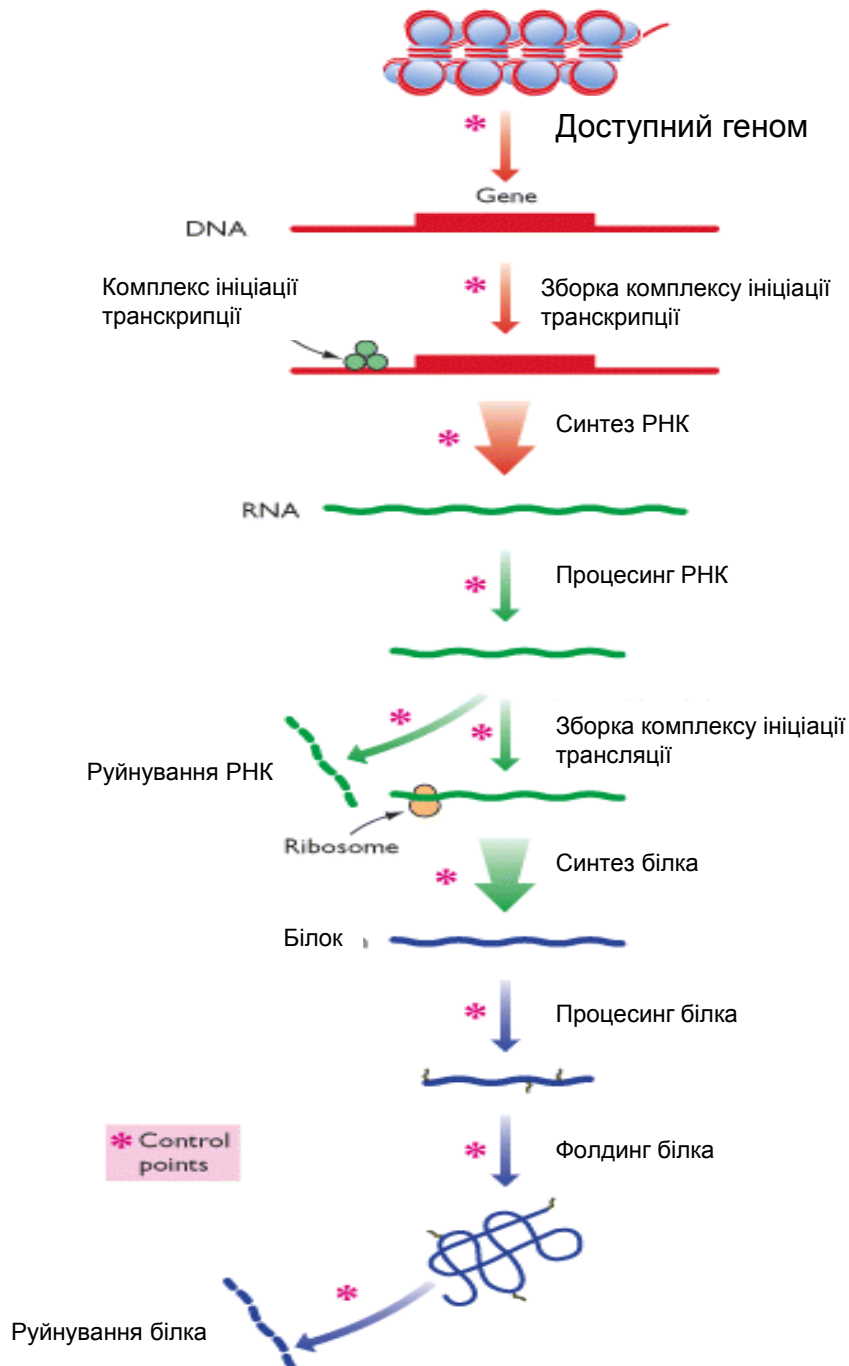
**Протеом**



**Біохімічні  
процеси**



Попередній погляд на експресію генів



## Сучасні уявлення про експресію генів (особливо у вищих організмів)



Роджер Корнберг

# Транскрипція (ДНК → РНК)

- **Транскрипція** - це синтез усіх видів РНК на матриці ДНК, що здійснюється ферментом ДНК-залежною РНК-полімеразою

# Транскриптом

- **Транскриптом** – сукупність усіх ДНК-транскриптів (в основному мРНК), що продукуються

# Етапи транскрипції

- Біля 50 різних білків – **факторів транскрипції** – зв'язуються із **промотором** гена
- Фермент **РНК-полімераза** зв'язується із комплексом факторів транскрипції
- Діючи разом, вони **розкривають подвійну спіраль ДНК**



- РНК-полімераза копіює один із ланцюгів ДНК за принципом комплементарності – утворюється **пре-мРНК**
- При досягненні РНК-полімеразою **термінального сигналу** (специфічної послідовності нуклеотидів) фермент і пре-мРНК полишають ДНК-матрицю

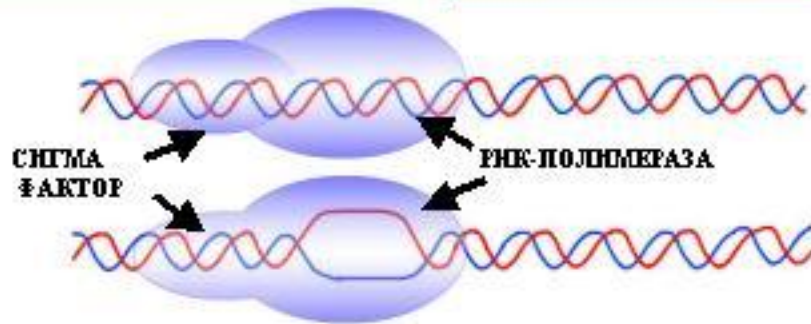


■ **Функції РНК-полімерази:**

- розплетіння й заплетіння ДНК
- синтез РНК
- рух по ланцюгу ДНК

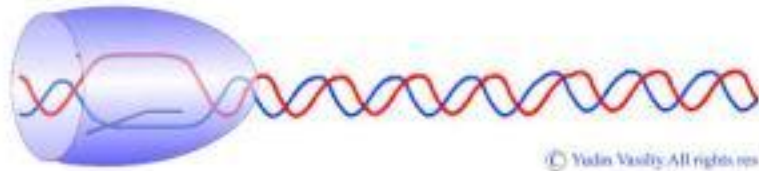


## Четыре этапа транскрипции:



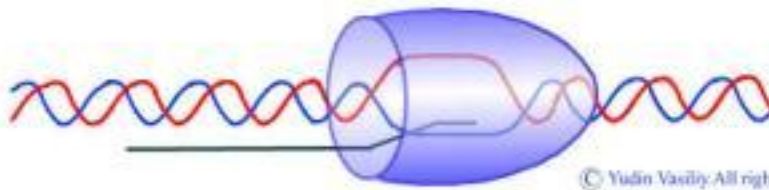
### РАСПОЗНАВАНИЕ МАТРИЦЫ:

при участии сигма фактора (у *E.coli*)  
РНК полимеразы связывается с ДНК и  
расплетает ДНК в точке инициации  
транскрипции



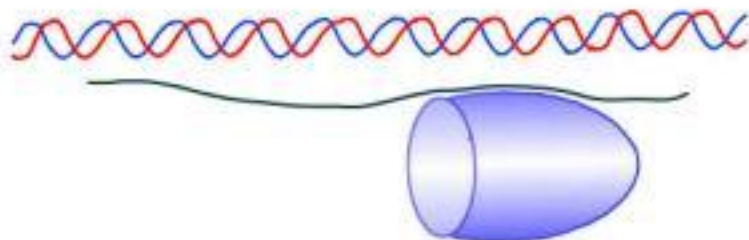
### ИНИЦИАЦИЯ:

сигма фактор отсоединился и синтезирована  
цепь РНК  
(2-9 пар оснований)



### ЭЛОНГАЦИЯ:

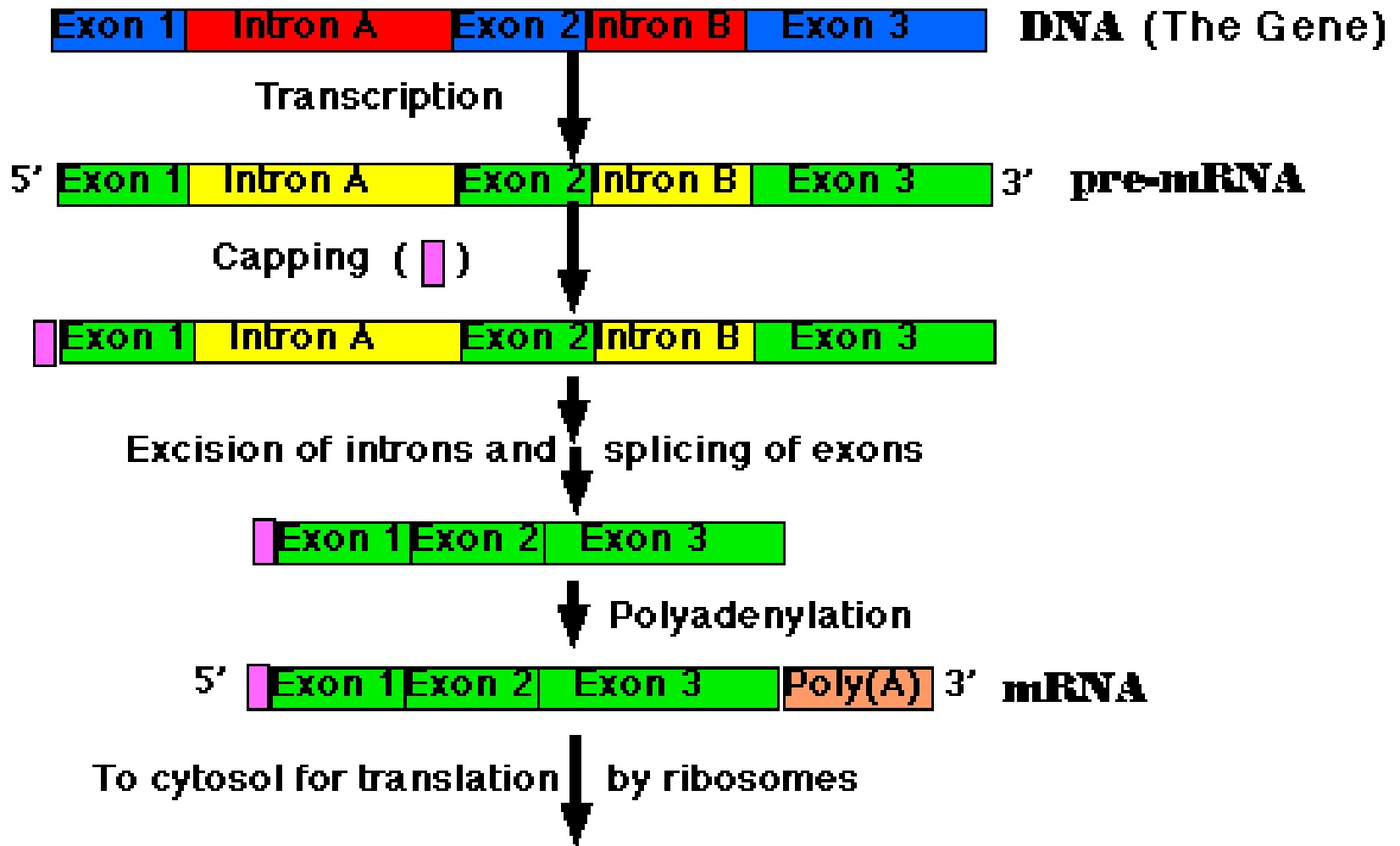
движение РНК полимеразы вдоль  
ДНК, расплетание ДНК, синтез РНК,  
заплетание ДНК



### ТЕРМИНАЦИЯ:

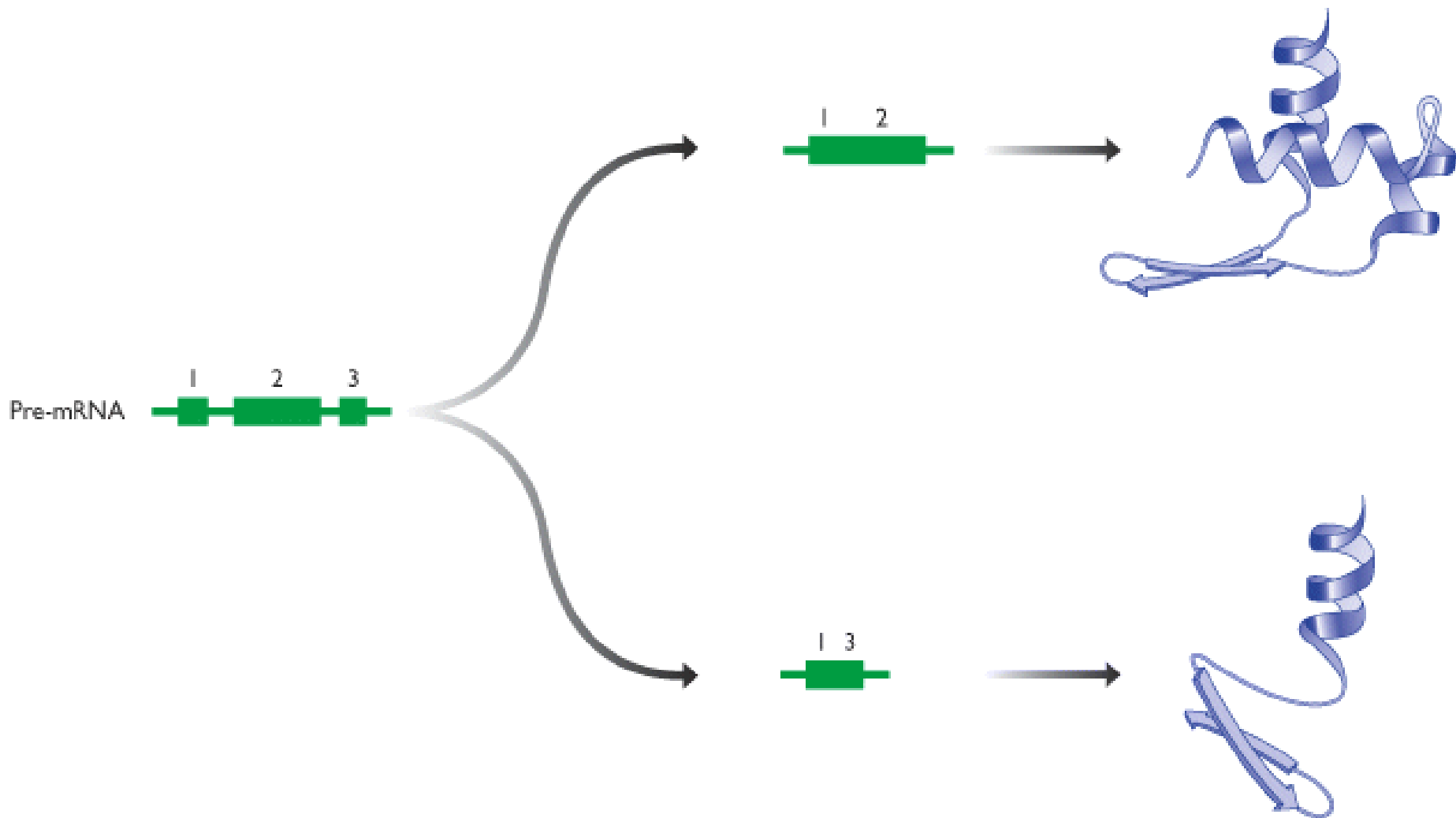
окончание  
транскрипции, распад комплекса  
ДНК-РНК-полимераза. Происходит  
после распознавания  
терминатора

# Процесинг РНК (пре-мРНК → мРНК)



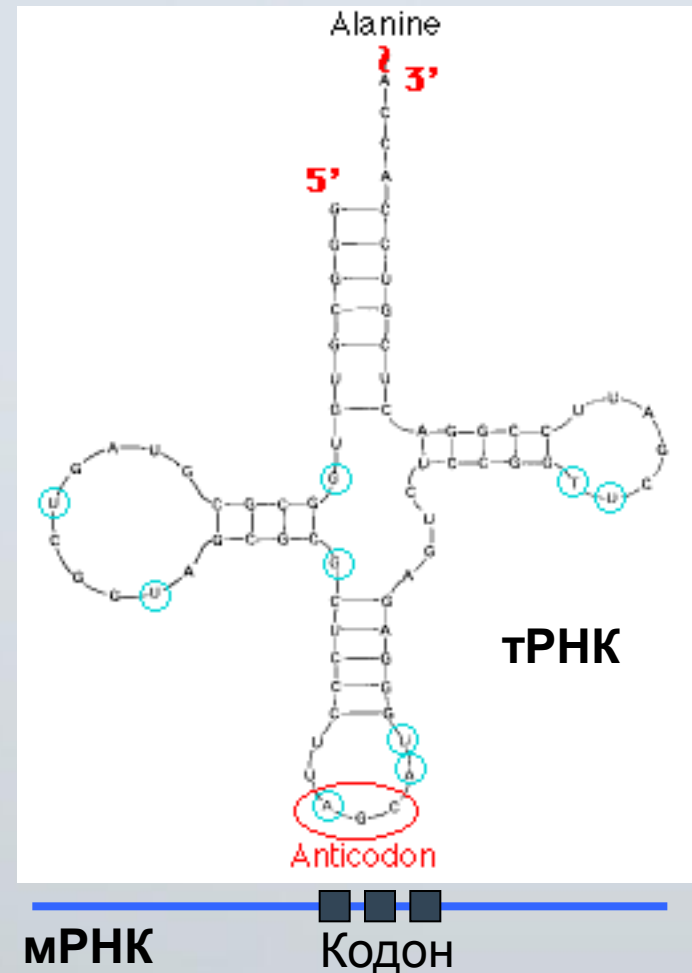
Ларіати – «побочні» продукти сплайсингу РНК

# Альтернативний сплайсинг



# Трансляція (РНК → білок)

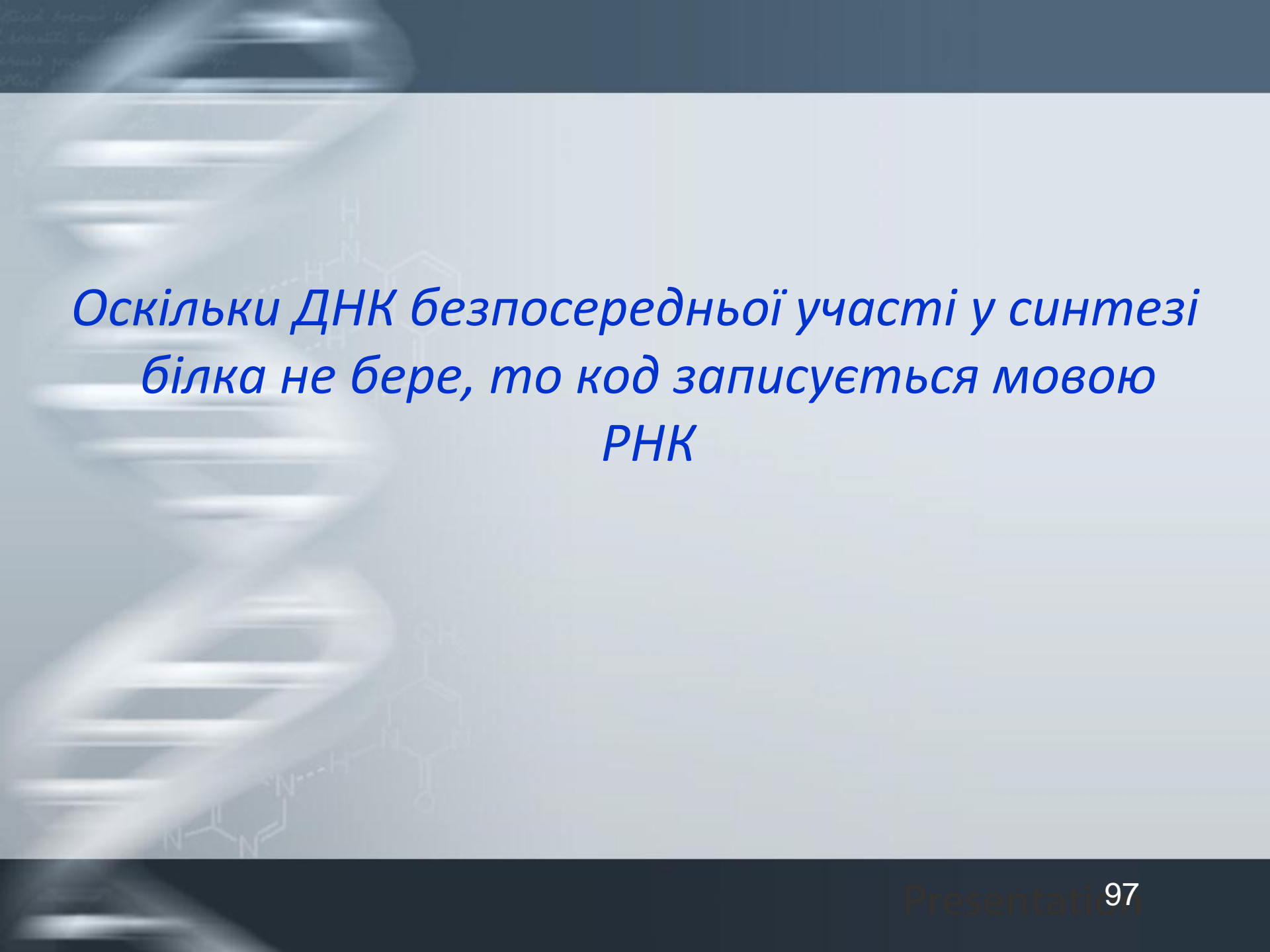
- **Питання:** Як послідовність нуклеотидів визначає послідовність амінокислот?
- **Відповідь:** за допомогою молекули транспортної РНК, специфічної для кожної амінокислоти і для **триплету** нуклеотидів у мРНК, що має назву **кодон**.
- Сукупність молекул тРНК здатна **транслявати** кодони мРНК у послідовність амінокислот у білку.



# Генетичний код

- Був розшифрований у 1962 році (**Маршалл Ніренберг, Генріх Маттеї, Северо Очоа**)
- **Генетичний код** - це система запису інформації про послідовність розташування амінокислот у білках за допомогою послідовності розташування нуклеотидів у ДНК





*Оскільки ДНК безпосередньої участі у синтезі білка не бере, то код записується мовою РНК*

# Властивості генетичного коду

## 1. Триплетність

Кожна амінокислота кодується послідовністю нуклеотидів із 3-х нуклеотидів - ***триплетом або кодоном***

## Вторая позиция кодона

Первая позиция кодона

	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Третья позиция кодона

$4^3 = 64$  кодони

61 кодон –  
змістовий

3 кодони –  
незмістові

## 2. Виродженість (надлишковість)

Усі амінокислоти, за винятком метіоніну і триптофану, кодуються **більш ніж одним триплетом:**

2 АК по 1 триплету = 2

9 АК по 2 триплети = 18

1 АК 3 триплети = 3

5 АК по 4 триплети = 20

3 АК по 6 триплетів = 18

Усього 61 триплет кодує 20 амінокислот.

### 3. Однозначність

Кожний триплет кодує лише одну амінокислоту або є термінатором трансляції.

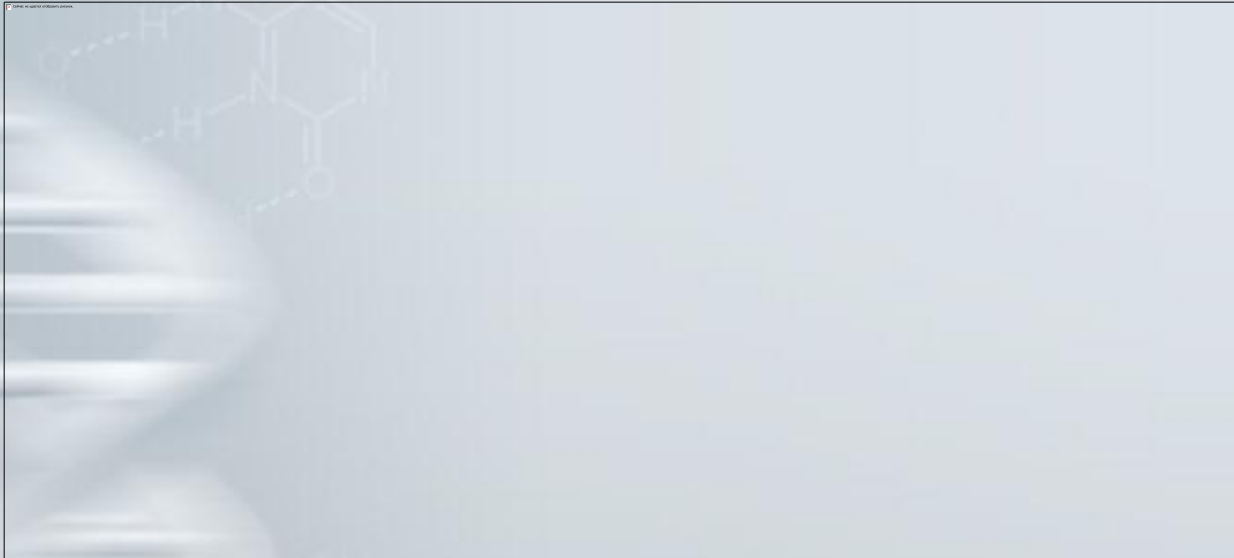
- Виняток складає кодон **AUG**. У прокаріот у першій позиції він кодує формілметіонін, а у будь-якій іншій - метіонін.

## 4. Універсальність

**Генетичний код єдиний для усіх живих істот на Землі**

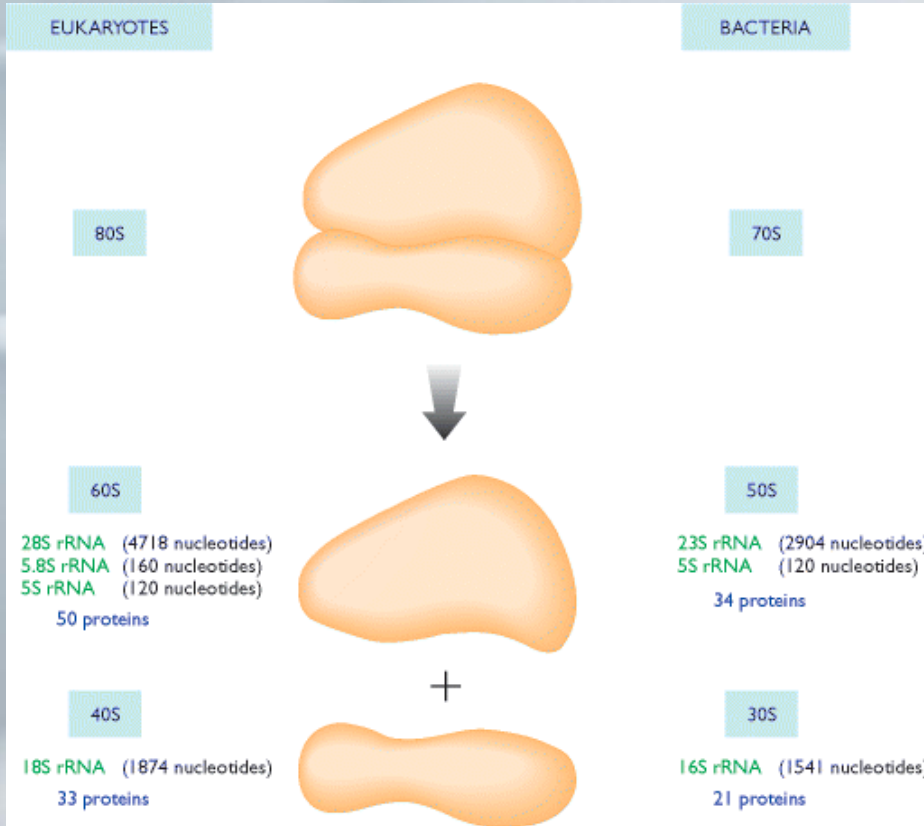
Це є свідомством єдності походження і еволюції.

## ■ 5. Неперекриваність



У 1956 р. **Георгій Гамов** запропонував варіант **перекриваного коду**. Згідно із Гамовським кодом, кожний нуклеотид, починаючи із третього у гені, входить до складу 3-х кодонів. Коли генетичний код було розшифровано, виявилось, що він **неперекриваний**, тобто **кожний нуклеотид входить до складу лише одного кодону**.

# Рибосоми (рРНК + білок)



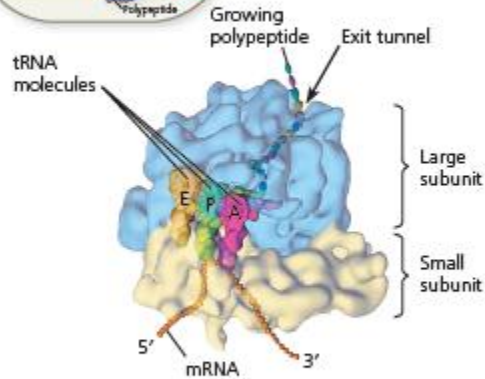
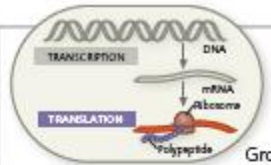
## Виділяють чотири класи рибосом:

1. Прокаріотичні 70S.
2. Еукаріотичні 80S.
3. Рибосоми мітохондрій (55S - у тварин, 75S - у грибів).
4. Рибосоми хлоропластів (70S у вищих рослин).

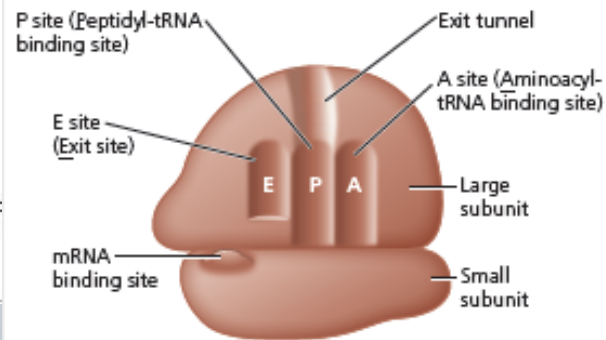


- **Асп** - центр специфічного впізнавання  
Тут відбувається взаємодія кодон-антикодон.
- **Р-центр** - пептидильний, донорний  
Він є донором формілметіоніну при ініціації або пептидилу при елонгації трансляції.
- **А-центр** - аміноацильний, акцепторний  
Акцептує формілметіонін на самому початку або пептидил при елонгації трансляції.
- **К-центр** - каталітичний  
(фермент пептидилтрансфераза – утворює пептидний зв'язок).

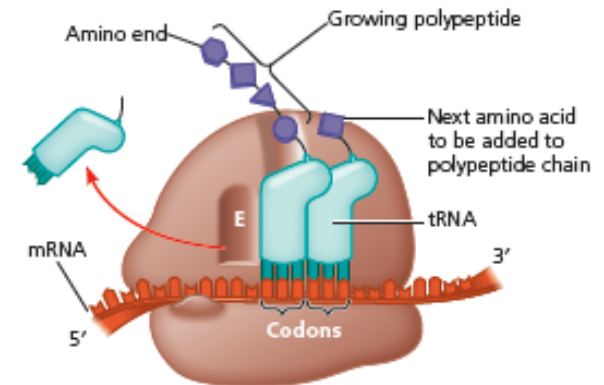




(a) Computer model of functioning ribosome. This is a model of a bacterial ribosome, showing its overall shape. The eukaryotic ribosome is roughly similar. A ribosomal subunit is a complex of ribosomal RNA molecules and proteins.



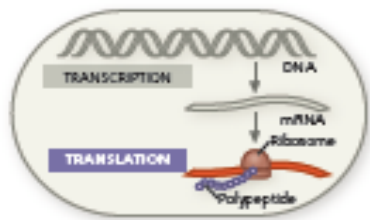
(b) Schematic model showing binding sites. A ribosome has an mRNA binding site and three tRNA binding sites, known as the A, P, and E sites. This schematic ribosome will appear in later diagrams.



(c) Schematic model with mRNA and tRNA. A tRNA fits into a binding site when its anticodon base-pairs with an mRNA codon. The P site holds the tRNA attached to the growing polypeptide. The A site holds the tRNA carrying the next amino acid to be added to the polypeptide chain. Discharged tRNAs leave from the E site. The polypeptide grows at its carboxyl end.

# Етапи транскрипції (на прикладі прокариот)

- Активація амінокислот
- Ініціація
- Елонгація
- Термінація



Amino end of polypeptide

**1 Codon recognition.** The anticodon of an incoming aminoacyl tRNA base-pairs with the complementary mRNA codon in the A site. Hydrolysis of GTP increases the accuracy and efficiency of this step. Although not shown, many different aminoacyl tRNAs are present, but only the one with the appropriate anticodon will bind and allow the cycle to progress.

mRNA  
5' 3'

E P A  
site site

GTP  
GDP + P<sub>i</sub>

Ribosome ready for next aminoacyl tRNA

E P A

**3 Translocation.** The ribosome translocates the tRNA in the A site to the P site. At the same time, the empty tRNA in the P site is moved to the E site, where it is released. The mRNA moves along with its bound tRNAs, bringing the next codon to be translated into the A site.

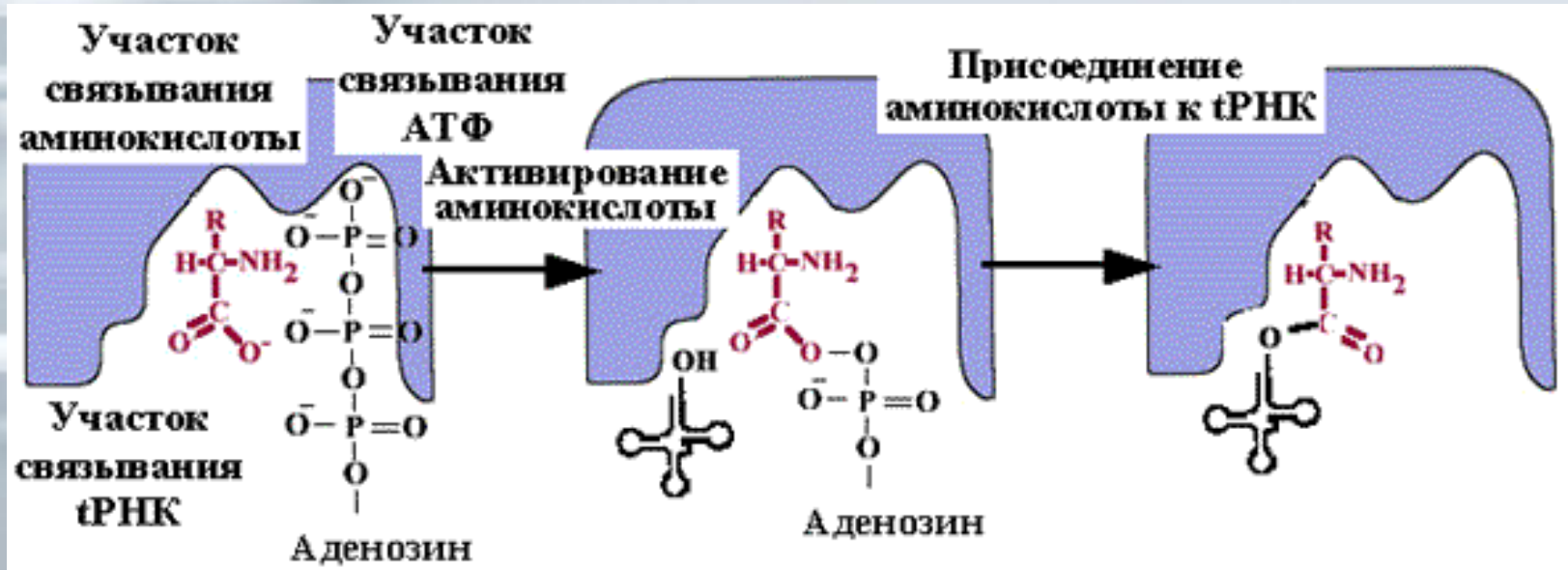
GDP + P<sub>i</sub>

GTP

E P A

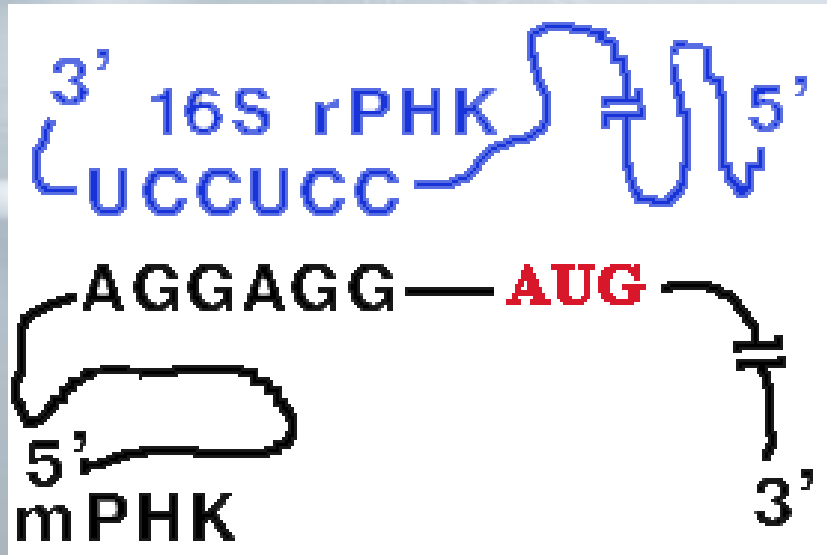
**2 Peptide bond formation.** An rRNA molecule of the large ribosomal subunit catalyzes the formation of a peptide bond between the amino group of the new amino acid in the A site and the carboxyl end of the growing polypeptide in the P site. This step removes the polypeptide from the tRNA in the P site and attaches it to the amino acid on the tRNA in the A site.

# Активация аминокислот

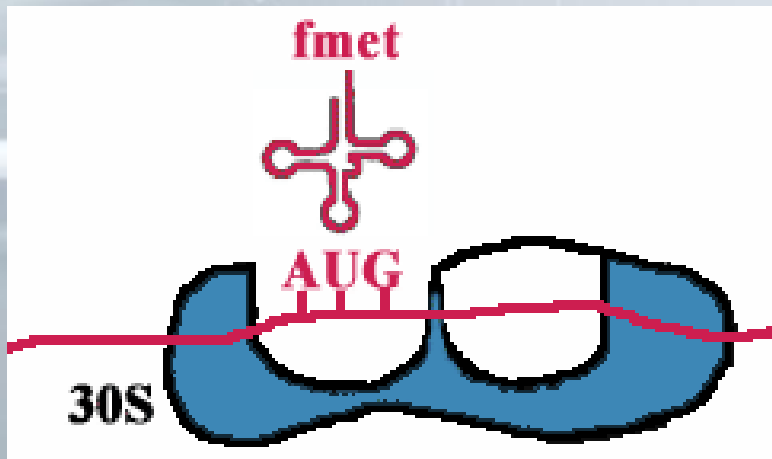


- Активация аминокислот – це процес їхнього приєднання до специфічних тРНК із затратою АТФ
- Основний фермент процесу – **аміноцил-тРНК-синтетаза (АРС-аза, кодаза)**

# Ініціація

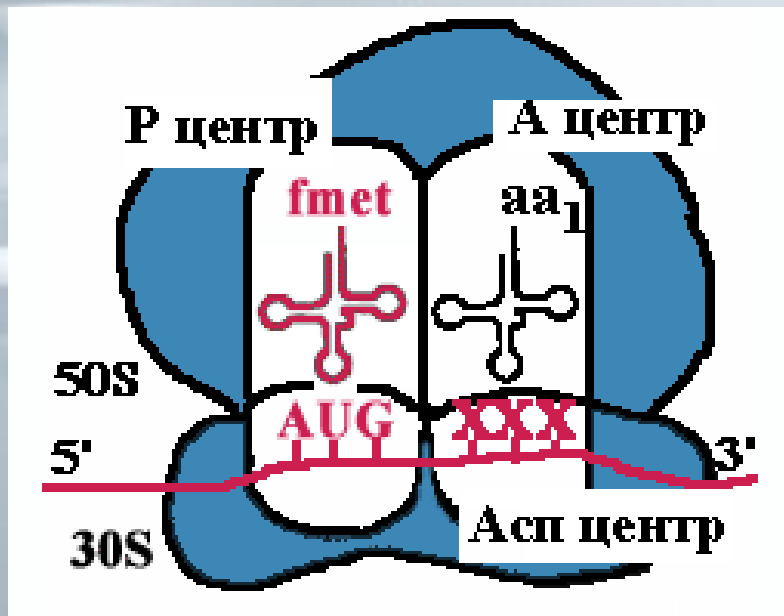


- У прокариот перед кожним геном і відповідно у мРНК перед геном є **лідерна послідовність**.
- Вона обов'язково містить **поліпуринову послідовність Шайна-Дальгарно**, яка комплементарна до 3'-кінцевої ділянки рРНК.
- Мала одиниця рибосоми зв'язується із мРНК



- До малої субодиниці, на якій уже знаходиться мРНК, підходить тРНК із формілметіоніном (у еукаріот із метіоніном).
- Внаслідок утворюється **ініціаторний комплекс:**  
*30S субодиниця рибосоми + мРНК + тРНК-формілметіонін.*



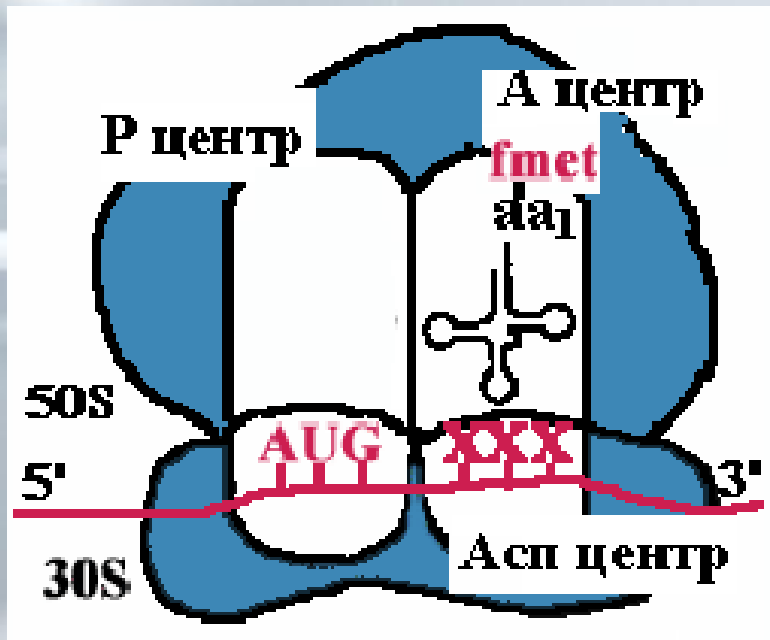


- Далі відбувається асоціація рибосоми

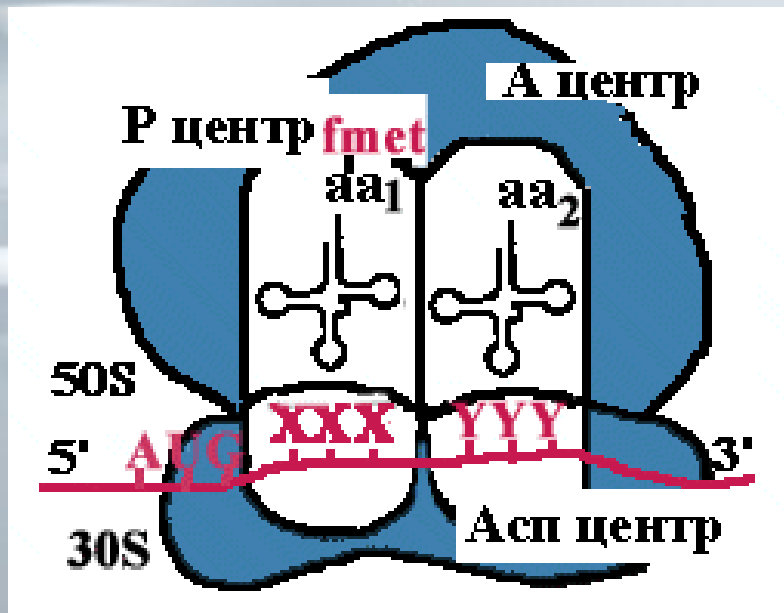
## ЕЛОНГАЦІЯ

- Аміноацильний кінець формілметіонінової тРНК опиняється в Р-центрі. Другий кодон гена опиняється в Асп-центрі. Відповідна йому аміноацил-тРНК устанавлюється таким чином, що її аміноацильний кінець потрапляє в А-центр.

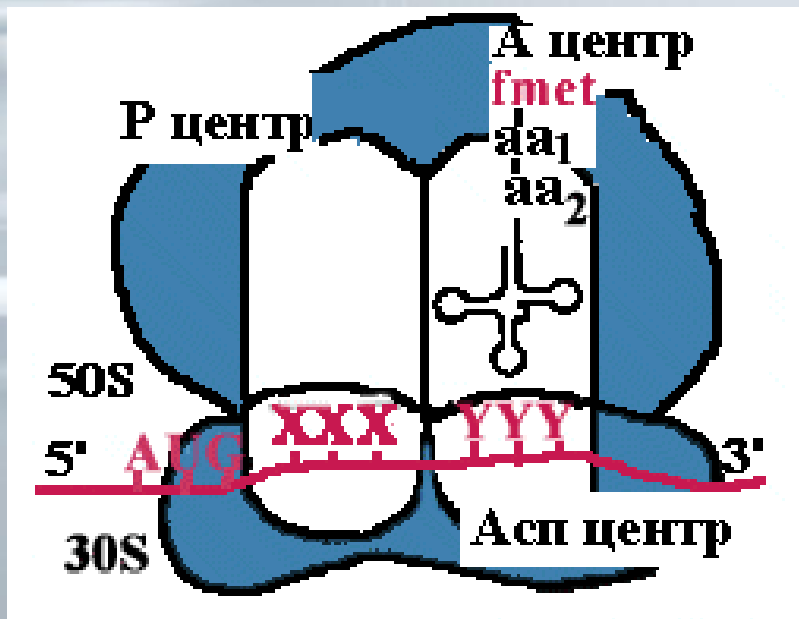




- Пептидилтрансфераза відриває формілметіонін в Р-центрі і переносить його до А-центру.
- Утворюється пептидний зв'язок між формілметіоніном і аміноацил-тРНК.

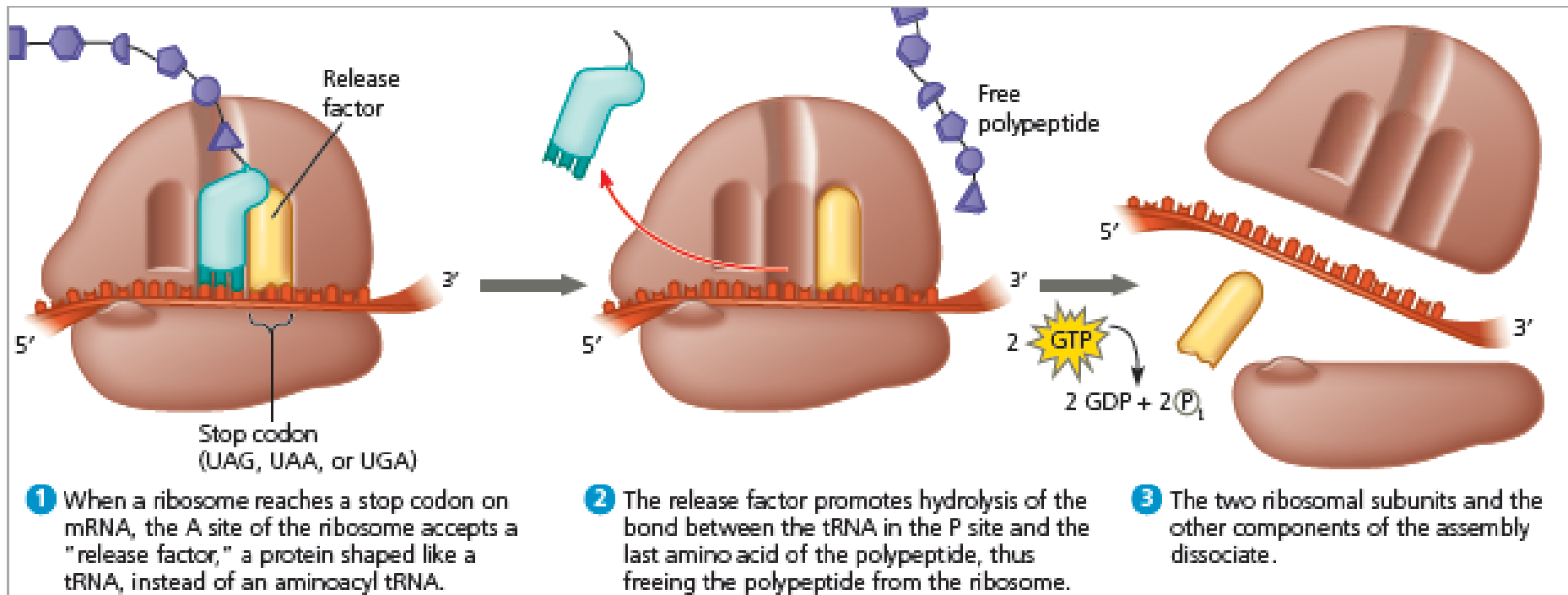


- Рибосома зазнає конформаційних змін і зсувається на один кодон (транслокація). Формілметіонінова тРНК залишає рибосому. Другий кодон опиняється напроти Р-центру. Сюди ж переходить тРНК, яка несе на хвості дипептид. В Асп-центр потрапляє третій кодон, а до А-центру наступна аміноацил-тРНК.



- Тепер у Р-центрі відривається дипептид, переноситься до А-центру і сполучається із третьою аміноацил-тРНК. Так відбувається до тих пір, поки до Асп-центру не потрапляє термінуючий кодон (ТЕРМІНАЦІЯ).
- Поліпептид відривається в Р-центрі, переноситься до А-центру і, позаяк приєднуватися йому нема до чого, він відривається від рибосоми.
- Рибосома дисоціює

# Термінація трансляції

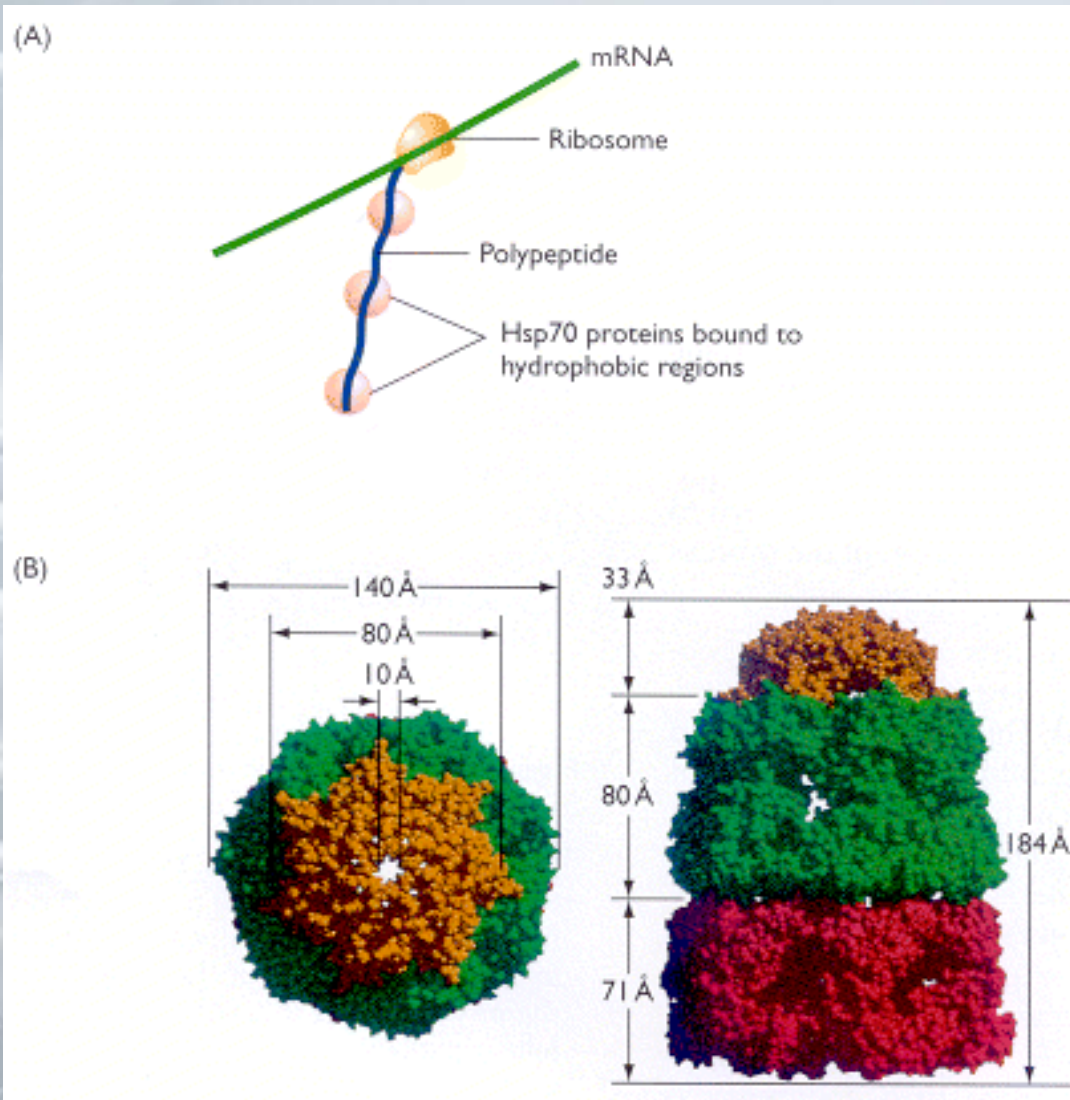


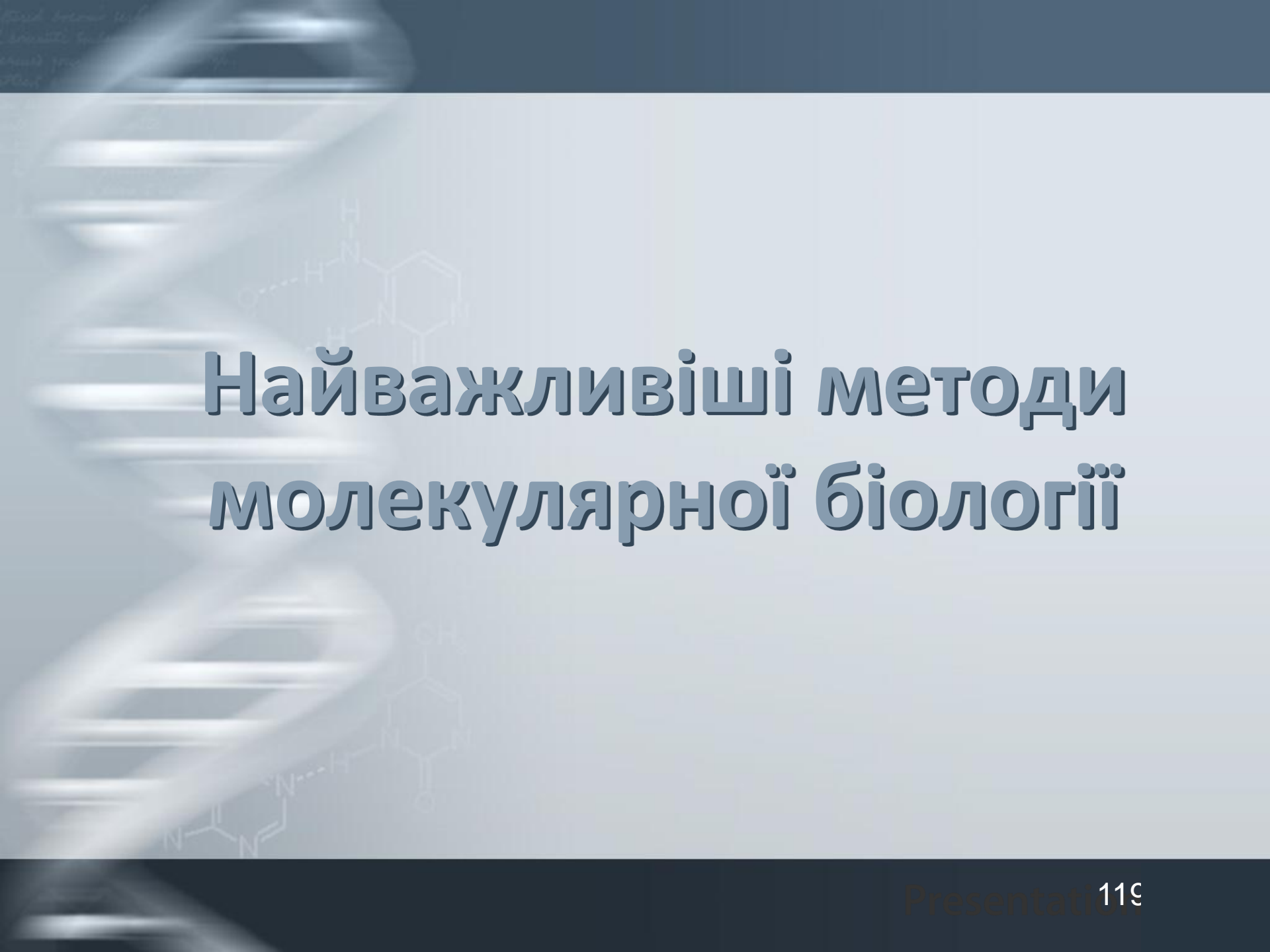
# Посттрансляційні перетворення білків

«Розуміння механізмів фолдингу представляє великий інтерес у світлі багатьох захворювань (хвороба Альцгеймера і Паркінсона), при розвитку яких даний процес проходить неправильно» – говорить Ульріх Хартл (директор інституту біохімії товариства Макса Планка)



# Шаперони – «няньки» білків





# Найважливіші методи молекулярної біології

# Розрізання і зшивання ДНК

- **Рестрикційні нуклеази (рестриктази)**- бактеріальні ферменти, які розрізають молекулу ДНК строго у визначених місцях (сайтах рестрикції)
- **ДНК-лігази** – ферменти, які зшивають цукрово-фосфатний остов ДНК (оскільки ДНК у різних організмів подібна – можна зшивати ДНК різних організмів)

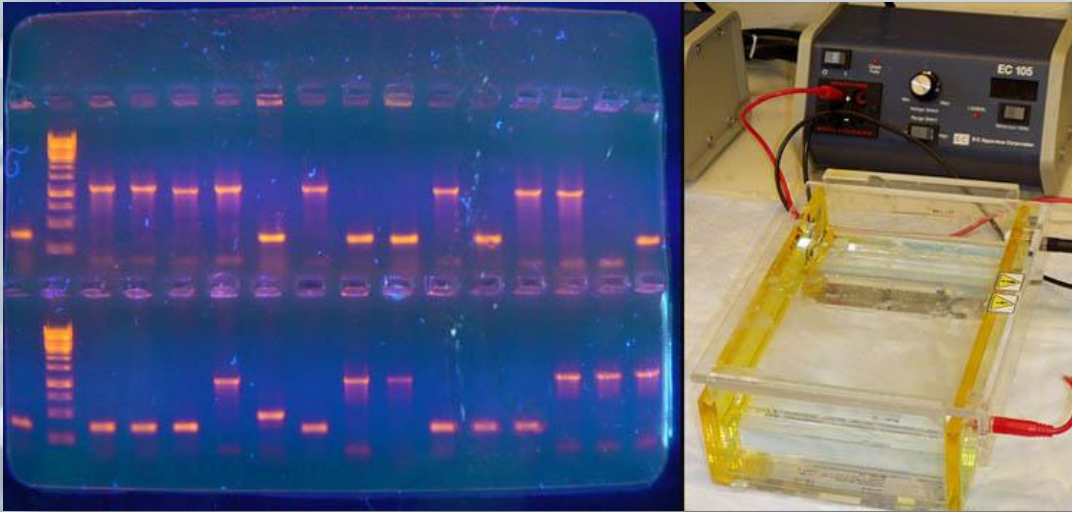


Тупі кінці

“Липкі” кінці



# Розділення молекул ДНК: електрофорез у гелі

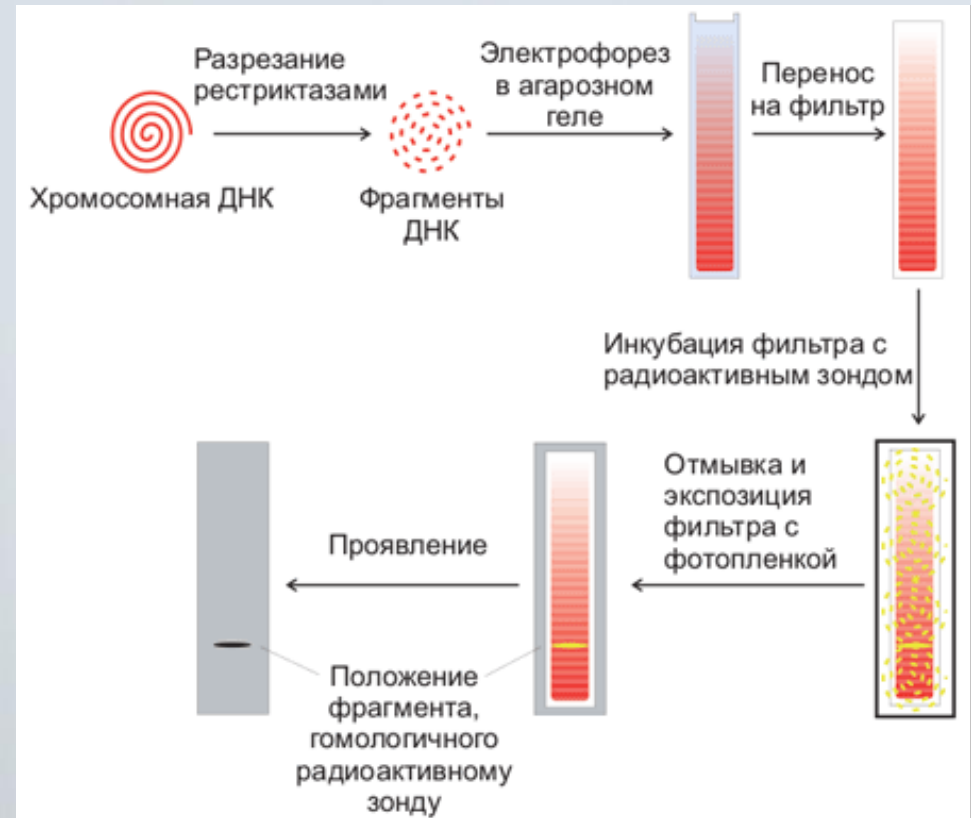


Електрофорез в агарозному гелі з використанням бромистого етидію для візуалізації результатів в ультрафіолеті (ліворуч). Друга ліворуч дорожка — маркер із відомими довжинами фрагментів. Праворуч — установка для проведення електрофорезу в гелі

- Після дії рестриктаз утворюються фрагменти ДНК різної довжини
- Усі фрагменти ДНК мають негативний заряд, тому можуть бути розділеними електрофорезом в агарі (рухаються к аноду)

# Виявлення певної послідовності ДНК у суміші. Саузерн-блоттинг

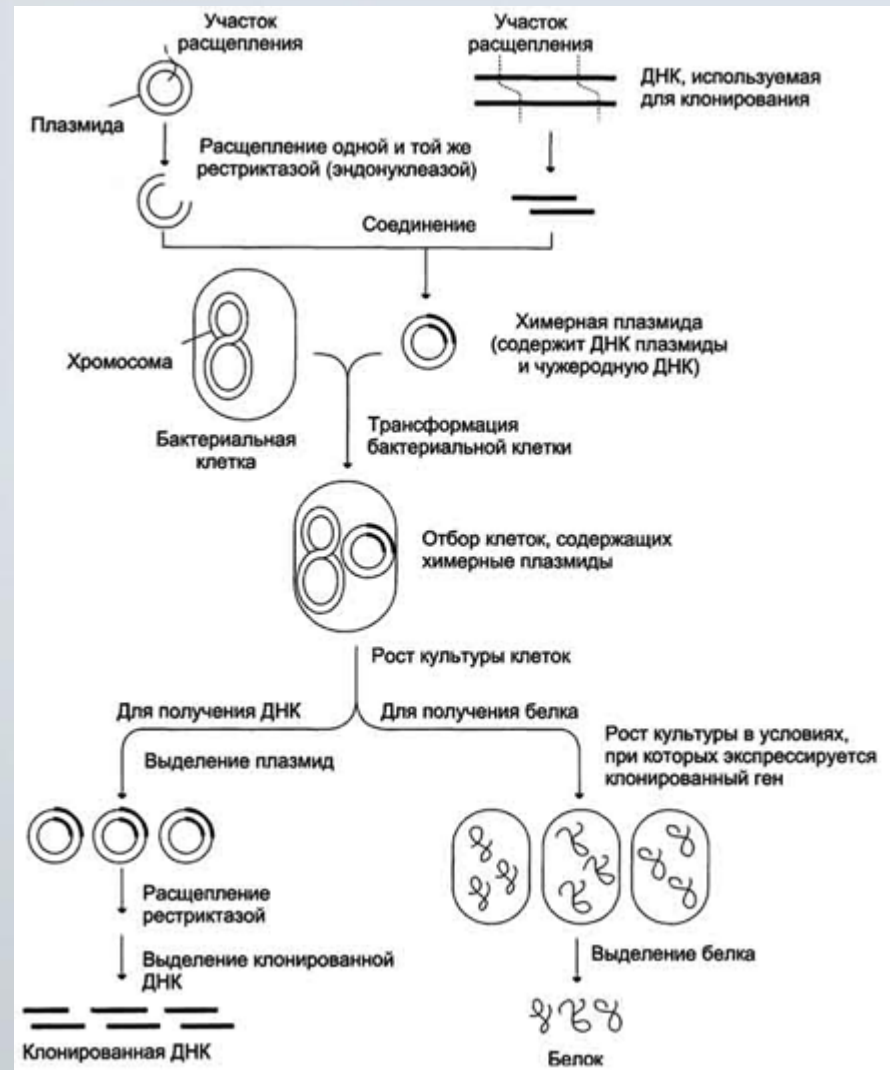
- За допомогою електрофорезу можна визначити розмір молекул ДНК у розчині, але не послідовність нуклеотидів у них
- За допомогою **гібридації ДНК** можна визначити, яка зі смужок містить фрагмент із **визначеною послідовністю**
- Гібридація ДНК ґрунтується на утворенні водневих зв'язків між двома ланцюгами ДНК, що призводить до їх з'єднання
- Спочатку синтезують **ДНК-зонд**, комплементарний послідовності, яку треба знайти (довжина 1000 нуклеотидів)
- Зонд зв'язується з необхідною послідовністю, а за рахунок флуоресцентного маркера або радіоізотопів, вбудованих у зонд, результати можна побачити



Саузерн-блоттинг

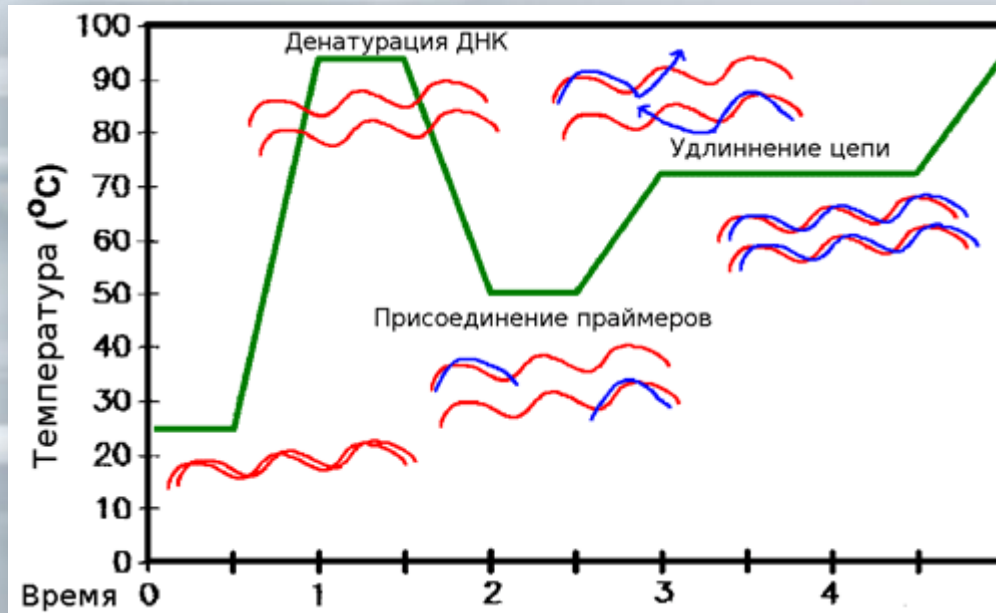
# Клонування ДНК

- Клонування ДНК – створення великої кількості копій визначеного фрагмента
- Для клонування ДНК існує два основних методи: **використання організмів, що швидко діляться** (зазвичай бактерії *Escherichia coli* — кишкової палички — або дріжджей *Saccharomyces cerevisiae*) або **in vitro** за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

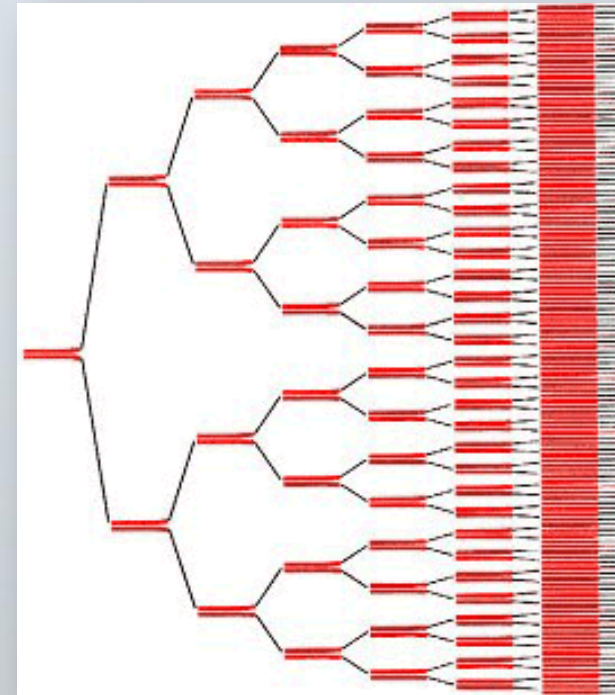


Клонування ділянки ДНК (гена)

# Полімеразна ланцюгова реакція



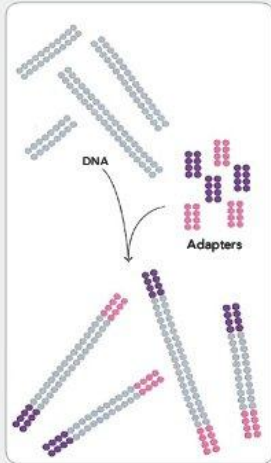
- **Полімеразна ланцюгова реакція** — молекулярно-біологічний метод, який збільшує (до  $10^{12}$  разів) число копій визначеного фрагмента ДНК *in vitro*
- ПЛР була винайдена **Кері Муллісом** (Kary Mullis) у 1983 році, за що у 1993 році він отримав Нобелівську премію
- Метод полягає у багаторазовому вибіркового копіюванні визначеної ділянки ДНК за допомогою ферментів у штучних умовах





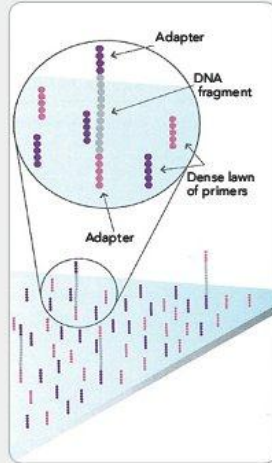
# Секвенування ДНК

## 1. PREPARE GENOMIC DNA SAMPLE



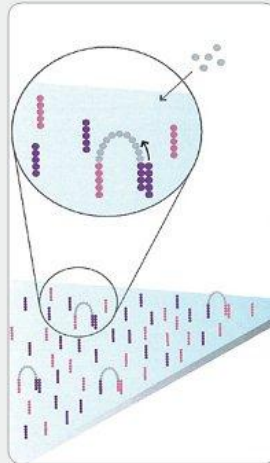
Randomly fragment genomic DNA and ligate adapters to both ends of the fragments.

## 2. ATTACH DNA TO SURFACE



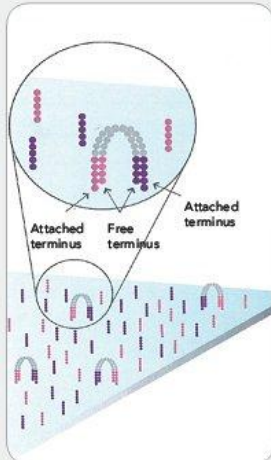
Bind single-stranded fragments randomly to the inside surface of the flow cell channels.

## 3. BRIDGE AMPLIFICATION



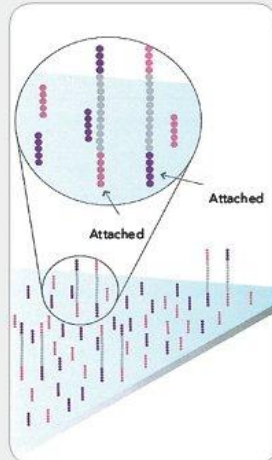
Add unlabeled nucleotides and enzyme to initiate solid-phase bridge amplification.

## 4. FRAGMENTS BECOME DOUBLE STRANDED



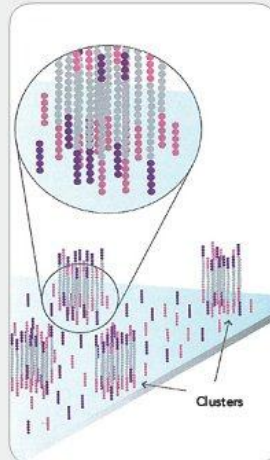
The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

## 5. DENATURE THE DOUBLE-STRANDED MOLECULES



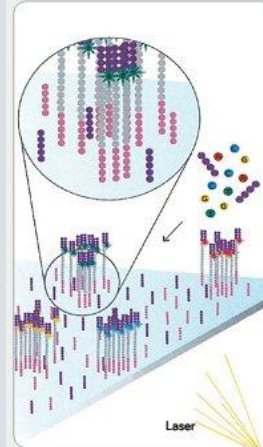
Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

## 6. COMPLETE AMPLIFICATION



Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

## 7. DETERMINE FIRST BASE



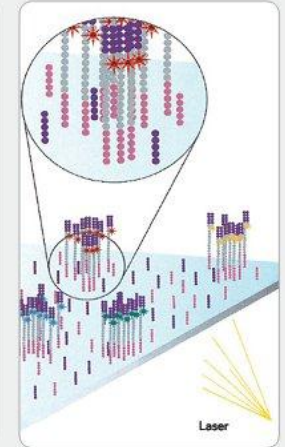
First chemistry cycle: to initiate the first sequencing cycle, add all four labeled reversible terminators, primers and DNA polymerase enzyme to the flow cell.

## 8. IMAGE FIRST BASE



After laser excitation, capture the image of emitted fluorescence from each cluster on the flow cell. Record the identity of the first base for each cluster.

## 9. DETERMINE SECOND BASE



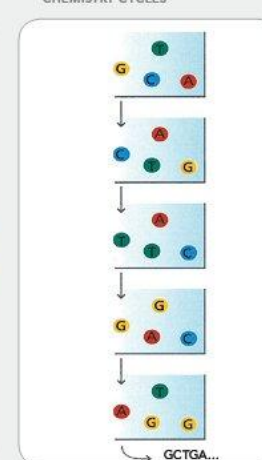
Second chemistry cycle: to initiate the next sequencing cycle, add all four labeled reversible terminators and enzyme to the flow cell.

## 10. IMAGE SECOND CHEMISTRY CYCLE



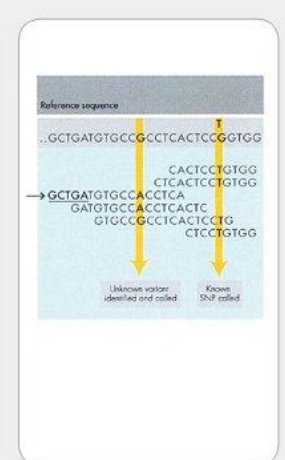
After laser excitation, collect the image data as before. Record the identity of the second base for each cluster.

## 11. SEQUENCE READS OVER MULTIPLE CHEMISTRY CYCLES



Repeat cycles of sequencing to determine the sequence of bases in a given fragment a single base at a time.

## 12. ALIGN DATA



Align data, compare to a reference, and identify sequence differences.



**Дякую за увагу!**