

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

# ГЕНЕТИКА

Підручник

*З а т в е р д ж е н о*  
*Міністерством освіти і науки України*  
*як підручник біологічних спеціальностей університетів*



УДК 575(075.8)  
ББК 28.04я73  
Г34

Рецензенти:  
д-р мед. наук, проф. І.Р. Барил'як,  
д-р біол. наук, проф. О.М. Дуган,  
д-р біол. наук, проф. В.В. Філоненко

За редакцією д-ра біол. наук., проф. А.В. Сиволоба

*Затверджено до друку Вченою радою  
Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
5 березня 2007 року*

Авторський колектив: д-р біол. наук, проф. А.В. Сиволоб (розд. 1, 2, 3, 5, 6, 9); канд. біол. наук, доц. С.Р. Рушковський (розд. 4, 6, 7); канд. біол. наук, асист. С.С. Кир'яченко (розд. 6, 9); канд. біол. наук, асист. К.С. Афанас'єва (розд. 4, 6); канд. біол. наук, доц. В.Ф. Безруков (розд. 8); канд. біол. наук, доц. І.А. Козерецька (розд. 3); д-р біол. наук, проф. С.В. Демидов (розд. 9).

**Сиволоб, А.В.**

Г34 Генетика : підручник / А.В. Сиволоб, С.Р. Рушковський, С.С. Кир'яченко та ін. ; за ред. А.В.Сиволоба. – К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008. – 320 с.

ISBN 975-966-439-108-2

Викладено сучасні уявлення про механізми спадковості й мінливості. Описано принципи молекулярної генетики, закономірності спадкування ознак, механізми мінливості генетичного матеріалу, особливості генетичних процесів у про- та еукаріотів, у тому числі в людини, а також основи генетики популяцій і генетичної інженерії.

Для студентів біологічних спеціальностей університетів, медичних і аграрних вищих навчальних закладів, а також для аспірантів і науковців, які цікавляться генетикою.

Іл. 135. Бібліогр.: 52.

**Гриф надано Міністерством освіти і науки України  
(лист № 1.4/18-Г-808 від 04.04.08)**

**ББК 28.04я73  
УДК 575(075.8)**

ISBN 975-966-439-108-2

© Сиволоб А.В., Рушковський С.Р., Кир'яченко С.С. та ін, 2008  
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008

# ЗМІСТ

<b>Вступ</b> .....	7
<b>Розділ 1. Природа генетичного матеріалу</b> .....	9
Структура ДНК .....	9
Хімічна будова нуклеїнових кислот .....	9
Подвійна спіраль.....	12
Білково-нуклеїнові взаємодії.....	15
Шлях передачі інформації в живих системах: "центральна догма" молекулярної генетики.....	17
ДНК як генетичний текст: організація геномів .....	18
Структурна організація ДНК у клітинах.....	22
Структура хроматину .....	23
Хромосоми .....	26
Реплікація ДНК .....	29
Репарація ДНК.....	35
Пряма репарація.....	35
Експізіційна репарація.....	36
Репарація некомплементарних пар основ – місметчів .....	38
Неточний синтез ДНК .....	39
Репарація дволанцюгових розривів.....	41
Гомологічна рекомбінація ДНК.....	42
Клітинний цикл і клітинний поділ в еукаріотів .....	47
Базові закономірності спадкування .....	50
<b>Розділ 2. Експресія генів</b> .....	53
Генетичний код .....	54
Синтез білків.....	57
Транспортні РНК.....	57
Рибосома й механізм трансляції .....	59
Експресія генів у прокаріотів .....	62
Транскрипція .....	62
Регуляція транскрипції .....	66
Експресія генів в еукаріотів .....	70
Ініціація транскрипції .....	71
Елонгація транскрипції, процесинг і термінація синтезу мРНК.....	79
Особливості білкового синтезу в еукаріотів .....	76
Регуляція генної експресії в еукаріотів.....	77

Регуляція транскрипції .....	77
РНК-інтерференція .....	82
Альтернативний сплайсинг.....	82
Що таке ген?.....	84
<b>Розділ 3. Формальна генетика: закономірності спадкування ознак .....</b>	<b>89</b>
Закони Менделя.....	90
Моногібридні схрещування.....	91
Взаємодія алелів одного гена .....	93
Дигібридні й полігібридні схрещування .....	95
Відхилення від менделівських розщеплень.....	96
Установлення факту відхилення: критерій $\chi^2$ .....	96
Причини статистично значущих відхилень від менделівських розщеп- лень .....	99
Взаємодія неалельних генів .....	101
Кількісні ознаки .....	108
Хромосоми як групи зчеплення генів .....	112
Спадкування ознак, зчеплених зі статтю .....	113
Кросинговер.....	115
Генетичні наслідки обмінів ділянками між гомологічними хромосомами .....	115
Подвійний кросинговер .....	118
Інтерференція .....	120
Конверсія гена .....	122
Нерівний кросинговер .....	122
Мітотичний кросинговер .....	123
<b>Розділ 4. Мінливість генетичного матеріалу.....</b>	<b>125</b>
Типи мутацій .....	126
Молекулярні механізми мутаційної мінливості.....	131
Пошкодження ДНК, що виникають у процесі життєдіяльності клітини .....	131
Помилки реплікації та репарації.....	133
Механізми виникнення поліплоїдій і анеуплоїдій.....	136
Індукція мутацій мутагенними факторами .....	137
Наслідки мутаційної мінливості .....	140
Модифікаційна мінливість .....	142
<b>Розділ 5. Генетика бактерій, вірусів і одноклітинних еукаріотів .....</b>	<b>145</b>
Організація генетичного апарату прокариотів .....	145
Обмін генетичним матеріалом між бактеріями.....	147
Бактеріофаги.....	150
Сайт-специфічна рекомбінація .....	152
Життєвий цикл бактеріофага $\lambda$ .....	154

Віруси еукаріотів .....	157
Одноклітинні еукаріоти .....	159
Дріжджі .....	160
Інфузорія.....	165
<b>Розділ 6. Генетика багатоклітинних еукаріотів .....</b>	<b>167</b>
Еукаріотичні геноми.....	168
Загальні риси будови еукаріотичних геномів .....	168
Генетичні ефекти активності мобільних елементів .....	172
Еволюційна зміна геномів .....	175
Запрограмовані геномні перебудови: V(D)J-рекомбінація імуноглобулінових генів.....	177
Епігенетичне спадкування .....	180
HP1-залежна система репресії .....	180
Метилювання ДНК.....	182
Гетерохроматин і РНК-інтерференція.....	183
Ефект положення гена.....	184
Цитоплазматична спадковість: генетика мітохондрій і хлоропластів .....	185
Геноми мітохондрій .....	186
Геном хлоропластів .....	188
Основні характеристики спадкування генів органел.....	190
Генетика статі.....	191
Механізми визначення статі.....	192
Спадкування ознак і стать .....	198
Компенсація дози генів і походження статевих хромосом .....	199
Генетика індивідуального розвитку.....	201
Генетичний контроль розвитку <i>Drosophila</i> .....	202
Розвиток <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	207
<b>Розділ 7. Генетика людини .....</b>	<b>213</b>
Людина як генетичний об'єкт.....	214
Геном людини .....	216
Визначення типів спадкування в людини. Складання родоводів.....	220
Кількісні й багатобактерні ознаки людини.....	226
Близнюковий метод і метод приймків .....	227
Спадкові хвороби .....	229
Генетика онкологічних захворювань.....	239
Генетичні аспекти еволюції людини.....	242
<b>Розділ 8. Генетика популяцій .....</b>	<b>247</b>
Властивості популяції .....	248
Чисельність .....	248
Мінливість.....	251
Структурованість.....	252
Системи схрещувань.....	252

Генетична структура популяції. Закон Харді – Вайнберга.....	253
Фактори динаміки генетичної структури популяцій .....	257
Дрейф генів .....	257
Інбридинг.....	260
Мутації .....	262
Міграції.....	263
Добір .....	264
Еволюційні процеси.....	268
<b>Розділ 9. Генетична інженерія і методи молекулярної генетики .....</b>	<b>271</b>
Методи генної інженерії .....	271
Основні ферменти генної інженерії.....	271
Клонування ДНК.....	274
Геномні бібліотеки.....	277
Полімеразна ланцюгова реакція .....	280
Аналіз структури й експресії генів і геномів.....	281
Експресія рекомбінантних білків .....	285
Генетична інженерія мікробіологічних систем .....	287
Генетична інженерія рослин.....	289
Генетична інженерія тварин .....	293
Генна терапія.....	296
<b>Ключові етапи розвитку генетики .....</b>	<b>301</b>
<b>Рекомендована література.....</b>	<b>305</b>
Основна .....	305
Додаткова .....	306
<b>Предметний покажчик.....</b>	<b>309</b>



## ВСТУП

Основним об'єктом генетики є *гени* (від γένος – рід, походження) – їхня структурно-функціональна організація, закономірності їхнього збереження, зміни та передачі нащадкам, а також принципи реалізації записаної в генах спадкової програми та взаємодій між генами в єдиній складній системі апарату спадковості. У загальному визначенні ген – це окремий елемент спадкової програми. Навести детальніше визначення, тим більше на початку підручника, яке б у кількох реченнях описувало головні властивості гена, практично неможливо. Сучасним уявленням про гени присвячена вся книга.

Матеріальною основою гена є молекула дезоксирибонуклеїнової кислоти – ДНК. Принципи структурної організації ДНК, процес її подвоєння у двох ідентичних копіях, а також механізми збереження спадкової інформації, які протидіють зовнішнім пошкоджуючим впливам і помилкам подвоєння, розглядаються в розділі 1. У цьому ж розділі описано загальні принципи організації спадкових програм, закодованих у молекулах ДНК, закономірності структурної організації ДНК у клітинах, процеси перетасування спадкової інформації при переміщеннях ділянок ДНК і шляхи передачі спадкового матеріалу дочірнім клітинам при клітинному поділі.

У розділі 2 описано механізми реалізації спадкової програми під час життя клітини: принципи декодування інформації, яка міститься в ДНК, і регуляції цього процесу. Власне, матеріал перших двох розділів і має дати початкову відповідь на запитання про те, що таке ген.

Розглянуті в перших розділах молекулярні основи спадковості дозволяють сформулювати базові закономірності спадкування зовнішніх ознак. Цьому присвячено розділ 3. У ньому більшість матеріалу базується на досягненнях генетики того періоду, коли генетичну роль ДНК ще не було встановлено, – генетика була в багатьох аспектах формаль-

ною наукою. Ці формальні генетичні закономірності повністю базуються на зрозумілих тепер молекулярних механізмах спадковості, а розроблені у той час методи генетичного аналізу й досі є актуальними.

Суттєвим аспектом існування спадкового матеріалу в живих системах є його мінливість унаслідок пошкоджуючих впливів і помилок у функціонуванні спадкового апарату. Механізми цієї мінливості, яка не тільки призводить до небажаних наслідків, але й постачає матеріал для еволюційного процесу, розглядаються в розділі 4.

Наступні 5 і 6 розділи стосуються особливостей організації та функціонування спадкового апарату в різних груп організмів – прокаріотів, вірусів, одно- та багатоклітинних еукаріотів.

Розділ 7 присвячено генетиці людини, яка посідає особливе місце серед інших розділів генетики окремих видів.

У розділі 8 викладено закономірності переміщення генетичного матеріалу в межах популяцій – великих груп організмів одного виду, що схрещуються між собою. Генетика популяцій є однією з головних основ для розуміння механізмів еволюції, оскільки саме популяція являє собою найдрібнішу еволюційну одиницю.

Найновітнішому прикладному аспекту генетики – огляду підходів, які можна об'єднати під назвою генетична інженерія, – присвячено останній 9 розділ. Генетична інженерія, спрямована на зміну генетичних програм організмів, водночас є основною групою методів дослідження в молекулярній генетиці.

Наприкінці підручника вміщено історичну довідку, в якій відображено головні етапи розвитку генетики. Крім того, наведено перелік літератури, рекомендованої для глибшого вивчення сучасних проблем цієї науки.





## РОЗДІЛ 1

# Природа генетичного матеріалу

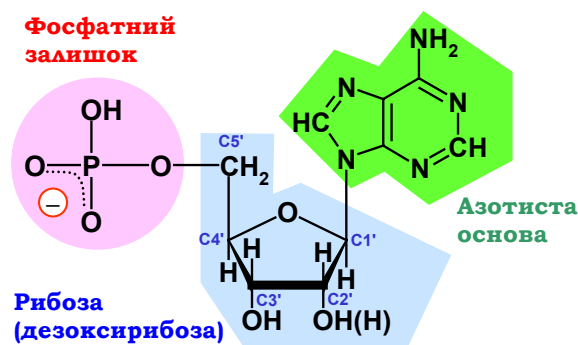
Як фізичний об'єкт **ген** – це ділянка полімерної молекули дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). Єдиним винятком із цього загального для всіх живих організмів правила є особливий клас вірусів, де роль носія інформації виконує інша нуклеїнова кислота (хімічний аналог ДНК) – рибонуклеїнова кислота (РНК). Численні типи РНК беруть також участь у процесах реалізації генетичної інформації в усіх організмах.

Фізико-хімічні властивості молекули ДНК роблять її надійним носієм спадкової інформації та забезпечують простий механізм **реплікації** – точного відновлення молекули (а отже, і спадкової програми) у дочірніх клітинах при клітинному поділі. Численні взаємодії, в які вступає ДНК з іншими молекулами (насамперед білками), зумовлюють певну схему упаковки ДНК у клітинах, експресію генетичної інформації та регуляцію цього процесу, а також здійснення інших операцій, суттєвих для функціонування спадкового апарату.

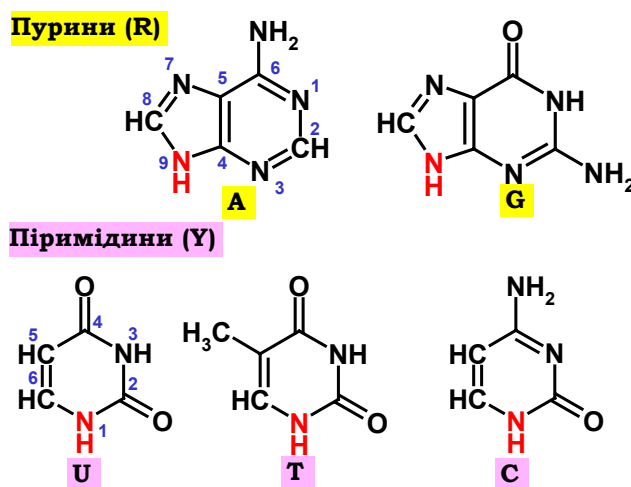
## СТРУКТУРА ДНК

### Хімічна будова нуклеїнових кислот

Мономерна одиниця нуклеїнової кислоти – *нуклеотид* – складається з трьох елементів: азотиста основа, пентозний цукор (рибоза або дезоксирибоза), залишок фосфорної кислоти (рис. 1.1).



**Рис. 1.1.** Хімічна будова нуклеотиду. Наведено стандартну нумерацію атомів пентозного кільця



**Рис. 1.2.** Азотисті основи. Червоним позначено атом N, з'єднаний у нуклеотиді з C1' атомом пентози. Наведено стандартну нумерацію атомів кілець пуринів і піримидинів

*Азотисті основи* – гетероциклічні сполуки (рис. 1.2), у кільцях яких містяться карбон і азот, а всі зв'язки мають характер частково подвійних. До певних атомів кільця приєднані екзоциклічні групи – аміногрупа чи атом оксигену. До складу нуклеїнових кислот входять два типи азотистих основ: пурини (загальноприйняте позначення R) – аденін (A)

і гуанін (G); піримідини (Y) – урацил (U), тимін (T), цитозин (C). Загальне позначення для всіх основ – N. У складі нуклеотиду один із атомів азоту кільця (виділено червоним на рис. 1.2) приєднується ковалентним зв'язком до карбону пентозного цукру (рис. 1.1). Цей атом пентози позначається як C1' (символ ' прийнято додавати, щоб відрізнити атоми пентозного кільця від атомів азотистої основи). Інші C'-атоми пентози нумеруються далі по порядку їхнього розташування (рис. 1.1). До 3'-атома завжди приєднана ОН-група. Пентоза, у складі якої ОН-група знаходиться також при 2'-атомі, називається *рибозою*. Пентоза іншого типу, яка також входить до складу нуклеїнових кислот, – *дезоксирибоза* – відрізняється лише заміною цієї ОН-групи на атом гідрогену.

Сполука азотистої основи та пентози називається *нуклеозидом* (залежно від типу азотистої основи: аденозин, гуанозин, цитидин, тимідин, уридин) або *рибо-* чи *дезоксирибонуклеозидом* (залежно від типу пентози). Рибонуклеозиди входять до складу РНК, дезоксирибонуклеозиди – до ДНК. Інша хімічна різниця між ДНК і РНК стосується складу піримідинових азотистих основ: Т у ДНК замість U в РНК.

Фосфорильовання ОН-групи при 5'-атомі пентози в нуклеозиді приводить до утворення нуклеотиду (рис. 1.1). Таким чином, нуклеотид є нуклеозидфосфатом або нуклеозидмонофосфатом (NMP). Так, нуклеотид, що зображений на рис 1.1, є аденозинмонофосфатом (AMP).

Будівним матеріалом для синтезу полімерних нуклеїнових кислот є нуклеозидтрифосфати, у складі яких ще два фосфатні залишки послідовно приєднані до 5'-фосфату, – у реакціях синтезу вони відщеплюються.

При синтезі дві хімічні групи – ОН-група при 3'-атомі пентози одного нуклеотиду та фосфат при 5'-атомі іншого – використовуються для утворення *фосфодієфірного зв'язку* між нуклеотидами (рис. 1.3). Отже, полінуклеотидний ланцюг має напрямок: на одному його кінці залишається 5'-фосфат (5'-кінець), на іншому – 3'-ОН-група (3'-кінець). Послідовності нуклеотидів прийнято записувати в напрямку 5' → 3', у тому ж напрямку відбувається синтез усіх нуклеїнових кислот. **Генетична інформація записана в молекулі ДНК саме у вигляді послідовності нуклеотидів.**

Отже, остов полінуклеотидного ланцюга являє собою фосфатні залишки (кожен із яких має негативний заряд за фізіологічних умов) і пентози, що чергуються – *цукрофосфатний остов*. Від цього остова відходять азотисті основи як бокові залишки.

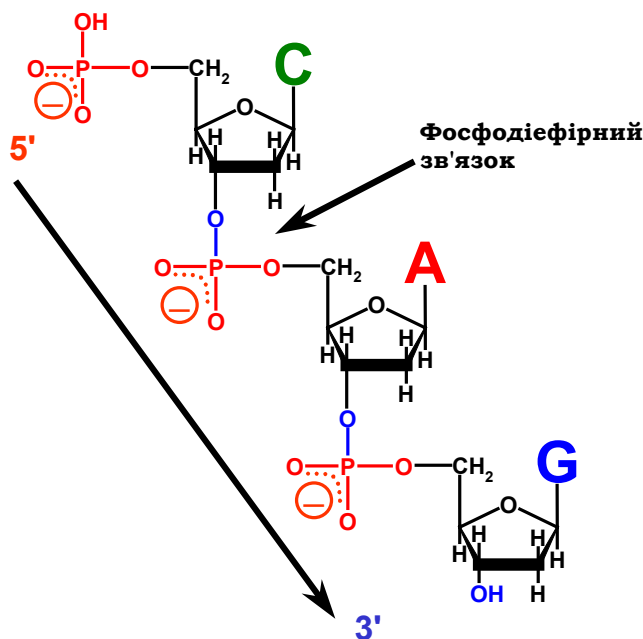
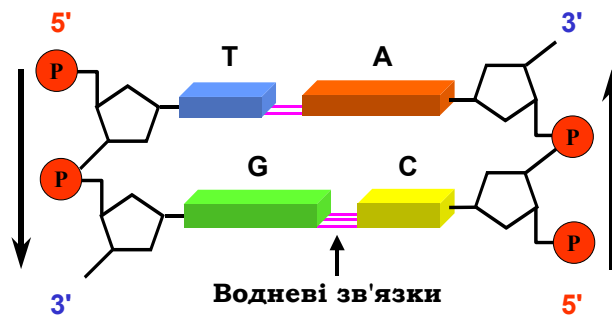


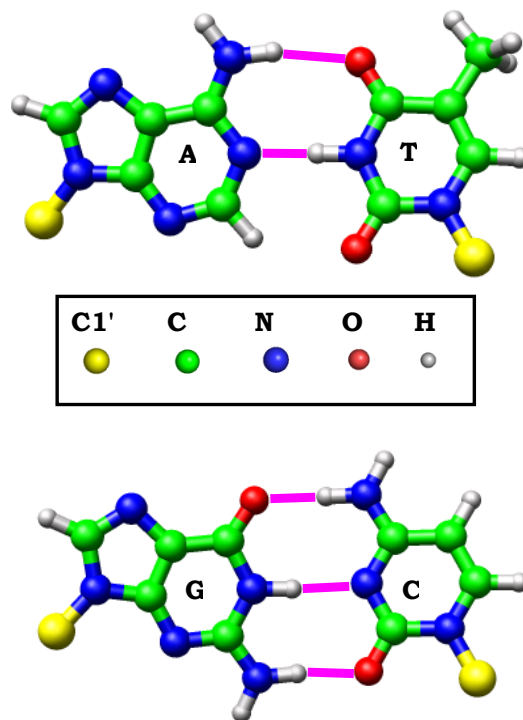
Рис. 1.3. Полінуклеотидний ланцюг

## Подвійна спіраль

Два полінуклеотидні ланцюги (насамперед ДНК, але в окремих випадках – також РНК або гібридні РНК-ДНК) можуть об'єднуватися в єдину дволанцюгову структуру (**дуплекс**), схему якої представлено на рис. 1.4. Таке об'єднання відбувається за жорсткої умови: певні азотисті основи повинні стояти одна проти одної – А проти Т (чи U), G проти С. Цей **принцип комплементарності**, сформульований Уотсоном і Кріком (James D. Watson, Francis H. C. Crick), зумовлений утворенням специфічних водневих зв'язків між екзоциклічними групами названих основ: два зв'язки в парі А-Т, три в парі G-С (рис. 1.5). Принцип комплементарності є ключовим для розуміння функціонування нуклеїнових кислот.

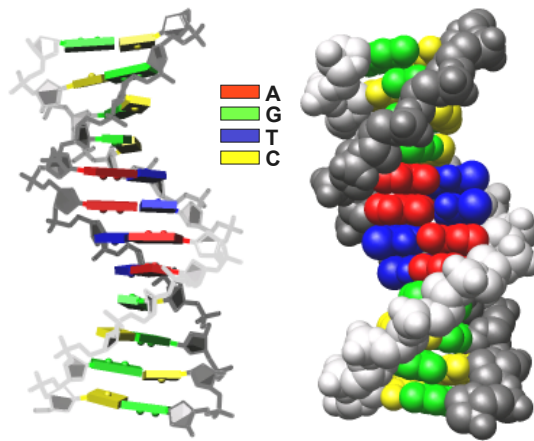


**Рис. 1.4.** Схема об'єднання двох динуклеотидів у дволанцюгову структуру



**Рис. 1.5.** Комплементарні пари основ у складі ДНК з водневими зв'язками між основами

Два ланцюги у складі дуплекса спрямовані в різні боки (є *антипаралельними*), цукрофосфатні остови (які добре взаємодіють з водою) розташовані зовні, пари основ – усередині цієї структури. Унаслідок взаємодій між площинами сусідніх пар основ (*стекинг-взаємодій*) полінуклеотидні ланцюги закручуються один навкруг одного в подвійну спіраль (рис. 1.6). Між остовами на поверхні спіралі утворюються два жолобки різного розміру – великий і маленький, в які "дивляться" певні екзоциклічні групи азотистих основ, не задіяні до утворення комплементарних водневих зв'язків.



**Рис. 1.6.** Два варіанти зображення подвійної спіралі ДНК.

Показано структуру додекамеру ДНК у кристалах (код структури у Protein Data Bank 355D). Зображення створено за допомогою програми UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>)

За фізіологічних умов подвійна спіраль є досить стабільною структурою, саме в цій формі ДНК існує в живих системах. Різноманітні молекули РНК, як правило, є одноланцюговими, але окремі взаємокомплементарні ділянки РНК часто також формують двоспіральні структури в межах однієї молекули.

Подвійним спіралям нуклеїнових кислот притаманний досить значний структурний поліморфізм, що залежить від послідовності пар основ, типу пентозного цукру та зовнішніх умов. Структура, зображена на рис. 1.6, є так званою В-формою ДНК: права спіраль з ~10,5 парами основ на виток. Саме в цій формі ДНК існує за фізіологічних умов *in vivo*.

Інша – А-форма (також права спіраль, ~11 пар основ на виток, значний нахил площин пар основ відносно осі спіралі) – реалізується у ДНК лише *in vitro* за певних умов, далеких від фізіологічних. Проте саме в А-формі існують подвійні спіралі РНК за фізіологічних умов (причиною є заміна дезоксирибози на рибозу). Крім того, ДНК може переходити в А-форму або наближену до неї в комплексах із білками.

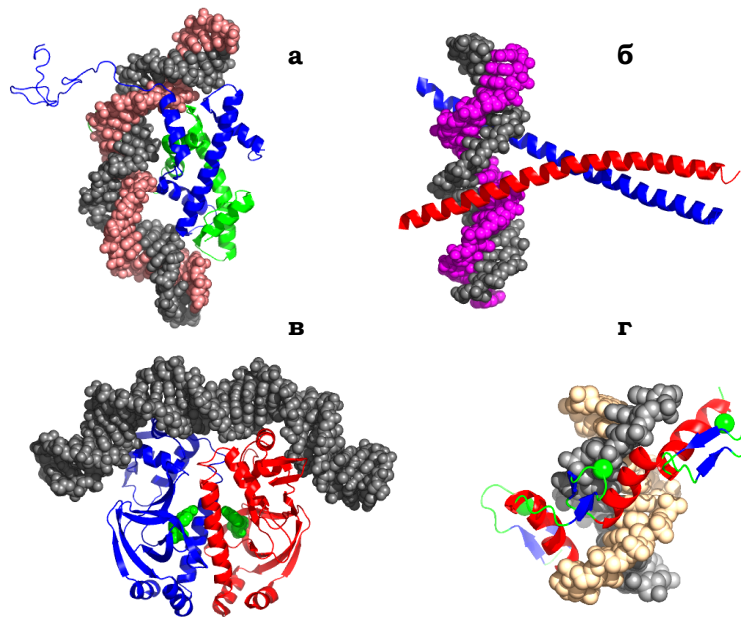
Ще одна форма подвійної спіралі – Z-форма – є лівою спіраллю і реалізується тільки для альтернувальних послідовностей poly(GC) (коли G і C чергуються в ланцюзі). Такі послідовності є в природних ДНК, але перехід у Z-форму відбувається *in vitro* за умов, які дуже далекі від фізіологічних. Біологічне значення Z-форми залишається не зовсім зрозумілим, хоча знайдено білки, що мають високу спорідненість саме до неї, тобто можуть індукувати B→Z перехід *in vivo*.

Структура основної фізіологічної B-форми ДНК не є абсолютно регулярною. Конформаційні особливості подвійної спіралі (ступінь закручення, локальні вигини, розміри жолобків тощо) суттєво залежать від послідовності пар основ – можна сказати, що послідовність несе інформацію про структурні особливості ДНК (подібно до того, як амінокислотна послідовність визначає просторову структуру білка). Крім того, послідовність пар основ зумовлює варіації стабільності подвійної спіралі (визначає, наскільки легко можна розвести полінуклеотидні ланцюги) і конформаційну рухливість (здатність спіралі до деформацій – вигинів, зміни спіральної періодичності тощо). Залежні від послідовності особливості структури подвійної спіралі та потенціал щодо конформаційних змін – основа механізму специфічного впізнання послідовностей ДНК білками.

## **Білково-нуклеїнові взаємодії**

ДНК у живих системах постійно взаємодіє з великою кількістю білків. На поверхні ДНК розташовані фосфатні залишки та екзоциклічні групи азотистих основ у жолобках. Саме ці групи й залучаються до контактів з амінокислотними боковими залишками та пептидними групами на поверхні білка. Усі білки, які взаємодіють із ДНК, можна розділити на дві категорії: такі, що зв'язуються з ДНК будь-якої послідовності, і ті, що здійснюють специфічне впізнання певної послідовності пар основ. Білки, котрі здійснюють таке впізнання, як правило, взаємодіють і з будь-якою іншою послідовністю ДНК неспецифічно.

Кілька прикладів структури білково-нуклеїнових комплексів наведено на рис. 1.7. Димер гістонів H3-H4 (рис. 1.7, а) здійснює неспецифічні електростатичні (іонні) взаємодії з фосфатами ДНК, виконуючи роль в упаковці ДНК у клітинному ядрі, про що йтиметься нижче. Інші білки, зображені на рис. 1.7, виконують роль регуляторів генної активності, специфічно впізнаючи певні ділянки послідовності.



**Рис. 1.7.** Приклади білково-нуклеїнових комплексів: димер гістонів H3-H4 (а); лейциновий зіпер (б); катаболічний активаторний білок (в); білок із цинковими пальцями (г). Зображення створено за допомогою програми PyMOL (<http://www.pymol.org/>), використано структури з Protein Data Bank із кодами 1AOI, 1NWQ, 1CGP, 1ZAA

Головною умовою реалізації контактів між ДНК і білком є взаємна підгонка структури взаємодіючих елементів унаслідок відповідних конформаційних перетворень: шляхом певних структурних перебудов (іноді невеликих, іноді досить значних) подвійної спіралі хімічні групи ДНК "підводяться" під контакти з білковими хімічними групами. Тобто для ефективного впізнання необхідна певна конформація подвійної спіралі та/або певні зміни цієї конформації. І те, й інше визначається послідовністю пар основ.



## ШЛЯХ ПЕРЕДАЧІ ІНФОРМАЦІЇ В ЖИВИХ СИСТЕМАХ: "ЦЕНТРАЛЬНА ДОГМА" МОЛЕКУЛЯРНОЇ ГЕНЕТИКИ

Магістральний шлях передачі інформації в біологічних системах відображає схема, яка була, виходячи з принципів структурної організації подвійної спіралі ДНК, запропонована у свій час Френсісом Кріком під назвою *центральна догма молекулярної біології* (рис. 1.8).

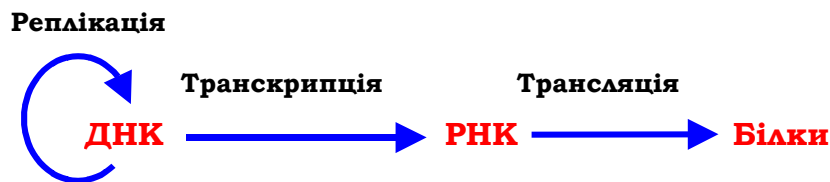


Рис. 1.8. Центральна догма молекулярної біології та генетики

Інформаційним джерелом є ДНК, а кінцевою точкою передачі інформації – білки (біополімери, побудовані з 20 типів *амінокислот*). Велике розмаїття амінокислотних послідовностей створює можливості для реалізації різноманітних шляхів укладання ланцюгів у просторі – утворення специфічних просторових структур білків для виконання певних специфічних завдань. Головним типом цих завдань є каталіз численних біохімічних реакцій (у тому числі тих, що забезпечують передачу біологічної інформації). Крім того, білки є основним будівним матеріалом будь-якої біологічної системи й зумовляють виконання всіх інших біологічних функцій: транспорт речовин, передачу регуляторних сигналів, спрямовані рухи, захист від чужорідних молекул тощо. Отже, саме білки, головним чином, зумовляють усі фізіологічні особливості та зовнішні ознаки організму.

Спадкова інформація, яка записана в послідовності нуклеотидів на ділянці ДНК, є інформацією про послідовність амінокислот у складі білка. Отже, **ген – це окрема змістовна ділянка ДНК, у послідовності якої закодована амінокислотна послідовність білка**. Проте, крім білкових, існує також велика кількість генів, кінцевими продуктами яких є різноманітні молекули РНК. Але незалежно від типу гена, первинним продуктом його активності (проміжним для білкових генів) є молекула РНК. Під час **транскрипції** нуклеотидна послідовність

одного з ланцюгів ДНК за принципом комплементарності переписується в нуклеотидну послідовність РНК – ДНК використовується як матриця, на якій будується комплементарна РНК-репліка. Молекула РНК, що синтезується на білковому гені, використовується далі як матриця для білкового синтезу – **трансляції** (переписування нуклеотидної послідовності РНК в амінокислотну послідовність білка).

Суттєвим моментом функціонування біологічної системи є не тільки реалізація (експресія) генетичної інформації, а й її збереження та подвоєння з метою передачі наступному поколінню. Подвоєння інформації – це відтворення молекули ДНК у двох ідентичних дочірніх копіях – **реплікація**. Головним її механізмом знову ж таки є принцип комплементарності: кожен із ланцюгів ДНК використовується як матриця для синтезу комплементарної ДНК-репліки.

З кількома суттєвими уточненнями (у деяких вірусів спадкова інформація міститься в молекулі РНК; в усіх організмів у процесі функціонування клітин працюють також шляхи передачі інформації з РНК на РНК і на ДНК; не тільки білки, але й РНК певних типів мають значення для клітинних фізіологічних процесів) центральна догма є головним фундаментальним принципом роботи апарату спадковості.

## ДНК ЯК ГЕНЕТИЧНИЙ ТЕКСТ: ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

Як джерело інформації **ген** – це ділянка ДНК, у послідовності нуклеотидів якої записано інформацію про певний функціональний продукт. За типом цього продукту всі гени (сукупність генів даного організму називають **генотипом**) можна поділити на дві групи: гени, кінцевим продуктом яких є певні функціональні молекули РНК (гени РНК), і гени, у послідовності яких відповідно до генетичного коду (див. розділ 2) записано інформацію про послідовність амінокислот у складі білків (білкові гени). Гени РНК кодують різноманітні молекули РНК, що не піддаються трансляції (див. розділ 2): **рРНК** – рибосомні РНК (компоненти рибосом); **тРНК** – транспортні РНК (ключовий елемент системи трансляції); маленькі ядерні РНК; маленькі ядерцеві РНК; мікро-РНК; молекули РНК, що є компонентами деяких ферментів; інші види РНК, із яких ще не для всіх з'ясовані їхні функції. На білковому гені синтезується РНК-матриця для наступного синтезу білка – матрична (або інформаційна) РНК – **мРНК**.

Кодуюча послідовність ДНК, з якої під час транскрипції знімається інформація про послідовність нуклеотидів у складі РНК-репліки, є найважливішою змістовною частиною гена. Але для того, щоб відбулась експресія генетичної інформації (через синтез РНК і далі – білка), не менш важливими є регуляторні послідовності ДНК, які (за рахунок спорідненості до специфічних білків) використовуються для вмикання / вимикання транскрипції як першої стадії експресії гена. Отже, визначення гена можна сформулювати й так: **ген – це ділянка ДНК, яка є необхідною і достатньою для повноцінного синтезу функціональної молекули РНК.** Ділянка ДНК, яка може вважатися геном, має містити кодуючу послідовність із записаною інформацією про продукт, а також певний набір регуляторних елементів послідовності, від яких залежить запуск / блокування процесу транскрипції, шлях зчитування інформації тощо.

У кожній клітині багатоклітинного організму міститься кілька (іноді до кількох десятків) молекул ДНК – їхній набір однаковий для всіх клітин. Ця ДНК містить не тільки гени: принаймні мають бути з'єднувальні міжгенні ділянки. **Скупність послідовностей ДНК у клітинах даного організму називається геномом.** На сьогодні повністю встановлено послідовності понад 700 бактеріальних і близько 100 еукаріотичних геномів. Головна відмінність між ними полягає в тому, що у прокаріотичних геномах кодуючі послідовності становлять близько 95 %, тоді як частка кодуючих послідовностей у геномах еукаріотів не перевищує 3 %. Розміри деяких геномів і оцінку кількості білкових генів у їхньому складі наведено в табл. 1.1.

Таблиця 1.1. Розміри геномів і кількість білкових генів деяких організмів

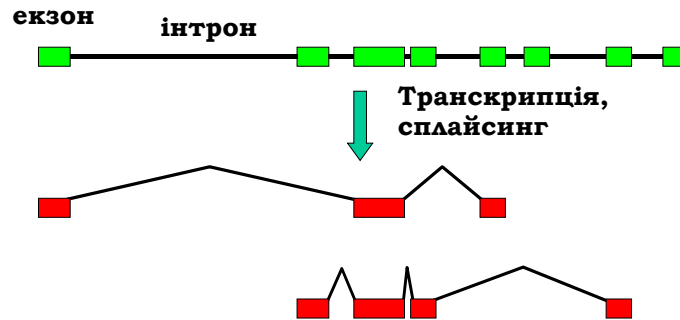
Організм	Розмір геному (пари основ)*	Кількість молекул ДНК*	Кількість генів
Бактеріофаг φX-174	5386	1	10
Бактерія <i>Escherichia coli</i>	$4,6 \cdot 10^6$	1	4100
Аскоміцет <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,2 \cdot 10^7$	16	6700
Нематода <i>Caenorhabditis elegans</i>	$10^8$	6	20000
Плодова мушка <i>Drosophila melanogaster</i>	$1,3 \cdot 10^8$	4	14000
Курка <i>Gallus gallus</i>	$10^9$	33	13000
Миша <i>Mus musculus</i>	$3,3 \cdot 10^9$	20	22000
Людина <i>Homo sapiens</i>	$3,2 \cdot 10^9$	23	21000

\* Для еукаріотів розмір геному та кількість молекул відображають половину ДНК у клітинному ядрі.

Вірусні геноми побудовані надзвичайно "економно": кодуючі ділянки генів займають практично всю, порівняно невелику, вірусну ДНК. У геномі прокаріотичної клітини кількість ДНК і генів значно зростає, але зберігається принцип економності щодо використання більшості послідовностей для кодування генетичної інформації. Наприклад, геном *Escherichia coli* представлений однією циркулярною молекулою ДНК (так званою бактеріальною хромосоною) довжиною 4,6 млн пар основ. Близько 90 % цієї ДНК припадає на кодуючі послідовності ~4,1 тис. білкових генів і ~120 генів РНК, що не транскрибуються.

Еукаріотичні геноми містять значно більшу кількість ДНК порівняно з геномами прокаріотів (див. табл. 1.1), причому переважна частина цієї ДНК представлена некодуючими послідовностями. У тому числі, приблизно половина еукаріотичного геному – це послідовності, представлені багатьма копіями (послідовності, що повторюються). Еукаріотична ДНК знаходиться у клітинному ядрі у складі **хромосом**, кожна хромосома містить одну гігантську лінійну молекулу ДНК. Послідовності, що повторюються, зосереджені, зокрема, на кінцях хромосом (**теломери**) та в зонах прикріплення хромосом до веретена поділу при мітозі та мейозі (**центромери**).

Характерною ознакою генів еукаріотів (на відміну від прокаріотів) є мозаїчний принцип будови кодуючої частини (рис. 1.9): власне кодуюча частина представлена послідовністю окремих змістовних ділянок – **екзонів**, розділених беззмістовними **інтронами**. Часто екзони відповідають окремим структурним доменам мультидоменних білків: еволюційне збирання білка з кубиків-доменів може здійснюватись шляхом перетасування екзонів на рівні ДНК. Беззмістовними інтронами є в тому сенсі, що не несуть інформації про кінцевий продукт, але в межах інтронів часто розташовані важливі регуляторні ділянки. Крім того, інтрони деяких генів можуть містити інші гени зі своїми інтронами та екзонами. При транскрипції молекула РНК синтезується суцільно (первинний продукт транскрипції – первинний транскрипт – має у своєму складі екзони та інтрони). Отже, необхідним етапом експресії гена є процес **сплайсингу** (розділ 2) – вирізання інтронів і зшивання екзонів у кінцевий транскрипт, який уже може бути використаний як матриця для білкового синтезу. При цьому сплайсинг може бути спрямований по різних шляхах (рис. 1.9) – **альтернативний сплайсинг**, – що приводить до утворення різних кінцевих продуктів – різних білків.



**Рис. 1.9.** Мозаїчна будова кодуєчої частини гена та схема утворення різних мРНК (ламані лінії – інтрони, що вирізаються) унаслідок альтернативного сплайсингу

Загальна кількість генів у геномах вищих еукаріотів варіює приблизно від 20 до 30 тис. (табл. 1.1). Як показано на рис. 1.10, кодуєчі послідовності цих генів займають лише ~1,5 % геному. Решта припадає на міжгенну ДНК (де розташовані також регуляторні ділянки), інтрони (~30 %) і більше ніж половину геному становлять послідовності, що повторюються.



**Рис. 1.10.** Приблизний відносний вміст послідовностей різних типів в еукаріотичному геномі

Основні типи повторів, присутні в геномі вищих еукаріотів:

- гени, представлені кількома (а іноді до 1 тис.) копіями. Часто гени, котрі повторюються, згруповані в кластери, тобто знаходяться поряд один з одним;

- псевдогени – послідовності, які гомологічні певним генам, але не експресуються. До їхньої появи приводять, наприклад, порушення частини генів, що повторюються: непошкоджені гени беруть на себе функцію пошкоджених, а останні так і залишаються в геномі;
- багатократні повтори коротких послідовностей (тандемні повтори), частина яких розподілена по всьому геному, але більшість зосереджена в теломерних і центромерних зонах хромосом;
- інтерсперсні (дисперговані) мобільні елементи, здатні до переміщення та розмноження в межах геному. Мобільні елементи займають значну частину еукаріотичного геному (від 30 до 50 %), але розподілені в геномі нерівномірно: є довгі ділянки, що на 90 % представлені мобільними елементами, і такі зони, де інтерсперсні елементи відсутні. У цілому спостерігається негативна кореляція між щільністю генів і мобільних елементів. Детальніше про типи еукаріотичних мобільних елементів йтиметься в розділі 6.

Крім клітинного ядра, ДНК є також у мітохондріях і хлоропластах, де являє собою автономний, невеликий порівняннї з ядерним, цитоплазматичний елемент еукаріотичного геному (див. розділ 6).

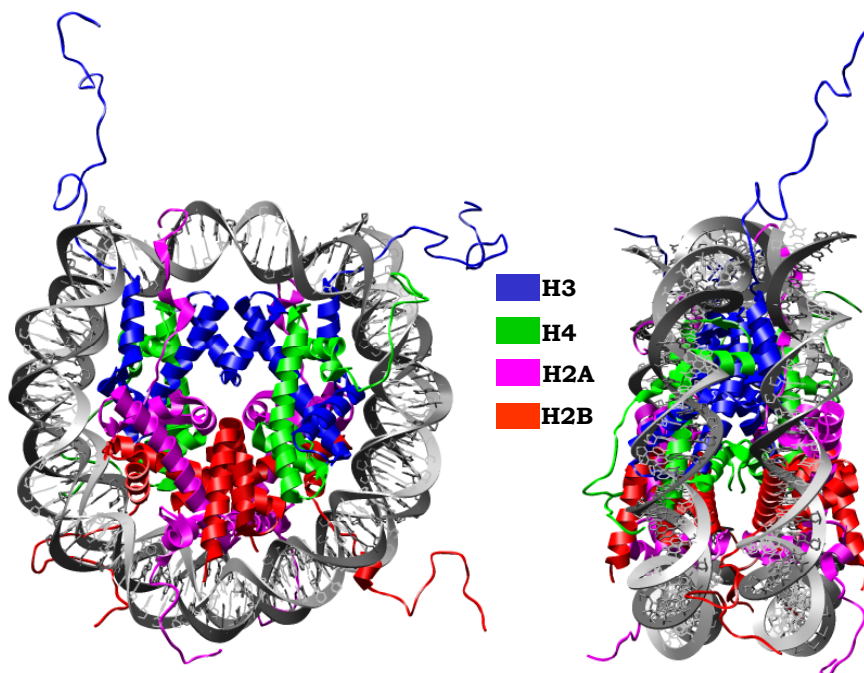
## СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ДНК У КЛІТИНАХ

Циркулярна ДНК бактеріальної хромосоми існує в клітині у вигляді комплексу з білками. Ця взаємодія є досить динамічною, і практично весь бактеріальний геном (що принципово відрізняє його від еукаріотичного) перебуває в потенційно транскрипційно-активному стані: гени є об'єктами швидкої оперативної регуляції у відповідь на зміну зовнішніх умов.

Загальна довжина ДНК у ядрі еукаріотичної клітини – близько 2 м. Така кількість ДНК вимагає її щільної упаковки, яка зумовлює тотальне пригнічення функціональних активностей у більшій частині геному. Але при цьому упаковка ДНК у клітинному ядрі має дозволяти вибірково активацію певних ділянок у певні моменти часу. Ці альтернативні завдання вирішуються завдяки тому, що ДНК існує в клітинному ядрі у вигляді складного нуклеопротейнового комплексу – **хроматину**. Нуклеопротейновий комплекс, який містить одну гігантську лінійну молекулу ДНК називають **хромосомою**.

## Структура хроматину

На першому рівні організації хроматину ДНК формує за рахунок взаємодії з білками елементарні утворення – *нуклеосоми*. Білковий компонент нуклеосоми (кор) складається з восьми молекул *корових гістонів* H2A, H2B, H3 і H4 – по дві молекули кожного типу (див. структуру димеру H2A-H2B, який є компонентом кора, на рис. 1.7, а). Октамерний комплекс гістонів має на своїй поверхні своєрідний трек позитивно заряджених амінокислотних залишків, який використовується для взаємодії з нуклеосомною ДНК довжиною 145 пар основ: ДНК утворює на поверхні октамера ~1,7 витка лівої суперспіралі (рис. 1.11).



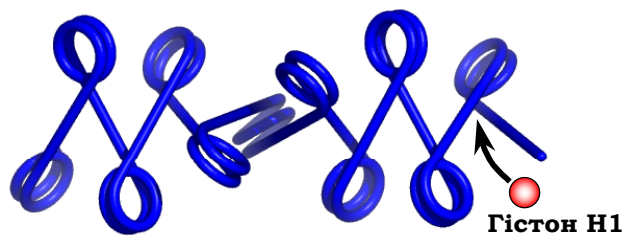
**Рис. 1.11.** Структура нуклеосоми у двох проєкціях. Зображення створено за допомогою програми UCSF Chimera, код структури у Protein Data Bank 1KX5

У хроматині *вся* ДНК формує нуклеосоми із середньою щільністю одна нуклеосома на 200 пар основ, сусідні нуклеосоми з'єднані між-нуклеосомними *лінкерними* ділянками. Нуклеосомна ДНК разом із лінкерною ділянкою становлять так званий *нуклеосомний повтор*,

довжина якого варіює як уздовж полінуклеосомного ланцюга, так і залежно від функціонального стану, типу клітин тощо. Характер розподілу нуклеосом уздовж геномної ДНК має важливе функціональне значення: зрозуміло, що лінкерна ДНК є більш доступною для зовнішніх регуляторних впливів.

Як показано на рис. 1.11, кінцеві неупорядковані ділянки гістонів (хвості) виходять за межі нуклеосом. Завдяки своїй структурній лабільності вони беруть участь в організації хроматину на наднуклеосомному рівні, а також відіграють важливу роль платформи для зв'язування різноманітних білків. Така взаємодія з білками має важливі функціональні наслідки для регуляції генної активності й залежить від посттрансляційних модифікацій хвостів – приєднання певних хімічних груп до певних амінокислотних залишків: ацетилювання, фосфорилування, метилювання та деяких інших. Співвідношення між характером модифікацій і набором білків, які впізнають певний розподіл модифікованих груп по хвостах, називають *гістоновим кодом*.

Лінкерна ділянки, якими з'єднані сусідні нуклеосоми, продовжують хід нуклеосомної ДНК по прямій: у результаті нуклеосоми у складі полінуклеосомної нитки розташовані зигзагом (рис. 1.12). За рахунок взаємодії з ДНК неупорядкованих хвостів корових гістонів і молекула п'ятого гістона – гістона H1 (одна молекула на нуклеосому) – полінуклеосомний зигзаг конденсується з утворенням так званої фібрили діаметром 30 нм – другого рівня компактизації хроматину.



**Рис. 1.12.** Зигзагоподібна конфігурація полінуклеосомної нитки

Фібрила діаметром 30 нм є основною формою хроматину під час *інтерфази* – періоду між клітинними поділами. Однак у хроматині існує значна гетерогенність за ступенем конденсації. З одного боку, передумовою активації окремих ділянок хроматину є деконденсація



фібрили. З іншого, – у репресованих ділянках хроматинова фібрила може бути як додатково стабілізованою в компактному стані, так і піддаватися компактизації більш високого порядку. Частина хроматину, що зберігає стан підвищеної компактизації протягом інтерфази, називається **гетерохроматином** (решта хроматину, де в принципі може відбуватися активація транскрипції, позначається як **еухроматин**). Утворення гетерохроматину здійснюється головним чином у ділянках, що містять повтори – у центромерах, теломерах та суміжних перичентромерних і субтеломерних ділянках, зонах концентрації мобільних елементів.

На наступному рівні структурної організації у клітинному ядрі хроматинова фібрила формує петлі, кінці яких жорстко закріплені на скелетних білкових структурах клітинного ядра – *ядерному матриксу* (рис. 1.13). Одна петля, що містить від 20 до 200 тис. пар основ ДНК (один або кілька генів) часто розглядається як важливий елемент регуляції процесів транскрипції та реплікації. Із білками матриксу взаємодіють ділянки ДНК довжиною від 300 до 1 тис. пар основ – ділянки, асоційовані з матриксом (MAR, Matrix Associated Regions).



Рис. 1.13. Схема петельної організації хроматину

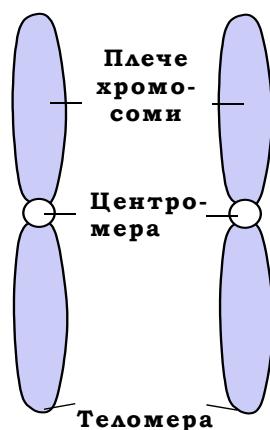
Ядерний матрикс – це система білкових філаментів, яка формує структурний каркас ядра. На периферії ядра розташована особлива частина матриксу, асоційована із внутрішньою ядерною мембраною – *ядерна ламіна*. Від ламіни всередину ядра протягнуті філаменти внутрішнього ядерного матриксу. З ламіною взаємодіє значна частина гетерохроматину, зокрема центромери й теломери хромосом. Еухроматинова частина хромосоми "звисає" всередину ядра, де хроматинові петлі закріплюються на внутрішній частині матриксу. У результаті хромосома займає певну зону в об'ємі ядра – *хромосомну територію*.

## Хромосоми

У соматичних клітинах переважної більшості багатоклітинних організмів існує подвійний (парний) набір хромосом: **гомологічні** хромосоми кожної пари містять *майже* однакові молекули ДНК із *майже* однаковим набором генів, які розташовані вздовж молекули ДНК в однаковому для двох хромосом порядку (мають певні визначені місця у хромосомі – **хромосомні локуси**). Таким чином, можна розглядати **ген як певний хромосомний локус**. При утворенні статевих клітин (**гамет**) до однієї з них переходить по одній хромосомі від пари гомологічних хромосом (див. процес мейозу, описаний нижче) – статеві клітини містять одинарний (**гаплоїдний**) набір хромосом. Відповідно, при заплідненні відбувається об'єднання двох гаплоїдних хромосомних наборів з утворенням **диплоїдного** набору нащадка. Оскільки дві гомологічні хромосоми походять від різних особин, вони не є абсолютно ідентичними: певні гени можуть бути відсутніми в одній із гомологічних хромосом або мати відмінності у своїх нуклеотидних послідовностях. Різні варіанти одного гена (локусу) називають **алелями** даного гена.

Слід зауважити, що хромосомні набори багатьох організмів, які розмножуються статевим шляхом, містять одну пару **статевих хромосом** (усі інші хромосоми називають **аутосомами**), які представлені двома негомологічними типами. Як правило, одна зі статей є гомогаметною (містить дві статеві хромосоми одного типу), інша – гетерогаметною (різні статеві хромосоми), на чому й базується визначення статі нащадка при заплідненні (див. розділ 6). Слід зазначити також, що зазвичай **під геномом виду розуміють сукупність послідовностей ДНК у гаплоїдному наборі**. Саме в цьому розумінні наведено дані щодо розмірів геномів і кількості хромосом у табл. 1.1.

Коли клітина вступає в мітоз, після реплікації ДНК (і, відповідно, подвоєння диплоїдного набору хромосом) починається утворення надкомпактної мітотичної хромосоми, деталі структурної організації якої залишаються недостатньо зрозумілими. Одночасно з компактизацією хроматинової фібрили частина ламіни "розчиняється" разом із ядерною мембраною, інша частина, разом із внутрішнім матриксом, перебудовується з утворенням білкового каркасу мітотичної хромосоми – хромосомного **скефолду** (scaffold), з яким залишаються зв'язаними основи хроматинових петель. Компактна мітотична хромосома, яка після відповідного забарвлення стає видимою під оптичним мікроскопом, має два плеча (рис. 1.14), розділених центромерною перетяжкою.



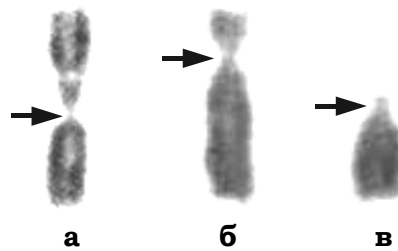
**Рис. 1.14.** Схема морфології двох гомологічних мітотичних хромосом

Центромера, що розділяє два плеча хромосоми, є ділянкою хромосоми, на якій відбувається утворення складного мультибілкового комплексу – *кінетохору*, необхідного для прикріплення мікротрубочок веретена поділу. На перших стадіях мітозу унаслідок реплікації ДНК (див. нижче) кожна хромосома представлена двома сестринськими хроматидами, з'єднаними між собою своїми центромерами за рахунок білок-білкових взаємодій. Пізніше веретено поділу забезпечує розходження дочірніх хромосом (див. обговорення мітозу нижче).

Довжина центромерної ділянки ДНК сильно варіює (від 125 пар основ у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до 0,1–4 млн пар основ у людини). У деяких видів, скажімо, у нематоди *Caenorhabditis elegans* та в річкового рака, окремі хромосоми мають дифузну центромеру – мікротрубочки прикріплюються по всій довжині хромосоми (так звані голоцентричні хромосоми). Найчастіше послідовність ДНК в ділянці центромери представлена тандемними АТ-збагаченими повторами й не містить активних генів. Гомології між центромерними послідовностями різних організмів чи певних консенсусних мотивів, притаманних лише центромерній ДНК, немає: провідну роль у визначенні структури центромери відіграють білки, які взаємодіють із ДНК у цій ділянці. Центромерні білки (одним із головних є, зокрема, CENP A – аналог гістону H3, який входить до складу нуклеосом у центромерній зоні) забезпечують компактизацію центромерної зони хромосоми та рекрутують до цієї зони білки кінетохору.

Розміщення центромери на певній хромосомі є постійною характеристикою: під час кожного клітинного поділу локалізація видимої під мікроскопом центромерної перетяжки не змінюється. Залежно від розміщення центромери хромосоми розподіляють на три типи (рис. 1.15):

- *метацентричні* хромосоми – центромера ділить хромосому на два плеча, приблизно однакових за довжиною;
- *субметацентричні* хромосоми – центромера ділить хромосому на два плеча, різних за своєю довжиною; плечі позначають латинськими літерами *p* (коротке плече) і *q* (довге плече);
- *ахроцентричні* хромосоми – центромера ділить хромосому на два плеча, довжина яких різниться настільки сильно, що під мікроскопом короткі плечі майже не помітні.



**Рис. 1.15.** Фото трьох типів мітотичних хромосом людини (пар сестринських хроматид, з'єднаних центромерами): метацентрична (а), субметацентрична (б), ахроцентрична (в). Стрілкою позначено центромерну перетяжку

Кожне плече хромосоми закінчується теломерою – комплексом теломерної ДНК на кінці хромосоми та специфічних теломерних білків. Довжина теломерної ділянки варіює в різних організмів (наприклад, у миші понад 30 тис. пар основ, у людини їх 10–15 тис.). Крім того, довжина теломери часто залежить від типу тканини, проліферативної активності клітини тощо.

Розмір хромосом, їхня кількість, відносний розмір плечей – усе це є специфічною видовою характеристикою. Сукупність морфологічних ознак, за якими можна охарактеризувати набір мітотичних хромосом даного організму (виду) називають **каріотипом**.

Слід зупинитися на особливому випадку, коли окремі хромосоми можна побачити за допомогою оптичного мікроскопа не лише під час мітозу. У деяких клітинах (різноманітні тканини личинок комах,

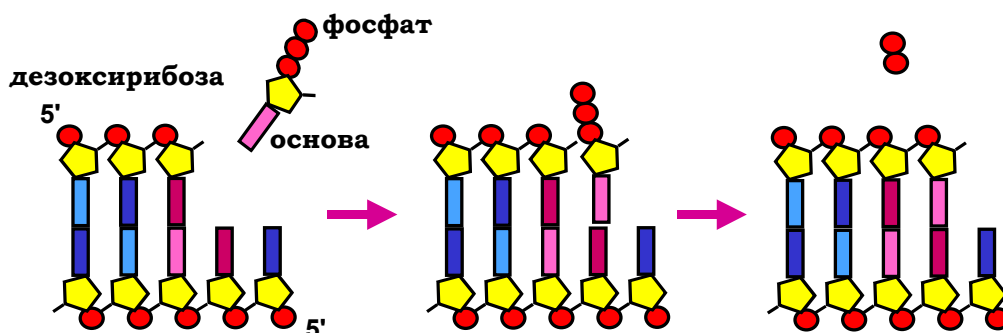
клітини трофобласту у ссавців, клітини зародкового міхура в рослин тощо) хромосоми мають гігантські розміри й видимі постійно. Це стає можливим за рахунок того, що хромосома складається не з однієї молекули ДНК, а з декількох сотень і навіть тисяч ідентичних молекул, які накопичуються в результаті багаторазової реплікації без проходження клітиною мітотичних поділів (ендоредуплікація). Такі хромосоми називають **політенними**. Загалом реплікація без наступного поділу клітини приводить до виникнення багатьох наборів молекул ДНК – *поліплоїдизації* (див. розділ 4). Але на відміну від поліплоїдних клітин, при політенії однакові копії молекули ДНК контактують між собою по всій довжині, що й дозволяє побачити їх як одну гігантську деконденсовану хромосому.

Політенні хромосоми на цитологічних препаратах мають характерну поперечну посмугованість: темні смуги (*диски*, або *хромомери*) чергуються зі світлими (*міждисками*), створюючи специфічний лише для даної хромосоми малюнок. Вважається, що в області дисків переважно розміщені гени, активація яких зумовлює характерне здуття диска – появу так званого *пуфа*. Великий розмір політенних хромосом, можливість досить легкої ідентифікації конкретних геномних ділянок, хромосомних перебудов тощо – усе це робить політенні хромосоми зручним об'єктом дослідження в цитогенетиці. Біологічна роль політенії, можливо, пов'язана з високою метаболічною активністю певних клітин.

## РЕПЛІКАЦІЯ ДНК

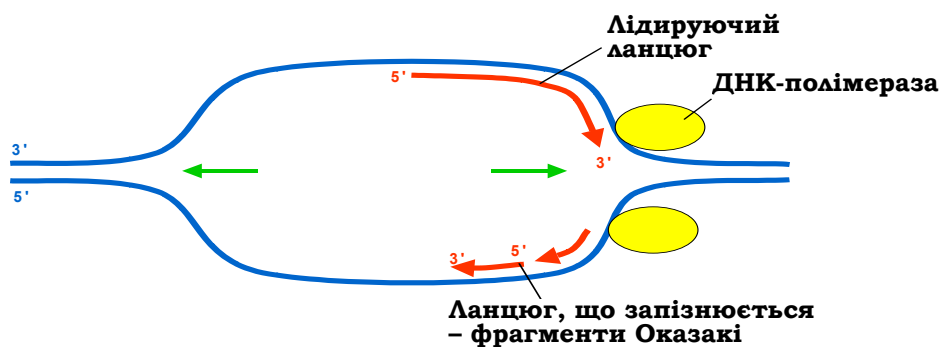
Комплементарне спарювання нуклеотидів у складі подвійної спіралі ДНК негайно вказує на механізм копіювання генетичної інформації шляхом реплікації. Синтез ДНК відбувається при реплікації з використанням обох полінуклеотидних ланцюгів як матриць – за так званим *напівконсервативним механізмом*: дві дочірні молекули-копії містять один материнський ланцюг (що служив матрицею) і один ланцюг, синтезований *de novo*. Включення нуклеотидів до ланцюга, що синтезується, детермінується матрицею за принципом комплементарності. Базові молекулярні механізми реплікації є спільними для всіх організмів.

Зростання ланцюга ДНК відбувається в напрямку від 5'- до 3'-кінця. Субстратами реакції є 3'-кінцева ОН-група дезоксирибози зростаючого ланцюга та дезоксирибонуклеозидтрифосфати (рис. 1.16). Фермент, що каталізує цю реакцію, – *ДНК-залежна ДНК-полімераза*.



**Рис. 1.16.** Схема ДНК-полімеразної реакції

Реплікація ДНК починається з невеликої ділянки – *ориджину* (origin), де здійснюється ініціація процесу, головним моментом якої є розходження ланцюгів ДНК. Далі з ходом реплікації такий *реплікативний міхур* (рис. 1.17) розростається у двох протилежних напрямках. На кожному боці міхура існує так звана *реплікативна вилка*, в основі якої й відбувається синтез ДНК.



**Рис. 1.17.** Реплікативний міхур – дві реплікативні вилки, які переміщуються у протилежних напрямках (ланцюги, що синтезуються, показано тільки для однієї з них)

У кожній реплікативній вилиці працюють дві молекули ДНК-полімерази, що здійснюють синтез двох полінуклеотидних ланцюгів. Оскільки два ланцюги є антипаралельними, а синтез здійснюється тільки в напрямку від 5'- до 3'-кінця, то синтез тільки одного з ланцюгів може відбуватися (і відбувається) безперервно, починаючись від ориджину (рис. 1.17). Цей ланцюг називають *лідуючим*, його 3'-кінець розташований поблизу від основи реплікативної вилки. Синтез іншого ланцюга *розпочинається* від реплікативної вилки: синтезуються окремі фрагменти – так звані *фрагменти Оказаки*, які пізніше з'єднуються між собою. Для синтезу кожного з фрагментів треба спочатку звільнити певний простір на матричному ланцюзі – пересунути реплікативну вилку вперед (рис. 1.17); відповідно, фрагментарний ланцюг називають *ланцюгом, що запізнюється*. Середня швидкість реплікації на одну реплікативну вилку становить ~750 нуклеотидів за секунду в бактерій, 60–90 нуклеотидів за секунду в еукаріотів. Синтез бактеріальної хромосоми відбувається за ~50 хв, повна реплікація ДНК еукаріотичної клітини – за кілька годин.

Ділянку ДНК, де здійснюється реплікація, яка розпочинається з однієї точки, називають *репліконом*. Бактеріальна хромосома часто містить тільки один ориджин (зокрема, в *E. coli*) – являє собою єдиний реплікон. У деяких бактерій може бути два реплікони на хромосому. Еукаріотична хромосома є полірепліконом – містить велику кількість точок ініціації. Загалом геном, наприклад ссавців, містить близько 40 тис. ориджинів. Розмір еукаріотичного реплікона варіює від 50 до 200 тис. пар основ, що збігається з розмірами петельних доменів хроматину. Отже, хроматинова петля – це один реплікон, а ориджин збігається з ділянкою, асоційованою з ядерним матриксом. Сусідні реплікони еукаріотичної хромосоми врешті-решт "зустрічаються", унаслідок чого утворюються дві копії ДНК хромосоми.

Більшість ДНК-полімераз мають дві ферментативні активності: власне *полімеразну*, за рахунок якої до 3'-кінця ланцюга, що синтезується, приєднуються нуклеотиди, і *3'-екзонуклеазну*, яка використовується для редагування помилок – відщеплення помилкових нуклеотидів, щойно приєднаних до 3'-кінця. ДНК-полімераза є прецизійним молекулярним пристроєм: її полімеразний активний центр забезпечує впізнання комплементарного нуклеотиду в складі матриці нуклеозидтрифосфатом, приєднує цей черговий нуклеотид до зростаючого ланцюга (рис. 1.16) і пересувається на один нуклеотид уперед уздовж матриці, знову повторюючи вказані операції з наступ-

ним нуклеотидом. При цьому частота помилкового включення нуклеотидів забезпечується на рівні  $\sim 10^{-5}$ . Але оскільки ДНК синтезується "раз і назавжди" перед її передачею нащадкам, такий рівень помилок не може вважатися задовільним. Якщо внаслідок приєднання помилкового нуклеотиду утворилася некомплементарна (тобто нестабільна) пара основ, спрацьовує нуклеазний активний центр, помилковий нуклеотид відщеплюється, і ДНК-полімераза здійснює нову спробу подовження ланцюга. У результаті такої осциляції полімерази з перемиканням активності між двома центрами рівень помилок знижується до  $\sim 10^{-8}$ . Остаточна частота помилок становить  $\sim 10^{-10}$  за рахунок активності систем репарації (див. нижче), які спрацьовують під час і відразу після реплікації.

Дві ДНК-полімерази, що працюють у реплікативній вилиці, об'єднані в складний мультибілковий комплекс – *реплісому*, компонентами якої є також інші важливі структурні та функціональні модулі: ДНК-геліказа – АТР-залежна молекулярна машина, що руйнує подвійну спіраль попереду від реплікативної вилки; праймаза, яка забезпечує синтез праймера – короткої ділянки РНК на початку кожного фрагмента Оказакі, після чого праймер подовжується ДНК-полімеразою (сама ДНК-полімераза не здатна *ініціювати* синтез нуклеїнової кислоти, а може тільки продовжувати синтез праймера); компоненти, що сприяють утриманню ДНК-полімераз у реплікативній вилиці тощо.

РНК-праймер на початку кожного фрагмента Оказакі має бути замінений на відповідну послідовність ДНК. Ця робота виконується за рахунок 5'-екзонуклеазної активності певних ферментів, після чого ДНК-полімераза заповнює прогалину між сусідніми фрагментами Оказакі. У результаті між двома фрагментами Оказакі залишається односторонній розрив, який зшивається ще одним важливим ферментом – ДНК-лігазою.

У клітині *Escherichia coli* працюють ДНК-полімерази трьох типів (позначаються римськими цифрами). Дві з них (I та III) належать до класу полімераз високої точності синтезу, ДНК-полімераза II – полімераза низької точності, яка використовується в певних репараційних процесах. Основна реплікативна полімераза – ДНК-полімераза III. ДНК-полімераза I (або полімераза Корнберга), на відміну від інших ДНК-полімераз, має також додаткову 5'-екзонуклеазну активність – саме ця полімераза й використовується при з'єднанні фрагментів



Оказакі під час реплікації (видаляє праймер і заповнює прогалину), а також при репараційних процесах синтезу ДНК.

П'ять типів еукаріотичних ДНК-полімераз високої точності прийнято позначати грецькими літерами. Основними ДНК-синтезуючими (під час реплікації та репарації) є ДНК-полімерази  $\delta$  і  $\epsilon$ . Вони ж заповнюють прогалину між фрагментами Оказакі, що утворюється після видалення праймера певною нуклеазою. Полімераза  $\alpha$  використовується як праймаза при ініціації синтезу лідируючого ланцюга й кожного фрагмента Оказакі (синтезує РНК-праймер і трохи подовжує його як ДНК). Полімераза  $\beta$  використовується при ексцизійній репарації основ Полімераза  $\gamma$  – реплікативна ДНК-полімераза мітохондрій.

В еукаріотичних клітинах працює ще досить велика кількість ДНК-полімераз низької точності ( $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ), функція яких полягає в забезпеченні синтезу ДНК у випадку пошкодження матриці.

Характерною особливістю еукаріотичної системи реплікації є те, що подвоюється не циркулярна, як у прокаріотів, а лінійна молекула ДНК – така, що має два кінці. Унаслідок цієї простої обставини на 3'-кінцях матричних ланцюгів ДНК залишаються одноланцюгові хвости (рис. 1.18): два РНК-праймери на 5'-кінцях ланцюгів, що синтезовані, видаляються, а прогалина не може бути заповненою, оскільки немає 3'-кінця, який міг би бути використаним як праймер. Одноланцюгові хвости піддаються швидкій нуклеазній деградації, і після кожної реплікації ДНК повинна вкоротитися.

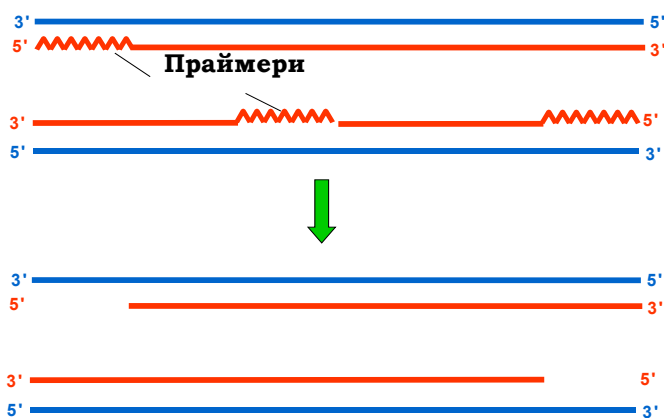
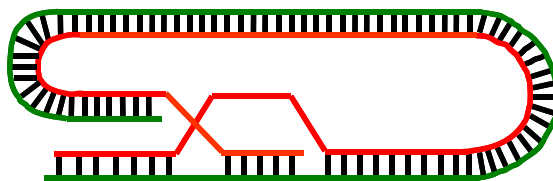


Рис. 1.18. Дві дочірні лінійні молекули ДНК після реплікації

Кінцеві ділянки молекул ДНК, що містяться у клітинному ядрі, – теломери – складаються з невеликих елементів послідовності (шість, рідше вісім нуклеотидів), які тандемно повторюються – теломерних повторів. У хребетних і більшості вищих рослин теломерний повтор є однаковим – TTAGGG. Подовження теломер після реплікації здійснюється за допомогою спеціального ферменту – *теломерази*, яка є РНК-залежною ДНК-полімеразою. РНК-матриця входить до складу самого ферменту й містить ділянку, комплементарну теломерному повтору. Використовуючи її як матрицю і 3'-кінець як праймер, теломераза покроково добудовує до 3'-кінця кілька копій теломеразного повтору. Теломераза є активною у проліферуючих недиференційованих клітинах і в злоякісно трансформованих клітинах і неактивною – у диференційованих соматичних клітинах вищих еукаріотів. Певне критичне скорочення теломер, яке відбувається у таких клітинах після кількох десятків клітинних поділів, є одним із ключових механізмів активації програми їхньої загибелі (див. розділ 6).

Подовжений теломеразою одноланцюговий хвіст використовується як матриця для синтезу іншого ланцюга за звичайним реплікативним механізмом. Після видалення РНК-праймера на кінцях подовженої хромосоми (у складі G-ланцюгів, збагачених на гуанін) залишаються одноланцюгові 3'-вирости (як на рис. 1.18). За рахунок взаємодії зі специфічними білками одноланцюговий виріст "втягується" у дволанцюгову ДНК, порушуючи при цьому водневі зв'язки дуплекса: утворюється закрита форма теломери, що називається *t*-петлею (рис. 1.19).



**Рис. 1.19.** Схема організації *t*-петлі в теломерній ділянці хромосоми

Основна функція *t*-петлі полягає в захисті кінців лінійної молекули ДНК від деградації екзонуклеазами та в тому, щоб зробити кінець хромосоми непомітним для репараційних систем: відкрита форма теломери буде сприйматися репараційними системами як розрив, що може призвести до об'єднання кінців двох різних хромосом.

## РЕПАРАЦІЯ ДНК

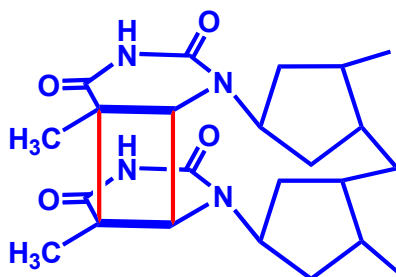
Репарація ДНК – один із загальних біологічних процесів, спрямований на виправлення помилок синтезу ДНК при реплікації, а також численних пошкоджень, що виникають у ДНК унаслідок дії хімічних і фізичних факторів. До таких пошкоджень відносять різноманітні хімічні модифікації азотистих основ, ковалентні зшивки сусідніх піримідинів (утворення піримідинових, найчастіше тимінових, димерів) під дією ультрафіолетового випромінювання, одно- і дволанцюгові розриви, що виникають під дією іонізуючої радіації та вільних радикалів тощо. Часто системи репарації працюють під час або відразу після реплікації. Більшість репараційних процесів передбачає видалення пошкодженої одноланцюгової ділянки з наступним синтезом ДНК за допомогою ДНК-полімераз. Але є й такі процеси, що пов'язані з безпосереднім "виправленням" пошкодженого елемента за рахунок прямої дії певних ферментів (*пряма репарація*).

Жодна репараційна система не має 100-відсоткової ефективності – частина пошкоджень залишається в ДНК, унаслідок чого відбуваються заміни нуклеотидів, втрати ділянок послідовності та інші порушення спадкової програми – *мутації* (детальніше про мінливість генетичного матеріалу йдеться в розділі 4). Зрозуміло, що порушення репараційних систем приводять до підвищення частоти мутацій – прискорення мутаційного процесу.

### Пряма репарація

Найочевиднішим випадком прямої репарації є зшивання одноланцюгового розриву ДНК лігазою.

Іншим спільним для більшості живих організмів (за винятком, наприклад, ссавців) шляхом прямої репарації є так звана *фотореактивація* – руйнування піримідинових димерів (рис. 1.20), індукованих ультрафіолетовим світлом, ферментом *фотоліазою*. Фотоліаза (або її власні амінокислотні залишки, або зв'язані з білком простетичні групи) здатна поглинати світло, що зумовлює активацію ферменту. Тобто світло, викликаючи утворення піримідинових димерів, одночасно активує фотоліазу, яка каталізує розрив ковалентних зв'язків між сусідніми піримідинами (рис. 1.20) і, таким чином, відновлення структури ДНК.



**Рис. 1.20.** Тиміновий димер

Одним із загальних пошкоджуючих впливів на ДНК є *алкілування* азотистих основ – ковалентне приєднання метильних чи етильних груп до атомів О або N. Пряма репарація таких пошкоджень є можливою за рахунок активності специфічних метилтрансфераз, що відщеплюють метильні групи.

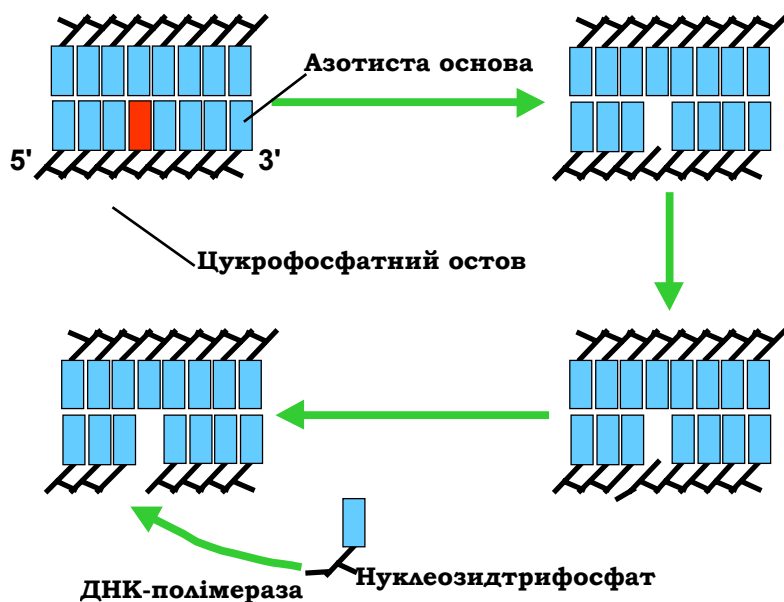
## Ексцизійна репарація

Більш радикальним і ефективним шляхом виправлення порушень нуклеотидів є ексцизійна репарація, коли пошкоджена одноланцюгова ділянка вирізається з ДНК, а інший ланцюг використовується далі як матриця для нового синтезу. Існує два варіанти такої репарації.

При **ексцизійній репарації азотистих основ** (Base Excision Repair – BER), що відбувається в усіх організмів, модифікована азотиста основа розпізнається ферментом, який відщеплює її від дезоксирибози (рис. 1.21). У ДНК залишається так званий АП-сайт – апуриновий / апіримідиновий. Ще два ферменти видаляють дезоксирибозу в АП-сайті, і в ДНК залишається прогалина довжиною в один нуклеотид.

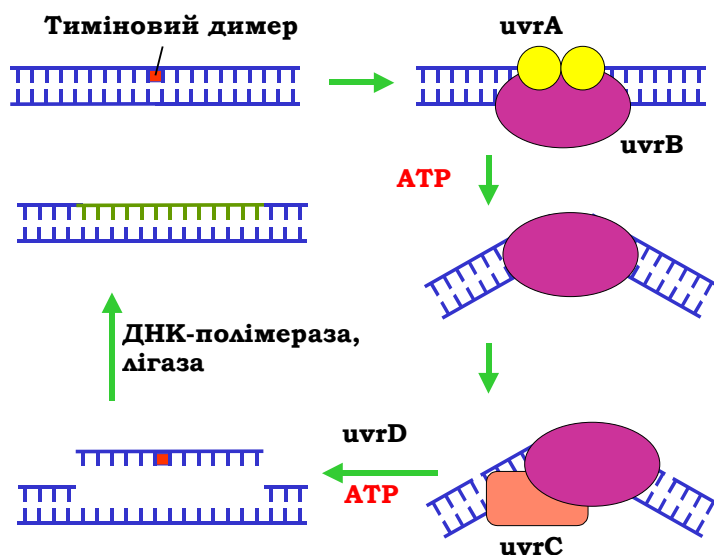
Ця прогалина заповнюється ДНК-полімеразою  $\beta$  (в еукаріотів), яка приєднує нуклеотид до 3'-ОН групи попереднього нуклеотиду ланцюга. Фосфодієфірний зв'язок приєданого нуклеотиду з наступним нуклеотидом ланцюга відновлюється лігазою. У прокаріотів заповнення прогалини здійснюється ДНК-полімеразою I.

**Ексцизійна репарація нуклеотидів** (Nucleotide Excision Repair – NER) – це шлях, пов'язаний із вирізанням одноланцюгової ділянки ДНК, яка містить пошкодження (модифіковану основу, тиміновий димер тощо).



**Рис. 1.21.** Екцизійна репарація азотистих основ.  
Пошкоджена основа забарвлена червоним

У клітинах *E. coli* за цей шлях відповідає а система *uvrABC* (*uvr* – *ultra violet repair*). Комплекс білка *uvrB* і двох білків *uvrA* упізнає пошкодження та зв'язується з ДНК у цьому місці (рис. 1.22). На наступному кроці відбувається зміна конформації *uvrB*, вигин ДНК і дисоціація *uvrA*. До комплексу рекрутується білок *uvrC*. Обидва білки у складі комплексу набувають ендонуклеазної активності: *uvrC* робить одноланцюговий розріз у пошкодженому ланцюзі за кілька нуклеотидів у напрямку до 5'-кінця від пошкодження (ліворуч на рис. 1.22); *uvrB* – розріз з іншого боку від пошкодження. Далі ДНК-геліказа *uvrD* руйнує подвійну спіраль між двома розрізами, тобто видаляє пошкоджену ділянку. Прогалина, що залишилася, заповнюється ДНК-полімеразою I, лігаза остаточно відновлює цілісність ланцюга.



**Рис. 1.22.** Система *uvrABC* ексцизійної репарації нуклеотидів у *E. coli*

Аналогічна система ексцизійної репарації, до якої залучено близько 17 білків, працює в еукаріотичних клітинах.

## Репарація некомплементарних пар основ – місметчів

Незважаючи на редагування помилок під час реплікації, певна кількість невірно спарених основ залишається в синтезованих ланцюгах ДНК. Зрозуміло, що при репарації таких місметчів (mismatch) із двох некомплементарних нуклеотидів замінити слід саме той, що входить до *синтезованого*, а не до *матричного* ланцюга.

У бактеріальній клітині за репарацію місметчів відповідає система *mutHLSU*. По бактеріальному геному розподілені (на середній відстані 256 пар основ) короткі послідовності *CTAG* (які є паліндромами – читаються однаково в обох ланцюгах від 5'- до 3'-кінця), де аденін піддається постреплікативному метилюванню. Але певний час після реплікації метильованим є лише матричний (материнський) ланцюг. Саме за цей час і спрацьовує система репарації (рис. 1.23): білок, що позначається як *mutS*, упізнає місметч і рекрутує білок *mutL*, останній взаємодіє з двома білками *mutH*, які зв'язуються з тетра nukлеотидними паліндромними сайтами по обидва боки від місметча. У складі утвореного ком-

плексу mutH набуває ендонуклеазної активності й робить одноланцюговий розріз у *неметильованому* ланцюзі в межах одного із сайтів (один із двох сайтів обирається випадково). Далі геліказа mutU (той самий білок, що й *uvrD*) розплітає подвійну спіраль, а екзонуклеаза руйнує ланцюг від розрізу до місметча і трохи далі. Нарешті прогалина заповнюється ДНК-полімеразою III і одноланцюговий розрив зшивається лігазою.

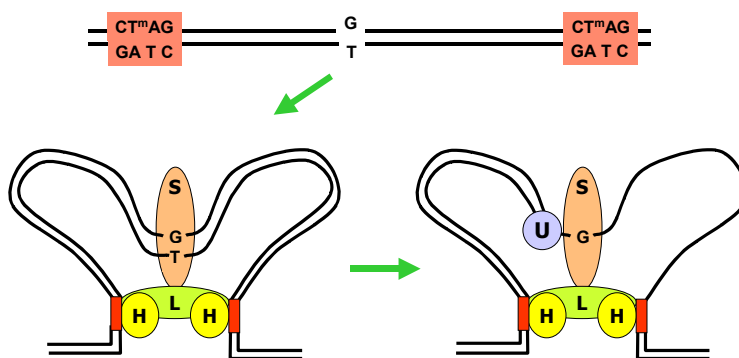


Рис. 1.23. Система репарації місметчів mutHLSU

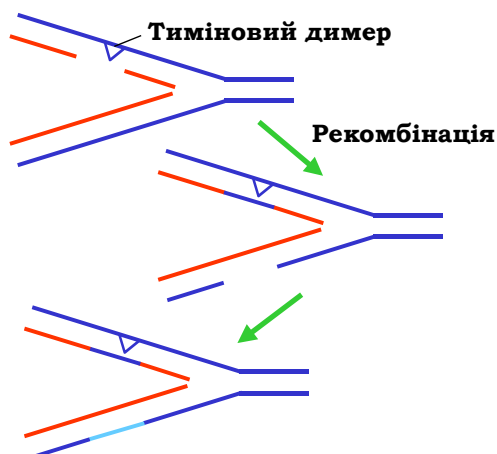
Система mutHLSU є консервативною, гомологічні білки присутні також і в еукаріотів. Метильовання аденіну не використовується для дискримінації ланцюгів: білки еукаріотичної системи репарації місметчів пов'язані з реплісомою та ланцюгами ДНК, що синтезуються, тобто спрацьовують безпосередньо під час реплікації.

## Неточний синтез ДНК

Іноді в клітині активуються процеси, які прийнято також називати репарацією, хоча насправді вони є засобом здійснити реплікативний синтез ДНК, "не звертаючи уваги" на пошкодження її структури. Реплікативна машинерія зазвичай зупиняється, зустрічаючи пошкодження у складі матриці. Якщо таких пошкоджень надто багато, й істинні репараційні системи не встигають їх виправити, перемикання на неточний синтез ДНК дає клітині шанс на виживання. Пошкодження при цьому залишаються, що спричинює виникнення мутацій. Усі процеси такого типу зазвичай об'єднують під назвою **SOS-репарації**, або (що точніше) – механізмів синтезу ДНК, толерантних до пошкоджень (damage tolerance mechanisms).

У прокаріотів перемикання на неакуратний синтез, який дозволяє долати перешкоди, відбувається завдяки заміні ДНК-полімерази III на полімеразу низької точності синтезу – ДНК-полімеразу V (полімераза активується у відповідь на несприятливі умови, скажімо, на ультрафіолетове опромінювання). Ця полімераза вставляє напроти тимінового димеру два довільні нуклеотиди (виникає мутація), після чого замінюється на ДНК-полімеразу III, яка продовжує точний синтез. Крім того, долати невеликі одноланцюгові прогалини при SOS-репарації допомагає ДНК-полімераза II – інша полімераза низької точності. Аналогічним чином перемикання на полімерази низької точності відбувається й в еукаріотів у разі наявності в матриці пошкоджених основ, піримідинових димерів тощо.

Інший шлях здійснення реплікації, оминаючи пошкодження у складі матриці, отримав назву **постреплікативної (рекомбінаційної) репарації**. За наявності пошкодження (наприклад, тимінового димеру) реплісома може його "обійти", залишивши прогалину в ланцюзі, що синтезується (рис. 1.24). У цьому випадку на її місце шляхом гомологічної рекомбінації (про неї йтиметься у відповідному підрозділі) вставляється ділянка сестринської молекули ДНК. Прогалина, що залишається при цьому в сестринській молекулі, легко заповнюється ДНК-полімеразою. Як і при SOS-репарації, пошкодження залишається і може бути виправлено пізніше завдяки ексцизійній репарації.



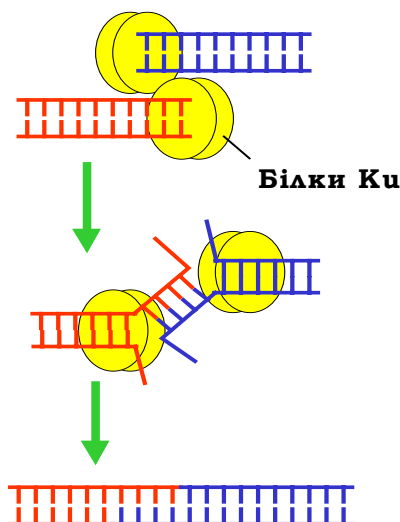
**Рис. 1.24.** Постреплікативна (рекомбінаційна) репарація



## Репарація дволанцюгових розривів

Точна репарація дволанцюгового розриву ДНК можлива лише під час або відразу після реплікації, коли розірвана ділянка може бути відновлена завдяки використанню сестринської молекули як матриці за механізмом гомологічної рекомбінації (див. нижче).

В інших випадках цілісність розірваних молекул ДНК відновлюється в консервативному для всіх організмів процесі, який називається *негомологічним з'єднанням кінців* (NHEJ – *Non-Homologous End Joining*, рис. 1.25). З'єднуються при цьому будь-які кінці ДНК, що, за наявності великої кількості розривів, приводить до об'єднання ділянок різних хромосом – хромосомних перебудов (розділ 4).



**Рис. 1.25.** Негомологічне з'єднання кінців ДНК

Ключову роль у процесі NHEJ відіграють білки Ku, які розпізнають кінці ДНК, об'єднують їх у нековалентний комплекс і рекрутують до нього низку інших білків. У складі комплексу відбувається розплітання кінцевих ділянок ДНК і пошук мікрогомології – коротких комплементарних (чи майже комплементарних) одноланцюгових ділянок, котрі належать різним молекулам. У результаті утворюється короткий дуплекс, зайві одноланцюгові ділянки відщеплюються нуклеазами, лігаза зшиває одноланцюгові розриви. Таким чином, у процесі з'єднання відбувається втрата кількох пар основ.

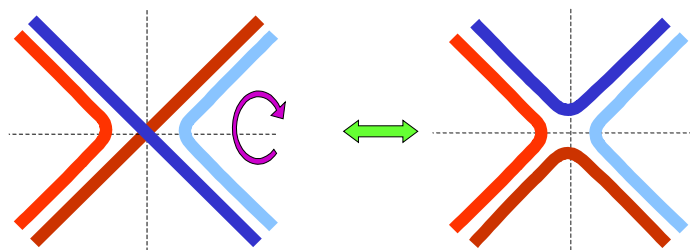
## ГОМОЛОГІЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ ДНК

Суттєвим моментом існування ДНК у живих системах є не тільки процеси відновлення та збереження інформації, яка міститься в послідовності нуклеотидів, а й різноманітні дії, спрямовані на перетасування цієї інформації з метою створення нових комбінацій генів. Найважливішою серед подібних операцій є гомологічна рекомбінація – обмін ділянками між досить довгими молекулами ДНК із гомологічними послідовностями пар основ. Такий процес відбувається в усіх організмів, котрі розмножуються статевим шляхом, між гомологічними хромосомами при мейозі (у процесі утворення статевих клітин). Також гомологічна рекомбінація можлива в парах гомологічних дочірніх молекул ДНК при реплікації в соматичних клітинах (мітотична рекомбінація) і в прокаріотів, скажімо, після кон'югації двох бактеріальних клітин і проникнення ДНК із однієї в іншу (див. розділ 5).

Необхідною умовою для здійснення гомологічної рекомбінації є гомологія послідовностей між двома молекулами ДНК по всій довжині. Загальну модель початкового етапу гомологічної рекомбінації зображено на рис. 1.26. Ініціюючою подією є *дволанцюговий розріз* в одній із гомологічних молекул (здійснюється спеціальними ферментами). Цей розріз за рахунок активності комплексу білків *гесBCD* (тут і далі вказано назви білків, які забезпечують гомологічну рекомбінацію в *E. coli*, гомологічні білки є також і в еукаріотів) "розширюється" шляхом 5'-екзонуклеазної деградації ДНК – у результаті в місці розрізу залишаються два одноланцюгові 3'-хвости. Один із них (у комплексі з білком *гесA*) здійснює *інвазію* – утворює подвійну спіраль з антипаралельним ланцюгом інтактної гомологічної молекули ДНК. Інший ланцюг цієї останньої виштовхується з дуплексу у вигляді одноланцюгової D-петлі (від *displacement*). Разом із 3'-хвостом D-петля здатна переміщуватись у пошуку гомології – максимальної комплементарності в межах подвійної спіралі, яка утворилася між ланцюгами двох гомологічних молекул ДНК. На наступному кроці відбувається репараційний синтез ДНК: два 3'-кінці розірваної молекули ДНК продовжуються ДНК-полімеразами з використанням як матриць двох ланцюгів інтактної молекули. До цього моменту схема на рис. 1.26 є одночасно *схемою точної репарації дволанцюгового розриву* в одній із двох сестринських молекул ДНК під час реплікації.



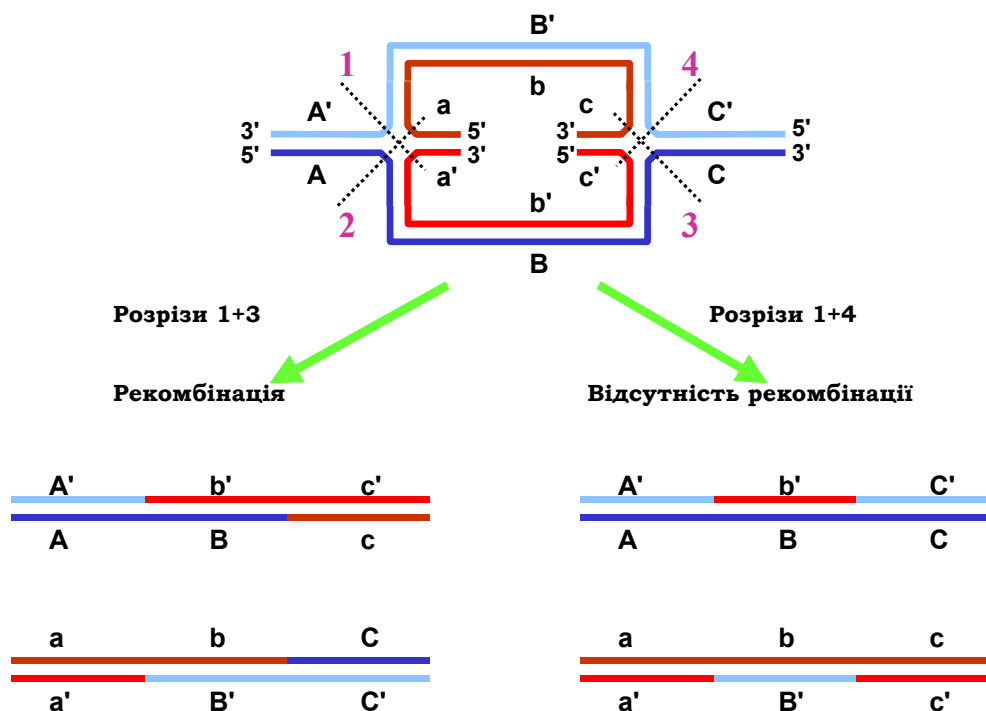
в АТР-залежному процесі забезпечують протягування ланцюгів через комплекс *huvA / huvB* – міграцію гілки з одночасним подовженням гетеродуплекса.



**Рис. 1.27.** Ізомеризація структури Холідея

Останньою подією рекомбінації є розділення (resolution) структури Холідея резольвазою – білком *huvC*. Резольваза – це ендонуклеаза, дві молекули якої взаємодіють із комплексом *huvA / huvB* і двома ланцюгами хреста, розташованими один проти одного (є два рівноймовірні варіанти такого зв'язування). Отже, резольваза робить дволанцюговий розріз через хрест двома можливими шляхами (рис. 1.28). Після наступного зшивання лігазою залишаються дві дволанцюгові молекули ДНК.

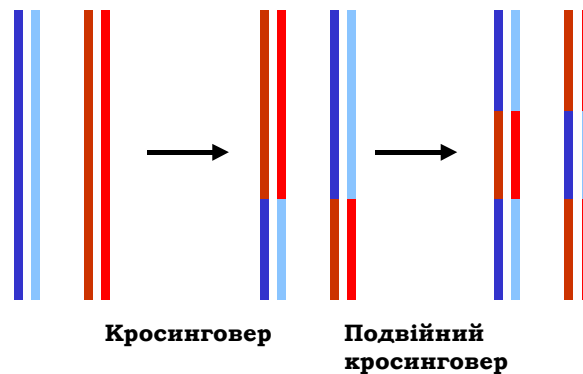
На рис. 1.28 зображено ізомеризовану чотириланцюгову структуру з рис. 1.26 – дві структури Холідея з перехрещеннями перетворені на планарні (ділянки, які синтезовані шляхом репарації, не позначено) – і результат її розділення. Із чотирьох можливих комбінацій розділення двох структур Холідея показано дві. Одна з них приводить до рекомбінації (аналогічно, рекомбінантною є і пара розрізів 2 + 4): дві гомологічні молекули ДНК обмінялися ділянками, і умовна "абетка", якою позначено фрагменти ДНК, змінює регістр – великі літери замінюються на маленькі та навпаки. У масштабі цілих хромосом результатом рекомбінації є дві молекули, показані в центральній частині рис. 1.29. Пари розрізів 1 + 4 і 2 + 3 не приводять до рекомбінації. Отже, рекомбінація при розділенні структур Холідея відбувається з імовірністю 50 %.



**Рис. 1.28.** Схема розділення двох структур Холідея. Конфігурація чотирьох ланцюгів зверху є еквівалентною конфігурації на нижній панелі рис. 1.26. Літерами позначено ділянки ланцюгів (великі й маленькі літери відповідають гомологічним ділянкам двох молекул, літери зі штрихом і без – комплементарним ділянкам вихідних дуплексів). Цифрами 1–4 позначено можливі розрізи резольвазою. Унизу: дві пари дволанцюгових молекул після розділення структур Холідея, отримані в результаті відповідних розрізів

Незалежно від того, чи відбулася рекомбінація, усі продукти містять гетеродуплекси (середня частина всіх кінцевих молекул на рис. 1.28). Оскільки гетеродуплекси складаються з майже комплементарних ланцюгів, вони містять місметчі. Відповідно, кінцевою операцією, яка завершує процес гомологічної рекомбінації, є репарація цих місметчів описаною вище системою mutHLSU. На відміну від того, як ця система спрацьовує після реплікації, після рекомбінації ланцюг, де відбувається заміна нуклеотидів, обирається випадково, наприклад, центральний фрагмент першої молекули на рис. 1.28 перетворюється або на В/В', або на b/b'. Якщо на цій ділянці розта-

шований ген, шляхом репарації обирається один із його алелів – В чи b. Отже, ефектом рекомбінації може бути явище **конверсії гена** – заміни одного алеля на інший.



**Рис. 1.29.** Кросинговер як результат рекомбінації двох дволанцюгових молекул ДНК

Іншим наслідком рекомбінації є обмін ділянками між двома гомологічними хромосомами – **кросинговер** (рис. 1.29). Під час процесу рекомбінації кросинговер між двома хромосомами може відбутися (і часто відбувається) у кількох точках (рис. 1.29). Зрозуміло, що чим більшою є відстань між двома хромосомними локусами, із тим вищою ймовірністю відбудеться обмін ділянками десь між цими локусами, і тим більшою буде кількість таких обмінів. Два локуси, що рознесені по хромосомі на велику відстань, починають поводити себе як незалежні (не зв'язані в одній хромосомі) спадкові елементи. У цьому, власне, і полягає біологічне значення гомологічної рекомбінації (детальніше ефекти кросинговеру описано в розділі 3.)

Серед інших процесів рекомбінації ДНК розрізняють сайт-специфічну рекомбінацію (вирізання / вбудовування однієї молекули ДНК з / в іншу за рахунок розпізнання специфічними білками коротких елементів послідовності ДНК, див. розділ 5), незаконну рекомбінацію (об'єднання двох молекул ДНК, які не мають ані гомології, ані специфічних елементів послідовності – основним механізмом є розглянуте вище негомологічне з'єднання кінців) і переміщення в межах геному мобільних елементів послідовності ДНК (розділ 6).

## КЛІТИННИЙ ЦИКЛ І КЛІТИННИЙ ПОДІЛ В ЕУКАРІОТІВ

Реплікація ДНК відбувається під час так званої **S-фази** клітинного циклу, яка, у свою чергу, є одним з етапів **інтерфази** – періоду, коли хромосоми існують у вигляді хроматинових фібрил, і в клітині відбувається експресія генетичної інформації (рис. 1.30). Після закінчення реплікації та репараційних процесів, які її супроводжують, сестринські хроматиди (майбутні дочірні хромосоми), що утворюються внаслідок подвоєння ДНК, за рахунок взаємодії зі специфічними білками залишаються з'єднаними між собою. Клітина при цьому вступає у фазу G2, яку можна розглядати як підготовку до мітозу – клітинного поділу соматичних клітин.

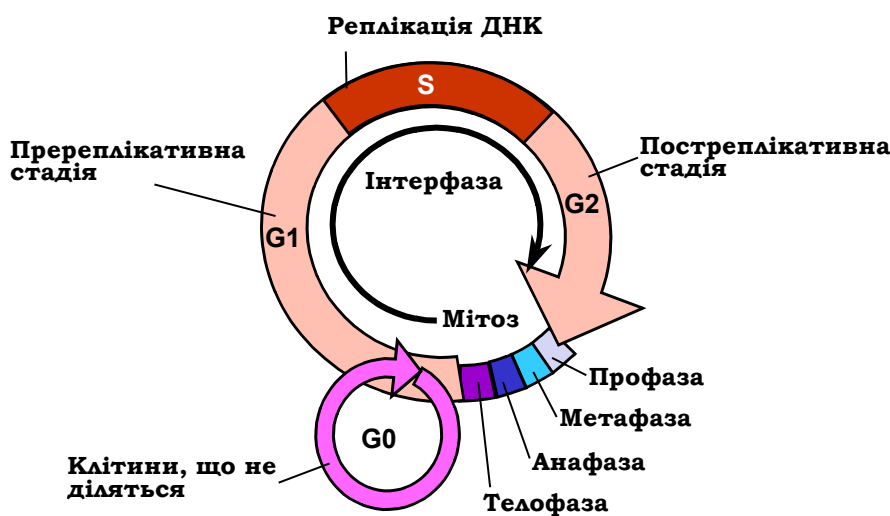
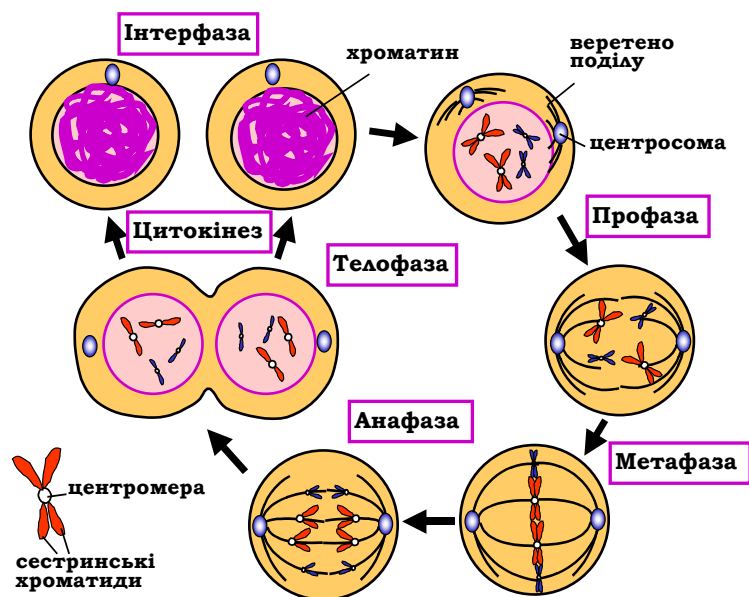


Рис. 1.30. Схема клітинного циклу

На першій стадії мітозу – у **профазі** – відбувається конденсація хроматид, а також дозрівання двох центросом (структур, що складаються з двох центріолей кожна), формування веретена поділу та приєднання ниток веретена до хромосом (рис. 1.31). Наприкінці профазы центросоми розходяться до полюсів клітини.



**Рис. 1.31.** Схема клітинного поділу шляхом мітозу.  
Показано дві пари гомологічних хромосом

Далі в **метафазі** хромосоми (пари сестринських хроматид, з'єднаних між собою своїми центромерами) вишукуються по екватору клітини. **Анафаза** починається з роз'єднання центромер, після чого сестринські хроматиди, які тепер уже називаються дочірніми хромосомами, рухаються до полюсів. Під час **телофази** починається формування ядерних мембран і деконденсація хромосом. Закінчується телофаза (і сам мітоз) цитокінезом – розділенням двох дочірніх клітин.

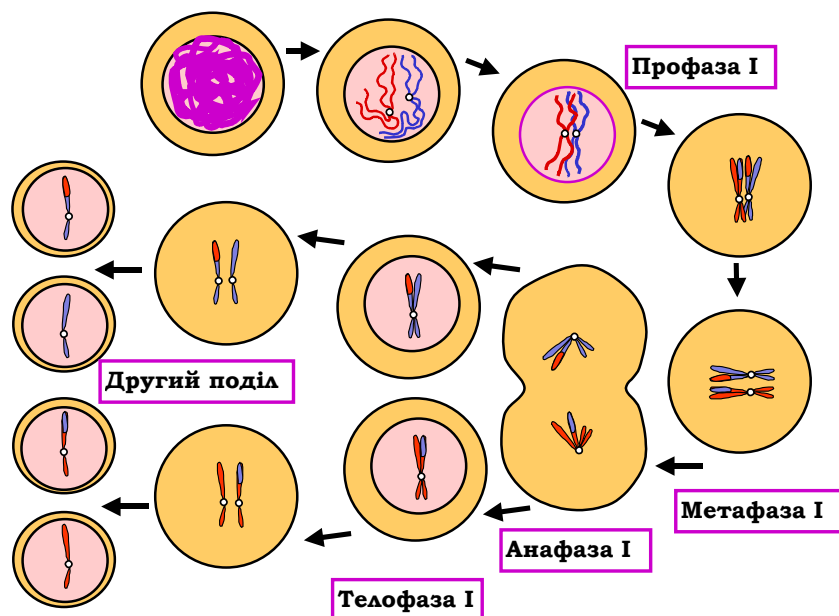
По закінченні мітозу клітина, що буде ділитися далі, вступає у фазу G1 клітинного циклу (її можна розглядати як пререплікативну), а остаточно диференційована клітина, для якої цей мітоз став останнім, – у фазу G0 (рис. 1.30). Результатом мітозу є дві ідентичні клітини з двома ідентичними диплоїдними наборами хромосом.

При утворенні статевих клітин (гамет) шляхом мейозу в диплоїдній клітині-попереднику також відбувається реплікація ДНК і подвоєння хроматид, які залишаються зв'язаними своїми центромерами.

Мейоз здійснюється шляхом двох клітинних поділів (рис. 1.32). У профазі I (у ній розрізняють стадії лептотени, зиготени, пахітени, диплотени й діакінезу – на рисунку вони детально не показані) відбувається утворення так званих **бівалентів**, або **тетрад**, – комплексів гомологічних пар хроматид. Дві з чотирьох хроматид бівалента,



що належать гомологічним хромосомам, у кількох точках утворюють за участю певних білків *синаптонемні комплекси*, де починається процес гомологічної рекомбінації (рис. 1.32). У результаті частина гомологічних хромосом обмінюється своїми ділянками. Далі здійснюється поступова конденсація хроматид, і під мікроскопом можна побачити характерні перехрещення між хроматидами – *хіазми*, що утворилися внаслідок рекомбінації. Профаза I закінчується розділенням конденсованих бівалентів. Далі в метафазі I пари хроматид вишукуються по екватору, в анафазі I відбувається їхнє розходження, у телофазі I – остаточне розділення двох клітин, що містять подвійний набір молекул ДНК. Сестринські хроматиди при цьому залишаються з'єднаними в зоні своїх центромер.



**Рис. 1.32.** Схема клітинного поділу шляхом мейозу.  
Показано одну пару гомологічних хромосом

Далі в другому поділі (профаза II, метафаза II, анафаза II, телофаза II на рис. 1.32 не показані) відбувається розділення центромер, розходження хромосом і поділ обох клітин – у результаті утворюються чотири гаплоїдні гамети. При заплідненні батьківські набори хромосом об'єднуються з утворенням диплоїдної *зиготи*, яка шляхом мітотичного поділу дає початок усім іншим клітинам багатоклітинного організму-нащадка.

## БАЗОВІ ЗАКОНОМІРНОСТІ СПАДКУВАННЯ

Наведений вище огляд молекулярних і цитологічних основ організації спадкового апарату дозволяє сформулювати кілька загальних правил спадкування генів:

- гени є ділянками ДНК, які несуть інформацію про структуру білків і таких молекул РНК, котрі безпосередньо виконують певні функції;
- сукупність білків (головним чином) визначає всі фізіологічні й зовнішні ознаки організму, тобто вияв певної ознаки залежить від певної сукупності генів;
- гени містяться у хромосомах – білково-нуклеїнових комплексах, у кожній із яких входить одна довга молекула ДНК;
- при розмноженні одноклітинних організмів нестатевим шляхом і поділі соматичних клітин багатоклітинного організму дочірні клітини отримують повний набір генів від материнської клітини в незмінному вигляді.

Решта правил стосується багатоклітинних еукаріотів, які розмножуються статевим шляхом:

- у кожній клітині багатоклітинного організму існує набір пар гомологічних хромосом (диплоїдний набір); у даній ділянці (локусі) кожної з хромосом певної пари можуть міститися ідентичні гени або різні варіанти одного гена (алелі).
- при утворенні гамет кожна з них отримує тільки одну хромосому з кожної пари, але перед цим гомологічні хромосоми обмінюються своїми ділянками;
- нащадок одержує по одному набору хромосом ( $i$ , відповідно, по одному набору алелів) від кожного з батьків.

Хоча більшість ознак залежить від активності певної сукупності генів, є випадки (їх меншість, але все одно досить багато), коли прояву зовнішньої ознаки можна поставити у відповідність лише один ген. Розглянемо на простому прикладі, як реалізуються сформульовані вище правила.

Забарвлення насіння гороху залежить від гена *sgr*, що кодує білок SGR (гени прийнято позначати, як правило, маленькими літерами, виділяючи їх курсивом, їхні продукти – великими; наведене позначення походить від "stay green"). Білок бере участь у процесі руйнування хлорофілу, унаслідок чого зріле насіння набуває жовтого кольору (стають видимими жовті пігменти каротиноїди). Мутація в гені *sgr* приводить до того, що насіння зберігає зелений колір. Отже, маємо два алеля одного гена,

які можна позначити як  $sgr^+$  (нормальний ген) і  $sgr^-$  (мутантний ген), або ж як  $A$  та  $a$  відповідно. Якщо мутантний алель буде присутнім лише в одній хромосомі, алель  $A$  все одно виконає свою роботу, і насіння буде жовтим. У цьому разі прийнято казати, що алель  $A$  є **домінантним**, а алель  $a$  – **рецесивним**. Зелений колір насіння проявиться лише у випадку, коли обидві хромосоми будуть нести алель  $a$  – генотип буде **гомозиготним** за рецесивним алелем; гомозигота за доміантним алелем ( $AA$ ) і **гетерозигота** ( $Aa$ ) матимуть насіння жовтого кольору. Отже, якщо схрестити гомозиготи  $AA$  (жовті) та  $aa$  (зелені), усі нащадки першого покоління будуть гетерозиготами  $Aa$  з жовтим насінням.

Такі гетерозиготи будуть утворювати гамети двох типів: з алелем  $A$  або  $a$  в рівному співвідношенні. Якщо схрестити ці гетерозиготи першого покоління, то у другому поколінні на одну гомозиготу  $AA$  буде утворюватися в середньому одна гомозигота  $aa$  та дві гетерозиготи  $Aa$  ( $A$  – від батька,  $a$  – від матері або навпаки): особини з жовтим і зеленим насінням будуть отримані в кількісному співвідношенні 3 : 1.

Виходячи зі сформульованих вище положень, нами щойно отримано результат, опублікований Грегором Менделем (Gregor (Johann) Mendel) у 1866 р. Оскільки небагато знайдеться прикладів публікацій, з яких починалася б ціла наука, варто навести повне посилання на неї: Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden // Verh. Naturforsch. Ver. Brünn. – 1866. – Bd. 4. – S. 3–47. Звичайно, Мендель нічого не знав про ДНК та її реплікацію, хромосоми, мейоз і таке інше; він просто досліджував кількість особин із певними ознаками у схрещеннях гороху з жовтим і зеленим насінням. Проте сформулював найпринциповіші положення генетики: ознаки залежать від дискретних спадкових факторів (Мендель не користувався терміном "ген"), кожен такий фактор існує в кількох формах, дві копії фактора містяться в соматичних клітинах, у гамети переходить тільки одна з них.

Навіть виходячи з матеріалу цього розділу, зрозуміло, що в більшості випадків закономірності спадкування будуть значно складнішими (наступні розділи присвячено подальшому з'ясуванню цих закономірностей). Наприклад, якщо розглядати два гени, які визначають пару деяких ознак (Мендель вивчав і цей випадок, досліджуючи колір і форму насіння), то вони будуть спадкуватися незалежно один від одного, якщо знаходяться в різних хромосомах (як це й було в його дослідах). Якщо ж два гени присутні в одній хромосомі (зчеплені), то вони спадкуються разом. Але тільки за умови, що вони не розійшлися по різних гомологічних хромосомах (та не потрапили до різних гамет) унаслідок кросинговеру. Детальніше менделівські закони спадкування та відхилення від них розглянуто в розділі 3.

### *Контрольні запитання і завдання*

1. З яких трьох елементів складається нуклеотид? Чим хімічно відрізняються між собою рибо- і дезоксирибонуклеїнові кислоти?
2. Опишіть основні риси структури подвійної спіралі ДНК. Які взаємодії стабілізують подвійну спіраль? Що лежить в основі комплементарності нуклеотидів?
3. Опишіть магістральний шлях передачі спадкової інформації в живих системах.
4. Дайте визначення геному. У чому полягає найсуттєвіша відмінність між геномами про- та еукаріотів?
5. Що таке інтрон і екзон?
6. Назвіть основні типи послідовностей ДНК, що повторюються.
7. Із яких елементів складається нуклеосома? Як організована хроматинова фібрила у просторі?
8. Що таке ядерний матрикс і яка його роль в організації хроматину в клітинному ядрі?
9. Дайте визначення хромосоми, еухроматину, гетерохроматину.
10. Яка різниця між гаплоїдним і диплоїдним наборами хромосом? В яких клітинах багатоклітинних організмів вони присутні?
11. Опишіть морфологію мітотичної хромосоми. На які типи поділяють мітотичні хромосоми?
12. Що таке політенні хромосоми?
13. Дайте визначення реплікативної вилки. Яка різниця між двома ланцюгами ДНК, що синтезуються під час реплікації? Що таке фрагменти Оказаки?
14. Які ферментативні активності мають бактеріальні ДНК-полімерази? Порівняйте особливості та функціональне значення ДНК-полімераз I і III.
15. Що таке праймер та яка його хімічна природа?
16. Яку функціональну роль виконує теломераза?
17. Порівняйте ексцизійну репарацію основ і нуклеотидів.
18. Як здійснюється репарація місметчів у ДНК?
19. Як здійснюється репарація дволанцюгових розривів ДНК?
20. З якої події починається гомологічна рекомбінація? Що таке гетеродуплекс? Що таке структура Холідея?
21. З якою імовірністю відбувається обмін ділянками між двома гомологічними молекулами ДНК і від чого залежить реалізація такого обміну?
22. Що відбувається з гетеродуплексом після завершення гомологічної рекомбінації? Що таке конверсія гена?
23. Назвіть етапи клітинного циклу в багатоклітинних еукаріотів?
24. Опишіть процес мітозу.
25. Опишіть процес мейозу.
26. Сформулюйте базові закономірності спадкування генів.



## РОЗДІЛ 2

# Експресія генів

Першим етапом експресії генетичної інформації, записаної в послідовності нуклеотидів ДНК, є транскрипція – процес синтезу РНК з використанням одного з ланцюгів ДНК як матриці, тобто "переписування" послідовності нуклеотидів ДНК у послідовність нуклеотидів РНК.

Молекула РНК, що синтезується на білковому гені, – мРНК – використовується далі як джерело інформації на другому етапі експресії гена – синтезі білка, або трансляції, – перекладі нуклеотидного тексту в амінокислотний. Відповідність між цими двома типами текстів – між комбінаціями нуклеотидів і амінокислотами – називається **генетичним кодом**.

Безпосереднім продуктом активності геному, яка регулюється спеціальними системами (за участю певних генів), є специфічна для даного типу клітин сукупність транскриптів (молекул РНК) – **транскриптом**. Участь цих транскриптів у білковому синтезі зумовлює утворення набору білків – **протеому**. Для цих білків характерною є складна взаємодія: за деякими оцінками, кожен білок протеому, наприклад дріжджів, вступає в середньому у п'ять таких взаємодій (не беручи до уваги гомотипних взаємодій між однаковими білковими субодинаціями). Зважаючи на те, що білки вищих еукаріотів відрізняються наявністю більшої кількості структурних доменів у своєму складі, мережа білок-білкових взаємодій у протеомах організмів з вищою організацією має бути ще складнішою. Загальна картина взаємодій між білками (**інтерактом**) визначає розмаїття біологічних функцій, які часто й виконуються не поодинокими молекулами білків, а міжмолекулярними комплексами. При цьому варіації складу

цих комплексів приводять до варіацій функціональних. Білки та мультимолекулярні комплекси, відповідні за каталіз хімічних реакцій, функціонування сигнальних мереж, транспорт сполук тощо, залучені до складної системи реакцій і метаболічних перетворень (**реактом** і **метаболом**), до якої зводиться вся сукупність зовнішніх ознак та фізіологічних проявів організму.

Сучасна генетика є ще досить далекою від остаточного розуміння цього складного шляху від системи генів до сукупності ознак. Однак принципи передачі інформації від гена до білка (а часто й далі) нині вже з'ясовані в багатьох деталях.

## ГЕНЕТИЧНИЙ КОД

Одне "слово" нуклеотидного тексту має відповідати одному із 20 типів амінокислот, що входять до складу білків. Загальна кількість комбінацій по два нуклеотиди з чотирьох дорівнює 16, а по три – 64. Отже, мінімальна кількість нуклеотидів у одному слові, достатня для кодування 20 амінокислот, має дорівнювати трьом. Саме це й реалізується в генетичному коді: одне слово – **кодон** – являє собою триплет нуклеотидів (рис. 2.1). Серед 64 кодонів три є сигналами зупинки синтезу білка (стоп-кодони, або нонсенс-кодони), решта (61 змістовний кодон) відповідають 20 амінокислотам. Певний триплет кодує одну й тільки одну певну амінокислоту. Зворотне співвідношення не є однозначним: 18 амінокислот кодуються кількома синонімічними триплетами – код є *виродженим*. Дві амінокислоти – Trp і Met – невироджені й кодуються лише одним кодоном кожна.

Три позиції нуклеотидів у складі синонімічних кодонів не рівнозначні: найважливішою для визначення змісту кодона є комбінація нуклеотидів у першій та другій позиції. При цьому друга позиція визначає зміст кодона найжорсткіше – нуклеотидні заміни по ній завжди приводять до зміни змісту (амінокислотної заміни). Найнезмістовнішою є третя позиція – нуклеотидні заміни по третій позиції в 70 % випадків не викликають змін змісту кодона.

Два параметри амінокислотних залишків мають особливе значення для структури білка: розмір і здатність взаємодіяти з водою. За останньою ознакою залишки можна розділити дві групи: полярні

(такі, що добре взаємодіють із водою, – Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr) і неполярні, або гідрофобні (Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val). Три гідрофобні залишки (Ala, Gly, Pro) – маленького розміру, тому їх можна вважати "нейтральними" щодо спорідненості до води. У глобулярних водорозчинних білках співвідношення між гідрофобними й полярними залишками дорівнює в середньому 50 : 50. Унаслідок гідрофобного ефекту неполярні залишки прагнуть опинитися всередині структури білка, полярні залишаються на поверхні, зберігаючи взаємодії з водою. Це і є головна рушійна сила, яка змушує білковий ланцюг укладатися певним чином у просторі, формуючи компактну глобулярну структуру, що має певну функціональну активність.

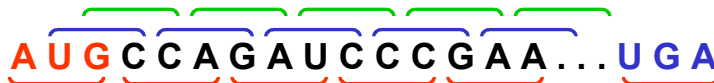
		2й нуклеотид			
		U	C	A	G
1й нуклеотид	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }
	A	AUU } AUC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

**Рис. 2.1.** Таблиця генетичного коду. Послідовності кодонів наведено у напрямку від 5'- до 3'-кінця у складі мРНК. Використано стандартні скорочення амінокислот (у дужках – загальноживані однолітерні скорочення): Ala – аланін (A), Arg – аргінін (R), Asn – аспарагін (N), Asp – аспарагінова кислота (D), Cys – цистеїн (C), Gln – глутамін (Q), Glu – глутамінова кислота (E), Gly – гліцин (G), His – гістидин (H), Ile – ізолейцин (I), Leu – лейцин (L), Lys – лізин (K), Met – метіонін (M), Phe – фенілаланін (P), Pro – пролін (P), Ser – серин (S), Thr – треонін (T), Trp – триптофан (W), Tyr – тирозин (Y), Val – валін (V). Stop – стоп-кодон

Залежно від типу нуклеотиду в другій позиції, усі кодони можна розділити на чотири групи (чотири стовпчики в таблиці коду на рис. 2.1). До групи U (урацил у другій позиції) належать гідрофобні амінокислоти великого розміру, до групи A – великі полярні амінокислоти (крім Туг, але й він, хоча загалом гідрофобний, також здатен утворювати водневий зв'язок), група C сформована амінокислотами маленького розміру. Тобто нуклеотидні заміни в першій і третій позиціях у межах цих груп не викликають зміни властивостей амінокислоти, мінімізуючи вплив таких амінокислотних замін на просторову структуру білка: генетичний код є стійким до перешкод.

Наведена таблиця коду реалізується як для бактерій, так і для ссавців, тобто генетичний код досить універсальний. Але в деяких випадках (окремі прокаріоти, гриби, водорості, а також автономна генетична система мітохондрій) спостерігаються невеличкі відхилення від цієї універсальної таблиці. Наприклад, деякі стоп-кодони іноді стають змістовними. Слід зауважити також, що один із стоп-кодонів – UGA – у переважній більшості організмів використовується для кодування мінорної 21-ї амінокислоти – селеноцистеїну. Ця амінокислота включається при білковому синтезі лише в кілька важливих ферментів, таке нестандартне сприйняття стоп-кодона системою трансляції залежить від контексту послідовності, в якому цей кодон міститься.

У процесі синтезу білка триплети зчитуються з нуклеотидного тексту один за одним: сусідні триплетні не перекриваються, між ними немає проміжків. Будь яка послідовність нуклеотидів може бути прочитана трьома різними способами, тобто вона містить три рамки зчитування (рис. 2.2). Нуклеотидна заміна може зумовити зміну змісту кодона – амінокислотну заміну, а видалення хоча б одного нуклеотиду привести до зсуву рамки зчитування, тобто заміни змісту всіх кодонів, розташованих нижче такого втраченого нуклеотиду (чи ділянки, довжина якої не є кратною трьом).



**Рис. 2.2.** Три можливі рамки зчитування, одна з яких (позначена червоними дужками) є відкритою



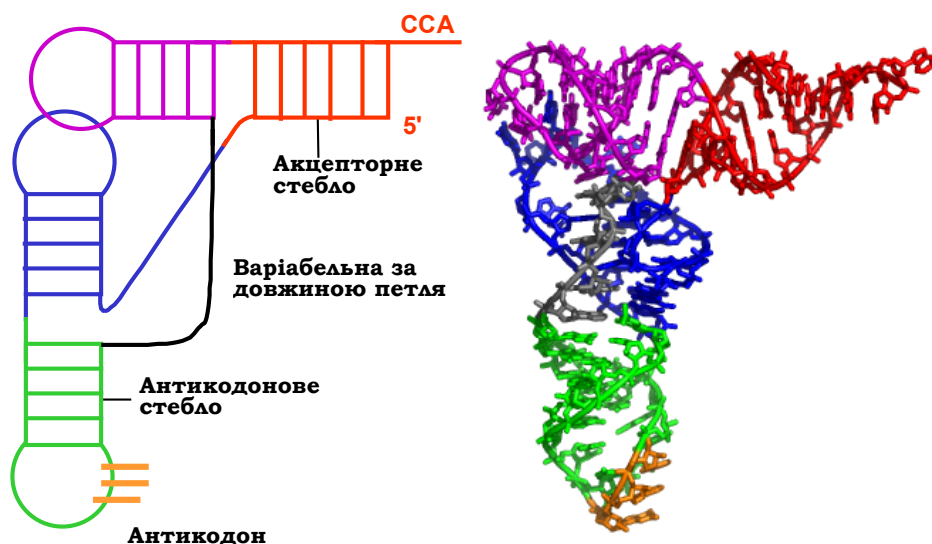
Рамка, яка розташована між стартовим (найчастіше роль стартового при білковому синтезі відіграє метіоніновий кодон AUG) і стоп-кодоном, називається **відкритою рамкою зчитування** (ORF, open reading frame). Отже, кодуєча частина білкового гена обов'язково містить відкриту рамку зчитування.

## СИНТЕЗ БІЛКІВ

Молекулярні механізми білкового синтезу в основному є спільними для всіх живих організмів. Зчитування інформації, записаної в послідовності нуклеотидів мРНК, та її переклад у амінокислотний текст розпочинається зі стартового кодона, де при *ініціації трансляції* відбувається остаточне збирання головного пристрою трансляції – *рибосоми* – комплексу рибосомної РНК і білків. Вона сканує нуклеотидну послідовність мРНК, рухаючись уздовж неї кроками по три нуклеотиди від 5'- до 3'-кінця під час *елонгації трансляції* до стоп-кодона, де відбувається *термінація* процесу. Під час сканування рибосома працює як декодуючий пристрій, забезпечуючи впізнання кодонів комплементарними щодо них триплетами (*антикодонами*) у складі *тРНК* (транспортні РНК), і як каталізатор процесу синтезу пептидного зв'язку між амінокислотами. Певний антикодон відповідає амінокислоті певного типу, яку несе на собі тРНК. Отже, тРНК є ключовою ланкою реалізації генетичного коду: саме вони забезпечують доставку амінокислот до рибосоми в порядку, який відповідає послідовності кодонів.

### Транспортні РНК

Молекули тРНК містять 74–95 (найчастіше 76) нуклеотидів. У складі молекули формуються комплементарні дволанцюгові стебла та шпильки з петлями на кінцях за єдиною для всіх тРНК схемою (рис. 2.3). Кінцеві фрагменти ланцюга об'єднуються у дволанцюгове стебло, причому чотири нуклеотиди на 3'-кінці залишаються неспареними. 3'-Кінцевий триплет ССА є стандартним для всіх тРНК, до рибози кінцевого аденозину ковалентно приєднується амінокислота – відповідно, стебло називають *акцепторним*.



**Рис. 2.3.** Схема та просторова структура тРНК. Зображення створено за допомогою програми PyMOL, код структури у Protein Data Bank 6TNA. Елементи структури пофарбовані однаково ліворуч і праворуч

Чотири дволанцюгові стебла попарно переходять одне в одне й формують дві приблизно перпендикулярні одна одній подвійні спіралі (рис. 2.3). У результаті молекула тРНК має Г- або L-подібну форму з двома плечима різної довжини: на кінці одного плеча акцептується амінокислота (акцепторне плече), на кінці іншого – у складі антикодонової петлі – розташований антикодон (антикодонове плече).

тРНК конкретного типу, яка відповідає певній амінокислоті, позначають, індексами, наприклад, тРНК<sup>Ala</sup>. Якщо молекула тРНК містить амінокислоту, то таку аміноацил-тРНК позначають як Ala-тРНК<sup>Ala</sup>. Загальне позначення для аміноацильованих тРНК – aa-тРНК.

Молекули тРНК є продуктами транскрипції відповідних генів, частина яких представлена кількома копіями, – близько 500 активних генів тРНК у геномі людини, 87 у геномі *E. coli*. Загальна кількість типів тРНК, які обслуговують процес білкового синтезу, становить близько 40 (наприклад, усі гени тРНК людини можна розділити на 49 родин за властивостями антикодонів). Оскільки типів тРНК більше, ніж амінокислот, одній амінокислоті може відповідати кілька тРНК – такі тРНК називають *ізоакцепторними*. Типів тРНК менше, ніж кодонів, тому одна тРНК здатна розпізнавати кілька синонімічних кодонів, що забезпечується неоднозначністю спарювання між першою позицією антикодона і третьою

(за якою в основному розрізняються синонімічні кодони (рис. 2.1)) – кодона. А саме: U та G здатні впізнавати по два нуклеотиди у третій позиції кодона, I (інозин – неканонічна азотиста основа, що досить часто зустрічається в першій позиції антикодона) упізнає три нуклеотиди (табл. 2.1).

**Таблиця 2.1. Відповідність між нуклеотидами у першій позиції антикодона і третій позиції кодона**

Антикодон	Кодон
C	G
A	U
U	A, G
G	U, C
I	U, C, A

Порядок залучення амінокислот до поліпептидного ланцюга, який утворюється при білковому синтезі, залежить лише від взаємодій між нуклеїновими кислотами – кодоном і антикодоном; амінокислота, яку несе тРНК, жодним чином не розпізнається рибосоною. Отже, акцептування певної амінокислоти молекулою тРНК відповідного типу (і тільки відповідного) є одним із найважливіших моментів білкового синтезу: від точності процесу акцептування буде залежати й точність синтезу білка в цілому. Процес приєднання амінокислот до тРНК каталізується *аміноацил-тРНК-синтетазами* (АРСаза). Кожна із 20 типів (за кількістю амінокислот) цих ферментів є прецизійним молекулярним пристроєм, який забезпечує високоточне (середня частота помилок становить приблизно  $10^{-6}$ ) акцептування амінокислот відповідними тРНК.

## Рибосома й механізм трансляції

Рибосома – рибонуклеопротеїновий комплекс, який складається з двох субодиниць. Маленька субодиниця прокариотичної рибосоми містить одну молекулу рРНК 16S (компоненти рибосоми прийнято позначати їхніми коефіцієнтами седиментації у сведбергах – S) і 21 молекулу рибосомних білків. Велика субодиниця містить дві молекули рРНК (23S і 5S) і білки 36 типів. Еукариотична рибосома містить трохи більшу рРНК 18S замість 16S, дві рРНК (28S і 5,8S), замість 23S, рРНК 5S і більшу кількість білків. Структура обох рибосом і принципи їхньої роботи подібні.

Синтез еукариотичних рРНК 18S, 5,8S і 28S здійснюється в ядерці, яке формується на тандемних повторях кластера відповідних генів рРНК (кластер повторюється від 100 до 1000 разів у різних видів).

Первинний продукт транскрипції містить три фрагменти майбутніх рРНК, розділені спейсерами, – кластер транскрибується як одне ціле. *Процесинг* рРНК – деградація спейсерів, а також певні хімічні модифікації – здійснюється за участю близько 150 типів *маленьких ядерцевих РНК* (аналогічно до того, як маленькі ядерні РНК беруть участь у процесингу мРНК, про що йтиметься нижче). Гени рРНК ще одного типу – 5S – також тандемно повторюються в іншому місці геному, звідки рРНК 5S транспортуються до ядереця, куди потрапляють також і рибосомні білки, і де відбувається збирання рибосомних субодиниць. Первинний продукт транскрипції прокаріотичних генів рРНК містить ділянки, які відповідають усім трьом прокаріотичним рРНК, а також кілька майбутніх тРНК. Часткова деградація транскрипту приводить до утворення зрілих молекул, які взаємодіють із рибосомними білками, формуючи дві субодиниці рибосоми. Остаточне збирання рибосоми з двох субодиниць, як у про-, так і в еукаріотів, відбувається під час ініціації трансляції.

Рибосомні РНК становлять близько 2/3 маси рибосоми й саме вони визначають її структуру та функції. Полінуклеотидний ланцюг рРНК утворює велику кількість подвійних спіралей, які укладаються в складну просторову структуру. Рибосомні білки розташовані на поверхні рРНК (і, відповідно, на поверхні рибосоми), стабілізуючи її функціонально активну просторову організацію.

Під час роботи рибосоми її маленька субодиниця взаємодіє з мРНК. Сумісно двома субодиницями утворюються сайти зв'язування для трьох молекул тРНК (рис. 2.4): *A-сайт* – у ньому відбувається зв'язування аа-тРНК; *P-сайт* – тут із рибосомою взаємодіє пептидил-тРНК (тРНК, до якої приєднаний *пептидил* – ланцюг, що синтезується); *E-сайт* (від exit) – куди потрапляє деаміноацильована тРНК перед її звільненням із рибосоми.

Зчитування інформації з мРНК здійснюється рибосомою в напрямку від 5'- до 3'-кінця, поліпептидний ланцюг синтезується від N- до C-кінця. Процес трансляції розпочинається зі стадії ініціації (рис. 2.4), коли рибосомою впізнається стартовий кодон, що задає початок і рамку зчитування інформації. На нього та в P-сайт рибосоми одночасно завантажуються ініціаторна аа-тРНК. Ефективність здійснення цих операцій забезпечується набором певних білкових факторів ініціації.

Стартовим кодоном є здебільшого метіоніновий кодон AUG, відповідно, ініціаторною є завжди Met-тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup> (індекс "i" вказує на те, що це – саме *ініціаторна* метіонінова тРНК, тобто вона відрізняється за своєю структурою від звичайної тРНК<sup>Met</sup>, яка використовується для включення Met усередині ланцюга). Отже, першою амінокислотою завжди виступає метіонін (як правило, відщеплюється посттрансляційно).

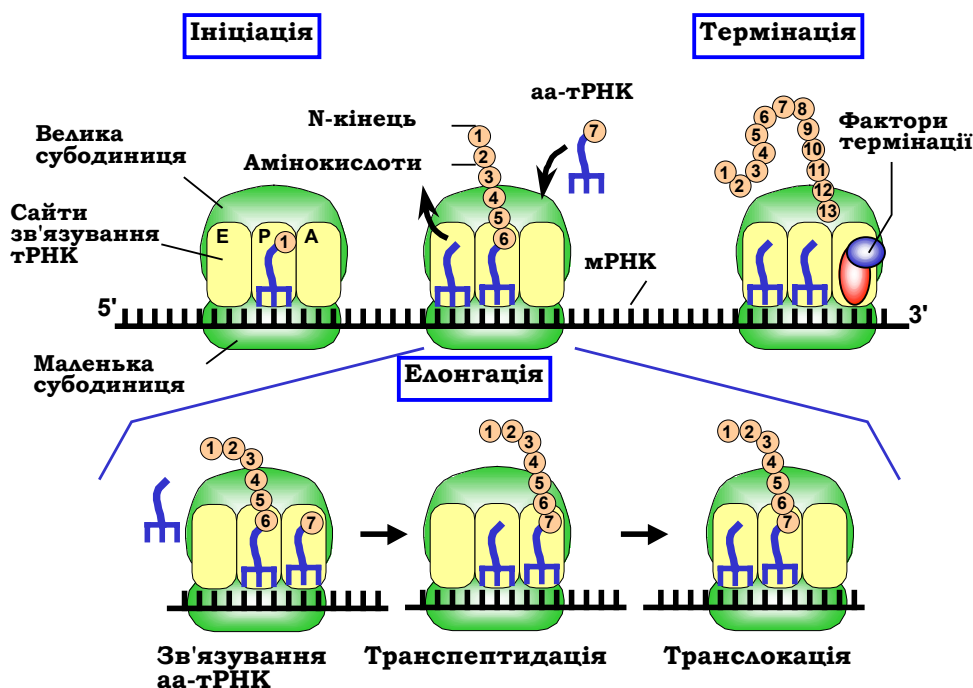


Рис. 2.4. Схема процесу трансляції. У нижній частині показано події одного елонгаційного циклу

Далі робота рибосоми під час елонгації трансляції полягає в послідовному (потриплетно) зчитуванні інформації з мРНК і відповідному приєднанні амінокислот до поліпептидного ланцюга (рис. 2.4). Кожен такий крок складається з трьох операцій, що циклічно повторюються (елонгаційний цикл). Цикл розпочинається зі зв'язування *aa-тРНК* з *A-сайтом*. Рибосома забезпечує високу специфічність щодо взаємодій між кодоном і антикодоном – тільки споріднена до даного кодона тРНК відбирається системою. Процес розміщення *aa-тРНК* в *A-сайті* часто супроводжується дисоціацією з *E-сайта* деаміноацильованої тРНК, яка залишилася там із попереднього циклу.

Наслідком зв'язування є *транспептидація* – перенесення пептидилу з пептидил-тРНК на амінокислоту у складі *aa-тРНК*. Каталітичний активний центр, що забезпечує транспептидацію, розташований на великій субодинаці рибосоми й формується виключно рибосомною РНК. Унаслідок транспептидації в *A-сайті* опиняється пептидил-тРНК із подовженим на одну амінокислоту пептидилом, у *P-сайті* – деаміноацильована тРНК.

Третя операція – *транслокація* – полягає в переміщенні рибосоми на один кодон уздовж мРНК (молекули тРНК залишаються зв'язаними зі своїми кодонами), після чого розпочинається наступний елонгаційний цикл. Ефективність і швидкість здійснення елонгаційного циклу залежить від двох білкових факторів елонгації.

Коли після чергового елонгаційного циклу (який стане останнім) в А-сайті опиняється один із трьох стоп-кодонів, він розпізнається факторами термінації трансляції – жодна тРНК не містить відповідних антикодонів (рис. 2.4). Фактори термінації забезпечують звільнення синтезованого амінокислотного ланцюга та підготовку рибосоми до нового раунду трансляції: дисоціацію субодиниць рибосоми одна від одної та від мРНК.

## ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ У ПРОКАРІОТІВ

Розглянемо перший етап експресії гена – транскрипцію – і, водночас, загальну картину реалізації спадкової інформації. Хоча молекулярні механізми синтезу РНК є значною мірою спільними для всіх живих організмів, вони суттєво розрізняються для про- та еукаріотів. Тому варто розглянути їх окремо, а почати слід із простішої прокариотичної системи експресії генів.

### Транскрипція

Зростання ланцюга РНК при транскрипції відбувається в напрямі від 5'- до 3'-кінця. Субстратами реакції є 3'-кінцева ОН-група рибози зростаючого транскрипту (ланцюга РНК, що синтезується) і рибонуклеозидтрифосфати (rNTP). Принципова схема реакції ідентична схемі реакції синтезу ДНК (рис. 1.16) – приєднання чергового нуклеотиду залежить від його комплементарних взаємодій з тим ланцюгом ДНК, котрий використовується як матриця. Фермент, який каталізує цю реакцію – *ДНК-залежна РНК-полімераза*.

До складу бактеріальної РНК-полімерази входять кілька білкових субодиниць. Залежно від стадії транскрипції існує дві її форми:

- 1) *кор-фермент* у складі субодиниць, позначуваних як  $\alpha$  (дві копії),  $\beta$ ,  $\beta'$  і  $\omega$ ;
- 2) *голофермент* – комплекс кор-ферменту із субодиницею  $\sigma$ .

Кор-фермент може працювати на різноманітних послідовностях, оскільки має досить високу неспецифічну спорідненість до ДНК. Поява субодиниці  $\sigma$  у складі голоферменту зумовлює *зниження* загальної неспецифічної спорідненості, однак при цьому виникає *специфічна* спорідненість до **промоторів** – особливих ділянок, із яких має розпочинатися транскрипція. Субодиниця  $\sigma$ , таким чином, виконує роль *загального фактора ініціації* транскрипції. Різні промотори розрізняються за спорідненістю до голоферменту (*силою промотора*). Відповідно, упізнання слабких промоторів залежить від додаткових, специфічних для даного гена чи групи генів, факторів ініціації.

Робочий цикл РНК-полімерази складається з таких стадій.

• **Ініціація** транскрипції, яка також є багатостадійним процесом (рис. 2.5):

- 1) зв'язування голоферменту з промотором;
- 2) локальне плавлення подвійної спіралі – розходження ланцюгів ДНК (на ділянці у 12–14 пар основ), яке дозволяє використовувати один із них як матрицю;
- 3) включення перших двох нуклеотидів у молекулу РНК (синтез першого фосфодієфірного зв'язку в активному центрі полімерази) є найповільнішою стадією процесу, яка може відбуватися тільки у присутності субодиниці  $\sigma$ ;
- 4) зростання первинного короткого транскрипту – приєднання 8–9 нуклеотидів;
- 5) очищення промотора – дисоціація  $\sigma$ -фактора, яка маркує перехід до елонгації транскрипції.

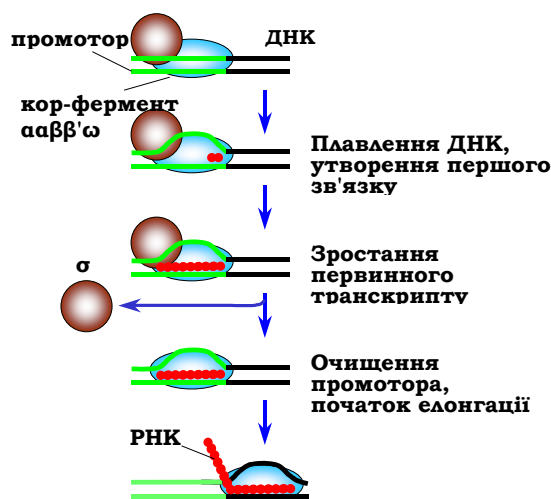
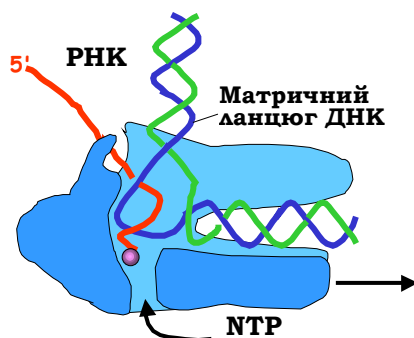


Рис. 2.5. Ініціація транскрипції бактеріальною РНК-полімеразою

- **Елонгація** транскрипції, у кожному елементарному акті якої приєднується черговий нуклеотид до 3'-кінця РНК і кор-фермент пересувається на один нуклеотид уздовж матриці. При цьому разом із полімеразою переміщується також і розплавлена ділянка ДНК: одна пара основ руйнується попереду від полімерази, одна – відновлюється позаду. Синтез РНК відбувається із середньою швидкістю 40 нуклеотидів за секунду.
- **Термінація** транскрипції – визволення транскрипту, після чого кор-фермент знову взаємодіє з  $\sigma$ -субодиницею і здійснює новий пошук промотора. Сигнал термінації являє собою послідовність, транскрипція якої приводить до утворення у складі мРНК комплементарної дволанцюгової шпильки, безпосередньо фланкованої роуU послідовністю: цей елемент структури мРНК розпізнається полімеразою, унаслідок чого система руйнується. Іноді процес полегшується додатковими білковими факторами термінації.

РНК-полімераза характеризується асиметричною структурою: дві великі субодиниці –  $\beta$  і  $\beta'$  – формують характерні "щелепи", із внутрішньою поверхнею яких взаємодіє ДНК, розташована "нижче" (downstream) у напрямку руху полімерази. Глибоко між щелепами міститься каталітичний активний центр (рис. 2.6). Ці риси структурної організації є загальними для всіх інших РНК-полімераз: еукаріотичних і мономерних полімераз деяких бактеріофагів.

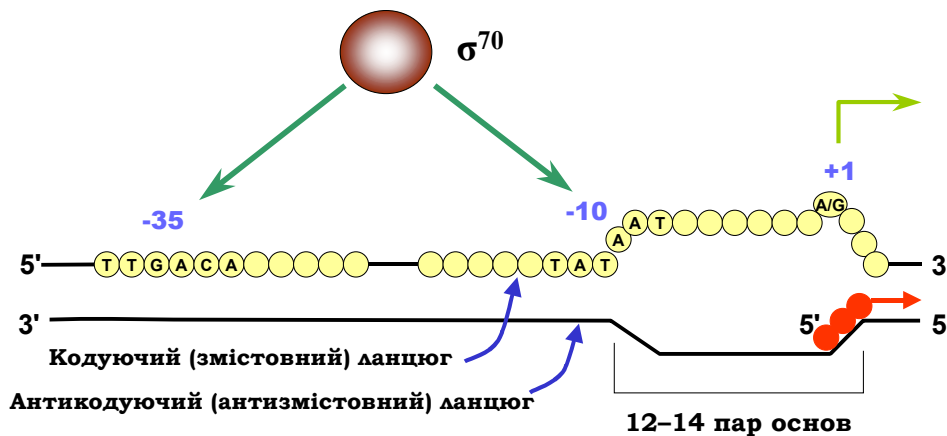


**Рис. 2.6.** Схема організації РНК-полімеразного комплексу (у розрізі) під час елонгації транскрипції

Асиметрична будова РНК-полімерази зумовлює два можливі способи, якими фермент може бути орієнтованим відносно ДНК: кожній із цих орієнтацій буде відповідати два протилежні напрямки руху при транскрипції. Відповідно, один із двох ланцюгів ДНК буде обиратися



як *матричний* – той, з якого зчитується інформація у напрямку 3'–5' (рис. 2.6, 2.7). Послідовність ланцюга ДНК, який є комплементарним матричному, збігається з послідовністю РНК, що синтезується. Тому саме цей нематричний ланцюг називають *кодуючим*, або *змістовним*, – його послідовність прийнято наводити як послідовність даного гена (відповідно, матричний ланцюг називають *антикодуючим*). Нуклеотид кодуючого ланцюга, який відповідає стартовому нуклеотиду РНК (частіше пуриновий), позначається як +1, наступні нуклеотиди (чи пари основ) у напрямку руху полімерази нумерують з позначкою "+": +2, +3 і т. д. У зворотному напрямку (ліворуч на рис. 2.7) нуклеотиди нумерують із позначкою "-" (починаючи з -1).



**Рис. 2.7.** Типовий промотор *E. coli*. Зелена стрілка позначає старт транскрипції всередині розплавленої зони

Типовий бактеріальний промотор (рис 2.7) складається з двох елементів послідовності, розташованих на відстані приблизно -10 і -35 від стартової точки. Консенсусна (узагальнена для різних промоторів) послідовність елемента -35 має вигляд  $T_{82}T_{84}G_{78}A_{65}C_{54}A_{45}$  (числами позначено частоту зустрічальності даної основи у відсотках). Послідовність елемента -10 (називається також боксом Прибнау):  $T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$ . Варіабельність послідовностей визначає різну ефективність ініціації – силу промоторів. Саме елементи -35 та -10 безпосередньо впізнаються  $\sigma$ -фактором при ініціації транскрипції. Наведені послідовності розпізнаються варіантом  $\sigma$ -фактора із молекулярною вагою 70 кДа ( $\sigma^{70}$ ), який є досить широко застосовуваним, однак він

не єдиний. Кільком іншим варіантам  $\sigma$ , під контролем яких перебувають певні групи промоторів, відповідають інші консенсусні послідовності  $-35$  та  $-10$ . Взаємодія  $\sigma$ -фактора з промотором чітко орієнтує РНК-полімеразу щодо ДНК, тобто визначає як стартову точку транскрипції, так і її напрямок (вибір одного з двох ланцюгів як матричного).

Суттєвою особливістю прокариотичної системи транскрипції білкових генів є те, що молекула мРНК зв'язується з рибосомами безпосередньо під час транскрипції – **прокариотична транскрипція і білковий синтез є єдиним процесом**. При цьому мРНК, що синтезується на так званих *операонах* – кластерах кількох генів, про які детальніше йтиметься нижче, містить кілька послідовних рамок зчитування та кілька стартових кодонів. Ініціація трансляції відбувається окремо на кожному з них усередині мРНК, і розпізнання цих стартових кодонів не залежить від їхнього розташування щодо 5'-кінця матриці (так звана *внутрішня ініціація*). Специфічне розміщення стартового кодона в Р-сайті рибосоми при ініціації трансляції у прокариотів забезпечується комплементарним упізнанням між ділянкою рРНК 16S і консервативною *послідовністю Шайна – Дальгарно*, розміщеною в мРНК за 5–9 нуклеотидів від стартового кодона в напрямку до 5'-кінця. Саме наявність цієї послідовності й робить даний кодон AUG стартовим, відрізняючи його від звичайного метіонінового кодона.

Якщо рибосоми з тих чи інших причин не зв'язуються з мРНК, транскрипт швидко деградує під дією нуклеаз.

## Регуляція транскрипції

Зрозуміло, що гени не транскрибуються постійно, а вмикаються / вимикаються в певні моменти залежно від зовнішніх умов, стадій клітинного циклу тощо. Головними елементами, взаємодія між якими зумовлює активацію чи репресію транскрипції, є *цис-* і *транс-елементи*. *Цис-*елементи – це регуляторні елементи послідовності ДНК, які фізично зв'язані з даним геном; у прокариотів часто називаються *операторами* і перебувають у безпосередній близькості до промоторів. *Транс-*елементи – білкові фактори транскрипції, які вільно дифундують (*транспортуються*) у просторі клітини, шукаючи свій *цис-*елемент, до якого вони мають специфічну спорідненість. Якщо зв'язування *транс-*елемента з оператором приводить до активації транскрипції (часто за рахунок прямих білок-білкових взаємодій транскрипційного фактора з РНК-полімеразою, які підвищують її спорідненість до про-

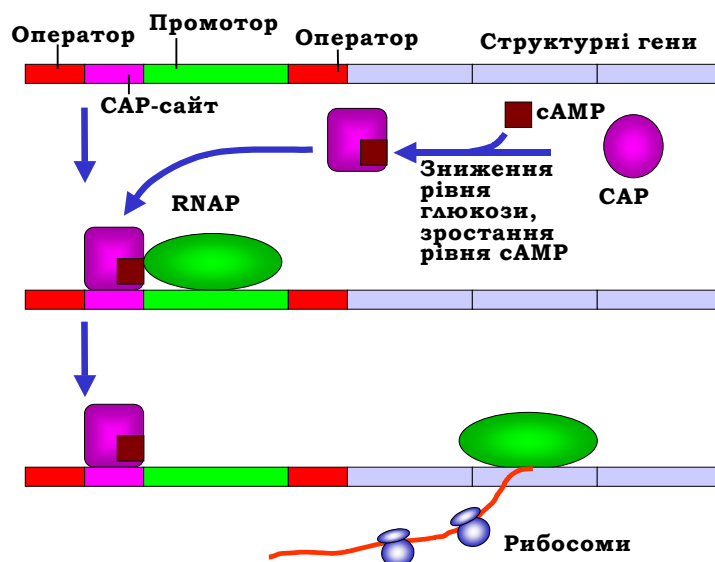
мотора), кажуть, що фактор є *активатором* і здійснює *позитивну* регуляцію. Якщо фактор блокує зв'язування РНК-полімерази (часто за рахунок зниження доступності промотора), його називають *репресором* і йдеться про *негативну* регуляцію.

Ці загальні принципи регуляції, які, ускладнюючись, зберігаються також в еукаріотів, реалізуються на стадії ініціації. Крім того, для регуляції використовуються інші моменти процесу транскрипції. Зокрема, для регуляції певних генів застосовується механізм *антитермінації*, коли активатори транскрипції запобігають упізнанню РНК-полімеразою сигналів термінації, що містяться всередині кодуєчої частини гена. Якщо фактори відсутні, ген неактивний: наявність термінуючого сигналу зумовлює термінацію транскрипції та визволення нефункціонального РНК-продукту.

Суттєвою особливістю прокаріотичного геному є те, що хоча приблизно 3/4 транскрипційних одиниць (скажімо, *E. coli*) містять один ген, решта реалізує характерний для бактерій оперонний принцип організації генетичного матеріалу. **Оперон** являє собою кластер так званих *структурних генів*, на яких синтезується одна молекула мРНК, що має кілька (одна на кожен структурний ген) послідовних відкритих рамок зчитування для трансляції відповідних білків. У межах оперона згруповані структурні гени, які відповідають за синтез білків, залучених до одного ланцюжка біохімічних перетворень (ферменти синтезу або деградації певної сполуки). Крім структурних генів оперон має регуляторні ділянки, за рахунок яких здійснюється регуляція транскрипції оперона як цілого. У геномі *E. coli* міститься ~650 таких одиниць транскрипції.

Наступні два приклади ілюструють найтипівіші механізми регуляції транскрипції у прокаріотичних системах.

**Лактозний оперон** (*lac*-оперон) *E. coli* став свого часу, завдяки дослідженням Жакоба і Моно (François Jacob, Jacques Monod), першою детально вивченою системою регуляції транскрипції. До складу оперона (рис. 2.8) входять три структурні гени, що кодують ферменти, залучені до утилізації (катаболізму) лактози. Транскрипція всіх трьох генів здійснюється з одного промотора (синтезується єдина *поліцистронна* молекула мРНК, яка має три послідовні відкриті рамки зчитування). Промотор оточують дві однакові операторні ділянки (*lac*-оператори), що мають спорідненість до *lac*-репресора, і сайт зв'язування CAP (Catabolite Activator Protein).



**Рис. 2.8.** Позитивна регуляція *lac*-оперона катаболітним активаторним білком CAP

Промотор *lac*-оперона слабкий – у нього досить низька власна спорідненість до РНК-полімерази. Навіть якщо в середовищі є лактоза, але присутня також глюкоза (кращий харчовий субстрат для бактерій), транскрипція *lac*-оперона майже не здійснюється. Зниження рівня глюкози приводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації сАМР (циклічного аденозинмонофосфату), зв'язування якого з CAP індукує конформаційну перебудову білка та появу його специфічної спорідненості до відповідного сайту на ДНК (див. структуру комплексу на рис. 1.7, в). Взаємодія CAP із РНК-полімеразою підсилює її спорідненість до промотора – CAP рекрутує полімеразу, яка далі розпочинає синтез мРНК (рис. 2.8).

Описаний сценарій позитивної регуляції реалізується лише за умови, що *lac*-оператори не взаємодіють із *lac*-репресором. У разі відсутності лактози (коли відповідні ферменти її утилізації напевно не потрібні) гомодимери репресора (незалежно від можливої присутності CAP) зв'язуються з обома операторами й при цьому взаємодіють між собою: утворюється тетрамерний комплекс, який утримує петлю ДНК (рис. 2.9). У середині петлі міститься промотор, і це абсолютно запобігає зв'язуванню з ним РНК-полімерази. Коли з'являється лактоза, її невелика кількість перетворюється на алолактозу, яка спрацьовує як індуктор *lac*-оперона: зв'язування алолактози з репресором індукує

структурні зміни білка та втрату його спорідненості до оператора. Унаслідок руйнування петлі РНК-полімераза зв'язується з промотором і оперон починає працювати.

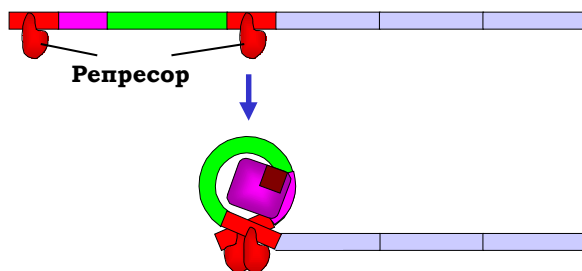


Рис. 2.9. Негативна регуляція *lac*-оперона *lac*-репресором

**Атенюація.** Система *атенюації* (attenuation – послаблення), яка використовується зокрема для регуляції активності триптофанового оперона (*trp*-оперона) *E. coli*, пов'язана із використанням сигналів термінації та тієї обставини, що прокаріотична транскрипція тісно узгоджена з трансляцією. Триптофановий оперон містить п'ять структурних генів, які відповідають за синтез амінокислоти Тгр, перед ними розташовані промотор, оператор і лідерна послідовність, з якої розпочинається транскрипція (рис. 2.10, а).

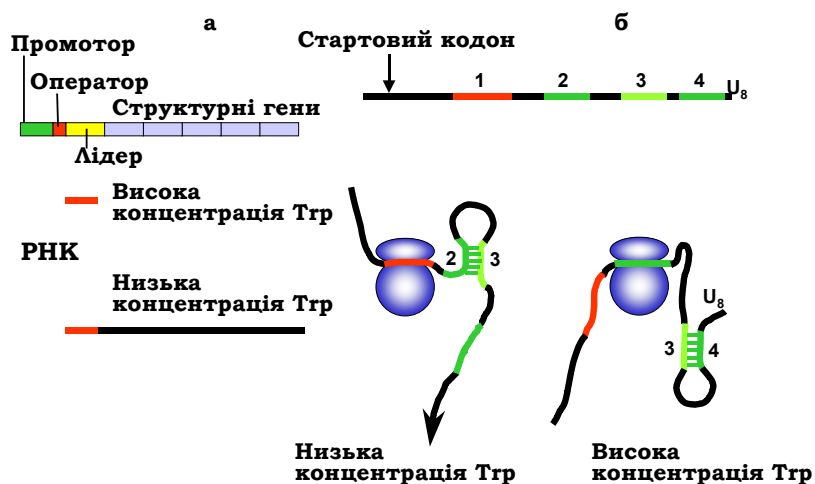


Рис. 2.10. (а): Схема *trp*-оперона, на якому синтезуються два РНК-продукти залежно від внутрішньоклітинної концентрації Тгр. (б): Лідерна РНК і два варіанти спарювання основ у її складі залежно від розташування рибосоми

Лідерна частина РНК містить стартовий кодон, що розпізнається рибосоною, і чотири елементи послідовності: ділянка 1 містить два послідовні триптофанові кодони, ділянки 2–3 та 3–4 є попарно взаємокомплементарними, за ділянкою 4 розташована оліго-U послідовність. Шпилька 3–4, фланкована оліго-U, є, таким чином, сигналом термінації транскрипції. Коли концентрація Trp низька (є потреба у Trp і тому оперон має бути активним), рибосома зупиняється на триптофанових кодонах ділянки 1 (оскільки відсутня і Trp-тРНК). У цьому випадку утворюється шпилька 2–3 (ділянка 3 не залучається до утворення термінуючої шпильки) і РНК-полімераза продовжує синтез повноцінної мРНК. Рибосоми зв'язуються зі стартовими кодонами, що відповідають структурним генам, і синтезуються відповідні білки.

За високого рівня Trp рибосома швидко проходить через ділянку 1 на ділянку 2 і зупиняється на стоп-кодоні. У результаті утворюється шпилька 3–4, тобто формується сигнал термінації, і РНК-полімераза зупиняє транскрипцію після синтезу короткої нефункціональної лідерної РНК.

*trp*-Оперон перебуває також під контролем *trp*-репресора. Регулятором спорідненості репресора до оператора є сам Trp: у комплексі з ним репресор набуває конформаційної форми, яка має високу спорідненість. Якщо концентрації Trp знижується – репресор дисоціює й ефективність ініціації транскрипції підвищується приблизно в 70 разів. Атенуація є додатковим, менш ефективним механізмом регуляції: у разі відсутності Trp ефективність транскрипції підвищується приблизно в 10 разів за рахунок атенуації (за наявності Trp близько 10 % РНК-полімераз долають сигнал термінації й продовжують працювати, за відсутності Trp – практично всі). Таким чином, сумісна дія атенуації та негативного контролю за рахунок репресора дозволяє змінювати активність оперона майже в 700 разів залежно від внутрішньоклітинної концентрації Trp.

## ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ В ЕУКАРІОТІВ

На відміну від прокаріотів, еукаріотична мРНК синтезується під час транскрипції у клітинному ядрі, звідки транспортується до цитоплазми. Отже, **білковий синтез, який відбувається в цитоплазмі, та транскрипція є окремими, розділеними у просторі й часі, етапами експресії гена**. Інша принципова відмінність полягає в мозаїчності

будови еукаріотичного гена (див. розділ 1): первинний транскрипт, що синтезується, не може бути використаним як матриця для білкового синтезу – принаймні тому, що в його складі є інтрони. Дозрівання пре-мРНК з утворенням функціональної матриці називають **процесингом**. Усі операції процесингу відбуваються під час транскрипції на РНК-полімеразному комплексі, тобто **процесинг еукаріотичної мРНК є невід'ємною частиною транскрипції**.

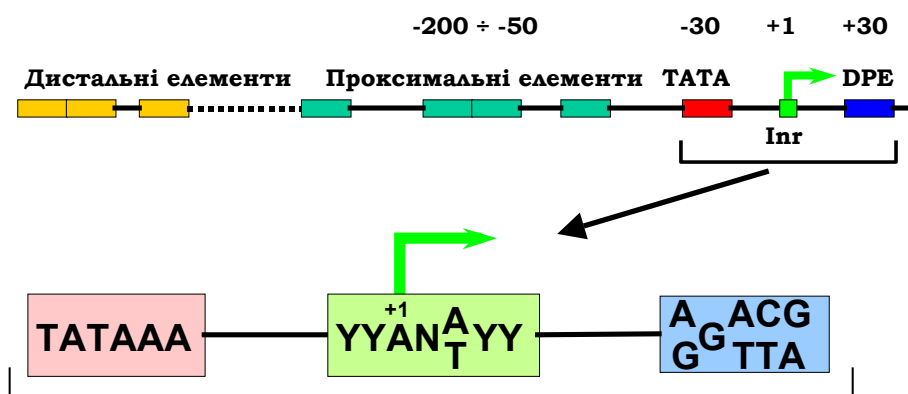
## Ініціація транскрипції

В еукаріотичних клітинах функціонують РНК-полімерази трьох типів: *РНК-полімераза I* працює на кластерах генів рибосомної РНК і синтезує рРНК 18S, 28S та 5,8S; *РНК-полімераза II* транскрибує білкові гени, гени маленьких ядерних РНК і деяких інших РНК, котрі не піддаються трансляції; *РНК-полімераза III* здійснює синтез тРНК, рибосомної РНК 5S і кількох інших низькомолекулярних РНК. Кожна з цих полімераз містить від 12 до 16 субодиниць. Загальна архітектура еукаріотичних полімераз дуже схожа на таку прокаріотичної полімерази; спільними є й основні механізми роботи полімераз.

Кожна полімераза має свій набір *базальних факторів транскрипції*, які забезпечують точну посадку ферменту на промотор, вибір стартової точки (як і для прокаріотів, стартова точка транскрипції *не збігається* із стартовим кодоном для трансляції) та одного з ланцюгів ДНК як матричного. РНК-полімерази I та III є високоспеціалізованими – за допомогою своїх базальних факторів вони розпізнають 1–2 типи промоторів. РНК-полімераза II працює на промоторах білкових генів, що відрізняються великим розмаїттям, і, крім базальних факторів, ініціація транскрипції РНК-полімеразою II потребує специфічних факторів транскрипції, які розпізнають специфічні регуляторні елементи промоторів.

Промотор РНК-полімерази II, узагальнену схему якого показано на рис. 2.11, може складатися з таких елементів послідовності (для конкретних промоторів спостерігаються численні варіації цієї схеми). *Проксимальні* (приблизно в зоні –50 ... –200 пар основ відносно старту транскрипції) і *дистальні* (будь-де відносно старту – на великій відстані, усередині кодуєвої частини гена тощо) регуляторні елементи мають спорідненість до специфічних факторів транскрипції, взаємодія з якими активує / блокує зв'язування РНК-полімерази. Якщо дистальний елемент підсилює ефективність ініціації, його називають

енхансером (enhancer – підсилювач), якщо навпаки – сайленсером (silencer – глушник). У зоні старту міститься так званий базальний промотор, на якому, власне, і відбувається ініціація.



**Рис. 2.11.** Приблизна узагальнена схема організації промотора РНК-полімерази II та консенсусні послідовності основних елементів базального промотора

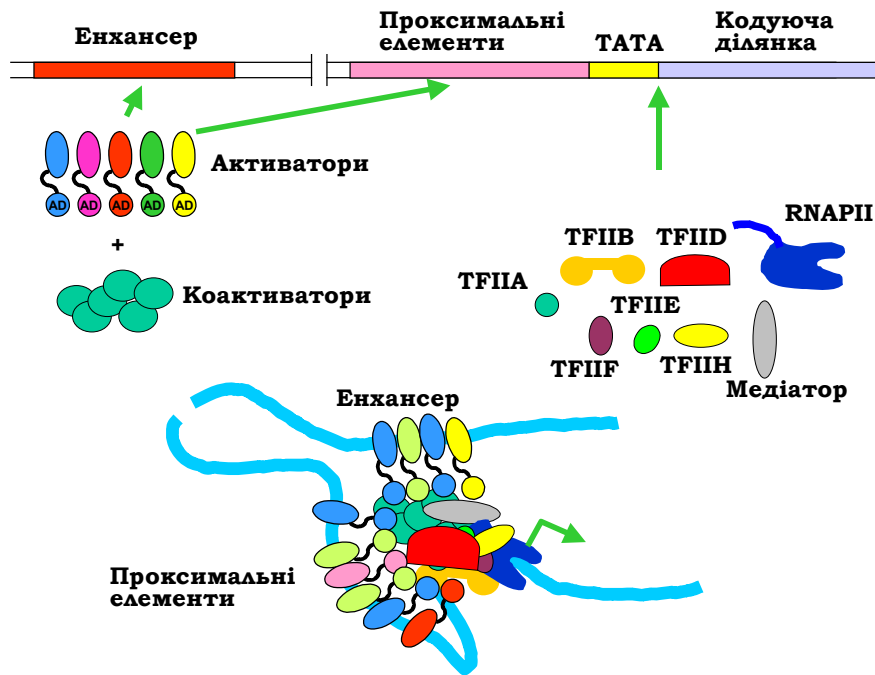
Базальний промотор може включати (але не обов'язково) три елементи: ТАТА-бокс (починається приблизно з  $-30$  пари основ), ініціаторний елемент (Initiator, Inr) безпосередньо в зоні старту, DPE (Downstream Promoter Element) на відстані приблизно  $+30$  пар основ від старту. Останні два елементи, Inr і DPE, як правило, присутні (якщо присутні) одночасно. Наприклад, близько 14 % промоторів дрозофіли містять усі три елементи, 29 % – тільки ТАТА-бокс, 26 % – тільки DPE разом з Inr, 31 % не мають жодного із трьох елементів. В останньому випадку промотор визначається іншими, більш специфічними елементами послідовності, що розпізнаються специфічними факторами, які, у свою чергу, взаємодіють із факторами базальними.

Для ініціації транскрипції є необхідним збирання на промоторі преініціаторного комплексу за участю РНК-полімерази II й шести базальних (загальних) факторів транскрипції TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH. Послідовність його збирання може бути різною, але всі базальні фактори мають бути присутніми у складі преініціаторного комплексу для подальшого запуску транскрипції. Фактор TFIID здійснює впізнання стандартних елементів базального промотора. TFIIB взаємодіє з TFIID і РНК-полімеразою, виконуючи функції, які дещо нагадують такі прокаріотичного фактора  $\sigma$  (див. вище). TFIIH забезпечує



первинне плавлення подвійної спіралі при ініціації та здійснює фосфорилування певних елементів РНК-полімерази, яке служить сигналом очищення промотора та початку елонгації. Інші базальні фактори додатково стабілізують комплекс і виконують допоміжну роль.

Ефективне збирання преініціаторного комплексу можливе лише за участі ще одного структурного модуля – *медіатора*, який містить понад 20 субодиниць. Цей мультибілковий комплекс здійснює лише білок-білкові взаємодії – із РНК-полімеразним комплексом та із специфічними факторами транскрипції, що зв'язані на проксимальних та дистальних елементах промотора (рис. 2.12). Отже, медіатор – це засіб передачі "активаційних сигналів" із регуляторних елементів послідовності на РНК-полімеразу: збільшення кількості взаємодій підсилює ефективність збирання преініціаторного комплексу.



**Рис. 2.12.** Схема збирання комплексу активації транскрипції

Більшість специфічних факторів транскрипції (далі позначатимуться як ТФ) мають у своїй структурі принаймні два домени: той, що взаємодіє з ДНК, і так званий активаційний (AD, Activation Domain), який використовується для взаємодії з іншими білками (рис. 2.12). Актива-

ційні домени зв'язують білкові кофактори (коактиватори), у результаті на дистальних і проксимальних елементах промотора формується складний мультибілковий комплекс – *енхансосома*. Активаційні домени ТФ і коактиватори мають спорідненість до медіатору та базальних факторів транскрипції. Результатом такої взаємодії є ефективне збирання преініціаторного комплексу на базальному промоторі (рис. 2.12).

Після збирання преініціаторного комплексу відбувається локальне плавлення ДНК, матричний ланцюг занурюється в активний центр полімерази, де починається синтез короткого первинного транскрипту. Далі за рахунок активності ТРПН здійснюється фосфорилування С-кінцевого домену (довгий неупорядкований поліпептидний хвіст) найбільшої із субодиниць РНК-полімерази, яке є точкою перемикання ініціації на елонгацію: відбувається очищення промотора, полімераза втрачає зв'язок із базальними факторами й продовжує синтез РНК.

### Елонгація транскрипції, процесинг і термінація синтезу мРНК

Після синтезу перших 20–30 нуклеотидів до С-кінцевого домену РНК-полімерази (який узагалі служить платформою для збирання всієї машинерії процесингу) рекрутуються ферменти, які здійснюють певну хімічну модифікацію 5'-кінцевого нуклеотиду мРНК з утворенням *кепу* (cap). Функціональне значення кепу є багатоплановим: незвичайна будова 5'-кінця захищає його від нуклеазної деградації, він приймає участь у транспорті мРНК до цитоплазми та в ініціації трансляції, а також стимулює інші реакції процесингу.

Далі під час елонгації транскрипції, негайно після синтезу чергового інтрона, на С-кінцевому домені відбувається збирання мультимолекулярної структури, яка називається *сплайсосомою* (рис. 2.13). Компонентами сплайсосоми є сам інтрон, білки та п'ять типів *маленьких ядерних РНК*. Призначення сплайсосоми полягає у здійсненні **сплайсингу** – вирізання інтронів і зшивання екзонів, у результаті чого мРНК стає копією лише кодуючої частини гена або її фрагментів: сплайсинг часто може здійснюватися кількома альтернативними шляхами (альтернативний сплайсинг, див. рис. 1.9).

Ключову роль у визначенні просторової структури, формуванні та функціонуванні сплайсосоми, яка утворюється окремо на кожному черговому інтроні, відіграють маленькі ядерні РНК: саме вони впізнають межі інтронів та екзонів, а також забезпечують каталіз реакцій сплайсингу (як і в рибосомі, каталіз у даному випадку здійснюється

молекулами РНК). Роль сплайсосомних білків зводиться до стабілізації структури сплайсосоми, сприяння перебудові цієї структури під час здійснення операцій сплайсингу, а також регуляції сплайсингу – блокування чи підсилення ефективності збирання сплайсосоми на даному інтроні білками-регуляторами сплайсингу. Наявність певного набору таких регуляторів і визначає, головним чином, вибір того чи іншого шляху альтернативного сплайсингу.

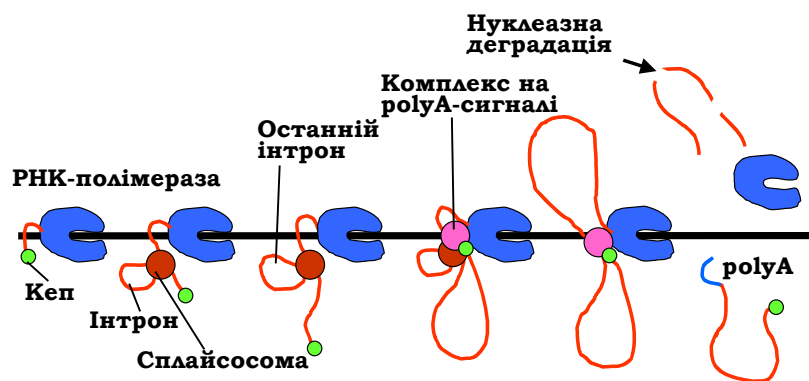


Рис. 2.13. Синхронізація транскрипції та процесингу мРНК.

Швидкість збирання сплайсосом визначається швидкістю транскрипції. З іншого боку, зі сплайсосомою взаємодіють фактори елонгації транскрипції – наявність сплайс-сайта (межі між інтроном і екзоном) сприяє прискоренню руху полімерази. Такий процес синтезу РНК та її сплайсингу продовжується до моменту, поки в складі пре-мРНК не з'являється специфічна послідовність – сигнал термінації.

Останньою подією процесингу, тісно узгодженою з термінацією транскрипції, є *поліаденілування* 3'-кінця мРНК – приєднання до 3'-кінцевого нуклеотиду *polyA*-послідовності. Сигнал термінації транскрипції та поліаденілування (*polyA*-сигналі) складається з двох елементів послідовності, які розпізнаються певним набором білкових факторів. Після впізнання *polyA*-сигналу, поки РНК-полімераза продовжує синтез РНК за сигналом (до 1 тис. нуклеотидів), до мультибілкового комплексу, який збирається на *polyA*-сигналі, долучаються *polyA*-полімераза та фактори розрізання мРНК. Збирання комплексу стимулюється зв'язаними з кепом білками, а також сплайсосомою на останньому інтроні – сплайсинг останнього інтрона й розрізання / поліаденілування РНК здійснюються одночасно та стимулюють одне одного (рис. 2.13).

У межах другого елемента послідовності polyA-сигналу міститься консервативний динуклеотид, у якому відбувається розрізання. До 3'-кінця, що виник унаслідок розрізу, polyA-полімераза приєднує один за одним 100–200 аденінових нуклеотидів. Розрізання / поліаденілування РНК є тригером термінації транскрипції. Упізнання polyA-сигналу індукує конформаційні зміни в полімеразному комплексі, які приводять до зниження спорідненості полімерази до ДНК і транскрипту (рис. 2.13).

## Особливості білкового синтезу в еукаріотів

Узагальнену схему будови зрілої еукаріотичної мРНК, яка звільняється з полімеразного комплексу, транспортується в цитоплазму й використовується як матриця для білкового синтезу, зображено на рис. 2.14. Між кепом і початком кодувочої ділянки (стартовим кодоном) розташована 5'-кінцева зона, яка не транлюється (5' UTR – UnTranslated Region). За кодувочною ділянкою, яка закінчується одним із стоп-кодонів, і перед polyA-послідовністю міститься 3'-кінцева зона, що не піддається трансляції. Обидві ці зони містять важливі елементи послідовності, які використовуються для регуляції білкового синтезу.

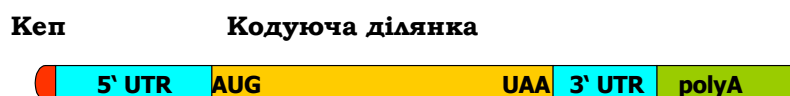


Рис. 2.14. Схема будови мРНК

Кожна еукаріотична молекула мРНК має тільки одну рамку зчитування (один стартовий кодон), елементи системи ініціації трансляції в цитоплазмі взаємодіють спочатку з кепом на 5'-кінці молекули, після чого відбувається сканування матриці з метою пошуку стартового кодона (на відміну від прокариотів, ініціація відбувається за так званим *скануючим механізмом*). Зовсім не обов'язково при цьому перший кодон AUG, що зустрічається, сприймається як стартовий. Упізнання стартового кодона залежить від контексту послідовності, в якій він розташований. Найкращим контекстом, який максимально сприяє ініціації трансляції, є *послідовність Козак* (Marilyn Kozak): GCC(A/G)CCAAUGG. Відповідно, відхилення від цього контексту утруднює розпізнання стартової точки й зумовлює необхідність позитивної регуляції ініціації трансляції. Ефективність ініціації залежить також від: відстані стартового кодона від 5'-кінця мРНК – довге сканування матриці під час ініціації підвищує ймовірність руйнування комплексу; наявності / відсутності дволанцюгових шпильок у 5'-кінцевій зоні мРНК,

що не транслаюється, які гальмують процес сканування; присутності / відсутності регуляторних білків або молекул мікроРНК (див. нижче), які зв'язуються в 5'-кінцевій зоні.

Елонгація трансляції також є мішенню регуляторних впливів: наявність шпильок усередині кодуєчої частини мРНК гальмує елонгацію, як і репресори, що впізнають елементи послідовності мРНК. Зміна часу життя мРНК – ще один шлях регуляції експресії гена. Час життя мРНК у цитоплазмі залежить головним чином від ступеня захищеності 3'-кінця від екзонуклеаз (оскільки кеп є нечутливим до нуклеаз). Додатковий захист створюють білки, які зв'язуються у 3'-кінцевій зоні – відсутність такого зв'язування приводить, відповідно, до швидкої деградації.

## РЕГУЛЯЦІЯ ГЕННОЇ ЕКСПРЕСІЇ В ЕУКАРІОТІВ

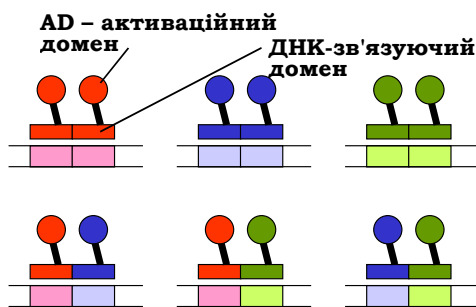
### Регуляція транскрипції

Кілька десятків тисяч еукаріотичних генів потребують диференційної активації / репресії в певні моменти залежно від типу клітин, стадії розвитку, зовнішніх умов тощо.

**Транскрипційні фактори.** Як і в прокаріотів, ключовими елементами системи регуляції транскрипції є регуляторні *цис*-елементи послідовності (проксимальні та дистальні елементи промоторів, див. рис. 2.11) і *транс*-регулятори – білкові *транскрипційні фактори* (ТФ, під якими будемо розуміти специфічні, не базальні, фактори транскрипції). Проте кількість еукаріотичних генів значно більша, і зрозуміло, що кожен ген не може контролюватися своїм особливим фактором транскрипції: фактор також є продуктом певного гена, який також має контролюватися певним фактором.

Відповіддю на необхідність регулювати окремо активність великої кількості генів лімітованим набором факторів транскрипції є принцип *модульності* будови еукаріотичних промоторів. Його ілюструє рис. 2.15: три регуляторні (наприклад, проксимальні) елементи послідовності мають спорідненість до трьох транскрипційних факторів, із трьох пар такої взаємодії можна скласти шість комбінацій. Насправді ж кількість таких пар є значно більшою, а число можливих комбінацій – практично нескінченно великим. Кожен промотор може мати свій

власний набір модулів, який відрізняє його від інших промоторів, і, відповідно, власний набір досить великої кількості транскрипційних факторів, потрібних для активації гена.



**Рис. 2.15.** Модульний принцип взаємодії транскрипційних факторів із промоторами

З принципом модульності тісно пов'язаний принцип *кооперативності* взаємодії транскрипційних факторів із *цис*-елементами, що знаходяться поряд. Кожен із ТФ зазвичай має порівняно невисоку спорідненість до відповідного елемента послідовності. Але якщо два *цис*-елементи розташовані поруч і два ТФ здатні взаємодіяти між собою, спорідненість кожного з них підвищується – стабільність комплексу значно зростає.

Крім того, активаційні домени ТФ зв'язують білкові кофактори (коактиватори), що зумовлює збирання енхансоми та преініціаторного комплексу (див. рис. 2.12). Різні елементи енхансоми діють синергічно, підвищуючи загальну стабільність комплексу. З іншого боку, відсутність кількох елементів може викликати дестабілізацію та розпад енхансоми, де спорідненість до ДНК кожного окремого елемента невисока. Це забезпечує *динамізм* активації: енхансома не є фіксованою, а збирається / розбирається в певні моменти. Слід зауважити, що компоненти мультибілкових комплексів, які збираються на промоторах, можуть, навпаки, блокувати ініціацію транскрипції – тоді їх називають репресорами та корепресорами.

Активність певного гена залежить від наявності у клітині певного набору активаторів / репресорів транскрипції. Відповідно, гени самих факторів транскрипції перебувають під контролем складних систем регуляції, які працюють під час розвитку та диференціації клітин. У результаті в клітині певного типу відбувається синтез специфічного набору ТФ, що приводить до активації специфічного набору генів.

У той же час, експресія певного гена може оперативно контролюватися у відповідь на зовнішні сигнали шляхом зміни активності вже синтезованих транскрипційних факторів. Два найважливіші механізми такої регуляції: взаємодія ТФ певного типу – *гормонового рецептора* – зі стероїдними гормонами та каскади пострасляційних модифікацій у відповідь на дію хімічних сигналів (*сигнальна трансдукція*). Гормоновий рецептор у відсутності гормону перебуває в цитоплазмі в неактивному структурному стані. Коли гормон проникає в цитоплазму, він взаємодіє з рецептором, що зумовлює його активацію: гормоновий рецептор прямує до ядра, де зв'язується зі специфічним елементом послідовності та запускає каскад збирання енхансосоми. Прикладом сигнальної трансдукції є зв'язування білкового гормону з рецептором на зовнішньому боці клітинної мембрани, яке активує примембранну кіназу з іншого боку мембрани. Кіназа здійснює фосфорилування неактивного транскрипційного фактора, що й переводить його в активну форму. Часто примембранна кіназа запускає каскад фосфорилування – фосфорилує білок, який набуває внаслідок цього кіназної активності, ця нова кіназа фосфорилує інший білок (або кілька різних білків, завдяки чому здійснюється підсилення сигналу та / або його розгалуження по кількох шляхах, спрямованих до кількох кінцевих мішеней), перетворюючи його на кіназу, і так далі – до фосфорилування та, відповідно, активації транскрипційного фактора.

**Регуляція транскрипції та структура хроматину.** Суттєвою особливістю еукаріотів є та обставина, що ДНК клітинного ядра організована у складні хроматинові структури (розділ 1). Нуклеосоми та хроматинова фібрила в цілому виступають як загальний репресор генної активності. Тим самим вони допомагають забезпечити загальну інактивацію більшості генів в еукаріотичній клітині, за винятком тих, чия активація здійснюється за участю ТФ. Активація транскрипції потребує перебудов структури хроматину в напрямку деконденсації хроматинової фібрили та визволення *цис*-елементів від нуклеосом. Для реалізації таких перебудов є два основні інструменти, які діють у тісній координації один з одним: система *посттрансляційних модифікацій* гістонів і АТР-залежні *комплекси ремодельовання* хроматину, що проводять репозиціонування нуклеосом. Специфічна картина (патерн) гістонових модифікацій відіграє також і зворотну роль – у здійсненні гарантованої репресії певних ділянок хроматину.

Серед інших модифікацій, ацетилювання залишків Lys (у певних консервативних позиціях) майже завжди корелює з активацією транскрипції – ацетильовані гістон-ацетилтрансферазами (НАТ) гістони акумулюються в активних промоторах, і навпаки, дія гістон-деацетилаз

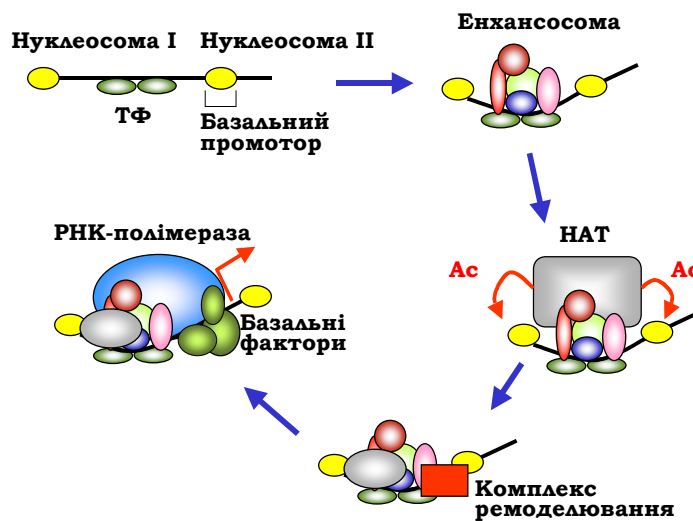
приводить до інактивзації. Ацетилтрансферази та деацетилази постійно безадресно працюють у хроматині, підтримуючи певний базовий баланс ацетилювання / деацетилювання гістонів. При активації певного промотора ацетилтрансферази здійснюють адресне гіперацетилювання, а після зникнення активуючого сигналу деацетилази повертають промотор до базового неактивного стану. Деацетилази також можуть бути адресно рекрутовані до промоторів репресорами транскрипції для підтримання гарантованого деацетилюваного статусу.

НАТ входять до складу мультибілкових комплексів, які часто є компонентами енхансосою. Часто у складі НАТ присутні бромодомени – структурні модулі, що мають специфічну спорідненість до ацетилюваних лізинів. Тобто НАТ упізнають Lys, уже ацетилювані іншими НАТ, і здійснюють ацетилювання сусідніх нуклеосом, підтримуючи таким чином ацетилюваний статус певної ділянки хроматину. Ацетилювання гістонів сприяє деконденсації хроматинової фібрили за рахунок зниження позитивного заряду головних факторів конденсації, якими є гістонові хвости. Розгортання фібрили та тимчасова дисоціація гістона H1 створює "вікно можливості" для зв'язування регуляторних факторів із міжнуклеосомною лінкерною ДНК. Крім того, ацетилювані лізинові залишки гістонів можуть безпосередньо впізнаватися факторами і кофакторами транскрипції. Наприклад, наявність бромодому у складі TFIIID сприяє підвищенню локальної концентрації цього базального фактора транскрипції в ацетилюваних ділянках хроматину.

Підвищення доступності промоторів під час їхньої активації потребує також інших спеціальних механізмів. Справа в тому, що за фізіологічної іонної сили електростатичні взаємодії ДНК і гістонів дуже міцні й нуклеосома зберігає високу стабільність, яка практично виключає навіть переміщення нуклеосоми вздовж ДНК. Оскільки переміщення нуклеосом є необхідним для експонування регуляторних сайтів на ДНК до дії транскрипційних факторів, у клітині існує спеціальна система: комплекси ремоделювання хроматину (КР), які часто є компонентами енхансосою. КР є АТР-залежними мультибілковими молекулярними машинами, які забезпечують переміщення нуклеосом уздовж хроматинової фібрили (репозиціювання) і сприяють тимчасовому видаленню нуклеосом із активних промоторів на білки, що є проміжними переносниками гістонів. КР здатні здійснювати численні взаємодії з нуклеосомною ДНК, гістоновими хвостами, специфічними та загальними факторами транскрипції, гістон-ацетилтрансферазами тощо. Слід зауважити, що дія комплексів ремоделювання приводить не обов'язково до активації транскрипції, а також і до репресії – залежно від контексту інших функціонально важливих впливів, у кооперації з якими працює даний комплекс.



Один із численних варіантів сценаріїв активації промотора зображено на рис. 2.16: одна з нуклеосом закриває базальний промотор; у лінкері між нуклеосомами ініціюється збирання енхансосоми, до складу якої залучається НАТ; НАТ здійснює ацетилювання гістонів; до енхансосоми рекрутується інша НАТ і комплекс ремоделювання, який переміщує нуклеосому; із базальним промотором зв'язується РНК-полімераза та базальні фактори транскрипції.



**Рис. 2.16.** Один із варіантів послідовності етапів активації еукаріотичного промотора. НАТ – гістон-ацетилтрансфераза, Ас – ацетатні залишки

На стадії елонгації транскрипції нуклеосома також має створювати суттєві перешкоди для проходження РНК-полімерази. При цьому хроматин, навіть у межах активних генів, у цілому зберігає нуклеосомну структуру. Елонгація РНК-полімерази через хроматин полегшується цілим набором факторів елонгації, які, зокрема, забезпечують руйнуванням нуклеосом попереду полімерази та їхнім відновленням позаду.

Хоча базова структура інтерфазного хроматину – фібрила діаметром 30 нм – є перешкодою для активації транскрипції, гарантована репресія потребує підвищення ступеня компактизації хроматину. Така додаткова компактизація в гетерохроматині та інших репресованих ділянках залежить від спеціальних хімічних маркерів. Найважливішими з них є знову ж таки посттрансляційні модифікації гістонів (у першу чергу метилювання специфічних залишків Lys) і метилювання ДНК. Механізми такої репресії розглядаються в розділі 6.

## РНК-інтерференція

РНК-інтерференція є ще однією системою негативної регуляції експресії генів через використання мікро-РНК. Активація генів мікро-РНК (транскрибуються РНК-полімеразою II) зумовлює синтез молекул РНК, які містять дволанцюгові шпильки. Шпильки вирізаються нуклеазою і стають субстратом для РНКаз, яка отримала назву *дайсер* (*Dicer*). Останній деградує будь-яку дволанцюгову РНК до фрагментів довжиною 19–21 пара основ. Ці фрагменти зв'язуються з кількома білками, утворюючи комплекс RISC (RNA Induced Silencing Complex). Один із ланцюгів дволанцюгової РНК є комплементарним до ділянки мРНК певного білкового гена, яка й стає мішенню для комплексу. Результатом взаємодії з мРНК може бути: рекрутування білками комплексу ферментів, які здійснюють метилювання гістонів, що приводить до компактизації хроматину та репресії гена; посттранскрипційна деградація мРНК за рахунок нуклеазної активності комплексу (характерніше для рослин); зупинка білкового синтезу (більш характерно для тварин – у цьому випадку взаємодія з мРНК відбувається в цитоплазмі).

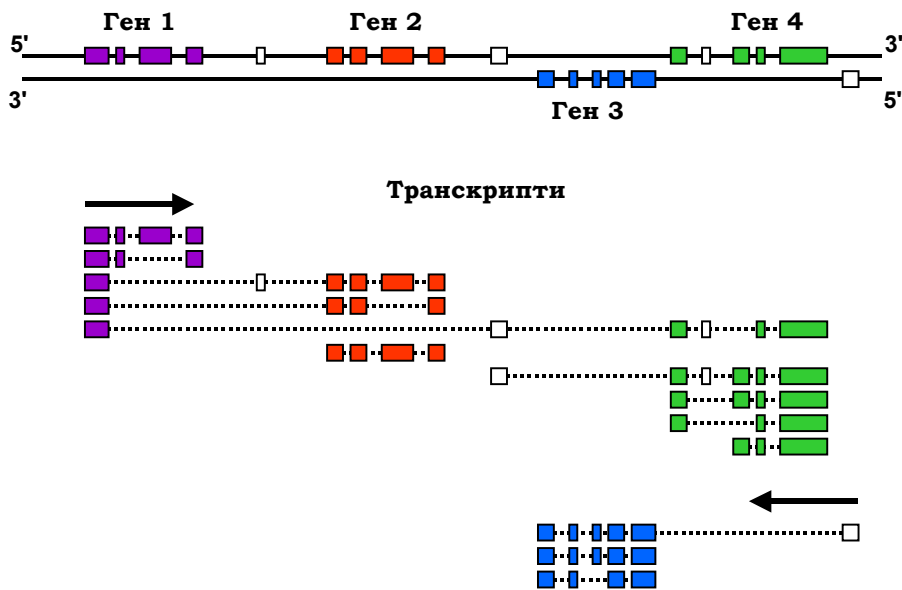
## Альтернативний сплайсинг

Пре-мРНК, що синтезується під час транскрипції, може піддаватися сплайсингу та поліаденілуванню різними альтернативними шляхами (рис. 2.17): кілька екзонів на початку чи всередині гена можуть вирізатися з транскрипту, останній може обрізатися та піддаватися поліаденілуванню за рахунок використання polyA-сигналу всередині одного з інтронів тощо. У результаті утворюються різні молекули мРНК з різними наборами екзонів які, відповідно, кодують різні білки. Середня кількість альтернативних форм мРНК оцінюється у 5,4 на один ген людини.

Багатокомпонентність (і необхідність кооперації між компонентами) сплайсосоми та системи розрізання / поліаденілування дозволяє здійснювати тонку регуляцію утворення мРНК певного типу за рахунок зміни транскрипційної активності генів, які кодують ті чи інші компоненти машинерії процесингу, зміни концентрацій компонентів, їхньої хімічної модифікації.

Ключова роль у визначенні шляху сплайсингу належить білкам-регуляторам сплайсингу. Наприклад, досить часто регулятор специфічно зв'язується з певною послідовністю нуклеотидів усередині екзона та стимулює розпізнання меж з інтронами (сплайс-сайтів) по обидва боки від нього. Зрозуміло, що в разі відсутності регулятора такий екзон буде вирізано разом з інтронами, що його фланкують. Регу-

лятор, навпаки, може блокувати впізнання сплайс-сайтів. Сплайсинг-регулятори можуть мати сайти зв'язування в інтронах, впливаючи на ефективність збирання сплайсосоми. Вибір шляху утворення кінцевого мРНК-продукту часто залежить також від альтернативного вибору за допомогою сплайсинг-регуляторів polyA-сигналів, які можуть бути присутніми не лише нижче останнього екзона, а й усередині інтронів.



**Рис. 2.17.** Зона еукаріотичного геному: показано чотири гени та відповідні екзони (прямокутники) у складі змістовних ланцюгів. Прямокутники білого кольору важко віднести до конкретного гена. Унизу: кінцеві транскрипти, синтезовані у цій зоні, стрілки вказують напрям транскрипції

Поряд із спласинг-регуляторами, досить важливим фактором регуляції сплайсингу є швидкість транскрипції: чим нижча швидкість, тим більше часу "розібратися" із сигналами – на великій швидкості полімераза може "проскочити" через екзон чи polyA-сигнал. При цьому швидкість (частота рекрутування полімераз до промотора) визначається на стадії ініціації транскрипції та контролюється транскрипційними факторами. Отже, значною мірою шлях сплайсингу визначається вже на етапі ініціації. При цьому до промотора (а отже, і до РНК-полімеразного комплексу) можуть рекрутуватися також і регулятори сплайсингу.

Для еукаріотичних генів досить часто спостерігається також явище *транс-сплайсингу*: об'єднання у складі мРНК екзонів різних генів. Основою для транс-сплайсингу є та обставина, що для багатьох генів існує не одна, а кілька альтернативних стартових точок транскрипції, у тому числі й такі, що розташовані досить далеко від гена й водночас є стартовими точками інших генів (рис. 2.17). У результаті транскрипція іноді здійснюється через кілька генів (така ситуація дещо нагадує розглянуті вище прокариотичні оперони) і сплайсинг відбувається на рівні таких "об'єднаних" первинних транскриптів.

Крім того, описано також випадки транс-сплайсингу між пре-мРНК, які є продуктами різних одиниць транскрипції, іноді такими, що розташовані на різних хромосомах. У цьому випадку на 5'- і 3'-кінцях двох пре-мРНК міститься ніби "розірваний" інтрон – об'єднання двох кінців у сплайсосомі приводить до видалення цього інтрона та зшивання кінцевих екзонів.

## ЩО ТАКЕ ГЕН?

Термін "ген" було запропоновано Йоханнсенем (Wilhelm Johannsen) у 1909 р., невдовзі після відкриття заново менделівських законів спадковості (див. історичну довідку наприкінці підручника). Із тих часів поняття гена кілька разів піддавалося суттєвій ревізії. Частина різних відповідних його визначень було наведено в розділі 1, і слід зауважити, що всі вони мають право на існування. Але важливо розуміти, що кожне з них має в той самий час досить суттєві обмеження. Беззаперечним є лише те, що ген є ділянкою ДНК (і навіть це твердження потребує уточнень стосовно вірусів, що містять РНК як генетичний матеріал, див. розділ 5), проте таке визначення нічого не говорить про властивості, які мають бути притаманні цій ділянці, щоб її можна було вважати геном.

Від початку існування термін інтерпретувався в дусі Менделя, тобто як дискретна й нероздільна спадкова одиниця, яка не залежить від інших спадкових одиниць і відповідає за прояв певної ознаки. В окремих випадках (згаданий у розділі 1 ген *sgr* гороху є прикладом такого типу) така інтерпретація може бути застосована, хоча зрозуміло, що про незалежність спадкування різних генів можна говорити тільки за умови, що гени містяться в різних хромосомах.

Зрозуміло також, що ген не є дискретним і нероздільним: ген як ділянка ДНК має довжину, ця ділянка може бути розділеною на фрагменти. У процесі своєї експресії гени взаємодіють на різних рівнях:

активація транскрипції та шлях сплайсингу залежать від активності генів транскрипційних факторів і сплайсинг-регуляторів, трансляція мРНК – від активності генів білків-регуляторів трансляції; білкові продукти різних генів взаємодіють тощо. У результаті активність одного гена може підсилити чи пригнітити експресію іншого, і взагалі, для прояву ознаки, як правило, є необхідною активність кількох генів. Останнім часом набула популярності комп'ютерна метафора, згідно з якою спадковий апарат (геном і систему його експресії) можна розглядати як "операційну систему", що керує організмом, а ген – як "підпрограму" цієї системи.

Після того, як було з'ясовано, що гени знаходяться в хромосомах, ген став розглядатися як хромосомний локус, а сама хромосома – як лінійна комбінація генів, що не перекриваються. Часто так воно і є, але, з іншого боку, один локус (одна ділянка хромосомної ДНК) може містити кілька генів – гени перекриваються або за рахунок перекриття рамок зчитування (деякі бактеріофаги та окремі гени еукаріотів), або за рахунок розташування генів (в еукаріотичних геномах) у межах інтрону іншого гена, або за рахунок розташування двох кодуючих послідовностей на одній ділянці ДНК на двох різних ланцюгах (як на рис. 2.17). Крім того, концепція гена як локусу не може бути застосована для мобільних елементів – ділянок ДНК (які часто містять один або кілька генів), що можуть змінювати свою локалізацію в геномі.

Розвиток молекулярної біології спочатку привів до розуміння того, що ген – це ділянка молекули ДНК, яка відповідає за синтез молекули білка ("один ген – один білок"). Іноді це справді так, проте сьогодні вже ясно, що, по-перше, не менш важливими є гени, що кодують різноманітні РНК, які не піддаються трансляції. По-друге, одна ділянка ДНК (сукупність екзонів еукаріотичного гена) часто дає кілька білкових продуктів за рахунок альтернативного сплайсингу. Різниця між біологічними видами часто зумовлена не тільки і не стільки різницею в наборах кодуючих послідовностей (екзонів), скільки різними комбінаціями цих екзонів. Причому таке перекомбінування можливо як на рівні ДНК, так і на рівні кінцевих транскриптів. Отже, якщо трактувати ген як спадковий фактор, то **ген – це не тільки ділянка ДНК, що містить певну інформацію, а й система експресії цієї інформації.**

Інтенсивний розвиток протягом останніх 10–15 років нової дисципліни – геноміки, що спрямована на встановлення та аналіз нуклеотидних послідовностей цілих геномів, зумовив тенденцію розглядати ген як анотовану геномну ділянку з певними властивостями. Згідно з визначенням міжнародного консорціуму онтології послідовностей (Sequence Ontology Consortium), **ген – це певна визначена зона геномної послідовності, яка відповідає одиниці спадковості й містить регуляторні ділянки**

**та ділянки, що транскрибуються.** Під словами "одиниця спадковості" слід розуміти той факт, що ген кодує певні (один або кілька) функціональні продукти (білки або молекули РНК, що не транскрибуються). Під "ділянкою, що транскрибується" мається на увазі певна група екзонів, з'єднаних інтронами, яка транскрибується як одне ціле. При цьому за правилами анотації послідовностей, прийнятими сучасними базами даних геномних послідовностей, первинні транскрипти, котрі піддаються альтернативному сплайсингу, вважаються такими, що належать одному гену, навіть якщо кінцеві білки є різними. Тобто ген – це група екзонів, що транскрибуються разом, або ген – це ділянка геному, що дає набір кінцевих транскриптів, які містять хоча б один спільний екзон. Нарешті, важливим моментом наведеного визначення гена є те, що до складу цієї елементарної одиниці спадковості організму прийнято включати регуляторні ділянки, які контролюють його активність.

З тим уточненням, що в прокаріотичних системах (у випадку оперонів) регуляторні ділянки можуть контролювати групу генів, таке трактування гена до самого останнього часу залишалося загальноприйнятим.

З метою ретельного аналізу інформації, яка записана в геномі й реалізується внаслідок транскрипції, чотири роки тому Національним інститутом США з вивчення геному людини (National Human Genome Research Institute) було започатковано міжнародний проект ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements), одним з основних завдань якого є тотальний аналіз транскриптому людини. Нещодавно було завершено перший етап цієї роботи – проаналізовано функціонування 1 % геному людини (приблизно 30 млн пар основ), і перші результати принесли низку несподіванок (The ENCODE Project Consortium // Nature, 2007, Vol. 447, P. 799–816).

По-перше, відносна кількість ДНК, що піддається транскрипції, виявилася неочікувано високою – на рівні 80 %. Зважаючи на частку геному, яку становлять екзони разом з інтронами (див. рис. 1.10), виникає питання, чи всі ці транскрипти відповідають генам? Напевно, частина цих первинних транскриптів є просто наслідком неспецифічної хаотичної активності РНК-полімераз. Проте значна частка транскриптів містить консервативні (для ссавців і серед популяцій людини) елементи послідовності – близько 60 % таких елементів знаходиться поза межами відомих раніше білкових генів чи регуляторних ділянок. Імовірно, у багатьох випадках ці транскрипти є невідомими раніше РНК, які не піддаються трансляції, для більшості з них їхнє функціональне значення ще має бути з'ясовано. Крім того, було встановлено, що часто піддаються транскрипції регуляторні ділянки

(промотори, енхансери). Імовірно, така транскрипція є просто одним із способів підтримувати регуляторну ділянку в доступному стані деконденсованої хроматинової фібрили.

Для відомих білкових генів (399 у дослідженій частині геному) було продемонстровано наявність великої кількості невідомих раніше стартових точок транскрипції. Приблизно половина генів мають альтернативні стартові точки, які відстоять на 100 тис. пар основ від анованих раніше стартів транскрипції цих генів. Деякі з цих стартових точок використовують промотори інших генів: одна така точка може бути спільною для двох чи трьох генів, і первинний транскрипт іноді містить кілька генних локусів – груп екзонів (див. рис. 2.17).

Крім того, для більшості білкових генів аналіз їхніх транскриптів показує наявність невідомих раніше екзонів. Деякі з цих екзонів розташовані на відстані до кількох тисяч пар основ від усіх інших екзонів гена, іноді опиняючись у межах іншого гена. Як демонструє рис. 2.17, іноді важко віднести даний екзон до того чи іншого конкретного гена. Більшою за очікувану виявилася кількість різних ізоформ мРНК, що виникають як унаслідок альтернативного сплайсингу, так і транссплайсингу.

Результати проекту ENCODE вказують на диспергований характер розподілу регуляторних елементів по всьому геному: багато регуляторних елементів розташовано всередині екзонів та інтронів, при цьому вони можуть бути елементами системи регуляції зовсім іншого гена.

Отже, поняття гена знову потребує певної ревізії. Відповідно до одного з нещодавно запропонованих визначень, **ген – це об'єднання (union) геномних послідовностей, що кодують зв'язний (coherent) набір функціональних продуктів, які можуть частково перекриватися** (Gerstein *et al.* // Genome Res., 2007, Vol. 17, P. 669–681). Під когерентністю набору продуктів мається на увазі, що у випадку білкових генів кожен екзон є спільним хоча б для двох продуктів даного набору.

Головний акцент у цьому визначенні робиться на кінцеві продукти активності генів – перекриття між проміжними транскриптами ігнорується. Якщо виходити з перекриття між первинними транскриптами (інтерпретувати ген як кластер екзонів, що можуть спільно транскрибуватися), то, наприклад, на геномній ділянці рис. 2.17 слід було б визначити лише два гени (об'єднавши гени 1, 2, 4 в один). Якщо ж виходити з перекриття між кінцевими продуктами, то на цій ділянці міститься принаймні шість генів (гени 1–2 та 1–4 формують окремі групи екзонів, що частково перекриваються з генами 1, 2, 4). Тобто ген не обов'язково складається з екзонів, що розташовані поряд; група екзонів одного гена може бути диспергованою по геномній зоні, і окремі екзони групи можуть одночасно належати до інших генів.

Зрозуміло, що у простому випадку, коли немає альтернативного сплайсингу (або взагалі немає інтронів), визначення зводиться до класичного: ген – це ділянка ДНК, що кодує молекулу білка або РНК.

Крім того, згідно з визначенням, що обговорюється, регуляторні елементи *не є* компонентами гена (пропонується називати їх "елементами, асоційованими з генами" – gene-associated): система регуляції є складнішою, ніж просте співвідношення "один до одного" між регуляторними елементами та кодуючими ділянками.

Наведене визначення, звичайно, не може вважатися остаточним. Очевидно, що поняття гена є надто складним, щоб його можна було чітко сформулювати: різні визначення, які акцентують увагу на різних властивостях генів різних типів, є, відповідно до принципу додатковості, одночасно справедливими.

### Контрольні запитання і завдання

1. Що таке кодон і відкрита рамка зчитування? Скільки існує кодонів? Які позиції нуклеотидів у складі кодона є найбільш і найменш визначальними?
2. Охарактеризуйте етапи білкового синтезу. Яку роль у синтезі білків виконує рибосома та тРНК?
3. У чому полягають характерні відмінності механізмів експресії генетичної інформації у про- та еукаріотів?
4. В якому напрямку здійснюється зчитування інформації з ДНК під час транскрипції? Що таке змістовний і антизмістовний ланцюги? Який із них є матричним?
5. Яка різниця між *цис-* і *транс-*елементами системи регуляції транскрипції?
6. Опишіть систему регуляції лактозного оперона.
7. Яку будову мають бактеріальний промотор і промотор еукаріотичної РНК-полімерази II?
8. Яку спеціалізацію мають еукаріотичні РНК-полімерази різних типів?
9. Сформулюйте основні принципи регуляції транскрипції за участю транскрипційних факторів.
10. Як узгоджуються транскрипція та процесинг мРНК в еукаріотів?
11. Опишіть основні механізми активації транскрипції в еукаріотів.
12. Що таке РНК-інтерференція?
13. Як відбувається вибір альтернативних шляхів сплайсингу?
14. Дайте визначення транс-сплайсингу. За якими механізмами він здійснюється?
15. Сформулюйте кілька визначень гена. Поясніть обмеження, які має кожне з них.





## РОЗДІЛ 3

# Формальна генетика: закономірності спадкування ознак

Виходячи з розуміння молекулярних і цитологічних основ функціонування апарату спадковості, викладених у попередніх розділах, можна описати процеси передачі кінцевого результату активності генів – ознак – від батьків до нащадків і далі в ряду поколінь. При цьому використовують певну систему позначень, яка дозволяє, відволікаючись від конкретних молекулярних механізмів, записати процес у символічній формі – на кшталт того, як за допомогою математичних формул і рівнянь описують фізичні процеси. Так само, як математична фізика тісно пов'язана з фізикою експериментальною, така формальна генетика є засобом або передбачити характер розподілу ознак у нащадків на основі відомостей про набір генів (генотип) батьків, або навпаки – установити генотип батьків і нащадків за кількісним розподілом ознак.

Історично генетика як наука розпочалася саме з вирішення питань другого типу, і досить довгий час носила характер формальної дисципліни просто тому, що молекулярна природа гена була невідомою. Проте це не завадило встановити важливі генетичні закономірності вже в цей початковий період.

Основні закони спадковості були відкриті Грегором Менделем (1822–1884), монахом августинського монастиря, який жив у австрійському місті Брюнн (нині Брно, Чехія), викладав математику в монастирській школі та експериментував із передачею у спадок індивідуальних ознак гороху *Pisum sativum*. Робота Менделя, яка є взірцем на-

укової роботи, тоді не привернула уваги широкого загалу, оскільки випередила свій час. Менделівські результати були відкриті заново через 35 років, а саме в 1900 р. (див. історичну довідку), відколи й беруть початок систематичні генетичні дослідження.

## ЗАКОНИ МЕНДЕЛЯ

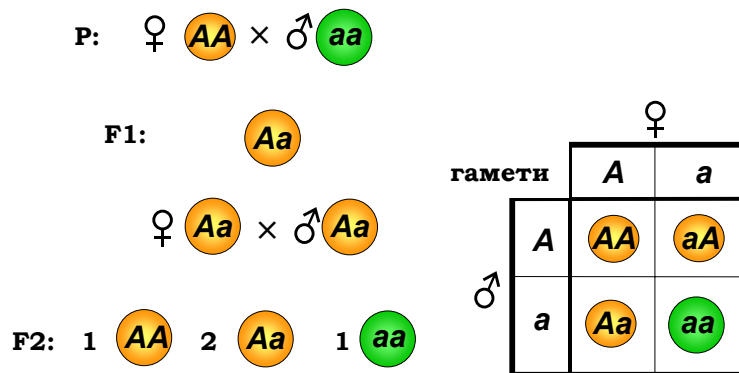
Одним із головних понять генетики є поняття **ознаки** – певної властивості організму або його частини, за якою одна особина відрізняється від іншої. Ознакою в генетичному розумінні можна вважати будь-яку характеристику на рівні зовнішніх рис, фізіологічних або біохімічних особливостей: вага, колір, ріст, набір речовин певного типу в органах і клітинах, сукупність певних білків тощо. Сукупність ознак даного організму називають **фенотипом**. Мендель усвідомив, що ознаки, які можна використати в генетичному аналізі, повинні виявлятися постійно (незалежно від віку, зовнішніх умов тощо) і мати два або більше альтернативних проявів.

Найважливішим експериментальним підходом генетики (практично єдиним на початковому етапі її розвитку) є **схрещування** – природне або штучне поєднання двох гамет при заплідненні. Схрещування позначають знаком множення "×". У схемах на перше місце ставлять генотип жіночої статі, яку позначають символом "♀" (дзеркало Венери), на друге – чоловічої із символом "♂" (щит і спис Марса). Під генотипом у схемах схрещувань розуміють не сукупність усіх генів організму, а тільки тих, що стосуються ознак, які аналізуються.

Домінантні та рецесивні алелі (див. розділ 1) одного гена позначають, як правило, однаковими великою та малою літерами відповідно. Потомство від схрещування двох особин із різними альтернативними проявами ознаки називають **гібридним**, а окремого представника такого потомства – **гібридом**. Батьківські організми, які беруть у схрещування, позначають літерою **P** (від латинського *parentes* – батьки), а потомство – літерою **F** (від латинського *fili* – діти). Зазвичай біля літери F ставлять цифровий індекс, який відповідає порядковому номеру гібридного покоління.

## Моногібридні схрещування

Схрещування, в якому проводиться аналіз однієї пари альтернативних ознак, називається **моногібридним**. Повернемося до прикладу, що вже розглядався наприкінці розділу 1 – спадкування забарвлення насіння гороху, що залежить від гена *sgr*. Відповідно до сформульованих вище правил, позначимо нормальний (домінантний) алель цього гена як *A* (ген дає функціональний продукт, який зумовлює руйнування хлорофілу та, відповідно, жовтий колір насіння), а мутантний рецесивний алель (ген не дає функціонального продукту, і насіння залишається зеленим) як *a*. Власне, саме така мутація, коли ген втрачає здатність кодувати повноцінний продукт, і зумовлює зазвичай виникнення рецесивної форми цього гена.



**Рис. 3.1.** Схема моногібридного схрещування гомозиготних батьківських форм гороху з жовтим і зеленим насінням і наступного схрещування гібридів першого покоління. Праворуч показано решітку Пеннета для другого схрещування

Мендель узяв для схрещування дві попередньо отримані ним **чисті (генетичні) лінії** – так називають групи особин, які стабільно відновлюють у низці поколінь одні й ті самі спадково константні ознаки. Тобто батьківські форми (Мендель установив це за кінцевим результатом) були гомозиготами за алелями *A* та *a* із насінням відповідно жовтого та зеленого кольору (рис. 3.1). У першому поколінні після об'єднання гамет двох типів (кожен із батьків продукує гамети тільки одного типу) усі особини були гетерозиготами жовтого кольору – виявлявся тільки домінантний алель, а ознака іншого батька (рецесивна)

не спостерігалася. Це явище стало основою для формулювання **першого закону Менделя** (або закону одноманітності гібридів першого покоління): **у першому поколінні від схрещування гомозигот із домінантною та рецесивною ознаками виявляється тільки домінантна ознака.**

Гібриди першого покоління продукують уже два типи гамет – з алелями  $A$  або  $a$ . При схрещуванні цих гібридів мають утворитися три різні комбінації алелів (строго кажучи, чотири комбінації, дві з яких –  $aA$  та  $Aa$  – є еквівалентними). Для полегшення розрахунків цих комбінацій іноді застосовують таблицю, запропоновану Пеннетом (її ще називають решіткою Пеннета): у першому рядку та першому стовпчику записують типи гамет, і тоді на перетині отримують комбінації алелів у нащадків. Із решітки Пеннета на рис. 3.1 видно, що частота гетерозигот  $Aa$  буде у два рази вищою, ніж однакові частоти гомозигот за домінантним і рецесивним алелями. Отже, для великої кількості особин другого покоління генотипи  $AA$ ,  $Aa$ ,  $aa$  будуть отримані у співвідношенні  $1 : 2 : 1$ , а співвідношення фенотипів (жовтих до зелених) буде дорівнювати  $3 : 1$ . Саме цей результат і отримав Мендель. Твердження про те, що у **другому поколінні відбувається розщеплення домінантної ознаки на домінантну та рецесивну у співвідношенні  $3 : 1$** , називають **другим законом Менделя**, або законом розщеплення.

Отримані групи нащадків Мендель піддав самозапиленню та встановив, що рослини з рецесивними ознаками не дають розщеплення в наступних поколіннях. Таким самим чином поводить себе й  $1/3$  всіх особин із домінантною ознакою. А решта  $2/3$  домінантних особин дають розщеплення на домінантних і рецесивних знову ж таки у співвідношенні  $3 : 1$ .

Не будемо тут ще раз повторювати висновки, які зробив Мендель на підставі отриманих ним результатів, – практично, він описав поведінку хромосом під час мейозу та запліднення. Важливість його роботи полягала ще й у демонстрації того, що, слідкуючи за спадкуванням зовнішніх ознак при схрещуваннях, можна робити висновки щодо генотипу особини.

Іноді такі висновки можна робити й без схрещувань: у разі наявності в певного організму рецесивної ознаки він завжди є гомозиготою. Але у випадку домінантної ознаки такий однозначний висновок зробити неможливо: особина може бути як гомо-, так і гетерозиготою. У схемах схрещувань таку особину часто записують у вигляді **фенотипового радикала**  $A_$  (маючи на увазі, що замість  $_$  може стояти як велика, так і маленька літера – без зміни при цьому фенотипового прояву). Для встановлення генотипу застосовують схрещування досліджуваної особини

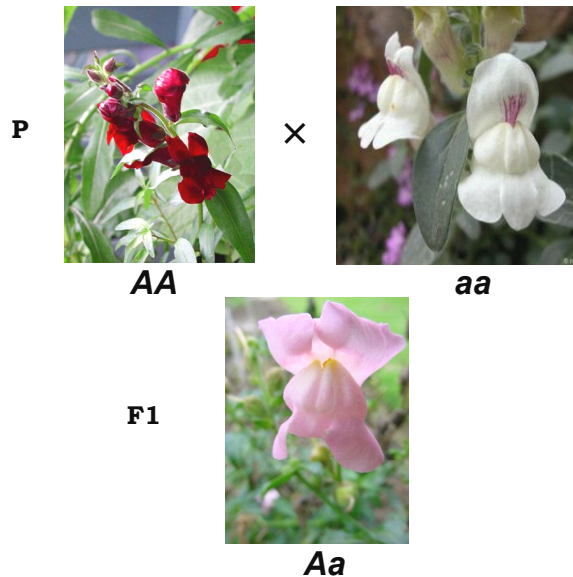
(з домінантною ознакою) з особиною, гомозиготною за рецесивом, – **аналізуюче схрещування**, яке чітко ідентифікує генотип особини. Залежно від генотипу досліджуваної особини в аналізуючому схрещуванні або спостерігається розщеплення 1 : 1 (гетерозигота, варіант 1), або всі нащадки характеризуються домінантною ознакою (гомозигота, варіант 2):

		1		2
<b>P</b>	<b>Aa</b>	×		<b>aa</b>
<b>G (типи гамет)</b>	<b>A, a</b>			<b>A a</b>
<b>F1</b>	<b>Aa, aa</b>			<b>Aa</b>

### Взаємодія алелів одного гена

Описаний приклад спадкування забарвлення насіння гороху належить до ситуації так званого **повного домінування**: прояв ознаки не залежить від кількості (два або один) домінантних алелів у генотипі. Проте у природі часто зустрічаються ще інші типи взаємодії алельних генів.

Перший із них спостерігається у випадку, коли рецесивний алель не дає функціонального продукту, але ознака залежить від кількості копій домінантного алеля в генотипі. Наприклад, забарвлення квітки в червоний колір у ротиків *Antirrhinum majus* залежить від кількості червоного пігменту, а цей останній з'являється внаслідок активності ферменту, що контролюється певним геном. Два гени **AA** зумовляють інтенсивне червоне забарвлення, гомозигота **aa** (відсутність ферменту та, відповідно, пігменту) характеризується білим кольором квітки, гетерозигота має вдвічі меншу інтенсивність забарвлення порівняно з гомозиготою за домінантним алелем (удвічі менше ферменту й пігменту) – квітку рожевого кольору (рис. 3.2). Аналогічно спадкується кучерявість пір'я в голубів: особина, гетерозиготна за геном кучерявості, характеризується хвилястим пір'ям. Такий тип взаємодії алельних генів називають **неповним домінуванням**. За неповного домінування гетерозигота характеризується фенотипом, відмінним від обох гомозигот – із цією поправкою перший закон Менделя залишається без змін. Що стосується результатів схрещування гетерозигот, то розщеплення за генотипом і фенотипом збігатимуться та становитимуть 1 : 2 : 1.



**Рис. 3.2.** Неповне домінування забарвлення квітів у ротиків

Аналогічні розщеплення характерні й для **кодомінування** з тією різницею, що нащадки від схрещування гомозигот різних типів будуть характеризуватися наявністю фенотипових ознак обох батьків одночасно. Тобто в цьому разі обидва алелі є домінантними: дають функціональні продукти, що трохи розрізняються за певними характеристиками. Така ситуація досить часто спостерігається для ферментів, коли два алелі зумовляють синтез двох білків – *изоферментів* – із практично однаковою активністю, але при цьому вони розрізняються за молекулярною вагою (один із білків має додатковий структурний домен, кінцевий хвіст тощо).

Розглянуті приклади потребують важливого уточнення. З того факту, що у двох гомологічних хромосомах можуть міститися лише два різні алелі одного гена, не випливає, що у групі особин ген обов'язково має максимум два алелі. Насправді, у більшості випадків гени існують у вигляді кількох (теоретично необмеженої кількості) різних алелів. Це явище отримало назву **множинний алелізм**. Одним із прикладів множинного алелізму є система груп крові АВО. Добре відомі чотири групи крові – 0, А, В і АВ – визначаються трьома алелями одного гена:  $I^A$ ,  $I^B$ ,  $i^0$ . Алелі  $I^A$  та  $I^B$  є кодомінантними (відповідають за формування на поверхні еритроцитів антигенів двох типів – А і В), але при цьому домінують над алелем  $i^0$ , який не продукує жодного ан-

тигену. За наявності трьох алелів можливо шість комбінацій між ними, але рецесивність  $i^0$  зводить кількість фенотипів (груп крові) до чотирьох: групі 0 відповідає генотип  $i^0i^0$ , групі А – генотипи  $I^AI^A$  та  $I^Ai^0$ , групі В –  $I^BI^B$  та  $I^Bi^0$ , групі АВ – генотип  $I^AI^B$ .

## Дигібридні й полігібридні схрещування

У своїх дослідах Мендель також аналізував спадкування двох пар альтернативних ознак одночасно: такі схрещування називаються **дигібридними**, а особини, що є гетерозиготними за двома генами одночасно, – **дигетерозиготами**. Мендель схрещував форми гороху з жовтим і гладеньким насінням із рослинами з насінням зеленим та зморшкуватим. Усі гібриди першого покоління мали жовті й гладкі горошини: жовтий колір, як і в попередньому прикладі, домінував над зеленим, а гладка форма – над зморшкуватою. Залишивши позначення  $A/a$  за алелями забарвлення, алелі форми насіння позначимо як  $B$  (гладенька) і  $b$  (зморшкувата). Після самозапилення гібридів першого покоління спостерігалось розщеплення  $9 : 3 : 3 : 1$  – виявилось, що  $9/16$  потомства характеризувалось наявністю двох домінантних ознак одночасно (жовте та гладке насіння), дві групи по  $3/16$  – наявністю лише однієї з двох домінантних ознак (жовте – зморшкувате, зелене – гладке), і  $1/16$  особин були притаманні обидві рецесивні ознаки.

Якщо припустити (що й зробив Мендель), що два гени спадкуються незалежно, то дигібридні схрещування можна розглядати як два незалежні моногібридні схрещування. За другим законом Менделя, розщеплення за кольором у другому поколінні становить  $3/4A_ :$   $1/4aa$ , і за формою також –  $3/4B_ :$   $1/4bb$ . За відомим правилом добутку ймовірностей (імовірність здійснення двох подій одночасно дорівнює добутку ймовірностей кожної з цих подій) можна розрахувати вищезгадане розщеплення:

$$\begin{aligned} A\_B\_ & 3/4 \times 3/4 = 9/16 \\ aaB\_ & 1/4 \times 3/4 = 3/16 \\ A\_bb & 3/4 \times 1/4 = 3/16 \\ aabb & 1/4 \times 1/4 = 1/16 \end{aligned}$$

Використовуючи правило добутку та знаючи розщеплення при моногібридному схрещуванні, можна розрахувати співвідношення як фенотипових, так і генотипових класів у полігібридних схрещуваннях (табл. 3.1).

Таблиця 3.1. Деякі параметри розщеплень при полігібридних схрещуваннях

Схрещування	Кількість пар алелів, за якими різняться батьки	Кількість типів гамет, які може продукувати гетерозигота	Кількість фенотипних класів F2 при повному домінуванні	Кількість генотипних класів F2	Частка особин F2, гомозиготних по всіх генах
Моногібридне	1	2	2	3	1/4
Дигібридне	2	4	4	9	1/16
Тригібридне	3	8	8	27	1/64
Полігібридне	$n$	$2^n$	$2^n$	$3^n$	$1/4^n$

Проаналізувавши результати дигібридних схрещувань, Мендель сформулював постулат про **незалежне спадкування ознак**, який потім став називатися **третім законом Менделя**.

## ВІДХИЛЕННЯ ВІД МЕНДЕЛІВСЬКИХ РОЗЩЕПЛЕНЬ

Закони Менделя мають для генетики приблизно таке значення, що й закони поведінки ідеальних газів – для термодинаміки. Подібно до того, як модель ідеального газу ускладнюється з метою врахування особливостей реального газу, менделівські закономірності є базисом для розробки складніших моделей, в яких беруться до уваги різноманітні особливості функціонування спадкового апарату в конкретних випадках. Описані вище розщеплення, які реально спостерігаються для певних ознак гороху, є скоріше винятком із правила. Власне, уся постменделівська генетика присвячена з'ясуванню причин різноманітних відхилень від законів Менделя.

### Установлення факту відхилення: критерій $\chi^2$

Перш ніж з'ясувати причини та механізми відхилень, у кожному конкретному випадку слід відповісти на питання, чи дійсно має місце таке відхилення від очікуваного за Менделем розподілу ознак. Адже відсутність відповідності між очікуваним та реальним співвідношенням фенотипів може бути викликана просто випадковими від-



хиленнями. Проілюструємо це на простому прикладі підкидання монеток з наступним падінням орлом або решкою. Зрозуміло, що ймовірність падіння на орла / решку становить 1/2, тобто очікуване співвідношення падінь дорівнює 1 : 1. Конкретно на 10 підкидань має бути приблизно 5 падінь на орла та 5 – на решку. Ключовим у попередньому реченні є слово "приблизно" – чим більше буде підкидань, тим ближчим до очікуваного буде результат. Через випадкові відхилення зазвичай (у чому можна легко переконатися) спостерігаються співвідношення на кшталт 3–7 падінь на орла та 7–3 на решку (а  $7 : 3 = 2,333:1$ , що суттєво відрізняється від теоретично очікуваного співвідношення).

Отже, випадкові відхилення можуть приводити до різниці між теоретично очікуваними розщепленнями та такими, що спостерігаються в досліді. Чим більший розмір вибірки, тим меншими будуть такі відхилення. Якщо експериментальні дані відрізняються від теоретично очікуваних тільки за рахунок випадкових відхилень, то кажуть, що виправдовується **нульова гіпотеза**. У протилежному разі необхідно запропонувати інше пояснення розщепленням, які спостерігаються, а отже, запропонувати іншу гіпотезу.

Для оцінки нульової гіпотези в математичній статистиці користуються  **$\chi^2$ -критерієм**. Величина  $\chi^2$  кількісно відображає відхилення від очікуваного розподілу з урахуванням розміру вибірки:

$$\chi^2 = \sum \frac{(f - f_0)^2}{f_0},$$

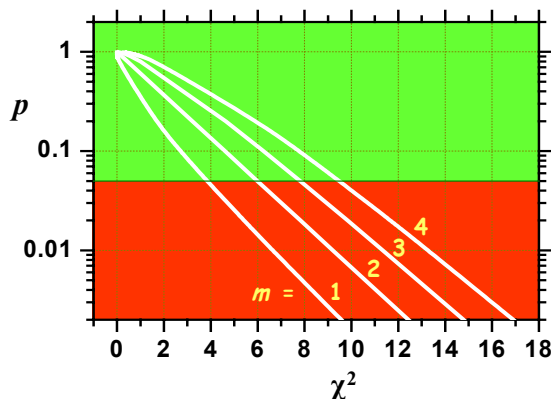
де  $f$  – кількість особин з фенотипами певного класу у вибірці,  $f_0$  – очікувана кількість, знак суми вказує на підсумовування по всіх фенотипових класах (числом  $n$ ). Припустимо, наприклад, що у схрещуванні гороху з жовтим і зеленим насінням (рис. 3.1) у другому поколінні отримано 70 рослин з жовтим насінням і 30 – із зеленим ( $n = 2$ ). Нульова гіпотеза передбачає співвідношення 3 : 1, тобто очікувані кількості становлять відповідно 75 і 25. Застосування наведеної формули дає

$$\chi^2 = \frac{(70 - 75)^2}{75} + \frac{(30 - 25)^2}{25} = 1,333.$$

Важливою характеристикою є також *число ступенів свободи*. Серед усіх фенотипових класів імовірність появи одного з них однозначно визначається ймовірностями решти класів, тобто число ступенів свободи  $m = n - 1$ . У нашому прикладі кількість фенотипових класів  $n = 2$ , а число ступенів свободи  $m = 1$ : для певної вибірки кількість особин одного класу автоматично дає кількість особин іншого класу. Число ступе-

нів свободи важливо враховувати, оскільки зі збільшенням цієї величини росте й імовірність випадкового відхилення від очікуваних величин.

Після визначення числа ступенів свободи необхідно інтерпретувати значення  $\chi^2$  стосовно ймовірності  $(1 - p)$  того, що відхилення від очікуваного розподілу є *статистично значущими* (не випадковими), – насправді, саме таке завдання найчастіше стоїть перед дослідником. Величина  $p$  залежить від значення  $\chi^2$  і числа ступенів свободи – зазвичай  $p$  установлюють, використовуючи спеціальні таблиці або графіки. На рис. 3.3 наведено у графічній формі табличні значення залежності  $p$  від  $\chi^2$  для різних значень числа ступенів свободи. Якщо, наприклад, провести вертикальну лінію з точки 1,333 на осі абсцис до перетину з графіком для  $m = 1$ , то можна оцінити, що в нашому прикладі  $p \approx 0,27$ .



**Рис. 3.3.** Залежність ймовірності  $p$  від  $\chi^2$  для чотирьох значень числа ступенів свободи  $m$ . Зеленим зафарбовано зону  $p > 0,05$ , червоним –  $p < 0,05$

Отриману величину  $p$  порівнюють з певним *рівнем значущості*  $\alpha$ , який задає прийнятну для даного випадку ймовірність хибного визнання нульової гіпотези невірною: якщо  $p > \alpha$ , нульову гіпотезу приймають; якщо  $p \leq \alpha$ , – відкидають, визнаючи відхилення, що спостерігаються, статистично значущими. Зазвичай у біологічних дослідженнях використовують  $\alpha = 0,05$ . Тобто, якщо  $p \leq 0,05$ , то з ймовірністю  $\geq 0,95$  (так звана *довірча ймовірність*  $1 - \alpha$ ) відхилення, що спостерігаються, визнаються статистично значущими; для всіх інших значень  $p$  береться нульова гіпотеза. Отже, у нашому прикладі нульова гіпотеза виправдовується. У попередньому простому прикладі з підкиданням монети (також одна степінь вільності) при семи випадіннях орла та трьох – решки  $\chi^2 = 1,6$  і  $p \approx 0,2$  – нульова гіпотеза (у справедливості якої в даному випадку ніхто не сумнівається) також виправдовується.

Таблиця 3.2. Величини  $\chi^2$  для двох значень  $p$  залежно від числа ступенів свободи

Число ступенів вільності	$\chi^2$	
	$p = 0,05$	$p = 0,01$
1	3,841	6,635
2	5,991	9,210
3	7,815	11,341
4	9,488	13,277
5	11,070	15,086
6	12,592	16,812
7	14,067	18,475
8	15,507	20,090
9	16,919	21,666
10	18,307	23,209

На практиці з метою перевірки нульової гіпотези порівнюють розраховане значення  $\chi^2$  із таким критичним значенням, що відповідає  $p = \alpha$  (рис. 3.3, табл. 3.2), і приймають нульову гіпотезу, якщо  $\chi^2$  є меншим за критичний, та відкидають у протилежному випадку.

### Причини статистично значущих відхилень від менделівських розщеплень

Слід зауважити, що, як це зрозуміло з описаних у розділі 1 цитологічних основ спадковості, менделівські розщеплення у принципі можуть бути реалізованими тільки для видів із нормальним статевим процесом, диплоїдністю обох статей та за умови відсутності порушень у мейозі.

Але й при виконанні зазначених умов випадки відхилень від менделівських розщеплень досить численні. При цьому менделівські закономірності не порушуються – просто на них накладаються інші ефекти. Три такі ефекти – взаємодія неалельних генів, зчеплення груп генів в одній хромосомі та розташування гена в статевих хромосомах – розглядаються в окремих підрозділах. Серед інших причин слід назвати такі:

1. Летальність певних комбінацій алелів. Наприклад, при схрещуванні жовтих (гетерозиготних) мишей, розщеплення на жовті й чорні (рецесивні гомозиготи) завжди становить 2 : 1. Подібний результат спостерігається також при схрещуванні платинових лисиць. Якщо перевірити вагітних самок, то виявляється, що чверть ембріонів гине ще до народження. А саме, гинуть гомозиготи за домінант-

ним алелем, чому й спостерігається відхилення від очікуваного розщеплення 3 : 1 (відсутній один із чотирьох генотипових класів). Таким чином, у цьому прикладі домінантний алель є насправді домінантним лише щодо забарвлення шерсті – стосовно життєздатності той самий алель є рецесивним. Наведений випадок, коли один ген впливає на декілька ознак одночасно (забарвлення шерсті та життєздатність), є одним із прикладів **плейотропії**.

2. Існують алелі, які фенотипово виявляються тільки в певній частині організмів, що містять їх у генотипі. Для характеристики такого варіабельного прояву генів використовують поняття **пенетрантності** та **експресивності**. Мірою пенетрантності є частка особин, які характеризуються певним фенотипом, серед усіх особин з однаковим генотипом. Деякі спадкові хвороби людини, наприклад подагра, характеризуються неповною пенетрантністю, тобто не всі особи, які несуть мутацію, хворіють. Експресивність відображає силу прояву мутантного гена у фенотипі. Так, дрозофіли, гомозиготні за мутантним алелем *eyeless*, можуть мати різну кількість фасеток очей – від нормальної кількості до повної їхньої відсутності. Здатність генотипу виявлятися по-різному залежно від зовнішніх умов відображає його **норму реакції** – певний діапазон прояву, у межах якого ознаки можуть варіювати у відповідь на варіації умов розвитку організму.

3. Деякі ознаки притаманні особинам протягом не всього життя, а виникають лише в певний період: характер розщеплення може залежати від віку. Наприклад, у людини є спадкові синдроми, які виявляються лише в похилому віці (синдром Альцгеймера, хвороба Гентінгтона).

4. До відхилень від очікуваних менделівських розщеплень приводить також явище *імпринтингу*. Основою його є так звана епігенетична спадковість – успадкування від батьків не просто ДНК, а хроматину, який несе на собі певні хімічні маркери, від яких залежить структурний стан ділянки та, відповідно, активність певних генів (див. розділ 6). Унаслідок такого ефекту прояв певного гена може бути зумовлений тим, від кого саме з батьків дана хромосома отримана.

5. У природі існує багато видів зі статевим диморфізмом, і стать відіграє велику роль у прояві цілої низки ознак (див. підрозділ, присвячений зчепленню зі статтю, а також розділ 6).

Насправді, усі зазначені вище ефекти можуть бути зведені до взаємодії генів у складній системі функціонування геному, хоча й не завжди таку взаємодію можна легко описати: часто треба враховувати надто багато окремих елементів, які впливають один на одного.

## ВЗАЄМОДІЯ НЕАЛЕЛЬНИХ ГЕНІВ

Під взаємодією неалельних генів у вузькому значенні зазвичай розуміють випадки, коли *декілька* різних генів впливають на розвиток *однієї* ознаки. При цьому також спостерігаються відхилення від очікуваних співвідношень фенотипових класів. Слід розуміти, що йдеться не про безпосередню взаємодію між генами: прояв ознаки залежить від продуктів різних генів (наприклад, ферментів, які залучені до одного біохімічного каскаду). Розрізняють три типи взаємодії неалельних генів: *комплементарність*, *епістаз* і *полімерію*.

**Комплементарність** – тип взаємодії неалельних генів, при якому присутність у зиготі домінантних алелів цих генів (хоча б по одному для кожного гена) зумовлює такий прояв ознаки, який не спостерігається за наявності лише одного з домінантних алелів окремо. Гени, що взаємодіють за такою схемою, називають **комплементарними**. Конкретний вид розщеплень на фенотипові класи за комплементарної взаємодії залежить від того, чи мають домінантні алелі кожного з генів власний фенотиповий прояв.

Розглянемо найпростіший випадок взаємодії двох комплементарних генів  $A/a$  і  $B/b$ . Згідно з третім законом Менделя, при дигібридному схрещуванні очікуваним розщепленням за фенотипом у  $F_2$  є  $9A\_B\_ : 3A\_bb : 3aaB\_ : 1aabb$ . Саме це розщеплення і спостерігається при спадкуванні форми гребня в курей (рис. 3.4), коли кожен із домінантних алелів двох комплементарних генів має свій власний фенотиповий прояв (табл. 3.3).



**Рис. 3.4.** Різні форми гребеня в курей: трояндоподібна (а), горохоподібна (б), горіхоподібна (в), проста (г)

Таблиця 3.3. Комплементарна взаємодія генів, які визначають форму гребеня в курей

Генотипи батьків	Фенотипи батьків (форма гребеня)	Генотипи F1	Фенотипи F1	Генотипи F2	Частки генотипів F2	Фенотипи F2	Частки фенотипів F2
<i>AAbb</i>	Горохоподібна	<i>AaBb</i>	горіхоподібна	<i>A_B_</i>	9/16	Горіхоподібна	9/16
				<i>A_bb</i>	3/16	Горохоподібна	3/16
<i>aaBB</i>	Трояндоподібна			<i>aaB_</i>	3/16	Трояндоподібна	3/16
				<i>aabb</i>	1/16	Проста	1/16

У запашного горошку забарвлення квітки в червоний колір залежить від двох домінантних алелів, жоден із яких не має свого власного фенотипового прояву. Гени кодують два ферменти, залучені до послідовного двоступеневого перетворення певного субстрату на червоний пігмент: у відсутності хоча б одного з ферментів (хоча б одного домінантного алеля) пелюстки квітки залишаються незабарвленими (рис. 3.5). Тобто генотипові класи *A\_bb*, *aaB\_* і *aabb* мають однаковий фенотип (білі пелюстки) і формують один фенотиповий клас: у F2 спостерігається розщеплення 9 : 7 (табл. 3.4).

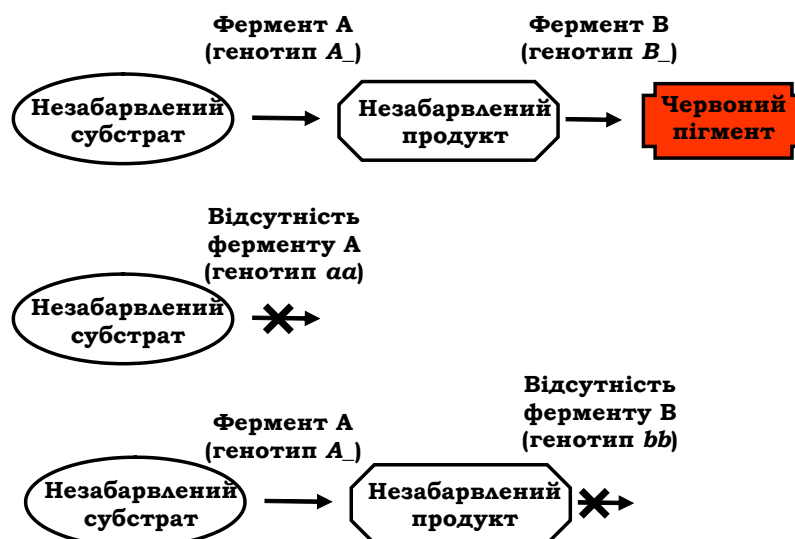


Рис. 3.5. Схема визначення забарвлення пелюсток у запашного горошку

**Таблиця 3.4. Комплементарна взаємодія генів, які визначають забарвлення квітки в запашного горошку**

Гено-типи батьків	Фено-типи батьків (колір квітки)	Гено-типи F1	Фено-типи F1	Гено-типи F2	Частки генотипів F2	Фено-типи F2	Частки фенотипів F2
<i>AAbb</i>	біла	<i>AaBb</i>	червона	<i>A_B_</i>	9/16	червона	9/16
<i>aaBB</i>	біла			<i>A_bb</i>	3/16	біла	7/16
				<i>aaB_</i>	3/16		
				<i>aabb</i>	1/16		

Забарвлення плоду в гарбуза також визначається двома генами (за схемою, аналогічною до такої на рис. 3.5), але тільки один із домінантних алелів цих генів не має власного прояву – у F2 спостерігається розщеплення 9 : 3 : 4 (табл. 3.5). У даному випадку алель *W* – один із генів, який відповідає за синтез або накопичення зеленого пігменту (хлорофілу). У присутності алеля *Y* зелений пігмент перетворюється на жовтий (тобто, алель *Y* у фенотипі виявляється виключно за наявності *W*, але власного фенотипового прояву не має). У присутності двох алелів *w* пігмент узагалі не утворюється, тому плоди залишаються білими.

**Таблиця 3.5. Комплементарна взаємодія генів, які визначають забарвлення плоду в гарбуза**

Гено-типи батьків	Фено-типи батьків (колір плоду)	Гено-типи F1	Фено-типи F1	Гено-типи F2	Частки генотипів F2	Фено-типи F2	Частки фенотипів F2
<i>WWYY</i>	Жовтий	<i>WwYy</i>	Жовтий	<i>W_Y_</i>	9/16	Жовтий	9/16
<i>wwyy</i>	Білий			<i>W_yy</i>	3/16	Зелений	3/16
				<i>wwY_</i>	3/16	Білий	4/16
				<i>wwyy</i>	1/16		

Ще один тип розщеплення у другому поколінні при комплементарній взаємодії генів спостерігається тоді, коли обидва домінантні алелі мають однаковий власний фенотиповий прояв. Так, домінантні алелі двох певних генів визначають однакову сферичну форму плоду в гарбуза, якщо вони присутні в генотипі окремо; сумісна дія цих алелів зумовлює дископодібну форму. У другому поколінні спостерігаються три фенотипові класи у співвідношенні 9 : 6 : 1 за рахунок об'єднання генотипових класів *A\_bb* і *aaB\_* (табл. 3.6).

Таблиця 3.6. Комплементарна взаємодія генів, які визначають форму плоду в гарбуза

Гено-типи батьків	Фено-типи батьків (форма плоду)	Гено-типи F1	Фено-типи F1	Гено-типи F2	Частки генотипів F2	Фено-типи F2	Частки фенотипів F2
<i>AAbb</i>	Сферична	<i>AaBb</i>	Диско-подібна	<i>A_B_</i>	9/16	Диско-подібна	9/16
<i>aaBB</i>	Сферична			<i>A_bb</i>	3/16	Сферична	6/16
				<i>aaB_</i>	3/16		
				<i>aabb</i>	1/16	Видовжена	1/16

**Епістаз** – тип взаємодії неалельних генів, при якому один ген здатен пригнічувати дію іншого. Ген, який пригнічує, називають *епістатичним*, а ген, дія якого пригнічується, – *гіпостатичним*. Характер розподілу фенотипових класів залежить від наявності власного прояву у двох генів, що взаємодіють, та від того, домінуючий чи рецесивний алель гена є епістатичним.

Якщо інгібітором є домінуючий алель епістатичного гена, має місце **домінуючий епістаз** (табл. 3.7 – алель *I* пригнічує прояв алеля *C* при забарвленні пір'я в курей).

Таблиця 3.7. Епістатична взаємодія генів, які визначають забарвлення пір'я в курей

Гено-типи батьків	Фенотипи батьків (забарвлення пір'я)	Гено-типи F1	Фено-типи F1	Гено-типи F2	Частки генотипів F2	Фено-типи F2	Частки фенотипів F2
<i>CCII</i>	біле	<i>CcIi</i>	біле	<i>C_ii</i>	3/16	забарвлене	3/16
<i>ccii</i>	біле			<i>C_I_</i>	9/16	біле	13/16
				<i>ccI_</i>	3/16		
				<i>ccii</i>	1/16		

Іншим варіантом розщеплення при домінуючому епістазі може бути розщеплення 12 : 3 : 1. Це спостерігається при забарвленні хутра в деяких гризунів. Алель *A* зумовлює синтез чорного пігменту, а алель *B* – рудого. За відсутності обох домінуючих алелів хутро залишається білим. За наявності двох алелів (*A\_B\_*) синтезуються обидва пігменти, але рудий маскується чорним – хутро в цьому разі має чорне забарвлення.



У випадку, коли гіпостатичний ген не виявляється за присутності епістатичного рецесивного алеля в гомозиготному стані, говорять про **рецесивний епістаз**. Як приклад даного типу взаємодії можна навести спадкування кольору шерсті в лабрадорських мисливських собак. Один ген зумовлює тип пігменту, який синтезується клітинами шкіри: алель *B* зумовлює синтез чорного пігменту, а рецесивний алель *b* – коричневого. Інший ген контролює накопичення пігменту у волоссі: наявність домінантного алеля *E* приводить до накопичення пігменту, тоді як у гомозигот за рецесивним алелем *e* пігменту у волоссі немає, такі собаки мають жовтий колір. Отже, алель *e* в гомозиготному стані приводить до відсутності пігменту у волоссі, тобто можна сказати, що він пригнічує прояв гена забарвлення. Очевидно, що генотипові класи *B\_ee* та *bbee* будуть об'єднуватися в один фенотиповий, і при схрещуванні дигетерозигот спостерігатиметься розщеплення 9 (*B\_E\_* – чорні) : 3 (*bbE\_* – коричневі) : 4 (3 *B\_ee* + 1 *bbee* – жовті). Очевидно також, що наведений приклад рецесивного епістазу скоріше можна інтерпретувати як комплементарність: чорне забарвлення волосся спостерігається тільки за наявності домінантних алелів обох генів (див. аналогічне розщеплення в табл. 3.5).

Поряд із простим рецесивним епістазом, іноді формально розглядають **подвійний рецесивний епістаз** – ситуацію, коли рецесивний алель будь-якого з генів, що взаємодіють, у гомозиготному стані є епістатичним щодо іншого гена. Так, розглянуте розщеплення 9 : 7 (спадкування забарвлення квітки в запашного горошку, табл. 3.4) можна інтерпретувати як подвійний рецесивний епістаз: *aa* пригнічує прояв алеля *B*, а *bb*, у свою чергу, – прояв *A*. Наведені приклади демонструють, що рецесивний епістаз (простий або подвійний) насправді зводиться до комплементарності.

Чітко визначити тип взаємодії неалельних генів можливо в тих випадках, коли відомий біохімічний механізм прояву досліджуваної ознаки (як, скажімо, у випадку забарвлення квітки в запашного горошку). Часто біохімічний механізм залишається невідомим, і тоді обмежуються констатацією формальної генетичної схеми спадкування ознаки. Отже, ідентифікація того чи іншого типу взаємодії неалельних генів часто є умовною. Як показано в табл. 3.3–3.7, при відхиленнях у розщепленнях, зумовлених взаємодією двох генів, співвідношення фенотипових класів, що спостерігаються у F<sub>2</sub>, завжди можна вивести з класичного 9 : 3 : 3 : 1. Для цього важливо усвідомити, які саме класи об'єднуються, після чого можна зробити висновок про можливий тип взаємодії (табл. 3.8).

Таблиця 3.8. Співвідношення фенотипових класів у F2 дигібридного схрещування при деяких типах взаємодії неалельних генів

Генотипи				Тип взаємодії
A_B_	A_bb	aaB_	aabb	
9	3	3	1	комплементарність
9	3	4		комплементарність, рецесивний епістаз
9	7			комплементарність, подвійний рецесивний епістаз
9	6		1	комплементарність
12		3	1	домінантний епістаз
12 (+1 aabb)		3	1 (+12)	домінантний епістаз

**Полімерія** – тип взаємодії неалельних генів, при якому ознака формується в результаті дії кількох генів з однаковим впливом на ознаку (*однозначних генів*), тобто йдеться про родини ідентичних або гомологічних генів, що повторюються в геномі та мають однаковий прояв. Сумарний ефект може залежати просто від наявності хоча б одного такого гена (при визначенні якісних ознак) або від кількості домінантних алелів взаємодіючих генів (при визначенні кількісних ознак). Відповідно, розрізняють *некумулятивну* та *кумулятивну* полімерію. У разі полімерії прийнято позначати взаємодіючі гени однією буквою, різні гени при цьому позначають нижнім цифровим індексом ( $A_1a_1A_2a_2A_3a_3\dots$ ). При **некумулятивній полімерії** достатньо одного домінантного алеля будь-якого гена з числа тих, які впливають на ознаку, щоб ця ознака виявилась. Характерне розщеплення у другому поколінні 15 : 1, прикладом є форма плоду у грициків *Capsella bursa-pastoris* (табл. 3.9).

Таблиця 3.9. Полімерна взаємодія генів, які визначають форму плоду в *Capsella bursa-pastoris*

Генотипи батьків	Фенотипи батьків (форма плоду)	Генотипи F1	Фенотипи F1	Генотипи F2	Частки генотипів F2	Фенотипи F2	Частки фенотипів F2
$A_1A_1A_2A_2$	трикутна	$A_1a_1A_2a_2$	трикутна	$A_1\_A_2\_$	9/16	трикутна	15/16
				$A_1\_a_2a_2$	3/16	трикутна	
$a_1a_1A_2\_$	3/16			трикутна			
$a_1a_1a_2a_2$	1/16			овальна	1/16		

У випадку **кумулятивної полімерії** ступінь прояву ознаки (яку називають адитивною) залежить від кількості домінантних алелів полімерних (адитивних) генів: можна сказати, що вплив окремих генів накопичується, і чим більше домінантних алелів різних генів, тим сильніше проявляється ознака. Саме за таким принципом спадкується, наприклад, колір шкіри в людини (рис. 3.6).

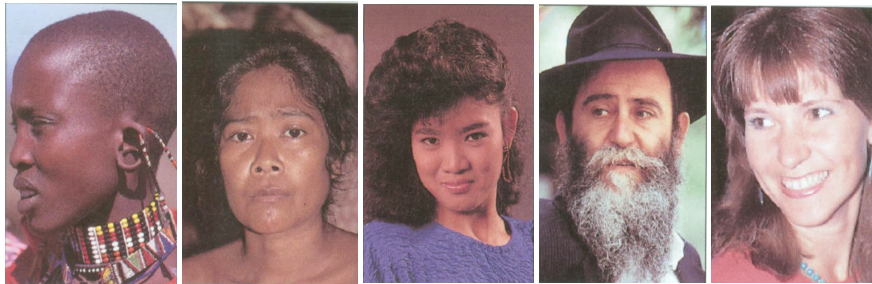


Рис. 3.6. Варіації забарвлення шкіри в людини

Для двох пар адитивних генів характерне розщеплення у другому поколінні становить 1 : 4 : 6 : 4 : 1 – прикладом є розвиток забарвлення зерна пшениці (табл. 3.10). За типом кумулятивної полімерії спадкується більшість кількісних ознак.

Таблиця 3.10. Полімерна взаємодія генів, які визначають забарвлення зерна пшениці

Гено-типи батьків	Фено-типи батьків (забарвлення зерна)	Гено-типи F1	Фено-типи F1	Гено-типи F2	Частки генотипів F2	Фено-типи F2	Частки фенотипів F2
$A_1A_1A_2A_2$	червоне	$A_1a_1A_2a_2$	рожеве	$A_1A_1A_2A_2$	1/16	червоне	1/16
				$A_1a_1A_2A_2$	2/16	темно-рожеве	4/16
				$A_1A_1A_2a_2$	2/16	рожеве	6/16
				$A_1A_1a_2a_2$	1/16		
				$A_1a_1A_2a_2$	4/16		
$a_1a_1a_2a_2$	біле			$a_1a_1A_2A_2$	1/16	світло-рожеве	4/16
				$a_1a_1A_2a_2$	2/16		
				$A_1a_1a_2a_2$	2/16	біле	1/16
				$a_1a_1a_2a_2$	1/16		

## КІЛЬКІСНІ ОЗНАКИ

Вище йшлося головним чином про ознаки, які чітко виявляються у фенотипі й досить легко відрізняються від альтернативних. При розчепленні їх не виникає сумнівів, до якого фенотипового класу за даною ознакою слід віднести ту чи іншу особину. Такі ознаки (це, наприклад, особливості забарвлення чи форми, відсутність певного ферменту та ін.) зазвичай називають **якісними**. Однак багато спадкових ознак неможливо точно і якісно описати. Скажімо, коли спостерігаються поступові малопомітні переходи між особинами, а при розщепленні немає чітко розмежованих фенотипових класів. Ці ознаки (вага й розміри тіла, плодовитість, урожайність, продуктивність, скоростиглість, вміст білків і жирів тощо) доводиться вивчати шляхом вимірювань або підрахунків, які дозволяють дати їм чисельну характеристику. Подібні ознаки прийнято називати **кількісними**. Чітку межу між якісними й кількісними ознаками провести неможливо: деякі кількісні можна описати якісно (наприклад, високий – карликовий, скоростиглий – пізньостиглий), якісні ж відмінності можна виразити кількісно (наприклад, різницю в забарвленні – кількістю пігменту). Проте якісний опис можливий лише у рідких випадках, коли ці відмінності досить різкі й між ними немає проміжних форм. Більшість господарсько-корисних ознак культивованих рослин і домашніх тварин відносять до кількісних, тому розуміння того, як спадкуються кількісні ознаки, є дуже важливим для селекційної роботи.

Кількісні ознаки, як правило, мінливіші, ніж якісні. Це залежить від двох причин. По-перше, спадкові відмінності особин за тією чи іншою кількісною ознакою зазвичай зумовлені взаємодією декількох пар полімерних генів, причому кожен ген досить суттєво впливає на розвиток даної ознаки. Певні комбінації полімерних генів, які визначають кількісну ознаку, зсувають ступінь прояву ознаки в позитивний бік, інші – у негативний. На відміну від цього, у випадку якісних ознак різниця між особинами визначається здебільшого лише однією, двома або, зрідка, трьома парами алелів. По-друге, кількісні ознаки зазвичай значно сильніше, порівняно з якісними, залежать від зовнішніх факторів. При цьому різні фактори часто можуть діяти на фенотиповий прояв генів різнонаправлено.

При вивченні спадкування кількісних ознак використовують певні статистичні параметри, за допомогою яких характеризують ступінь прояву таких ознак. Головні з цих параметрів – середнє арифметичне ( $\bar{x}$ ), середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ) і коефіцієнт мінливості ( $CV$ ).

Ознаку, яку вивчають, вимірюють в усіх особин досліджуваної групи, отримані дані розбивають на довільну, але відносно невелику кількість класів, у кожному з яких об'єднані особини більш-менш схожі за значенням ознаки. Тобто створюють варіаційний ряд, який зручно зображувати у вигляді гістограми – стовпчиків з основами, які відповідають інтервалу, прийнятому для даного класу, і висотою, що відповідає кількості варіантів (тобто кількості особин, які належать до даного класу). Аналогічно можна побудувати криву розподілу (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Розподіл за вагою корів костромської породи віком понад п'ять років

Після побудови варіаційного ряду знаходять **середнє арифметичне** ( $\bar{x}$ ), яке дає уявлення про типове значення ступеня прояву ознаки в досліджуваній групі особин. Середнє арифметичне розраховують за формулою

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum x_i,$$

де  $x_i$  – значення для окремих особин;  $N$  – кількість особин.

Середнє арифметичне не дає уяви про ступінь мінливості ознаки в межах досліджуваної групи: варіаційні ряди, які мають однакове середнє арифметичне, можуть значно відрізнятися за мінливістю. Найуживанішою мірою мінливості (ширини розподілу ознаки) є **середнє квадратичне відхилення** ( $\sigma$ ), його розраховують за формулою

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{N-1}}.$$

Середнє квадратичне відхилення дозволяє порівнювати мінливість однієї й тієї ж ознаки в різних групах особин. Проте цей показник не придатний для порівняння мінливості ознак, які характеризуються різними одиницями вимірювання, наприклад, мінливості ваги та зросту. У такому випадку розраховують **коефіцієнт варіації** (CV), що являє собою виражене у відсотках відношення середнього квадратичного відхилення до середнього арифметичного:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100\%.$$

Потрібно зауважити, що не слід користуватися коефіцієнтом варіації там, де можна обійтися середнім квадратичним відхиленням, – у математичному відношенні останнє значно точніше характеризує мінливість ознаки.

Важливо розуміти також, що будь-який емпіричний варіаційний ряд є випадковою вибіркою, яка містить обмежену кількість варіантів, і тому не зовсім точно відображає характерну для даної популяції величину досліджуваної ознаки та її мінливість. Достовірність біометричних показників, що визначаються для емпіричної вибірки, сильно залежать від кількості особин, що входять до її складу: чим більша вибірка, тим ближчі ці показники до свого істинного значення.

Як правило, кількісні ознаки залежать від полімерних генів, що й зумовлює деякі особливості їхнього спадкування. При цьому в основі спадкової передачі кількісних ознак лежать такі самі явища розщеплення та перекомбінації генів, що й при передачі якісних. При схрещуванні особин, які відрізняються за кількісною ознакою, деякі нащадки у F<sub>2</sub> можуть мати більше чи менше значення прояву ознаки, ніж вихідні батьки. Якщо обидва батьки несуть як гени, що збільшують це значення, так і ті, що зменшують його, то у F<sub>2</sub> мають з'явитися нащадки, в яких концентрація плюс- або мінус-генів буде вищою, ніж у батьків. Припустимо, наприклад, що полімерні гени A, B і C збільшують прояв ознаки, а їхні алелі a, b і c зменшують його, і що генотип однієї батьківської форми AABVcc, а іншої – aabbCC. Тоді серед особин F<sub>2</sub> деякі матимуть генотип AABVCC або aabbcc; у перших значення ознаки буде більше, а в других – менше, ніж у батьків. Така можливість розсунути межі спадкової мінливості кількісної ознаки має велике практичне значення. У багатьох випадках цим шляхом вдається виділити з F<sub>2</sub> форми, які генотипово і фенотипово є ціннішими, ніж вихідні батьківські форми.

У найпростішому вигляді теорія полімерних генів припускає, що будь-яка кількісна ознака визначається взаємодією кількох адитивно діючих генів, які мають приблизно однаковий вплив на цю ознаку. Насправді полімерні гени часто різняться за "силою", з якою кожен із них визначає прояв даної ознаки: залежно від ступеня впливу на кількісну ознаку гени поділяють на *сильні* та *слабкі*, а також гени з проміжним впливом на прояв ознаки. Деякий ген із плеiotропною дією може виступати як сильний щодо одних ознак і як слабкий – стосовно інших. Крім того, взаємовідносини полімерних генів можуть бути неадитивними й нерідко ускладнюються явищами комплементарності або епістазу, а також наявністю слабкіших генів-модифікаторів, вплив яких складно враховувати.

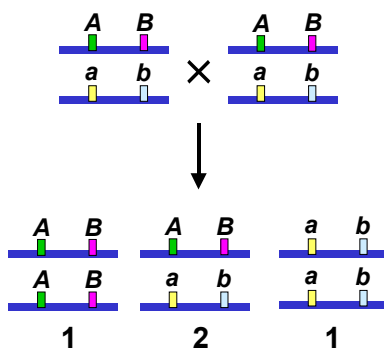
Більш або менш точне визначення конкретного набору генів, які визначають прояв кількісної ознаки, є досить складним завданням. У практиці рослинництва і тваринництва постійно виникає потреба знати, якою мірою мінливість кількісної ознаки зумовлена генетичними причинами, а якою – модифікаціями, викликаними факторами зовнішнього середовища. Від розв'язання цієї проблеми залежить прогноз ефективності добору, що проводиться за даною ознакою. У таких випадках суттєву користь може принести обчислення **коефіцієнта успадкованості** ознаки. Це може бути здійснено й без установлення конкретних генів, які визначають цю ознаку. Коефіцієнт успадкованості є величиною, що показує, яка частка припадає на генетичну компоненту в загальній фенотиповій мінливості досліджуваної кількісної ознаки. Фенотипова мінливість ознаки характеризується середнім квадратичним відхиленням або квадратом цього відхилення – дисперсією ( $\sigma^2$ ). Загальна фенотипова дисперсія ( $\sigma^2_P$ ) складається з дисперсії, що залежить від генетичної різноманітності особин ( $\sigma^2_G$ ), і дисперсії, зумовленої зовнішніми впливами ( $\sigma^2_E$ ). Коефіцієнт успадкованості  $h^2$  визначається рівнянням:

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2} = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}.$$

Існує декілька різних способів обчислення коефіцієнта успадкованості. Найпростіший із них базується на зіставленні мінливості кількісної ознаки в генетично однорідній групі особин із мінливістю цієї ж ознаки в групі особин, узятій з гетерогенної популяції того самого виду. Генетично однорідну групу отримують у результаті того, що протягом багатьох поколінь розмноження здійснюється шляхом схрещування близькоспоріднених особин або самозапилення.

## ХРОМОСОМИ ЯК ГРУПИ ЗЧЕПЛЕННЯ ГЕНІВ

Той факт, що гени містяться у хромосомах, які, власне, і передаються від батьків до нащадків, суттєво обмежує третій закон Менделя: незалежно одна від одної спадкуються хромосоми – великі групи генів (групи зчеплення). Зрозуміло, що це обмеження має зумовлювати відхилення від менделівських розщеплень у разі полігібридних схрещувань. Наприклад, при схрещуванні дигетерозигот  $AaBb$ , за умови, що гени  $A/a$  і  $B/b$  знаходяться в одній хромосомі, замість розщеплення  $9 : 3 : 3 : 1$  має бути отримано два фенотипові класи у відношенні  $3 : 1$  (рис. 3.8). Іншим засобом перевірити наявність генів в одній хромосомі, є аналізуюче схрещування  $AaBb \times aabb$ : якщо два гени спадкуються незалежно, то утворюються чотири фенотипові класи нащадків у співвідношенні  $1 : 1 : 1 : 1$  (скористуйтеся схемою моногібридного аналізуючого схрещення, наведеною вище, і правилом добутку ймовірностей); якщо гени зчеплені в одній хромосомі, буде два фенотипових класи ( $AaBb$ ,  $aabb$ ) у рівному співвідношенні.

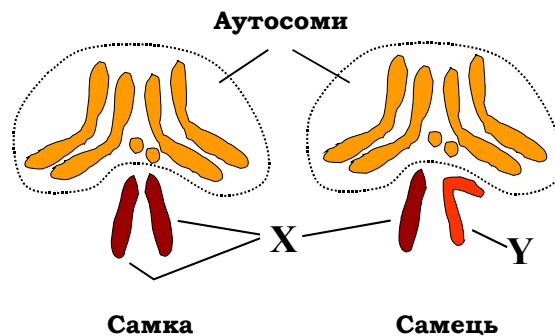


**Рис. 3.8.** Схрещування дигетерозигот за умови, що два гени містяться в одній хромосомі

Спостереження такого типу та встановлення того факту, що кількість груп зчеплення дорівнює гаплоїдній кількості хромосом, дозволили свого часу Моргану (Thomas Hunt Morgan) і співробітникам отримати генетичні докази того, що гени розташовані у хромосомах (див. історичну довідку).



Проте, і це теж було встановлено групою Моргана, очікувані співвідношення на кшталт щойно наведених майже ніколи не реалізуються точно: обмін ділянками між гомологічними хромосомами при мейозі – кросинговер (див. розділ 1) – приводить до "перемішування" генів у межах гомологічних груп зчеплення (гомологічних хромосом) і, таким чином, частково відновлює незалежність передачі генів до нащадків.



**Рис. 3.9.** Схема хромосомних наборів самки та самця *Drosophila melanogaster*. три пари аутосом і одна – статевих хромосом

Останнє твердження потребує уточнення: кросинговер унаслідок гомологічної рекомбінації відбувається тільки в парах гомологічних хромосом, які є однаковими за морфологією та набором генів у обох статей, – так званих аутосом. У більшості організмів, які розмножуються статевим шляхом, одна пара хромосом – статеві – представлена двома негомологічними типами (детальніше про генетику статі йдеться в розділі б). Одна зі статей при цьому (гомогаметна) характеризується двома однаковими статевими хромосомами, інша (гетерогаметна) – двома різними (наприклад, у ссавців і деяких комах дві X-хромосоми визначають самку, X- і Y-хромосома – самця, рис. 3.9). Рекомбінація в парі негомологічних статевих хромосом є неможливою (або суттєво обмеженою), отже статеві хромосоми передаються як одне ціле від гетерогаметної статі до нащадка.

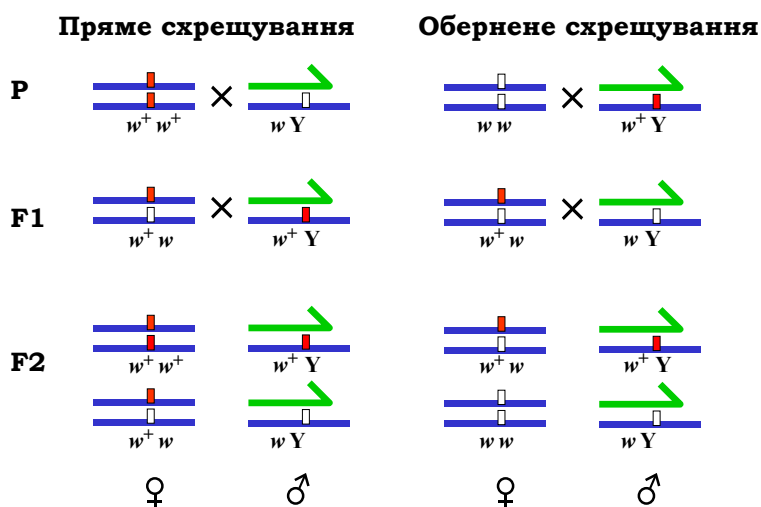
### Спадкування ознак, зчеплених зі статтю

Суттєвою обставиною, яка також впливає на розподіл фенотипових класів, є те, що негомологічні статеві хромосоми містять різні набори генів. Не слід думати, що це гени, які визначають статеві ознаки: більшість генів X-хромосоми людини та комах кодує ознаки, спільні для обох статей, тоді як Y-хромосома взагалі є практично інертною, оскільки в ній майже немає активних генів. Спадкування ознак, гени

яких розташовані в статевих хромосомах, називається **спадкуванням, зчепленим зі статтю**, і для нього спостерігаються суттєві відхилення від менделівських розщеплень.

Уперше таке спадкування досліджено Морганом на прикладі плодової мушки *Drosophila melanogaster* – об'єкта, що відіграв надзвичайно велику роль у розвитку генетики. Актуальним він залишається й досі.

У Х-хромосомі дрозофіли знаходиться один із генів, від яких залежить розвиток червоного забарвлення ока ("нормальні" мухи – мухи **дикого типу** – мають червоні очі). Мутація цього гена перетворює його на мутантний рецесивний алель *white* (скорочене позначення *w*, відповідний алель дикого типу позначають як *w<sup>+</sup>*) – гомозигота за рецесивним алелем характеризується білими очима. Морган поставив два так звані **реципрокні схрещування** (рис. 3.10): самка з червоними очима × самець із білими (пряме схрещування), і навпаки – білоока самка × червоноокий самець (обернене схрещування).



**Рис. 3.10.** Схема реципрокних схрещувань дрозофіл, які несуть рецесивну мутацію *w* (білі очі) і мають відповідний алель дикого типу *w<sup>+</sup>* (червоні очі). Х-хромосому позначено синім кольором, Y-хромосому – зеленим

У прямому схрещуванні нащадки першого покоління всі були червоноокі, тобто виконувався перший закон Менделя. Але в оберненому схрещуванні вже в першому поколінні спостерігалось розщеплення на

червонооких і білооких таким чином, що всі самки були червонооки, а самці – білооки. Така картина спадкування, коли у ознаки батьків передаються нащадкам протилежній статі, називається **крис-крос** (criss-cross).

При схрещуванні особин першого покоління у F2 у прямому схрещуванні було отримано загальне розщеплення 3 : 1, але самки – всі червонооки, самці – червонооки та білооки у співвідношенні 1 : 1. В оберненому схрещуванні відношення 1 : 1 спостерігалось як для самців, так і для самок.

Оскільки наведені розщеплення повністю корелюють із поведінкою статевих хромосом, описаний експеримент став свого часу одним із ключових доказів ролі хромосом у спадковості.

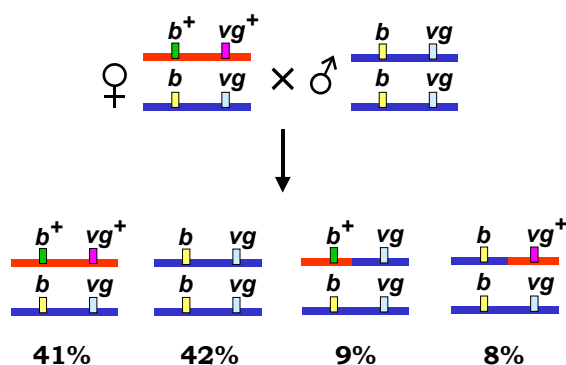
## КРОСИНГОВЕР

### Генетичні наслідки обмінів ділянками між гомологічними хромосомами

Як уже йшлося, при схрещуванні дигетерозиготи  $AaBb$  із гомозиготою  $aabb$  мають утворитися два фенотипові класи з генотипами  $AaBb$  і  $aabb$ , якщо гени знаходяться в одній хромосомі, і чотири класи ( $AaBb$ ,  $aabb$ ,  $Aabb$ ,  $aaBb$ ) – якщо в різних. Проте, розглядаючи випадок зчеплення двох генів, слід узяти до уваги гомологічну рекомбінацію (розділ 1), яка відбувається під час мейозу при гаметогенезі та приводить до обміну гомологічними ділянками між гомологічними хромосомами – кросинговеру. Зрозуміло, що внаслідок кросинговеру в дигетерозиготного батька, крім гамет, які містять комбінації генів  $AB$  і  $ab$ , із певною імовірністю утворюються також гамети з комбінаціями  $Ab$  і  $aB$ . У результаті серед нащадків, крім двох генотипів  $AaBb$  і  $aabb$ , будуть знайдені також генотипи  $Aabb$ ,  $aaBb$ .

Саме таку ситуацію ілюструє рис. 3.11, на якому наведено результати конкретного схрещування дрозофіл, здійсненого групою Моргана. У другій хромосомі дрозофіли присутні два гени, рецесивні алелі яких зумовлюють чорне забарвлення тіла (*black* або  $b$ , алель дикого типу – сіре тіло – позначається як  $b^+$ ) і редуковані крила (*vestigial* або  $vg$ , алель дикого типу –  $vg^+$ ). Аналізуюче схрещування дигетерозиготної самки з гомозиготним самцем приводить до розщеплення нащадків на чотири фенотипові класи. Більшість особин розподілено в рівному співвідношенні

між двома класами: диким типом та мухами з чорним тілом і редукованими крилами – саме тими класами, що очікуються з огляду на зчеплення двох генів. Але 17 % особин представлено (також у рівному співвідношенні) двома фенотиповими класами, які мали б утворитися при незалежному спадкуванні. Ці два класи називають *кросоверними* – як показано на схемі рис. 3.11, вони утворилися внаслідок обміну ділянками між гомологічними хромосомами самки. Оскільки самець є подвійною гомозиготою, обмін ділянками його хромосом у випадку, що розглядається, не мав би генетичних наслідків, але слід зауважити, що в самців дрозофіл кросинговер при сперматогенезі взагалі не відбувається.



**Рис. 3.11.** Схема схрещування самців дрозофіл, гомозиготних за двома рецесивними алелями, які містяться в одній хромосомі, із самками, гетерозиготними за цими генами

Зрозуміло, що для двох хромосомних локусів перенесення внаслідок кросинговеру першого чи другого з них на гомологічну хромосому є рівноймовірними подіями. Відповідно, частоти двох кросоверних класів є практично однаковими (рис. 3.11). Частота кросинговеру (у нашому прикладі вона становить  $9 + 8 = 17\%$ ) визначається як відношення кількості гамет із обмінами між двома локусами до загальної кількості гамет. Звичайно, відносна кількість гамет різних типів визначається за результатами відповідних схрещувань.

Зрозуміло також, що чим більшою є відстань між двома хромосомними локусами, тим більше рекомбінаційних подій у більшій кількості точок може відбутися між ними. Це означає, що частота кросинговеру є мірою фізичної відстані між локусами, і у відсотках кросинговеру можна вимірювати відносну відстань між генами на хромосомі. Саме таким чином протягом довгого часу, а іноді й досі,

здійснювали картування хромосом – установлювали лінійний порядок розміщення генів. Одиницею виміру відстані на таких картах є **сантиморган** (centiMorgan, cM): 1 cM відповідає відстані, що забезпечує частоту кросинговеру в 1 %. Отже, відстань між генами *black* і *vestigial* становить 17 cM.

Відносна відстань між генами, яку можна визначити за частотою кросинговеру, має верхню границю – при відстані 50 cM і більше взагалі неможливо встановити, чи містяться гени в одній хромосомі. Припустимо, що відстань між двома генами дорівнює цій граничній величині – кросинговер відбувається із частотою 50 %. Тоді половина гамет, котрі продукує дигетерозигота (як на рис. 3.11), є кросоверними, – утворюється всього чотири класи гамет по 25 % у кожному. І, відповідно, в аналізуючому схрещуванні буде отримано співвідношення фенотипових класів 1 : 1 : 1 : 1 – таке саме, що й при незалежному спадкуванні генів, розташованих у різних хромосомах.

Власне, у перемішуванні генів між двома гомологічними хромосомами, яке забезпечує (повністю або частково – залежно від фізичної відстані між генами) справедливості третього закону Менделя, і полягає основна біологічна роль кросинговеру. Справді, якщо б не було кросинговеру, то при схрещуванні полігетерозигот гомозигота за багатьма рецесивними алелями одночасно ( $n$  алелів, розташованих в одній хромосомі) утворювалася б в одному випадку із чотирьох (за другим законом Менделя, див. рис. 3.8). Кросинговер забезпечує для багатьох пар генів практично незалежне спадкування, і ймовірність утворення такої гомозиготи зменшується на кілька порядків – до  $1/4^n$  (див. табл. 3.1). З огляду на те, що більшість рецесивних алелів є мутантними, кросинговер, таким чином, різко підвищує частку життєздатних гетерозигот у наступному поколінні. Крім того, викликане кросинговером незалежне спадкування генів зумовлює створення великої кількості їхніх комбінацій у межах популяції, що сприяє, з одного боку, загальній генетичній стабільності популяції, з іншого – забезпечує певний еволюційний потенціал.

Кросинговер відбувається в усіх досліджених видів тварин і рослин, хоча наявність процесу та його частота може залежати від статі: наприклад, у самців дрозофіли, як уже згадувалося, і самок шовкопряда (обидві статі є гетерогаметними) кросинговер не відбувається; у людини рекомбінація здійснюється у два рази частіше при сперматогенезі у чоловіків, ніж при оогенезі у жінок. Частота кросинговеру залежить також від факторів зовнішнього середовища (наприклад, від температури для пойкилотермних організмів) і стадій індивідуального розвитку. Уздовж хромосоми частоти гомологічної

рекомбінації розподілені нерівномірно: залежність частоти від фізичної відстані є лінійною в середніх частинах плечей хромосом, ближче до гетерохроматинових центромерних і теломерних зон кросинговер пригнічується. Існують також певні "гарячі точки", які характеризуються підвищеною частотою рекомбінації. Нарешті, як і будь-який інший біологічний процес, гомологічна рекомбінація контролюється певним набором генів, мутації яких також впливають на частоту кросинговеру.

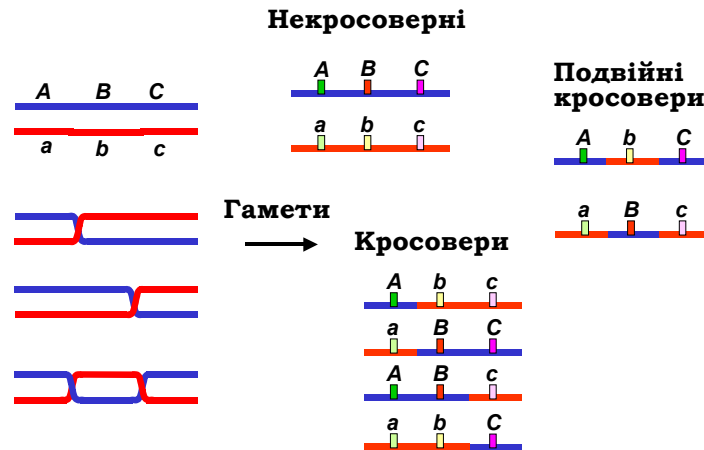
### Подвійний кросинговер

Кросинговер, що спостерігається між двома хромосомними локусами (як на рис. 3.11), є наслідком багатьох рекомбінаційних подій на ділянці, котра розділяє ці два гени: у генетичному аналізі детектується сумарний результат усіх таких подій, його можна формально розглядати як одинарний обмін ділянками. Термін "подвійний кросинговер" (потрійний або вищого порядку) відображає тільки той факт, що аналізуються генетичні наслідки рекомбінаційних подій на ділянці хромосоми, яка має три маркерні локуси (чотири для потрійного кросинговеру і т. д.).

Наприклад, якщо аналізувати рекомбінаційні події між двома локусами  $A$  і  $C$  на рис. 3.12 (припустимо, що ділянка  $B$  не містить маркерного гена, який мав би фенотиповий прояв), то кросинговери на ділянках між  $A$  і  $B$  і між  $A$  і  $C$  будуть сприйматися як одинарний кросинговер десь на ділянці між  $A$  і  $C$ , а подвійне перехрестя, яке повертає локус  $C$  до вихідної хромосоми, узагалі не буде зафіксоване як рекомбінаційна подія. Якщо ж на ділянці  $B$  є ген, який можна аналізувати, то всі зазначені рекомбінаційні події будуть сприйматися окремо: вісім типів гамет, які продукує тригетерозигота на рис. 3.12, можна буде зафіксувати в аналізуючому схрещуванні (з гомозиготою за трьома рецесивними алелями  $abc/abc$ ).

Результати такого гіпотетичного аналізуючого схрещування наведено в табл. 3.11. За частотою кросоверних особин відстань між локусами  $A/a$  і  $B/b$  дорівнює  $15 + 3 = 18$  сМ (подвійний кросинговер також спричинює реципрокне переміщення  $B/b$  до гомологічних хромосом, і, якщо б аналізували лише два локуси –  $A/a$  і  $B/b$ , – то ці подвійні перехрестя давали б внесок у частоту формально одинарного кросинговеру). Аналогічно, відстань між локусами  $B/b$  і  $C/c$  становить  $26 + 3 = 29$  сМ. Отже, відстань між  $A/a$  і  $C/c$  (вона дорівнює сумі

відстаней між  $A/a$  і  $B/b$  та між  $B/b$  і  $C/c$ ) можна розрахувати як суму частот одинарних кросоверів, додавши до неї подвоєну частоту подвійних кросоверів  $15 + 26 + 2 \times 3 = 47$  сМ.



**Рис. 3.12.** Одинарні й подвійні кросинговери на ділянці, що містить три гени, і гамети, які продукує тригетерозигота

**Таблиця 3.11. Розщеплення в аналізуючому схрещуванні тригетерозиготи з рис. 3.12**

Гамети	Генотипи зигот	Частота, %	
Некросоверні: $ABC, abc$	$ABC/abc$	28,5	56
	$abc/abc$	27,5	
Кросинговер між A і B: $Abc, aBC$	$Abc/abc$	7	15
	$aBC/abc$	8	
Кросинговер між B і C: $ABc, abC$	$ABc/abc$	13,5	26
	$abC/abc$	12,5	
Подвійний кросинговер між A і B та B і C: $AbC, aBc$	$AbC/abc$	1,7	3
	$aBc/abc$	1,3	

Слід зауважити, що в разі відсутності локусу  $B/b$  відстань між  $A/a$  і  $C/c$  була б оцінена як  $18 + 29 - 2 \times 3 = 41$  сМ (табл. 3.11): подвійний кросинговер на ділянці між  $A/a$  і  $C/c$  знижує спостережувану частоту кросоверних форм. Узагалі, чим більша відстань між двома генами, тим

вища ймовірність подвійних (і вищого порядку) кросинговерів і тим менш точно можна визначити відстань. І навпаки, відстань визначається тим точніше, чим вона менша. Наприклад, в одному з класичних експериментів групи Моргана, визначалися відносні відстані між трьома генами, розташованими в X-хромосомі дрізофіли: *y* (*yellow* – жовтий колір тіла), *w* (ген *white*, що вже згадувався) та *bi* (*bifid* – вилкоподібні крила). Подвійні кросовери в цьому випадку взагалі не спостерігалися, частота кросоверів між генами *y* і *bi* (4,7 сМ) точно дорівнювала сумі частот кросоверів між генами *y* і *w* (1,2 сМ) та *w* і *bi* (3,5 сМ) – подібні спостереження і стали основою для формулювання концепції щодо лінійного розташування генів на хромосомі.

## Інтерференція

Повертаючись до нашого прикладу на рис. 3.12, треба зазначити, що наведена в табл. 3.11 частота подвійних кросоверів (3 %) суперечить припущенню про повну незалежність між рекомбінантними подіями на сусідніх ділянках хромосом. Якщо б такі події на ділянках між локусами *A/a* і *B/b* та *B/b* і *C/c* були незалежними, то частота подвійних кросоверів (результату двох одночасних подій на цих ділянках) мала б дорівнювати добутку частот відповідних одинарних кросинговерів (за правилом добутку ймовірностей):  $0,18 \times 0,29 = 0,052$  (5,2 %). Зазначимо, що в якості частоти одинарних подій слід брати саме сумарну частоту кросинговеру (наприклад,  $0,15 + 0,03 = 0,18$ ): важливим є те, з якою частотою алелі *B/b* обмінялися місцями (див. табл. 3.11), і неважливо, чи повернулися при цьому алелі *C/c* на "своє місце" внаслідок подвійного кросинговеру.

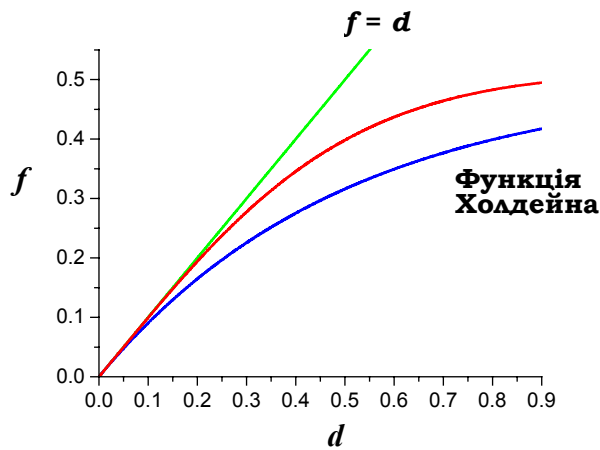
Отже, обмін між локусами на одній ділянці впливає на такий обмін на сусідніх ділянках – явище, яке називають **інтерференцією**. У нашому прикладі (і це типова ситуація) інтерференція є позитивною – кросинговери на сусідніх ділянках заважають один одному. Зрозуміло, що інтерференція є тим суттєвішою, чим меншою є відстань між двома ділянками. Іноді спостерігається також негативна інтерференція, коли відбувається взаємна стимуляція рекомбінаційного процесу на двох або більше сусідніх ділянках. Проте насправді негативна інтерференція відображає не підвищення частоти подвійних кросинговерів, а є наслідком конверсії гена (див. нижче).

Для оцінки відповідності між очікуваною на підставі незалежності окремих рекомбінаційних подій частотою подвійного кросинговеру  $h_0$  та частотою  $h$ , що спостерігається, використовують **коефіцієнт коінцеденції**



$C = h/h_0$ . Тобто, у нашому прикладі  $C = 0,030/0,052 = 0,58$ , величина інтерференції становить  $I = 1 - C = 0,42$ .

З наведених оцінок зрозуміло, що інтерференція частково компенсує вплив подвійного кросинговеру на визначення відстані між двома генами. Справді, якщо б дві рекомбінаційні події були незалежними, і частота подвійного кросинговеру була б 5,2 %, то частота кросинговеру між локусами  $A/a$  і  $C/c$  (оцінена у відсутності  $B/b$ ) становила б  $18 + 29 - 2 \times 5,2 = 36,6$  сМ.



**Рис. 3.13.** Реальна залежність частоти кросинговеру між двома локусами  $f$  від відстані  $d$  (червона крива) порівняно з двома ідеалізованими залежностями

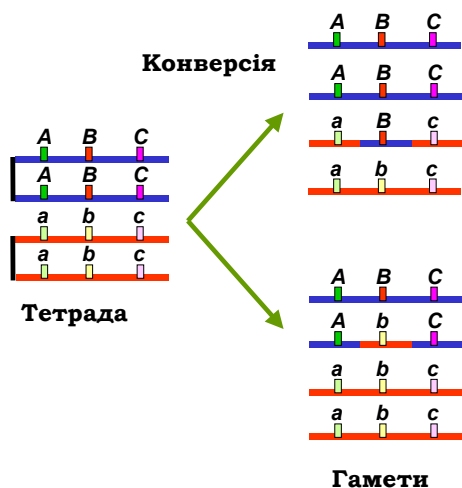
Розрахована частота кросинговеру  $f$  між двома локусами як результат одинарних і множинних перехресть у припущенні про незалежність окремих рекомбінаційних подій описується функцією Холдейна (John Haldane):

$$f = \frac{1}{2}[1 - \exp(-2d)],$$

де  $d$  – фізична відстань між двома локусами в одиницях імовірності (змінюється від 0 до 1). На малих відстанях  $\exp(-2d) \approx 1 - 2d$  і  $f \approx d$  (частота кросинговеру є прямо пропорційною фізичній відстані, практично це справедливо для відстаней до  $\sim 10$  сМ), на великих відстанях  $f$  наближається до  $1/2$  – максимально можливої частоти кросинговеру. Унаслідок інтерференції реальна залежність частоти від фізичної відстані займає проміжне положення між функцією Холдейна та прямою  $f = d$  (рис. 3.13).

## Конверсія гена

Явище конверсії гена має тісний зв'язок із процесом гомологічної рекомбінації – незалежно від того, чи відбувся обмін ділянками між гомологічними хромосомами (див. розділ 1). Як показано на рис. 3.14, унаслідок конверсії, що відбулася з перетворенням алеля *B* на *b* або навпаки, гетерозигота *Bb* може продукувати гамети двох типів у співвідношенні 3 : 1. У генетичному аналізі за допомогою схрещувань такі гамети можуть формально розглядатися як подвійні кросовери (порівн. рис. 3.12), що характеризуються негативною інтерференцією – висока частота "подвійних кросоверів" за відсутності кросоверних форм між локусами *A/a* і *C/c*.



**Рис. 3.14.** Тетрада у профазі I мейозу та два варіанти набору гамет, які вона продукує у випадку конверсії гена *B/b* між двома гомологічними хроматидами

Слід відмітити, що конверсія гена створює для диплоїдних організмів можливість відновлення генетичної інформації, яка виявилася пошкодженою внаслідок мутації в одній із двох гомологічних хромосом (див. також розділ 5).

## Нерівний кросинговер

Гомологічна рекомбінація – досить точний процес, який відбувається між гомологічними ділянками ДНК (див. розділ 1). У результаті, зазвичай при кросинговері, як і в усіх попередніх прикладах, відбувається обмін однаковими за довжиною ділянками, що містять однакову кількість генів.

Але іноді спостерігається рекомбінація між гомологічними ділянками, які займають різне положення на хромосомі, унаслідок чого здійснюється обмін неоднаковими за довжиною ділянками – нерівний кросинговер. Як показано на рис. 3.15, такий обмін зумовлює дуплікацію ділянки в одній хромосомі та делецію – в іншій. Таким чином, нерівний кросинговер є однією з причин хромосомних перебудов (див. розділ 4).

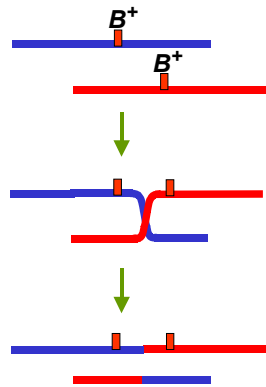


Рис. 3.15. Схема нерівного кросинговеру

Саме така ситуація спостерігається для хромосомного локусу, розташованого в X-ромосомі дрозофіли, який впливає на кількість фасеток ока: мухи дикого типу містять один такий локус (позначається як  $B^+$ ), дуплікація локусу (яка позначається як мутація  $Var$  або  $V$ ) приводить до зниження кількості фасеток. Повторення нерівного кросинговеру між одинарним і дуплікованим локусами веде до триплікації – мутація  $BB$ , очі мають ще меншу кількість фасеток.

## Мітотичний кросинговер

Усі розглянуті приклади стосуються кросинговеру, що здійснюється під час мейозу при гаметогенезі. Але кросинговер може також відбуватися в соматичних клітинах – під час мітозу на стадії утворення чотирьох хроматид. Зокрема, такі випадки описано для дрозофіли. Так, самка, гетерозиготна за алелями локусу  $w$  ( $w^{\infty}$  – очі кольору корала та  $w$  – білі очі) має очі рожевого кольору. Якщо личинки, що розвиваються, піддати рентгенівському опроміненню, то під час мітозу може відбутися обмін ділянками між несестринськими гомологічними хроматидами. У результаті в одній із дочірніх клітин опиняться дві хромосоми з алелем  $w$ , а в іншій – дві з алелем  $w^{\infty}$ . Перша клітина при наступному роз-

множенні дасть початок розвитку клону ідентичних клітин – білої плями на тлі рожевого ока, друга – зумовить появу темно-червоної плями.

Мітотичний кросинговер є наслідком точної репарації дволанцюгових розривів під час реплікації за механізмом гомологічної рекомбінації (див. рис. 1.25). Після завершення процесу репарації та розділення структури Холідея, яка утворилася між двома дочірніми молекулами ДНК, ці молекули можуть обмінятися своїми ділянками. Для одноклітинних еукаріотів мітотичний кросинговер, напевно, є важливим засобом забезпечити рекомбінацію генетичного матеріалу при вегетативному розмноженні.

### Контрольні запитання і завдання

1. Сформулюйте три закони Менделя та поясніть їх, виходячи з молекулярних і цитологічних механізмів спадковості.
2. Що таке генотип, фенотип, фенотиповий радикал, гомозигота, гетерозигота?
3. Яким чином зазвичай виникають рецесивні алелі?
4. Яка різниця між повним домінуванням, неповним домінуванням і кодомінуванням?
5. Розрахуйте розщеплення від схрещування дигетерозигот  $AaBb$  за умови неповного домінування для гена  $Aa$ .
6. Розрахуйте значення  $\chi^2$  для випадку випадіння монети 25 разів орлом і 32 рази – решкою. Чи виправдовується нульова гіпотеза?
7. Дайте визначення комплементарності, епістазу та полімерії при взаємодії неалельних генів.
8. Чим відрізняються підходи до вивчення кількісних і якісних ознак?
9. Опишіть статистичні параметри, за допомогою яких характеризують ступінь прояву кількісних ознак? Поясніть зміст коефіцієнту спадковості.
10. Скільки груп зчеплення генів існує у дрозофілі?
11. Запишіть схему та результати схрещування самки дрозофіли з жовтим тілом (зчеплена зі статтю рецесивна мутація  $y$ ) із самцем дикого типу (чорне тіло,  $y^+$ ). Яке розщеплення буде реалізовано від схрещування нащадків ( $y$  другому поколінні)? Проаналізуйте також відповідне обернене схрещування.
12. Як визначається частота кросинговеру? В яких одиницях вимірюють відстань між генами на основі встановлення цієї частоти?
13. За якої умови є можливим дослідження подвійного кросинговеру?
14. Що таке інтерференція та який вплив вона має на частоту кросинговеру? Як визначається коефіцієнт коінциденції?
15. Що таке конверсія гена й чому вона відбувається?
16. З яких причин відбувається нерівний кросинговер і які наслідки він має для структури гомологічних хромосом?



## РОЗДІЛ 4

# Мінливість генетичного матеріалу

Однією із загальних властивостей біологічних систем є їхня консервативність – здатність відновлювати генетичний матеріал і передавати його нащадкам у майже незмінному вигляді. Молекулярна машинерія реплікації та репарації ДНК (розділ 1) забезпечує надзвичайно високу точність відновлення генетичної інформації – рівень помилок становить  $\sim 10^{-10}$  нуклеотидних заміни, тобто менше однієї заміни на еукаріотичний геном при одному подвоєнні ДНК. Зрозуміло, що *абсолютна* точність відтворення ДНК є неможливою, і мінливість генетичного матеріалу є також важливим аспектом його існування.

Мінливість можна визначити як здатність генетичного апарату до змін, які зумовляють фенотипові відмінності між особинами одного виду в ряду поколінь або в межах одного покоління. Мінливість може бути спричинена змінами геному (*спадкова мінливість*) або виникати в результаті зміни експресії генів за дії факторів навколишнього середовища протягом індивідуального розвитку (*неспадкова мінливість*).

Спадкова мінливість може бути зумовлена утворенням або нових варіантів послідовностей нуклеотидів ДНК (*мутаційна мінливість*), або нових комбінацій уже існуючих послідовностей, які виникають за рахунок рекомбінації та випадкового розподілу хромосом у мейозі (*комбінативна мінливість*). Механізми й наслідки комбінативної мінливості описано в розділах 1 і 3, а в цьому розділі увагу буде зосереджено саме на мутаційній мінливості. Слід розрізняти також власне мутаційну мінливість, яка приводить до випадкових змін генетичних програм (саме про таку мінливість ітиметься нижче), і запрограмовані зміни генетичного матеріалу в певних геномних зонах або іноді в масштабі цілого геному, приклади яких розглядатимуться в розділах 5 і 6.

**Мутації** – це незапрограмовані, випадкові та стабільні (такі, що залишаються "назавжди" та спадкуються) зміни в структурі ДНК, які з'являються або в результаті дії пошкоджуючих чинників, або як результат помилок систем реплікації, репарації чи рекомбінації. Мутація, яка виникла в соматичних клітинах (*соматична мутація*), спадкується тільки в ряду клітинних поколінь, а та, що в статевих (*генеративна мутація*) – передається наступним поколінням нащадків. Крім мутацій, котрі виникають у ядерному геномі (*ядерні мутації*), зміни можуть відбуватися також у ДНК мітохондрій і хлоропластів – це *цитоплазматичні мутації*.

## ТИПИ МУТАЦІЙ

Мутаційні зміни можуть охоплювати декілька нуклеотидів молекули ДНК, великі за довжиною послідовності та цілі набори хромосом. Відповідно, розрізняють точкові, хромосомні та геномні мутації.

Зміну послідовності ДНК, обмежену лише одним чи декількома нуклеотидами, називають **точковою мутацією**. Така мутація може являти собою заміну одного нуклеотиду на інший. Заміна, в результаті якої замість пурину (А, G) включається піримідин (Т, С) або навпаки називається *трансверсією*. Заміна пурину на пурин (А↔G) і, відповідно, піримідину на піримідин (Т↔С), називається *транзицією*. Транзиції та трансверсії, які відбулися в кодуючій частині гена, можуть зумовити заміну амінокислоти в складі білка – у такому випадку мутацію називають *міссенс-мутацією* (missense), або *несинонімічною* нуклеотидною заміною. Унаслідок виродженості генетичного коду (див. розділ 2) заміна нуклеотиду може не змінити змісту кодона. Така нуклеотидна заміна називається *сеймсенс-мутацією* (samesense), або *синонімічною* мутацією. При утворенні в результаті трансверсії чи транзиції стоп-кодона (беззмістовного щодо амінокислот) нуклеотидну заміну називають *нонсенс-мутацією* (nonsense).

Іншими двома типами точкових мутацій є вставка (*інсерція*) або випадіння (*делеція*) одного чи декількох нуклеотидів. Інсерція або делеція не кратної трьом кількості нуклеотидів у кодуючій частині гена приводить до зсуву рамки зчитування. Якщо вставка повторює послідовність, яка присутня поблизу місця інсерції, то її називають *дуплікацією*, а багаторазовий повтор декількох нуклеотидів – *експансією повторів*. Усі розглянуті типи точкових мутацій схематично зображено на рис. 4.1.

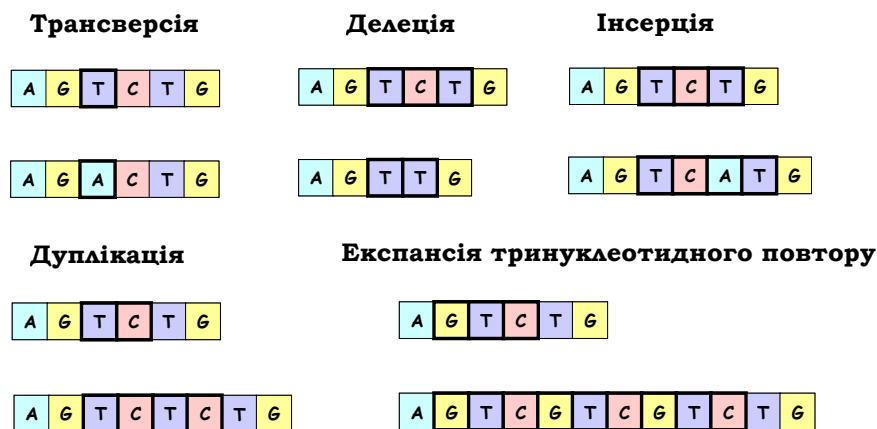


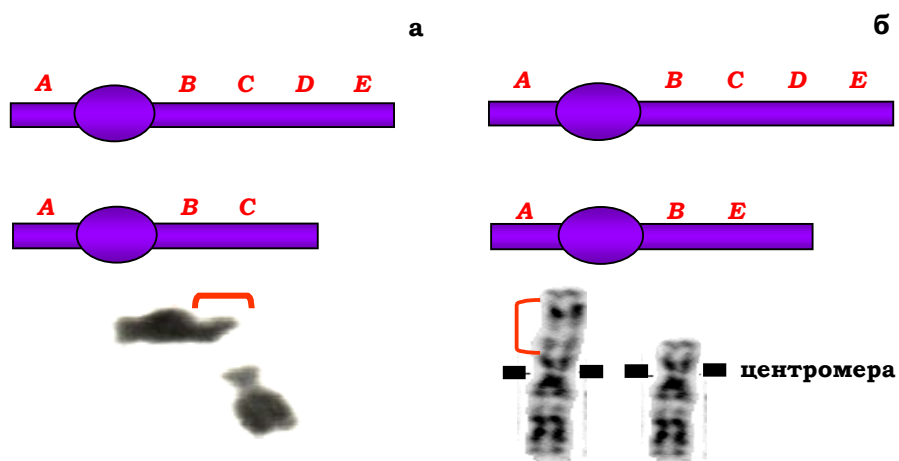
Рис. 4.1. Типи точкових мутацій

**Хромосомні мутації** (хромосомні перебудови або *хромосомні аберації*) – це порушення в нормальній морфології хромосом, спостережувані на стадії метафази або телофази мітозу, коли можна розрізняти окремі хромосоми. Отже, хромосомними мутаціями є такі великомасштабні зміни послідовностей ДНК (від 1 млн пар основ і більше), які можна ідентифікувати за допомогою оптичного мікроскопа. Здебільшого під хромосомними абераціями розуміють будь-які порушення морфології хромосом – у тому числі такі, що унеможливають наступний поділ клітини або взагалі є несумісними з життям і тому не спадкуються. Хромосомні мутації – це частина хромосомних аберацій, які успадковуються дочірніми клітинами.

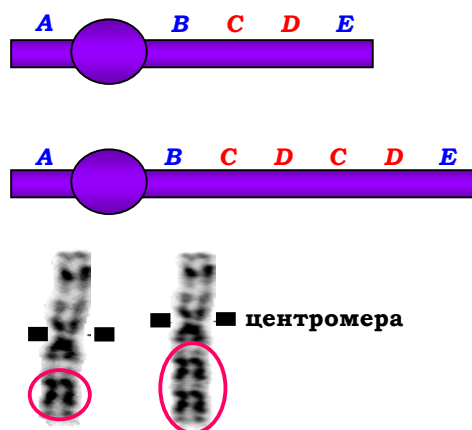
Хромосомні перебудови можуть бути внутрішньохромосомними (відбуваються в межах однієї хромосоми) і міжхромосомними (перебудови, що охоплюють дві різні хромосоми).

Одним із типів внутрішньохромосомних перебудов є *делеції*. Розрізняють термінальні делеції (*дефішенсі* – втрати кінцевих ділянок хромосом) та інтерстиціальні – втрати внутрішніх частин хромосом (рис. 4.2). До внутрішньохромосомних перебудов також належать *дуплікації* (двократні повтори певного сегменту хромосоми, рис. 4.3), *ампліфікації* (багаторазові повтори сегмента хромосоми) та *інверсії* – повороти ділянки хромосоми на 180°. Залежно від того, залучає інверсія область центромери чи ні, розрізняють відповідно перичентричні та парацентричні інверсії. Перші можуть значно змінювати морфологію хромосоми, а другі не приводять до зміни морфологічного типу

хромосоми й детектуються лише за допомогою методів диференційного забарвлення – методів, які дозволяють візуалізувати певні більш або менш інтенсивно забарвлені ділянки, розподіл яких є специфічною ознакою кожної хромосоми (рис. 4.4).

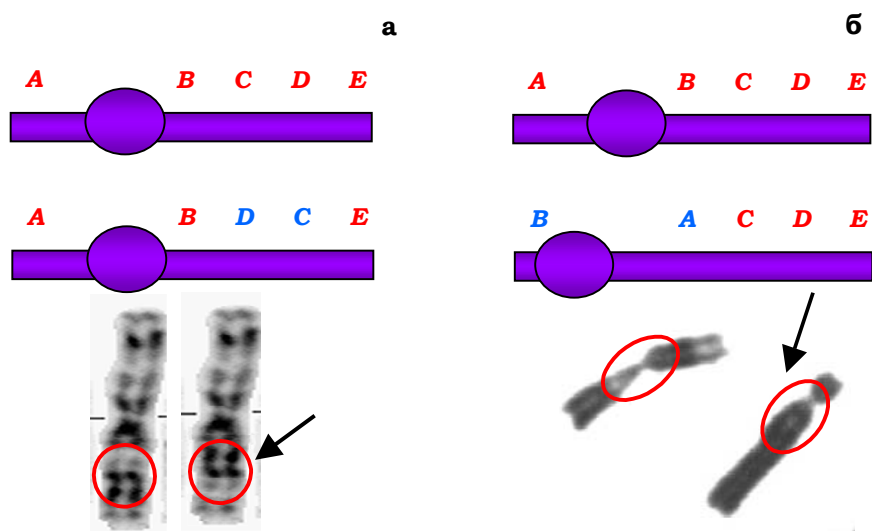


**Рис. 4.2.** Схеми й фото термінальної (а) та інтерстиціальної (б) делецій. Овали на схемах позначають центромери. На фото наведено хромосоми людини, делетовані ділянки вказано квадратними дужками



**Рис. 4.3.** Схема та фото дуплікації. На фото – хромосоми людини, дуплікований фрагмент обведено червоним

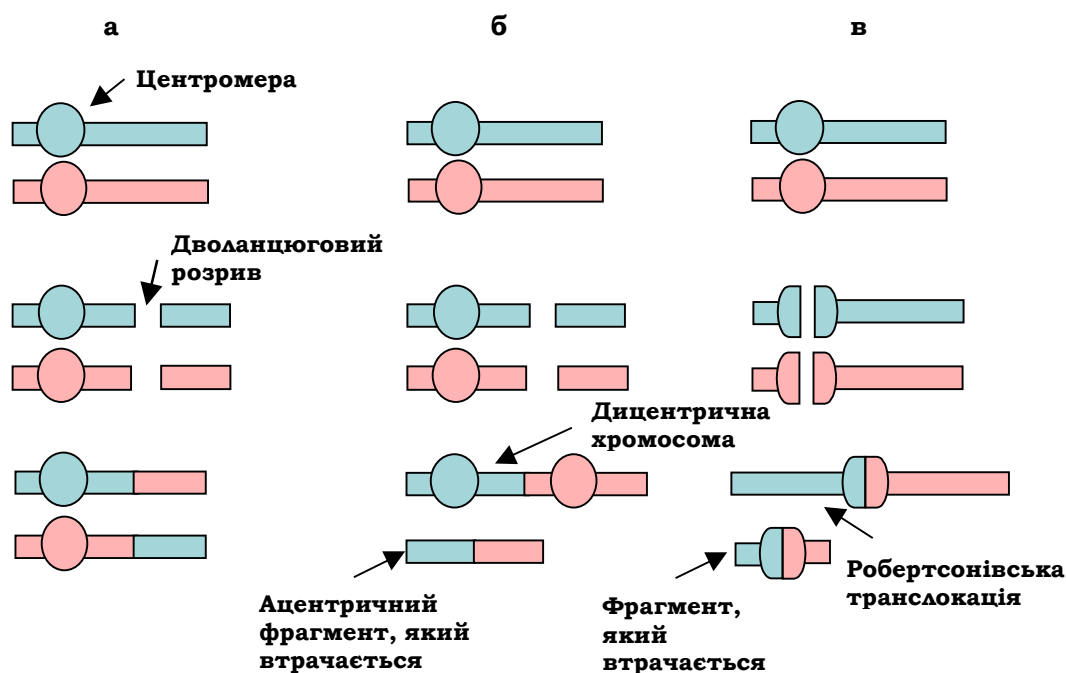




**Рис. 4.4.** Схема та фото парацентричної (а) і перичентричної (б) інверсій.  
На фото – хромосоми людини, ділянки інверсій обведено червоним,  
хромосоми з інверсіями вказано стрілкою

До міжхромосомних перебудов відносять *інсерції* та *транслокації*. Інсерція – це вставка ділянки однієї хромосоми всередину іншої (маються на увазі *негомологічні* хромосоми), яка супроводжується делецією в першій хромосомі.

Обмін ділянками між негомологічними хромосомами називається *транслокацією*. Розрізняють *реципрокні* та *нереципрокні* транслокації. Взаємний обмін ділянками двох негомологічних хромосом – це реципрокні транслокації (рис. 4.5). При цьому можуть об'єднатися дві центромерні області різних хромосом, тоді обмін веде до утворення *дицентричної* хромосоми (рис. 4.5, б). Така хромосома є прикладом перебудови, що не спадкується, – це хромосомна аберація, яка не є мутацією. Різновидом реципрокних транслокацій є *робертсонівські транслокації* – об'єднання двох акроцентричних хромосом (після дволанцюгового розриву в центромерних зонах) у мета- чи субметацентричну (рис. 4.5, в). При цьому кількість хромосом зменшується на одну: тільки одна половина кожної центромери містить елементи послідовності, важливі для утворення кінетохору під час мітозу, відповідно, фрагмент, що утворився шляхом з'єднання інших половин, втрачається.



**Рис. 4.5.** Реципрокні транслокації: без утворення дицентричної хромосоми (а); з утворенням дицентричної хромосоми (б); робертсонівська транслокація (в)

При нерезипрочних транслокаціях, на відміну від інсерцій, ділянка однієї хромосоми приєднується до кінця іншої (за умови порушення теломерної зони цієї іншої хромосоми).

Три типи **геномних мутацій** – гаплоїдія, поліплоїдія та анеуплоїдія – широко розповсюджені у тваринному й рослинному світі. Гаплоїдія – це зменшення вдвічі диплоїдного набору хромосом. Зворотним явищем є поліплоїдія – кратне гаплоїдному збільшення кількості хромосом. Клітина з трьома гаплоїдними наборами хромосом називається триплоїдною, чотирма – тетраплоїдною і т. д. Поліплоїдія може бути зумовлена або кратним збільшенням власних для даного виду хромосом (*автополіплоїдія*), або виникати за рахунок гібридизації, тобто об'єднання геномів різних видів (*аллополіплоїдія*).

*Анеуплоїдія* – це не кратна гаплоїдному набору зміна кількості хромосом. Найчастіше вона виявляється у збільшенні або зменшенні кількості копій однієї хромосоми, рідше – декількох. Анеуплоїдна клі-

тина (чи організм), яка містить одну додаткову хромосому, має назву *трисомік*. Утрата однієї хромосоми приводить до *моносомії*, двох гомологічних хромосом – до *нулісомії*.

## МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ МУТАЦІЙНОЇ МІНЛИВОСТІ

Джерелом мутаційних змін є перебудови послідовності нуклеотидів ДНК, які виникають у результаті хімічних модифікацій молекули, таутомеризації азотистих основ, переміщення мобільних елементів (див. розділ 6), інтеграції чужорідної, (наприклад, вірусної) ДНК і помилок під час реплікації та репарації. Пошкодження ДНК не є власне мутаціями, а лише *передмутаційними* змінами, які можуть бути або виправлені системами репарації, або зафіксовані в ДНК у вигляді мутацій. Тобто мутація є такою зміною послідовності ДНК, яка залишилась після репарації та наступної чергової реплікації.

Пошкодження ДНК можуть виникати внаслідок як впливу продуктів нормальної життєдіяльності клітини, так і дії зовнішніх факторів середовища. Ендогенні та екзогенні фактори, здатні пошкоджувати ДНК, називають *мутагенами*, а процес утворення мутацій – *мутагенезом*. Мутагенез, який відбувається у природних умовах, конкретні причини якого, як правило, важко ідентифікувати, – це *спонтанний мутагенез*. Якщо мутації викликаються штучно (при використанні мутагенних факторів у експериментах), кажуть про *індукований мутагенез*. Молекулярні механізми виникнення пошкоджень ДНК і фіксації їх у вигляді мутацій принципово не відрізняються для обох типів мутагенезу.

### Пошкодження ДНК, що виникають у процесі життєдіяльності клітини

Поява передмутаційних змін генетичного матеріалу в клітині унаслідок метаболічних процесів є нормальним явищем. Кількість спонтанних пошкоджень ДНК, що виникають у одній клітині людини за добу, оцінюється в  $10^4$ – $10^6$ . Переважна частина цих пошкоджень у нормі видаляється системами репарації, і тільки невелика кількість залишається у вигляді мутації.

Найпоширенішими передмутаційними пошкодженнями ДНК є втрати азотистих основ (утворення апуринових або апіримідинових сайтів), хімічні модифікації основ, ковалентні зшивання ДНК-ДНК і ДНК-білок, одно- та дволанцюгові розриви цукрофосфатного остова ДНК. Ці пошкодження виникають здебільшого в реакціях гідролізу (хімічні реакції з водою), реакціях з активними радикалами оксигену та пероксидними радикалами, а також унаслідок метилування (алкілування) основ.

*Гідроліз глікозидного зв'язку* між азотистою основою та дезоксирибозою (див. рис. 1.1) приводить до видалення азотистої основи й появи в цьому місці апуринового чи апіримідинового сайту (АП-сайту). За добу в клітинній ДНК утворюється близько 10 тис. таких АП-сайтів. Неправильна репарація цих пошкоджень може зумовити нуклеотидні заміни (транзиції чи трансверсії). Відсутність репарації стане причиною того, що під час наступного реплікаційного циклу напроти АП-сайту у складі матричного ланцюга в ланцюзі, що синтезується, буде вставлено довільний нуклеотид – з імовірністю 3/4 він виявиться не тим, що мав би стояти в цьому місці, тобто виникне точкова мутація типу нуклеотидної заміни. Крім того, ДНК-полімеразний комплекс може "проскочити" АП-сайт у складі матриці, наслідком чого буде делеція нуклеотиду в складі ланцюга, що синтезується.

Нерепаровані АП-сайти можуть також перетворюватися на одноланцюгові розриви. Накопичення одноланцюгових розривів, у свою чергу, приводить до розривів дволанцюгових (коли два одноланцюгові розриви розташовані на невеликій відстані та на різних ланцюгах), що може бути причиною утворення різних типів хромосомних аберацій. Одноланцюгові розриви ДНК можуть виникати також у результаті прямого гідролізу фосфодієфірного зв'язку.

*При гідролізі екзоциклічних аміногруп азотистих основ* виникає дезамінування основ (до 500 пошкоджень на клітину за добу). Так, у результаті дезамінування цитозин перетворюється на урацил (див. рис. 1.2), а 5-метилцитозин – на тимін. Обидві основи, що з'явилися внаслідок таких перетворень, комплементарні аденіну, а отже, у разі відсутності репарації дезамінування може зумовити нуклеотидну заміну (стабільну заміну пари GC на AT-пару при реплікації).

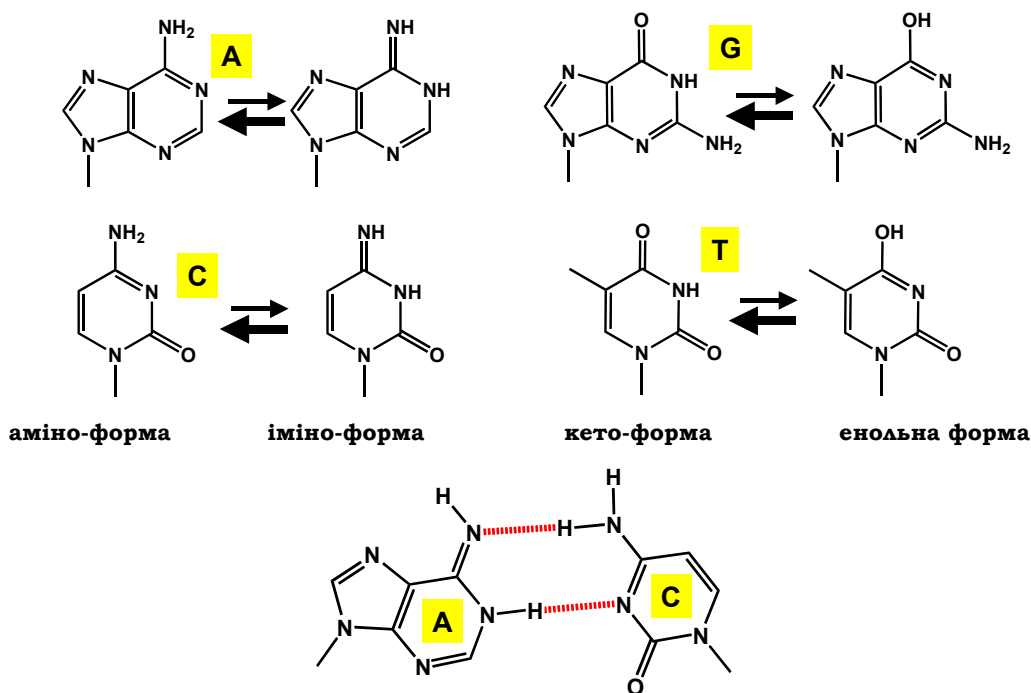
*Оксидативні пошкодження ДНК* виникають в результаті хімічних реакцій дезоксирибози та азотистих основ із вільними радикалами оксигену або пероксидними радикалами. Джерелом радикалів є процеси дихання клітини. Найсуттєвіші оксидативні пошкодження ДНК –

це утворення 8-оксигуаніну (приєднання кисню до восьмого атома кільця, див. рис. 1.2), комплементарного тиміну, і 2-оксиаденіну, комплементарного цитозину. Продуктами реакцій з вільними радикалами є також одноланцюгові розриви та зшивання ДНК-ДНК або ДНК-білок, які можуть бути причинами хромосомних аберацій.

Ще одним механізмом виникнення передмутаційних пошкоджень ДНК є *метилування основ* по атомах, які в нормі не піддаються цій модифікації. Помилки метилування викликають появу таких суттєвих пошкоджень ДНК: утворення 7-метилгуаніну, 3-метиладеніну та O<sup>6</sup>-метиладеніну. 7-Метилгуанін і 3-метиладенін перешкоджають нормальному проходженню реплікації, унаслідок чого відбувається утворення одноланцюгових прогалин (ділянок недореплікації) напроти модифікованих нуклеотидів. O<sup>6</sup>-метиладенін є комплементарним цитозину й може бути причиною транзицій.

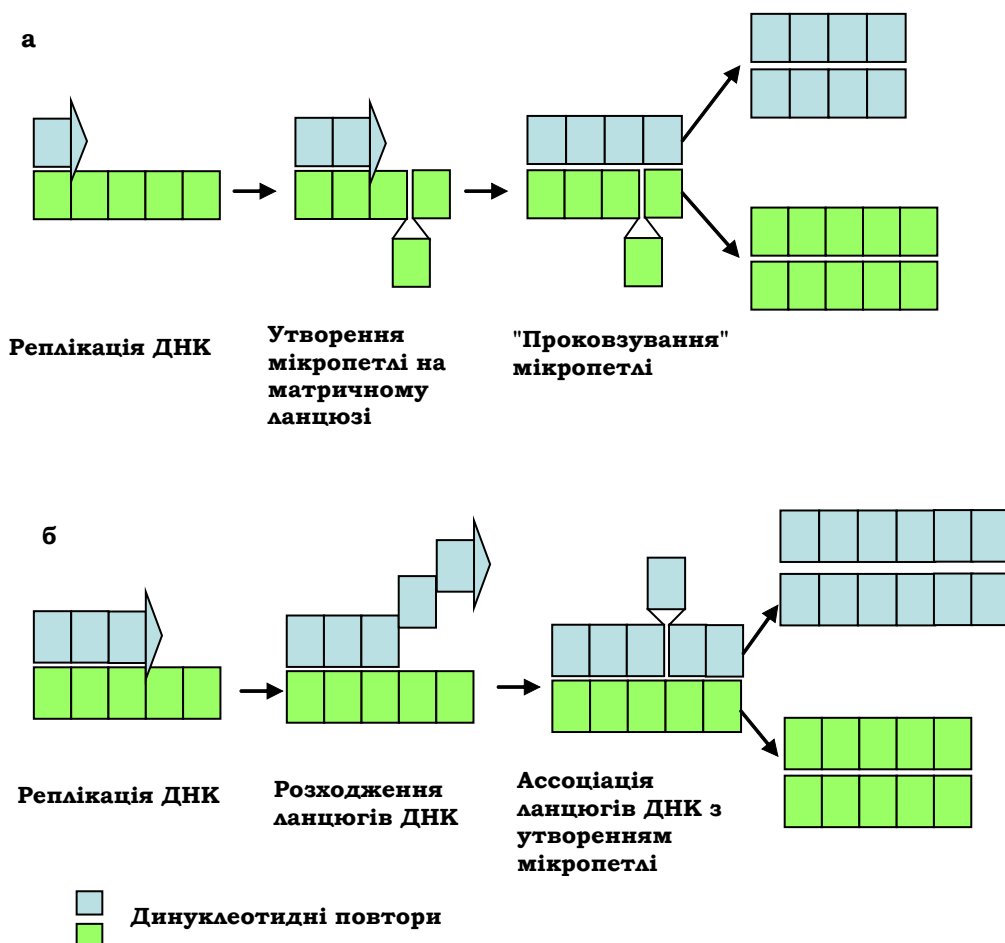
## Помилки реплікації та репарації

Помилкове включення нуклеотидів під час реплікації є досить вагомою причиною виникнення точкових мутацій і хромосомних перебудов. Утворення некомплементарних пар нуклеотидів (місметчів) під час реплікації відбувається з частотою 1 на 10 тис. нуклеотидних пар. Основною причиною помилкового приєднання нуклеотидів під час реплікації є *таутомерія* азотистих основ. Спонтанні перебудови електронних систем гетероциклів приводять до існування кожної основи у вигляді двох таутомерних форм: аміно- чи іміноформи для А, С; енольної чи кетоформи для G, T (рис. 4.6). Рівновага зсунута в бік аміно- та кетоформ, які й присутні у складі подвійних спіралей (див. також рис. 1.2) і для яких реалізуються правила комплементарності А-Т, G-С. Але спарювання основ підпорядковується іншим правилам для мінорних таутомерних форм: наприклад, іміноформа А та аміноформа С утворюють між собою два водневі зв'язки (рис. 4.6), що може відбутися під час впізнання матриці черговим нуклеотидом при реплікації. Аналогічно, енольна форма тиміну є комплементарною гуаніну. У результаті швидкого повернення до мажорної таутомерної форми, у складі ДНК залишиться некомплементарна пара нуклеотидів. Якщо система редагування помилок під час синтезу ДНК і потім система репарації місметчів (див. розділ 1) не спрацює, у наступному реплікативному циклі така некомплементарна пара зафіксується у вигляді мутації в одній із двох дочірніх молекул.



**Рис. 4.6.** Таутомерні форми азотистих основ, унизу – комплементарна пара іміноформи аденіну та аміноформи цитозину

На ділянках мікросателітних тандемних повторів (повторів елементів послідовності довжиною 1–15 пар основ, розділ б) спостерігається специфічна помилка ДНК-полімеразного комплексу – проковзування (slippage) ДНК-полімерази. На ділянці матричного або новосинтезованого ланцюгів ДНК інколи відбувається утворення мікропетель або мікрошпильок за рахунок внутрішньоланцюгових комплементарних взаємодій. У випадку появи мікропетлі на матричному ланцюзі ДНК дочірній ланцюг буде коротший на кілька нуклеотидів, і отже, після наступного раунду реплікації буде спостерігатися делеція (рис. 4.7, а). Якщо така мікропетля утворюється в дочірньому ланцюзі, кількість нуклеотидів у ньому збільшиться, що приведе до вставки одного або декількох повторів (рис. 4.7, б).



**Рис. 4.7.** Зменшення (а) і збільшення (б) кількості повторів при утворенні мікропетлі в ДНК під час реплікації.

Мутації виникають не тільки внаслідок недостатньо ефективною репарації – деякі процеси репарації ДНК самі є причинами мутацій. Насамперед це стосується неточних систем репарації: SOS-репарації, яка зумовлює неточний синтез ДНК у разі великої кількості пошкоджень, що викликає ще більше зростання мутацій, і системи репарації дволанцюгових розривів за рахунок негомологічного з'єднання кінців NHEJ (див. розділ 1). Саме NHEJ вважається основною причиною реалізації хромосомних перебудов, оскільки забезпечує з'єднання кінців будь-яких молекул ДНК.

## Механізми виникнення поліплоїдій і анеуплоїдій

Кількісні аномалії хромосом пов'язані з порушенням процесів, які забезпечують розходження хромосом (хроматид) у мітозі та мейозі. Причиною помилок розподілу хромосом можуть бути порушення контролю клітинного поділу, дефекти в центромерній області хромосом і пошкодження мікротрубочок веретена поділу. Залежно від того, як саме виникла аномалія в кількості хромосом (у результаті мітотичного чи мейотичного поділу), розрізняють соматичну й мейотичну поліплоїдію та анеуплоїдію.

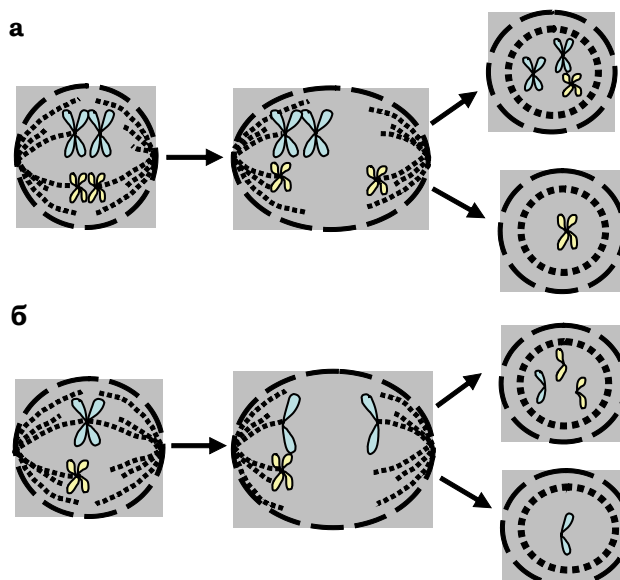
Одним із механізмів виникнення автополіплоїдних клітин є явище ендореplikації ДНК: клітина проходить декілька циклів репликації без подальшого виходу в мітоз. Інший механізм – порушення мікротрубочок веретена поділу, що приводить до нерозходження хромосом або хроматид. Поліплоїдію можна викликати і штучним шляхом, застосовуючи речовини – блокатори мітозу (колхіцин, колцемід та ін.). Ці сполуки та їхні аналоги інгібують утворення мікротрубочок веретена поділу, і хромосоми після репликації не розходяться до полюсів клітини. Крім того, автополіплоїдні клітини можна отримати шляхом блокування не власне поділу ядра (каріокінезу), а поділу цитоплазми (цитокінезу). Два диплоїдних ядра, залишаючись в одній цитоплазмі, при об'єднанні створюють клітину з тетраплоїдним набором хромосом.

Алополіплоїди утворюються штучним шляхом за рахунок міжвидової гібридизації.

Усі типи анеуплоїдій є результатом нерозходження окремих хромосом (чи хроматид) при поділі клітини – мітозі чи мейозі (рис. 4.8). Найчастіше нерозходження хромосом пов'язане з дефектом центромерної ділянки: така хромосома не прикріплюється до веретена поділу й опиняється в одній дочірній клітині разом зі своїм гомологом, інша дочірня клітина виявляється позбавленою однієї хромосоми. Отже, усі форми анеуплоїдій (моносомія і трисомія, нулісомія і трисомія) можуть бути результатом одного циклу неправильного розподілу хромосом. При мейотичному поділі нерозходження хромосом може відбуватися як у першому, так і в другому поділі.

Поліплоїдні та анеуплоїдні клітини характеризуються порушенням процесів мейозу. Так, при утворенні гамет у поліплоїдів замість бівалентів (див. розділ 1) можуть утворюватися три-, тетра- та уніваленти, що порушує сегрегацію хромосом і викликає появу нових геномних мутацій. Крім того, дисбаланс у кількості хромосом приводить до аномальних мітотичних поділів.





**Рис. 4.8.** Схема утворення анеуплоїдних клітин при першому мейотичному поділі (а) і при другому мейотичному поділі чи мітозі (б)

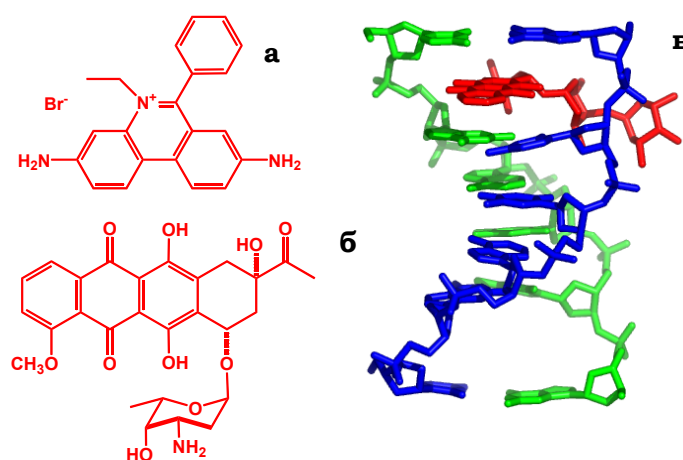
## Індукція мутацій мутагенними факторами

За своєю природою мутагени поділяють на фізичні, хімічні та біологічні. Коли мутагенний фактор безпосередньо взаємодіє з ДНК і викликає пошкодження, говорять про пряму дію мутагену. Мутаген може не взаємодіяти з ДНК, але запускати каскад процесів, які в кінцевому наслідку приводять до появи пошкоджень (або до інгібування їхньої репарації). У цьому випадку йдеться про опосередковану дію мутагену. Більшість мутагенних факторів, незалежно від їхньої природи, мають як пряму, так і опосередковану дію. Майже всі мутагени є одночасно й *канцерогенами*, тобто вони здатні стимулювати розвиток пухлин.

**Хімічні мутагени** за своєю структурою та механізмами дії являють собою дуже різноманітну групу сполук. Хімічні мутагени можуть бути нормальними метаболітами клітини – *аутомутагени*, або потрапляти в організм (клітину) ззовні – *ксенобіотики*. Найчастіше хімічні мутагени класифікують за хімічною структурою або за типом реакції з ДНК.

Деякі хімічні мутагени є аналогами азотистих основ. Вони за структурою подібні до нормальних основ і можуть використовуватися ферментами, які забезпечують процеси синтезу нуклеїнових кислот. Наприклад, 5-бромурацил є аналогом тиміну і, відповідно, може включатися замість нього в ДНК. Проте, на відміну від тиміну, 5-бромурацил значно легше піддається таутомеризації: у результаті в наступному реплікаційному циклі напроти 5-бромурацилу до ДНК часто включається гуанін.

Ароматичні сполуки, здатні до інтеркаляції (вбудовування) між сусідніми парами основ подвійної спіралі ДНК, належать до *інтеркалюючих* мутагенних чинників. Прикладами є бромистий етидій і дауноміцин (рис. 4.9, а, б), профлавін, актиноміцин D тощо – планарні молекули, які за розміром наближаються до пурин-піримідинової пари. Вбудовуючись у подвійну спіраль, інтеркалятор удвічі збільшує відстань між сусідніми парами основ (рис. 4.9, в). Під час реплікації відбувається інсерція додаткового нуклеотиду в місці інтеркаляції, що призводить до мутації – зсуву рамки зчитування.



**Рис. 4.9.** Хімічні формули бромистого етидію (а) і дауноміцину (б) і структура комплексу інтеркальованої похідної дауноміцину (червона) з ДНК (в, зображення створено за допомогою програми РумОЛ, код структури у Protein Data Bank 1NAB)

Різноманітні природні та синтетичні речовини, взаємодіючи з ДНК, викликають хімічні модифікації азотистих основ. Скажімо, сильні окисники, такі як азотиста кислота або біхромат калію, ви-

кликають окисне дезамінування основ. Алкілюючі агенти (нітрозометилсечовина, тіофосфамід та інші) приєднують алкільні радикали як екзоциклічні групи азотистих основ.

Деякі хімічно інертні молекули, що потрапляють в організм, набувають мутагенних властивостей тільки внаслідок їхніх метаболічних перетворень – *метаболічної активації*. Такі хімічні речовини називають *промутгенами* – це, наприклад, гідрофобні поліциклічні ароматичні вуглеводні, афлотоксин (токсин, що синтезується багатьма муковоривими цвілевими грибами).

Узагалі, пошкодження ДНК хімічними речовинами далеко не завжди спричиняється безпосередньою взаємодією мутагену з азотистими основами чи цукрофосфатним остовом. Часто хімічні речовини вступають у складні внутрішньоклітинні реакції, що супроводжуються появою вільних радикалів, які пошкоджують ДНК. Генераторами вільних радикалів можуть виступати сильні окисники, солі металів, деякі антибіотики, наприклад блеоміцин. Хімічними мутагенами, які не взаємодіють з ДНК, є також інгібітори ферментів метаболізму нуклеїнових кислот і репарації. Так, сильним інгібітором систем репарації ДНК є алкалоїд кофеїн. Аналог тиміну – 5-фторурацил – сам у ДНК не вбудовується, а є інгібітором ферменту тимідилатсинтетази. Результатом є нестача тимінових нуклеотидів у клітині, що може бути причиною утворення одноланцюгових прогалин при реплікації ДНК.

**Фізичні мутагенні фактори** представлені електромагнітним випромінюванням із довжиною хвилі менше 300 нм і корпускулярними випромінюваннями. *Іонізуюче випромінювання* (рентгенівські та  $\gamma$ -промені,  $\alpha$ - і  $\beta$ -частинки) викликає іонізацію молекул – втрату чи приєднання електронів, унаслідок чого утворюються позитивно чи негативно заряджені радикали компонентів нуклеїнових кислот. Хімічні реакції між цими радикалами викликають руйнування різноманітних ковалентних зв'язків: фосфодієфірних, глікозидних, зв'язків усередині азотистих основ і цукрів. Подібні процеси індукують як точкові, так і хромосомні мутації всіх типів. Крім прямої дії на ДНК, іонізуюче випромінювання індукує появу вільних гідроксильних і пероксидних радикалів, які підсилюють пряму мутагенну дію іонізуючої радіації.

Серед *неіонізуючого випромінювання* найбільшу мутагенну активність мають ультрафіолетові промені короткохвильового діапазону (100–280 нм). Саме в цій спектральній області знаходяться максимуми поглинання світла азотистими основами. Поглинання енергії ультрафіолетових променів веде до збудження електронів – їхнім переходам на вищі енергетичні рівні, що дає можливість проходженню фотохімічних реакцій між азотистими основами. Найчастіше продуктами таких реакцій

цій є піримідинові димери, наприклад, між сусідніми (по одному ланцюгу) тимінами (див. рис. 1.18). Довгохвильовий максимум поглинання основ припадає на 260 нм: світло з довжиною хвилі понад 280 нм практично не поглинається ДНК. Певна мутагенна активність довгохвильового ультрафіолету пояснюється поглинанням енергії іншими хромофорами (наприклад, деякими коферментами) із подальшою передачею електронного збудження на ДНК. Крім того, поглинута енергія може також бути причиною генерації вільних радикалів деякими молекулами (скажімо, рибофлавіном).

До **біологічних мутагенних факторів** відносяться віруси, бактерії, паразити. Основною причиною мутагенної активності вірусів (ретровірусів і вірусів, що містять ДНК, див. розділ 5) є інтеграція їхніх ДНК у геном хазяїна. Інтеграція в межах кодуєчої або регуляторної ділянки гена може викликати мутацію або вплинути на нормальну експресію. Мутацію може спричинити екзогенна ДНК, штучно введена в клітину. Подібний механізм мутагенезу є цілком подібним до ефектів переміщення мобільних елементів (розділ 6). Крім того, причиною збільшення загального рівня мутацій у клітинах, оброблених екзогенною ДНК або заражених вірусами, є "конкуренція" чужорідної ДНК із клітинною за молекулярну машинерію систем репарації.

Зростання рівня мутацій різного типу, що спостерігається в соматичних клітинах організмів, які піддалися вірусним, бактеріальним та іншим інфекціям, носить назву *інфекційного мутагенезу*. Інфекційний мутагенез пояснюється комплексом процесів, що відбуваються при взаємодії організму хазяїна з інфекційним агентом або паразитом. Причиною мутацій можуть бути, наприклад, токсини, які виділяють бактерії та паразити, токсичні метаболіти й речовини, синтезовані організмом при реакціях імунної відповіді.

## НАСЛІДКИ МУТАЦІЙНОЇ МІНЛИВОСТІ

Загальним наслідком мутаційної мінливості є порушення спадкових програм клітин і організмів. Але при цьому мутаційна мінливість спричиняє підвищення біологічного різноманіття: забезпечує появу нових геномних варіантів і, відповідно, генотипових і фенотипових форм. Більшість з утворених варіантів геному є відносно нейтральними. Велика частина новоутворених фенотипів є або нежиттєздатними (прояв *летальних мутацій*), або мають знижену життєздатність (прояв *напівлетальних мутацій*). Проте інколи нові варіанти набува-

ють адаптивної переваги. Адаптивні та нейтральні варіанти закріплюються в популяціях – саме вони забезпечують такі явища, як множинний алелізм і генетичний поліморфізм (див. розділи 3 і 8).

Слід зауважити, що точкові мутації приводять до зміни спадкової програми не обов'язково тільки тоді, коли вони відбуваються в кодуючих ділянках геному. Нуклеотидні заміни в некодуючих ділянках можуть впливати на експресію генів: заміни нуклеотидів у 5'- або 3'-кінцевих ділянках мРНК, що не транскрибуються, можуть впливати на час життя мРНК; заміни в інтронах – на ефективність сплайсингу; у регуляторних ділянках гена – на рівень експресії. Таким чином, не завжди поліморфізм ДНК у некодуючих ділянках є нейтральним.

Говорячи про наслідки мутаційної мінливості, слід відмежувати ті, що стосуються окремого організму (індивідуальні наслідки), від наслідків для популяцій і видів у цілому (еволюційні наслідки). Мутації в соматичних клітинах часто приводять до негативних ефектів для окремих організмів: наприклад, усі типи мутацій, від точкових до геномних, можуть бути причиною виникнення злоякісних новоутворень. Але такі мутації не спадкуються в наступних поколіннях нащадків. Генеративні мутації зумовлюють розвиток особин, усі клітини яких будуть нести дану зміну. Типовим проявом таких мутацій є різноманітні спадкові хвороби (див. розділ 7).

Зрозуміло, що для популяцій і груп організмів, а отже, і для видоутворення, найбільш значимими є генеративні мутації. У ході розвитку різних класів хребетних (від круглоротих до ссавців) спостерігається значна кількість хромосомних і геномних перебудов, які в основному представлені транслокаціями, інверсіями та змінами кількості хромосом. Так, людина відрізняється від людиноподібних мавп робертсонівською транслокацією (друга хромосома людини є транслокаційною формою двох акроцентричних хромосом мавп, див. розділ 7).

Важливу роль в еволюції рослинного й тваринного світу відіграють геномні мутації (поліплоїдії та анеуплоїдії). Проте, як правило, відсутність у каріотипі однієї з хромосом гомологічної пари приводить до зниження життєздатності особин, а в деяких випадках має летальні наслідки. Такий ефект можна пояснити або недостатністю певних білкових продуктів (експресуються гени лише однієї хромосоми), або наявністю в хромосомі, яка присутня в анеуплоїдному ядрі, летальних алельних варіантів певних генів. Слід зазначити, що фенотиповий ефект моносомії залежить від того, яка хромосома втрачена. У людини, наприклад, моносомії за статевою X-хромосомою (синдром Шерешевського – Тернера, див. розділ 7) мають менш несприятливий для організму ефект порівняно з моносоміями за аутосомами, які є летальними. У дрозодфілі

нежиттєздатними є особини з нестачею четвертої хромосоми, тоді як нестача другої, третьої або X-хромосоми не має летальних наслідків. У рослин (пшениці, кукурудзи, тютюну) моносомні форми можуть не відрізнятися від нормальних диплоїдних особин або мати незначні відмінності в розмірах окремих частин рослини.

Що стосується наявності в каріотипі додаткової хромосоми, то зниження життєздатності або летальність трисомій загалом характерна для представників тваринного світу. Рослини-трисоміки часто є життєздатними й мають незначні відхилення від нормальних організмів: у дурману *Datura stramonium*, наприклад, описані життєздатні трисоміки по кожній із 12 пар хромосом.

Поліплоїдія найбільше розповсюджена в рослинному світі. Збільшення наборів хромосом у рослин приводить до збільшення їхньої вегетативної маси та розвитку стійкості до несприятливих умов. Розповсюдженість поліплоїдних форм у рослин пов'язана з тим, що для них характерне вегетативне розмноження та самозапилення. Поліплоїдні форми у тварин найчастіше не є життєздатними, оскільки поліплоїдія несумісна зі статевим процесом. Часто поліплоїдія у тварин зумовлює їхню стерильність, особливо це стосується алополіплоїдних форм. Відповідно, поліплоїдні форми є характерними для тварин із партеногенетичним розмноженням.

## МОДИФІКАЦІЙНА МІНЛИВІСТЬ

Будь-який організм є відкритою системою: реалізація спадкової програми відбувається не тільки під контролем генотипу, але й під впливом оточуючого середовища. Умови середовища можуть зумовлювати як ступінь прояву спадкової ознаки (експресивність), так і ймовірність прояву ознаки взагалі (пенетрантність). Таким чином, особини з однаковими генотипами, залежно від впливу навколишнього середовища, можуть мати відмінні фенотипи. Така мінливість називається *фенотиповою*, або *модифікаційною*. Класичним прикладом фенотипових змін у межах одного організму є різні форми листової пластинки у стрілолиста – залежно від розташування листя в підводній або надводній частині рослини (рис. 4.10). Модифікаційним змінам в основному піддаються кількісні та якісні полігенні ознаки. Наприклад, зріст, вага, схильність до розповсюджених хвороб, тривалість життя значно залежать від умов середовища.



**Рис. 4.10.** Модифікація листової пластинки у стрілолиста: підводні (а) і надводний (б) листки

Модифікаційна мінливість зумовлена не змінами послідовностей ДНК, а змінами в експресії генів (від ефективності транскрипції до особливостей перебігу біохімічних реакцій) під впливом факторів навколишнього середовища. Очевидно, що такі зміни не спадкуються, проте межі модифікаційної мінливості (*норма реакції*) для кожної окремої ознаки повністю визначаються генотипом. Розмах норми реакції є адаптивною ознакою та визначає межі змін умов навколишнього середовища, в яких може існувати особина, тобто окремий генотип.

Результатом модифікаційної мінливості може бути поява організмів, які фенотипово копіюють прояв певного генотипу. Такі фенотипові форми називають *фенокопіями*. По суті, фенокопії є проявом крайніх варіантів норми реакції. Наприклад, недостатність вітаміну D спричинює розвиток рахіту, який за симптоматикою нічим не відрізняється від спадкового захворювання, зумовленого мутаціями, які приводять до нечутливості до вітаміну D.

До окремого типу модифікаційної мінливості відносять так звані довготривалі модифікації, які можуть спадкуватися протягом декількох поколінь. Відомим прикладом є зміна забарвлення в колорадського жука, яка виявляється після витримування лялечок за високих температур. Змінене забарвлення зберігається для кількох поколінь, а потім повертається до вихідного стану. При цьому спадкування відбувається виключно по материнській лінії: змін у геномі не відбу-

вається, а тривалість модифікації пояснюється накопиченням у цитоплазмі клітин зародкового шляху стабільних мРНК генів теплового шоку, які з цитоплазмою яйцеклітини передаються нащадкам. Зрозуміло, що через декілька поколінь відбудеться "розведення" цих мРНК: їхня кількість стане врешті-решт недостатньою для прояву зміненого забарвлення.

### *Контрольні запитання і завдання*

1. Дайте визначення терміну "мінливість". Які існують типи мінливості?
2. Чим зумовлена спадкова мінливість?
3. Що таке мутації? Чим соматичні мутації відрізняються від генеративних.
4. Опишіть типи точкових мутацій.
5. Опишіть типи хромосомних і геномних мутацій.
6. Що є джерелом мутаційних змін?
7. Які пошкодження ДНК виникають у процесі життєдіяльності клітин і внаслідок помилок реплікації та репарації?
8. Опишіть механізми виникнення хромосомних і геномних мутацій.
9. Дайте визначення поняття "мутагенний фактор". Що таке пряма та опосередкована дія мутагену?
10. Які типи хімічних мутагенів ви знаєте. Опишіть механізми їхньої дії. Що таке промутагени?
11. Поясніть механізми мутагенної дії фізичних факторів.
12. Які мутагенні чинники можна віднести до факторів біологічної природи? Які механізми їхньої дії?
13. Які наслідки мутаційної мінливості є негативними? Позитивними?
14. Що таке модифікаційна мінливість? Які основні причини її прояву? Чим модифікаційна мінливість відрізняється від мутаційної?
15. Що таке фенкопія?
16. Що таке довготривалі модифікації? Поясніть механізми їхнього утворення.





## РОЗДІЛ 5

# Генетика бактерій, вірусів і одноклітинних еукаріотів

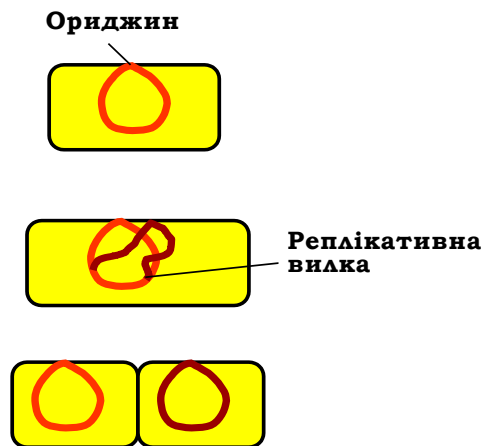
Прокаріотична клітина відрізняється порівняно простою організацією (відсутність ядра та розвиненої компартменталізації, відсутність мейозу, порівняно невелика кількість ДНК), що робить її зручним об'єктом досліджень. Саме вивчення прокаріотів зіграло провідну роль у з'ясуванні багатьох базових принципів функціонування генетичного апарату, особливо в перші десятиліття після початку інтенсивних досліджень молекулярних основ спадковості. При збереженні загальних принципів, організація та функціонування спадкового апарату таких порівняно простих систем має певні особливості.

## ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОГО АПАРАТУ ПРОКАРІОТІВ

Як правило, бактеріальний геном представлений однією циркулярною молекулою ДНК (бактеріальною хромосоною). Ця ДНК взаємодіє з білками, формуючи нуклеоїд, який займає певну зону бактеріальної клітини. Загальна довжина хромосоми, наприклад, у *Escherichia coli*, становить 4,6 млн пар основ, близько 90 % яких припадають на кодуючі послідовності (див. табл. 1.1). Середній розмір гена *E. coli* – 950 пар основ (прокаріотичні гени не містять інтронів), середня довжина міжгенної ділянки – 118 пар основ. Проте міжгенні зони мають досить нерівномірний розподіл по довжині, яка варіює від 0 до 1730 пар основ.

У бактеріальному геномі присутні також мобільні елементи класу **ДНК-транспозонів**, цілком аналогічні транспозонам у геномах еукаріотів (див. розділ 6). Бактеріальні транспозони поділяють на два типи, які дещо різняться між собою за будовою послідовностей і довжиною: IS-елементи (insertion sequences), розмір яких варіює від 700 до 1400 пар основ, і власне транспозони (Tn) більшого розміру. Транспозони обох типів часто містять гени *транспозази*. Транспозаза здійснює каталіз хімічних реакцій, які забезпечують переміщення транспозона в інше місце геному (див. розділ 6). Крім генів транспозази у складі Tn-транспозонів можуть бути присутніми інші гени.

Реплікація бактеріальної хромосоми розпочинається з ділянки ориджину (як правило, єдиного, розділ 1) і продовжується в обидва боки двома реплікативними вилками (рис. 5.1). Вважається, що ориджин при цьому взаємодіє з клітинною мембраною; між новим (щойно синтезованим) і старим ориджинами під час реплікації нарощується клітинна оболонка, по завершенні реплікації відбувається поділ дочірніх клітин – до кожної переходить повний материнський набір генів.



**Рис. 5.1.** Синхронізація реплікації та клітинного поділу бактеріальної клітини

Характерною відзнакою бактерій є наявність у клітині, поряд із бактеріальною хромосомою, невеликих автономних елементів геному – **плазмід**. Плазміда є циркулярною молекулою ДНК (типовий розмір близько 3 тис. пар основ), яка містить кілька генів і реплікується незалежно від бактеріальної хромосоми (має власний ориджин). Плазмід широко використовуються як зручний інструмент молекулярно-біологічних досліджень (див. розділ 9).

## ОБМІН ГЕНЕТИЧНИМ МАТЕРІАЛОМ МІЖ БАКТЕРІЯМИ

Хоча бактерії розмножуються шляхом клітинного поділу, у них спостерігається також своєрідний "статевий процес" перенесення генетичного матеріалу від однієї клітини до іншої. Таке перенесення відбувається під час **кон'югації** – безпосереднього контакту між клітинами. Залежить кон'югація від присутності в одній із клітин особливої плазмиди – **F-фактора** (фактора фертильності) – яка, як і багато інших плазмід, може існувати автономно, а може вбудовуватись у бактеріальну хромосому шляхом сайт-специфічної рекомбінації. В *E. coli* існує два "статеві" типи клітин, що позначаються як  $F^+$  і  $F^-$ , – кон'югація супроводжується перенесенням ДНК від клітини  $F^+$  до  $F^-$ .

F-фактор містить кілька генів, у тому числі такі, що відповідають за утворення так званих *пілів* – трубчастих виростів на поверхні клітини. Пілі з'єднуються з рецепторами клітин  $F^-$ , і між клітинами двох типів утворюється цитоплазматичний місток (рис. 5.2). Специфічна нуклеаза робить одноланцюговий розріз у ДНК F-фактора, інтактний ланцюг слугує матрицею для добудови 3'-кінця, що залишився в місці розрізу, – відбувається реплікація циркулярної ДНК F-фактора за так званим типом *кільця, що котиться* (такий механізм реплікації використовується також для копіювання ДНК багатьох бактеріофагів). Процес добудови 3'-кінця виштовхує 5'-кінцеву одноланцюгову ділянку, яка проникає у клітину  $F^-$ , де використовується як матриця для синтезу другого ланцюга ДНК. У результаті клітина  $F^-$  перетворюється на  $F^+$  (рис. 5.3).

Частота кон'югації та подвоєння і перенесення F-фактора є невисокою ( $\sim 10^{-5}$ ), якщо F-фактор існує автономно від бактеріальної хромосоми (як на рис. 5.2). Коли F-фактор вбудовується в бактеріальну хромосому, частота зростає до  $10^{-2}$ – $10^{-1}$  – такі штами клітин  $F^+$  позначаються як Hfr (high frequency recombination). При кон'югації клітин  $F^-$  і Hfr вбудований F-фактор ініціює реплікацію за типом кільця, що котиться, цілої бактеріальної хромосоми (рис. 5.3): у клітині Hfr хромосома відновлюється, у клітину  $F^-$  переноситься її копія. Насправді ж ціла хромосома потрапляє до клітини  $F^-$  дуже рідко – як правило, відбувається порушення кон'югаційної трубки й розрив хромосоми, котра переноситься, (як видно з рис. 5.3, це не порушує вихідну хромосому у клітині Hfr – там завжди є інтактний ланцюг ДНК, який може

бути використаний у ролі матриці для відновлення цілісності дволанцюгової молекули). Оскільки на початку процесу в клітину  $F^-$  потрапляє лише частина  $F$ -фактора, а щоб він опинився там повністю, вихідна хромосома має зробити повний "оберт" (рис. 5.3), як правило, клітина  $F^-$  не перетворюється на  $F^+$  при кон'югації з клітиною  $Hfr$ .

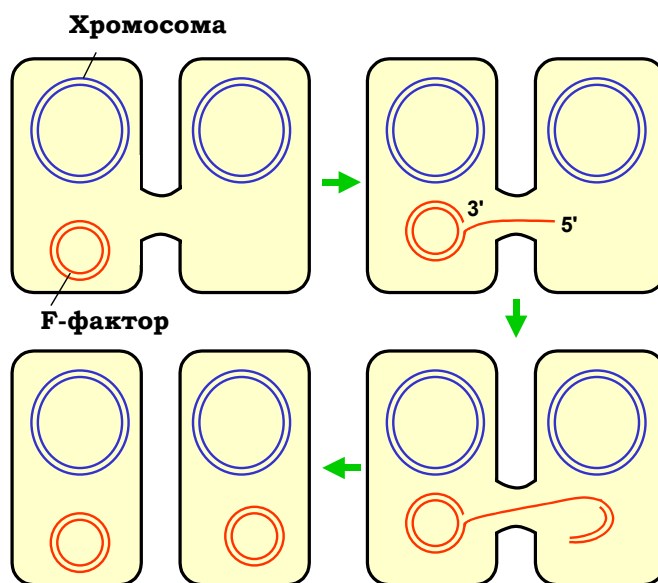


Рис. 5.2. Перенесення  $F$ -фактора з клітини  $F^+$  у  $F^-$

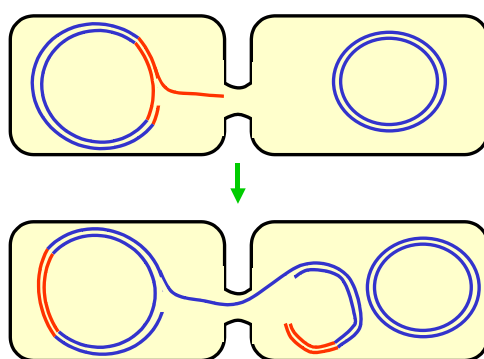
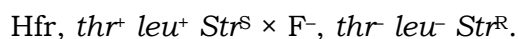


Рис. 5.3. Перенесення ДНК від клітини  $Hfr$  до  $F^-$ , ДНК інтегрованого  $F$ -фактора позначено червоним

Коли в клітині  $F^-$  опиняється частина гомологічної ДНК іншої бактерії, починається гомологічна рекомбінація, описана в розділі 1, – обмін ділянками між донорною ДНК і ДНК клітини-реципієнта. Результуюча клітина-реципієнт залишається гаплоїдною – "зайва" ДНК, що не потрапила до хазяйської хромосоми, піддається деградації нуклеазами, оскільки вона не є циркулярною. Таким чином, між двома бактеріальними штамами відбувається своєрідне часткове схрещування, яке можна досліджувати за допомогою звичайних методів генетичного аналізу. Розглянемо, наприклад, схрещування  $Hfr$ -штаму дикого типу за генами  $thr^+$  та  $leu^+$  (визначають здатність синтезувати відповідні амінокислоти), який містить також ген чутливості до стрептоміцину  $Str^S$ , із штамом  $F^-$ , що має ген стійкості до стрептоміцину  $Str^R$  і мутантні гени  $thr^-$  та  $leu^-$  (ауксотрофний штам, який потребує присутності відповідних амінокислот у поживному середовищі):



З певною частотою в такому схрещуванні утворюються рекомбінантні бактерії дикого типу  $F^-$ ,  $thr^+ leu^+ Str^R$ , які можна відібрати, вирощуючи культуру на середовищі зі стрептоміцином.

Оскільки перенесення генів із клітини  $Hfr$  у  $F^-$  відбувається послідовно, починаючи із сайту інтеграції  $F$ -фактора (рис. 5.3), можна картувати розміщення генів у бактеріальній хромосомі (у порядку потрапляння їх до клітини  $F^-$ ). Для цього кон'югацію (після змішування клітин двох типів у рідкому середовищі) зупиняють шляхом струшування пробірки через певні проміжки часу. Це дозволило свого часу отримати детальні генетичні карти бактеріальної хромосоми (відстані на таких картах вимірюють у хвилинах) і довести її циркулярність.

$F$ -фактор, інтегрований до хромосоми, може також вирізатися з неї з утворенням автономної плазміди. Таке вирізання іноді буває неточним: ділянка  $F$ -фактора залишається в хромосомі, замінюючись на ділянку хромосоми в складі плазміди. Утворюється так званий  $F'$ -фактор, який здатен переносити в інші клітини бактеріальні гени незалежно від бактеріальної хромосоми (явище *сексдукції*). Після такого перенесення можна отримати частково диплоїдні клітини – за генами, що перебувають у складі  $F'$ -фактора. Між останнім і хромосомою клітини-реципієнта можлива гомологічна рекомбінація, що приводить або до утворення  $Hfr$ -клітин і дуплікації генів (одиначний кросинговер – вбудовування  $F'$ -фактора у хромосому), або до обміну ділянками між хромосомою та  $F'$ -фактором (подвійний кросинговер).

## БАКТЕРІОФАГИ

Бактеріофаги (бактеріальні віруси) поділяють на два типи: *вірулентні*, які проникають у клітину, розмножуються та зумовлюють руйнування клітини (*літичний шлях*), і *помірні* – такі, що можуть використовувати або літичний шлях, або шлях *лізогенії*, коли ДНК фага за допомогою сайт-специфічної рекомбінації (див. наступний підрозділ) вбудовується в бактеріальний геном (фаг перетворюється на *профаг*). В останньому випадку за несприятливих для бактерії умов може відбуватися *індукція бактеріофага* – перехід до літичного шляху.

Процес перенесення генетичного матеріалу між бактеріальними клітинами за рахунок активності бактеріофагів називають **трансдукцією**. Здійснюють її зазвичай помірні бактеріофаги: після практично необмеженого існування фагової ДНК у бактеріальному геномі, індукція іноді зумовлює вирізання фагової ДНК разом із бактеріальними ділянками. Далі відбувається реплікація цієї ДНК, синтез білків оболонки бактеріофага (закодованих у генах фагової ДНК) і збирання фагових частинок. Фагові частинки потім інфікують інші клітини, і якщо реалізується шлях лізогенії, вбудовуються в ДНК клітини-хазяїна разом із захопленими раніше бактеріальними генами. До помірних фагів належать, зокрема, фаги P1, P22,  $\lambda$  (див. нижче огляд життєвого циклу фага  $\lambda$ ). ДНК помірних фагів може розглядатися як частина бактеріального геному, яка іноді виходить з під контроль: гени бактеріофага жодним чином не відрізняються від бактеріальних, тобто перебувають під контролем промоторів, що впізнаються бактеріальною РНК-полімеразою клітини-хазяїна.

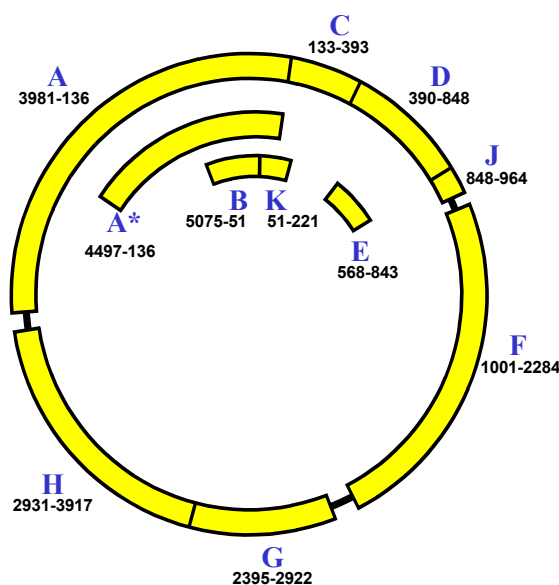
Бактеріофаги групи T відносять до таких, що реалізують тільки літичний шлях. Як і для помірних фагів, їхній геном представлений однією лінійною дволанцюговою ДНК. ДНК T-парних фагів (T2, T4, T6) містить приблизно 200 тис. пар основ, фагові гени кодують білки системи реплікації (у тому числі й власну ДНК-полімеразу), білки фагової оболонки та певні регуляторні білки, що сприяють перемиканню роботи клітинних систем на користь бактеріофага. Після проникнення ДНК у клітину починається транскрипція групи фагових генів бактеріальною РНК-полімеразою, згодом – реплікація фагової ДНК, синтез фагових білків, збирання частинок бактеріофага й лізис клітини.

Аналогічно реалізується літичний шлях Т-непарними фагами (Т1, Т3, Т5, Т7), ДНК яких є трохи меншою за розміром (~40 тис. пар основ). Відразу після проникнення ДНК у клітину-хазяїна відбувається експресія гена мономерної фагової РНК-полімерази, яка далі ефективно транскрибує інші гени бактеріофага.

Бактеріальні клітини мають свою систему захисту від ДНК бактеріофагів. Основою цієї своєрідної "імунної системи" є **рестриктази** – велика група специфічних нуклеаз, які розрізають лише певні невеличкі (частіше чотири або шість нуклеотидів) елементи послідовності. Активність рестриктази залежить від метилювання певних азотистих основ у складі специфічних сайтів рестрикції: сайти у складі бактеріальної ДНК є метильованими й тому непомітними для рестриктази, неметилювані сайти ДНК бактеріофага залишаються чутливими.

Крім фагів, котрі містять дволанцюгову ДНК як генетичний матеріал, існують ще дві групи фагів, геном яких є відхиленням від "канону". Перша група – бактеріофаги з одноланцюговою циркулярною ДНК (φX-174, M13). Ця ДНК досить маленька, фагові гени кодують тільки 10–12 білків. Наприклад, геном (який був першим із прочитаних) φX-174 (слід читати "фі-десять") побудований надзвичайно економно: десять генів (один із них – ген А – дає дві різні молекули РНК при транскрипції) займають практично всю циркулярну ДНК бактеріофага (рис. 5.4). Більш того, декілька генів перекриваються за рахунок використання різних рамок зчитування: гени А і С та С і D перекриваються своїми кінцями, гени В, К і Е повністю містяться в межах інших генів; три гени – А, С і К – використовують усі три можливі рамки зчитування на одній ділянці ДНК (звичайно, у даному випадку всі три рамки є відкритими). Явище перекриття генів за рахунок використання різних рамок зчитування спостерігається також для кількох інших бактеріофагів і зустрічається в еукаріотів.

У бактеріальній клітині фагова ДНК, що позначається як (+)-ланцюг, використовується як матриця для синтезу (-)-ланцюга. У результаті утворюється дволанцюгова циркулярна ДНК, з неї транскрибуються гени ((-)-ланцюг є матричним), і вона, після одноланцюгового розриву в (+)-ланцюзі, використовується для реплікації за типом кільця, що котиться (див. рис. 5.2): на циркулярному (-)-ланцюзі синтезується велика кількість копій (+)-ланцюга, фрагменти нарізаються, замикаються в кільце й упаковуються у фагову оболонку.



**Рис. 5.4.** Геном бактеріофага фХ-174.  
Позначено початок та кінець кожного гена,  
загальна довжина ДНК – 5386 пар основ

Остання група бактеріофагів (R17, F2, MS2) містить як генетичний матеріал молекулу РНК, де є тільки чотири гени (фагова РНК одночасно слугує як мРНК), що кодують: РНК-залежну РНК-полімеразу, яка здійснює копіювання фагової РНК; два білки оболонки; білок, що забезпечує лізис клітини. Таким чином, ці найменші з усіх відомих вірусів здійснюють найпростіший шлях передачі спадкової інформації – тільки з РНК на РНК і на білок.

## САЙТ-СПЕЦИФІЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ

Як приклад сайт-специфічної рекомбінації розглянемо уже згадану інсерцію (інтеграцію) ДНК бактеріофага  $\lambda$  в бактеріальну хромосому. У складі фагової ДНК є сайт attP – ділянка довжиною 270 пар основ, у складі бактеріальної ДНК – сайт attB (23 пари основ). Обидва сайти мають ділянку спільної (або гомологічної) послідовності довжиною 15 пар основ. Два білки – бактеріальний IHF (Integration Host Factor) і продукт одного з генів бактеріофага *інтеграза* – зв'язуються з цими сайтами (рис. 5.5).



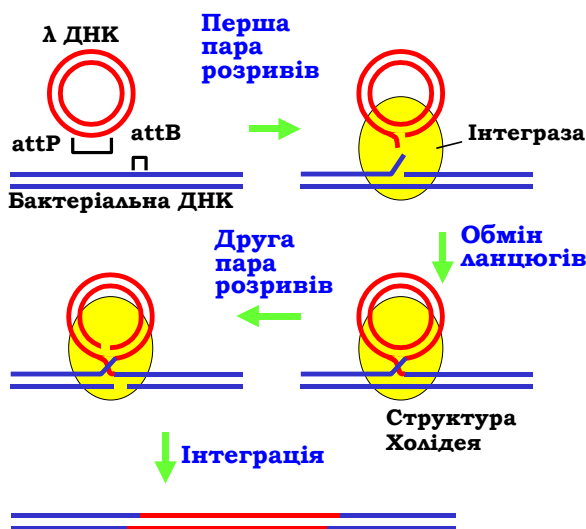


Рис. 5.5. Інтеграція ДНК фага λ в бактеріальний геном

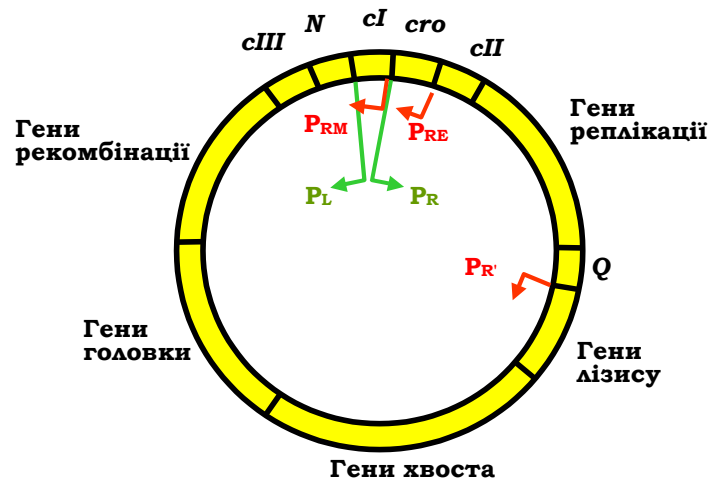
Інтеграза здійснює два одноланцюгові розрізи в бактеріальній і фаговій ДНК, після чого відновлює фосфодієфірний зв'язок, але з відповідним кінцем іншого дуплекса – відбувається обмін ланцюгами. На цьому етапі утворюється конфігурація чотирьох ланцюгів, еквівалентна структурі Холідея (див. також рис. 1.25). Після цього здійснюється друга пара розривів і обмін ланцюгами, що й зумовлює інтеграцію.

Розглянутий приклад указує на основну різницю між сайт-специфічною та гомологічною рекомбінаціями: якщо при гомологічній рекомбінації дві молекули ДНК упізнають одна одну шляхом порівняння своїх послідовностей уздовж великих ділянок (див. розділ 1), сайт-специфічна рекомбінація передбачає наявність також гомологічних, але коротких елементів послідовності, що впізнаються специфічними білками.

Процеси сайт-специфічної рекомбінації за механізмом, цілком аналогічним розглянутому, дуже поширені в бактеріофагів, при інсерції плазмід в основний геном у бактерій і дріжджів, вирізанні плазмід. Практично сайт-специфічною рекомбінацією є і переміщення ДНК-транспозона. Що стосується вищих еукаріотів, одним із головних процесів, у ході якого використовуються механізми сайт-специфічної рекомбінації, є дозрівання імуноглобулінових генів (розділ 6).

## ЖИТТЄВИЙ ЦИКЛ БАКТЕРІОФАГА $\lambda$

Життєвий цикл фага  $\lambda$  є чудовим прикладом добре вивченої системи регуляції транскрипції в масштабі хоча й невеличкого, але цілого геному. Після проникнення в бактеріальну клітину лінійна ДНК бактеріофага  $\lambda$  замикається в кільце бактеріальною лігазою. Геном фага містить гени, які відповідають за синтез білків головки та хвоста фагової частинки, реплікацію фагової ДНК, лізис бактерії, рекомбінацію (вбудовування фагової ДНК у бактеріальний геном), і кілька регуляторних генів, що кодують фактори транскрипції (рис. 5.6).

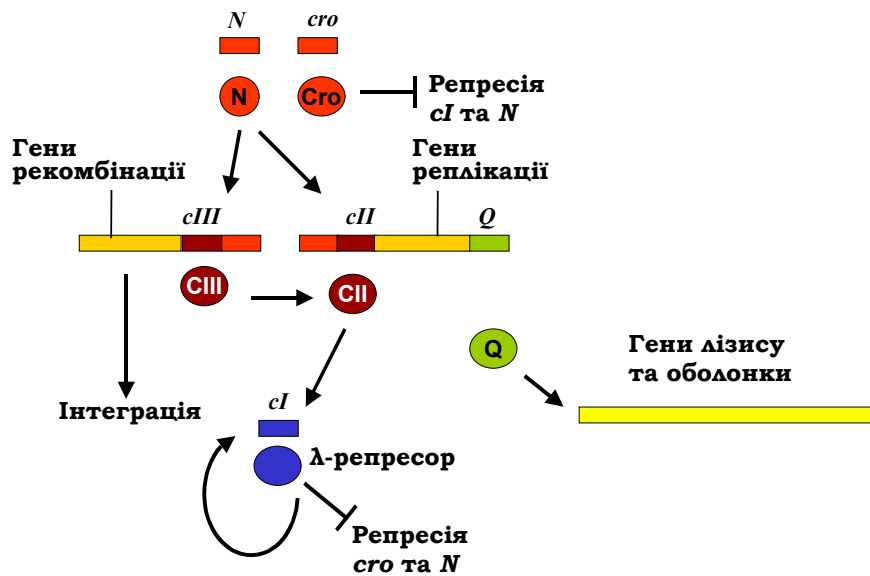


**Рис. 5.6.** Циркулярна ДНК бактеріофага  $\lambda$ .

Стрілочками позначено промотори та напрямок транскрипції: зелені – сильні промотори, червоні – такі, що потребують активації.

Відразу після інфекції РНК-полімераза зв'язується з двома сильними промоторами  $P_R$  і  $P_L$  (рис. 5.6), з яких відбувається транскрипція у протилежних напрямках на генах *cro* і *N* відповідно (рис. 5.7). Обидва гени закінчуються термінаторами, але щойно з'являється білок *N*, він виконує роль антитермінатора – забезпечує ігнорування РНК-полімеразою сигналів термінації, і вона продовжує синтезувати поліцистронну мРНК на *cIII* та генах рекомбінації (із промотора  $P_L$ ) і *cII*, генах реплікації та *Q* (з промотора  $P_R$ ). Після цього можливе розгалуження на два альтернативні шляхи.

Розглянемо спочатку шлях лізогенії. Продукт гена *cIII* – активатор транскрипції, який забезпечує зв'язування РНК-полімерази зі слабким промотором  $P_{RE}$ . Із цього промотора (у напрямку, протилежному напрямку транскрипції *cro*, рис. 5.6) транскрибується ген *cI*, продуктом якого є білок  $\lambda$ -репресор. Крім того, білок CII активує ген інтегрази (міститься серед генів рекомбінації) – ферменту, що забезпечує вбудовування фагової ДНК у геном клітини-хазяїна. Продукт гена *cIII* захищає білок CII від бактеріальних протеаз, тобто підвищує час життя активатора. Отже, за умови високої концентрації CII з'являється певна кількість  $\lambda$ -репресора, а фагова ДНК вбудовується інтегразою в бактеріальний геном (рис. 5.7).



**Рис. 5.7.** Схема регуляції транскрипції в життєвому циклі фага  $\lambda$ . Прямокутники – транскрипти, отримані з відповідних генів, овали – білки

Репресор має спорідненість до операторних ділянок, розташованих між промоторами  $P_R$  і  $P_{RM}$ , а також у зоні промотора  $P_L$ . Взаємодія з операторами веде до блокування промотора  $P_R$  гена *cro* та автоматично блокує всі гени праворуч від нього. Так само репресор блокує промотор  $P_L$ , тобто транскрипцію всіх генів ліворуч від *N*. Разом із тим репресор є активатором власного гена *cI* із промотора  $P_{RM}$ . Отже, на стадії лізогенії тільки ген *cI* є активним (рис. 5.7). Накопи-

чення репресора та насичення ним операторних ділянок зумовлює вимикання цього промотора – за принципом зворотного зв'язку репресор підтримує активність свого гена на певному оптимальному рівні.

Якщо бактерія піддається дії мутагенів, коли виникає ризик загибелі клітини (разом із вбудованою фаговою ДНК), відбувається активація певної бактеріальної протеази, яка гідролізує молекулу репресора, результатом чого є втрата його спорідненості до ДНК. Унаслідок звільнення промоторів  $P_R$  і  $P_L$  РНК-полімераза зв'язується з ними й починає транскрибувати гени *cro* та *N*, тобто знов виникає ситуація, що спостерігається відразу після інфекції – спрацьовують гени рекомбінації, *cII*, реплікації та ген *Q*. Але при цьому білок CII швидко деградується протеазами, не встигаючи активувати синтез репресора. Така сама ситуація (висока активність протеаз) може, звичайно, реалізуватися відразу після інфекції.

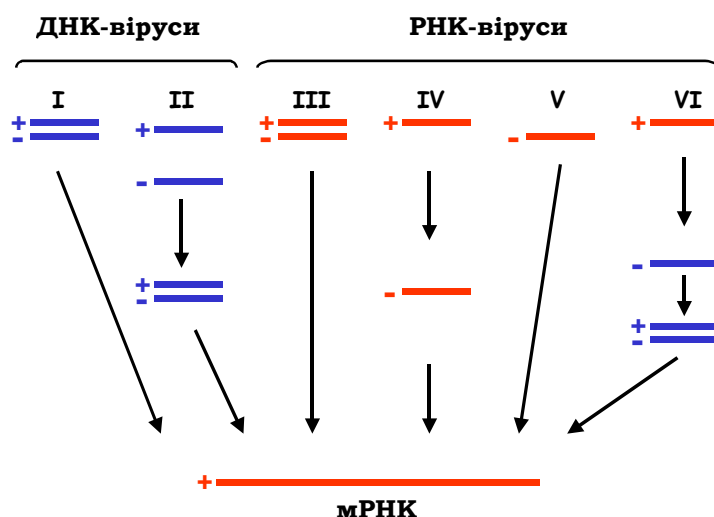
Білок Cro заповнює ті самі операторні ділянки між промоторами  $P_R$  і  $P_{RM}$ , але тепер ця взаємодія остаточно вимикає синтез репресора з промотора  $P_{RM}$ . Подальше заповнення операторів при зростанні концентрації Cro вимикає транскрипцію *cro* і генів праворуч від нього, так само, як і генів ліворуч від *N* за рахунок зв'язування Cro з операторами в зоні промотора  $P_L$ . Але головний наслідок активності *cro* полягає у появі білка *Q*.

Ще один промотор  $P_{R'}$  є насправді сильним, але відразу за ним розташований термінатор – РНК-полімераза у відсутності *Q* синтезує з цього промотора короткий нефункціональний транскрипт. Білок *Q* спрацьовує як антитермінатор, забезпечуючи долання цього бар'єру. У результаті відбувається синтез поліцистронної мРНК на генах лізису та білків оболонки (праворуч від *Q*), паралельно активність генів рекомбінації забезпечує вирізання фагової ДНК, а генів реплікації – її ампліфікацію: здійснюється збирання фагових частинок і лізис клітини.

Розглянута досить складна система регуляції транскрипції порівняно простого геному бактеріофага  $\lambda$  має дати уявлення про те, наскільки ускладнюється загальна система регуляції транскрипції у бактерій і тим більше – в еукаріотів. Насправді складність загальних систем внутрішньоклітинної регуляції, які залежать від тонкого балансу великої кількості різноманітних впливів, залишається дуже далекою від остаточного розуміння.

## ВІРУСИ ЕУКАРІОТІВ

Віруси, що розмножуються в еукаріотичних клітинах, представлені всіма можливими варіантами щодо типу нуклеїнової кислоти, яка є носієм генетичної інформації. Залежно від цього та від шляху реалізації генетичної інформації віруси поділяють на сім класів. Шляхи експресії для шести з них показано на рис. 5.8, сьомий клас поєднує властивості класів I і VI. При експресії вірусної спадкової програми врешті-решт синтезується молекула мРНК, що слугує матрицею для синтезу вірусних білків клітинною системою трансляції. Полінуклеотидний ланцюг мРНК позначають як (+)-ланцюг, він комплементарний (-)-ланцюгу або ДНК, або РНК.



**Рис. 5.8.** Шляхи реалізації спадкової інформації в шести класів вірусів.  
Ланцюги ДНК сині, РНК – червоні

Віруси класу I містять дволанцюгову ДНК і, відповідно, використовують канонічний шлях реалізації спадкової інформації. Більшість із них (аденовіруси, бакуловіруси, віруси герпесу, папіломавіруси людини, вірус мавпи SV-40) застосовують транскрипційний апарат клітини-хазяїна для синтезу мРНК, реплікація вірусної ДНК здійснюється у клітинному ядрі. Розмір геному варіює від 5,5 до 150 тис. пар основ. Як і бактеріофаги, ці ДНК-віруси можуть реалізувати лізогенетичний шлях, зберігаючись у геномі клітини-хазяїна. Поксвіруси (варіола,

вакцинія), що також належать до класу I, мають ДНК досить великого розміру (~200 тис. пар основ) і власні ферменти, за допомогою яких здійснюється транскрипція та реплікація вірусної ДНК у цитоплазмі.

Віруси класу II, зокрема парвовіруси, містять одноланцюгову ДНК (~5 тис. нуклеотидів) – у вірусних частинках різних вірусів є або тільки (-)-ланцюг, або один із двох типів ланцюгів. У будь-якому випадку на одноланцюговій ДНК у клітині відбувається синтез іншого ланцюга, після чого дволанцюгова ДНК служить субстратом для транскрипції та реплікації.

РНК-віруси класу III – реовіруси – використовують дволанцюгову РНК як сховище спадкової інформації. Вірусна частинка містить 10–12 окремих молекул довжиною 1–4 тис. пар основ, а також власні ферменти, що здійснюють у цитоплазмі реплікацію РНК і ампліфікацію (+)-ланцюга як мРНК для синтезу білків.

Віруси класу IV – поліовіруси, пікорнавіруси – мають одноланцюгову РНК (7–10 тис. нуклеотидів), яка є (+)-ланцюгом – РНК безпосередньо кодує вірусні білки й тому інфекційна сама по собі. Вірусна РНК є матрицею для синтезу (-)-ланцюгів, які далі використовуються для синтезу більшої кількості (+)-ланцюгів. На (+)-ланцюзі відбувається синтез єдиного поліпептиду – поліпротеїну, – який потім розрізається на окремі вірусні білки.

РНК вірусів класу V – ортоміксовіруси, зокрема вірус грипу, – є (-)-ланцюгом (~12 тис. нуклеотидів, іноді розділена на окремі фрагменти). Віруси використовують власну РНК-полімеразу для синтезу (+)-ланцюгів мРНК.

Віруси класу VI – ретровіруси, зокрема вірус імунодефіциту людини – містять два ідентичні (+)-ланцюги РНК (5–8 тис. нуклеотидів) і використовують ДНК як проміжну стадію експресії спадкової інформації (рис. 5.9). У вірусній частинці є також два ферменти: *зворотна транскриптаза* (РНК-залежна ДНК-полімераза) та *інтеграза*. Зворотна транскриптаза здійснює в цитоплазмі клітини синтез комплементарного ланцюга ДНК із використанням вірусної РНК як матриці та молекули тРНК як праймера, після чого синтезує другий ланцюг ДНК. Дволанцюгова ДНК, що містить гени інтегрази, зворотної транскриптази, білків вірусної оболонки та довгі повтори на кінцях (LTR – long terminal repeats) у комплексі з інтегразою прямує до ядра, де інтеграза здійснює інсерцію цієї ДНК у геном. У такій формі *провіруса* вірусна ДНК може існувати в геномі досить довго. При активації транскрипції на провірусі клітинною РНК-полімеразою синтезується мРНК (що є одночасно вірусною (+)-РНК), відбувається трансляція та фор-

мування вірусних частинок. Як правило, ретровірус не вбиває клітину: ДНК разом із провірусом передається дочірнім клітинам, які знову здатні утворювати вірусні частинки. Зрозуміло також, що завдяки активності ретровірусів є можливим перенесення частини генетичного матеріалу від одного організму до іншого.

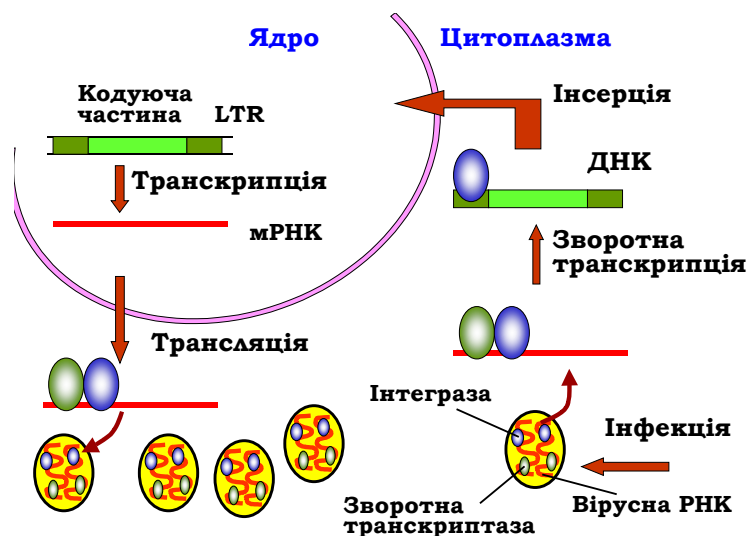


Рис. 5.9. Життєвий цикл ретровіруса

Віруси групи VII – ретроїдні віруси, до них належить і вірус гепатиту В, – містять дволанцюгову ДНК, вона використовується як матриця для синтезу мРНК, а також провірусної РНК (не показано на рис. 5.8). Ця остання є матрицею для синтезу вірусної ДНК за допомогою вірусної зворотної транскриптази.

## ОДНОКЛІТИННІ ЕУКАРІОТИ

Серед розмаїття одноклітинних еукаріотів, які можна розглядати як проміжний еволюційний щабель від прокаріотів до багатоклітинних організмів, зупинимося на двох прикладах. Перший стосується важливого для генетики експериментального об'єкта, другий – виду, що реалізує незвичайні перебудови свого спадкового апарату під час розвитку.

## Дріжджі

Дріжджі, з одного боку, – еукаріоти, з усіма притаманними їм особливостями (див. розділ 6). З іншого боку, це найпростіші з еукаріотів, що робить їх (у першу чергу, *Saccharomyces cerevisiae*) популярним модельним об'єктом дослідження в генетиці, молекулярній біології, біології клітини, а також у біотехнології – подібно до бактерій, дріжджі швидко розмножуються й досить легко піддаються культивуванню та трансформації (уведенню чужорідної ДНК, див. розділ 9).

Геном *S. cerevisiae* містить ~12 млн пар основ (16 хромосом у гаплоїдному наборі; крім хромосомної ДНК, дріжджі, подібно до бактерій, часто мають у своєму складі також автономні плазміди). Трохи більше 1 % геному становлять послідовності, що повторюються в центромерних і теломерних зонах хромосом, дещо більше 2 % – мобільні елементи (так звані Ту-елементи, які відносять до класу LTR-ретропозонів – див. розділ 6). Узагалі послідовності, що повторюються (включаючи гени рРНК і тРНК) дорівнюють ~10 % геному. На кодуючі послідовності ~6,7 тис. білкових генів припадає близько 70 % геному. Середній розмір кодуючої послідовності – 480 кодонів (варіює від 40 до 5 тис.). Тільки близько 3,5 % генів містять інтрони у своєму складі. Отже, геном *S. cerevisiae* є очевидною перехідною ланкою між геномами прокаріотів і вищих еукаріотів (див. табл. 1.1; розділ 6).

Цикл розвитку *S. cerevisiae* зображено на рис. 5.10. Диплоїдна клітина здатна розмножуватись брунькуванням: відбувається мітоз, поділ ядра, формування клітинної стінки та поділ клітин. В умовах нестачі поживних речовин здійснюється споруляція, коли диплоїдна клітина розділяється шляхом мейозу. Чотири гаплоїдні нащадки утворюють аскоспори, що інкапсулюються разом у структуру, яку називають аском. Споруюляція є можливою тільки для диплоїдних клітин, гетерозиготних за локусом *MAT*, – таких, що несуть два алелі цього локусу, які позначаються як *MATa* й *MATα*. Відповідно, утворюються гаплоїдні аскоспори двох типів: *a* та *α*.

Тип спори є так званим типом спарювання, або своєрідною "статтю" гаплоїдних клітин. При перенесенні аска на поживне середовище відбувається розмноження спор вегетативним шляхом, а також спарювання між "різностатевими" спорами з утворенням диплоїдної клітини. Використовуючи аски різних штамів, можна проводити схрещування між ними й досліджувати їхні результати методами генетичного аналізу. Для отримання "гібридних" штамів зазвичай використовують комплементарні генетичні маркери: наприклад, якщо клітини одного



штаму не розмножуються на середовищі без триптофану, а іншого – потребують гістидин, то на відповідному середовищі можна відібрати "гібридні" диплоїдні колонії.

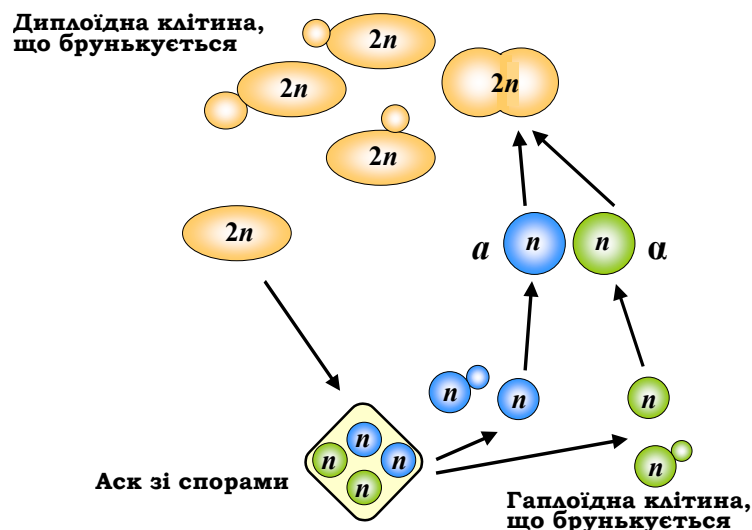
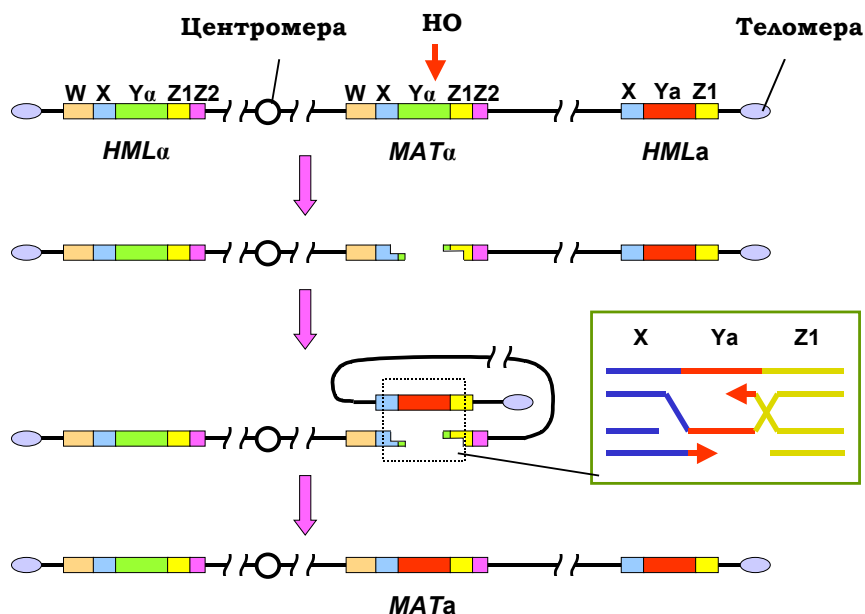


Рис. 5.10. Життєвий цикл аскоміцета *Saccharomyces cerevisiae*

Якщо ізолювати окрему аскоспору, то її потомство, яке виникне за рахунок брунькування, має складатися з клітин одного типу. Проте такий штам не буде насправді моноспоровим, якщо в нього присутній ген *HO*, який забезпечує перемикання типів клітин: клітина *a* утворює бруньку типу  $\alpha$  (або навпаки). Звичайно, у цьому випадку клітини різного типу, що накопичуються, будуть спарюватися з утворенням диплоїдних гетерозигот, які врешті-решт і будуть переважати в культурі.

Перемикання типів клітин у *S. cerevisiae* є прикладом програмованої геномної перебудови. Локус *MAT* розташований у правому плечі третьої хромосоми: елемент послідовності  $Ya$  або  $Y\alpha$ , який визначає алельну форму локусу, фланкований кількома іншими елементами з обох боків (рис. 5.11, де зображено конфігурацію, що відповідає алелю *MAT $\alpha$* ). Поблизу від лівої та правої теломер є дві так звані касети, що являють собою алелі  $\alpha$  та *a* відповідно. Але касети (позначаються як *HML $\alpha$*  та *HML*a**) знаходяться у субтеломерних гетерохроматинових зонах, і тому не експресуються – вони недоступні для системи транскрипції внаслідок додаткової компактизації хроматину (див. розділ 6).

При перемиканні типів клітин спрацьовує ген *HO*, який кодує специфічну нуклеазу. Нуклеаза *HO* розрізає локус *MAT* у зоні елемента  $Y_{\alpha}$  (або  $Y_{\alpha}$ ). Наступні події еквівалентні схемі гомологічної рекомбінації (порівн. рис. 5.11 і 1.25): дволанцюговий розріз розширюється з утворенням двох 3'-кінцевих одноланцюгових хвостів, у хромосомі утворюється петля й гомологічна касета *HML $\alpha$*  підводиться до зони розрізу, відбувається репараційний синтез ДНК на ланцюгах ДНК касети. Результатом є конверсія гена: заміна локусу *MAT $\alpha$*  на локус *MAT $\alpha$* . Обидві касети при цьому залишаються в незмінному вигляді, і в майбутніх поколіннях ліва касета може бути використана для зворотного перемикання локусу *MAT $\alpha$*  на *MAT $\alpha$* .



**Рис. 5.11.** Схема перемикання типу спарювання у *S. cerevisiae*. Якщо в центрі міститься локус *MAT $\alpha$* , для конверсії використовується касета *HML $\alpha$*

Результатом синтезу ДНК, що зображено на вставці рис. 5.11, буде утворення двох структур Холідея (порівн. рис. 1.26). Як пояснювалось у розділі 1, є два рівноймовірні шляхи розділення цих структур: із кросинговером між двома дуплексами та без (див. також рис. 1.28). У випадку, зображеному на рис. 5.11, кросинговер між двома дуплексами, що належать одній хромосомі, зумовить делецію – вирізання ділянки між локусом *MAT* і касетою *HML $\alpha$* . Отже, у цьому разі спрямо-

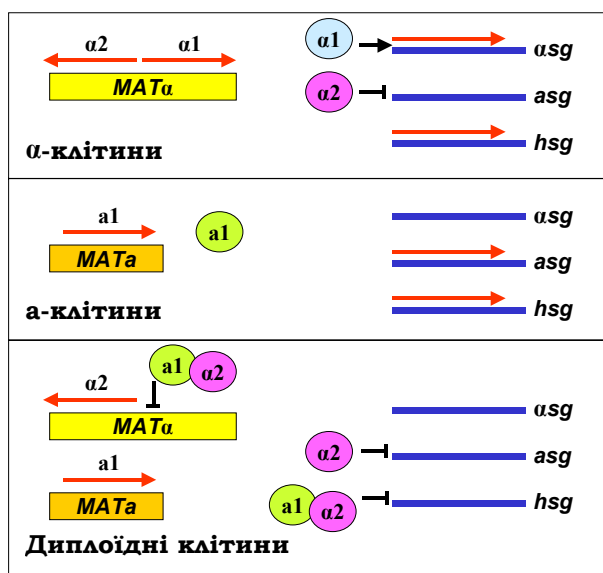
вано реалізуються лише такі варіанти розділення, які не приводять до кросинговеру та, відповідно, хромосомних аберацій.

Слід зауважити, що й при міжхроматидній гомологічній рекомбінації не завжди кросинговер і конверсія без кросинговеру є рівноймовірними подіями. Так, при рекомбінації під час мітозу диплоїдних клітин дріжджів кросинговер відбувається лише в 10 % рекомбінаційних подій. Таким чином, принаймні в деяких випадках, процеси гомологічної рекомбінації можуть здійснюватися саме з метою конверсії геномної ділянки, яка б не супроводжувалась кросинговером.

Касетний механізм перемикання активності генів є досить поширеним: аналогічні процеси описано для інших видів аскоміцетів, трипаносом і деяких бактерій. Крім того, такий механізм напевно реалізується при внутрішньохромосомній гомологічній рекомбінації на генах, що тандемно повторюються (за принципом, який ілюструє рис. 5.11, і без кросинговеру), з метою підтримувати ідентичність тандемних копій: мутація в одній з таких копій з високою імовірністю буде елімінована за рахунок використання іншої з багатьох нормальних гомологічних ділянок як матриці.

Повернемося до перемикання типів клітин у *S. cerevisiae*, яке є також добре вивченим прикладом взаємодії генів на рівні регуляції транскрипції. Приблизно по центру локусу *MATa* розташована операторна ділянка, що активує два промотори, з яких відбувається транскрипція у двох протилежних напрямках. Продуктами цих генів є два білки  $\alpha 1$  та  $\alpha 2$  – транскрипційні фактори. Перший із них активує транскрипцію групи генів, які визначають специфічні ознаки клітин  $\alpha$ -типу, другий – є репресором для групи  $\alpha$ -специфічних генів (рис. 5.12). При цьому в гаплоїдних клітинах обох типів експресується група генів, специфічних для гаплоїдних клітин узагалі – за рахунок активації іншим фактором транскрипції. У клітинах  $\alpha$ -типу з локусу *MATa* експресується білок  $\alpha 1$ , який сам по собі не впливає на транскрипцію зазначених груп генів, але відсутність білків  $\alpha 1$  і  $\alpha 2$  зумовлює активацію  $\alpha$ -специфічних (за відсутності репресора) і вимикання  $\alpha$ -специфічних (за відсутності активатора) генів (рис. 5.12). У гетерозиготних за обома *MAT*-локусами диплоїдних клітинах білок  $\alpha 1$  утворює комплекс із  $\alpha 2$ , який ефективно блокує транскрипцію  $\alpha 1$  (у результаті  $\alpha$ -специфічні гени знову вимкнено), а також транскрипцію генів, специфічних для гаплоїдних клітин (рис. 5.12).

Крім того, комплекс  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  є репресором гена *HO*, який не здатен ініціювати процес рекомбінації, зображений на рис. 5.11, у диплоїдних клітинах. Активація цього гена в гаплоїдних клітинах потребує набору певних активаторів транскрипції, поява яких узгоджена з регуляцією клітинного циклу: вони з'являються тільки на пізній G1-стадії, коли й може розпочатися перемикання типів клітин.



**Рис. 5.12.** Схема регуляції транскрипції в диплоїдних і гаплоїдних клітинах двох типів *S. cerevisiae*. Червоні стрілки – мРНК, овали – відповідні білкові продукти, які є факторами транскрипції груп генів, котрі специфічно виявляються в гаплоїдних клітинах узагалі (*hsg*),  $\alpha$ -клітинах (*asg*) та  $a$ -клітинах (*asg*)

Але регуляція активності гена *HO* є ще складнішою та не до кінця з'ясованою. Справа в тому, що після мітозу гаплоїдна спора продукує два типи клітин, які дещо розрізняються за властивостями, – так звані материнську та дочірню. Перемикання типів клітин відбувається тільки в материнській клітині, дочірня не здатна це робити, оскільки ген *HO* не активується. Отже, материнська клітина змінює свій тип – наприклад, *a* на  $\alpha$ , і відбувається поділ з утворенням двох  $\alpha$ -клітин, одна з яких знову є материнською і змінює свій тип на *a*, а інша – дочірньою, вона залишається клітиною  $\alpha$ -типу.

Така асиметрія продуктів мітозу є характерною також для диференціації клітин багатоклітинних організмів, коли стовбурова клітина дає початок стовбуровій клітині та клітині, котра є більш спеціалізованою та такою, що втратила частину потенціалу розвитку. Розглянуті приклади відображають лише невелику частину вивчених для *S. cerevisiae* генетичних механізмів, які допомагають з'ясувати загальні закономірності функціонування еукаріотичного апарату спадковості.

## Інфузорія

Генетичний апарат інфузорій відрізняється унікальною особливістю: у клітині присутні не одне, а два ядра – мікро- та макронуклеус. Перший із них містить диплоїдний набір хромосом (наприклад, у *Tetrahymena thermophila* п'ять пар хромосом), які є тільки сховищем спадкової інформації – гени мікронуклеуса не експресуються. У макронуклеусі хромосомний набір є багатократно дуплікованим (кілька сотень хромосом), і саме гени макронуклеуса активно експресуються, але при цьому не передаються нащадкам.

При нестатевому розмноженні поділ мікронуклеуса здійснюється шляхом мітозу, а макронуклеуса – шляхом простого поділу, тобто з часом він старіє, і його активність знижується. Тоді між двома клітинами проходить статевий процес: відбувається кон'югація, під час якої макронуклеуси руйнуються, мікронуклеуси розділяються шляхом мейозу, і клітини обмінюються гаплоїдними ядрами – деталі процесу можуть розрізнятися для різних видів, але в результаті утворюються клітини, що мають по одному диплоїдному мікронуклеусу. Негайно після цього здійснюється його мітотичний поділ, і одне з дочірніх ядер перетворюється на макронуклеус.

Під час формування макронуклеуса геном не тільки багатократно дуплікується, а й піддається суттєвим перебудовам. Спочатку в складі ядра-попередника макронуклеуса проходять багатократні раунди реплікації ДНК – політенізація хромосом. Далі видаляються численні елементи послідовності ДНК (IES – internal eliminated sequences), розташовані всередині генів мікронуклеуса (таким чином, гени мікронуклеуса, що перериваються IES, у принципі не можуть бути експресованими). Після стикування кодуєчих послідовностей генів здійснюється фрагментація хромосом на своєрідні мікрохромосоми – кожна має один або кілька генів і теломери на кінцях, які синтезуються теломеразою. Під час фрагментації хромосом видаляються також усі міжгенні зони, послідовності, що повторюються, і мобільні елементи – прибирається все беззмислове "сміття". Загалом видаляється до 90 % геному. Нарешті, мікрохромосоми ампліфікуються в 4–6 раундах реплікації – процес дозрівання макронуклеуса завершується.

Геном макронуклеуса інфузорії *Tetrahymena thermophila* вже встановлено. Він містить 27 тис. генів – стільки ж, скільки у вищих еукаріотів (навіть трохи більше, ніж у людини). Унаслідок видалення значної частини ДНК загальний розмір геному (гаплоїдного набору) дорівнює 105 млн пар основ (у 30 разів менше, ніж у ссавців), вміст послідовностей, що повторюються становить ~2 %. Цікавою особливістю генетично-

го апарату *Tetrahymena* є те, що кодони UAA та UAG (стоп-кодони для більшості організмів) кодують амінокислоту глютамін: тільки UGA використовується як стоп-кодон.

Незвичайна система функціонування спадкового апарату інфузорій ставить важливе фундаментальне питання: чому в еукаріотичних геномах зберігається велика кількість беззмстовної ДНК? При тому, що загальна структура геному інфузорії практично не відрізняється від такої вищих еукаріотів, реалізується механізм видалення беззмстовних послідовностей при утворенні макронуклеуса. Отже, ці послідовності не потрібні для експресії генетичної інформації. Проте ці "зайві" послідовності, як і в інших еукаріотів, ретельно зберігаються в мікронуклеусі й передаються нащадкам. У чому може полягати адаптивне значення такого збереження, залишається не зовсім зрозумілим. Утім, принаймні одна відповідь на це питання здається очевидною: беззмстовна ДНК є саме тією "обкладинкою", в якій зберігається змістовна ДНК, або своєрідним буфером, що захищає змістовний генетичний матеріал від пошкоджуючих впливів. Адже зовнішні мутагенні фактори імовірніше спрямовані на беззмстовну ДНК через те, що вона становить переважну більшість еукаріотичного геному.

### Контрольні запитання і завдання

1. Яка різниця між бактеріальними штамами типів F<sup>+</sup> і Hfr?
2. Якими шляхами здійснюється перенесення генетичного матеріалу між бактеріями?
3. На які класи можна поділити бактеріофаги за типом носія генетичної інформації?
4. Поясніть різницю між сайт-специфічною та гомологічною рекомбінацією. Яке функціональне значення має сайт-специфічна рекомбінація?
5. Опишіть життєвий цикл бактеріофага  $\lambda$ . Від чого залежить вибір шляхів розвитку цього фага?
6. Яку функцію виконує репресор фага  $\lambda$ ? У чому полягає механізм його дії?
7. На які класи та за яким принципом поділяють еукаріотичні віруси?
8. Опишіть цикл розвитку ретровірусів.
9. Як відбувається розмноження *Saccharomyces cerevisiae*?
10. За яким механізмом здійснюється перемикання типів спарювання в *S. cerevisiae*?
11. У чому полягає структурна та функціональна різниця між макрота мікронуклеусом у інфузорій?



## РОЗДІЛ 6

# Генетика багатоклітинних еукаріотів

Найхарактернішими особливостями організації спадкового апарату еукаріотів порівняно з прокаріотами є (див. також розділи 1 і 2):

- Наявність клітинного ядра з кількома молекулами ДНК, які є компонентами складних білково-нуклеїнових комплексів – хромосом.
- Присутність, поряд із головним ядерним спадковим апаратом, цитоплазматичних елементів спадковості – ДНК усередині мітохондрій і хлоропластів.
- Великий розмір еукаріотичних геномів, причому значна частка припадає на послідовності ДНК, які повторюються багато разів.
- Мозаїчний принцип будови еукаріотичних генів, причому один ген може давати кілька різних функціональних продуктів за рахунок альтернативного сплайсингу.
- Велика кількість генів, причому всі клітини багатоклітинного організму (за винятком деяких) містять ідентичні набори генів, хоча більша їхня частка є неактивною у клітинах даного типу. Це викликає необхідність реалізації складної системи регуляції експресії генів у процесі диференціювання клітин під час онтогенезу. Одним із важливих елементів цієї системи є епігенетична спадковість – забезпечення спадкування дочірніми клітинами не просто набору генів, а й системи специфічного блокування певної їхньої частини.
- Статевий процес, що лежить в основі розмноження переважної більшості багатоклітинних організмів: нащадок отримує два набори алельних генів від двох батьків різної статі. Механізми визначення статі є важливим розділом генетики еукаріотів.

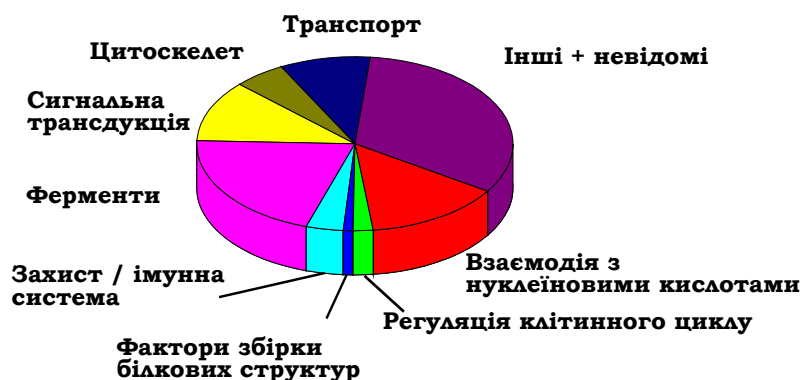
Базуючись на матеріалі попередніх розділів, розглянемо ці особливості детальніше.

## ЕУКАРІОТИЧНІ ГЕНОМИ

### Загальні риси будови еукаріотичних геномів

Усі гени багатоклітинного організму можна розділити на дві групи: 1) гени, від яких залежать певні універсальні функції, і які є активними в усіх клітинах, – "гени домашнього господарства" (housekeeping genes); 2) гени, що специфічно активуються в клітинах певного типу, – "гени розкоші" (luxury genes). Досить загальною ознакою генів першої групи є розташування в їхніх регуляторних зонах так званих *CpG-острівців* – ділянок із підвищеним вмістом динуклеотидів CpG (мається на увазі послідовність нуклеотидів *уздовж* подвійної спіралі). Загалом вміст цих динуклетидів у еукаріотичних геномах приблизно у п'ять разів менший за очікуваний унаслідок метилювання цитозину в складі CpG-контакту: 5mC (5-метилицитозин) спонтанно перетворюється на тимін, що є одним із джерел виникнення мутацій. Метилювання цитозину в регуляторних ділянках є одним із механізмів репресії генів (див. нижче). Відповідно, гени, які зберігають свою активність у більшості клітин, містять неметилювані динуклеотиди CpG, вміст яких зберігається на високому рівні.

Загальна кількість білкових генів у геномах вищих еукаріотів варіює приблизно від 20 до 30 тис. (див. табл. 1.1). Приблизний розподіл еукаріотичних білків за їхніми функціями показано на рис. 6.1.



**Рис. 6.1.** Приблизний розподіл білків еукаріотичного протеому за функціями



Серед еукаріотичних генів 25–50 % є унікальними (представлені в геномі єдиною копією), решта належать до родин генів, що складаються з кількох копій, як правило, не ідентичних. Відповідні (гомологічні але не ідентичні) білки становлять родину білків. Кілька родин (протеїнкінази, транскрипційні фактори певного типу, імуноглобуліни) містять сотні білків, більшість родин складається з кількох (до 30) білків. Гени такої родини часто об'єднані в геномі в кластери – знаходяться поряд у певній хромосомі (кластери генів теплового шоку, глобінові гени). Слід зауважити, що такий кластер не є опероном – кожен ген піддається регуляції як окрема одиниця транскрипції. Наприклад, кластер генів  $\beta$ -субодиниці гемоглобіну містить гомологічні гени, які активуються на певних стадіях індивідуального розвитку (рис. 6.2). Проте всі гени кластеру мають також спільну регуляторну зону, яка відповідає за загальний потенційно активний стан кластеру в клітинах, які в принципі мають здійснювати синтез гемоглобіну.



**Рис. 6.2.** Кластер  $\beta$ -глобіну в 16 хромосомі людини (кожен ген містить інтрони). Указано стадії розвитку, на яких відповідні гени є активними

$\beta$ -Глобіновий кластер містить також неактивний псевдоген (див. розділ 1). Після дезактивації гена (порушення внаслідок мутації ініціації транскрипції, сплайсингу тощо) псевдоген перестає бути об'єктом відбору, і в ньому накопичується велика кількість мутацій. Зрозуміло, що в першу чергу псевдогени з'являються саме в кластерах – коли є кілька копій гена, і пошкодження одного з них не приводить до фатальних наслідків.

Кілька генних кластерів повторюються в геномі багато разів. Серед білкових генів це стосується генів гістонів (див. розділ 1) – гени п'яти молекул гістонів завжди згруповані в кластер (кожен ген – окрема одиниця транскрипції), який повторюється до 100 разів. Іншим прикладом кластерів, що повторюються, є гени рибосомної РНК (див. розділ 2), але в цьому випадку кластер є одиницею транскрипції.

Крім генів, що повторюються, еукаріотичний геном містить значну кількість інших послідовностей, що повторюються (до 50 % геному). Основні типи таких повторів, крім уже згаданих псевдогенів, такі:

1. **Тандемні повтори.** До таких відносять багатократні повтори коротких послідовностей по 6–8 пар основ у теломерах і повтори так званої  $\alpha$ -сателітної ДНК у центромерах (довжина повтору варіює від 7 пар основ у дрозофіли до 100–200 пар основ у ссавців, у людини – 171 пара основ). По всьому геному розподілені також так звані прості повтори (SSR, simple sequence repeats). Зазвичай виділяють *мікросателіти* – 1–15 пар основ, що повторюються від 10 до кількох тисяч разів, і *мінісателіти* – 15–500 пар основ, що повторюються до 100 разів. Кількість міні- та мікросателітних локусів становить десятки й сотні тисяч. Розподіл локусів за кількістю повторів є специфічною індивідуальною ознакою – на кшталт відбитків пальців.

2. **Сегментні дуплікації** – великі блоки довжиною 1–200 тис. пар основ, які характеризуються високим ступенем гомології. Імовірно, сегментні дуплікації є продуктом колишніх порушень хромосом. Частіше зустрічаються в перицентромерних і субтеломерних зонах.

3. **Інтерсперсні (мобільні) елементи**, здатні до переміщення та розмноження в межах геному, становлять основну кількість ДНК, що повторюється. Частина таких послідовностей є результатом колишньої активності мобільних елементів (таких, що втратили здатність до переміщення). Основні типи еукаріотичних мобільних елементів:

- **ДНК-транспозони** – переміщення здійснюється шляхом вирізання ділянки ДНК із наступним вбудовуванням її в інше місце – цілком аналогічно до відповідних елементів у прокариотів. Транспозони містять один або два гени (у різних видів), що кодують *транспозазу* – фермент, який забезпечує транспозицію елемента, – його вирізання з донорного сайту та вбудовування в сайт-мішень. Гени транспозази можуть бути пошкодженими – тоді транспозиція даного елемента відбувається з використанням транспозази, закодованої іншим ДНК-транспозоном.

Кодуюча частина транспозона фланкована невеликими інвертованими повторами, які впізнає транспозаза, вирізаючи фрагмент ДНК. Сайт-мішень – невелика специфічна послідовність ДНК, котра теж впізнається транспозазою і теж розрізається, після чого транспозаза каталізує вбудовування транспозона до сайту-мішені (рис. 6.3). Процес транспозиції залишає дволанцюговий розріз у місці, де містився транспозон. У разі незалежної від реплікації транспозиції (*нереплікативна транспозиція*), цей розріз піддається репарації за механізмом негомологічного з'єднання кінців (див. розділ 1). Тобто транспозон просто "стрибає" в інше місце. Але досить часто транспозиція

відбувається під час реплікації (*реплікативна транспозиція*) – тоді розріз репарується за механізмом гомологічної рекомбінації (див рис. 1.26): сестринська молекула ДНК використовується як матриця, і ділянка, що містила транспозон, відновлюється – транспозон і стрибає в інше місце, і залишається в донорному сайті, тобто "розмножується".

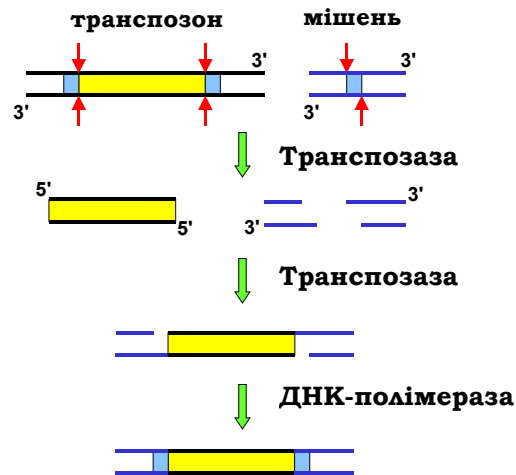


Рис. 6.3. Механізм переміщення ДНК-транспозона

- **LTR-ретропозони** – елементи послідовності, що містять довгі кінцеві повтори – Long Terminal Repeats – і кілька генів, зокрема ген зворотної транскриптази та інтегрази (аналог транспозази). Як і для наступних двох типів мобільних елементів, переміщення відбувається через проміжну молекулу РНК. Процес переміщення копії LTR-ретропозона нагадує життєвий цикл ретровірусів (див. рис. 5.9). Першим етапом є транскрипція ретропозона, після чого синтезована мРНК транспортується до цитоплазми, де піддається трансляції. Зворотна транскриптаза, яка є продуктом цієї трансляції, здійснює синтез ДНК: мРНК використовується як матриця, 3'-кінець молекули тРНК – як праймер. Комплекс синтезованої ДНК-копії ретропозона з інтегразою повертається до ядра, де ця ДНК вбудовується в геном.
- **Інтерсперсні елементи LINE** (Long Interspersed Elements) містять кілька генів, включаючи ген зворотної транскриптази. Після транскрипції та наступної трансляції мРНК у цитоплазмі синтезовані білки зв'язуються з мРНК, цей комплекс поверта-

ється до ядра, де й відбувається зворотна транскрипція та вбудовування елемента в геном. Синтез мРНК при транскрипції елемента LINE, як і для більшості інших еукаріотичних мРНК, закінчується на polyA-сигналі (див. розділ 2). Цей сигнал слабкий, що дозволяє елементу вбудовуватись в інтрони звичайних генів без особливих перешкод для експресії цих генів: система процесингу часто не помічає слабкий polyA-сигнал. Елементи LINE є, відповідно, надзвичайно поширеними мобільними елементами в геномі вищих еукаріотів.

Іноді вони є не просто ділянками "егоїстичної ДНК", що автономно розмножуються в геномі, а виконують певні конкретні біологічні функції. Наприклад, у дрозофіли відсутня теломеразна система, і елементи LINE певного типу виконують функцію подовження кінців хромосом після реплікації: зворотна транскриптаза виступає як теломераза, мРНК мобільного елемента – як теломеразна матрична РНК (див. розділ 1). Цікаво, що послідовності ДНК гена теломераз та елементів LINE характеризуються високою гомологією: цілком можливо, що теломеразна система походить від мобільних елементів LINE.

- **Інтерсперсні елементи SINE** (Short INterspersed Elements) – короткі (100–400 пар основ) безмістовні елементи, які використовують для переміщення ферменти системи LINE. До цього класу належить, зокрема, так званий Alu-повтор (назва походить від назви відповідної рестриктази, яка здатна специфічно гідролізувати цей елемент послідовності).

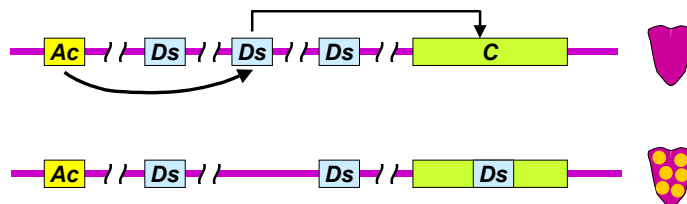
Мобільні елементи розподілені в геномі нерівномірно: є довгі ділянки, які на 90 % представлені мобільними елементами, і такі зони, де інтерсперсні елементи відсутні. Загалом спостерігається негативна кореляція між густиною генів і мобільних елементів. Винятком із цієї закономірності є позитивна кореляція між густиною генів та елементів типу SINE.

## Генетичні ефекти активності мобільних елементів

Очевидним наслідком активності (переміщення) мобільних елементів є мутації, що спостерігаються за умови вбудовування (інсерції) мобільного елемента в кодуючу або регуляторну частину гена. Найкраще вивченими в цьому відношенні модельними об'єктами є кукурудза (саме на цьому об'єкті мобільні елементи були вперше відкриті Барбарою Мак-Клінток, див. історичну довідку наприкінці підручника) і дрозофіла.

У кукурудзи описано кілька родин мобільних елементів (*Ac-Ds*, *Spm*, *Dt*), які належать до класу ДНК-транспозонів. Кожна родина складається з елементів двох типів: *автономних* і *неавтономних*. Автономний елемент (одного типу на родину) здатен до переміщення за рахунок активності транспозази (див. рис. 6.3), що кодується самим автономним елементом. Неавтономні елементи, кількість і розмаїття яких є значно більшими, теж можуть переміщуватись, але тільки за умови, що вони будуть активовані автономними елементами тієї самої родини. Така активація відбувається, якщо об'єднати обидва типи елементів у геномі шляхом відповідних схрещувань. Насправді неавтономні елементи походять від автономних – це транспозони, в яких унаслідок мутацій утрачені (пошкоджені) активні гени транспозази, їхнє переміщення здійснюється за рахунок транспозази автономного елемента.

Наприклад, у родині елементів *Ac-Ds* роль автономного відіграє елемент *Ac*, а численні елементи *Ds* – роль неавтономних, що активуються за умови присутності в будь-якому місці геному елемента *Ac* (рис. 6.4). Активовані елементи *Ds* часто переміщуються (нереплікативним шляхом), вбудовуючись у гени, котрі мають зовнішній прояв: на рис. 6.4 показано ситуацію, коли транспозон порушує ген, який відповідає за пурпурне забарвлення зерна. У результаті виникає мозаїчність забарвлення: при наступних поділах клітини, в якій відбулась така подія, утворюється незабарвлений клон.



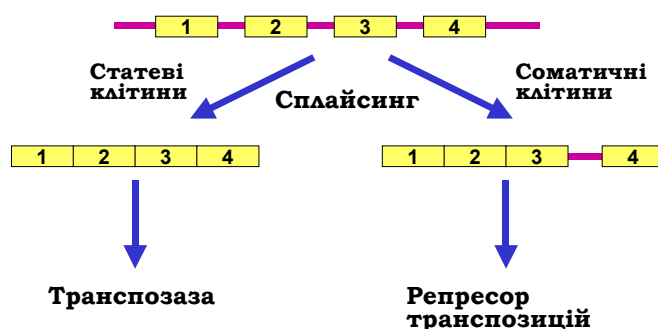
**Рис. 6.4.** Активація елемента *Ds* і його переміщення до гена *C*, який визначає пурпурне забарвлення зерна кукурудзи. Клітинні клони, що походять від клітин, в яких відбулась така подія, втрачають забарвлення

У дрозофіли приблизно 80 % усіх спонтанних мутацій виникає внаслідок інсерції мобільних елементів. У тому числі, саме інсерція мобільного елемента  *copia* (належить до класу LTR-ретропозонів) у локус *w<sup>+</sup>* X-хромосоми приводить до мутації *white*, що згадувалася в розділі 3, – першої описаної мутації дрозофіли.

З активністю групи мобільних елементів дрозофіли класу ДНК-транспозонів – *P-елементів* – тісно пов'язане явище так званого *гібридного дисгенезу* – комплексу дегенеративних аномалій, що приводять до сте-

рильності (мутації, хромосомні аберації, порушення мейозу). Р-елементи (до 30–50 копій) містяться в геномі лабораторних ліній, які так і позначаються як лінії Р-типу, у ліній М-типу Р-елементи відсутні.

Кодуюча частина Р-елемента містить ген транспозази – 4 екзони, що піддаються сплайсингу за двома альтернативними шляхами (рис. 6.5): у статевих клітинах зріла мРНК кодує активну транспозазу; у соматичних клітинах залишається один із інтронів, що приводить до синтезу скороченого білка, який є репресором транспозицій (блокує транскрипцію на Р-елементі). Таким чином, транспозиції Р-елемента є можливими тільки у статевих клітинах.

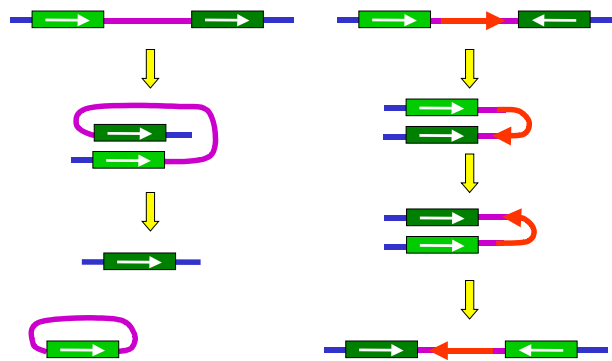


**Рис. 6.5.** Схема будови мобільного Р-елемента дрозофіли (цифрами позначено екзони) і два шляхи альтернативного сплайсингу при транскрипції елемента

Звичайно, транспозиції можуть відбуватися тільки у статевих клітинах мух Р-типу. Але наявність у цитоплазмі яйцеклітини та заплідненого яйця значної кількості репресора транспозицій (материнський фактор) приводить до того, що транспозиції не відбуваються: у схрещуваннях Р-самки з будь-яким самцем народжується нормальне потомство без ознак гібридного дисгенезу. Він спостерігається тільки в нащадків від схрещування Р-самця (у якого присутні Р-елементи) і М-самки (у якої відсутні Р-елементи і, відповідно, репресор транспозицій у цитоплазмі яйця).

Цікаво, що лінії *D. melanogaster*, які було введено в лабораторну культуру понад 50 років тому, належать до М-типу. Мухи, знайдені в природі протягом останніх 30 років, майже завжди відносяться до Р-типу. Можливо, оскільки гібридний дисгенез запобігає схрещуванням мух різних типів, він є одним із механізмів видоутворення – сприяє ізоляції різних популяцій. Слід зауважити, що описана система є не єдиною системою дисгенезу, яка реалізується у дрозофіл.

Поряд із активністю мобільних елементів, сама наявність їх у геномі – наявність багатьох копій гомологічних ділянок ДНК – зумовлює хромосомні перебудови за механізмом гомологічної рекомбінації (див. розділ 1). Рекомбінація між мобільними елементами, які знаходяться в різних локусах двох гомологічних хромосом, є однією з причин нерівного кросинговеру, що розглядався в розділі 3, – реципрокної делеції та дуплікації хромосомних ділянок (див. рис. 3.12).



**Рис. 6.6.** Внутрішньохромосомний кросинговер між гомологічними мобільними елементами, орієнтованими в один бік (ліворуч, делеція ділянки) і в різні боки (праворуч, інверсія ділянки)

Подібним чином гомологічна рекомбінація може відбуватися між мобільними елементами, що містяться в одній хромосомі. Якщо два елементи мають однакову орієнтацію своїх послідовностей, кросинговер між ними зумовлює делецію хромосомної ділянки – із хромосоми видаляється циркулярний елемент ДНК (рис. 6.6, ліворуч). Якщо орієнтація елементів є різною, відбувається інверсія ділянки хромосоми (рис. 6.6, праворуч). Як і при переміщенні мобільних елементів, результатом таких перебудов може бути втрата регуляторних ділянок, "підстановка" регуляторних елементів послідовності під інші гени, зміна напрямку транскрипції тощо.

## Еволюційна зміна геномів

Порівняння відомих геномних послідовностей тварин приводить загалом до висновку, що ключову роль в еволюції відіграє не поява нових кодуєчих послідовностей, а нові комбінації старих і поява нових регуляторних ділянок. При цьому у формуванні нових регуляторних послідовностей значну роль відіграють мобільні елементи.

Вміст мобільних елементів у геномах тварин варіює від 10 до 50 % (наприклад, курка – 9,4, собака – 35,5, миша – 40,9, людина – 45,5, опосум – 52,2 %).

Геноми ссавців дуже незначним чином відрізняються один від одного. Скажімо, для людини та миші спостерігається близько 80 % загальної гомології, при цьому ступінь гомології між екзонами є значно вищою. Навіть різниця в послідовностях білкових генів між людиною та сумчастим опосумом (*Monodelphis domestica*) дуже незначна – переважна більшість генів одного виду має аналогів у іншого. Головна різниця між людиною та опосумом щодо білкових генів – дуплікація частки з них, у результаті 15–20 % генів присутні в геномах двох видів у різній кількості. При цьому різні копії певного гена одного виду розрізняються між собою за кількістю нуклеотидних замін більше, ніж гомологічні гени опосума та людини, які присутні в геномах однократно. Це вказує на можливість виникнення нових генів шляхом дуплікації: нова копія гена або набуває нової функції (частіше як варіації старої), або стає зайвою. У першому випадку ген починає змінюватись під дією відбору, у другому – швидко деградує, накопичує нейтральні мутації та стає псевдогеном.

Але загалом за 180 млн років в екзонах сумчастих і плацентарних виникло дуже мало варіацій. Напевно, еволюція вищих еукаріотів головним чином відбувається за рахунок змін у регуляторних ділянках геному, а також рекомбінації екзонів і переміщення генів у активні / неактивні зони хромосом унаслідок хромосомних аберацій (див. нижче обговорення ефекту положення гена).

Один із підходів до ідентифікації регуляторних елементів – виявлення шляхом порівняльного аналізу гомологічних для різних геномів, консервативних ділянок серед некодуючих послідовностей – CNE (conserved non-coding elements). Такий порівняльний аналіз опосума, курки та плацентарних дозволив виявити CNE трьох типів: спільні для птахів і ссавців; спільні для всіх плацентарних, але також частково присутні у птахів і опосума; унікальні для плацентарних. Загальний розмір другої групи в геномі людини – 74 млн пар основ (окремі елементи мають розмір від десятків до сотень пар), з яких 20 % є унікальними для плацентарних (серед кодуючих ділянок частка таких унікальних послідовностей становить 1 %). Отже, основна частина еволюційних змін плацентарних пов'язана з появою нових регуляторних ділянок. Серед цих ділянок виявилися, зокрема, енхансери та гени мікро-РНК. Велику кількість CNE знайдено в оточенні ключових регуляторних генів, які визначають шляхи індивідуального розвитку



й диференціації клітин, – при тому, що самі ці гени відрізняються підвищеним консерватизмом. Отже, основні відмінності в будові плацентарних зумовлені додаванням нових регуляторних елементів до генів, що регулюють онтогенез.

Найцікавіше, що серед унікальних для плацентарних CNE принаймні 16 % є ділянками, які походять від мобільних елементів усіх чотирьох груп. Вважається, що ця оцінка є заниженою: значна кількість колишніх мобільних елементів просто значно змінилась за послідовністю після того, як ці елементи стали нерухомими й набули регуляторних функцій.

Висновок про виникнення еволюційних змін шляхом корекції регуляторних систем підтверджується нещодавнім аналізом геному актинії *Nematostella* (найпримітивніший вид серед справжніх багатоклітинних – Eumetazoa). Геном містить 450 млн пар основ, 18 тис. генів (приблизно стільки ж, скільки в людини), частка мобільних елементів становить 25 %. Останній спільний предок актинії, хребетних і комах жив приблизно 700 млн років тому. Порівняльний аналіз вказує, що ссавці успадкували близько 2/3 своїх генів від цього предка, актинії – майже стільки ж, комахи – 50 %. Загалом геном людини більше схожий (і за набором генів, і за порядком розташування їх на хромосомах) на геном актинії, ніж на геном дрозофіли.

Близько 80 % генів цього спільного предка Eumetazoa мають аналоги поза межами тваринного царства – серед одноклітинних. Серед решти 20 % генів приблизно чверть містять блоки (екзони або групи екзонів), що зустрічаються в одноклітинних, але в інших комбінаціях. Отже, один із основних шляхів виникнення нових генів – це перекомбінування існуючих екзонів у новому порядку. Звичайно, ці нові гени багатоклітинних відповідають за нові функції: регуляцію онтогенезу, міжклітинні взаємодії, передачу міжклітинних сигналів, регуляцію клітинного циклу тощо.

Таким чином, уже перші представники тварин мали практично повний набір генів, який дозволив шляхом їхньої перекомбінації та тонкої підгонки регуляторних систем створити все розмаїття складних багатоклітинних організмів.

## **Запрограмовані геномні перебудови: V(D)J-рекомбінація імуноглобулінових генів**

Геномні перебудови не завжди є спонтанними. Як згадувалось у розділі 5, існують запрограмовані перебудови генетичного матеріалу. Важливим прикладом таких запрограмованих (але багато в чому хаотичних) змін у певній зоні геному є дозрівання генів імуноглобулінів.

Основою імунної відповіді організму на появу чужорідної молекули чи частинки – антигену – є синтез імуноглобуліну певного типу, який має до цього антигену високу специфічну спорідненість. Кількість типів імуноглобулінів, так само як і антигенів, практично необмежена. Зрозуміло, що закодувати таке розмаїття у вигляді окремих імуноглобулінових генів також неможливо. Еволюційним рішенням цієї проблеми став особливий рекомбінаційний процес дозрівання імуноглобулінових генів.

Молекула імуноглобуліну складається з двох важких і двох легких поліпептидних ланцюгів (рис. 6.7). Кожен із ланцюгів має константну С-кінцеву (спільну для всіх імуноглобулінів) і варіабельну N-кінцеву частини. Варіабельні частини кожної пари важкого й легкого ланцюгів формують два антигензв'язувальні сайти на поверхні молекули.

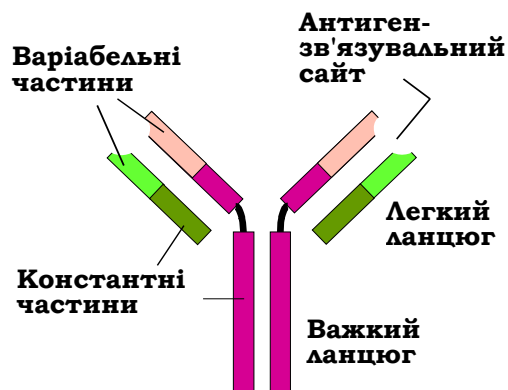
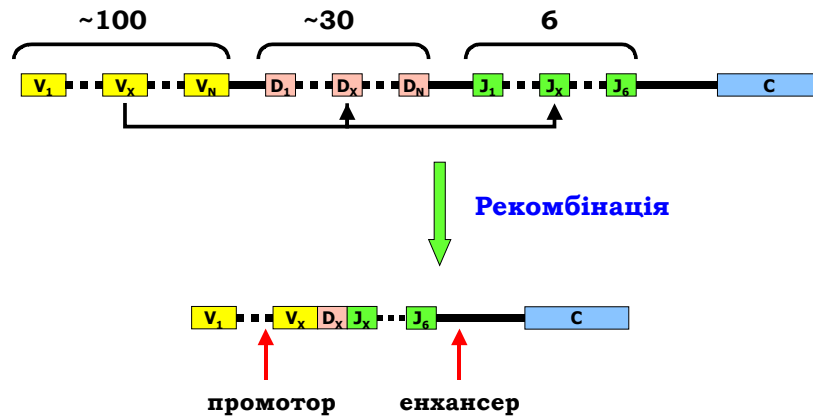


Рис. 6.7. Схема будови імуноглобуліну

Незрілі імуноглобулінові гени мають вигляд кластерів окремих елементів нуклеотидної послідовності – блоків, з яких шляхом рекомбінації в імунокомпетентній клітині будується активний імуноглобуліновий ген. Кластер важкого ланцюга містить ~100 V-сегментів (від *variable*), що тандемно повторюються (послідовності всіх сегментів розрізняються між собою), ~30 D-сегментів (від *diversity*), 6 J-сегментів (від *joining*) і С-ділянку, яка кодує константну частину ланцюга (рис. 6.8). Аналогічно побудований кластер легкого ланцюга, який містить тільки два типи варіабельних сегментів (~100 V- і 4 J-сегменти). Активний ген збирається із сегментів трьох (або двох) типів, як із кубиків, шляхом так званої V(D)J-рекомбінації: один випадковий D-сегмент з'єднується з випадковим J-сегментом (ділянка між ними вирізається), до них приєднується один із V-сегментів (рис. 6.4). Аналогічно, для легкого ланцюга об'єднуються один V- з одним із J-сегментів.

Перед кожним V-сегментом знаходиться промотор, у спейсері перед C-ділянкою – енхансер. Їхнє зближення після рекомбінації активує транскрипцію, зайві спейсери та інтрони константної частини видаляються з мРНК шляхом сплайсингу.



**Рис. 6.8.** Будова кластера генів важкого ланцюга імуноглобуліну та схема збирання активного гена. Константа частина (С) містить інтрони, які не показано

Отже, для важкого ланцюга може реалізуватися ~18 тис. комбінацій між сегментами трьох типів, для легкого – ~400 комбінацій, загалом за рахунок рекомбінації для обох ланцюгів утворюється ~7 млн варіантів послідовності. Додаткова варіабельність забезпечується за рахунок індукції мутацій у межах V-сегментів, а також завдяки застосування особливих механізмів при з'єднанні сегментів.

Рекомбінація залежить від сигнальних послідовностей, що фланкують з двох боків кожен із сегментів і є власне сайтами рекомбінації. Сигнальні послідовності розпізнаються певними білками (гомологами транспозази), які вирізають ділянку між двома сегментами. Після цього 3'-кінці обох сегментів добудовуються шляхом випадкового приєднання нуклеотидів – зрозуміло, що цей процес ще значно підвищує розмаїття послідовностей зрілих генів імуноглобулінів. Частина цих генів буде неактивною завдяки стоп-кодонам, які з певною імовірністю з'являються при такому випадковому синтезі, але це є прийнятною платою за загальне збільшення варіантів.

Нарешті кінці сегментів з'єднуються за допомогою системи репарації дволанцюгових розривів NHEJ (див. рис. 1.25): на останніх стадіях рекомбінації процес з'єднання сегментів імуноглобулінових генів навмисно "загрублюється" з метою підвищення варіабельності.

## ЕПІГЕНЕТИЧНЕ СПАДКУВАННЯ

Великий розмір еукаріотичного геному (до половини якого припадає на послідовності, що повторюються) вимагає існування систем, які б визначали гарантовану інактивацію значної частини генетичного матеріалу. При цьому інактивований стан як некодуючої ДНК, так і значної частини генів у клітинах певного типу має відтворюватись у дочірніх клітинах після мітозу.

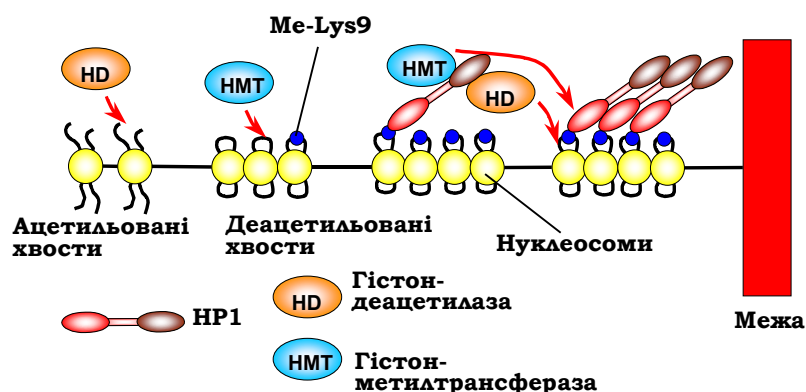
Успадкування такої тканиноспецифічної системи репресії (при збереженні повної генетичної програми даного організму) називають *епігенетичною спадковістю*. В її основі лежить передача клітинам-нащадкам не просто батьківської ДНК, а хроматину разом із певними хімічними маркерами (див. розділ 1) – маються на увазі патерни посттрансляційних модифікацій гістонів і метилювання ДНК. Такі маркери впізнають відповідні білки, які вступають у різноманітні взаємодії з репресорами й корепресорами транскрипції, ферментами, які здійснюють посттрансляційні модифікації, і білками, котрі додатково компактизують хроматинову фібрилу. У першу чергу, подібні системи працюють у ділянках гетерохроматину – частини хроматину, що зберігає високий ступінь компактності протягом інтерфази. Прикладами конститутивного гетерохроматину (такого, що утворюється в усіх клітинах) є теломерні та центромерні зони хромосом, одна з Х-хромосом самок ссавців. Інші гетерохроматинові зони є специфічними для клітин певного типу.

### HP1-залежна система репресії

Прикладом залучення білка HP1 (Heterochromatin Protein 1) до утворення гетерохроматину є центромери хромосом (рис. 6.9). HP1 містить два структурні домени, один з яких упізнає метильовані лізинні залишки гістонів, а інший має спорідненість до певних специфічних гістон-деацетилази (HD) і гістон-метилтрансферази (HMT), а також здатен взаємодіяти з іншою молекулою HP1.

Деацетилювання неупорядкованого хвоста гістона H3 сприяє зв'язуванню специфічної HMT, яка здійснює метилювання Lys9 гістона H3. Цей метильований Lys (Me-Lys9) упізнається HP1, який, у свою чергу, рекрутує HD і HMT, котрі підтримують деацетилюваний статус і здійснюють метилювання суміжних нуклеосом: виникає лавиноподібний процес, що самопідтримується й поширюється на сусідні ділянки. Взаємодія між білками HP1 забезпечує додаткову компактизацію фібрили.

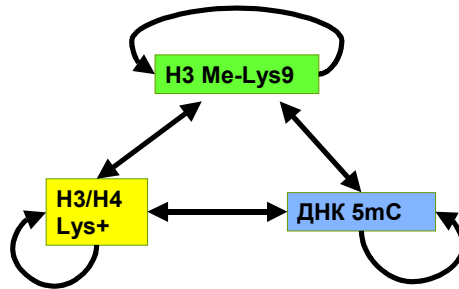
Природу межі, яка відділяє гетерохроматин у центромірній зоні, не з'ясовано, але гранична ділянка містить свій специфічний маркер – метильований Lys4 гістона H3 (і деметильований Lys9).



**Рис. 6.9.** Розповсюдження та самопідтримання гетерохроматинового стану в центромерах

У процесі реплікації, що здійснюється нерівномірно в різних ділянках (гетерохроматин реплікується в останню чергу), білки тимчасово знімаються з ДНК у реплікативній вилці (розділ 1). За точкою реплікації гістони батьківського хроматину (котрі несуть на собі гетерохроматинові маркери) повертаються на дочірні молекули ДНК разом із гістонами, синтезованими *de novo*. HP1 також повертається на той самий локус, де він був присутній, і відновлює патерни модифікацій нових гістонів та компактний (репресований) стан гетерохроматинової ділянки. Тобто гетерохроматиновий стан даного локусу відтворюється в дочірніх клітинах. При цьому HP1 має спорідненість до білків ламіни (розділ 1), що зумовлює розташування гетерохроматину в периферичних зонах клітинного ядра.

Подібна система репресії за участю HP1 широко використовується в інших ділянках гетерохроматину, а також для гарантованого блокування генів в еухроматинових зонах. Метильовання Lys9 гістона H3 і деацетильований стан лізинів гістонів H3/H4 є найхарактернішою ознакою таких ділянок. Обидві модифікації, як описано вище, самопідтримуються та підтримують одна одну через опосередковану дію HP1. При цьому важливу роль у забезпеченні репресованого стану відіграє метильовання цитозинів ДНК – інша ковалентна модифікація, яка також відновлюється при клітинному поділі й замикає своєрідне "коло репресії" (рис. 6.10).



**Рис. 6.10.** Взаємний вплив деацетилювання гістонів, метилювання Lys9 гістона H3 і метилювання ДНК у гетерохроматині. Lys+ – деацетилювані лізини

## Метилювання ДНК

Патерн тканиноспецифічного метилювання ДНК (утворення 5mC у складі динуклеотидів CpG, рис. 6.11) є результатом двох процесів: підтримання метильованого статусу після реплікації та метилювання *de novo*.



**Рис. 6.11.** Динуклеотид CpG у ДНК – субстрат метилювання

Підтримуюча ДНК-метилтрансфераза спрацьовує протягом 1–2 хв після реплікації: дві дочірні молекули ДНК містять батьківський ланцюг ДНК (із 5mC у складі CpG) і синтезований ланцюг, де цитозин не є метильованим. Метилтрансфераза впізнає такі напівметилювані динуклеотидні контакти й відновлює симетрію щодо метилювання C. За рахунок цього процесу патерн метилювання відтворюється в дочірніх клітинах, що є, поряд із відновленням модифікацій гістонів, одним із важливих механізмів епігенетичного спадкування.

Інші ДНК-метилтрансферази здійснюють метилювання ДНК *de novo*. Особливо важливим цей процес є на ранніх стадіях ембріонального розвитку, коли ДНК тотально деметилювана. У процесі розвитку здійснюється метилювання, яке визначає специфічне вимикання певних

груп генів при диференціюванні клітин. Крім того, деметильовання є можливим і в диференційованих клітинах, де метилтрансферази використовуються для відновлення метильованого статусу.

Залучення 5mC до репресії пов'язане з наявністю у складі певних білків особливих структурних модулів – MBD (Methyl Binding Domain), які мають специфічну спорідненість до метильованих динуклеотидів CpG. Білки, що містять MBD, є компонентами різноманітних репресуючих комплексів. Зокрема, такі білки рекрутують до метильованих ділянок хроматину гістон-деацетилази та гістон-метилтрансферази. І навпаки: Me-Lys9 розпізнається білком, котрий містить хромодомен і рекрутує ДНК-метилтрансферазу (рис. 6.10).

Хоча Me-Lys9 і 5mC є загальними маркерами конститутивно репресованих ділянок хроматину, не завжди репресія та додаткова компактизація залежить від HP1. Прикладом іншої системи є інактивація однієї з X-хромосом у клітинах самок ссавців (див. підрозділ, присвячений генетиці статі). У складі X-хромосоми, яка буде інактивованою (обирається випадково на ранніх стадіях розвитку), спрацьовує ген *Xist*, що продукує велику некодуючу молекулу РНК. Ці РНК укривають собою хромосому і взаємодіють з низкою білків, серед яких – гістон-метилтрансфераза (здійснює метильовання Lys9 гістона H3). Метильовання Lys9 зумовлює метильовання ДНК, що приводить до епігенетичного спадкування. Крім того, до X-хромосоми рекрутуються структурні компактизуючі білки (але не HP1).

## Гетерохроматин і РНК-інтерференція

Гетерохроматин утворюється в першу чергу на послідовностях ДНК, що повторюються. Причому має значення не послідовність як така, а саме наявність повторів: штучне введення повторів до геномної ділянки викликає утворення гетерохроматинової зони. У формуванні й підтриманні гетерохроматинового стану повторів (принаймні в центромерах) важливу роль відіграє процес РНК-інтерференції (див. розділ 2).

При порушенні компактизації на центромерних повторах може відбуватися спонтанна транскрипція в різних напрямках. Оскільки матрицею є повтори, існує висока ймовірність синтезу комплементарних молекул РНК: утвориться дволанцюгова РНК, яка запустить процес інтерференції – нуклеаза Dicer розрізає дволанцюгову РНК на фрагменти (можуть бути далі ампліфіковані РНК-залежною РНК-полімеразою), які залучаються до комплексу RISC. У складі комплексу РНК взаємодіють

із транскриптами, і відбувається деградація останніх. Крім деградації, інтерференція має інший наслідок: RISC, який опиняється в зоні повторів, рекрутує до хроматину гістон-метилтрансферазу, яка здійснює метилювання Lys9 гістона H3. За вже відомою схемою (рис. 6.9, 6.10) відбувається зв'язування HP1 і компактизація гетерохроматину.

Гетерохроматин формується також у зонах скупчення мобільних елементів. Активність мобільних елементів може контролюватися організмом – відповідну систему пригнічення транскрипції мобільних елементів, котрі використовують РНК як проміжну стадію, знайдено як у дрозофіли, так і в мишей. Система вмикається при сперматогенезі та складається з білків родини Piwi й коротких регуляторних РНК, комплементарних ділянкам мРНК, яка синтезується на мобільних елементах. Ці РНК і білки Piwi об'єднуються в комплекс. РНК спрямовує цей комплекс на мРНК мобільного елемента, білки комплексу здійснюють деградацію мРНК, що й запобігає переміщенню – загалом така система є аналогічною процесу РНК-інтерференції. Крім того, від присутності згаданих регуляторних РНК залежить також інтенсивне метилювання ДНК мобільних елементів, яке зумовлює конститутивну репресію їхньої транскрипції.

## Ефект положення гена

Описаний досить давно ефект залежності прояву гена від його положення у хромосомі має безпосереднє відношення до епігенетичного спадкування гетерохроматинового стану.

Один із прикладів ефекту положення демонструє рис. 6.12: штучно індукована у статевих клітинах дрозофіли хромосомна перебудова з інверсією ділянки, яка на одному кінці містить ген  $w^+$  (червоні очі дикого типу), а на іншому – частину перичентромерної гетерохроматинової зони з межею, що не дозволяє гетерохроматину розповсюджуватися. Після такої інверсії на ранніх стадіях ембріонального розвитку гетерохроматин (який тепер не має межі) іноді поширюється на ген  $w^+$ , що опинився поряд. Це приводить до вимкнення гена, і такий залежний від структури гетерохроматину репресований стан спадкується при мітозі. У результаті утворюються групи клітин білого кольору – мозаїчне око.

Якщо внаслідок хромосомних перебудов, нерівного кросинговеру або активності мобільних елементів поряд із гетерохроматиною зоною опиняється група генів, то частота (імовірність) їхнього вимкнення залежить від порядку розташування – ген, що знаходиться ближче до гетерохроматинової ділянки, вимикається частіше.



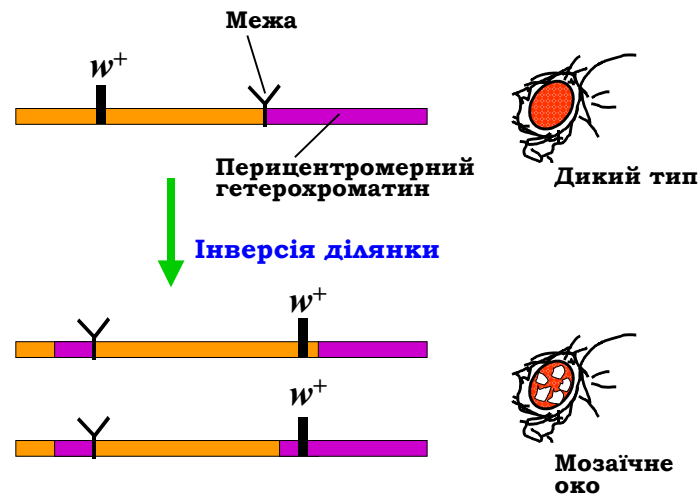


Рис. 6.12. Приклад ефекту положення гена – утворення мозаїчного ока дрозофіли

## ЦИТОПЛАЗМАТИЧНА СПАДКОВІСТЬ: ГЕНЕТИКА МІТОХОНДРІЙ І ХЛОРОПЛАСТІВ

Переважна більшість еукаріотичних генів міститься в клітинному ядрі. Крім ядра, свій власний генетичний матеріал мають цитоплазматичні органели еукаріотичної клітини: мітохондрії та хлоропласти. Геноми цих органел містять гени білків і РНК, необхідні для їхнього функціонування. За своєю організацією геноми органел значно відрізняються від ядерного геному й нагадують геноми прокариотів. Молекулярна машинерія, яка забезпечує експресію генетичної інформації в органелах, також подібна до прокариотичної. Ці факти лягли в основу *ендосимбіотичної теорії* походження мітохондрій і пластид, відповідно до якої органели виникли в результаті незалежних ендосимбіотичних подій: вільно існуючі  $\alpha$ -протобактерії та ціанобактерії були захоплені протоеукаріотичною клітиною-хазяїном і еволюціонували у специфічні органели (мітохондрії та хлоропласти відповідно), які відповідають за дихання та фотосинтез. Під час коєволюції клітини-хазяїна й ендосимбіонта частина мітохондріальних і хлоропластних генів (інколи досить значна частина) була перенесена в ядерний ге-

ном. Таким чином, наявність власного генетичного апарату забезпечує мітохондріям і хлоропластам своєрідну автономність від ядерного геному, але велика кількість компонентів, потрібних для виконання їхніх функцій, кодується ядерним геномом.

## Геноми мітохондрій

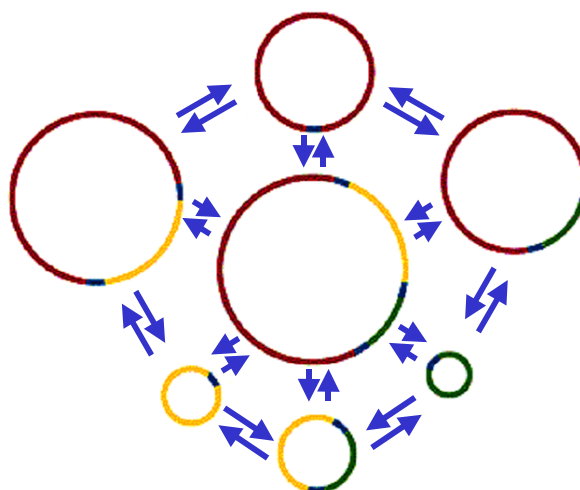
Мітохондрії, які присутні практично в усіх еукаріотів за деякими винятками, відіграють центральну роль у синтезі АТФ і деяких інших важливих фізіологічних процесах. Кількість мітохондрій на одну клітину може варіювати від декількох штук (наприклад, у сперміях) до декількох тисяч (у гепатоцитах). Кожна мітохондрія може нести декілька копій ДНК (мтДНК), які в комплексі з білками утворюють структуру, подібну до нуклеоїдів прокариотів.

Генетичний код, що використовується власною системою трансляції мітохондрій, характеризується деякими відхиленнями від універсальної таблиці відповідності кодонів амінокислотам (див. рис. 2.1). Зокрема, універсальний стоп-кодон UGA в мітохондріях більшості видів кодує триптофан, у мітохондріях дріжджів кодон CUG відповідає треоніну замість лейцину, у мітохондріях ссавців AUA відповідає метіоніну замість ізолейцину тощо.

Популярною є думка, що більшість еукаріотів мають кільцеву молекулу мтДНК. Часто так воно і є, проте останнім часом накопичилися дані про те, що у великій кількості еукаріотів мтДНК є лінійною (малярійний плазмодій, гідра, деякі гриби та одноклітинні водорості). Іноді, наприклад у дріжджів, лінійна молекула мтДНК являє собою так званий конкатомер – складається з великих однакових ділянок послідовності, що тандемно повторюються. Лінійні мтДНК характеризуються наявністю специфічних кінцевих структур: ковалентно замкнені на кінцях комплементарні ланцюги, приєднані до кінців молекули специфічні термінальні білки або теломероподібні кінцеві повтори різноманітної довжини.

Зазвичай мітохондріальні геноми (мітохондріоми) представлені однією "хромосоמוю", однак є винятки. Так, мітохондрії гриба *Spizellomyces punctatus* містять три різні кільцеві молекули ДНК. У найпростішого *Amoebidium parasiticum* мітохондріом складається з декількох сотень лінійних молекул, які різняться за розмірами й послідовністю. Мітохондріальний геном рослин, як правило, складається з декількох молекул різного розміру. Одна з них, "основна хромосома", містить більшу частину генів, а кільцеві форми меншого розміру, які

перебувають в динамічній рівновазі як між собою, так і з основною хромосомою, утворюються внаслідок внутрішньо- та міжмолекулярної рекомбінації завдяки наявності гомологічних ділянок (рис. 6.13). Перебудови геномів мітохондрій у результаті рекомбінаційних подій, ведуть до делецій, дуплікацій, інверсій або інсерцій певних нуклеотидних послідовностей або цілих генів. Такі зміни можуть викликати не тільки ушкодження наявних генів, але й появу нових працюючих генів. Вважають, що ця зміна структури мітохондріального геному контролюється ядром і є одним із механізмів регуляції ефективності експресії мітохондріальних генів.



**Рис. 6.13.** Схема утворення кільцевих молекул різного розміру в мітохондріях рослин. Рекомбінація відбувається по гомологічних ділянках, забарвлених однаковою кольором

Мітохондріальні геноми значно варіюють за розмірами: від 6 тис. пар основ у плазмодіїв до 2 млн 400 тис. пар основ у сітчастій дині. У тварин мтДНК має в основному невеликі розміри – у середньому 13–19 тис. пар основ. Відносно великі мітохондріоми (від 20 до 42 тис. пар основ) знайдені в молюсків, нематод і деяких комах. Мітохондріоми вищих рослин мають великі розміри (від 180 до 2 млн 500 тис. пар основ), містять значну кількість послідовностей, що повторюються, і відкритих рамок зчитування з невідомими функціями. Характерним для мітохондріомів рослин є наявність вбудованих ділянок хлоропластної ДНК.

Набір генів у мітохондріальних геномах варіює від 5 у плазмодіїв до 100 у джгутикового *Reclinomonas americana*. Для більшості еукаріотів середня кількість генів, які кодує мітохондріом, становить 40–50, з яких 12–20 є білковими. Геноми мітохондрій усіх еукаріотів кодують рРНК великої та малої субодиниць мітохондріальної рибосоми, а також частковий (інколи повний) набір власних тРНК. Білки, що кодуються мітохондріомами, в основному залучені до процесів перенесення електрона та синтезу АТФ: субодиниця АТФ-синтази (ген *atp*), компоненти комплексів дихального ланцюга (гени *nad*, *sdh*, *cob*, *cox*). У мтДНК рослин і деяких одноклітинних містяться гени рибосомних білків. Деяко атиповим за складом генів є мітохондріом дріжджів – він містить, зокрема, гени ендонуклеаз і зворотної транскриптази.

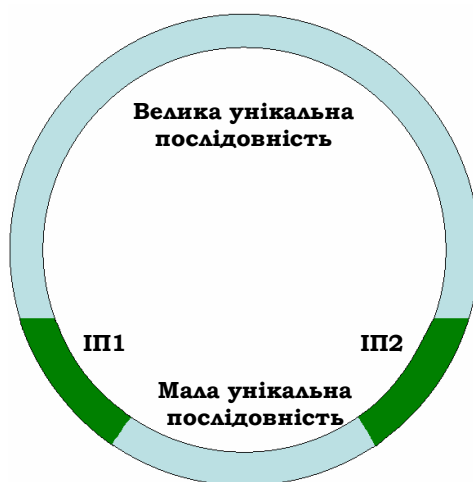
Різниця в розмірах мітохондріомів викликана некодуючими послідовностями – кореляція між розміром мтДНК і кількістю генів практично відсутня. Особливо велика кількість некодуючих послідовностей мтДНК (50–70 %) є характерною для вищих рослин. Частина таких послідовностей входить до складу інтронів (в основному зустрічаються в мітохондріальних генах грибів і вищих рослин, у генах ссавців інтрони відсутні), які видаляються з транскриптів під час сплайсингу. Більша частина некодуючих ділянок представлена міжгенними регіонами.

Усі компоненти реплікативного, транскрипційного та частина трансляційного апаратів мітохондрій кодуються ядерним геномом. Отже, експресія мітохондріальних генів перебуває під повним контролем ядра.

## Геном хлоропластів

Хлоропласти вищих рослин містять багато ідентичних кільцевих дволанцюгових молекул ДНК, розміри яких коливаються від 120 до 220 тис. пар основ. Характерною особливістю хлоропластної ДНК (хлДНК) вищих рослин є наявність інвертованого повтору (ІП), довжина якого в середньому становить 20–30 тис. пар основ (варіює в різних видів від 5 до 76 тис. пар основ). У результаті гени, локалізовані в ІП, є дуплікованими в геномі хлоропластів. Відмінності за розмірами хлДНК різних видів в основному визначаються довжиною ІП. Винятком є хлДНК деяких бобових і хвойних, які не містять ІП. Вважають, що ІП був у загального предка вищих рослин.

Як правило, ІП представлений двома сегментами (ІП-1 та ІП-2), що розділяють хлДНК на велику й малу унікальні ділянки (рис. 6.14). Велика унікальна ділянка є найбільш варіабельною (для різних видів) частиною молекули. У деяких видів у процесі еволюції один сегмент ІП був повністю або частково втрачений.



**Рис. 6.14.** Схема організації хлоропластного геному тютюну, ІП – інвертований повтор.

Вражає подібність організації хлоропластного й бактеріального геномів. Основні регуляторні послідовності, такі як промотори і термінатори, в обох геномах фактично ідентичні. Білки, що кодуються хлоропластними генами, дуже схожі на бактеріальні, а деякі групи генів із близькими функціями (скажімо, гени рибосомних білків) організовані однаково в геномах хлоропластів, *E. coli* та ціанобактерій. Разом із тим, на відміну від прокариотів, у генах хлДНК присутні інтрони.

Велика кількість генів локалізована в кластерах, що експресуються у вигляді великих поліцистронних первинних транскриптів. Останні процесуються до оліго- і моноцистронних мРНК, що піддаються сплайсингу та редагуванню. Редагування транскриптів хлоропластних генів виявлено тільки у вищих рослин; найчастіше спостерігаються заміни С → У шляхом дезамінування. Аналогічний процес, що викликає заміни амінокислотних залишків у відповідних білках, відбувається і в мітохондріях деяких еукаріотів (найпростіших, грибів і рослин).

За складом і порядком розміщення генів хлоропластні геноми вищих рослин є високо консервативними. У вивчених геномах хлоропластів вищих рослин виявлено від 108 до 122 генів, 95 з яких є однаковими й зустрічаються в усіх видів. За функціональністю гени хлоропластів можна розділити на три групи: гени апаратів транскрипції та трансляції; гени, що пов'язані з фотосинтезом; гени фото-

синтетичного метаболізму (біосинтезу амінокислот, жирних кислот, пігментів тощо). До генів першої групи відносять гени рРНК, тРНК (близько 30), деяких субодиниць хлоропластної РНК-полімерази, приблизно 20 генів рибосомних білків і кількох факторів трансляції. До другої групи – гени, що кодують деякі білки, які є компонентами фотосистем I і II, комплексу цитохромів *b/f*, АТР-синтази, субодиниць NADH-дегідрогеназного комплексу дихального ланцюга та велику субодиницю ключового ферменту фотосинтезу рибулозобісфосфаткарбоксилази. Гени третьої групи найменш вивчені. До неї відносять ген *accD*, що кодує  $\beta$ -субодиницю ацетил-СоА-карбоксилази прокаріотичного типу, яка бере участь у біосинтезі жирних кислот. Геноми хлоропластів злаків не мають гена *accD*. У мохоподібних і голонасінних виявлено гени, пов'язані з біосинтезом хлорофілу. Їх було ідентифіковано за схожістю з відповідними генами фотосинтезуючих бактерій.

Усі відомі білки, які кодуються в хлоропластах, входять до складу великих ферментативних комплексів. Ці комплекси також містять одну або декілька субодиниць, що кодуються ядерним геномом. Цікаво, що субодиниці, котрі кодуються ядерним геномом, є регуляторними, а ті, що кодуються хлДНК, – каталітичними. Усі найважливіші білки, які беруть участь у реплікації, транскрипції та трансляції також кодуються ядерним геномом. Тобто, як і для мітохондрій, усі процеси, що відбуваються у хлоропластах, перебувають під жорстким контролем ядра.

## Основні характеристики спадкування генів органел

У диплоїдних видів еукаріотів ядерні гени зумовлюють успадкування ознак за законами Менделя в результаті того, що, за винятком зчеплених зі статтю ознак, нащадки отримують по одній копії кожного гена від обох батьків. Мітохондрії та пластиди не розподіляються по гаметах і дочірніх клітинах аналогічно хромосомам ядра, тому закономірності спадкування генів органел і ознак, які вони зумовлюють, значно відхиляються від менделівських. Оскільки мітохондрії та пластиди знаходяться в цитоплазмі клітин, такий тип спадкування називається *позаядерним (позахромосомним)*, або *цитоплазматичним*.

Особливості позаядерного спадкування зумовлені в першу чергу тим, що гамети різних статей мають непорівнянні кількості мітохондрій і пластид. Найчастіше жіночі гамети містять тисячі мітохондрій (і пластид у рослин), а чоловічі – одиниці. У результаті в зиготі переважають міто-

хондрії та хлоропласти матері. У деяких видів, зокрема в людини, чоловічі мітохондрії взагалі не потрапляють до зиготи. Отже, спадкування генів органел відбувається в основному по материнській лінії (особливості позаядерної спадковості в людини див. у розділі 7). Проте це загальне правило не носить абсолютного характеру – для деяких видів гризунів спостерігається передача мітохондрій у зиготу від обох батьків.

Особливості спадкування хлоропластних генів були вперше вивчені при дослідженні спадкування строкатості листків нічної красуні. Якщо в ролі материнської форми брали квіти безхлорофільної рослини і запилювали їх пишком зеленої рослини, то у F1 спостерігали тільки безхлорофільні форми (незабаром гинуть). При реципрокному схрещуванні у F1 усі рослини нормальні. Якщо запилювали квіти строкатих рослин пишком зеленої форми, у F1 виявляли безхлорофільні, строкаті й зелені рослини. При реципрокному схрещуванні – тільки зелені. Таким чином, розглянутий приклад демонструє материнський тип спадкування хлоропластного геному в рослин, для якого є характерною контрастна різниця між результатами реципрокних схрещувань. Досить схожі відмінності в таких схрещуваннях спостерігаються при схрещуванні зелених і строкатих форм у інших рослин. Проте все залежить від кількостей цитоплазми, що привносяться в зиготу яйцеклітиною та сперматозоїдом. Так, якщо квіти строкатих рослин герані запилюють пишком зеленої, то до 30 % нащадків будуть строкатими, а 70 % – зеленими. При реципрокному схрещуванні 70 % нащадків є строкатими, а 30 % – зеленими. Тобто в рослин спостерігається також і двобатьківське спадкування генів хлоропластів.

## ГЕНЕТИКА СТАТІ

Статевий шлях розмноження, притаманний вищим еукаріотам, передбачає наявність двох статей, представники яких передають нащадку по одному гаплоїдному набору своїх генів. Стать можна визначити як сукупність морфологічних, фізіологічних і поведінкових ознак, пов'язаних із розмноженням організмів, і за якими розрізняються жіночі та чоловічі особини. Розвиток цих ознак в онтогенезі – детермінація статі – є складним процесом, до якого залучена велика кількість різних генів і додаткові модулюючі чинники, здатні впливати на напрямок розвитку чоловічої або жіночої статі.

Загальну схему визначення статі наведено на рис. 6.15. Початковим етапом є вплив на яйцеклітину, зиготу чи особину *стать-детермінуючих факторів*. Це можуть бути як фактори середовища (температура, кількість поживних речовин у яйцеклітині тощо), так і генетичні фактори (наявність у зиготі генів, котрі визначають стать). Дія *стать-детермінуючого фактора* зумовлює експресію відповідного *ключового гена*, який впливає на активність інших генів, що визначають розвиток жіночих чи чоловічих гонад (статевих залоз). Клітини гонад починають продукувати специфічні для даної статі гормони, які, у свою чергу, регулюють експресію генів, що відповідають за формування *первинних статевих ознак* – внутрішніх і зовнішніх статевих органів. У подальшому з'являються *вторинні статеві ознаки* (додаткові ознаки, за якими відрізняються статі після статевого дозрівання).

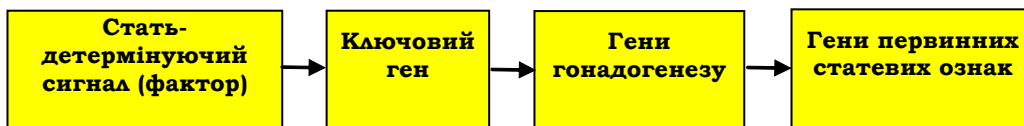


Рис. 6.15. Загальна схема детермінації статі

## Механізми визначення статі

За природою *стать-детермінуючого сигналу* розрізняють *середовищний і генетичний механізми визначення статі*. Якщо *стать* зумовлюється середовищем, то розрізняють *про-* та *епігамний* типи визначення статі. У першому випадку вона установлюється до запліднення яйцеклітини, а в другому – після. Найчастіше *стать* визначається генотипом зиготи (генетичний механізм), тобто залежить від того, які *стать-детермінуючі гени* мали сперматозоїд і яйцеклітина. У такому разі кажуть про *сингамний тип визначення статі* – у момент запліднення яйцеклітини.

**Прогамний і епігамний типи визначення статі.** Прогамний тип притаманний, наприклад, коловерткам і попелицям. При статевому розмноженні цих видів *стать* нащадка визначається розміром яйцеклітини (кількістю поживних речовин у ній). Незалежно від того, які генотипи мають яйцеклітина та сперматозоїд, що утворюють зиготу, із запліднених яйцеклітин великого розміру розвиваються самки, а з дрібних – самці. У даному разі *детермінуючим сигналом* розвитку статі є внутрішнє середовище яйцеклітини.



Класичним прикладом епігамного типу визначення статі є детермінація статі у морського черв'яка *Bonellia viridis*. Самки можуть досягати розміру до одного метра, тоді як самці мають довжину не більше 3 мм і паразитують у статевих шляхах самки. Визначення статі відбувається під час розвитку личинки: личинка, що вільно плаває, може випадково прикріпитися або до самки, або до будь-якого субстрату. У першому випадку під дією гормонів, які виділяє самка, із личинки розвивається самець-паразит, у другому – самка.

Епігамним типом визначення статі також характеризуються деякі види черепах, крокодилів і ящірок. Стать-детермінуючим сигналом для цих видів є температура інкубації заплідненого яйця, оскільки вона впливає на експресію ключового гена *Tdf* (testis determining factor), який визначає розвиток чоловічих гонад – при підвищенні температури оточуючого середовища у крокодилів і ящірок з яєць виляплюється більше самців, у черепах – самок.

**Сингамний тип визначення статі.** У тваринному та рослинному світі найпоширенішим є залежне від генетичних факторів визначення статі в момент утворення зиготи. Проте слід зазначити, що іноді спостерігаються перехідні варіанти, які поєднують генетичний і середовищний механізми. Так, у риб стать визначається за сингамним типом (залежить від присутності статевих хромосом, див. нижче), проте, у деяких видів під час індивідуального розвитку може спостерігатися зміна статі в дорослих особин під впливом навколишнього середовища, тобто сингамний тип визначення статі змінюється на епігамний. Наприклад, в акваріумних рибок *Oryzias latipes*, стать яких детермінується статевими хромосомами, відбувається зміна статі з чоловічої на жіночу при інкубації заплідненої яйцеклітини в середовищі, збагаченому жіночими статевими гормонами. Найцікавішим є приклад зміни статі в риб у зв'язку із "соціальними умовами". Так, у популяції риби-клоуна *Botia macracanthus* найбільша риба в групі стає самкою, друга за розміром – самцем. Усі інші особини залишаються статеві незрілими. Якщо самка гине, самець перетворюється на самку, а наступна за розміром риба у групі стає самцем. Механізм такої "соціальної" зміни статі, який зустрічається в багатьох інших видів риб, залишається нез'ясованим.

Конкретні механізми, які зумовлюють детермінацію статі за суто сингамним типом, досить різноманітні. Існують два основні класи таких механізмів: алельний і хромосомний.

За **алельним механізмом** стать визначається одним геном, представленим декількома алелями. Скажімо, у шаленого огірка *Ecballium elaterium* стать визначається геном, який має три алелі:  $a^D$  зумовлює

розвиток чоловічої статі,  $a^d$  – жіночої,  $a^+$  визначає гермафродитизм (розвиток чоловічих і жіночих ознак в одній особини). Аallel  $a^D$  домінуючий щодо двох інших алелів, алель  $a^+$  – щодо рецесивного  $a^d$ . Таким чином, рослини з генотипами  $a^D a^+$  та  $a^D a^d$  є чоловічими, із генотипом  $a^d a^d$  – жіночими, із генотипами  $a^+ a^+$ ,  $a^+ a^d$  – гермафродитами.

Цікавий механізм визначення статі реалізується в перетинчастокрилих (ос, мурах, бджіл). Самки розвиваються із запліднених (диплоїдних) яєць, а самці (трутні) – із незапліднених (гаплоїдних). Під час подальшого розвитку самців відбувається подвоєння хромосом в соматичних тканинах (автодиплоїдизація). Довгий час вважалося, що саме факт диплоїдності або гаплоїдності зиготи є вирішальним у визначенні статі, тому такий механізм отримав назву *гаплодиплоїдного*. Виявилося, однак, що визначення статі в перетинчастокрилих залежить від одного гена, який має велику (понад 20) кількість алелів. Отже, гаплодиплоїдний тип визначення статі можна вважати різновидом алельного. Гетерозиготні за цим геном особини є самками. Зрозуміло, що трутні не можуть бути гетерозиготами: вони розвиваються з яєць, які несуть тільки по одній копії всіх генів, а при відновленні диплоїдної кількості хромосом соматичні клітини будуть гомозиготними за всіма генами. У випадку тривалих споріднених схрещувань (*інбридингу*) відбувається зменшення *гетерозиготності популяції* (див. розділ 8), і у вуликах можуть з'являтися самці, що розвинулись із запліднених яєць.

У багатьох видів гени первинного визначення статі містяться у специфічних *статевих* хромосомах, які й зумовлюють детермінацію статі. Такий механізм називається **хромосомним визначенням статі**.

Існує декілька різновидів визначення статі хромосомного типу:

- Тип XX/X0 (характерний для деяких комах, наприклад, коників і клопів роду *Protentor*) – самки мають дві статеві хромосоми одного типу, які позначаються як X-хромосоми (XX), а самці лише одну (X0).
- Тип XX/XY (савці, риби, деякі комахи, деякі рослини) – жіноча стать має дві однакові статеві хромосоми (XX), а чоловіча – дві різні (XY).
- Тип ZZ/ZW (птахи, плазуни, метелики). На відміну від попереднього типу, особини, які мають дві однакові статеві хромосоми (ZZ), є самцями, а особини з двома різними хромосомами (ZW) – самками.
- Тип ZZ/Z0 (характерний для деяких метеликів) – самці є носіями двох однакових статевих хромосом (ZZ), а самки – лише однієї (Z0).

Стать, представники якої мають дві ідентичні статеві хромосоми та, відповідно, продукують ідентичні за цими хромосомами гамети, називається *гомогаметною* (гомогаметною статтю у ссавців є самки, а у птахів – самці). Стать, представники якої продукують різні за статевими хромосомами гамети, є *гетерогаметною*.

Молекулярні механізми визначення статі, навіть у межах одного хромосомного типу, можуть кардинально відрізнятися. Розглянемо два різні механізми визначення статі за типом XX/XУ – у дрозофіли та ссавців.

У дрозофіли наявні два типи статевих хромосом – X і Y. Особини XX розвиваються як самки, а особини XУ – як самці. При цьому із зиготи, що має тільки одну X-хромосому (X0) також розвиваються самці, а набір статевих хромосом XXУ приводить до розвитку самки. Отже, генетично інертна Y-хромосома у дрозофіли взагалі не відіграє ролі у визначенні статі: ключовим моментом є співвідношення (баланс) між кількістю X-хромосом і кількістю наборів аутосом (табл. 6.1) – це положення було свого часу сформульоване Бріджесом (Calvin Bridges) як *балансова теорія* визначення статі.

**Таблиця 6.1. Співвідношення між числом X-хромосом і кількістю наборів аутосом при визначенні статі у дрозофіли**

Набір статевих хромосом	Набір аутосом (A)	Відношення X : A	Статевий фенотип
XX	AA	1,0	самка
XУ	AA	0,5	самець
X0	AA	0,5	самець
XXУ	AA	1,0	самка
XXX	AA	1,5	надсамка
XXXУ	AA	1,5	надсамка
XX	AAA	0,67	інтерсекс
X0	AAA	0,33	надсамець
XXXX	AAA	1,3	надсамка

За наявності в диплоїдній зиготі двох X-хромосом, співвідношення між ними та кількістю наборів аутосом дорівнює 1 – саме за такої умови із зиготи буде розвиватися самка. Набір статевих хромосом XУ приводить до відношення X : A (див. табл. 1), що дорівнює 0,5, і з зиготи розвивається самець. Набір X0 зумовить таке саме співвідношення між X-хромосомами й аутосомами, тому особини X0 є самцями. Набір статевих хромосом XXУ визначить співвідношення, яке дорівнює 1, що забезпечить розвиток самки. За умови, що X : A більше за одиницю, із зиготи розвивається надсамка, яка характеризується

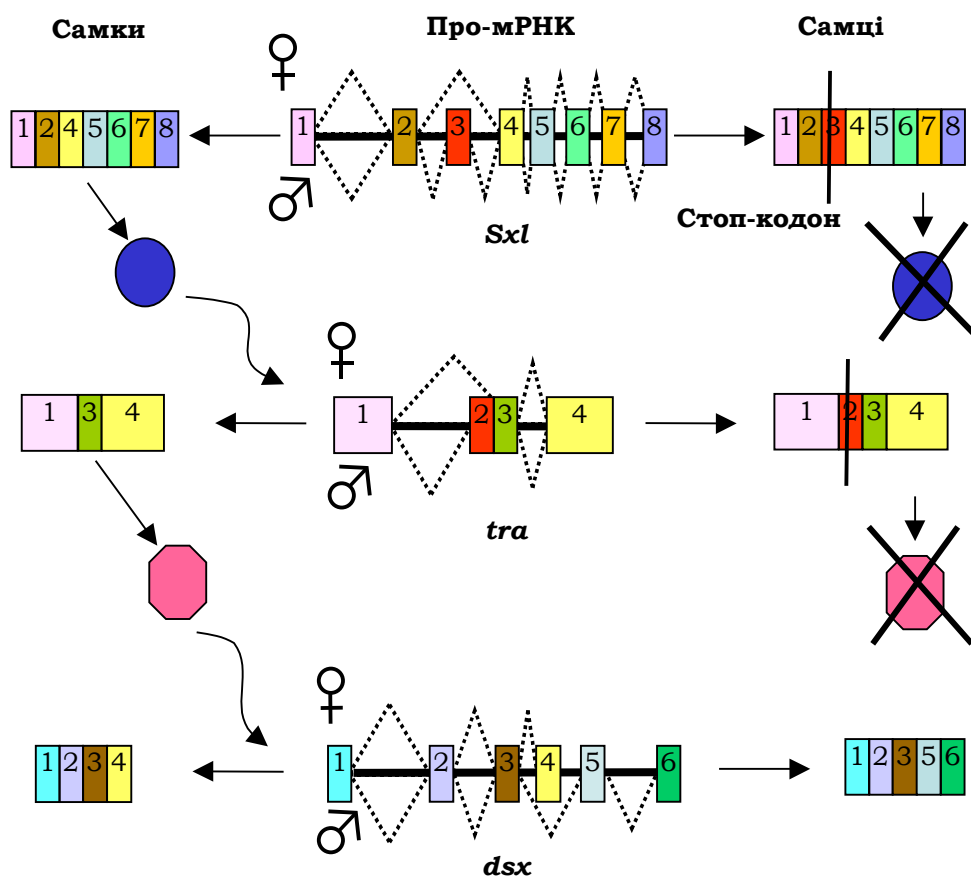
гіпертрофованими зовнішніми статевими ознаками самки; наслідком відношення, яке менше 0,5, є розвиток надсамця. Якщо відношення X-хромосом до кількості наборів аутосом є проміжним між 1 і 0,5, із зиготи розвивається так званий *інтерсекс*, який характеризується проміжним між самцями та самками фенотипом.

Балансовою теорією пояснюється поява серед дрозофіл *гіандроморфів* – особин, які мають частину клітин, тканин чи органів з ознаками, характерними для різних статей. Під час ембріонального розвитку при перших поділах зиготи з набором статевих хромосом XX, одна з X-хромосом може бути втраченою (за механізмом виникнення анеуплоїдів, див. розділ 4), і відповідні клітини будуть родоначальниками тканин і органів, що розвиваються шляхом, характерним для самця.

Молекулярний механізм балансового визначення статі у дрозофіли пов'язаний із наявністю в X-хромосомі двох генів – *sis-a* та *sis-b*, що виконують роль головного статъ-детермінуючого сигналу. Білкові продукти цих генів утворюють комплекс із продуктом аутосомного гена *da*. Кількість продуктів гена *da* відповідає кількості аутосом (у диплоїдного організму – дві дози), а кількість продуктів генів *sis-a* та *sis-b* варіює залежно від кількості X-хромосом у зиготі (одна або дві дози). Таким чином, у самок утворюється вдвічі більше цих білкових комплексів, ніж у самців. Білкові комплекси *sis-da* виконують роль факторів транскрипції, під контролем яких знаходиться ключовий ген розвитку статі – *Sxl* (*Sex-lethal*), що міститься в одній із аутосом. Подвійна концентрація фактора транскрипції є достатньою для активації гена *Sxl* у самки; у самця (одна X-хромосома) ген не транскрибується на найбільш ранніх стадіях ембріонального розвитку, оскільки концентрація активатора транскрипції є недостатньою.

Ген *Sxl* містить вісім екзонів (див. рис. 6.16) і має два промотори – ранній і пізній. Фактор транскрипції *sis-da* активує ранній промотор, при транскрипції з якого (що відбувається тільки в самки) сплайсинг мРНК спрямований таким чином, що екзони 2 і 3 вирізаються з пре-мРНК (не показано на рис. 6.16). Продуктом гена є білок *Sxl*, він виконує роль регулятора сплайсингу власного гена при його транскрипції з іншого – пізнього – промотора, що активується як у самця, так і в самки на трохи пізніших стадіях розвитку ембріона. Транскрипція з пізнього промотора зумовлює трохи інший шлях сплайсингу, коли в мРНК залишається скорочений екзон 1 разом з екзоном 2. Регулятор сплайсингу *Sxl* забезпечує вирізання екзона 3 у самки, у самця (за відсутності *Sxl*) цей екзон залишається (рис. 6.16). Оскільки екзон 3 містить стоп-кодон, трансляція мРНК у самця приводить до синтезу нефункці-

онального поліпептиду. У самки синтезується трохи змінена форма білка Sxl, яка підтримує сплайсинг власної мРНК шляхом, характерним для самки, а також виконує роль регулятора сплайсингу мРНК гена *tra* (*transformer*): у самки утворюється функціональна мРНК, у самця – нефункціональна, яка містить стоп-кодон у екзоні 2 (рис. 6.16).



**Рис. 6.16.** Альтернативний сплайсинг у процесі детермінації статі у дрозозіли. Для гена *Sxl* показано сплайсинг у самки й самця при транскрипції гена з пізнього промотора

Функціональний білковий продукт гена *tra*, у свою чергу, спрямовує сплайсинг мРНК гена *dsx* (*double-sex*) за типом самки: у мРНК наявні перші чотири з шести екзонів – за екзоном 4 розташований polyA-сигнал (див. розділ 2), який у присутності білка Тра впізнається системою процесингу. У результаті утворюється білок  $dsx^F$ , який зу-

мовляє розвиток самки, запускаючи активацію відповідного каскаду генів. За відсутності білка Tpa в самця вказаний  $\text{po}yA$ -сигнал не розпізнається, і синтезується мРНК, що містить усі шість екзонів (рис. 6.16), – відповідний білок  $\text{dsx}^M$  зумовляє активацію генів, які відповідають за розвиток ознак самця.

У ссавців, як і в дрозофіли, особини з набором статевих хромосом XX мають жіночу стать, а з набором XY – чоловічу. Але, на відміну від дрозофіли, особини XO (при втраті Y-хромосоми) мають жіночу стать (з певними вадами, див. розділ 7), а особини з додатковими X-хромосомами (XXY, XXXY, XXXY) – чоловічу. Отже, у визначенні статі у ссавців ключову роль відіграє Y-хромосома: за її наявності розвивається особина чоловічої статі, за відсутності – жіночої. Визначальна функція Y-хромосоми зумовлена наявністю в її складі ключового гена *TDF/SRY* (*Testis Determining Factor/ Sex determining Region Y*), продукт якого є транскрипційним фактором для генів, котрі визначають розвиток тестикул (чоловічих гонад) у зародку.

## Спадкування ознак і статі

Спадкування ознак, на які впливає стать, має певні особливості (див. також основні принципи спадкування ознак, розглянуті в розділі 3). Зазвичай виділяють три групи таких ознак: ознаки, зчеплені зі статтю; ознаки, обмежені статтю; ознаки, залежні від статі.

**Ознаки, зчеплені зі статтю**, – це ознаки, гени яких розташовані в статевих хромосомах X (Z) або Y (W) (ідеться про гени, які зовсім не обов'язково мають відношення до статевих ознак). Статеві хромосоми X (Z) і Y (W) суттєво відрізняються одна від одної набором генів. Особина гомогаметної статі може бути як гомо-, так і гетерозиготою за певним геном. Гетерогаметна стать є *гемізиготою* за більшістю генів: у генотипі існує лише одна копія гена – або в хромосомі X (Z), або Y (W). Отже, у гомогаметної статі рецесивна ознака виявляється лише тоді, коли ген перебуває в гомозиготному стані, а в гетерогаметної статі – завжди.

Прикладом X-зчеплених ознак у людини є гемофілія та дальтонізм, а Y-зчеплених – гіпертрихоз (оволосіння вушної раковини) і перетинка між пальцями. Ознаки, зчеплені з X-хромосомою, спадкуються за принципом крис-крос (див. розділ 3). Ознаки, зчеплені з Y-хромосомою, – лише по чоловічій лінії й називаються *голандричними*.

Незважаючи на те, що X- та Y-хромосоми ссавців суттєво відрізняються за набором генів, у дистальних районах короткого та довгого плечей вони мають гомологічні ділянки – *псевдоаутосомні регіони*.

Гени, які знаходяться в цих ділянках (приблизно 10), формально зчеплені зі статтю (містяться в статевих хромосомах), але характер спадкування мають такий самий, як і аутосомні.

**Ознаки, обмежені статтю**, – це ознаки, гени яких знаходяться в аутосомах, але виявляються лише в одній зі статей. Прикладами таких ознак є яйценосність птахів і молочність ссавців. Особини чоловічої та жіночої статей мають гени цих ознак, але їх прояв є можливим лише в самок, оскільки самці позбавлені необхідних для цього органів.

**Ознаки, залежні від статі**. Гени цих ознак містяться в аутосомах і можуть виявлятися у представників обох статей, але тип спадкування (рецесивний або домінантний) залежить від статі. Наприклад, ознакою, яка залежить від статі в людини, є облісіння. Аляль, котрий відповідає за часткове облісіння у чоловіків, є домінантним і, відповідно, ознака виявляється за наявності однієї його копії. У жінок фенотиповий прояв цієї ознаки потребує присутності в генотипі двох копій аляля, тобто той самий аляль поводить себе як рецесивний. Експресія генів залежних від статі ознак визначається гормональним статусом, і в результаті гетерозиготи різних статей мають різні фенотипи. Аналогічно спадкуються ознаки рогатості та комолості в овець.

Слід зауважити, що більшість генів, які визначають характерний для даної статі фенотип, знаходяться не в статевих хромосомах, а в аутосомах. Ознаки, які вони зумовлюють (первинні та вторинні статеві ознаки), і є ознаками, обмеженими статтю або залежними від неї. Їхній прояв контролюється відповідним балансом чоловічих і жіночих статевих гормонів.

## **Компенсація дози генів і походження статевих хромосом**

Оскільки в гомогаметної статі наявні дві однакові статеві хромосоми, кількість генів, які містяться в цих хромосомах, а отже, і їхніх білкових продуктів (доза генів), є вдвічі більшою, ніж у гетерогаметної статі. Збільшення чи нестача певних білків може негативно впливати на розвиток організму, тому в процесі еволюції виникли механізми, які на відповідних стадіях розвитку "вирівнюють" кількість продуктів генів статевих хромосом у осіб жіночої та чоловічої статей – механізми компенсації дози генів.

Існує два шляхи такої компенсації. У самців дрозофіли спостерігається гіперактивація єдиної X-хромосоми за рахунок підтримання декомпактизованого стану хроматинової фібрили. У цьому процесі бе-

руть участь продукти п'яти генів (білки MSL), які утворюють мультибілковий комплекс, що зв'язується з X-хромосою: MSL-комплекси підтримують дифузність фібрили й рекрутують до хроматину комплекси ремоделювання та гістон-ацетиленсферази (див. розділ 2), що забезпечує значне зростання ефективності ініціації транскрипції. Компенсація дози генів контролюється ключовим геном *Sxl*, про який уже йшлося: у самок функціональний білок *Sxl* не дозволяє MSL-білкам розташовуватися на X-хромосомах і тим самим запобігає гіперактивації.

У ссавців спостерігається протилежний механізм компенсації дози генів за рахунок інактивації однієї з X-хромосом у самок. Інактивація відбувається на ранніх етапах дроблення зиготи (16–32 бластомери), а вибір хромосоми, яка буде інактивована, є випадковим. Таким чином, і в самок, і в самців у соматичних клітинах працює тільки одна X-хромосома. Самки, гетерозиготні за X-зчепленими генами, є мозаїками (у деяких клітинах експресується домінуючий алель, в інших – рецесивний).

Детальний механізм інактивації однієї з X-хромосом самок ссавців до кінця не з'ясований. Відомо, що розпочинається інактивація зі специфічної ділянки X-хромосоми, яка позначається як *Xic* (X inactivation center). *Xic* містить декілька генів, один із яких – ген *Xist* – експресується лише в X-хромосомі, що буде інактивована. Продуктом цього гена є досить довга молекула РНК, яка не піддається трансляції. Молекули *Xist*-РНК зв'язуються з X-хромосою майже по всій довжині й рекрутують певні білки, які забезпечують гетерохроматинізацію. Інактивована X-хромосома виявляється в інтерфазних ядрах у вигляді гетерохроматинового компактного утворення поблизу мембрани – тільця Барра (Murray Barr). У разі наявності кількох X-хромосом (XXY, XXXY і т. д.) активно залишається лише одна з них – кількість тілець Барра дорівнює кількості X-хромосом мінус одиниця.

Оскільки організми, які мають гетероморфні статеві хромосоми, належать до різних царств, статеві хромосоми, напевно, виникали в процесі еволюції неодноразово. На користь такого висновку свідчить і той факт, що навіть у межах однієї систематичної групи, наприклад рептилії, є види і з хромосомним типом визначення статі, і такі, що не мають статевих хромосом (стать визначається температурним режимом).

Зрозуміло, що статеві хромосоми відокремились як одна з аутосомних пар, про що свідчить наявність у них псевдоаутосомних регіонів. Найімовірніше, спочатку виникли гомоморфні (однакові за морфологією) статеві хромосоми, а пізніше – гетероморфні. Так, у змії більш архаїчні види мають гомоморфні статеві хромосоми, єдиною різницею між якими є час реплікації: Z-хромосома реплікується на початку,



а W-хромосома – наприкінці S-фази клітинного циклу. Молодші види змії мають уже гетероморфні статеві хромосоми. Очевидно, одна зі статевих хромосом змінюється шляхом хромосомних перебудов, принаймні для ссавців вважається, що Y-хромосома за походженням є X-хромосомою, яка піддалася численним делеціям.

## ГЕНЕТИКА ІНДИВІДУАЛЬНОГО РОЗВИТКУ

Розвиток будь-якого багатоклітинного організму розпочинається з утворення *зиготи* – клітини, яка виникає в процесі злиття статевих клітин (яйцеклітини та сперматозоїда). Після запліднення ядро сперматозоїда (*пронуклеус*) опиняється в цитоплазмі яйцеклітини, зливається з її ядром, відтворюючи таким чином характерний для даного виду диплоїдний набір хромосом. У більшості організмів одразу після запліднення зигота розпочинає серію мітотичних поділів (так зване *дроблення зиготи*), у результаті утворюється велика кількість дрібних клітин – *бластомерів*. Розвиваючись, кожен із цих бластомерів (або їхня група) утворює функціонально спеціалізовані клітини з притаманною лише їм морфологією та фізіологічними особливостями. Отже, запліднена яйцеклітина здатна дати початок різним типам клітин, тобто забезпечити розвиток від однієї клітини до багатоклітинного організму. Ця властивість зиготи називається *тотипотентністю*. Вона притаманна також і бластомерам, які утворилися в перших чотирьох поділах зиготи. При подальших поділах тотипотентність клітин зменшується, кожна з них "обирає" свою програму розвитку – стає *детермінованою*. У такій клітині відбуваються стійкі внутрішні зміни (як у структурі ядра, так і в структурі цитоплазми), що роблять її саму та її нащадків відмінними від інших клітин ембріона й визначають подальший шлях спеціалізації. Слід зазначити, що ці зміни не викликають суттєвої морфологічної різниці між клітинами різних типів. Детермінована клітина, продовжуючи свій розвиток, набуває видимих морфологічних відмін і властивих лише даному типу клітин функцій. Така остаточно спеціалізована клітина називається *диференційованою*.

Детермінація та диференціація клітин пов'язані з поступовою зміною активності генів у процесі розвитку організму: певні групи генів починають активно експресуватися в одних клітинах і переходять у репресований стан у інших. Така диференційна картина експресії генів виникає вже на ранніх етапах розвитку зиготи й викликана не-

однорідністю цитоплазми яйцеклітини. Під неоднорідністю цитоплазми яйцеклітини розуміють нерівномірний розподіл у межах клітини *цитоплазматичних детермінант* – певних молекул мРНК та їхніх білкових продуктів. Оскільки ці мРНК і білки синтезуються й накопичуються в яйцеклітині ще в процесі оогенезу, то гени цих цитоплазматичних детермінант називають *генами з материнським ефектом*. Таким чином, ядра бластомерів, які утворюються в результаті дроблення зиготи, опиняються в різному цитоплазматичному оточенні, яке зумовлює вибірккову транскрипцію генів. Цитоплазматичні детермінанти, створюючи градієнт концентрацій уздовж різних осей яйцеклітини, визначають передньо-задню та дорсовентральну осі зародку. У ході дроблення зиготи бластомери, які знаходитимуться у відповідних частинах зародку, зумовлять розвиток притаманних для даної частини організму органів і тканин.

Генні продукти, які синтезуються в окремих групах бластомерів, спричиняють ще значніші відмінності в цитоплазматичному оточенні ядер клітин, що у свою чергу приводить до активації інших специфічних генів. Такий каскад активації чи інактивації генів підсилюється за рахунок взаємодій між сусідніми клітинами, які через цитоплазматичні містки чи щільні контакти здатні взаємно впливати на подальшу диференціацію одна одної.

Загальні принципи генетичної детермінації розвитку подібні в різних організмів. Найдетальніше вивчено диференційну експресію генів у ході розвитку представників роду *Drosophila* та нематоди *Caenorhabditis elegans*. Нижче розглянуто генетичні аспекти ембріогенезу саме цих організмів.

## Генетичний контроль розвитку *Drosophila*

Для комах роду *Drosophila* характерний життєвий цикл із повним перетворенням: утворення дорослої особини (*імаго*) із заплідненого яйця здійснюється через проходження декількох личинкових стадій, які розділені періодами линьки. Упродовж стадії яйця та трьох личинкових стадій визначаються осі майбутнього зародку, закладаються й розвиваються основні сегменти трьох частини тіла імаго – голови, грудей і черевця. Таким чином, ембріональний розвиток *Drosophila* можна умовно поділити на три етапи: 1 – визначення передньо-задньої та дорсовентральної осей зародку, 2 – детермінація кількості сегментів тіла та їхньої орієнтації (полярності) і 3 – специфікація сегментів, тобто набуття ними індивідуальних характеристик, прита-

манних лише даному сегменту. Усі етапи розвитку перебувають під жорстким контролем певного набору генів.

Особливістю розвитку *Drosophila* є утворення на перших етапах дроблення зиготи *синцитію*: при послідовних мітотичних поділах розділення цитоплазми проходить не повністю й новоутворені ядра мають спільну цитоплазму. Це сприяє вільному руху цитоплазматичних детермінант і є важливим у визначенні осей зародку. Пізніше відбувається міграція ядер до периферії, добудовуються клітинні мембрани та створюється шар приблизно із 6 тис. клітин на зовнішній поверхні ембріона.

**Визначення осей зародку** контролюється набором генів, які дістали назву *гени полярності яйця*. Продукти цих генів (мРНК і відповідні білки), створюють градієнти концентрацій від одного полюса яйця до іншого, забезпечуючи таким чином спрямовану детермінацію осей зародку – дорсовентральної та передньо-задньої. Нерівномірний розподіл цих цитоплазматичних детермінант (їх іще називають *морфогенами*) підтримується за допомогою різних механізмів. По-перше, певні молекули РНК мають сигнали локалізації – елементи послідовності нуклеотидів, які, утворюючи певну просторову структуру, зумовлюють спрямований транспорт РНК у необхідне місце цитоплазми яйцеклітини та утримання там. По-друге, активність трансляції таких РНК є різною в різних частинах яйцеклітини, що також спричинює відмінності в концентраціях морфогенів. Як уже відмічалось, наявність цитоплазматичних детермінант та розподіл їх у яйці залежить лише від активності генів яйцеклітини. Отже, перший етап розвитку *Drosophila* залежить лише від материнських генів.

Серед генів, які контролюють дорсовентральну полярність яйця, найважливішим є *dorsal*. Білковий продукт цього гена є транскрипційним фактором, що регулює активність декількох інших генів. Різниця в ядерних концентраціях білка Dorsal із максимумом у вентральній частині яйця і мінімумом у дорсальній (цитоплазматична концентрація при цьому змінюється в протилежному напрямку) приводить до специфічної активації генів, які зумовляють розвиток відповідних дорсальних і вентральних структур.

Серед генів, які контролюють передньо-задню полярність яйця виділяють два найголовніших – *bicoid* і *nanos*. мРНК *bicoid* синтезується під час дозрівання яйцеклітини та після запліднення транспортується до передньої частини зиготи. Транспорт мРНК *bicoid* у заданому напрямку забезпечується наявністю в її 3'-нетрансльованій ділянці специфічного локалізаційного елемента послідовності, що розпізнається

білковими факторами. Експресія мРНК *bicoid* у передній частині заплідненого яйця створює градієнт концентрації білка Bicoid, яка зменшується в передньо-задньому напрямку. Білок Bicoid, як і Dorsal, є транскрипційним фактором і забезпечує експресію генів, необхідних для розвитку головного та грудного відділів. мРНК *nanos*, аналогічно до мРНК *bicoid*, синтезується під час дозрівання яйцеклітини. У процесі розвитку зиготи створюється градієнт концентрації білка Nanos (РНК-зв'язувальний білок), протилежний до такого білка Bicoid: з максимумом у задній частині зародку та мінімумом у передній (рис. 6.17).

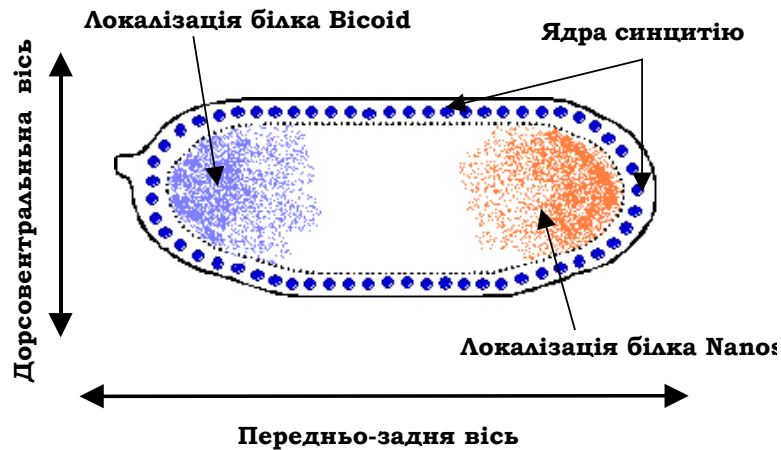


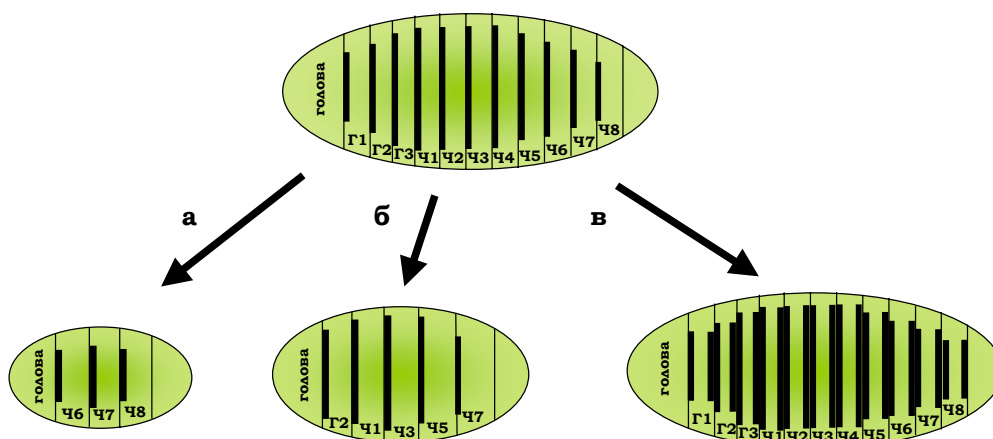
Рис. 6.17. Локалізація білків Bicoid і Nanos та основні осі зародку *Drosophila*

За участю також інших генів два описані градієнти мають визначальний вплив на детермінацію утворення основних структур черевця.

**Детермінація кількості сегментів тіла та їхньої полярності.** Після визначення основних осей зародку, активуються *гени сегментації*. Їхня активність спостерігається після запліднення яйцеклітини, тому вони не є генами з материнським ефектом. Відомо близько 30 генів сегментації, які становлять три групи:

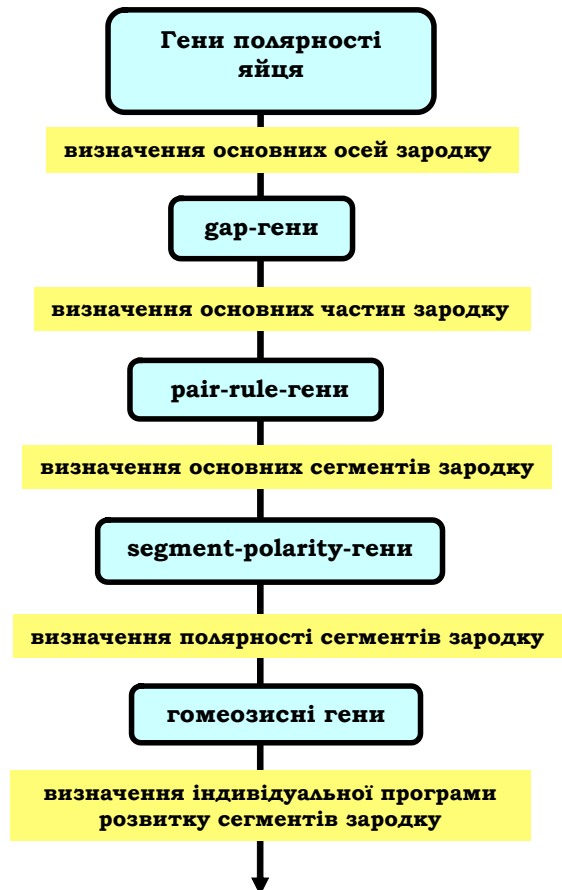
- *gap-гени* визначають утворення великих ембріональних структур, які майже збігаються з трьома частинами тіла дорослих особин. Мутації цих генів можуть привести до повної відсутності всіх грудних сегментів, декількох черевних тощо (рис. 6.18, а).
- *pair-rule-гени* детермінують утворення структур, з яких розвиваються окремі сегменти тіла. Мутанти за цими генами можуть бути позбавлені або всіх парних, або непарних сегментів (рис. 6.18, б).

- *segment-polarity-гени* відповідають за організацію та взаємну орієнтацію певних структур у межах одного сегменту. Мутанти за цими генами можуть бути позбавлені деяких сегментних структур або дзеркально дублювати однакові структури в межах певного сегмента (рис. 6.18, в).



**Рис. 6.18.** Приклади мутацій гар-генів (а, мутація *Krüppel* – елімінація грудних і перших п'яти черевних сегментів), *pair-rule*-генів (б, мутація *even-skipped* – елімінація непарних грудних і парних черевних сегментів) і *segment-polarity*-генів (в, мутація *gooseberry* – дзеркальне відтворення передніх частин сегментів у їхній задній частині) у дрозофіли. Г – грудні, Ч – черевні сегменти.

Експресію гар-генів контролюють білки Bicoid і Nanos. Найважливішим гар-геном є *hunchback*, необхідний для детермінації розвитку головного та грудного відділу. Активація його транскрипції перебуває під контролем білка Bicoid, а блокування трансляції – під контролем білка Nanos. Це означає, що в місці локалізації Bicoid утворюються структури, характерні для головного та грудного відділів, а в місці локалізації Nanos їхнє утворення блокується – розвивається черевний відділ. У свою чергу, гар-гени є регуляторами активності *pair-rule*-генів, які контролюють роботу *segment-polarity*-генів. Таким чином, у ході розвитку дрозофіли спостерігається чітка ієрархічна регуляція активності генів, на кожному щаблі якої визначаються все менші за розміром елементи тіла дорослої особини (рис. 6.19).



**Рис. 6.19.** Каскад генних взаємодій у визначенні полярності та специфіки розвитку сегментів *Drosophila*.

**Визначення індивідуальних характеристик окремих сегментів.** Після того як гени сегментації визначили кількість сегментів та їхню полярність, активуються гени, що детермінують індивідуальні характеристики й подальші шляхи розвитку кожного сегмента – *гомеозисні гени* (рис. 6.19). Контроль експресії гомеозисних генів здійснюється білками генів сегментації. Продуктами гомеозисних генів є різноманітні регуляторні білки, здатні взаємодіяти з ДНК і регулювати роботу генів, які будуть визначати утворення відповідних морфологічних структур (антен, ніг, очей, крил тощо) із клітин кожного окремого сегмента. Мутації гомеозисних генів викликають порушення в розвитку

окремих сегментів: наприклад, спостерігається утворення ніг замість антен із головного сегмента дрізофіли. Отже, активність гомеозисних генів, що залежить від оточення клітини й сегмента, в якому вона міститься, визначає остаточну диференціацію.

У *Drosophila* гомеозисні (або селекторні) гени утворюють два кластери (Antennapedia-комплекс і bithorax-комплекс) у третій хромосомі й разом формують *гомеозисний комплекс* (НОМ-С). Комплекс Antennapedia містить п'ять генів, які відповідають за диференціацію клітин головного та переднього грудного сегмента. Комплекс bithorax має три гени, які визначають остаточний розвиток задніх грудних та черевних сегментів. Кожен із гомеозисних генів містить консервативну послідовність із 180 пар основ (*гомеобокс*) – у білковому продукті гена гомеобоксу відповідає ДНК-зв'язувальний домен (*гомеодомен*), що складається із 60 амінокислотних залишків.

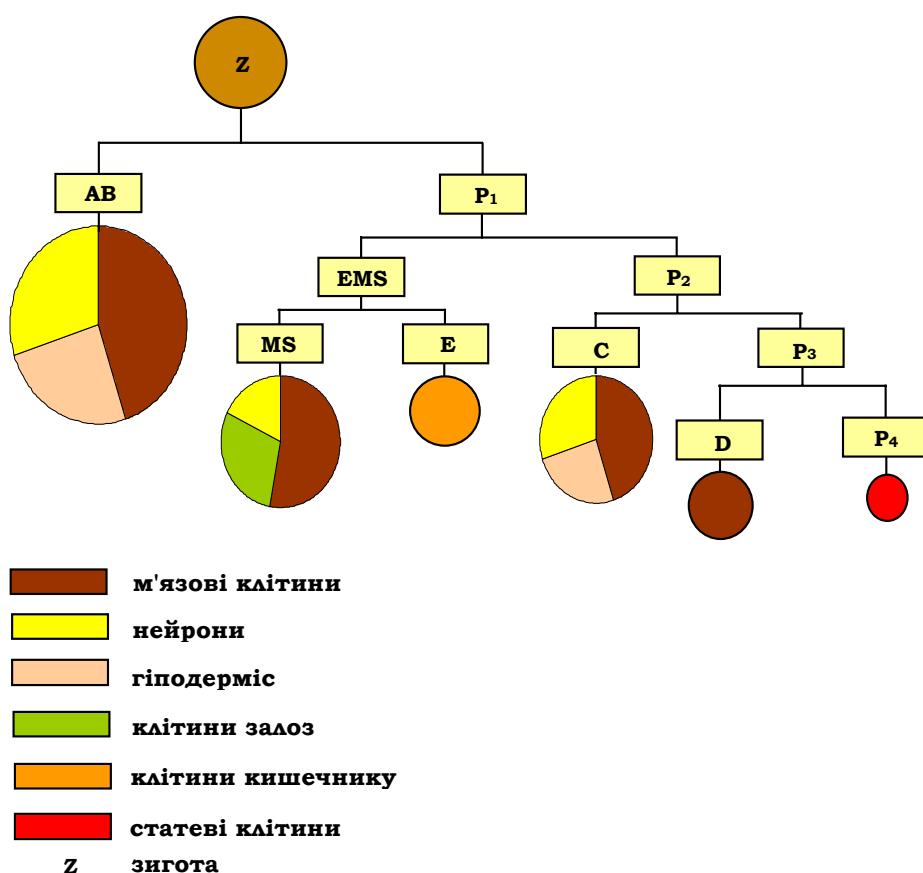
*Нох-гени* (від *homeobox containing genes*) знайдені в усіх досліджених видах рослин і тварин, що свідчить про універсальність систем регуляції диференціації клітин еукаріотичних організмів. У ссавців та інших хребетних Нох-гени також формують кластер із 9–11 генів, продукти яких – транскрипційні фактори – детермінують розвиток певних районів зародку вздовж передньо-задньої осі.

## Розвиток *Caenorhabditis elegans*

Розвиток нематоди *C. elegans* від зиготи до дорослої особини включає чотири личинкові стадії, які розділяються періодами линяння (L1, L2, L3 та L4). Протягом кожної личинкової стадії формуються окремі структури й диференціюються тканини тіла дорослої особини. Після останнього линяння утворюється доросла особина, яка має 959 соматичних клітин у гермафродитних форм або 1031 у самців. Доля кожної окремої клітини в ході розвитку *C. elegans* є відомою, тобто кожна клітина має свій описаний "родовід", який починається від першого дробленням зиготи й завершується утворенням функціональної диференційованої клітини.

У результаті першого поділу зиготи в передньо-задній площині зародку утворюються дві неоднакові за розміром клітини – АВ (велика, нащадки якої будуть формувати клітинні лінії передньої частини зародка) і P<sub>1</sub> (мала, її нащадки формуватимуть клітинні лінії задньої частини зародка). При цьому лише клітина P<sub>1</sub> має у своїй цитоплазмі *P-гранули* – специфічні цитоплазматичні детермінанти, необхідні для утворення попередників статевих клітин. Подальший поділ клітини P<sub>1</sub>

у передньо-задній площині дає дві клітини EMS (нащадки цієї клітини – MS та E – будуть визначати вентральну вісь зародка) і P<sub>2</sub>. За рахунок нерівномірної сегрегації Р-гранул у цитоплазмі клітини P<sub>1</sub>, ці гранули потрапляють тільки до клітини P<sub>2</sub> (усі клітини, які будуть мати Р-гранули після наступних поділів, і, відповідно, будуть детермінувати розвиток статевих клітин, позначаються літерою Р). При наступному поділі з P<sub>2</sub> утворяться дві клітини – С і P<sub>3</sub>, поділ останньої зумовить появу ще двох клітин D і P<sub>4</sub> (рис. 6.20).



**Рис. 6.20.** Схема утворення клітин-попередників шести основних клітинних ліній *C. elegans*

Отже, у перших поділах зиготи визначаються дорсовентральна та передньо-задня осі зародка, а шість клітин (AB, MS, E, C, D і P<sub>4</sub>), що утворюються при цьому, є попередниками шести основних клітинних



ліній личинки нематоди, які сформують основні тканини та органи дорослої особини. Слід відзначити, що первинна детермінація попередників статевих клітин відбувається вже в першому поділі зиготи.

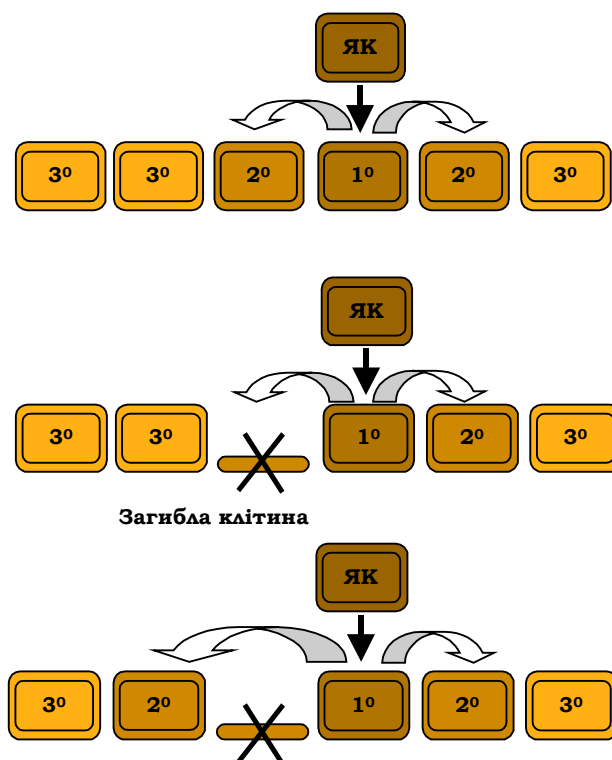
Шляхи детермінації та диференціації клітин інваріантні в усіх особин даного виду. Вони регулюються продуктами певних генів, які умовно можна розділити на три групи, що контролюють: а) детермінацію клітин; б) час детермінації клітин та їхній поділ; в) селективну загибель певних клітин у ході розвитку. Крім того, у диференціації клітин *C. elegans* значну роль відіграють міжклітинні взаємодії.

Найдетальніше генетичний контроль розвитку *C. elegans* досліджено на прикладі формування вульви – жіночої статевої системи в гермафродитів. Вульва формується із семи клітин, одна з яких стає якірною клітиною, інші – клітинами-попередниками статевих шляхів, матки тощо. Вибір того, яка з клітин стане якірною, визначається щонайменше п'ятьма генами. При цьому важливою є не тільки сама наявність п'яти ключових генів, а також час їхньої експресії. Так, у мутантів за одним із цих генів – *lin-14* – формування вульви відбувається на одну личинкову стадію раніше, ніж у нормі, що спричинює аномальний розвиток. Мутації, які змінюють час диференціації окремих клітин чи органів, називають *гетерохронічними*.

Після розподілу клітин на якірну та клітини-попередники, останні починають детермінуватися, утворюючи клітини трьох типів – первинні (1°), вторинні (2°) і третинні (3°). Цей етап перебуває під контролем щонайменше 15 генів, а сам процес детермінації має каскадний характер: якірна клітина стимулює розвиток первинної клітини, яка, у свою чергу, – вторинної і т. д. Особливе значення має місце взаєморозташування клітин: наприклад, при загибелі клітини 2°, найближча до неї клітина 3° стає вторинною. Тип регуляції детермінації, на який впливають оточуючі клітини, називається *позиційним* (рис. 6.21). Пізніше первинні та вторинні клітини-попередники будуть диференціюватися в тканини вульви, а третинні – у гіподерміс, який оточує вульву.

У процесі розвитку *C. elegans* шляхом послідовних мітотичних поділів утворюється 1090 соматичних клітин, дорослі особини-гермафродити при цьому мають 959 клітин, тобто 131 клітина елімінується протягом личинкових стадій. Універсальний для всіх еукаріотів механізм клітинної загибелі, при якому відбуваються точно запрограмовані біохімічні й морфологічні зміни окремих клітин, називається **апоптозом**.

Апоптоз контролюється великою кількістю внутрішньоклітинних і міжклітинних сигналів. Визначальну роль у розвитку запрограмованої клітинної загибелі відіграють специфічні протеази – *каспази* (розрізають молекули поліпептидів біля залишків аспарагінової кислоти). У клітині каспази знаходяться в неактивній формі – *прокаспази* – і не функціонують. Активація однієї з цих протеаз викликає каскадну активацію інших, що, у свою чергу, зумовлює активацію нуклеаз, деградацію ДНК і білків, які підтримують клітинні мембрани та цитоскелет, і, відповідно, загибель клітини. Сигналом для активації прокаспаз у процесі розвитку може бути нестача поживних речовин, факторів росту, міжклітинні сигнали різної природи тощо.



**Рис. 6.21.** Позиційний контроль розвитку клітин-попередників вувльви у *C. elegans*. Стрілками вказані позиційні сигнали детермінації розвитку. ЯК – якірна клітина

У *C. elegans* є три ключові гени, які контролюють селективну загибель клітин: *ced 3*, *ced 4* і *ced 9*. Продукти генів *ced 3* і *ced 4* є індукторами апоптозу, мутації за цими генами зумовлюють повну відсутність елімінації 131 клітини. Продукт гена *ced 9*, навпаки, є інгібітором апоптозу: інактивація цього гена приводить до елімінації клітин, яка в нормі не відбувається. Білок Ced-3 є прокаспазою, що міститься у клітині в неактивній формі. Каспаза Ced-3 активується продуктом гена Ced-4, котрий індукує саморозрізання прокаспази й перетворення її в активу форму. У клітинах, в яких апоптоз не повинен відбуватися, білок Ced-4 блокуваний білком Ced-9. Апоптичний сигнал приводить до дисоціації Ced-9 від Ced-4 і запуску каспазного каскаду.

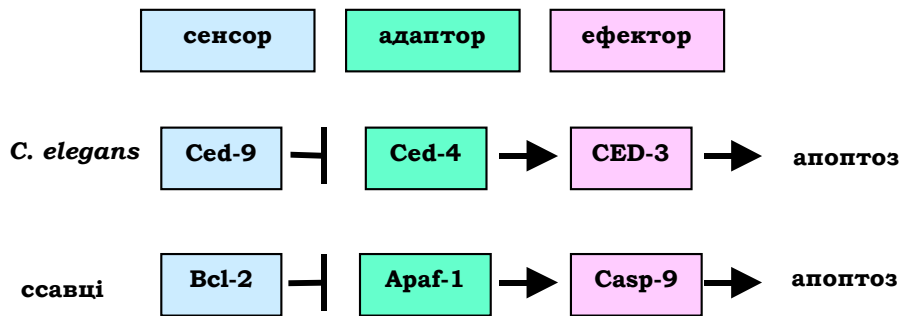


Рис. 6.22. Сигнальні шляхи розвитку апоптозу у *C. elegans* і ссавців

Гени, які контролюють апоптоз, досить консервативні. У хребетних знайдені білки, гомологічні таким *C. elegans*. Зокрема, білок bcl-2, як і його гомолог Ced-9, блокує апоптоз у клітинах ссавців. Обидва білки мають трансмембранний домен і розміщені на зовнішній поверхні мітохондрій, ядра та мембранах ендоплазматичного ретикулуму, що дозволяє їм виступати сенсорами апоптичного сигналу. Білок Araf-1 (гомолог Ced-4 у ссавців) активує перетворення прокаспази 9 в активну форму і таким чином запускає активаційний каскад протеаз. Білки Ced-4 та Araf-1 є адапторами апоптичного сигналу, а білками-ефекторами виступають різноманітні каспази (рис. 6.22).

**Контрольні запитання і завдання**

1. Опишіть характерні особливості будови та еволюції еукаріотичних геномів.
2. Як класифікують мобільні елементи? За якими механізмами здійснюється їхнє переміщення?
3. Назвіть генетичні наслідки переміщення мобільних елементів у межах геному?
4. Опишіть процес V(D)J-рекомбінації імуноглобулінових генів.
5. Що таке епігенетичне спадкування та в чому полягають його основні механізми?
6. Що таке ефект положення гена?
7. Які факти підтверджують ендосимбіотичну теорію походження мітохондрій і пластид?
8. Опишіть різні типи будови мітохондріальних геномів.
9. Чим зумовлені особливості позаядерного спадкування?
10. Опишіть загальну схему визначення статі. Як розрізняють механізми визначення статі за природою статі-детермінуючого сигналу?
11. Як визначається стать за прогамним типом? Епігамним типом?
12. Охарактеризуйте механізми, які зумовляють детермінацію статі за сингамним типом? Які є різновиди визначення статі за хромосомним типом?
13. Як називається стать, представники якої мають дві ідентичні статеві хромосоми? Дві різні?
14. Опишіть механізм визначення статі у дрозоді. Які особини називаються інтерсексами? Гінандроморфами?
15. Як відбувається детермінація статі у ссавців?
16. Як стать впливає на успадкування ознак? Які ознаки називають зчепленими зі статтю, обмеженими статтю, залежними від статі?
17. Опишіть механізми компенсації дози генів статевих хромосом у дрозоді та ссавців? Що таке тільце Барра?
18. Що таке тотипотентність?
19. У чому полягає роль цитоплазматичних детермінант на ранніх етапах розвитку зиготи?
20. Як визначаються осі ембріона у дрозоді?
21. Які групи генів відіграють основну роль у детермінації кількості сегментів тіла дрозоді та їхньої полярності?
22. Що таке гомеозисні гени? Яку функцію відіграють продукти гомеозисних генів у індивідуальному розвитку дрозоді? Ссавців?
23. Опишіть схему утворення клітин-попередників шести основних клітинних ліній при розвитку *C. elegans*.
24. Опишіть генетичний контроль розвитку вульви в *C. elegans*. Які мутації називають гетерохронічними?
25. Як відбувається запрограмована загибель клітин?



## РОЗДІЛ 7

# Генетика людини

Генетика людини вивчає особливості спадковості та мінливості виду *Homo sapiens sapiens*. Усі основні загальні закономірності спадковості, установлені для тварин і рослин, справедливі й для людини. Однак зрозуміло, що генетика людини посідає особливе місце серед інших розділів генетики окремих видів.

Важливість генетики людини зумовлена й тим, що вона із самого початку розвивається не тільки як фундаментальна, але й як клінічна дисципліна. Саме дослідження патологічних варіантів ознак (тобто спадкових хвороб) стали основною базою для вивчення закономірностей спадкування в людини. Нині описано понад 4 тис. різних суто спадкових синдромів, а також доведено роль генетичної етіології у схильності до розповсюджених хвороб (онкозахворювань, серцево-судинних, психічних хвороб тощо). З іншого боку, потреби генетики людини (зокрема медичної) стимулюють розвиток сучасних напрямків загальної генетики та молекулярної біології.

Залежно від проблематики, генетика людини має різні напрямки, які розвинулися в самостійні галузі науки: генетика нормальних ознак людини, медична генетика, фармакогенетика, генетика поведінки та інтелекту, геноміка людини, популяційна генетика людини (у тому числі й геногеографія).

Методи, які використовуються в генетиці людини, принципово не відрізняються від загальноприйнятих для інших об'єктів – це популяційно-статистичний, генеалогічний, близнюковий, цитогенетичний, методи генетики соматичних клітин, молекулярно-біологічні методи. Універсальність генетичних законів дає змогу широко використовувати в генетиці людини модельні генетичні об'єкти (наприклад, для

перевірки генотоксичних властивостей хімічних речовин), застосовуючи методи моделювання. Особливості використання даних методик у генетиці людини враховують специфіку людини як генетичного об'єкта.

## ЛЮДИНА ЯК ГЕНЕТИЧНИЙ ОБ'ЄКТ

Зрозуміло, що серед усіх живих організмів людина – найбільш цікавий для нас генетичний об'єкт. Але одночасно людину можна вважати найгіршим об'єктом експериментальної генетики: при вирішенні дослідницьких завдань виникають складні обставини методичного та етичного характеру, які зумовляють проблематичність людини як об'єкта генетичних досліджень. Розглянемо ці труднощі та шляхи подолання їх.

**1. Неможливість експериментальних схрещувань** у штучних умовах є цілком зрозумілою, і в першу чергу – з етичних міркувань. Не можна, використавши заздалегідь розроблену схему, відбирати батьків із потрібними генотипами та одержувати й аналізувати їхніх нащадків: люди беруть шлюб вільно, незалежно від генотипу партнера й без будь-якої "дослідницької" мети. Обмеження цієї свободи (шляхом заборони небажаних шлюбів чи сприяння бажаним) було основною ідеєю *евгеніки* – концепції про "поліпшення" людини біологічним шляхом, в основі якої лежить визнання "генетичних основ" фізичної та психічної нерівноцінності рас, класової нерівності. Спроби такого "поліпшення людської породи" здійснювалися під егідою тоталітарних режимів ХХ століття.

Отже, при генетичному аналізі стосовно людини зникає основа гібридологічного методу – експериментальне схрещування. Існує декілька можливостей для подолання цього "недоліку":

- З великої кількості шлюбних пар генетик може вибрати ті, які його цікавлять, і під час аналізу родоводів зробити висновки стосовно характеру спадкування ознаки.
- Дослідник може проаналізувати спадкування ознак у лабораторних ссавців і зробити попередні висновки щодо можливості спадкування подібних ознак у людини.
- Метод гібридизації соматичних клітин дозволяє в деяких випадках здійснювати генетичний аналіз із використанням культури клітин людини. Аналізуючи гібриди, що утворилися в результаті злиття клітин від двох різних індивідумів можна робити висновки щодо взаємодії неалельних генів (тест на комплементарність мутацій) і проводити генетичне картування.

**2. Пізня статевая зрілість та довга тривалість генерацій** – для зміни одного покоління в людини потрібно 20–30 років, що утруднює аналіз спадкування. Головними методичними підходами, які дозволяють вирішити цю проблему, є вивчення великих популяцій людини, реєстрування ознак протягом значного часу (аналіз родоводів), використання методів генетики соматичних клітин ссавців і людини.

**3. Невелика кількість нащадків.** Проведення статистичного аналізу розщеплення ознак потребує достатньо великої кількості нащадків від однієї пари батьків (див. розділ 3). Людина належить до так званих "малоплідних видів" – за один раз рідко народжується більш ніж одна дитина. Таким чином, проводити аналіз розщеплення ознак на прикладі однієї родини практично неможливо.

Для розв'язання цієї проблеми ведеться пошук багатодітних родин або відбирається потрібна кількість невеликих сімей, де спостерігається ознака, що цікавить дослідника. Існують великі родоводи, де прояв деяких ознак можна простежити протягом декількох генерацій: у великому родоводі кількість нащадків буде достатньою для аналізу.

**4. Відсутність чистих ліній** і неможливість їхнього отримання є іншою об'єктивною причиною, яка утруднює аналіз спадкування ознак. При аналізі спадкування домінантних ознак генетик не завжди може точно визначити генотип батьків, а змушений робити лише більш-менш імовірні припущення.

**5. Велика кількість хромосом (груп зчеплення).** Хромосомний набір людини складається з 23 пар хромосом і, відповідно, 24 груп зчеплення: 22 аутосоми та дві статеві хромосоми X і Y. Велика кількість хромосом утруднює їхнє генетичне й цитологічне картування, особливо за допомогою методів класичної генетики. Допомагають розв'язати цю проблему методи гібридизації соматичних клітин людини з соматичними клітинами інших видів ссавців (особливо гризунів) і застосування методів молекулярної цитогенетики, таких як флуоресцентна гібридизація *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH – визначення на хромосомі місця гібридизації комплементарного флуоресцентно міченого ДНК-зонда). Однак, ураховуючи велику кількість генів у людини (приблизно 21 тис.), слід відзначити, що питання картування хромосом людини залишається ще досить далеким від свого вирішення, навіть на тлі повного секвенування геному людини.

**6. Неможливість створення стандартних умов існування** для різних груп індивідуумів значно утруднює вивчення спадкування багатьох ознак людини, особливо тих, що успадковуються полігенно. Навколишнє середовище має величезний вплив на формування низки

ознак, однак цей вплив не може змінюватися за бажанням дослідника (харчування, мікроклімат, навчання тощо). Значною проблемою для фахівців при діагностуванні спадкових хвороб є також наявність фенкопій. Цей "недолік" людини як об'єкта генетичних досліджень можна подолати, підбираючи з великої різноманітності людських популяцій групи, схожі за спадковими ознаками і впливом середовища. Для вивчення відносного впливу умов середовища та спадковості на формування ознак використовують близнюковий метод і метод "приймаків" (див. нижче).

До описаних труднощів, з якими стикається генетика людини, слід додати ряд так званих *організаційних недоліків*, які, на жаль, мають місце в багатьох країнах: незадовільний стан із збереженням документації та реєстрацією смертності, діагностикою і статистикою захворювань.

Незважаючи на перераховані проблеми, людина як генетичний об'єкт має також ряд важливих переваг: існує великий масив даних щодо нормальної та патологічної анатомії, фізіології та біохімії людини; існує можливість спілкування з об'єктом дослідження, що полегшує отримання інформації про його родичів і допомагає досліджувати ознаки, пов'язані з відчуттями, емоціями, інтелектом; практично повністю встановлено геном людини.

## ГЕНОМ ЛЮДИНИ

Проект розшифрування геному людини (Human Genome Project) був одним із найамбітніших наукових проектів ХХ століття. Він тривав 13 років і закінчився у 2003 р. Проект мав на меті побудувати достатньо точну генетичну карту (з кроком 2–5 сМ), отримати послідовність 3 млрд пар основ ДНК, ідентифікувати генні послідовності, визначити геномні варіації. У результаті виконання проекту побудована генетична карта з кроком у 1 сМ, отримані послідовності 99,9 % еухроматинових ділянок геному з точністю 99,99 %, отримано 15 тис. повних кДНК (змістовних послідовностей білкових генів, див. розділ 9) та ідентифіковано близько 3 млн нуклеотидів, що варіюють у геномах людини (SNP – single nucleotide polymorphism).

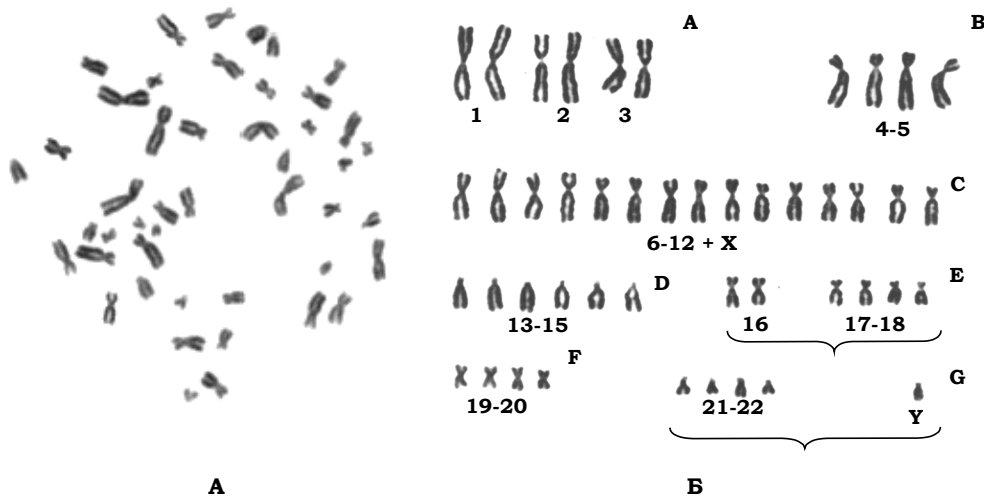
Традиційно геном людини представляють як сукупність послідовностей ДНК 22 аутосом і двох статевих хромосом Х та Y. Незважаючи на великий розмір геному (приблизно 3,2 млрд пар основ), верхня оцінка кількості білкових генів у геномі людини не перевищує 25 тис.



(ідентифікація всіх генів РНК є досить далекою від остаточного завершення). Останні версії каталогу білкових генів людини включають близько 21 тис. білкових генів і 4 тис. генів РНК (остання оцінка є напевно заниженою). Загальна довжина кодуючих ділянок генів дорівнює приблизно 34 млн пар основ, тобто становить 1,2 % геному. Складнішим є визначення зв'язку між генним локусом, продуктом і фенотипом, який він може зумовлювати. На 15 жовтня 2008 р. база даних OMIM містила тільки 12 тис. 514 генів, для яких відомі фенотипові прояви.

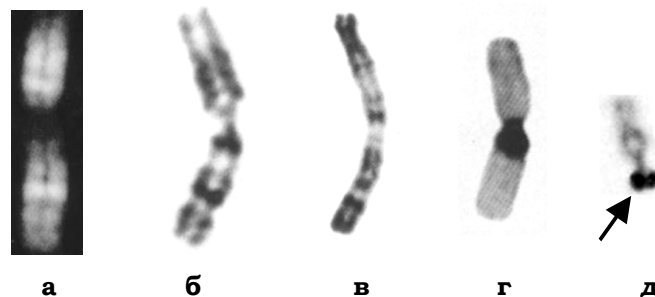
Щодо мітохондріальної ДНК людини, геном мітохондрій представлений кільцевою молекулою ДНК розміром 16 тис. 569 пар основ і містить 37 генів: гени білків, які беруть участь в окисному фосфорилуванні, 2 гени рРНК і 22 гени тРНК.

Ядерна геномна ДНК людини, як у інших еукаріотів, організована у хромосоми (див. розділ 1). Нормальний хромосомний набір людини складається із 46 хромосом: 22 пар аутосом і пари статевих хромосом (XX у жінок та XY у чоловіків). Рівномірно пофарбовані метафазні хромосоми людини за розміром і морфологією поділяються на сім груп (позначаються латинськими літерами від А до G, рис. 7.1).



**Рис. 7.1.** Рівномірно пофарбовані метафазні хромосоми людини: (а) – метафазна пластинка; (б) – розкладка хромосом по групах (А-Г); окремі хромосоми в межах груп, як правило, неможливо дискримінувати за такого способу фарбування (за винятком хромосом 1, 2, 3, 16 і Y)

Для більш точної ідентифікації хромосом та їхніх специфічних ділянок застосовують спеціальні методи диференційного забарвлення хромосом, які базуються на використанні певних барвників і процедур попередньої обробки препаратів (рис. 7.2). Найпоширенішим методом диференційного пофарбування є метод G-забарвлення, який дозволяє отримати хромосоми, нерівномірно пофарбовані по довжині. Малюнок чергування темних і світлих смуг є унікальним для кожної пари гомологічних хромосом. Цікаво, що темні та світлі смуги асоційовані з ділянками, збагаченими на АТ- і GC-пари відповідно (тобто, відповідно, з геномними зонами, збагаченими на мобільні елементи та кодуєчі послідовності). Практично таку саму картину чергування смуг дає метод Q-забарвлення (базується на використанні флуоресцентних барвників). Малюнок сегментів при R-забарвленні є протилежним до такого, що спостерігається при G- і Q-забарвленнях: R-позитивні смуги відповідають GC-збагаченим ділянкам геному. Існують також методи диференційного забарвлення, що дозволяють, наприклад, виявляти центромери та перицентромерний гетерохроматин (C-забарвлення) або ядерцеві організатори – місця локалізації кластерів генів рРНК – (ЯОР-забарвлення), які знаходяться у людини в ділянках вторинної перетяжки коротких плечей акроцентричних хромосом (хромосоми 13–15, 21 і 22).



**Рис. 7.2.** Диференційне забарвлення хромосом людини: Q-забарвлення (а); G-забарвлення (б); R-забарвлення (в); C-забарвлення (г); ЯОР-забарвлення (д), ядерцевий організатор вказано стрілкою

Результати аналізу геному людини свідчать про надзвичайно високу подібність послідовностей ДНК у різних індивідуумів: відповідно останнім оцінкам, будь-які дві людини є ідентичними за нуклеотидними послідовностями на 99,5 %, тобто вся сукупність різноманітних фенотипів у людини зумовлюється варіаціями тільки 0,5 % геному.

Першими, ще задовго до появи методів секвенування ДНК (установлення послідовності, див. розділ 9), були описані варіанти геному людини, які характеризуються зміною кількості й структури хромосом. Анеуплоїдії та хромосомні перебудови часто асоційовані з різними захворюваннями, але *гетероморфізм* гомологічних хромосом (наявність у них сегментів, які відрізняються за розміром, морфологією або особливостями забарвлення) не обов'язково пов'язаний з патологічними змінами фенотипу й достатньо часто зустрічається в людській популяції (*хромосомний поліморфізм*). Такі великі геномні зміни, що торкаються послідовностей ДНК розміром понад 3 млн пар основ, визначають як мікроскопічні структурні варіанти.

У процесі аналізу нуклеотидних послідовностей людини були виявлені численні "дрібномасштабні" варіанти геномних послідовностей, розмір яких не перевищує 1 тис. пар основ. Приблизно 80 % таких ДНК-варіантів представлено у вигляді поодиноких нуклеотидних замін (SNP). За приблизними оцінками в людській популяції одна нуклеотидна заміна зустрічається на кожні 300 нуклеотидних пар. Крім SNP до "дрібномасштабних" варіантів геному відносять невеликі делеції, дуплікації та інверсії (див. рис. 4.1), варіації кількості мікро- та мінісателітних повторів. SNP і дрібні перебудови спостерігаються також у мітохондріальному геномі.

В останні три-чотири роки були розроблені нові підходи ефективного аналізу структури геному, які дозволили виявити варіації нуклеотидних послідовностей, що мають проміжну довжину між 1 тис. та 3 млн пар основ. Такі геномні варіанти отримали назву *субмікроскопічних структурних варіантів*. Субмікроскопічні структурні варіанти в основному представлені інверсіями та CNVs (Copy-Number Variants) – варіантами за кількістю копій елементів послідовності порівняно з "еталонним геномом". Нині описано декілька сотень субмікроскопічних структурних варіантів.

При дослідженні індивідуальних геномних варіацій основну увагу приділяють SNP та іншим "дрібномасштабним" геномним варіаціям. Вважається, що саме вони зумовлюють різноманітність фенотипових варіантів, а також можуть бути відповідальними за схильність до деяких хвороб за дії несприятливих факторів середовища. Очевидно, що більша частина "дрібномасштабних" варіацій спостерігається в некодуючих ділянках геному (яких просто значно більше), і такі варіації не впливають на структуру білків. Тому аналіз в основному зосереджують на екзонних варіантах, особливо на несинонімічних нуклеотидних замі-

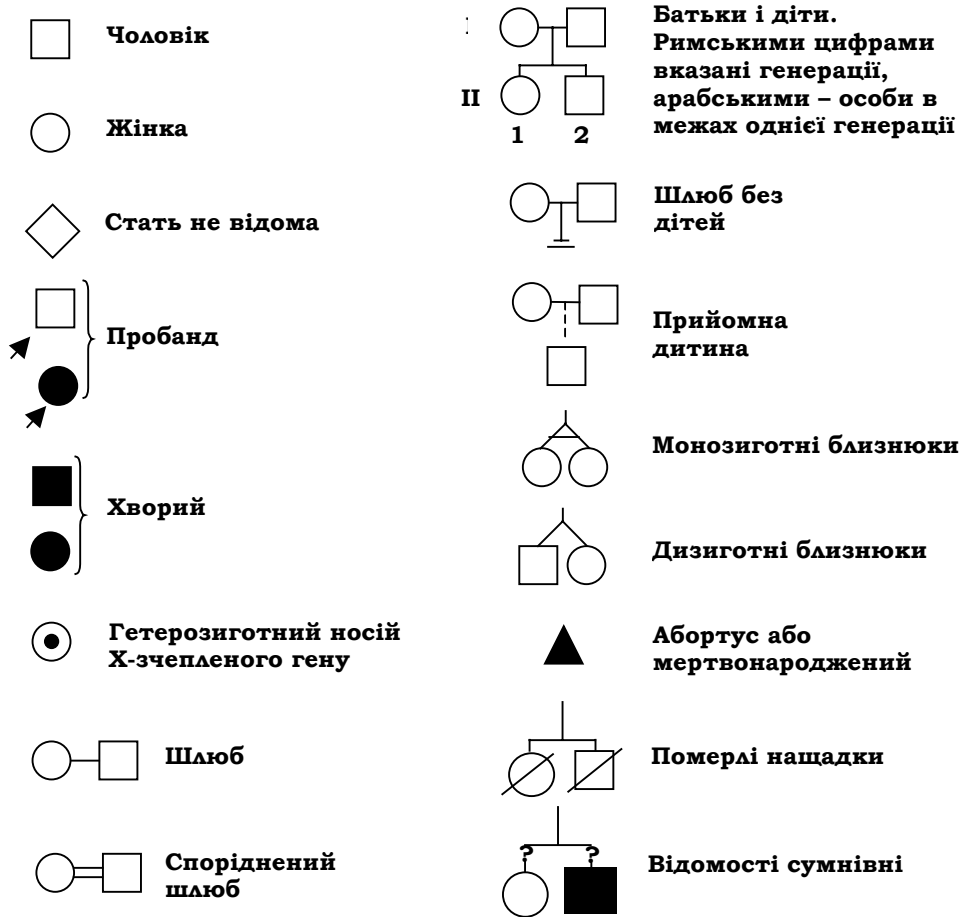
нах. Проте, накопичуються дані про роль синонімічних замін і замін у некодуючих ділянках у деяких фенотипових проявах (див. розділ 4).

Крім установлення зв'язку поліморфізм – фенотип, "дрібномасштабні" варіації геному використовуються для потреб медичної генетики (при виявленні носіїв рецесивних мутантних генів), популяційної генетики людини (визначення спорідненості між популяціями людей) і судово-медичної експертизи при встановленні особистості або батьківства (у цьому випадку широко використовують поліморфізм за міні- та мікросателітними локусами). Міні- та мікросателіти є гіперваріабельними тандемними повторами. Їхня різноманітність настільки висока, що кожна людина (крім монозиготних близнюків) має індивідуальний набір варіантів даних послідовностей. За цими наборами одну людину можна відрізнити від іншої так само легко, як і за відбитками пальців, тому методика ідентифікації особистості за міні- та мікросателітними повторами отримала назву ДНК-фінгерпринтингу (див. розділ 9).

Інформація про геном людини, особливо про індивідуальні структурні варіанти геному, розширила наше уявлення про зв'язок генотип – фенотип. Швидкий розвиток методів секвенування ДНК дозволяє говорити про "генетичну паспортизацію" (установлення повних послідовностей геномів кожної людини) як про досить близьку перспективу.

## ВИЗНАЧЕННЯ ТИПІВ СПАДКУВАННЯ В ЛЮДИНИ. СКЛАДАННЯ РОДОВОДІВ

Поряд із методами молекулярної генетики, не втратили свого значення традиційні підходи генетичного аналізу людини. Генетичний аналіз будь-якої ознаки в першу чергу має починатися із з'ясування питання, чи успадковується ознака, що нас цікавить. Якщо ознака є спадковою, то другим питанням буде тип її спадкування. Майже універсальним методом, який дозволяє отримати відповіді на дані запитання при дослідженні спадкування ознак людини, був і залишається метод складання та аналізу родоводів. При їхньому складанні ведуться детальні записи про кожного із членів родини та ступінь спорідненості між ними. Далі інформація про родину відображається у графічному вигляді: за допомогою спеціальної символіки (рис. 7.3) будується генеалогічне дерево (*pedigree*).

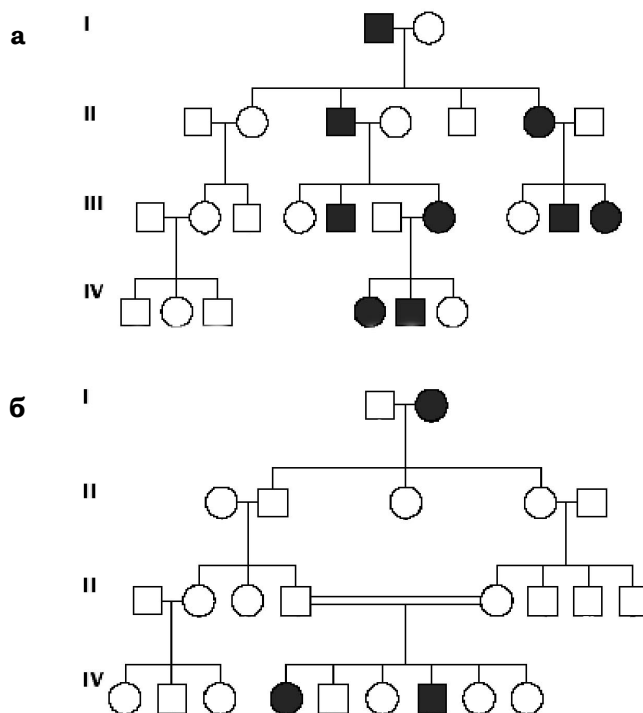


**Рис. 7.3.** Умовні позначки, що використовуються при складанні родоводів

Генеалогічний метод можна застосовувати, якщо є відомості про прямих родичів **пробанда** – людини, родовід якої складається, – по материнській і батьківській лініях у низці поколінь, та є достатня кількість нащадків у кожному поколінні. В іншому випадку збирають дані щодо достатньої кількості різних родин, де виявляється ознака, яка цікавить дослідника. За отриманими родоводами роблять висновок про можливість спадкування ознаки та тип її спадкування (домінантна або рецесивна, аутосомна чи зчеплена зі статтю тощо). Цей формальний аналіз базується на елементарних генетичних закономірностях спадкування (див. розділ 3).

Для родоводу, де спостерігається *аутосомно-домінантний* тип спадкування ознаки (приклад генеалогічного дерева див. на рис. 7.4, *а*), є характерною наявність носіїв ознаки в кожному поколінні – "вертикальне" спадкування. Якщо в батьків ознака не проявляється, імовірність народження дитини з такою ознакою незначна (у протилежному випадку можна говорити про виникнення генеративної мутації, див. розділ 4). Ознака виявляється з однаковою частотою серед чоловіків і жінок: показник того, що ген, який зумовлює ознаку, міститься в аутосомі.

Зрозуміло, що остання закономірність зберігається і для *аутосомно-рецесивного* типу спадкування (рис. 7.4, *б*), яке в інших відношеннях буде "негативом" до родоводу з аутосомно-домінантним типом. Зокрема, у родоводі наявні одне чи декілька поколінь, в яких прояв ознаки не спостерігається. Якщо ж ознака виявляється, то вона часто представлена в більшості рідних або двоюрідних *субсіє* (братів і сестер) – "горизонтальне" спадкування. У випадку, коли у здорових батьків (домінантна ознака) народжується хвора дитина (рецесивна ознака), батьки дуже часто є родичами.



**Рис 7.4.** Приклади родоводів з аутосомно-домінантним (*а*) та аутосомно-рецесивним (*б*) типами спадкування

Приклади деяких домінантних і рецесивних ознак людини наведено в табл.7.1.

Таблиця 7.1. Деякі домінантні та рецесивні ознаки в людини

Домінантні	Рецесивні
Темне волосся	Світле волосся
Кучеряве волосся	Пряме волосся
Карі очі	Голубі або сірі очі
Зелені очі	Голубі або сірі очі
Наявність епікантуса (рудимент третього віка)	Відсутність епікантуса
Уроджена катаракта	Нормальний зір
Короткозорість	Нормальний зір
Аніридія (відсутність райдужної оболонки)	Нормальне око
Кругле обличчя	Видовжене обличчя
Вільні вушні мочки	Прирослі вушні мочки
Товсті губи	Тонкі губи
Здатність скручувати язик трубочкою	Нездатність скручувати язик трубочкою
Довгі вії	Короткі вії
Монголоїдний розріз очей	Європеїдний розріз очей
Позитивний резус-фактор	Негативний резус-фактор
Ахондроплазія (непропорційна карликовість)	Нормальний зріст
Брахідактилія (короткопалість)	Нормальні пальці
Здатність відчувати смак фенілтіокарбаміду (ФТК)	Нездатність відчувати смак фенілтіокарбаміду (ФТК)
Нормальний стан	Амавротична ідіотія (хвороба Тея – Сакса)
Нормальний стан	Альбінізм (відсутність пігментації)
Нормальний стан	Фенілкетонурія (нездатність засвоювати фенілаланін)
Хорея Гентінгтона (нейродегенеративне захворювання)	Нормальний стан
Гіперхолістеринемія (підвищений рівень холестерину в крові)	Нормальний стан
Глаукома (прогресуюча атрофія зорового нерва)	Нормальний стан

Не викликає труднощів аналіз родоводів, якщо ознака зчеплена зі статтю (рис 7.5, а-в). Деякі ознаки, зчеплені зі статтю в людини, наведено в табл. 7.2 (слід нагадати, що псевдоаутосомні ознаки (див. розділ б) успадковуються аналогічно тим, гени яких знаходяться в аутосомах).

Таблиця 7.2. Деякі ознаки, зчеплені зі статтю в людини

Ознака	Тип спадкування
Гіпертрихоз (волохатість) вух	Y-зчеплений
Іхтіоз (луската шкіра)	Y-зчеплений
Перетинки між пальцями ніг	Y-зчеплений
Гемофілія А (відсутність фактора згортання крові VIII)	X-зчеплений рецесивний
Дальтонізм (червона або зелена кольорова сліпота)	X-зчеплений рецесивний
Міодистрофія Дюшена (прогресуюча дистрофія м'язів)	X-зчеплений рецесивний
Рахіт, не чутливий до вітаміну D	X-зчеплений домінуючий
Гіпофосфатемія (порушення транспорту фосфатів)	X-зчеплений домінуючий
Загальна кольорова сліпота	Псевдоаутосомний

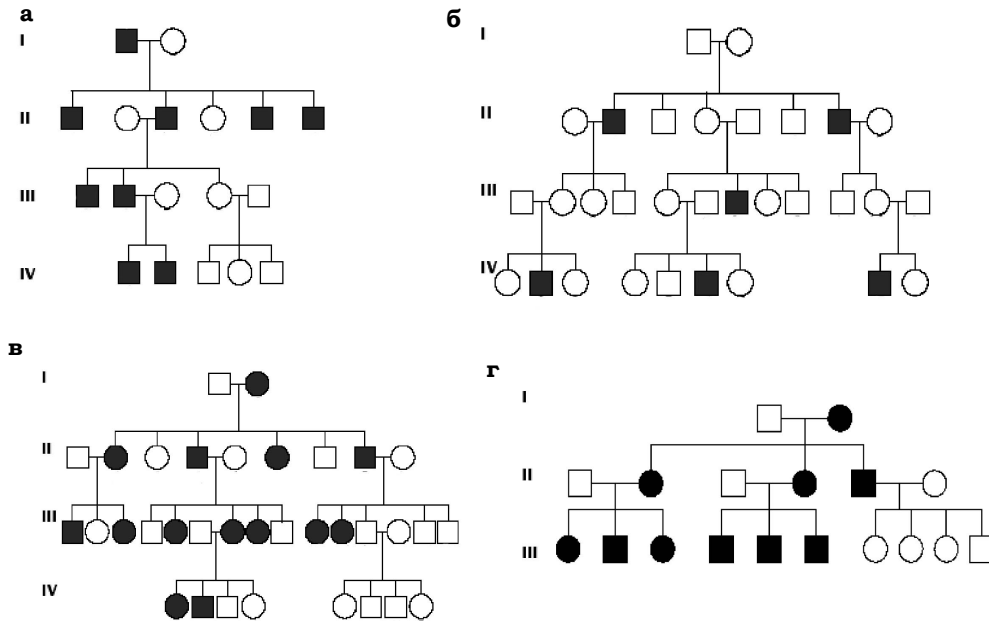
Найпростіше можна виявити голандричні ознаки (зчеплені з Y-хромосою): ознака буде проявлятися виключно у чоловіків і передаватися від батька до сина зі 100 % імовірністю (рис. 7.5, а).

При X-зчепленому рецесивному типі успадкування (рис. 7.5, б) прояв ознаки буде зустрічатися майже виключно у чоловіків, ознака ніколи не буде передаватися від батька до сина, але тільки до онука (чи правнука) через доньку.

X-зчеплений домінуючий тип успадкування при аналізі педігрі можна сплутати з аутосомно-домінуючим типом. Основними характеристиками, що вказують на зчеплення з X-хромосою, є різна частота прояву ознаки серед чоловіків і жінок – серед жінок вона зустрічається частіше – та те, що ознаку батька успадковують всі доньки і ніколи – сини (рис. 7.5, в).

Деякі ознаки можуть бути зумовлені мітохондріальними генами. Як відомо, дітям передаються виключно мітохондрії матері, у результаті чого при спадкуванні ознак спостерігатиметься материнський ефект: чоловіки та жінки можуть мати відповідну ознаку, але тільки жінки передають її своїм дітям (рис. 7.5, г). У людини як мітохондріальні успадковуються, наприклад, оптична атрофія Лебера (втрата зору в центральній частині зорового поля) та онкоцитоматоз (доброякісна пухлина нирок).





**Рис. 7.5.** Приклади родоводів із Y-зчепленим (а), X-зчепленим рецесивним (б), X-зчепленим домінантним (в) і мітохондріальним (г) типами спадкування

Генеалогічний метод дозволяє визначити не тільки розглянуті типи спадкування. Аналіз складніших випадків (наприклад, коли ознака має неповну пенетрантність або різну експресивність, є залежною від статі або обмеженою статтю) також не викликає принципових труднощів.

Крім визначення типів спадкування, аналіз родоводів за декількома ознаками використовується для встановлення зчеплення генів і розрахунку відстані між ними. За наявності великого родоvodu алгоритм виявлення факту зчеплення та розрахунку відстані між генами є майже подібним до описаного в розділі 3. Проте великі родоводи на практиці зустрічаються достатньо рідко. Найчастіше мають справу з великою кількістю маленьких родоводів, які аналізують за допомогою спеціальних комп'ютерних програм.

## КІЛЬКІСНІ Й БАГАТОФАКТОРНІ ОЗНАКИ ЛЮДИНИ

Найбільш вивченими є закономірності успадкування якісних моногенних ознак. Але, як згадувалося в розділах 3 і 4, гени не функціонують в "ізоляції" від інших генів та навколишнього середовища. Прояв великої кількості ознак людини (як і інших організмів) зумовлюється одночасно багатьма факторами: дією декількох генів та впливом комплексу чинників довкілля (кількісні або багатофакторні ознаки).

Найпростішим типом спадкування кількісних ознак є полімерія, коли прояв ознаки залежить від наявності в генотипі особи відповідної кількості домінуючих алелів однозначних генів (декількох копій одного гена), що діють адитивно (розділ 3). Класичним прикладом у людини є спадкування кольору шкіри, який, за підрахунками, визначається п'ятьма генами. Однак для інших кількісних ознак (зріст, маса тіла тощо) ситуація є значно складнішою. Гени, що відповідають за дані ознаки, хоча й діють на перший погляд адитивно (роблять свій внесок у неперервний розподіл варіантів ознаки), але не є однозначними, і між ними можуть відбуватися взаємодії різного типу.

Багатофакторні ознаки можуть виявлятися як якісні, коли особа або має ознаку, або ні. Наприклад, деякі уроджені вади розвитку (аненцефалія, спинномозкова грижа) і більшість розповсюджених захворювань (інфаркт міокарда, астма, атеросклероз, "спорадичні" онкозахворювання тощо) є якісними ознаками, але закономірності їхнього успадкування такі самі, як у кількісних. Для пояснення розподілу подібних ознак у популяціях людей була запропонована модель порогу: ознака проявляється тільки у тих особин, у яких кількість "генів схильності" перевищує певний "порог", тобто кількісною ознакою є схильність до хвороби, а не симптоми захворювання. У медичній практиці модель порогу застосовують також і для "класичних" кількісних ознак, об'єднуючи відповідні варіанти в так звану "норму" й "патологію" – це, наприклад, дистрофія, нормальна вага, клінічне ожиріння. Величина "порогу" для окремих індивідумів залежить від різноманітних чинників – статі особи, способу життя, факторів довкілля. Умови життя можуть значно збільшувати чи зменшувати кількість "генів схильності", необхідну для прояву ознаки та, відповідно, впливати на ризик розвитку захворювання.

## Близнюковий метод і метод приймаків

Значна залежність прояву багатofакторних ознак від зовнішніх чинників утруднює їхній генетичний аналіз і пошук генів, що їх обумовлюють. Навіть у межах однієї родини інколи важко з'ясувати, чи схожість за деякими ознаками між родичами підтверджує спадковість цієї ознаки, чи свідчить тільки про ідентичність умов існування. Для відокремлення дії факторів зовнішнього середовища від впливу генотипу на прояв ознаки в генетиці людини використовують *близнюковий метод* і *метод приймаків*.

Близнюковий метод базується на порівнянні збігу прояву ознак у близнюків. У людини близнюки народжуються з частотою приблизно 1 двійня на 84 пологи (трійні – 1 на 7 тис.). Одну третину з них становлять *монозиготні* або *однойцеві близнюки*. Вони розвиваються з бластомерів однієї заплідненої яйцеклітини, які розділилися на початкових стадіях дроблення (найчастіше на стадії двох бластомерів) і дають початок окремим організмам. Отже, монозиготні близнюки мають ідентичні генотипи. А дизиготні розвиваються з двох яйцеклітин, які дозріли й були запліднені одночасно. За генотипом вони схожі не більше, ніж рідні брати й сестри, що народилися в різний час.

При обстеженні одностатевих близнюкових пар важливим є точне встановлення типу їхньої зиготності. Його визначають або за подібністю прояву в парі близнюків ознак, що перебувають у мінімальній залежності від середовищних факторів (групи крові за різними антигенами, колір очей, можливість відчувати смак ФТК тощо), або використовуючи ДНК-фінгерпринтинг. Ознаки, прояв яких збігається в парі близнюків, називають *конкордантними* (якщо прояв відсутній у одного з них – *дискордантними*).

Вплив спадковості на прояв ознаки розраховують, порівнюючи *конкордантність* ознак (відсоток пар близнюків з ідентичним проявом потрібної ознаки) у монозиготних і дизиготних близнюків (таблиця 7.3). Зрозуміло, що, оскільки генотипи в монозиготних близнюків однакові, то фенотипові відміни між ними будуть зумовлені виключно впливом середовища під час внутрішньоутробного розвитку та після народження. Що стосується збігу в прояві ознак, то він може пояснюватися як ідентичністю генотипів, так і подібністю умов проживання. У цьому аспекті цікавими є випадки, коли пару монозиготних близнюків розлучали в дитинстві й тривалий час вони виховувались і росли в різних умовах. Конкордантність у таких пар поясню-

ється визначальним впливом генотипу на прояв певних ознак. Аналіз пар дизиготних близнюків дає інформацію про вплив ідентичних умов середовища (у тому числі й протягом внутрішньоутробного розвитку) на розвиток ознак у осіб з різними генотипами.

Таблиця 7.3. **Конкордантність деяких ознак людини в монозиготних (МБ) і дизиготних (ДБ) близнюків**

Ознака	Конкордантність, %	
	МБ	ДБ
Група крові (AB0)	100	46
Колір очей	99	28
Колір волосся	89	22
Розумова відсталість	97	37
Підвищена вага тіла у віці 18–20 років	51,8	20,2
Підвищена вага тіла у віці після 45 років	53	27,4
Епілепсія	72	15
Туберкульоз	56	22
"Заяча губа"	42	5
Кір	98	94
Шизофренія	46	14
Маніакально-депресивний психоз	60	14

Чисельно вклад генотипу в розвиток тієї чи іншої ознаки виражається як коефіцієнт спадковості  $H$ , який у даному випадку можна розрахувати за формулою

$$H = \frac{K_M - K_D}{100 - K_D},$$

де  $K_M$  – конкордантність (у відсотках) монозиготних,  $K_D$  – дизиготних близнюків. Якщо  $H = 1$ , то ознака повністю визначається генотипом, при  $H = 0$  – факторами середовища. Наприклад, коефіцієнт спадковості для кольору волосся дорівнює 0,86, що говорить про переважний внесок генетичних факторів у формування ознаки, але існує також незначний вплив середовища (0,14). Для надлишкової ваги тіла коефіцієнти спадковості дорівнюють 0,4 (для віку 18–20 років) і 0,35 (для людей після 45 років), що вказує на значніший вплив середовищних факторів, але спадковий компонент також відіграє суттєву роль.

Іншим підходом до оцінки ролі генотипу й середовища в розвитку багатофакторних ознак є аналіз фенотипових проявів у дітей, які були прийняті в родину – *метод приймачів*. Приймаки та прийомні ро-

дичі мають абсолютно несхожі генотипи, але подібні умови існування. Найчастіше метод приймаків використовується в комплексі з близнюковим, що дає можливість отримати більш об'єктивні результати щодо генетичного впливу на розвиток кількісних ознак.

## СПАДКОВІ ХВОРОБИ

Дослідження типів спадкування ознак і пошук генів, які зумовлюють чи модифікують їхній прояв, мають велике практичне значення, коли йдеться про патологічні прояви ознак. Хоча патологічні ознаки є крайніми варіантами прояву нормальних ознак, існує окремий розділ генетики людини, який зосереджує увагу на ролі спадковості у розвитку саме патологічних станів або хвороб – **медична генетика**. Залежно від внеску спадкових і середовищних факторів у розвиток патологічних станів і перебіг захворювань, усі хвороби можна умовно поділити на три групи: спадкові (незначний внесок середовища в розвиток патології), хвороби зі спадковою схильністю (розвиток патології зумовлюється взаємодією генотипу й середовища) і неспадкові захворювання (патології, викликані зовнішніми факторами).

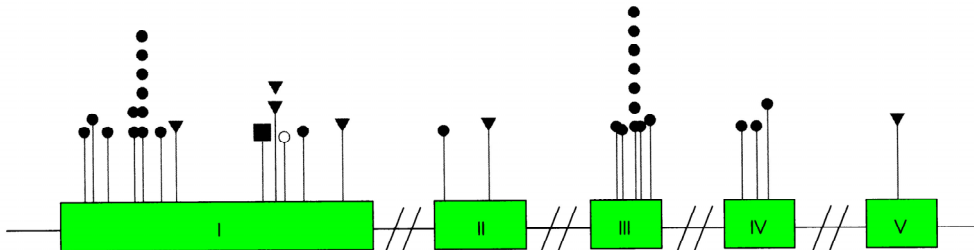
Медична генетика спрямована на діагностування, лікування, прогнозування та профілактику спадкових захворювань, у тому числі хвороб із спадковою схильністю, до яких відносять більшість захворювань людини. У прояві патології важливу роль відіграє комбінація спадкових і середовищних факторів, тобто хвороби є багатофакторними ознаками. Ефективна (у перспективі) діагностика схильності до таких хвороб і оцінка індивідуальних ризиків тісно пов'язана з розвитком методів секвенування індивідуальних геномів.

Суто **спадковими захворюваннями** називаються хвороби, причинами яких є мутації – зміни спадкового апарату. Хвороби, викликані точковими мутаціями, належать до **генних спадкових захворювань**. Захворювання, які спричинені зміною структури та кількості хромосом, об'єднують у групу **хромосомних хвороб**. Слід зауважити, що спадкові хвороби не обов'язково передаються наступним поколінням. Так, основна частина хромосомних хвороб не успадковується (унаслідок патологій репродуктивної системи хворих). Більшість онкологічних хвороб зумовлена виникненням соматичних мутацій і також не успадковується наступними поколіннями.

Більша частина спадкових синдромів викликана різноманітними патологічними генними мутаціями. Такі мутації характеризуються плеiotропною дією (один синдром – сукупність симптомів) і високою пенетрантністю, їхні прояви майже не залежать від факторів навколишнього середовища. Патологічна симптоматика може бути спричинена відсутністю продукту пошкодженого гена, зменшенням або збільшенням кількості генного продукту, а також утворенням аномального продукту. Генні хвороби класифікують за фенотиповими проявами й типом спадкування. При класифікації за фенотипом за основу беруть або системні симптоми (спадкові хвороби нирок, опорно-рухової системи тощо), або біохімічні прояви (порушення обміну речовин, аномалії структурних білків).

Серед **спадкових вад метаболізму** виділяють хвороби, пов'язані з порушенням обміну амінокислот (*аміноацидопатії*), вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот і мінеральних речовин. Патологічні прояви можуть бути зумовлені мутаціями генів, що кодують ферменти (*ензимопатії*); білки, які регулюють активність генів ферментів чи активність самих ферментів; білки, які забезпечують транспорт необхідних для метаболізму речовин; рецептори тощо. Метаболізм будь-яких речовин є процесом багатоступеневим, тому мутації різних генів, які забезпечують перетворення речовин від етапу проникнення речовини в організм до безпосередньої дії метаболітів на відповідні клітини, можуть приводити до подібних патологічних фенотипових проявів. У даному випадку говорять про *генетичну гетерогенність* спадкових захворювань, а мутації різних генів, які викликають схожу клінічну картину, називають *генакопіями*.

Прикладом спадкового синдрому порушення метаболізму амінокислот є **альбінізм**, причиною якого є мутація в гені тирозинази (розташований у довгому плечі хромосоми 11) – ферменту, що перетворює тирозин на дигідроксифенілаланін (ДОФА), який є субстратом для синтезу меланіну. У результаті захворювання характеризується відсутністю пігментації: хворі мають молочно-білий колір шкіри й біле волосся. Захворювання зустрічається з частотою 1/28–39 тис. і успадковується за аутосомно-рецесивним типом. Наразі відомо близько 40 мутацій у гені тирозинази, які приводять до альбінізму (деякі наведено на рис. 7.6). Мутації в різних частинах гена можуть зумовлювати варіанти фенотипового прояву хвороби. Так, мутація в кодоні 81 (пролін замінюється на лейцин) приводить до класичного типу альбінізму (позначається як IA), мутація в кодоні 406 (також заміна проліну на лейцин) є причиною прояву альбінізму типу IB. Тип IB, або "жовтий мутант", відрізняється від класичного типу наявністю у хворих волосся жовтого кольору та значно меншою чутливістю шкіри до сонячних променів.



**Рис. 7.6.** Мутації в гені тирозинази. Римськими цифрами позначено екзони, колами – однонуклеотидні заміни, трикутниками – мікроделеції, квадратом – інсерція

Іншою аміноацидопатією, пов'язаною з порушенням обміну тирозину, є **фенілкетонурія** (ФКУ). Хвороба зумовлена мутаціями в гені фенілаланінгідроксилази (усього відомо близько 600 мутацій). Через відсутність активного ферменту фенілаланін не перетворюється на тирозин. Причиною патології є фенілаланін, токсичний за великих концентрацій, а також його токсичний метаболіт фенілпіровиноградна кислота. Хворі при народженні мають специфічний "мишачий" запах, дисморфічне обличчя та недостатність пігментації (світла шкіра й волосся). Пізніше з'являються судоми, розвивається розумова відсталість. Паталогічних проявів мутацій можна уникнути за умови, що одразу після народження й до 15 років дитина буде переведена на спеціальну безфенілаланінову дієту. ФКУ зустрічається з достатньо високою частотою – у середньому 1/10 тис. (у деяких популяціях в Україні частота досягає 1/4,5 тис.), спадкується як аутосомно-рецесивна ознака. Цікавим є те, що кількість гетерозигот за мутантним геном фенілаланінгідроксилази в популяції є дещо більшою, ніж можна встановити за формулою Харді – Вайнберга (див. розділ 8). Це пояснюється тим, що підвищений рівень фенілаланіну в гетерозиготних жінок є фактором, який зменшує ризик викиднів.

Нестача ферменту може привести до поступового накопичення певних токсичних субстратів у клітині (саме у клітині – на відміну від ФКУ). До таких **хвороб накопичення** відносять, наприклад, хворобу Тея – Сакса (амавротична ідіотія). Через відсутність ферменту гексозамінідази А в лізосомах нервових клітин не розщеплюється гангліозид GM<sub>2</sub> – один із компонентів клітинної мембрани. Гангліозид накопичується в лізосомах, що веде до загибелі нервових клітин. Симптоми хвороби починають виявлятися в основному через декілька місяців після народження: спостерігається гальмування розвитку та про-

гресуючі нервові розлади. Смерть настає в середньому у віці трьох років. Є доросла форма амавротичної ідіотії – хвороба починає розвиватися у віці від 20 до 40 років і супроводжується поступовою прогресуючою розумовою відсталістю. Дитяча форма викликана мутаціями в гені гексоамінідази А за типом зсуву рамки зчитування або порушення сайтів сплайсингу, доросла – місенс-мутаціями.

**Муковіцидоз** є прикладом захворювання, яке пов'язане з порушенням обміну неорганічних іонів. Унаслідок мутації в гені *CFRT* (картований у довгому плечі хромосоми 7, кодує білок каналу для іона хлору) у хворих спостерігаються дефекти потових та інших залоз, що виникають у результаті дії великої концентрації солі в секретах, а також порушення засвоєння їжі, спричинене блокуванням протоків підшлункової залози. Відповідно, спостерігається затримка росту й розвитку дитини. Найфатальнішим є накопичення слизу в дихальних шляхах, що викликає легеневу недостатність у хворих і провокує розвиток пневмоній. Хвороба (аутосомно-рецесивний тип спадкування) зустрічається з частотою від 1/2 тис. до 1/90 тис.

Порушення транспорту кисню гемоглобіном є причиною патологічних проявів **гемоглобінопатій**. Хвороби цього класу пов'язані з мутаціями в генах  $\alpha$ - або  $\beta$ -субодиниць гемоглобіну. Серпоподібноклітинна анемія зумовлена мутацією, яка викликає заміну 6-ї амінокислоти в ланцюзі  $\beta$ -глобіну (глутамін замінюється на валін). Варіант гемоглобіну (гемоглобін S), до складу якого входить змінений  $\beta$ -глобін, гірше виконує свою функцію. Крім того, він здатен полімеризуватися, утворюючи філаменти, які змінюють морфологію еритроцитів (вони набувають форму серпа – звідти назва хвороби). Гомозиготи за мутантним геном мають широкий спектр симптомів: еритроцити серпоподібної форми, анемію, ниркову, серцеву та легеневу недостатність, розумову відсталість, паралічі, болі в суглобах і животі. Без спеціального лікарського нагляду хворі помирають у ранньому дитинстві. У гетерозигот еритроцити мають неправильну форму, оскільки містять два варіанти гемоглобіну – нормальний і мутантний. Але клінічні прояви захворювання в гетерозигот відсутні (починають виявлятися лише за умови зниження концентрації кисню в повітрі – наприклад, у високогірних умовах). Тобто серпоподібноклітинна анемія успадковується як ознака з неповним домінуванням. Хоча гемоглобін S є патологічним варіантом білка, його ген достатньо розповсюджений, особливо у країнах із великим рівнем захворюваності на малярію: кількість носіїв гена досягає 40 % у деяких країнах східної Африки. Це пояснюється високою резистентністю гетерозигот до малярії.



Іншим типом гемоглобінопатій є *таласемії* – хвороби, асоційовані з порушеннями експресії  $\alpha$ - або  $\beta$ -глобінів (відповідно, розрізняють  $\alpha$ - і  $\beta$ -таласемії). До патологій приводять або делеції у глобінових генах, або мутації, що спричиняють зменшення кількості активних мРНК у клітині. Хвороби поширені в деяких середземноморських регіонах: частота хворих може доходити до 30 % (назва хвороби походить від грецького слова *талаσα* – море). Таласемії характеризуються гемолітичною анемією, жовтухою, гіперплазією кісткового мозку та кістковими аномаліями. Залежно від генотипу хворого, симптоматика варіює від субклінічної (м'яка форма) до важкої летальної. Слід звернути увагу, що серпоподібноклітинна анемія та  $\beta$ -таласемія є прикладом, коли різні мутації одного гена можуть мати зовсім різні фенотипові прояви.

Мутації в генах структурних білків тканин, які призводять до відсутності, нестачі або утворення аномального білка, є також причиною великої кількості спадкових синдромів. Наприклад, **синдром Марфана** зумовлений мутаціями в гені фібриліну (локалізований у довгому плечі 15-ї хромосоми) – одного з білків сполучної тканини. Хворі мають порушення кістяка, високий зріст, арахнодактилію (павучі пальці) і дефекти серцево-судинної системи (найнебезпечнішим серед симптомів є ослаблення стінок аорти). Синдром Марфана – аутосомно-домінантне захворювання, яке зустрічається з частотою приблизно 1/10 тис. Цікаво, що приблизно 25 % хворих народжується в родинах, де захворювання раніше не спостерігалось, що вказує на високий рівень мутацій гену фібриліну.

В окрему групу спадкових генних захворювань виділяють так звані хвороби експансії тринуклеотидних повторів. Причиною цих хвороб (таблиця 7.4), які не мають спільної симптоматики, є багатократне збільшення числа копій (експансія, див. розділ 4) тринуклеотидного повтору в межах певного гена. У більшості випадків ці хвороби успадковуються як домінантні ознаки, що виявляються у статево-зрілому віці. Якщо у клінічно здорових батьків народжується хвора дитина, то один із батьків мав кількість повторів, більшу за норму, але меншу за потрібну для клінічних проявів (так званий стан премутації): при достатній кількості повторів значно зростає імовірність їхньої подальшої експансії при кожному наступному раунді реплікації. Відповідно, для всіх хвороб даного типу характерне явище *антиципації* – з кожним наступним поколінням симптоматика хвороби посилюється, хвороба виявляється в більш ранньому віці, що пов'язано зі збільшенням кількості копій тринуклеотидного повтору.

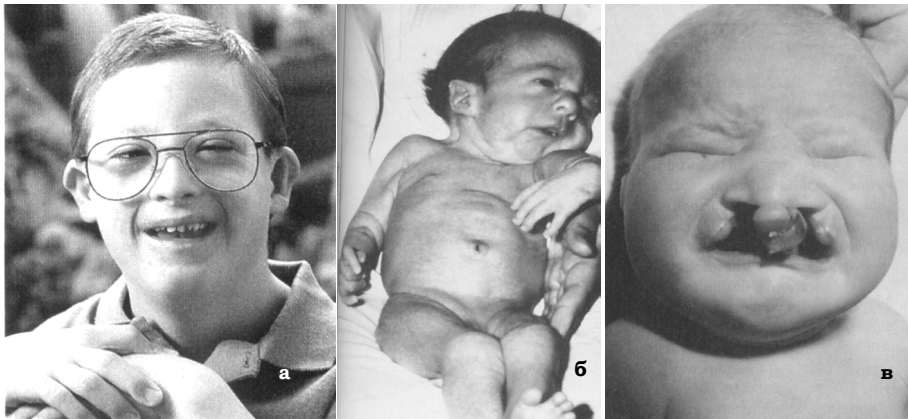
Таблиця 7.4. Деякі хвороби експансії тринуклеотидних повторів

Захво- рювання	Симпто- матика	Спадку- вання	Одиниця повтору	Кількість копій	
				Норма	Патологія
Міотонічна дистрофія	Прогресуюча м'язова слабкість, судоми, катаракта, серцева аритмія	Аутосомно- домінантне	CTG	5–37	80–3000
Хорея Геннтинг- тона	Прогресуюча дегенерація базальних гангліїв, яка супроводжується розладами руху, змінами психіки, епілептичними нападами	Аутосомно- домінантне	CAG	6–34	40–121
Спинно- церебелар- на атаксія першого типу	Прогресуюча дегенерація ділянок мозочка та спинного мозку з поступовою втратою координації рухів	Аутосомно- домінантне	CAG	6–30	41–81
Атаксія Фрідрейха	Прогресуюча дегенерація задніх і бокових стовпів спинного мозку з поступовою втратою координації рухів	Аутосомно- рецесивне	GAA	10–21	200–900
Синдром Мартіна – Белла	Ламка X-хромосома, розумова відсталість	Зчеплене з X-хромосо- мою, неповне домінування (ознаки ро- зумової від- сталості спо- стерігаються у 60 % гете- розиготних жінок)	CGG	6–52	230–2000

Велика група спадкових патологій належить до **хромосомних хвороб**. Різноманітні порушення каріотипу зустрічаються серед новонароджених у середньому з частотою 0,6 %. Тільки 10 % від цих аномалій не супроводжується видимими патологічними станами. Але реальний рівень утворення хромосомних аномалій значно вищий: за деякими розрахунками приблизно 25 % зигот мають аномальний каріотип і основна маса ембріонів із такими порушеннями гине ще в доімплантаційний період. Серед спонтанних абортусів 50 % мають хромосомні аномалії.

Порушення в кількості або структурі хромосом можуть виникати при гаметогенезі в одного з батьків. У цьому разі аномалія буде зустрічатися в усіх клітинах зародку. Такий організм називають *повним мутантом*. Інколи хромосомні аномалії виникають у процесі ембріонального розвитку. У результаті тільки частина клітин зародку буде мати аномальний каріотип – таке явище назвали *генетичним мозаїцизмом*.

Кількісні аномалії хромосом виникають унаслідок порушення сегрегації хромосом (див. розділ 4). Єдиною сумісною з життям моносомією в людини є моносомія X-хромосоми. Моносомії по всіх аутосомах є летальними: зародок гине на початкових стадіях розвитку, оскільки навіть серед абортусів дана аномалія каріотипу не зустрічається. Трисомії по більшості аутосом також спричиняють аномалії розвитку зародку, які несумісні з життям. Серед живонароджених спостерігаються трисомії тільки по хромосомах 21, 18 і 13 (рис.7.7).



**Рис. 7.7.** Характерні фенотипові риси хворих при трисоміях по хромосомах 21 (а), 18 (б) і 13 (в).

**Трисомія-21 – синдром Дауна** – найбільш розповсюджена хромосомна хвороба і зустрічається в середньому з частотою 1/500–700 новонароджених. Співвідношення статей серед хворих 1 : 1. Хворі мають характерний фенотип: монголоїдний розріз очей, наявність епіканта, плоске широке перенісся, низький зріст, маленький череп зі згладженою потилицею. У багатьох хворих спостерігаються аномалії серцево-судинної системи та імунодефіцити, які є основними причинами їхньої загибелі. Чоловіки стерильні, однак жінки іноді можуть мати дітей. Одним із головних симптомів синдрому Дауна є розумова відсталість (дебілізм різного ступеня, максимальний IQ = 75). Мозаїчні форми синдрому Дауна (близько 3 % від загальної кількості випадків) характеризуються значно м'якшою симптоматикою. У деяких випадках один із батьків хворого на синдром Дауна (частіше мати) є носієм збалансованої робертсонівської транслокації (див. розділ 4) хромосоми 21 із хромосомами 13–15, рідше з хромосомою 22. У такій родині можуть народжуватися хворі діти із синдромом Дауна, нормальні, а також здорові діти – носії збалансованої робертсонівської транслокації.

**Трисомія-18 – синдром Едвардса** – зустрічається з частотою 1/4,5–7 тис. новонароджених. Діти при народженні мають маленьку вагу, слабкі, повільно розвиваються фізично та психічно. Найчастіше спостерігаються аномалії черепа (скошене підборіддя, маленький рот, слабо розвинуті щелепи, випнута потилиця), деформовані низько розташовані вуха, деформації рук і стоп, коротка грудина, дефекти розвитку м'язів. Хворі мають значні пороки розвитку серця та нирок. Тільки 1–2 % дітей доживає до 1 року. Особливістю синдрому Едвардса є вища народжуваність дівчат із патологією, ніж хлопчиків (3 : 1), що відображає вищу внутрішньоутробну смертність чоловічих плодів.

**Трисомія-13 – синдром Патау.** Для клінічної картини захворювання характерними є множинні вроджені вади розвитку: розщеплення м'якого і твердого піднебіння, "заяча" губа, мікрофтальмія (недорозвинені маленькі очі), інколи відсутність очей, вуха, мікроцефалія, затримка росту та розумового розвитку, порушення серця, нирок та травної системи. Синдром зустрічається з частотою 1/14,5 тис., більшість плодів гине протягом внутрішньоутробного розвитку. Діти часто народжуються передчасно й мають маленьку масу, рідко доживають до 1 року, ті, що вижили, страждають глибокою формою ідіотії. Описано випадки, коли причиною синдрому Патау були робертсонівські транслокації за участю хромосоми 13. При мозаїцизмі за додатковою хромосомою 13 часто спостерігають розумову відсталість без зовнішніх аномалій.

**Кількісні аномалії статевих хромосом** представлені моносомією хромосоми X і полісоміями X- та Y-хромосом. Основні синдроми, причиною яких є зміна нормального числа статевих хромосом, наведено в табл. 7.5.

Таблиця 7.5. Основні синдроми, пов'язані зі зміною кількості статевих хромосом

Синдром	Каріотип*	Частота	Симптоматика
Шерешевського – Тернера (моносомія X)	45, X0	1/3000 – 1/5000	Фенотип жіночий. Недорозвинені яєчники й зовнішні статеві органи, відсутні вторинні статеві ознаки, безпліддя, низький зріст, "чоловічий" тип будови тіла. Часто вади серцево-судинної системи. Інтелект у нормі, відмічається психічний інфантилізм.
Трисомія X	47, XXX	1/1000	Фенотип жіночий. Невиразні фізичні відхилення різноманітного характеру. Фертильність. У 75 % спостерігається розумова відсталість невеликого ступеню. Підвищений ризик розвитку психозів.
Синдром Кляйнфельтера	47, XXУ	1/1000	Фенотип чоловічий. Недорозвинуті сім'яники, відсутність сперматогенезу, безпліддя. "Євнухоїдний" тип будови тіла: вузькі плечі, широкий таз, відкладення жиру й оволошіння за жіночим типом. Розумова відсталість різного ступеня.
Полісомія Y	47, XYУ	1/250 – 1/1000	Фенотип чоловічий. Фізичний, розумовий і статевий розвиток нормальний. Підвищений рівень андрогенів, у деяких чоловіків спостерігаються психопатичні риси характеру, агресивність, асоціальна поведінка.

\* загальне число хромосом, набір статевих хромосом.

Для більшості трисомій (як життєздатних, так і летальних) було доведено материнське походження зайвої хромосоми, що з'являється внаслідок нерозходження хромосом, найчастіше – у першому поділі мейозу. Наприклад, 88 % випадків трисомії-21 викликані порушенням сегрегації хромосом у матері, причому 65 % нерозходжень відбулися в мейозі I. Нерозходження хромосом при сперматогенезі є причиною тільки 8 % трисомій по хромосомі 21 (3 % – у мейозі I, а 5 % – у мейозі II). Проте нерозходження статевих хромосом у батька є основною причиною синдрому Шерешевського – Тернера й 46 % випадків

синдрому Кляйнфельтера. Для всіх трисомій із материнським ефектом є характерною чітка позитивна кореляція між віком матері та ризиком розвитку плоду з відповідним аномальним каріотипом. Збільшувати ризик нерозходження хромосом у матері можуть також зовнішні фактори: інфекційні хвороби, мутагенні чинники та шкідливі звички (тютюнопаління, алкоголізм тощо).

Описані кількісні аномалії хромосом – це анеуплоїдії. Причиною 23 % спонтанних абортів є поліплоїдії. Серед живонароджених тетраплоїдів не спостерігається, є одиничні випадки народження триплоїдних дітей із множинними важкими вадами розвитку, не сумісними з життям.

Крім кількісних аномалій хромосом, причиною вроджених патологічних станів можуть бути структурні хромосомні аберації. Такі хромосомні хвороби поділяються на **синдроми часткових анеуплоїдій** (до цієї групи не відносять незбалансовані робертсонівські транслокації) і **мікроцитогенетичні синдроми**.

Синдроми часткових анеуплоїдій (на сьогодні їх описано близько 100) отримали свою назву тому, що патологічна симптоматика захворювань зумовлена або надлишком (часткова трисомія), або нестачею (часткова моносомія) досить великої ділянки певної хромосоми. Основна клінічна картина, як і для повних анеуплоїдій, крім комбінації притаманних даному синдрому ознак, характеризується великим набором неспецифічних симптомів: уроджені вади розвитку, розумова відсталість, дисплазії, дефекти серцево-судинної системи тощо. Неспецифічність симптоматики вказує на те, що в загальній патології основну роль відіграють не втрачені чи надлишкові генні локуси, а сам факт хромосомного дисбалансу.

До мікроцитогенетичних синдромів відносять захворювання, причиною яких є субмікроскопічні делеції або дуплікації відповідних ділянок хромосом. Мікроцитогенетичні синдроми зустрічаються з достатньо низькою частотою (1/50 тис. – 1/100 тис.), характеризуються чіткою клінічною картиною. Прикладами мікроцитогенетичних синдромів є спадкова ретинобластома (мікроделеція в хромосомі 13, яка є причиною вроджених злоякісних пухлин сітківки ока), синдром Беквіта – Відемана (мікродуплікація в короткому плечі хромосоми 11, яка приводить до характерних вад розвитку: грижа пупкового каналіка, мікроцефалія, гіпоглікемія та множинні пороки розвитку внутрішніх органів), синдроми Ангельмана та Прадера – Віллі (мікроделеції в довгому плечі хромосоми 15).

З перерахованих захворювань синдроми Ангельмана та Прадера – Віллі привертають особливу увагу. При синдромі Прадера – Віллі хворі мають неконтрольований апетит і, як результат, ожиріння, диморфізм

обличчя, маленькі стопи й долоні, гіпотонію, розумову відсталість. Синдром Ангельмана характеризується важкими нервовими, психічними та розумовими розладами: порушення координації рухів (маріонеточні рухи), епілептичні напади, неконтрольовані напади сміху, відсутність мовної діяльності. Незважаючи на різні фенотипові прояви, мікрделеції у хромосомі 15, які виявляються при цих синдромах, є ідентичними. Патологічні прояви залежать від того, від кого дитина отримала змінену хромосому: якщо хромосома з мікрделецією дісталася від батька, то симптоматика відповідає синдрому Прадера – Віллі, якщо від матері – синдрому Ангельмана. Отже, важливим є не тільки факт успадкування аномальної хромосоми, а також її походження. Таке явище назвали хромосомним *імпринтингом*, а хвороби, які спадкуються подібно до синдромів Ангельмана та Прадера – Віллі, – *хворобами імпринтингу*. Явище імпринтингу пояснюється різною активністю деяких алелів на материнських і батьківських хромосомах унаслідок ефектів епігенетичної спадковості (див. розділ 6). Таким чином, для генів, котрі підлягають імпринтингу, спостерігається функціональна моносомія, а організми за цими генами є функціональними гемізиготами.

Окремою групою серед патологічних станів, зумовлених генетично, стоять патології несумісності матері та плоду. Найвідомішим прикладом такої патології є резус-конфлікт. У випадку, коли мати резус-негативна (відсутній Rh-антиген), а плід – резус-позитивний, в організмі матері утворюються антитіла проти Rh-антигену. Перша вагітність може пройти без будь-яких проблем. Під час другої вагітності, коли знову розвивається плід із позитивним резус-фактором, виникає конфлікт сумісності між організмом матері та плоду, оскільки мати вже імунна до плоду з позитивним резус-фактором. Цей конфлікт може привести до переривання вагітності або до народження дитини з патологіями.

## ГЕНЕТИКА ОНКОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Під онкологічними хворобами розуміють велику групу захворювань (понад 200), які зумовлені появою в організмі змінених (*трансформованих*) соматичних клітин. Такі клітини характеризуються низкою біологічних особливостей: безконтрольним поділом, безсмертям, порушенням диференціації, здатністю до інфільтрації та знищення сусідніх нормальних клітин, можливістю мігрувати по організму й утворювати *метастази* – вторинні колонії в органах і тканинах. Розвиток хвороби (*канцерогенез*) є довгим процесом, усі етапи якого

(від ініціації до утворення метастазів) пов'язані з перебудовами геному трансформованих клітин. Найчастіше всі популяції трансформованих клітин в організмі є нащадками однієї зміненої соматичної клітини. Отже, онкологічні захворювання є одним із типів спадкових хвороб – спадкових хвороб соматичних клітин.

Зміни геному, які приводять до трансформації клітин, стосуються генів, відповідальних за регуляцію клітинного циклу, диференціації та запрограмованої загибелі клітин. Крім мутацій, у трансформованих клітинах відбувається перерозподіл епігенетичних маркерів, що викликає зміни експресії деяких генів. Гени, залучені до канцерогенезу, зазвичай поділяють на три групи:

1. **Протоонкогени** (прийнято позначати *c-onc*) – гени, нормальна функція яких полягає у стимуляції поділу клітини. До цієї групи відносять також гени білків, що інгібують апоптоз, стимулюють *ангіогенез* (проростання судин в орган чи тканину при недостатності поживних факторів або кисню) і рухливість клітин. Мутації цих генів або епігенетичні зміни, які призводять до їхньої гіперекспресії, стимулюють розвиток новоутворень (протоонкогени перетворюються на **онкогени**). Мутації, як правило, є домінантними – достатньо однієї події для стимуляції відповідного етапу канцерогенезу.

2. **Антионкогени** (або **гени-супресори** пухлин) – гени, нормальна функція яких полягає в затриманні поділу клітин, активації процесів диференціації, стимуляції апоптозу та інгібуванні ангіогенезу. Для розвитку новоутворення в більшості випадків потрібна інактивація обох алелів генів-супресорів (двоударний механізм), тобто онкогенні мутації цих генів є рецесивними.

3. **Гени-мутатори** (*genome care keeper genes* – "охоронці геному") – гени, нормальна функція яких полягає в підтриманні цілісності геному (наприклад, гени білків репараційних систем). Їхня інактивація унаслідок мутацій або епігенетичних змін є причиною збільшення частоти будь-яких мутацій будь-яких генів – у тому числі протоонкогенів і генів-супресорів. У результаті клітина набуває так званого мутаторного фенотипу. Мутації генів-мутаторів є рецесивними.

Вважається, що надбання клітиною мутаторного фенотипу часто є ключовим етапом канцерогенезу. Мутації або інактивація генів білків репараційних систем значно збільшують імовірність виникнення інших онкогенних мутацій, що прискорює проходження всіх етапів канцерогенезу.



Причинами розвитку новоутворень, подібно до інших захворювань, є як фактори навколишнього середовища, так і генетична схильність до хвороби. Близько 80 % усіх випадків онкозахворювань відносять до спорадичних (випадкових), 15 % – до сімейних форм (важко розділити вплив середовища та генотипу), і тільки 5 % суто спадкові.

До середовищних факторів, що індукують розвиток новоутворювань (*канцерогенів*), належать будь-які мутагенні чинники (див. розділ 4) та онкогенні віруси. Вони трансформують заражену клітину за рахунок онкогенів, які присутні в геномі вірусу. Вірусні онкогени (позначаються як *v-onc*) можуть бути клітинного походження (захоплені вірусом *c-onc*), як у багатьох онкогенних ретровірусів, або бути вірусними генами, що кодують білки, необхідні для життєдіяльності вірусу (ДНК-онковіруси: папіломавіруси, вірус Епштейна – Барра тощо).

Середовищні чинники самі по собі відповідають за розвиток невеликої частини онкозахворювань. Розвиток більшості новоутворень (навіть спорадичних) залежить від спадкової схильності. Але на відміну від багатьох розглянутих вище спадкових хвороб, спадкові ракові синдроми мають ряд особливостей прояву, які утруднюють їхнє діагностування. Якщо при інших спадкових синдромах комплекс симптомів є результатом плейотропної дії відповідного мутантного гена, то успадковані онкогенні мутації – тільки "ініціатори" новоутворення. Подальший розвиток хвороби потребує додаткових змін геному окремих соматичних клітин.

Для багатьох спадкових ракових синдромів спостерігається своєрідний парадокс спадкування: на клітинному рівні успадкована мутація є рецесивною (більшість генів, які зумовлюють спадкові ракові синдроми, є генами-супресорами пухлин), а на організменому рівні поводить себе як домінантна. Справа в тому, що будь-яке новоутворення є хворобою соматичних клітин, розвиток якої є випадковою подією. Зрозуміло, що за наявності успадкованої мутації ймовірність ініціації захворювання (мутації та відповідної втрати іншого алеля гена-супресора пухлини в будь-якій соматичній клітині, яка в подальшому може дати початок зміненому клону) є на багато порядків вищою, ніж у разі відсутності такої мутації (ймовірність мутації одного алеля становить  $10^{-5}$ – $10^{-7}$ , двох –  $10^{-10}$ – $10^{-14}$ ).

Незважаючи на великі труднощі при встановленні спадкової схильності до онкологічних хвороб, розроблено ряд критеріїв, за якими можна з високою імовірністю виявити спадкові форми. Основні ознаки спадкових ракових синдромів такі:

- наявність ідентичних або подібних форм онкозахворювань у двох або більше близьких родичів;
- ранній розвиток (до 45 років) онкозахворювання хоча б у одного з близьких родичів;
- білатеральні пухлини в парних органах;
- велика кількість первинних пухлин у одного хворого;
- домінантний тип спадкування.

Звичайно, для окремих спадкових ракових синдромів існують додаткові критерії підтвердження діагнозу.

Дослідження молекулярних причин ракових синдромів є важливим джерелом інформації про гени, порушення функції яких приводить до ініціації та прогресування онкозахворювання. Популяційний скринінг мутацій цих генів допомагає виявляти групи ризику та проводити більш ефективну профілактику та ранню діагностику онкозахворювань. Вивчення поліморфних варіантів протоонкогенів, генів-супресорів пухлин і генів, які зумовлюють чутливість організму до канцерогенних факторів середовища, дозволяють розкривати причини багатьох онкологічних хвороб і оцінювати індивідуальний ризик розвитку злоякісних новоутворень.

## ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ЕВОЛЮЦІЇ ЛЮДИНИ

Реконструкція еволюції біологічного виду *Homo sapiens sapiens*, як і будь-якого сучасного виду, є важкою для розв'язання проблемою, що залишається далекою від свого остаточного вирішення. Можливі етапи еволюції людини запропоновані на основі палеонтологічних даних, порівнянні варіацій послідовностей ДНК людини та людиноподібних мавп, а також послідовностей ДНК різних груп сучасних і викопних останків стародавніх людей.

За палеонтологічними даними перші гомініди (до гомінід відносяться людина й людиноподібні мавпи) з'явилися в Африці приблизно 20 млн років тому. Чотирма мільйонами років датуються рештки гомінід, які могли би за припущеннями бути предками людини: кеніантропів, ардипітеків і австралопітеків. Рід *Homo* відокремився від стародавніх гомінід приблизно 2,5 млн років тому. Цю групу становили декілька видів, які проживали одночасно.

Із них прямим предком людини, за морфологічними показниками скам'янілих останків, вважається *Homo erectus* (людина прямоходяча). Вид зародився в Африці, потім представники мігрували в Азію та Європу. За загально прийнятою гіпотезою початок новому виду *Homo sapiens* у процесі еволюції дали популяції людини прямоходячої, що мешкали в Африці. Вид *Homo sapiens* мав два підвиди – *Homo sapiens neandertaliensis* (неандертальці, або палеоантропи) і *Homo sapiens sapiens* (люди сучасного типу, або неоантропи). Неандертальці з'явилися приблизно 400 тис. років тому, вимерли 30–25 тис. років тому. Сучасні люди виникли приблизно 200 тис. років тому. Деякий час неандертальці й неоантропи проживали на спільних територіях.

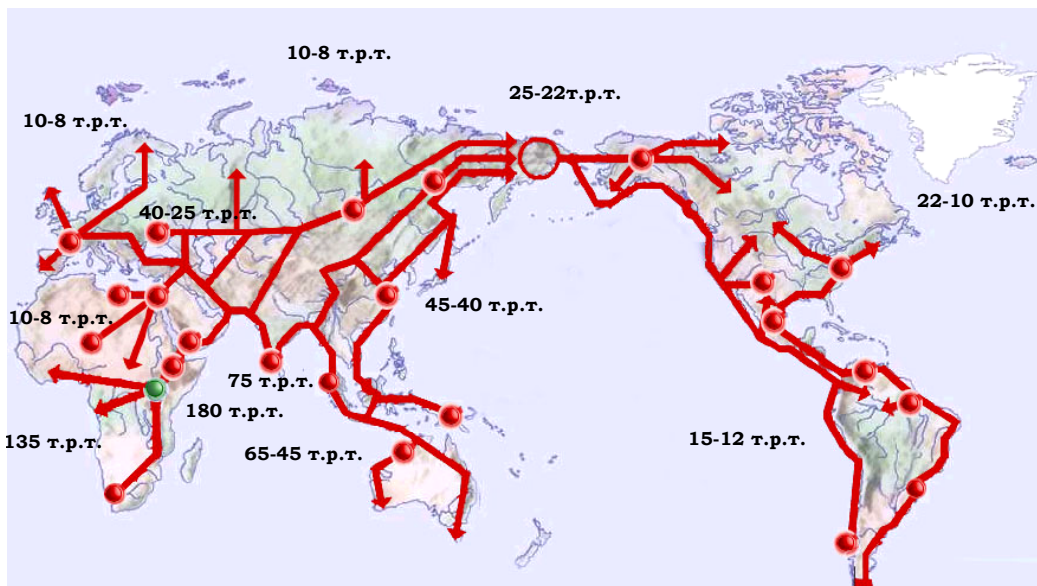
Підтвердження та уточнення палеонтологічних даних отримано при порівняльному геномному аналізі сучасних гомінід. Було з'ясовано, що найближчим до людини видом є шимпанзе, а найвіддаленішим – орангутанг. Порівняння каріотипів шимпанзе й людини показало, що 13 хромосом є повністю ідентичними за морфологією та особливостями диференційного забарвлення. Хромосома 2 людини утворилася в результаті злиття двох акроцентричних хромосом, ідентичних тим, які присутні у хромосомному наборі шимпанзе (саме тому людина має 23 пари хромосом, а шимпанзе та інші людиноподібні мавпи – 24). Решта дев'ять "неідентичних" хромосом відрізняються тільки за наявністю перичентричних інверсій. Така подібність каріотипів характерна для надзвичайно близьких видів.

Більш вражаюча інформація була отримана при порівнянні послідовностей ДНК і білків – генні послідовності людини й шимпанзе збігаються майже на 99 %. Така подібність є зазвичай характерною для "видів-близнюків", тобто таких видів, які морфологічно неможливо відрізнити. Це дало навіть підставу деяким дослідникам запропонувати приєднати шимпанзе до роду *Homo*. Причиною суттєвих морфологічних відмін між шимпанзе та людиною вважають особливості експресії генів, хоча питання залишається далеким від свого вирішення.

За допомогою порівняння геномів можна встановити не тільки генетичну подібність різних видів, але, використовуючи метод молекулярного годинника, і з'ясувати час, коли відбулося розгалуження еволюційного дерева. Метод молекулярного годинника базується на факті, що в різних ділянках геному мутації з'являються з різною частотою. Знаючи таку частоту (а, відповідно, і середній час, за який виникає одна мутація) для певної геномної зони, можна розрахувати час, потрібний для виникнення певної кількості розбіжностей між геномами, що аналізуються. Для подібних досліджень найбільш активно

використовують послідовності мітохондріальної ДНК і нерекомбінуючої ділянки Y-хромосоми. Ці послідовності мають дві значні переваги: їхні зміни виникають винятково в результаті мутацій (відсутня рекомбінаційна мінливість), і передача цих послідовностей нащадкам є одnobатьківською (мтДНК передається по материнській лінії, Y-хромосома – по батьківській). Так, раніше вважалося, що відокремлення гілки предків сучасного орангутанга від загального дерева гомінід відбулося приблизно 10 млн років тому, а 5 млн років тому відбулося одночасне розділення гілок людини, шимпанзе та горили. При порівнянні мтДНК людини й людиноподібних мавп було встановлено, що гілки шимпанзе та горили відокремилися значно пізніше, тобто тоді, коли предки людей уже повинні були існувати.

Порівняння мітохондріальної ДНК сучасних людей і неандертальців підтвердили, що ці дві групи є більш генетично близькими, ніж шимпанзе та людина, і належать до одного виду. Загальний предок неандертальців і людей сучасного типу жив приблизно 500 тис. років тому. На сьогоднішній день не має молекулярних доказів того, чи схрещувалися між собою неандертальці та неантропи.



**Рис. 7.8.** Шляхи міграції людства за період 180–8 тис. років тому (т.р.т.). Зеленим колом позначений центр зародження сучасної людини. Червоними колами – місця значних палеонтологічних знахідок. (Детальніше див. на <http://www.bradshawfoundation.com>)

За даними аналізу ДНК (які підтверджують сучасні палеонтологічні дані) люди сучасного типу виникли приблизно 180 тис. років тому в одному регіоні східної Африки й розселилися по всій земній кулі. Аналіз послідовностей ДНК дозволив також з'ясувати основні шляхи міграцій людства за приблизно 150 тис. років (рис. 7.8). Крім того, порівняння мтДНК і Y-хромосоми показали, що всі відомі варіанти цих послідовностей (як сучасні, так і з викопних останків) виникли в результаті послідовних однонуклеотидних замін, тобто всі ці варіанти можна звести до однієї первинної послідовності. Аналіз мітохондріальної ДНК свідчить, що всі сучасні люди є нащадками однієї жінки (так званої "генетичної Єви"), а аналіз Y-хромосоми, – що предком усього людства був тільки один чоловік ("генетичний Адам"). Слід зауважити, що хоча "прабатьки" всього людства походять зі східної Африки, жили вони в різні часи: генетична Єва жила 160 тис., а генетичний Адам – приблизно 60 тис. років тому.

Існування загальних "прабатьків" усього людства та розбіжність у періодах їхнього життя можна пояснити випадковими причинами: велика кількість ліній, що йшли від інших прабатьків, просто обірвалися. Справа в тому, що декілька разів за свою історію людина як вид була на межі вимирання. Наприклад, вибух вулкану Тоба, який відбувся 74 тис. років тому, ініціював початок льодового періоду. Унаслідок цього катаклізму загальна кількість людей на Землі скоротилася до 10 тис., а саме людство існувало у вигляді розкиданих невеличких ізолятів. Неодноразове проходження людства скрізь таку "шийку пляшки" (див. розділ 8) могло бути причиною того, що випадково залишились нащадки тільки однієї жінки та одного чоловіка.

### *Контрольні запитання і завдання*

1. Охарактеризуйте предмет і завдання генетики людини.
2. Обґрунтуйте недоліки та переваги людини як генетичного об'єкта.
3. Опишіть основні риси організації ядерного геному й каріотипу людини.
4. Перерахуйте типи структурних варіантів геному людини. Як використовується геномний поліморфізм для потреб медичної генетики та судово-медичної експертизи?
5. Як використовується метод складання родоводів при визначенні типів спадкування у людини? Якими основними символами послуговуються при графічному відображенні генеалогічного дерева?

6. Які основні характеристики родоvodu вказують на аутосомні типи спадкування ознак? На типи спадкування ознак зчеплених зі статтю?
7. Як залежить прояв багатофакторних ознак від факторів навколишнього середовища? Опишіть модель порогу.
8. Які методи в генетиці людини застосовують для відокремлення дії факторів зовнішнього середовища від впливу генотипу на прояв ознаки? Дайте визначення термінам конкордантність і дискордантність.
9. За даними, наведеними в табл. 7.3, розрахуйте коефіцієнт спадковості для епілепсії.
10. Як можна поділити хвороби залежно від внеску спадкових і середовищних факторів у розвиток патологічних станів?
11. Класифікація спадкових захворювань. Наведіть приклади генних спадкових захворювань.
12. Які основні характеристики хромосомних спадкових захворювань?
13. Назвіть трисомії та моносомії, які в людини є життєздатними.
14. Які існують мікрделеційні синдроми та хвороби імпринтингу?
15. Поясніть причини патологічних станів несумісності матері та плоду.
16. Опишіть особливості, які відрізняють онкологічні захворювання від інших спадкових хвороб.
17. В яких клітинних процесах беруть участь протоонкогени, антионкогени та гени-мутатори?
18. Як саме відрізняються хромосомні набори людини та шимпанзе? Наскільки коректно відносити людину та шимпанзе до "видів-близнюків"?
19. Застосування методу молекулярного годинника при дослідженні еволюції людини. Де й коли, за даними генетичних досліджень, зародилась людина сучасного типу?
20. Чим можна пояснити, що всі сучасні люди мають спільних пра-батьків?

## РОЗДІЛ 8

# Генетика популяцій

Статевий процес (зачатки якого реалізуються навіть у прокаріотів, див. розділ 5) створює умови обміну генами між особинами одного виду, що проживають на спільній території. Саме така група особин, яка узагальнює певну сукупність генів, – *популяція* – є елементарною одиницею еволюційного процесу.

**Популяцією** називають групу особин одного виду, що мають спільний ареал (мешкають на спільній території) і спільний генофонд, відокремлений від сусідніх груп (рис. 8.1). Між особинами популяції реалізуються тісні генетичні відносини – більш-менш вільне схрещування в межах групи. Відокремлення від сусідніх популяцій здійснюється внаслідок певної обмеженості таких відносин із іншими групами (ізоляції від інших популяцій). Еволюційні зміни виду відбуваються шляхом зміни генофонду – загальної сукупності генів – кожної такої популяції.



**Рис. 8.1.** Популяція пінгвінів Аделі на Ялурових островах (архіпелаг Аргентинські острови, Антарктика) складається з окремих колоній і має характерну "острівну" просторову структуру. На передньому плані – одна з таких колоній

Популяція не є просто арифметичною сукупністю особин, це певна система, якій властиві свої особливості структури та функціонування. Особливості популяції як системи базуються на видових та індивідуальних властивостях особин, що входять до її складу, але не можуть бути зведені до суми цих властивостей. З іншого боку, властивості організмів, які становлять популяцію, залежать від особливостей цієї популяції та формуються в умовах її існування. Отже, популяційна генетика, предметом якої є генетичні параметри груп особин і зміна цих параметрів, відрізняється певною специфікою проблематики та методів досліджень.

До найважливіших параметрів, що характеризують популяцію, відносять чисельність, мінливість, структурованість і особливості розмноження (системи схрещування), а також частоти генів (алелів) та генотипів. Ці параметри разом з іншими зумовляють унікальність генотипу популяції та її генетичну структуру.

## ВЛАСТИВОСТІ ПОПУЛЯЦІЇ

### Чисельність

У найпростішому випадку, без урахування міграційних процесів, чисельність популяції залежить від співвідношення двох величин – народжуваності та смертності. Якщо народжуваність (кількість новонароджених, віднесена на одну особину, за певних час  $t$ ) позначити як  $a$ , смертність (кількість смертей на одну особину за той самий час) – як  $b$ , то різниця між ними  $r$  дасть уяву про зміну чисельності популяції протягом дослідженого періоду:

$$r = a - b.$$

На честь Мальтуса (Thomas Robert Malthus), який першим звернув увагу на різну швидкість росту населення та необхідних ресурсів, величину  $r$  називають *мальтузіанським параметром*. Використовуючи цей параметр, миттєву швидкість зміни чисельності популяції  $N$  (зміну чисельності за певний момент часу, коли тривалість досліджуваного періоду  $t$  наближається до нуля) можна виразити рівнянням

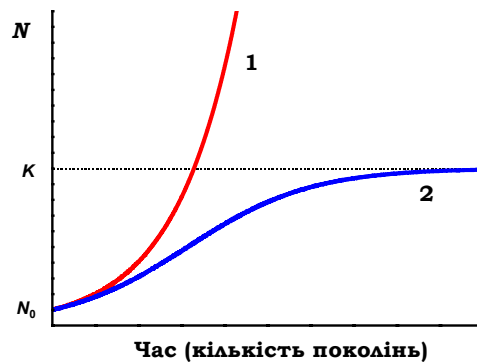
$$dN/dt = rN,$$

розв'язання якого дає експоненціальний характер зростання чисельності в часі (швидкість є тим вищою, чим більшою є чисельність популяції).

Ця *експоненціальна модель* росту популяції враховує лише два параметри – народжуваність і смертність. Вона описує вибухоподібне



зростання чисельності в умовах відсутності тиску середовища й наявності нескінченно великих ресурсів (рис. 8.2).



**Рис. 8.2.** Дві криві росту чисельності популяції  $N$ : експоненціальна (1) і логістична (2).  $N_0$  – вихідна чисельність популяції,  $K$  – верхня критична межа чисельності популяції, яка залежить від ресурсів середовища

Обмеженість ресурсів зумовлює певний "тиск середовища" на здатність популяції до експоненціального росту (див. рис. 8.3). Тобто існує верхня критична межа чисельності популяції  $K$ , яка визначається спроможністю середовища підтримувати на обмеженому ареалі існування лише обмежену кількість особин одного виду. Тоді швидкість зростання популяції залежатиме від того, наскільки в даний момент чисельність  $N$  наблизилась до  $K$ , (логістична модель росту популяції, рис. 8.2):

$$dN/dt = rN(1 - N/K).$$



**Рис. 8.3.** Зростання колоній дріжджів на поверхні живильного середовища в чашці Петрі. Добре помітно сповільнення росту колоній у напрямку найближчих сусідніх колоній і більш інтенсивний ріст у протилежному. Різницю темпів росту можна пояснити зменшеною концентрацією поживних речовин (ресурси середовища) і підвищеною концентрацією метаболітів у зоні сусідства

Чисельність популяції та її динаміка є вагомими показниками стану популяції. Не менш важливим параметром є так звана **ефективна чисельність популяції** ( $N_e$ ). Справа в тому, що не всі особини, які здатні залишати нащадків, насправді роблять репродуктивний внесок у відтворення популяції. У найпростішому випадку  $N_e$  можна визначити як чисельність особин, які залишають потомство. Якщо чисельності самців  $N_m$  і самок  $N_f$  приблизно однакові (вважаючи, що всі самці й самки є репродуктивно спроможними), то ефективна чисельність популяції просто дорівнює їхній сумі:

$$N_e = N_m + N_f.$$

У випадку значної різниці між чисельністю самців і самок ефективну чисельність популяції знаходять за виразом

$$N_e = \frac{4N_m N_f}{N_m + N_f}.$$

Залежність ефективної чисельності популяції від співвідношення статей для різних груп з однаковим кількісним складом показано в табл. 8.1. Очевидно, що ця величина дорівнює сумі самців і самок репродуктивного віку лише за умови їхньої однакової чисельності (останнє рівняння зводиться до попереднього, якщо  $N_m = N_f$ ). У всіх інших випадках  $N_e < (N_m + N_f)$ . На величину  $N_e$  впливає також розмір нерепродуктивної частини популяції (різні вікові групи або "робочі особини" у бджіл чи мурашок), неоднакова репродуктивна здатність, коливання загального кількісного складу популяції та ряд інших факторів.

**Таблиця 8.1. Теоретично розрахована ефективна чисельність популяції  $N_e$  для групи зі 100 особин при різних співвідношеннях самців  $N_m$  і самок  $N_f$**

Чисельність самців, $N_m$	Чисельність самок, $N_f$	$N_m / N_f$	Ефективна чисельність, $N_e$
50	50	1	100
75	25	3	75
25	75	0,33	75
90	10	9	36
10	90	0,1	36
99	1	99	3,96
1	99	0,01	3,96

## Мінливість

Наявність відмін між особинами одного виду є необхідною умовою еволюційних змін популяції. Мінливість фенотипів може бути викликана факторами середовища (неспадкова мінливість), генетичними відмінами (спадкова мінливість) або ж обома факторами, як це характерно для кількісних ознак.

Мінливість кількісних ознак при популяційних дослідженнях характеризують середнім значенням ознаки, дисперсією, а також коефіцієнтами варіації та успадкування (див. розділ 3). Мінливість альтернативних (якісних) ознак визначають часткою в популяції певної форми (або морфи) цієї ознаки – **частотою фенотипу**. Основними показниками генетичної мінливості в популяції є **частоти генів і генотипів**. Рівень генетичної мінливості популяції є основним джерелом для її потенційної адаптивної зміни.

Якщо в популяції існує всього один алель гена, його називають **мономорфним**, якщо два й більше – **поліморфним**, а наявність у популяції кількох алельних форм гена – **генетичним поліморфізмом**. Частка поліморфних генів серед усіх проаналізованих – **поліморфність** ( $P$ ) – є одним із показників генетичної мінливості популяцій. Умовним критерієм поліморфності гена є частота його алелів: ген вважають поліморфним, якщо частки хоча б двох алелів перевищують 0,05 або 0,01 (два пороги поліморфності). Якщо ж ця частота не перевищує порогове значення, алель відносять до рідких алелів або до мутацій. Приклад обчислення поліморфності  $P$  наведено в табл. 8.2.

Таблиця 8.2. Обчислення середньої поліморфності ( $\bar{P}$ ) чотирьох популяцій

Популяція	Кількість проаналізованих генів		Поліморфність
	Усього	Поліморфних	
А	30	18	0,60
Б	50	16	0,32
В	20	8	0,40
Г	25	13	0,52
Середня поліморфність:			$\bar{P} = 0,46$

Ще одним показником генетичної мінливості популяції є **середня гетерозиготність** ( $\bar{H}$ ). У кожній особини в популяції певна частина генів перебуває в гетерозиготному стані. Частка таких генів (від про-

аналізованих) характеризує гетерозиготність цієї особини. Усереднена величина індивідуальних значень гетерозиготності для всіх обстежених особин є середньою гетерозиготністю популяції  $\bar{H}$ .

Гетерозиготність значною мірою залежить від частоти алелів. Якщо частоти двох алелів одного гена дорівнюють 0,9 та 0,1, то частка гетерозигот становить  $2 \times 0,9 \times 0,1 = 0,18$  (див. розділ 3 і рівняння Харді – Вайнберга нижче). За частот двох алелів 0,4 і 0,6 частка гетерозигот становитиме вже  $2 \times 0,4 \times 0,6 = 0,48$ . Найвищими значення гетерозиготності будуть при однаковості частот алелів кожного з генів ( $1/2$  і  $1/2$  для двоалельних генів;  $1/3$ ,  $1/3$  і  $1/3$  для триалельних і т. п.).

## Структурованість

Структурованість означає наявність у популяції окремих груп; у межах групи особини об'єднані між собою за якимось критерієм. Розрізняють вікову, статеву, просторову, екологічну та генетичну структуру популяції.

Співвідношення в популяції осіб різного віку й статі визначає її вікову та статеву структуру відповідно. Просторова структура – це характер розподілу на популяційному ареалі окремих особин та їхніх угруповань. Як приклади можна назвати острівний і гомогенний розподіли. Екологічною структурою називають залежне від біотичних і абіотичних факторів середовища розподілення популяції на групи.

Подібна структурованість визначає особливості генетичної структури популяції (див. нижче) і формування генофонду наступних поколінь.

## Системи схрещувань

Із двох загальних типів розмноження – статевого та нестатевого – у популяційній генетиці основну увагу приділяють саме статевому способу розмноження, який забезпечує суттєвий рівень генетичної мінливості за рахунок рекомбінацій. Усе різноманіття видів статевого розмноження можна розділити на кілька типів.

**Панміксія** означає однакову ймовірність мати спільне потомство для будь-якої пари осіб протилежної статі. При цьому відсутня будь-яка вибірковість. Наявність такої вибірковості має місце при різного роду **шлюбній асортативності** – переважному формуванню шлюбних пар певного типу. Крайніми випадками асортативності є аутбридинг та інбридинг.

**Аутбридинг** – схрещування найбільш генетично віддалених партнерів – ліній, підвидів, або в окремих випадках – видів чи навіть родів. Останні два типи схрещувань ще називають міжвидовою чи міжродовою гібридизацією. Схрещування між генетично близькими формами називають **інбридингом**. Це, як правило, схрещування в межах однієї генетичної лінії, між родичами, самозапліднення (наприклад, поширене серед рослин самозапилення).

## ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦІЇ. ЗАКОН ХАРДІ -ВАЙНБЕРГА

Під генетичною структурою популяції розуміють співвідношення особин із різними генотипами, особливості формування генетичних зв'язків (систему схрещувань) і розподіленість популяцій на ряд угруповань (субпопуляцій), пов'язаних між собою потоками алелів. Основними параметрами генетичної структури популяцій є частоти генів і генотипів.

У популяції може існувати один, два, три чи більше (не обмежено) алелів певного гена. У конкретної диплоїдної особини з популяції – два алелі (однакових у гомозигот і різних у гетерозигот) для аутосомних генів. Гени статевих хромосом при XY-типі визначення статі представлені одним алелем у самців і двома – у самок; при ZW-типі – навпаки (див. розділ 6).

**Частота алеля** визначається як відношення кількості копій даного алеля до загальної кількості алелів цього гена в усіх особин популяції. Якщо в популяції існує два алелі певного гена (скажімо,  $A$  та  $a$ ), їхню частоту можна позначити як  $p_A$  і  $q_a$ , або просто  $p$  і  $q$ . **Частота генотипу** – це частка особин із певним генотипом у популяції, яку можна позначити як  $f(AA)$ ,  $f(Aa)$ ,  $f(aa)$ .

У 1908 р. Харді та Вайнберг (Godfrey Hardy, Wilhelm Weinberg) незалежно один від одного дійшли висновку, що за певних умов менделівський механізм спадкування забезпечує постійність (із покоління в покоління) співвідношення генотипів у популяції для будь-яких частот алелів.

Розглянемо приклад. Група із  $N = 200$  особин має такий склад:

Генотип	$AA$	$Aa$	$aa$
Кількість особин	84	72	44
Частота генотипу	$f(AA) = 0,42$	$f(Aa) = 0,36$	$f(aa) = 0,22$

Знайдемо частоту домінантного алеля. Гомозиготи мають по два однакових алеля, гетерозиготи – лише один; загальна кількість алелів у популяції диплоїдів дорівнює подвоєній чисельності особин. Маємо

$$p_A = \frac{2N_{AA} + N_{Aa}}{2N}.$$

Аналогічно, для рецесивного алеля

$$q_a = \frac{2N_{aa} + N_{Aa}}{2N}.$$

або, з таким самим результатом,

$$\begin{aligned} p_A &= f(AA) + \frac{1}{2}f(Aa), \\ q_a &= f(aa) + \frac{1}{2}f(Aa). \end{aligned}$$

Після підрахунку будь-яким із цих способів одержимо

$$p_A = 0,6; q_a = 0,4.$$

За умови панміксії відповідно до теорії ймовірності маємо частоти генотипів першого дочірнього покоління:

$$\begin{aligned} f(AA) &= p_A \times p_A = p_A^2 = 0,36, \\ f(Aa) &= f(Aa) + f(aA) = 2p_Aq_a = 0,48, \\ f(aa) &= q_a \times q_a = q_a^2 = 0,16. \end{aligned}$$

Отже, у розглянутому випадку частоти генотипів першого дочірнього покоління відрізняються від співвідношення генотипів у вихідній батьківській групі. Знайдемо частоти гамет з алелями  $A$  та  $a$ , які будуть продукувати особини цього покоління

$$\begin{aligned} p_A &= f(AA) + \frac{1}{2}f(Aa) = 0,36 + 0,24 = 0,6, \\ q_a &= f(aa) + \frac{1}{2}f(Aa) = 0,16 + 0,24 = 0,4. \end{aligned}$$

На відміну від частот генотипів, частоти алелів не змінились. Тому в другому дочірньому поколінні частоти генотипів будуть такими самими, як і в першому:

$$f(AA) = 0,36; f(Aa) = 0,48; f(aa) = 0,16.$$

Розрахунок частот алелів дасть знову 0,6 та 0,4, і в подальших поколіннях ані ці частоти алелів, ані частоти генотипів змінюватись не будуть. Таке співвідношення генотипів у популяції, яке здатне автоматично зберігатись протягом нескінченно великої кількості поколінь, називають **рівноважним співвідношенням генотипів**, а явище підтримання постійного співвідношення генотипів протягом поколінь –

**генетичною рівновагою.** У розглянутому прикладі частоти генотипів вихідного покоління не перебували в стані рівноваги, але перейшли до рівноважного стану після першого ж панміктичного схрещування.

Отже, **співвідношення генотипів у популяції буде постійним протягом нескінченної кількості поколінь для будь-яких частот алелів.** Ця закономірність, відома як **закон Харді – Вайнберга**, описує ключову особливість популяцій – здатність до підтримання сталості частот генотипів (генетичної рівноваги). Закон Харді – Вайнберга виконується тільки для ідеальних (менделівських) популяцій: нескінченно великих панміктичних популяцій диплоїдного виду зі статевим розмноженням, при однаковій життєздатності всіх генотипів і відсутності інших факторів динаміки популяції – факторів, які змінюють частоти генотипів і/або алелів (див. нижче).

Рівноважні співвідношення частот генотипів задаються піднесенням до квадрата суми частот алелів. Для двох алелів рівняння Харді – Вайнберга має такий вигляд:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1. \quad (8.1)$$

За наявності трьох алелів

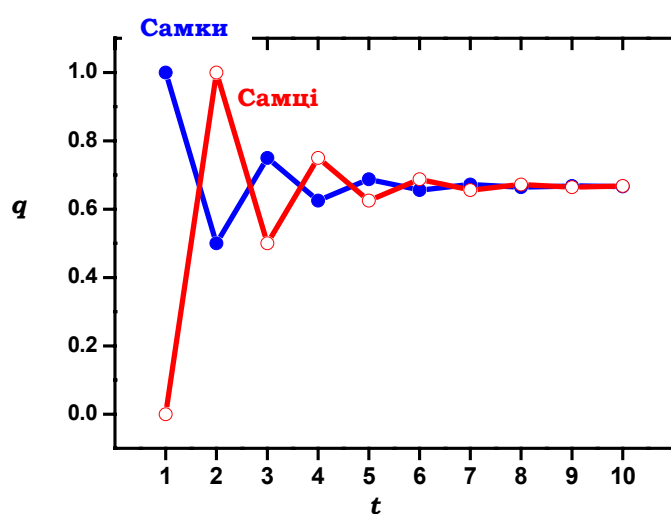
$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1.$$

Якщо в популяції (чи в групі особин) співвідношення генотипів не рівноважне (тобто реальні співвідношення частот генотипів не відповідають теоретично очікуваним на основі закону Харді – Вайнберга для даних частот алелів), популяція перейде до стану генетичної рівноваги після першого ж панміктичного схрещування (як у розглянутому вище прикладі). Це справедливо для генів, які містяться в аутосомах.

Розглянемо **встановлення генетичної рівноваги для генів, зчеплених зі статтю**, зокрема з X-хромосомою при XY-механізмі визначення статі. У цьому випадку самки (гомогаметна стать) матимуть 2/3 всіх наявних у популяції генів (розташованих у X-хромосомі), а самці – 1/3. У дочірньому поколінні завдяки крис-кросному механізму передачі статевих хромосом самці матимуть усі свої X-хромосоми від матерів, а самки – одну від матері, а другу від батька. Тоді, якщо частоти алелів не однакові в самців і самок, то в кожному наступному поколінні в самців частота алеля буде дорівнювати частоті алеля самок попереднього покоління, а в самок – середньому арифметичному частот алелів самців і самок попереднього покоління. Оскільки самки мають 2/3 від усієї кількості алелів (X-хромосом) у популяції, а самці – 1/3, то рівноважні значення частоти алелів такі:

$$\begin{aligned} p &= (2/3)p_f + (1/3)p_m, \\ q &= (2/3)q_f + (1/3)q_m, \end{aligned}$$

де індекс  $f$  указує на частоту (рівноважну чи нерівноважну) відповідного алеля в самок,  $m$  – у самців. У стані генетичної рівноваги частоти алелів у самок і самців однакові. Для прикладу, розглянутого на рис. 8.4, рівноважним значенням частоти алеля буде  $q = (2/3)q_f + (1/3)q_m = 2/3$ . Важливо розуміти, що при встановленні генетичної рівноваги за Х-зчепленими генами, частоти алелів змінюються в межах кожної статі, залишаючись постійними для популяції в цілому.



**Рис. 8.4.** Установлення генетичної рівноваги для Х-зчеплених генів. По осі абсцис – номер покоління  $t$ , по осі ординат – частота алеля  $q$ . Вихідні значення частоти алеля для самців  $q_m = 0$ , для самок  $q_f = 1$ . З кожним поколінням різниця між  $q_m$  і  $q_f$  зменшується, а частота алеля наближається до рівноважного значення  $2/3$

Перевірка рівноважності популяції проводиться шляхом порівняння (за допомогою методу  $\chi^2$ , див. розділ 3) реального розподілу генотипів з очікуваними частотами генотипів, визначеними відповідно до закону Харді – Вайнберга. Така перевірка є можливою лише тоді, коли можна експериментально оцінити частоту гетерозигот, а саме при кодомінуванні.

За повного домінування гомозиготи  $AA$  та гетерозиготи  $Aa$  відносять до одного й того ж фенотипу, тому шляхом безпосереднього підрахунку неможливо оцінити ані частоту гетерозигот, ані частоту алелів. Це можна зробити на основі закону Харді – Вайнберга, припустивши наявність у популяції генетичної рівноваги. Зрозуміло, що в даному випадку реальні значення частот алелів можуть бути далекими від одержаних гіпотетичних.



## ФАКТОРИ ДИНАМІКИ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ПОПУЛЯЦІЙ

Нагадаємо, що умовами виконання закону Харді – Вайнберга є:

- необмеженість чисельності популяції;
- панміксія;
- відсутність мутацій;
- відсутність міграцій;
- відсутність добору.

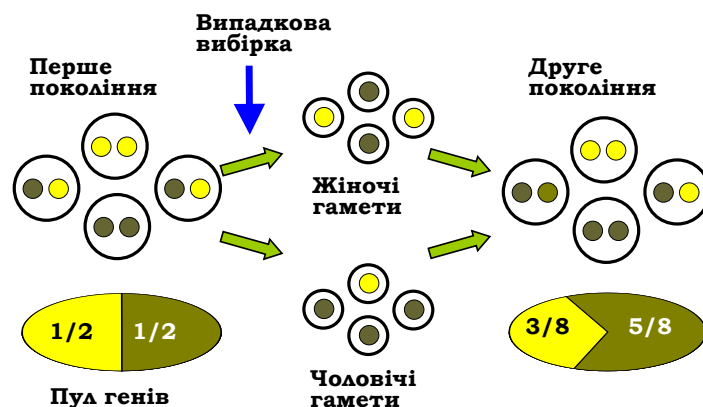
У природі практично не буває популяцій, для яких виконувалися б усі ці умови. Якщо існують суттєві відхилення від них, то залежно від ситуації можуть змінюватись частоти генотипів при збереженні частот алелів, або ж будуть змінюватись як частоти генотипів, так і частоти алелів.

Слід, проте, зауважити, що в стаціонарних умовах середовища та для достатньо великих популяцій рівняння 8.1 виявляється справедливим для більшості генів: велика кількість генів не є об'єктами добору; для багатьох генів розподіл алелів і генотипів є подібним для різних популяцій, що змішуються між собою під час міграцій.

### Дрейф генів

Чисельність популяцій завжди є величиною скінченною. Якщо (у разі відсутності добору, мутацій і міграцій) популяція характеризується незначною величиною  $N_e$ , то при формуванні пулу гамет і генофонду наступної генерації значно підвищується ймовірність випадкових відхилень від середньої частоти того чи іншого алеля. Процес ненаправленої зміни частот алелів у малих популяціях під впливом випадкових факторів називають **дрейфом генів**.

Ці випадкові коливання спричинюють непередбачені зміни частот генів у ряду генерацій (рис. 8.5, 8.6). Кінцевим результатом цього процесу буде елімінація алеля з популяції або його фіксація (частота алеля фіксується на 100 % рівні), причому тим швидше, чим меншим є значення  $N_e$ .



**Рис. 8.5.** Процес випадкової зміни генних частот протягом однієї генерації в популяції, що складається з чотирьох гермафродитних особин, при репродукції яких відбувається випадкове об'єднання гамет (за Кімура, 1985)

Випадковість і непередбаченість змін генетичної структури конкретної популяції зумовлює використання ймовірнісного підходу, лише за допомогою якого і є можливим вивчення дрейфу. Оцінку ймовірності відхилення частоти алеля від вихідного значення можна одержати шляхом використання стандартних відхилень ( $\sigma$ ). Дисперсія частоти алеля визначається формулою

$$\sigma_q^2 = \frac{q(1-q)}{2N},$$

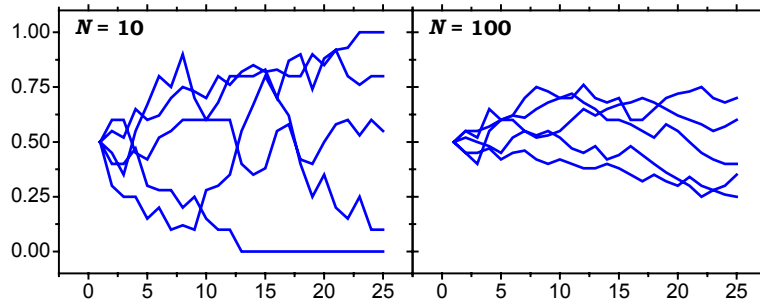
де  $q$  – частота алеля  $a$  у вихідній ( $i$ -тій) генерації,  $N$  – чисельність наступної дочірньої ( $i+1$ ) генерації. Звідки стандартне середньоквадратичне відхилення частоти гена в дочірній генерації

$$\sigma_q = \pm \sqrt{\frac{q(1-q)}{2N}}.$$

Чим більше відхилення частоти алеля від вихідного значення, тим рідше воно трапляється: до інтервалу від  $q - \sigma$  до  $q + \sigma$  потрапляє 68,27 % усіх можливих випадкових відхилень частоти алеля, до інтервалу від  $q - 2\sigma$  до  $q + 2\sigma$  – 95 % і т. д.

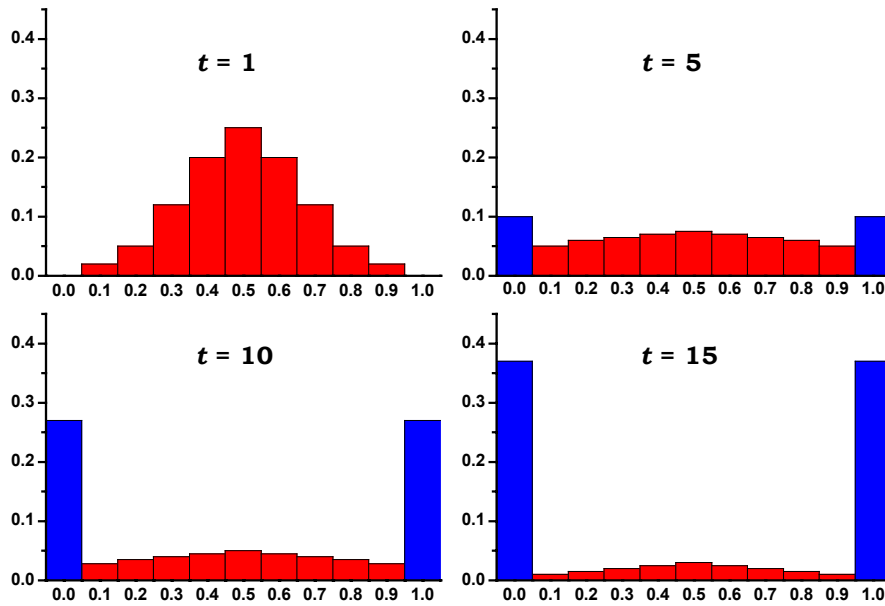
У результаті випадкових змін частот генів під час зміни генерації відбуватимуться як фіксація, так і елімінація алелів, тобто збільшення гомозиготності популяції, втрата мінливості (рис. 8.6, 8.7). Швидкість процесу втрати мінливості дорівнює  $k = 1/(2N)$ . Інакше кажучи, гетерозиготність у групі з  $N$  особин, що розмножуються шляхом випадкових схрещувань, у кожній генерації буде зменшуватися у  $2N$  разів:

$$\Delta H = H_0 - H_1 = \frac{H_0}{2N}$$



**Рис. 8.6.** Криві дрейфу генних частот.

По осі абсцис відкладено кількість поколінь, по осі ординат – частоту гена. Криві отримано в комп'ютерних експериментах, де моделювалась популяція з 10 і 100 особин із початковою частотою гена, яка дорівнювала 0,5



**Рис. 8.7.** Зміни розподілу генної частоти в результаті дрейфу генів: по осі абсцис – частота алеля, по осі ординат – частка популяцій із відповідною частотою. Популяції складаються з 5 гермафродитних особин; схрещування випадкові: початкова частота гена (при  $t = 0$ ) дорівнює 0,5. Наведено розподіли для 1, 5, 10 і 15-ї генерацій. Сині стовпці відповідають частці популяцій, у яких алель втрачено або він фіксований (за Кімура, 1985)

Гетерозиготність у групі з  $N$  особин після  $t$  панміктичних генерацій можна визначити за формулою

$$H_t = H_0 \exp\left(-\frac{t}{2N}\right),$$

де  $H_0$  – вихідна гетерозиготність,  $H_t$  – гетерозиготність після  $t$  генерацій.

Таким самим чином (тобто зі швидкістю  $1/(2N)$  за генерацію) при генетичному дрейфі змінюється ще один показник мінливості – кількість локусів, за якими не відбулась фіксація або елімінація одного з алелів.

Основними наслідками дрейфу генів є:

- зміна частот алелів у непередбачуваному напрямку;
- збільшення частки гомозигот;
- збіднення генофонду (зникнення алелів).

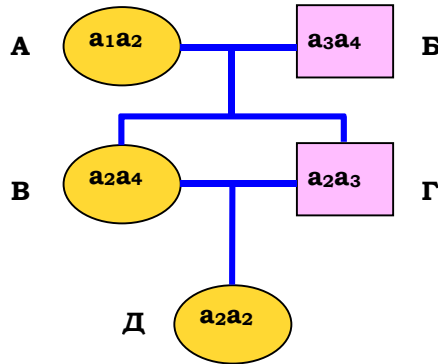
Дрейф суттєво впливає на генетичну структуру популяції при коливаннях чисельності, коли чисельність популяції різко зменшується (**ефект шийки пляшки**), а генофонд наступних поколінь визначає невелика група особин – засновників популяції (**ефект засновника**). Хоча чисельність популяції може потім значно зрости, гени всіх особин походять від невеликої кількості генів, що випадково були присутніми в засновників популяції. Зокрема, це стосується популяцій людини на певних етапах еволюції *Homo sapiens* (розділ 7). Ефект засновника має місце як при проходженні популяції "через шийку пляшки", так і при заселенні видом нових відокремлених територій (наприклад, островів).

## Інбридинг

**Інбридинг** – схрещування між генетично спорідненими особинами – є одним із порушень панміксії. При цьому також (як і при дрейфі) зростає гомозиготність популяції, але (на відміну від дрейфу) частоти алелів залишаються незмінними.

Розрізняють кілька різновидів такого схрещування залежно від рівня генетичної спорідненості шлюбних партнерів. Сам термін "інбридинг" – розведення "в собі" – прийшов із тваринництва, де ним називали схрещування в межах однієї лінії; типу брат × сестра тощо. Найтіснішим інбридингом є самозапліднення.

Для оцінки сили інбридингу використовують так званий **коефіцієнт інбридингу  $F$**  – імовірність того, що в генотипі особини обидва алелі певного гену будуть **ідентичні за походженням**. Розглянемо родовід зі схрещуванням типу брат × сестра (рис. 8.8).



**Рис. 8.8.** Схрещування типу брат × сестра. Інбредна особина Д гомозиготна за алелем  $a_2$ , обидві копії якого ідентичні за походженням

Усі учасники цього родоводу – гомозиготи за рецесивним алелем  $a$ , усі копії якого в особин А і Б однакові, але потрапили до них від різних предків і мають різне походження. Позначивши їх для зручності номерами, можна простежити їхню долю в потомстві. Особини В та Г мають різні комплекти алелів, але один із них у них спільний ( $a_2$ ). Саме цей алель міститься в генотипі Д у подвійному екземплярі – це дві копії-репліки одного алеля, що був у генотипі А. Таким чином, Д – гомозигота за алелями, що не тільки **однакові**, а ще й мають **ідентичне походження**.

Імовірність того, що А передасть алель  $a_2$  обом нащадкам В і Г дорівнює  $1/2 \times 1/2 = 1/4$ . Так само ймовірність того, що В і Г одночасно передадуть цей алель нащадку Д становить  $1/2 \times 1/2 = 1/4$ . Загальна ймовірність того, що до Д від А потраплять два екземпляри  $a_2$ , дорівнює  $(1/2)^4 = 1/16$ . Оскільки в даному родоводі будь-який із чотирьох варіантів алеля  $a$  може потрапити до Д у подвійному екземплярі, імовірність того, що Д буде гомозиготою за алелями, ідентичними за походженням, становитиме  $F = 4 \times (1/2)^4 = 1/4$ .

При самозаплідненні  $F = 1/2$ : це означає, що частка гетерозигот у кожному наступному поколінні буде вдвічі меншою, ніж у попередньому, а через  $t$  поколінь частка гетерозигот становитиме  $(1/2)^t$ .

У загальному вигляді при інбридингу частка гомозигот буде зростати за рахунок гетерозигот:

$$(p^2 + pqF) + 2pq(1 - F) + (q^2 + pqF) = 1.$$

Значення  $F$  може змінюватись від 0 до 1. Якщо в останню формулу підставити  $F = 0$ , одержимо рівняння Харді – Вайнберга для пан-

міктичних популяцій  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ . Значення  $F = 1$  означає повну відсутність гетерозигот у популяції, а частота генотипів  $AA$  та  $aa$  дорівнюватиме частотам алелів  $A$  та  $a$  відповідно.

До такого стану популяція може дійти протягом певної кількості поколінь – чим тіснішим є інбридинг, тим швидше. При цьому частоти алелів залишаться незмінними. Отже, основний наслідок інбридингу для структури популяції полягає в тому, що зростає частка гомозигот. Відповідно, зростає ймовірність гомозиготності рецесивних (у тому числі летальних або таких, що викликають захворювання) алелів – відбувається так звана **інbredна депресія**.

Проте деякі види тварин і рослин, які розмножуються шляхом самозапліднення, є цілком життєздатними. Якщо популяція піддається інбридингу протягом багатьох генерацій, "шкідливі" рецесивні алелі видаляються з неї завдяки добору (про який ітиметься нижче), тобто популяція стає гомозиготною за "корисними" алелями. У такий спосіб інбридинг часто використовують у селекційній роботі з метою отримання рослин і тварин із бажаними ознаками.

Оскільки інбридинг (у разі відсутності добору) не змінює частоти алелів, для оцінки генетичної варіабельності інbredної популяції часто використовують *очікувану гетерозиготність* – частку особин, які були б гетерозиготами за рівнянням Харді – Вайнберга ( $2pq$  для двоалельного локусу). Так, для самозапильних рослин реальна гетерозиготність може бути дуже низькою, але популяція може характеризуватися досить значною генетичною варіабельністю, мірою якої й буде слугувати очікувана гетерозиготність. Зазвичай очікувану гетерозиготність усереднюють для кількох досліджених локусів.

## Мутації

Мутації є первинним джерелом генетичної мінливості в популяціях. Вони викликають зміни частот як алелів, так і генотипів. Розглянемо випадок, коли внаслідок прямих мутацій алель  $A$  перетворюється на  $a$  ( $A \rightarrow a$ ) із частотою  $u$ , а зворотні мутації  $a \rightarrow A$  відбуваються з частотою  $v$ . Тоді за умови певного співвідношення  $u$  та  $v$  в популяції встановиться рівноважне співвідношення генотипів  $AA$ ,  $Aa$  та  $aa$ .

Спочатку оцінимо тиск прямих мутацій. Нехай частота алеля  $A$  у вихідному поколінні дорівнює  $p_0$ . У наступному поколінні ця частота зменшиться за рахунок мутацій:

$$p_1 = p_0 - up_0 = p_0(1 - u).$$

У другому поколінні частота становитиме

$$p_2 = p_1 - up_1 = p_1(1-u) = p_0(1-u)^2,$$

і для покоління за номером  $t$  частота алеля  $A$  дорівнюватиме

$$p_t = p_0(1-u)^t.$$

З часом за рахунок мутацій алель  $A$  мав би зникнути з популяції. Але цей час досить тривалий: щоб частота алеля змінилась від 1 до 0,99 при  $u = 10^{-5}$  на гамету за покоління, необхідно 1 тис. поколінь. При цьому не враховано вплив зворотних мутацій.

Якщо вихідні частоти алелів  $A$  та  $a$  становлять відповідно  $p_0$  і  $q_0$ , а частоти прямих і зворотних мутацій –  $u$  та  $v$ , то в першому поколінні частка алелів  $A$  за рахунок прямих мутацій зменшиться, а за рахунок зворотних – зросте:

$$p_1 = p_0 - up_0 + vq_0,$$

і зміна частоти алеля під впливом мутацій становитиме

$$\Delta p = p_1 - p_0 = vq_0 - up_0.$$

Процес зміни частот триватиме до досягнення рівноважного стану, коли подальша зміна частот припиниться:  $\Delta p = 0$ . У такому випадку частоти алелів  $A$  та  $a$  будуть рівноважними ( $\hat{p}$  і  $\hat{q}$ ). З останнього виразу для  $\Delta p = 0$  маємо  $u\hat{p} = v\hat{q} = v(1 - \hat{p})$ . Після простих перетворень одержимо

$$\hat{p} = v/(u+v),$$

$$\hat{q} = u/(u+v).$$

## Міграції

Міграції, або потік генів між популяціями, приводять до зростання мінливості в межах популяцій і зменшення різниці між ними. При цьому змінюються як частоти алелів, так і частоти генотипів. Масштаби цих змін залежать від розмірів популяцій та інтенсивності міграцій.

Розглянемо популяцію (реципієнт), до якої з певною частотою мігрують особини з інших популяцій (донорів). Вважатимемо, що розмір популяції залишається сталим, іммігранти вільно схрещуються з резидентами й мають однакову життєздатність.

Нехай у популяції-реципієнті початкова (доміграційна) частота алеля  $A$  становить  $p_0$ , у популяції-донорі –  $p_d$ . Позначимо частку мігрантів як  $m$ . Тоді в генофонді наступного покоління частка генів від мігрантів становитиме  $m$ , а від резидентів –  $(1 - m)$ . Через одне покоління міграції (імміграції) частота алеля в популяції-реципієнті буде

$$p_1 = (1 - m)p_0 + mp_d = p_0 - m(p_0 - p_d),$$

а зміна частоти алеля за одне покоління за наявності міграції –

$$\Delta p = p_1 - p_0 = -m(p_0 - p_d).$$

Частота алеля в популяції-реципієнті змінюватиметься доти, поки не припиниться міграція ( $m = 0$ ) або ж частота не зрівняється з такою в популяції-донорі ( $p_0 = p_d$ ). За одне покоління за наявності міграції різниця в частотах алелів двох популяцій становитиме

$$p_1 - p_d = (1 - m)(p_0 - p_d).$$

Через два покоління різниця зменшиться й буде дорівнювати

$$p_2 - p_d = (1 - m)^2(p_0 - p_d),$$

а через  $t$  поколінь –

$$p_t - p_d = (1 - m)^t(p_0 - p_d).$$

Остання формула дає можливість прогнозувати зміну частоти алеля в популяції через певний час після початку міграції, якщо відома інтенсивність цієї міграції  $m$ . Слід відмітити, що йшлося саме про імміграцію: еміграція з популяції (у разі відсутності будь-якої генетичної вибірковості, тобто якщо еміграція щодо генотипів буде випадковою, а отже, пропорційною частоті генотипів) до зміни частот алелів не приведе.

## Добір

Добір можна визначити як диференційне відтворення в популяції особин із різними генотипами. Під впливом добору частоти алелів і частоти генотипів будуть змінюватись у певному напрямку: добір може спричинити втрату чи фіксацію алеля.

Диференційний внесок особин із різними генотипами у відтворення наступної генерації може бути кількісно виражений через відносну ефективність їхнього розмноження, або **відносну пристосованість  $w$** , – відношення пристосованості особин із певним генотипом до пристосованості найкращого варіанта, який існує в популяції (табл. 8.3).

З відотною пристосованістю простою залежністю пов'язаний **коефіцієнт добору  $s$** , який указує, наскільки пристосованість особин даного генотипу є меншою за пристосованість найкращого варіанта:



$$S_i = W_{max} - W_i.$$

Зрозуміло, що відносна пристосованість найкращого варіанта до-рівнюватиме одиниці, а коефіцієнт його добору – нулю.

**Таблиця 8.3. Приклад визначення відносної пристосованості  $w$  трьох генотипів**

Показник	Генотипи		
	AA	Aa	aa
Кількість зигот у вихідній генерації, $N_1$	45	110	45
Кількість нащадків у наступній генерації, $N_2$	55	140	65
Середня кількість нащадків на одну зиготу вихідної генерації: $V_i = N_2 / N_1$	1,22	1,27	1,44
Відносна пристосованість (відносна ефективність розмноження): $w_i = V_i / V_{max}$	1,22:1,44 = 0,85	1,27:1,44 = 0,88	1,44:1,44 = 1

Унаслідок того, що особини з різними генотипами матимуть різну пристосованість, протягом ряду генерацій відбуватимуться зміни у співвідношенні генотипів і частот генів до повної елімінації одного з алелів або до такого співвідношення частот генів, при якому в популяції встановиться рівновага. Зміну частоти алеля протягом однієї генерації під впливом добору в загальному випадку показано в табл. 8.4.

**Таблиця 8.4. Зміна частоти гена під впливом добору протягом однієї генерації**

Показник	Генотипи			Разом	Частота алеля $a$
	AA	Aa	aa		
Вихідна частота зигот	$p^2$	$2pq$	$q^2$	1	$q$
Пристосованість	$w_1$	$w_2$	$w_3$		
Внесок генотипу в наступну генерацію	$p^2 w_1$	$2pq w_2$	$q^2 w_3$	$\hat{w}$	
Нормовані частоти генотипів	$\frac{p^2 w_1}{\hat{w}}$	$\frac{2pq w_2}{\hat{w}}$	$\frac{q^2 w_3}{\hat{w}}$	1	$q'$

Середню пристосованість популяції  $\hat{w}$  обчислюють як суму внесків різних генотипів у наступну генерацію:

$$\hat{w} = p^2 w_1 + 2pq w_2 + q^2 w_3. \quad (8.2)$$

Після нормування частот генотипів визначимо нову частоту  $q'$  алеля  $a$  в популяції – частоту після добору

$$q' = \frac{pqw_2 + q^2w_3}{\hat{w}}.$$

Різниця частот алелів до та після добору дозволяє визначити, як змінилася частота алеля під впливом добору протягом однієї генерації:

$$\Delta q = q' - q = \frac{pqw_2 + q^2w_3 - q\hat{w}}{\hat{w}}.$$

Після підстановки в чисельник виразу для  $\hat{w}$  (рівн. 8.2) та елементарних алгебраїчних перетворень (ураховуючи, зокрема, що  $1 - q = p$ , а  $1 - 2q = p - q$ ) знайдемо, що протягом однієї генерації частота алеля під впливом добору змінюється на величину

$$\Delta q = pq \frac{p(w_2 - w_1) - q(w_2 - w_3)}{\hat{w}}.$$

Знак при  $\Delta q$ , який характеризує напрям добору, залежить від співвідношення пристосованості різних генотипів  $w_1$ ,  $w_2$  і  $w_3$  (оскільки  $p$ ,  $q$  і знаменник дроби – завжди додатні числа), а на швидкість добору, інакше кажучи, на величину  $\Delta q$  матимуть вплив як значення пристосованостей, так і значення вихідних частот генів. При  $\Delta q = 0$  має місце генетична рівновага:

$$pq \frac{p(w_2 - w_1) - q(w_2 - w_3)}{\hat{w}} = 0. \quad (8.3)$$

Це рівняння рівноваги має два тривіальні розв'язки ( $p = 0$  або  $q = 0$ ), а також третій розв'язок, який відповідає умові  $p(w_2 - w_1) = q(w_2 - w_3)$ . Звідси маємо співвідношення частот алелів, що відповідає рівноважному стану:

$$\frac{p}{q} = \frac{w_2 - w_3}{w_2 - w_1}. \quad (8.4)$$

Відношення  $p/q$  завжди додатне, тому можливі два випадки: (1)  $w_2 > w_3$  і  $w_2 > w_1$ , або (2)  $w_2 < w_3$  і  $w_2 < w_1$ .

Отже, під дією добору частота гена змінюватиметься доти, поки вона не досягне одного зі стаціонарних станів. Один двоалельний локус може мати три такі стани.

1.  $p = 1$ ,  $q = 0$  – під впливом добору алель  $a$  втрачається (добір проти алеля  $a$ ). За рівнянням 8.3, така ситуація реалізується при співвідношеннях між пристосованостями  $w_1 = w_2 > w_3$  (повне доміну-

вання) і  $w_1 > w_2 > w_3$  (неповне домінування – пристосованість гетерозиготи є проміжною між пристосованостями гомозигот).

2.  $p = 0, q = 1$  – під впливом добору алель  $a$  фіксується (добір на користь алеля  $a$ ) при  $w_1 = w_2 < w_3$  або  $w_1 < w_2 < w_3$ .

3.  $\frac{p}{q} = \frac{w_2 - w_3}{w_2 - w_1}$  – добір приводить до генетичної рівноваги за рів-

нянням 8.4. У випадку *наддомінування* ( $w_1 < w_2 > w_3$ ) жоден із алелів не видаляється, оскільки обидва мають перевагу в гетерозиготному стані. Початковий напрямок добору визначається при цьому відносними пристосованостями двох гомозигот, після чого реалізується стан **стійкої рівноваги**, коли частоти алелів залишаються незмінними. Якщо гетерозигота характеризується пригніченою пристосованістю (*недодомінування*,  $w_1 > w_2 < w_3$ ), реалізується **нестійка рівновага**: частоти алелів залишаються незмінними, поки не здійснюється пертурбація рівноваги за рахунок тих чи інших еволюційних факторів – у цьому випадку рівновага порушується й один із алелів урешті-решт фіксується.

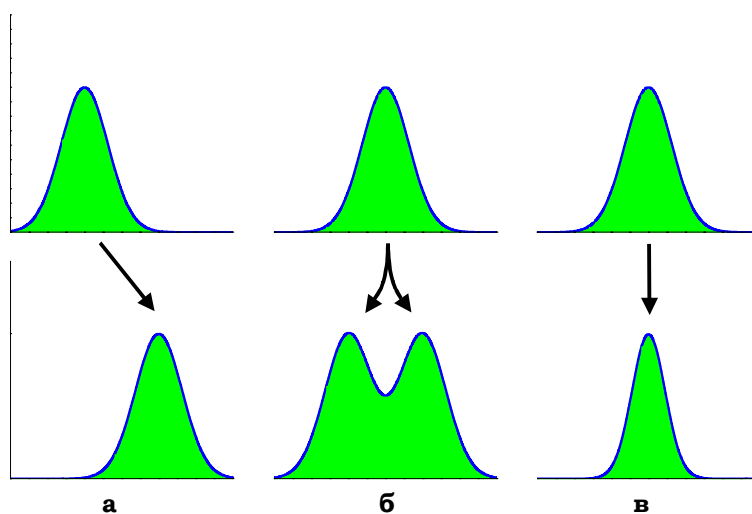
Аналогічно зміні частоти гена при доборі змінюватиметься середня пристосованість популяції  $\bar{w}$ . Величина  $\Delta\bar{w}$  – зміна середньої пристосованості популяції внаслідок добору протягом однієї генерації – завжди додатна. Отже, у результаті добору середня пристосованість популяції не може зменшуватися – вона може бути постійною або збільшуватися. Відповідно до фундаментальної теореми природного добору Фішера (Ronald Aylmer Fisher), швидкість її збільшення буде тим вища, чим нижче її вихідне значення й чим вища різниця пристосованості між особинами з різними генотипами. У рівноважних точках ( $\Delta q = 0$ ) значення  $\Delta\bar{w}$  дорівнюватиме нулю. За умови стійкої рівноваги в даній точці середня пристосованість популяції буде максимальною.

Більшість ознак, що перебувають під дією добору, є кількісними – залежать від кількох генних локусів (див. розділ 3). Добір може змінювати розподіл особин у популяції за значенням кількісної ознаки трьома різними шляхами. Якщо добір сприяє значенням ознаки на одній із меж розподілу, відбувається поступовий зсув розподілу у відповідному напрямі – **спрямований добір** (рис. 8.9, а). У природі така ситуація реалізується, коли умови середовища змінюються в певного напрямі, примушуючи популяцію адаптуватися до цих змін.

Якщо добір сприяє значенням на обох межах розподілу, відбувається **дизруптивний добір**: практично, це спрямований добір, що діє в обох напрямках (рис. 8.9, б). Зазвичай дизруптивний добір реалізується або за умов шлюбної асортативності (схрещування переважно відбуваються

між особинами з подібними екстремальними проявами ознаки), або внаслідок екологічної чи географічної ізоляції субпопуляцій.

Добір може також сприяти консервації середніх значень розподілу, "відсікаючи" екстремальні варіанти, – **стабілізуючий добір** (рис. 8.9, в). Такий процес відбувається, коли особини із середніми проявами ознаки характеризуються підвищеною пристосованістю.



**Рис. 8.9.** Зміна розподілів особин за кількісною ознакою (по осі ординат – частота) під дією добору трьох типів: спрямованого (а), дизруптивного (б), стабілізуючого (в)

## ЕВОЛЮЦІЙНІ ПРОЦЕСИ

Результуюча динаміка структури популяції залежить від питомого впливу кожного з розглянутих вище факторів, а також від зміни чисельності самої популяції, від змін, які відбуваються в сусідніх популяціях, від зміни умов середовища тощо. У тих випадках, коли зміни частот генотипів і алелів мають довготривалий або навіть незворотний характер (як, скажімо, втрата алеля внаслідок дрейфу), має місце **елементарна еволюційна подія**.

Мутації, ізоляція або міграції, добір, дрейф і асортативність схрещувань лежать в основі **мікроеволюції** – необоротних змін генетичної структури популяцій. Власне, еволюція і відбувається через

процеси мікроеволюції, які здійснюються в межах популяцій і можуть спричинити появу нових видів.

Зміна генетичної структури популяції залежить від складної взаємодії між різними еволюційними факторами (факторами динаміки популяції). Головна причина генетичної гетерогенності популяцій – мутаційний процес, який постачає "вихідний матеріал" для еволюції. Більшість точкових мутацій нейтральні або майже нейтральні: вони або не торкаються кодуєчих послідовностей, або приводять до синонімічних замін кодонів, або до таких замін амінокислот, що не мають суттєвих наслідків для структури та функціонування білка. Такі нейтральні мутації випадково фіксуються генетичним дрейфом, що зумовлює зростання генетичної гетерогенності. За постійної швидкості накопичення нейтральних нуклеотидних (чи амінокислотних) замін аналіз варіантів послідовностей у різних таксономічних груп є потужним методом оцінки еволюційних відстаней і філогенетичних зв'язків.

Швидкість результуючого накопичення замін не однакова для різних ділянок геному та різних білків: деякі білки або окремі їхні ділянки (наприклад, такі, що беруть участь у формуванні активних центрів ферментів) відрізняються підвищеною консервативністю. У цьому випадку мутації, які приводять до замін у консервативних ділянках, швидко елімінуються добором. **Теорія нейтральної еволюції**, сформульована Кімурою та Ота (Motoo Kimura, Tomoko Ohta), відводить головну роль в еволюції випадковим процесам (мутації та дрейф), залишаючи за добором функцію позбавлення від шкідливих мутацій: популяції не "поліпшуються" внаслідок фіксації корисних мутацій, вони просто не стають гіршими, фіксуючи тільки нейтральні або майже нейтральні мутації.

Популяція, що перебуває під тиском еволюційних факторів, які спричиняють генетичну гетерогенність, може раптово розділитися на субпопуляції. Якщо вони виявляються не здатними до схрещувань між собою, то стають репродуктивно ізольованими. Така ізоляція – ключова подія у формуванні нових видів.

Вид можна визначити як групу популяцій, представники яких схрещуються або потенційно здатні схрещуватись між собою, і які репродуктивно ізольовані від інших таких груп. До репродуктивної ізоляції можуть привести різноманітні механізми, їх зазвичай поділяють на дві групи: *презиготні* (екологічна ізоляція, коли популяції займають різні місця проживання в межах спільного регіону; часова ізоляція – парування або цвітіння відбувається в різні пори року; поведінкова ізоляція – відсутній взаємний потяг між статями різних по-

пуляцій; гаметна ізоляція – гамети є несумісними тощо) і *постзиготні* (гібриди не є життєздатними або не здатні давати потомство).

Очевидним шляхом розділення на субпопуляції є, наприклад, географічне розділення: дві популяції на різних островах, вершинах гір, у різних лісових масивах після міграцій тощо. За досить довгий час ізоляції в різних популяціях накопичуються генетичні відмінності, що приводять урешті-решт до репродуктивної ізоляції за одним із пре- або постзиготних механізмів. Навіть якщо дві такі популяції знов займають спільний ареал унаслідок змін навколишнього середовища, схрещування між ними вже стає неможливим: два нові види використовують середовище різними шляхами, добір проти гібридних форм сприяє підсиленню ізоляції та подальшій диференціації.

### **Контрольні запитання і завдання**

1. Дайте визначення популяції. Що таке менделівська популяція? Що таке генетична рівновага?
2. Від чого залежить верхня межа чисельності популяції?
3. Що визначає ефективну чисельність популяції?
4. Як в популяціях оцінюють рівень генетичної мінливості кількісних і альтернативних ознак?
5. Дайте визначення поліморфності та гетерозиготності.
6. Які системи схрещувань ви знаєте?
7. Сформулюйте закон Харді – Вайнберга. За яких умов він виконується?
8. Від чого залежить інтенсивність генетичного дрейфу?
9. Які наслідки дрейфу та інбридингу? У чому їхня відмінність?
10. Що таке коефіцієнт інбридингу? Як його визначити?
11. Що таке "ефект засновника" та "ефект шийки пляшки"?
12. Як мутаційний процес впливає на генетичну структуру популяції? Наскільки суттєвим є вплив мутацій різних типів на генетичну структуру популяцій?
13. Охарактеризуйте особливості впливу міграцій на генетичну структуру популяції? Як частота алеля в популяції залежить від еміграції та імміграції?
14. Як можна оцінити відносну пристосованість генотипу?
15. Що таке коефіцієнт добору?
16. Які типи добору вам відомі? У чому полягають їхні особливості?
17. Що таке мікроеволюція?
18. У чому полягає теорія нейтральної еволюції?



## РОЗДІЛ 9

# Генетична інженерія і методи молекулярної генетики

Формальною датою народження генної інженерії можна вважати 1972 р., коли Берг (Paul Berg) і співробітники отримали першу рекомбінантну ДНК, яка складалася з ДНК вірусу SV40 і бактеріофага  $\lambda$ . Удосконалення технології рекомбінантних ДНК і пов'язаних із нею методів відіграло велику роль у розвитку молекулярної генетики та молекулярної біології в цілому: структура й функції практично будь-якого гена та продуктів його експресії стали доступні для дослідження, з'явилась можливість детального вивчення величезних геномів вищих організмів і систем їхньої регуляції. Сучасні підходи для здійснення різноманітних маніпуляцій із молекулами ДНК є сьогодні не тільки головним інструментарієм для фундаментальних досліджень у галузі молекулярної генетики, а й основою для розвитку нових біотехнологій, котрі базуються на генетичній модифікації мікроорганізмів, рослин і тварин як продуцентів продуктів харчування та біологічно активних сполук.

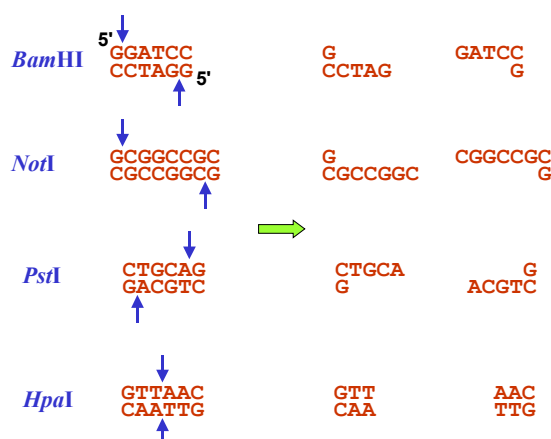
## МЕТОДИ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

### Основні ферменти генної інженерії

Головним інструментом для здійснення генно-інженерних операцій є природні ферменти, які каталізують реакції деградації та синтезу нуклеїнових кислот. Особливе місце серед них належить **рестриктивним ендонуклеазам (рестриктазам)**, що здійснюють специфічне розрізан-

ня молекули ДНК усередині певних елементів послідовності нуклеотидів. Рестриктази (існує кілька сотень таких ферментів) виконують у бактеріальних клітинах роль захисту від чужорідної ДНК бактеріофагів. Назви цих ферментів утворюються за таким принципом: перша велика літера позначає рід мікроорганізму, дві маленькі – вид, римські цифри та іноді великі літери – порядковий номер рестриктази серед інших рестриктаз даної бактерії. Наприклад, *EcoRI* – рестриктаза RI із *Escherichia coli*.

Послідовності нуклеотидів, які впізнаються рестриктазами, відрізняються великою різноманітністю: сайтом рестрикції є невеликі (4, 6, іноді трохи більше пар основ) паліндромні послідовності (такі, що читаються однаково в напрямку 5'-3' по обох ланцюгах, рис. 9.1). Залежно від типу рестриктази, два розрізи, які вона здійснює, можуть бути розташованими точно один напроти одного у двох ланцюгах, що зумовлює утворення так званих тупих кінців. Частіше рестриктази залишають взаємно комплементарні 5'-кінцеві (іноді 3'-кінцеві) одноланцюгові вирости – липкі кінці (рис. 9.1).



**Рис. 9.1.** Приклади рестриктних сайтів (ліворуч, стрілками позначено місця розрізів) та продуктів рестрикції (праворуч). Рестриктази *BamHI* та *NotI* залишають липкі кінці з 5'-кінцевими виступами, *PstI* – із 3'-кінцевими виступами, *HpaI* – тупі кінці

Крім того, часто використовують різноманітні менш специфічні **нуклеази** – ферменти, що каталізують реакцію гідролізу нуклеїнових кислот. Нуклеази можуть діяти тільки на молекули ДНК (*ДНКазу*) або РНК (*РНКазу*); вибірково гідролізувати тільки одноланцюгову (нуклеаза S1) або дволанцюгову (екзонуклеаза III) молекулу ДНК; діяти тільки на гібридну молекулу РНК-ДНК (РНКаза Н) тощо.



Наступний важливий для генної інженерії фермент – **ДНК-залежна ДНК-полімераза** (див. розділ 1). Найчастіше використовують ДНК-полімеразу I *E. coli*. Їй притаманні три види каталітичної активності:

- полімеразна, що зумовлює синтез ланцюга ДНК у напрямку 5'–3' на одноланцюговій ДНК-матриці у присутності чотирьох нуклеозидтрифосфатів і короткого ДНК-праймера, який має вільну 3'-гідроксильну групу;
- 3'-екзонуклеазна, яка спричиняє відщеплення нуклеотидів від 3'-кінця з метою редагування помилок;
- 5'-екзонуклеазна, що забезпечує відщеплення нуклеотидів від 5'-кінця полінуклеотидного ланцюга.

За рахунок першої та третьої активностей ДНК-полімераза I одночасно може каталізувати реакцію полімеризації та гідроліз нуклеотидного ланцюга в напрямку 5'–3', починаючи з одноланцюгового розриву у дволанцюговій ДНК. Такий процес називається **нік-трансляцією**: при цьому розрив (нік) переміщується вздовж ланцюга ДНК у напрямку 5'–3' на відстань до однієї тисячі пар нуклеотидів. Нік-трансляцію використовують, зокрема, для введення в ДНК радіоактивно мічених нуклеотидів.

Від ДНК-полімерази I за допомогою трипсину або субтилізину можна відокремити великий фрагмент (**фрагмент Кленова**), що зберігає тільки полімеразну та 3'-екзонуклеазну активності. Відсутність 5'-екзонуклеазної активності дає змогу, зокрема, використовувати фрагмент Кленова для "заповнення" одноланцюгових 5'-кінцевих виступів, що утворюються при розрізанні ДНК рестриктазами.

Також використовують ДНК-полімеразу фага T4. Їй притаманні ті самі активності, що й фрагменту Кленова, але її 3'-екзонуклеазна активність є у 200 разів вищою. Відповідно, цю полімеразу застосовують для введення мітки до рестриктів із виступами 3'-кінців.

**ДНК-лігаза** являє собою ще один із найважливіших інструментів генної інженерії. Вона каталізує синтез фосфодієфірного зв'язку між 5'-фосфатним і 3'-гідроксильними кінцями в місці одноланцюгового розрізу (ніка) у дволанцюговій молекулі ДНК. Найчастіше використовують ДНК-лігазу фага T4, яка здатна в присутності АТР зшивати фрагменти ДНК із липкими кінцями: два взаємно комплементарні липкі кінці утворюють подвійну спіраль з двома ніками (рис. 9.1), які зашиваються лігазою.

Для синтезу ДНК на РНК-матриці використовують **РНК-залежну ДНК-полімеразу – зворотну транскриптазу**. Назва ферменту пов'язана з тим, що він каталізує реакцію, зворотну першому етапу експресії гена – транскрипції, первинним продуктом реакції є гібрид

РНК-ДНК. У генній інженерії зазвичай використовують зворотну транскриптазу з РНК-вірусів птахів (див. розділ 5). Вона складається з двох субодиниць і має щонайменше дві активності: ДНК-полімеразу (може використовувати як матрицю одноланцюгові РНК або ДНК); активність РНКазиди Н (гідролізує РНК у складі гібрида РНК-ДНК, але не атакує вільну РНК). Таким чином, фермент синтезує на РНК-матриці комплементарну молекулу ДНК (**кДНК**).

Серед інших різноманітних ферментів, які використовують у генній інженерії, слід згадати **термінальну дезоксинуклеотидилтрансферазу**, яка може нарощувати нуклеотиди на 3'-кінець одноланцюгової молекули ДНК. З її допомогою можна "підтупити" кінці ДНК (якщо 3'-кінець є коротшим) або подовжити одноланцюгові 3'-кінцеві вирости (безматричний синтез ДНК – використовуються нуклеотиди, що наявні в реакційній суміші).

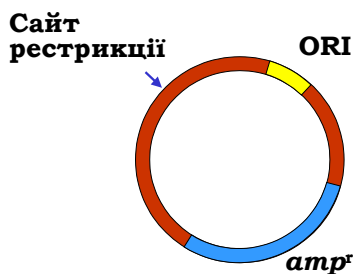
## Клонування ДНК

Методами клонування будь-які фрагменти ДНК, отримані за допомогою рестриктаз, можна вбудувати в плазмиду або ДНК бактеріофага – **вектор** для молекулярного клонування, а потім розмножити ці генетичні елементи в клітинах бактерій або дріжджів, збільшуючи їхню кількість у мільйони разів.

Необхідність використання вектора зумовлена тим, що при звичайному введенні ДНК у клітини вона піддається дії нуклеаз, які розщеплюють її до нуклеотидів. Щоб ДНК стала складовою частиною генетичного апарату клітини, вона повинна або вбудуватися в її геном, або бути здатною до автономної реплікації.

Як вектор для клонування часто використовують бактеріальні плазмиди (розділ 5). Основними вимогами до плазмиди як вектора є наявність у її складі ориджина реплікації, унікального (одного на плазміді) сайту, що впізнається певною рестриктазою, і гена стійкості до одного з антибіотиків як селективного маркера (рис. 9.2). Із метою створення рекомбінантної ДНК очищену плазмиду, яка містить єдиний сайт певної рестриктази, обробляють цією рестриктазою та отримують лінійний вектор з липкими кінцями. Далі додають фрагмент ДНК, який було вилучено за допомогою тієї самої рестриктази. За рахунок комплементарної взаємодії між липкими кінцями фрагмента й вектора утворюється циркулярний нековалентний комплекс двох молекул ДНК. Завдяки використанню ДНК-лігази полінуклеотидні ланцюги зшиваються – утворюється **рекомбінантна** молекула ДНК. Найзручнішими є плазмідні вектори,

котрі містять так званий *полілінкер* – ділянку з певним набором унікальних рестриктних сайтів, що дозволяє підібрати одну з рестриктаз, найбільш придатну для кожного випадку.



**Рис. 9.2.** Схема організації плазмідного вектора (Ori – ориджин реплікації, *amp<sup>r</sup>* – ген стійкості до ампіциліну)

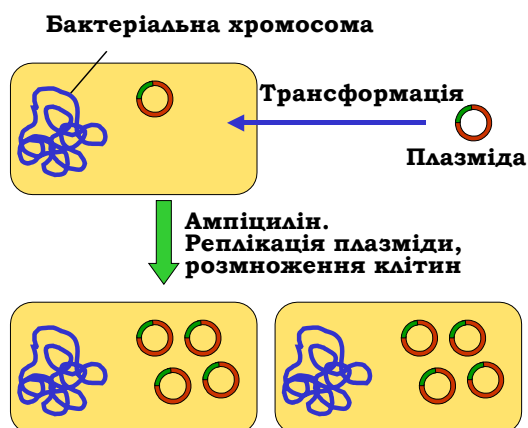
Фрагменти ДНК із тупими кінцями також можна вбудувати у вектор за допомогою лігази, хоча така реакція є на порядок менш ефективною. За допомогою термінальної трансферази до 3'-кінців фрагмента ДНК можна приєднати, наприклад, одноланцюговий poly(A)-хвіст, а до 3'-кінців лінійного вектора – poly(T). При змішуванні між комплементарними одноланцюговими кінцями відбудеться спарювання, остаточне зшивання завершує ДНК-лігаза. Таким чином можна об'єднувати будь-які фрагменти з тупими кінцями, незалежно від методу їхнього отримання.

Ферментативним шляхом можна утворити тупі кінці на фрагментах із липкими кінцями. Для цього або здійснюють видалення одноланцюгових виростів за допомогою нуклеази S1, або липкі кінці забудовують за допомогою фрагмента Кленова. Утворений фрагмент із тупими кінцями вбудовують у вектор за вже описаним методом.

**Трансформація** бактеріальних клітин рекомбінантною плазмідною здійснюється зазвичай у розчині CaCl<sub>2</sub> або шляхом електропорації (через суспензію клітин проводиться короткий імпульс електричного струму). В обох випадках підвищується проникність клітинної стінки й рекомбінантна плазміда потрапляє всередину. Далеко не всі бактерії отримують плазмиду при трансформації, і тут стає в пригоді ген стійкості до антибіотика: достатньо обробити бактеріальну культуру цим антибіотиком, щоб залишити тільки трансформовані клітини. Далі відбувається автономна реплікація плазмиди й розмноження самих клітин, що приводить до значного зростання загальної кількості плазмід (рис. 9.3). Клоновані плазмиди виділяють із бактеріальної

культури, а обробка їх тією самою рестриктазою, що була використана при виготовленні рекомбінантної молекули, дозволяє вирізати з вектора клонований фрагмент ДНК.

Найпоширенішими плазмідними векторами сьогодні є штучні плазміди – похідні від плазміди рUC (pBluescript, pGEM). Це невеликі (~2,7 тис. пар основ) мультикопійні плазміди, що містять ген стійкості до антибіотику, ориджин і полілінкер, вбудований у ген *lacZ*. Полілінкер сам по собі не впливає на експресію цього гена, продуктом якої є фермент, який перетворює певний синтетичний субстрат на сполуку синього кольору. Якщо фрагмент ДНК вбудовується в полілінкер, це порушує експресію гена *lacZ*, і можна легко відбирати тільки ті клони бактерій, котрі містять рекомбінантну ДНК.



**Рис. 9.3.** Розмноження рекомбінантної плазміди в бактеріальних клітинах

Чим менша плазміда за розміром, тим вона стабільніша, а отже, і трансформація бактерій плазмідами є ефективнішою. Відповідно, існує обмеження в розмірі фрагментів, що їх можна клонувати описаним шляхом – до 10 тис. пар основ. Альтернативною, але цілком аналогічною технікою, що дозволяє працювати з фрагментами довжиною приблизно 20 тис. пар основ, є клонування ДНК із використанням векторів на основі бактеріофага  $\lambda$  (див. розділ 5). За допомогою рестриктази фрагмент ДНК вбудовується у фагову ДНК, додаються порожні фагові оболонки, і здійснюється збірка фагових частинок *in vitro*. Рекомбінантними бактеріофагами заражають бактеріальну культуру, де відбувається їхнє розмноження.

Використовуючи вектори на основі **космід**, можна клонувати фрагменти ДНК до 40 тис. пар основ. Косміда є плазмідною, яка крім ориджину, сайтів рестрикції та генів стійкості до антибіотиків містить два так звані *cos*-сайти: липкі кінці лінійної молекули ДНК бактеріофага  $\lambda$ . Саме за рахунок *cos*-сайтів лінійна молекула фагової ДНК циркуляризується після її проникнення в бактеріальну клітину. У лінійну космиду з такими липкими кінцями вбудовується фрагмент ДНК, який бажано клонувати. Рекомбінантна косміда упаковується *in vitro* у фагові частинки, якими обробляють бактеріальну культуру. У цьому випадку бактеріофаг використовується як ефективний засіб трансформації: лінійна косміда проникає в клітину, де за рахунок *cos*-сайтів і бактеріальної лігази циркуляризується. Далі циркулярна косміда розмножується, як звичайна плазміда за схемою на рис. 9.3.

Для клонування фрагментів ДНК від 100 тис. пар основ розроблені спеціально сконструйовані вектори ВАС і УАС. ВАС-вектори створено на основі F-плазмід бактерій (розділ 5). УАС-вектор являє собою штучну дріжджову мініхромосому, яка містить центромеру, теломери і точку початку реплікації. У такий вектор можна ввести чужорідний фрагмент ДНК розміром понад 100 тис. пар основ, і така мініхромосома, уведена в дріжджову клітину, буде реплікуватись і поводити себе аналогічно до інших дріжджових хромосом при мітотичному поділі.

Більшість сучасних векторних систем поліфункціональні, тобто придатні не тільки для клонування ДНК, а й для експресії рекомбінантних білків.

## Геномні бібліотеки

Розглянуті принципи клонування фрагмента ДНК залишають питання, звідки береться той чи інший фрагмент ДНК. Для того, щоб працювати з певною ділянкою ДНК (наприклад, певним геном) спочатку здійснюють клонування великої кількості різноманітних фрагментів геному – створюють бібліотеку клонів, серед яких уже шукають потрібний.

Стандартна процедура створення бібліотеки – метод дробовика (*shotgun*) – розпочинається з часткової (протягом обмеженого часу) обробки всієї геномної ДНК певною рестриктазою – так, щоб отримати набір різноманітних фрагментів, що перекриваються, певної середньої довжини (рис. 9.4). Усі такі фрагменти вбудовуються у вектори, після чого здійснюється трансформація. Бактерії висіваються на твер-

де середовище таким чином, що кожна колонія веде походження від однієї клітини. Отже, набір колоній – це набір різноманітних клонів, кожен з яких містить один із фрагментів геному.

Аналогічно до геномних бібліотек створюють бібліотеки клонів кДНК. Для цього спочатку виділяють сумарну мРНК із клітин певного типу. Використовуючи зворотну транскриптазу та oligoT, що комплементарні до 3'-кінцевих polyA-хвостів мРНК, як праймери, на цих мРНК синтезують комплементарні ланцюги ДНК. Далі отримані молекули кДНК піддають клонуванню. На відміну від геномної, бібліотека клонів кДНК містить тільки кодуючі послідовності (екзони) генів і тільки таких генів, які є активними в клітинах даного типу.

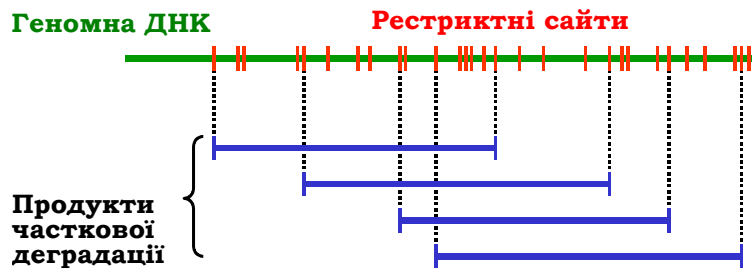
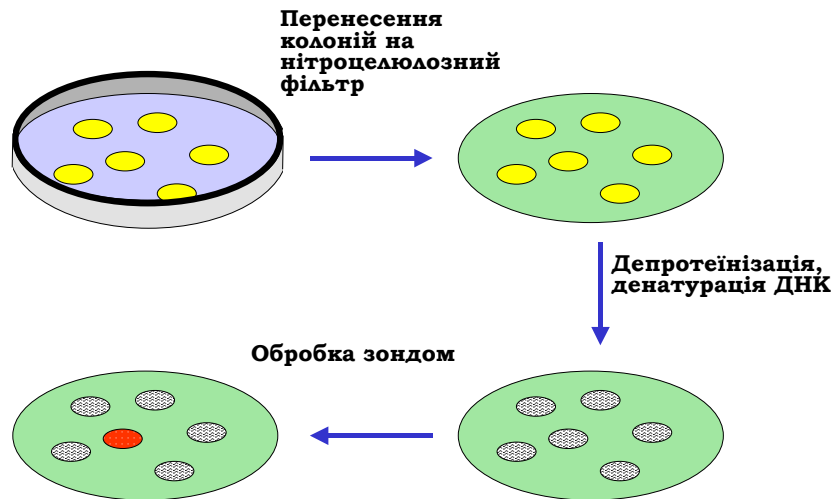


Рис. 9.4. Метод дробовика

Потрібну нуклеотидну послідовність серед бібліотеки клонів можна знайти за допомогою гібридизації клонованої ДНК із радіоактивно міченим ДНК-зондом (рис. 9.5). Колонії бактерій у чашці Петрі переносять на нітроцелюлозний фільтр – роблять своєрідну репліку. Потім здійснюють лізис клітин, депротейнізацію та денатурацію ДНК у лужному розчині. Після висушування фільтра одноланцюгову ДНК необернено фіксують на ньому. Фільтр обробляють радіоактивно міченою ДНК певної послідовності – зондом. Якщо зонд комплементарний ДНК клона, відбувається гібридизація – ренатурація дволанцюгової ДНК. Детектування цього факту за допомогою авторадіографії дозволяє ідентифікувати розшукуваний клон.

Синтез зонда найчастіше проводять, використовуючи базу даних EST (Expressed Sequence Tag). База є загальною доступною колекцією великої кількості коротких (200–400 пар основ) фрагментів послідовностей кДНК багатьох організмів. Достатньо знайти в EST-базі коротку ділянку, що відповідає фрагменту послідовності білка (ген якого розшукується), і синтезувати її, щоб приготувати зонд.



**Рис. 9.5.** Гібридизація клонованої ДНК із радіоактивним зондом на нітроцелюлозному фільтрі

Секвенування (див. нижче) кожного з фрагментів, які містяться в геномній бібліотеці клонів, і порівняння послідовностей фрагментів, що перекриваються (рис. 9.4), дозволяє розмістити клоновані фрагменти в порядку їхньої локалізації в геномі, тобто встановити повну послідовність геному.

Велика кількість послідовностей (у тому числі повних послідовностей геномів), які вже встановлені й продовжують накопичуватись, створює завдання їхнього збереження та аналізу. Зрозуміло, що таке завдання (яке постає вже при порівнянні послідовностей окремих клонованих фрагментів із метою з'ясувати нуклеотидну послідовність геному) може бути виконаним лише за допомогою комп'ютерів. **Біоінформатика** – галузь, пов'язана з вирішенням зазначених проблем, сьогодні є невід'ємною складовою частиною генетики. Найбільші загальнодоступні через інтернет бази даних нуклеотидних і амінокислотних послідовностей створено в Європейській Лабораторії Молекулярної Біології (EMBL Sequence Data Base) і Національних Інститутах Здоров'я США (GenBank). На відповідних порталах розміщено також програмні засоби порівняння послідовностей, пошуку промоторів, стартових точок транскрипції, інтронів і екзонів, визначення білкових послідовностей із послідовностей нуклеотидів тощо. На основі

біоінформатичного аналізу можна встановити, наприклад, функціональне значення невідомого щойно клонованого гена по його гомології з відомим геном іншого організму, структуру гена (знайти промотор, екзони, точки термінації транскрипції), структурно-функціональні особливості нових білків, функціональні зв'язки між різними білками й генами, філогенетичні стосунки між різними таксонами. Завдяки розвитку біоінформатики з'явилась можливість, у доповнення до результатів, що отримують *in vivo* та *in vitro*, вирішувати різноманітні проблеми просто за допомогою комп'ютера – *in silico*.

## Полімеразна ланцюгова реакція

Альтернативним і додатковим до клонування методом збільшення кількості бажаного фрагмента ДНК – ампліфікації – є полімеразна ланцюгова реакція (ПАР, або PCR – Polymerase Chain Reaction). ПАР – це реакція синтезу ДНК *in vitro*, яка повторюється багато разів: синтезовані ланцюги стають матрицями для синтезу в наступному циклі реакції. Для здійснення ПАР треба знати принаймні короткі послідовності ДНК на кінцях того фрагмента, що має бути ампліфікований.

Реакційна суміш містить слідову кількість вихідної ДНК, надлишкові кількості двох синтетичних праймерів до кінців фрагмента, нуклеозидтрифосфати чотирьох типів і ДНК-полімераза *Taq* термофільної бактерії *Thermus aquaticus*. Використання саме полімерази *Taq* викликано тим, що вона не втрачає своєї активності при нагріванні до високих температур. У кожному циклі реакції відбувається нагрівання суміші до 95 °С (денатурація ДНК) і охолодження до 60 °С. Після охолодження до такої все ще досить високої температури ланцюги ДНК не ренатурують, але праймери (оскільки вони присутні в досить високих концентраціях) знаходять свої комплементарні ділянки, зв'язуються з ними, і полімераза *Taq* починає працювати, подовжуючи ці праймери.

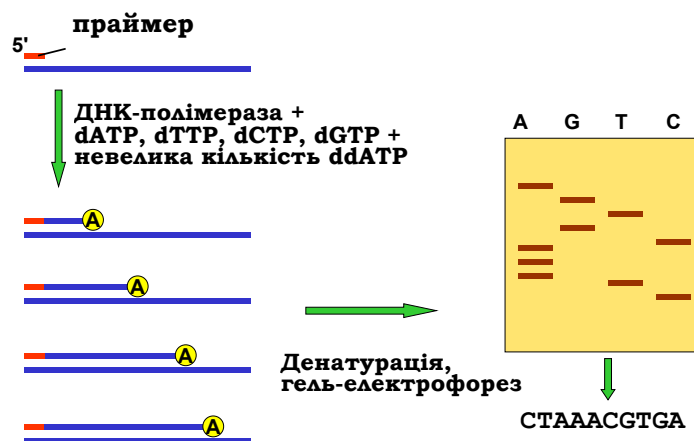
Метод ПАР має надзвичайно широке застосування. Ним послуговуються кожного разу, коли є необхідність детектувати й дослідити невелику кількість ДНК, у тому числі – у складі неочищеного біологічного матеріалу. ПАР застосовують також у комбінації з клонуванням: ампліфікований ДНК-продукт можна клонувати й використати, наприклад, для експресії білка (див. нижче); ампліфікація за допомогою ПАР стає в пригоді для збільшення невеликої кількості клонованої ДНК.



## АНАЛІЗ СТРУКТУРИ Й ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ І ГЕНОМІВ

Клонований або ампліфікований фрагмент ДНК можна дослідити різними способами, але найбільш вичерпну інформацію дає встановлення нуклеотидної послідовності (sequence) фрагмента – секвенування.

На рис. 9.6 показано схему найпопулярнішого сьогодні методу Сангера (Frederick Sanger). До одноланцюгової ДНК-матриці додається радіоактивно мічений праймер, повний набір дезоксирибонуклеозидтрифосфатів (dNTP), ДНК-полімераза й невелика кількість дидезоксирибонуклеозидтрифосфату одного з чотирьох типів (наприклад, ddATP). Дидезоксирибонуклеотид відрізняється тим, що містить атом Н замість ОН-групи не тільки при 2'-, а також і при 3'-атомі пентози (див. рис. 1.1). Відповідно, включення такого нуклеотиду в ланцюг, що синтезується, зупинить подальше зростання ланцюга внаслідок відсутності 3' ОН-групи на його кінці. Оскільки ddATP присутній у невеликій кількості, така подія буде відбуватися в різних точках ланцюга – в усіх, де стоїть аденін напроти тиміну в складі матриці. Денатурація продуктів реакції дасть набір мічених одноланцюгових фрагментів від праймера до кінцевого аденіну, довжина цих фрагментів у нуклеотидах дасть порядковий номер аденіну в складі ланцюга.



**Рис. 9.6.** Секвенування ДНК за Сангером: схема синтезу ДНК у присутності дидезоксиАТР (ліворуч). Аналогічна процедура для інших трьох дидезоксирибонуклеотидів дає набір одноланцюгових фрагментів, що аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в денатуруючих умовах (праворуч) – розподіл смуг дозволяє прочитати послідовність (праворуч вниз)

З метою визначення довжини фрагментів проводять гель-електрофорез одноланцюгової ДНК у денатуруючих умовах, на сусідні лунки геля наносять також продукти синтезу в присутності інших дидезоксинуклеотидів. Як показано на рис. 9.6, після електрофорезу та візуалізації смуг із такого геля можна прочитати нуклеотидну послідовність.

Інший сучасний підхід у секвенуванні (так зване *піросеквенування*), який реалізується на автоматизованих секвенаторах, дозволяє встановити послідовність значно швидше, дешевше й при цьому не потребує ані клонування ДНК, ані електрофорезу. Одноланцюгові фрагменти, отримані з невеликої кількості геномної ДНК, пришиваються своїми 5'-кінцями до мікрокульок (один фрагмент на кульку) і піддаються ампліфікації за допомогою ПАР. Кожна кулька з пришитими до неї ампліфікованими ідентичними фрагментами розміщується в мікрореакторі, де здійснюється ДНК-полімеразна реакція. Нуклеозидтрифосфати подаються в реакційну суміш імпульсно один за одним. Якщо нуклеотид певного типу виявляється комплементарним матриці та включається у зростаючий ланцюг, пірофосфат, що при цьому звільняється, залучається до низки хімічних реакцій, де остання реакція супроводжується випромінюванням світла (хемілюмінесценція). Світловий сигнал фіксується оптичною системою, і послідовність таких сигналів читається як нуклеотидна послідовність. Реакція здійснюється паралельно у 200 тис. мікрореакторів (для 200 тис. фрагментів, які перекриваються), що дозволяє встановити послідовність приблизно 200 млн пар основ за 4,5 години.

Зрозуміло, що далеко не завжди є потреба у визначенні послідовності ДНК, із якою має справу дослідник. Потужним засобом аналізу складних сумішей ДНК щодо наявності там специфічних елементів послідовності є **блот-гібридизація на нітроцелюлозних фільтрах за Саузерном** (Edward Southern). Назва процедури, яку схематично зображено на рис. 9.7, походить від слова blotting (промакування): фрагменти ДНК розділюються за допомогою гель-електрофорезу (залишаючись невидимими в гелі), після чого на гель накладають нітроцелюлозний фільтр, а під та над цим "сендвічем" розміщують фільтрувальний папір і занурюють нижній шар паперу в лужний розчин. Під дією капілярних сил розчин піднімається до верхнього шару паперу, "захоплюючи" при цьому ДНК і переносячи її з гелю на нітроцелюлозу. Одночасно при цьому ДНК денатурується лугом. У результаті одноланцюгова ДНК опиняється на фільтрі – середовищі, придатному для подальшої гібридизації, а сам фільтр є точною реплікою вихідного гелю. Далі проводять обробку фільтра зондом – одноланцюговим фрагментом

ДНК певної послідовності, який містить радіоактивну мітку. Зонд гібридується з комплементарною ДНК у певних досі невидимих смугах, що можна зафіксувати за допомогою авторадіографії.

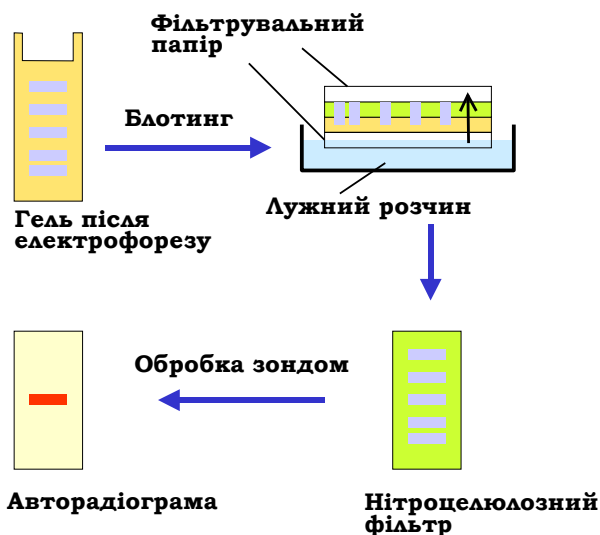


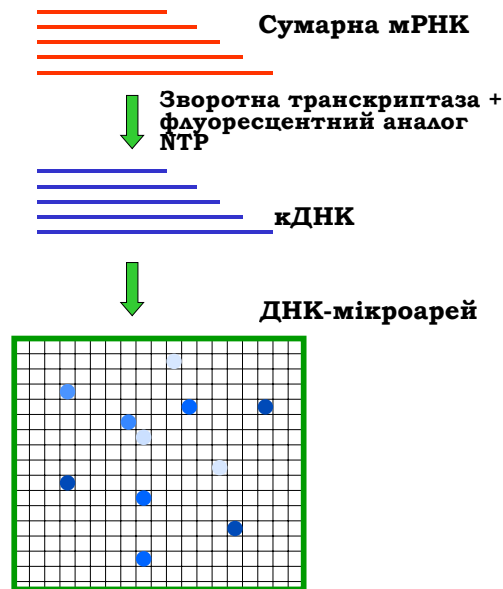
Рис. 9.7. Блот-гібридизація

У такий спосіб можна встановити, наприклад, присутність специфічних послідовностей ДНК у препаратах; наявність у геномі додаткових копій послідовності, що є гомологічними до вже відомої; присутність у невивченому геномі генів, гомологічних відомим генам тощо. Прикладом одного з численних застосувань Саузерн-блотингу є метод **фінгерпринтингу ДНК** (DNA fingerprinting). Метод базується на факті наявності в еукаріотичних геномах мінісателітних повторів – невеликих елементів послідовності, які тандемно повторюються в різних місцях геному кілька разів. Розподіл локусів за кількістю повторів є індивідуальним – так само, як відбитки пальців. З метою ідентифікації особи (чи особи – у криміналістиці, судових справах тощо) геномну ДНК обробляють рестриктазою, котра не має своїх сайтів усередині повтору. Фрагменти розділюються шляхом електрофорезу, здійснюється блотинг і гібридизація з радіоактивно міченим елементом послідовності мінісателіта. У результаті на авторадіограмі представлено специфічний для особи набір фрагментів різної довжини, тобто різної кількості повторів мінісателіта – своєрідний молекулярний відбиток (DNA fingerprint).

**Нозерн-блотинг** відрізняється від описаної процедури блотингу за Саузерном (назва nothern є просто жартиливою аналогією з буквальним значенням прізвища Саузерна) лише тим, що на гель для електрофорезу наноситься сумарний препарат виділеної мРНК. Гібридизація з міченим фрагментом ДНК (наприклад, κДНК із бібліотеки клонів) дозволяє встановити наявність певної мРНК, тобто активність гена, у клітинах певного типу після дії активуючих / репресуючих факторів тощо, а також оцінити рівень цієї активності (концентрацію мРНК) за інтенсивністю забарвлення смуги на авторадіограмі.

Проаналізувати повну програму активності генів організму чи клітин певного типу за певних фізіологічних умов або у процесі розвитку, а також виконувати інші завдання, пов'язані з вивченням функціонування цілого геному, дозволяють методи, що базуються на використанні **ДНК-мікроарей** (DNA-microarrays) або ДНК-чипів (DNA-microchips).

Фрагмент ДНК довжиною до 1 тис. пар основ, для якого відомо його розташування в геномі, ампліфікується, і одноланцюгові продукти ампліфікації пришиваються до невеликої зони на поверхні предметного скла мікроскопа. Скло розміром 2 × 2 см – ДНК-мікроарей – покрито сіткою із приблизно 6 тис. таких мікроплям, кожна з яких містить ДНК певної геномної ділянки.



**Рис. 9.8.** Аналіз сумарної мРНК за допомогою ДНК-мікроарей

Одну з типових схем використання мікроарея зображено на рис. 9.8. Сумарна мРНК, отримана з клітин певного типу, використовується як матриця в реакції зворотної транскрипції. Поряд зі звичайними, до реакційної суміші додається флуоресцентний аналог одного з НТР. У результаті маємо препарат флуоресцентно міченої кДНК. Після гібридизації з цією кДНК мікроарей аналізують за допомогою флуоресцентного мікроскопа: наявність флуоресцентної плями свідчить про активність певного гена, інтенсивність флуоресценції – про рівень цієї активності.

Експерименти такого типу дозволяють з'ясувати зміни загальної програми експресії генів при змінах зовнішніх умов, активність різних генів у різних тканинах багатоклітинного організму, зміни активності груп генів у процесі диференціювання клітин.

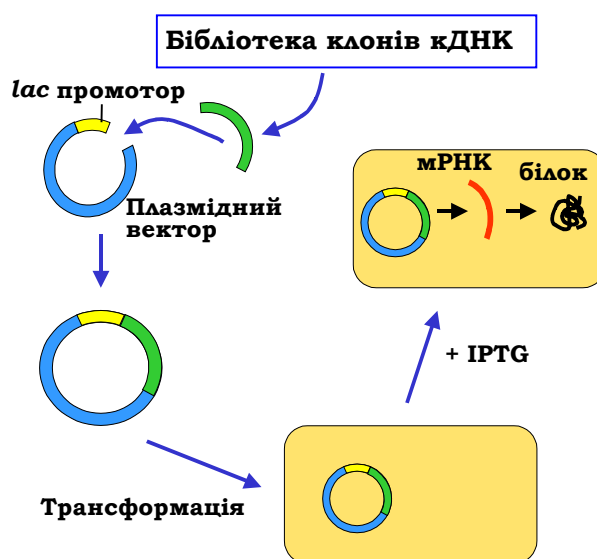
## ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ

Методи генної інженерії дозволяють не тільки здійснювати різноманітні операції з нуклеїновими кислотами, а й отримувати практично будь-які білки у великих кількостях. Ген, що кодує даний білок, можна клонувати, вбудувати (наприклад, у бактеріальну плазмиду) і змусити бактеріальну культуру продукувати цей білок. Виділення та очищення білка з культури біохімічними методами не є принциповою проблемою, зважаючи на його велику кількість.

Одну з найпростіших схем експресії білка в *E. coli* зображено на рис. 9.9. Зрозуміло, що еукаріотичний ген не має сенсу вводити у прокаріотичну клітину – прокаріоти не мають системи сплайсингу. Тому беруть лише кодуючу частину гена, яку можна отримати з бібліотеки клонів кДНК. Використовуючи придатну рестриктазу та лігазу, потрібну кДНК вбудовують у плазмідний вектор для експресії поряд із промотором – наприклад, лактозного оперона (див. розділ 2). Здійснюють трансформацію рекомбінантної плазмиди в бактеріальні клітини, до бактеріальної культури додають синтетичний індуктор *lac*-оперона IPTG. Промотор активується, після чого здійснюється транскрипція гена та трансляція білка.

Більш ефективна двоступенева система експресії використовує промотор РНК-полімерази бактеріофага Т7. У бактеріальному геномі ані таких полімераз, ані відповідних промоторів немає. У клітину

вводяться два плазмідні вектори: один містить *lac*-промотор і ген РНК-полімерази T7, інший – сильний промотор полімерази T7 разом із геном білка, що має бути експресований. IPTG індукує експресію полімерази, яка зв'язується тільки з промотором у складі другої плазміди (інших промоторів немає) і забезпечує синтез великої кількості білка.



**Рис. 9.9.** Експресія білка в бактеріальній клітині.  
*lac*-Промотор – промотор лактозного оперона,  
 IPTG – синтетичний індуктор *lac*-оперона

Велика кількість білків, у тому числі ферменти, що використовуються у рекомбінантних технологіях, виробляються сьогодні шляхом експресії в бактеріальних клітинах. Поряд із прокаріотичними розробляються та використовуються також системи експресії рекомбінантних білків в еукаріотичних клітинах. Особливо важливими еукаріотичні системи експресії є для еукаріотичних білків, що не можуть бути синтезовані бактеріальною клітиною в активній формі. Зокрема, це стосується білків, що піддаються суттєвим посттрансляційним модифікаціям – наприклад, глікопротеїдів. Найпростішим для використання еукаріотичним "біореактором" є дріжджі, маніпулювати якими так само легко й так само дешево, як і бактеріями. Як дріжджові експресуючі вектори використовують плазміди або штучні хромосоми YAC.

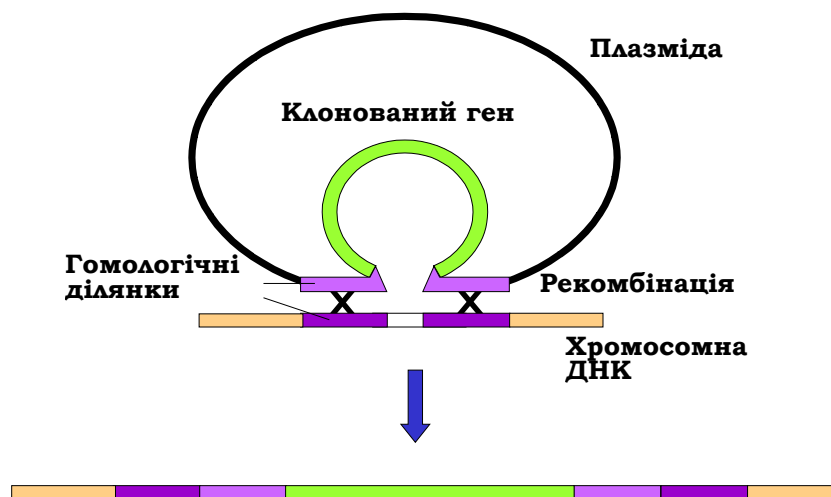


Рис. 9.10. Інтеграція гена у хромосомну ДНК

Крім того, часто буває доцільним вбудовування гена-мішені, що кодує бажаний білок, у хромосому клітини-хазяїна: клітина позбавляється при цьому зайвих витрат на реплікацію плазміди та синтез зайвих білків, гени яких несе плазміда. Здійснити інтеграцію можна за рахунок гомологічної рекомбінації між геномною ДНК і ділянками, що фланкують ген-мішень у плазміді (рис. 9.10).

## ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ

Генетично модифіковані мікроорганізми використовуються здебільшого як **біореактори, що продукують білки для потреб медицини**. В основному це невеликі білки, що не піддаються посттрансляційним модифікаціям. Одним із перших промислових застосувань генетичної інженерії було отримання шляхом експресії у клітинах *E. coli* (за принциповою схемою рис. 9.9) гормону росту людини – соматотропіну. В організмі він секретується передньою часткою гіпофіза, а його дефіцит є причиною захворювання – гіпофізарної карликовості.

Отримання соматостатину являє собою цікавий приклад цілеспрямованого конструювання білків за допомогою методів генної інженерії. Це короткий пептид (містить 14 амінокислотних залишків), який синтезується у шлунково-кишковому тракті й гальмує вивільнення з гіпофізу гормону росту. Отримати соматостатин у клітинах бактерій у значних кількостях є складним завданням, оскільки він швидко руйнується протеолітичними ферментами. Щоб "обійти" внутрішньоклітинні бактеріальні протеази, було сконструйовано химерний білок-попередник. У його складі як N-кінцеву ділянку було використано білок бактерії, до якого приєднали сам соматостатин: звичайно, усе це було зроблено на рівні ДНК, зв'язувальним елементом у цій конструкції було використано триплет АТГ, що кодує метіонін. Після виділення з клітин бактерій химерний білок обробляли бромціаном, унаслідок чого відбувалось його розщеплення за залишком метіоніну, і таким чином вилучався фізіологічно активний поліпептид. За аналогічною схемою було розроблено процес отримання інсуліну.

Шляхом експресії в *E. coli* отримують також інтерферони всіх трьох груп:  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -інтерферони – антивірусні білки, які синтезуються імунокомпетентними клітинами. Проте недоліком використання бактеріальних клітин для отримання  $\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів (природні інтерферони цих двох груп – глікопротеїди) є відсутність у бактерій систем, що забезпечують посттрансляційні модифікації білків. Роль глікозилювання  $\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів не до кінця зрозуміла і, хоча неглікозильовані форми цих білків практично повністю зберігають противірусну активність, це спонукає до розробки й використання систем експресії рекомбінантних інтерферонів в еукаріотичних клітинах.

Важливе місце в генетичній інженерії мікроорганізмів посідає виробництво **рекомбінантних вакцин**. Вони мають цілий ряд переваг перед традиційними вакцинами: характеризуються відсутністю (або значним зниженням вмісту) баластних компонентів, майже повною нешкідливістю та низькою вартістю. Можна назвати три основні підходи, які використовують для отримання таких вакцин:

- Модифікація мікроорганізму шляхом делеції генів, що відповідають за вірулентність. При цьому зберігається здатність викликати імунну відповідь, і мікроорганізм можна використовувати як живу вакцину.
- Перенесення антигенних детермінант патогенного мікроорганізму на непатогенний, який можна використовувати як вакцину.



- Клонування та експресія генів білків, котрі містять анигенні детермінанти. Білки використовують як вакцину, що провокує імунну відповідь.

Велике значення має використання мікроорганізмів для **промислового виробництва органічних сполук**. У такому виробництві, крім класичних технологій, усе ширше використовують технологію рекомбінантних ДНК, яка дозволяє спрямовано змінювати метаболізм мікроорганізмів, уводячи нові гени або модифікуючи такі, що вже існують. Прикладами є використання рекомбінантних мікроорганізмів для промислового синтезу L-аскорбінової кислоти (вітаміну С), барвника індиго, антибіотиків, цінних біополімерів тощо.

Мікроорганізми можуть приносити користь не тільки завдяки якомусь певному продукту, який ними синтезується, а й своєю дією на довкілля. Зокрема, бактерії можна використовувати для **деградації ксенобіотиків** (неприродних синтетичних хімічних речовин – гербіцидів, пестицидів, холодоагентів, хімічних відходів). Головну групу ґрунтових мікроорганізмів, що руйнують ксенобіотики, становлять бактерії роду *Pseudomonas*. Різні штами *Pseudomonas* здатні розщеплювати понад 100 органічних сполук, але кожен окремий штам використовує як джерело вуглецю тільки певну групу споріднених сполук і не використовує інших. Шляхом перенесення плазмід, які кодують ферменти різних катаболічних шляхів, в один реципієнтний штам було створено "супербацилу", що має надзвичайні катаболічні властивості – вона здатна руйнувати більшість вуглеводнів нафти. Тепер генетично модифіковані штами природних ґрунтових мікроорганізмів використовуються для комплексної біологічного очищення стічних вод.

## ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН

Одна з переваг рослинних клітин – їхня тотипотентність: з однієї клітини можна регенерувати цілу рослину. Отже, із клітин, сконструйованих генно-інженерними методами, можна отримати рослини, усі клітини яких несуть чужорідний ген чи гени. Часто такі **трансгенні рослини**, створені *de novo*, розмножують вегетативно. Генетична модифікація рослин може здійснюватись за допомогою спеціальних векторів або шляхом прямого перенесення генів.

Поширеним методом уведення генів у рослинні геноми є використання ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. Агробактерії мають здатність інтегрувати свій генетичний матеріал у клітини дводольних рослин. Вони містять великі (близько 200 тис. пар основ) Ті-плазмідни (tumor inducing), які несуть так звану Т-ДНК – ділянку, здатну інтегруватися в ядерний геном рослинної клітини. До складу Т-ДНК входять гени фітогормонів, продукти експресії яких індукують у трансформованих рослин утворення пухлин – корончастих галів. Гени, що відповідають за перенесення та інтеграцію Т-ДНК у геном рослин (*vir*-гени), знаходяться в іншій ділянці Ті-плазмідни. Трансгенні рослини отримують, використовуючи модифіковану Т-ДНК, в якій онкогени замінені на будь-який ген, котрий бажано інтегрувати в рослинний геном. Таку неонкогенну плазмідну конструюють генно-інженерними методами, клонують в *E. coli*, а потім вектор уводять в *A. tumefaciens*: *vir*-гени забезпечують перенесення та інтеграцію бажаної ділянки. За допомогою агробактерій трансформовано велику кількість видів дводольних рослин, однак модифікація одnodольних рослин (головні зернові культури – рис, пшениця та кукурудза) таким шляхом ускладнена.

**Безвекторні системи** дають можливість прямого перенесення чужорідної ДНК у будь-які рослинні клітини або протопласти (клітини, в яких відсутня клітинна стінка). При безвекторному перенесенні використовують методи електропорації, мікроін'єкції та біолістичний метод. **Мікроін'єкцію** проводять під мікроскопом за допомогою скляної голки, уводячи через неї ДНК у ядро клітини. Бомбардування клітин (**біолістика**) – інший дуже ефективний метод уведення ДНК у рослинну клітину. При цьому золоті або вольфрамові сферичні кульки діаметром 0,4–1,2 мкм покривають шаром ДНК, яку осаджують  $\text{CaCl}_2$ , спермідином або поліетиленгліколем, і "вистрілюють" кульками в суспензію клітин зі спеціальної "рушниці". Кульки пробивають клітинну стінку, за рахунок чого ДНК потрапляє всередину клітини та з певною імовірністю інтегрується в рослинну ДНК за допомогою не зовсім зрозумілого механізму. Пряме введення ДНК у протопласти рослин можна здійснити й за допомогою **ліпосом** – сферичних частинок, мембрани яких містять фосфоліпіди. Частинки обволікають трансформуючу ДНК і тим самим захищають її від нуклеаз. За допомогою ліпосом у протопласти рослин вдається ввести ДНК Ті-плазмід, а також цілі хромосоми.

Для ідентифікації трансформованих клітин і оцінки рівня експресії чужорідних генів на ранніх стадіях отримання трансгенних рослин використовують **репортерні гени**, продукти яких легко детектуються за допомогою простих методів. Одним із таких генів є ген *GUS*, що кодує фермент  $\beta$ -D-глюкуронідазу, яка перетворює певний субстрат на сполуку, забарвлену в яскраво-блакитний колір. Інший ген – *GFP* – кодує флуоресцентний білок, котрий легко детектувати. Як правило, експресія репортерного гена корелює з рівнем експресії функціонального гена в трансгенній рослині. З метою мінімізувати вторгнення а рослинний геном останнім часом розробляються підходи з отримання безмаркерних трансгенних рослин. Наприклад, трансформують рослину двома різними ДНК, одна з яких несе маркерний ген, а інша – трансген, що має бути інтегрованим. У цьому випадку від 30 до 80 % рослин містить обидва гени, які, однак, інтегровані в різні ділянки геному рослини. Після відбору трансформантів маркерний ген можна видалити з трансгенної рослини за допомогою звичайного схрещування.

З метою забезпечити високий рівень експресії в рослинному геномі чужорідний ген оснащують сильним конститутивним промотором. Часто використовують, наприклад, так званий 35S-промотор – промотор РНК 35S вірусу мозаїки кольорової капусти, який забезпечує експресію в будь-яких геномах рослин. Велике значення мають також тканиноспецифічні промотори рослинних генів. Їхня перевага полягає в тому, що гени, які перебувають під їхнім контролем, експресуються тільки в певних тканинах. Так, будь-який ген, контрольований пататиновим промотором, буде експресуватись тільки в бульбах картоплі (пататин – запасний білок бульб картоплі, і тільки тут експресуються його гени). Подібні промотори використовують, коли необхідна експресія гена в певних органах рослин, наприклад – у коренях для захисту від ґрунтових патогенів.

**Поліпшення харчових якостей рослин** є однією з основних цілей їхньої генетичної модифікації. Так, до складу білків ендосперму зернових культур генно-інженерними методами вводять додаткові амінокислоти, що дозволяє отримувати якісніше зерно. Існують розробки, спрямовані на поліпшення складу жирних кислот олійних культур, а також на гальмування процесу пом'якшення плодів після їхнього дозрівання. Наприклад, таке передчасне пом'якшення томатів зумовлене генами ферментів целюлази й полігалактуранази. Для ін активації вказаних генів за механізмом РНК-інтерференції було

створено трансгенні рослини, в яких синтезувались антизмістовні РНК-версії відповідних мРНК.

**Стійкість рослин до біотичних і абіотичних факторів** – інша важлива мета генетичних модифікацій. Наразі найширше культивуються трансгенні рослини, що є стійкими до дії гербіцидів і комах. Дія гербіцидів головним чином виявляється в інгібуванні біохімічних процесів фотосинтезу або синтезу амінокислот. З появою технології генетичної трансформації стало можливим убудовувати в рослини гени, які роблять їх нечутливими до таких гербіцидів: після обробки гербіцидом бур'яни гинуть, а трансгенні культури – ні. Сьогодні виведено велику кількість трансгенних рослин, стійких до основних класів гербіцидів. При створенні їх було реалізовано щонайменше три різні підходи: 1) забезпечити синтез білка, чутливого до дії гербіциду, у такій кількості, щоб його вистачило на виконання властивих йому функцій за наявності гербіциду; 2) зменшити здатність білка, чутливого до гербіциду, до зв'язування з ним; 3) забезпечити інактивіацію гербіциду в рослині в ході метаболізму.

Використання генної інженерії дозволяє також конструювати рослини, стійкі до комахиних атак. Так, тепер широко використовують гени *Bacillus thuringiensis* – ґрунтового мікроорганізму, що має здатність у ході споруляції утворювати асоційовані зі спорами кристалоподібні включення, які складаються з так званих Сгу-білків – токсинів проти комах. Мінімальний фрагмент гена такого бактеріального токсину, оздоблений сильним промотором, інтегрується в рослинний геном – таким шляхом уже отримано стійкі до комах форми картоплі, томатів, хлопку, кукурудзи тощо. Найважливіше, що при цьому зникає необхідність у використанні інсектицидів. Розроблено також інші системи захисту від комах на основі введення генів інгібіторів протеаз, які блокують гідроліз рослинних білків у травоході комах.

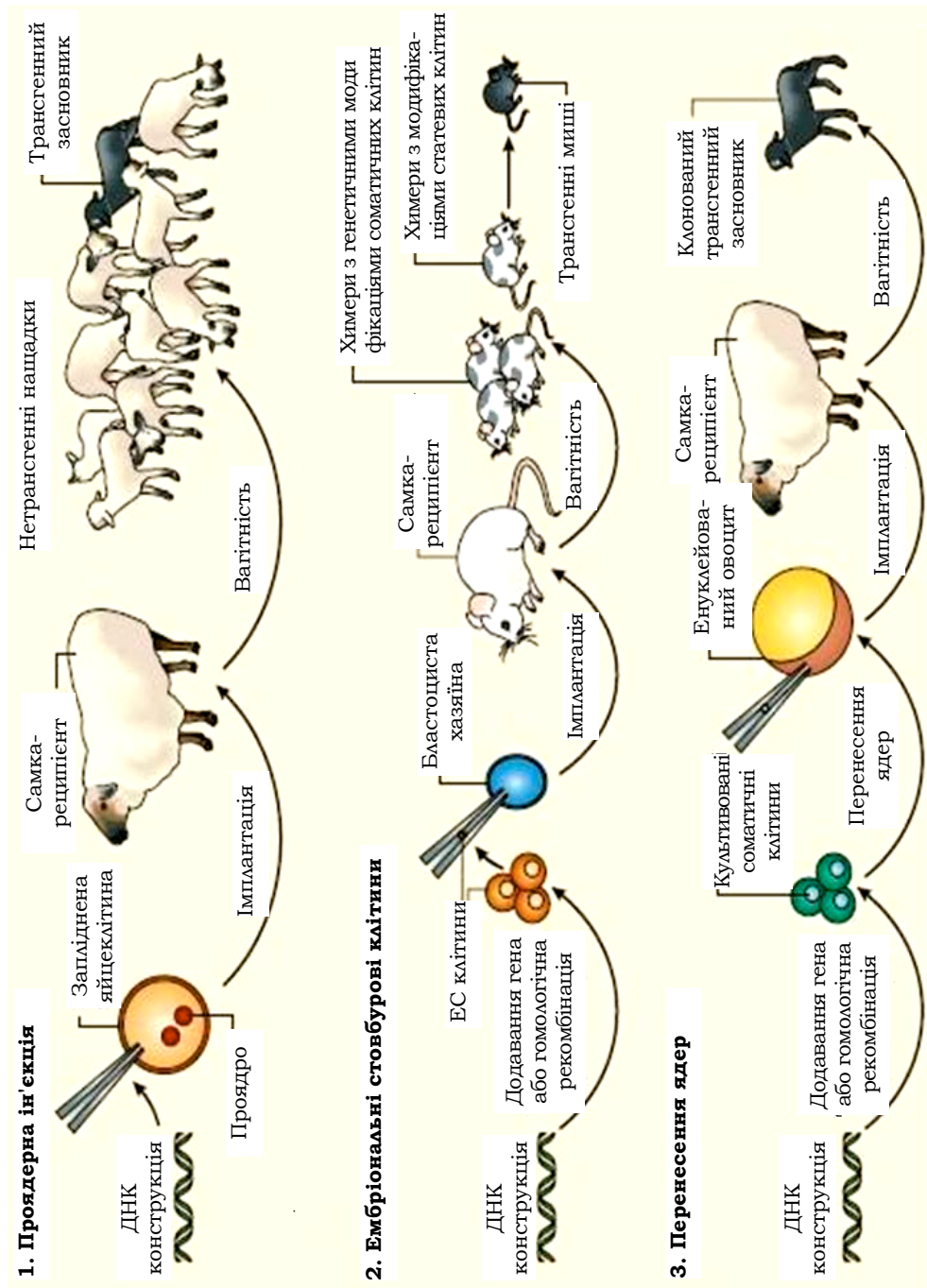
Генетичною інженерією рослин широко послуговуються також для створення культур, стійких до фітопатогенних вірусів, солета посухостійких трансгенних рослин. Так, одержано трансгенний рис з інактивованим геном *Fad7* (білок, що впливає на метаболізм жирних кислот), який може рости при підвищених температурах і витримувати до двох годин при 47 °С.

Перспективним напрямком є також **створення трансгенних рослин, що синтезують цінні речовини**. Рослини дають велику кількість біомаси, і, на відміну від рекомбінантних бактерій, для вирощування сільськогосподарських культур не потрібні великі кошти на обладнання та висококваліфікований персонал. Ще одна перевага трансгенних рослин як продуцентів фармакологічних білків – висока якість отриманого продукту й майже повна відповідність систем посттрансляційних модифікацій білків до таких, що реалізуються в організмі людини. Сьогодні вже створено трансгенні рослини-продуценти моноклональних антитіл, функціональних фрагментів антитіл, гормонів, цитокінів, факторів росту, інтерферону, інших білків із фармакологічною дією. Загалом, незважаючи на значні досягнення в області продукування рекомбінантних білків медичного значення в рослинах, цей напрямок перебуває лише на початковій стадії свого розвитку. Вважається, що в майбутньому рекомбінантні препарати, які отримуватимуть з генетично модифікованих рослин, замінять на фармацевтичному ринку вартісні аналоги, одержані з тварин і бактерій.

## ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ТВАРИН

Генетично модифікованих тварин отримують за допомогою мікроін'єкції ДНК у запліднену яйцеклітину; уведення генетично модифікованих ембріональних стовбурових клітин в ембріон на ранніх стадіях розвитку; пересадження генетично-модифікованих ядер соматичних клітин в енуклеюваний овоцит. Після введення ДНК яйцеклітини, бластоцити чи овоцити імплантують мікрохірургічним шляхом у "сурогатну" матір (рис. 9.11).

Після народження тварин їх ідентифікують на наявність трансгену за допомогою ПАР і гібридизації за Саузерном (у середньому на 100 вагітностей отримують одну трансгенну тварину). Щоб визначити, чи знаходиться трансген у клітинах зародкової лінії тварин, трансгенну тварину схрещують із звичайними. Далі можна схрещувати нащадків для отримання чистих трансгенних ліній: увесь процес є досить тривалим – наприклад, для отримання невеликої групи трансгенних кіз потрібно півтора року.



**Рис. 9.1.1.** Шляхи отримання трансгенних тварин

Процес пересадження ядер соматичних клітин в енуклеювані яйце-клітини називають також клонуванням (отримання генетично однорідного потомства від однієї родоначальної клітини). Для клонованих тварин характерний високий рівень пре- і постнатальної смертності, а також поява різних аномалій, що пов'язують з епігенетичною спадковістю. Отже, хоча роботи з клонування тварин мають вагомий науковий інтерес, їхня практична цінність наразі залишається невисокою.

Незважаючи на деякі успішні спроби, загалом поки що не вдалося отримати вражаючих результатів щодо збільшення швидкості росту сільськогосподарських тварин, підвищення надоїв і поліпшення якості продукції методами генетичної інженерії. Але використання трансгенних тварин – кіз, овець, свиней, кролів – як біореакторів розвивається досить інтенсивно (відповідні методики генетичної модифікації відпрацьовують зазвичай на мишах). Синтез необхідних для медицини білків (які виділяються трансгенною твариною просто в молоко) в організмі ссавців позбавлений усіх недоліків отримання рекомбінантних білків в культурах бактерій і навіть рослинах: системи посттрансляційних модифікацій є практично ідентичними в усіх ссавців. Перелік трансгенних лікарських білків, що їх сьогодні отримують із молока, уже досить великий. Це фактори згортання крові, фібриноген,  $\alpha$ -1-антитрипсин, колаген, інтерферони,  $\alpha$ -глюкозидаза, кальцитонін, лактоферин і багато інших. Запропоновано навіть спеціальний термін "фармінг" для позначення процесу отримання з молока свійських тварин аутентичних білків людини та фармацевтичних препаратів. Біореакторами можуть бути також курячі яйця. Уже отримано модифікованих птахів, що відкладають яйця, які містять деякі білки людини.

Важливим напрямком є також створення трансгенних тварин як генетичних моделей спадкових захворювань людини. Після установлення гена, імовірно відповідального за дане захворювання, можна створити два типи модельних тварин: це миші з функціональним трансгеном і миші, в яких функція даного гена втрачена. Перший тип – це класичні трансгенні миші, у геном яких уведено ген людини, відповідальний за конкретне захворювання. Якщо схильність до захворювання залежить від наявності в геномі одного з багатьох алелів, то створюються лінії трансгенних мишей, що несуть різні алелі даного гена. На цих моделях можна досліджувати вплив кількості копій гена та рівня його експресії на прояв захворювання, а також розробляти нові методи лікування. Другий тип модельних

тварин – це миші, у котрих вимкнено ген (генний нокаут), аналогічний тому, який викликає дане захворювання в людини. На такій моделі досліджують конкретні функції генів, що особливо важливо для аналізу причин мультигенних захворювань.

## ГЕННА ТЕРАПІЯ

Концепція генної терапії полягає в тому очевидному твердженні, що найрадикальнішим способом боротьби з різного роду захворюваннями, викликаними змінами генетичної інформації клітин, має бути виправлення або знищення самої генетичної причини захворювання, а не її наслідків. Такою може бути мутація в зародковій лінії клітин, яка передається нащадкам; або соматична мутація, що викликає, наприклад, злоякісну трансформацію; або поява в клітині чужорідного генетичного матеріалу унаслідок вірусної інфекції. Спосіб боротьби із цими генетичними змінами полягає в штучному введенні в постраждалу клітину нової генетичної інформації, покликаної виправити ту, з якою пов'язана хвороба. Історично генна терапія спочатку націлювалася на лікування спадкових генетичних захворювань, однак згодом поле її застосування, принаймні теоретично, розширилося таким чином, що вона стала розглядатися як потенційно універсальний підхід до лікування практично всього спектра хвороб.

Стратегії генної терапії можна розділити на три великі блоки. Стратегія першого типу використовується в тих випадках, коли клітини, які потрібно вилікувати, втратили функцію певного гена. Тоді в клітину, що страждає від втрати функції, потрібно доставити ген, здатний забезпечити її. Часто хвороба, навпаки, викликається надлишковою функцією, не властивою нормальній клітині. Це, зокрема, відбувається при інфекціях або пухлинних трансформаціях. Тоді варто сконцентрувати увагу на пригніченні зайвої функції. Ці дві стратегії можна вважати суто генно-терапевтичними: вони спрямовані на корекцію дефекту клітини шляхом її генетичної модифікації. Підходами третього типу є такі, що спрямовані на підсилення імунної відповіді організму на небажані явища. При цьому також здійснюється генетична модифікація або тих клітин, проти яких хочуть збільшити імунну відповідь, або клітин імунної системи, за допомогою котрих хочуть підсилити цей ефект.



Існує кілька способів введення нової генетичної інформації в клітини ссавців. Зазвичай використовують два основні підходи, які різняться природою клітин-мішеней:

1) *фетальна генотерапія* – при якій чужорідну ДНК уводять у зиготу або ембріон на ранній стадії розвитку; при цьому очікується, що введений матеріал потрапить в усі клітини реципієнта, у тому числі – статеві, забезпечивши тим самим передачу наступному поколінню);

2) *соматична генотерапія* – у цьому разі генетичний матеріал уводять тільки в соматичні клітини і він не передається статевим клітинам.

Є й третій підхід – активація власних генів організму з метою повного або часткового подолання дії мутантного гена. Яскравим прикладом такого підходу є використання гідроксисечовини для активації синтезу гемоглобіну F у хворих із серповидноклітинною анемією та таласеміями.

Більшість методів фетальної генотерапії розроблені на трансгенних мишах і вони дають іноді непогані результати. Але низький вихід трансгенних тварин, небезпека ушкодження генів хазяїна при неадресному вбудовуванні чужорідної ДНК, а також зрозумілі етичні проблеми роблять фетальну генотерапію поки що не актуальною.

Щодо соматичної генотерапії, то сьогодні на стадії розробки (а іноді й клінічних випробувань) існує кілька сотень проектів, спрямованих на лікування онкологічних, інфекційних (СНІД, гепатит, туберкульоз) і спадкових захворювань.

Є різні методи введення чужорідної ДНК у клітини-мішені – вибір частково залежить від захворювання. Доставку генетичного матеріалу здійснюють, застосовуючи вектори на основі вірусів (ретровірусів, не здатних до самостійної реплікації, аденовірусів, герпесвірусів тощо) або за допомогою безвекторних систем, зокрема ліпосом. Існує два підходи соматичної генотерапії. Перший – генна терапія *ex vivo*: спочатку генетичний матеріал уводять у клітини, які вирощують у культурі, а потім трансгенні клітини вводять реципієнтові. Другий – генна терапія *in vivo*: вектор, що несе потрібний ген, уводять безпосередньо в організм реципієнта. Перший підхід особливо ефективний, якщо для доставки використовують стовбурові кровотворні та інші клітини, які вдається виростити в культурі у великих кількостях.

До 80 % усіх сучасних розробок генної терапії припадають на пухлинні захворювання. Як найбільш перспективні сьогодні розглядають такі напрямки боротьби з онкологічними захворюваннями: 1) збільшення імуногенності пухлинних клітин, наприклад, шляхом введення генів, що кодують чужорідний для цих клітин антиген;

2) уведення в пухлинні клітини "генів-убивць", які запускають програму загибелі або відповідають за синтез продукту, що приводить у певних умовах до загибелі пухлинних клітин; 3) блокування експресії онкогенів шляхом, скажімо, уведення в клітини конструкцій, які кодують синтез антизмистовних РНК або антитіл до онкобілків; 4) захист стовбурових клітин від токсичних ефектів хіміотерапії шляхом уведення в них генів стійкості до ліків.

Особливе місце посідають розробки, спрямовані на боротьбу зі СНІДом. СНІД – незвичайне інфекційне захворювання, оскільки в цьому випадку генетичний матеріал збудника потрапляє в геном і залишається там до кінця існування клітини. Сьогодні використовують два головні підходи для генотерапії СНІДу: внутрішньоклітинну імунізацію та підвищення імунності проти вірусу з використанням генетично модифікованих клітин. Термін "внутрішньоклітинна імунізація" означає процес створення клітин, здатних продукувати внутрішньоклітинні антитіла проти збудника після введення в клітину відповідної генетичної інформації. Внутрішньоклітинні антитіла відкривають унікальний засіб впливу зсередини клітини на будь-які внутрішньоклітинні об'єкти – білки, цукри або нуклеїнові кислоти.

Для багатьох інфекційних збудників показано, що існують певні лінії їхніх клітин-хазяїв, які не інфікуються або не підтримують реплікацію даного збудника. Так, у 10 % представників європеїдної раси є мутантний вірусний корецептор СКР5 і гомозиготні за відповідним геном індивідууми не інфікуються ВІЛ-1. Запропоновано декілька варіантів використання цих даних для боротьби з інфекцією: запобігання інфекції шляхом блокування рецепторів, пригнічення експресії корецептора або його спрямована делеція.

У багатьох випадках захворювання, у тому числі й інфекційні, пов'язані з надлишковим синтезом нормального білка. Для лікування таких патологій розроблено терапевтичні системи з використанням *антизмистовних олігонуклеотидів*. Невеликий олігонуклеотид може гібридизуватися з комплементарною мРНК і знижувати рівень експресії білка, що відповідає за виникнення патології. Аналогічно можуть бути використані дволанцюгові РНК, що діють за механізмом РНК-інтерференції (див. розділ 2), блокуючи синтез білка на рибосомі. На відміну від антизмистовних РНК, дволанцюгові РНК – інструмент багаторазового використання, оскільки ампліфікуються в клітині РНК-залежною РНК-полімеразою.

Нарешті, одним із найважливіших напрямків застосування методів молекулярної генетики в медицині є молекулярна діагностика спадкових захворювань, у тому числі – до народження (пренатальна діагностика). Гени практично всіх спадкових захворювань уже відомі, методи їхнього визначення широко застосовуються в медицині з метою запобігти народженню хворої дитини. Методи молекулярної діагностики дозволяють виявити не тільки гени спадкових (моногенних) захворювань (гемофілія, муковісцидоз, міодистрофія Дюшенна, фенілкетонурія тощо), а й гени схильності до того чи іншого захворювання: хвороб, які розвиваються у старечому віці (хвороба Альцгеймера, рак молочної залози, нейродегенеративні хвороби), і таких, що виникають за дії певних зовнішніх факторів (діабет, атеросклероз, деякі онкологічні захворювання). Молекулярна діагностика дає можливість поставити діагноз задовго до появи симптомів і, відповідно, розпочати профілактику або лікування.

Розвиток методів геноміки дозволить у майбутньому проводити тотальну "генетичну паспортизацію" з метою виявлення індивідуальних ризиків кожної людини. Одним із найважливіших результатів робіт із секвенування геному людини стало суттєве вдосконалення методичних підходів. Нещодавно було здійснено секвенування першого індивідуального геному – геному Джеймса Вотсона, людини, яка стояла на початку молекулярної генетики. Цей геном було встановлено методом піросеквенування за два місяці, що коштувало менше 1 млн доларів (для порівняння: загальне фінансування проекту "Геном людини" з боку американського уряду становило близько 3 млрд доларів за 11 років). Швидкий розвиток сучасних технологій геноміки робить секвенування індивідуальних геномів кожної людини реальністю у близькому майбутньому.

### *Контрольні запитання і завдання*

1. Укажіть основні ферменти, які використовують у генній інженерії.
2. Що таке рестриктази та як вони використовуються в рекомбінантних технологіях?
3. У чому полягає процес клонування ДНК? Яким вимогам має відповідати плазмідний вектор для клонування і чому?
4. Що таке геномна бібліотека? Як створюються такі бібліотеки?
5. Дайте визначення кДНК. Як створюють бібліотеку клонів кДНК?

6. Що таке гібридизація? Як здійснюється гібридизація ДНК на нітроцелюлозних фільтрах?
7. Опишіть основні принципи полімеразної ланцюгової реакції.
8. Як здійснюють секвенування ДНК за Сангером?
9. Опишіть принципову схему експресії рекомбінантних білків у бактеріальних клітинах.
10. Що таке блот-гібридизація? Яка різниця між Саузерн- і нозерн-блотингом?
11. Як здійснюють фінгерпринтинг ДНК?
12. Як аналізують активність геному за допомогою ДНК-мікроареїв?
13. Назвіть продукти, які можна отримувати за допомогою генетично змінених мікроорганізмів.
14. Які методи використовуються для трансформації рослин?
15. Що таке репортерні гени? Як саме вони використовуються при трансформації рослинних клітин?
16. Назвіть основні напрямки використання генетично модифікованих рослин?
17. Як отримують трансгенних тварин?
18. Назвіть способи введення нової генетичної інформації в клітини ссавців?
19. Сформулюйте принципи лікування захворювань за допомогою генної терапії?

# КЛЮЧОВІ ЕТАПИ РОЗВИТКУ ГЕНЕТИКИ

<b>Рік</b>	<b>Подія</b>
1865	– Мендель (Gregor (Johann) Mendel) надрукував статтю "Досліди над рослинними гібридами", де сформулював принципи гібридологічного аналізу й базові закономірності передачі дискретних спадкових факторів у поколіннях. Робота залишилася неоціненою сучасниками.
1869	– Мішер (Frederick Miescher) уперше отримав ДНК.
1882	– Флемінг (Walter Flemming) описав мітоз і мейоз у тварин і поведінку хромосом у цих процесах.
1889	– Бовері (Theodor Boveri) довів роль клітинного ядра у спадковості.
1900	– Корренс, фон Чермак, де Фріз (Carl Correns, Erich von Tschermak, Hugo de Vries) заново встановили менделівські принципи спадкування.
1902	– Саттон (Walter Sutton) запропонував хромосомну теорію спадковості, базуючись на паралелізмі передачі менделівських спадкових факторів і хромосом при мейозі.
1903	– де Фріз сформулював першу теорію мутацій.
1906	– Бетсон (William Bateson) запропонував назву "генетика" для науки про механізми спадковості.
1908	– Харді та Вайнберг (Godfrey Hardy, Wilhelm Weinberg) незалежно один від одного сформулювали базовий принцип популяційної генетики.

- 1909 – Йоханнсен (Wilhelm Johannsen) запропонував термін "ген", а також започаткував використання термінів "генотип" і "фенотип".
- 1911 – Морган (Thomas Hunt Morgan) продемонстрував, що гени містяться у хромосомах і формують групу зчеплення; у 1920-х рр. Морганом і його співробітниками Бриджесом, Стертевантом, Меллером (Calvin Bridges, Alfred Sturtevant, Hermann Muller) остаточно сформульовано хромосомну теорію спадковості.
- 1927 – Меллер штучно індукував мутації у дрозофіли за допомогою рентгенівського випромінювання
- 1931 – Крейтон і Мак-Клінток (Harriet Creighton, Barbara McClintock) уперше спостерігали рекомбінацію хромосом кукурудзи під мікроскопом.
- 1935 – Ніколай Тимофеев-Ресовський, Циммер (Karl Zimmer) і Дельбрюк (Max Delbrück), базуючись на залежності кількості мутацій від радіаційної дози, оцінили розмір гена, установивши, що ген – це велика органічна молекула.
- 1930-ті – Райт, Фішер і Холдейн (Sewal Wright, Ronald Fisher, John Haldane) створили генетику популяцій і зробили її теоретичною базою еволюційної біології.
- 1941 – Біда і Тейтум (George Beadle, Edward Tatum), досліджуючи *Neurospora crassa*, установили вплив спадковості на біохімічні процеси та сформулювали принцип "один ген – один фермент".
- 1944 – Ейвери, Мак-Леод і Мак-Карті (Oswald Avery, Colin McLeod, Maclyn McCarty) уперше здійснили трансформацію бактерій і довели роль ДНК як генетичного матеріалу.
- 1944 – Мак-Клінток відкрила існування мобільних елементів у геномі кукурудзи.
- 1950 – Чаргафф (Erwin Chargaff) установив, що кількість аденіну в ДНК дорівнює кількості тиміну, а кількість гуаніну – кількості цитозину (правила Чаргаффа).
- 1952 – Херші та Чейз (Alfred Hershey, Martha Chase) показали, що тільки ДНК бактеріофага є інфікуючим агентом.

- 1953 – Франклін і Уїлкінс (Rosalind Franklin, Maurice Wilkins) отримали ключові рентгенограми фібрил ДНК, які вказували на регулярну спіральну структуру молекули.
- 1953 – Уотсон і Крік (James Watson, Francis Crick), базуючись на рентгенограмах і правилах Чаргаффа, розробили модель структури ДНК і сформулювали принцип комплементарності.
- 1955 – Корнберг (Arthur Kornberg) отримав першу ДНК-полімеразу й дослідив її властивості.
- 1957 – Крік сформулював "центральну догму молекулярної біології".
- 1958 – Мезельсон і Сталь (Matthew Meselson, Franklin Stahl) продемонстрували напівконсервативний механізм реплікації ДНК.
- 1961 – Бреннер, Жакоб (Sydney Brenner, François Jacob) і Мезельсон установили роль мРНК як проміжного переносника інформації при експресії білкових генів.
- 1961 – Жакоб і Моно (Jacques Monod) описали першу систему регуляції транскрипції – у лактозному опероні *E. coli*.
- 1966 – Ніренберг і Корана (Marshall Nirenberg, Gobind Khorana) закінчили розшифрування генетичного коду.
- 1970 – Сміт (Hamilton Smith) відкрив першу рестриктазу.
- 1970 – Темін і Балтімор (Howard Temin, David Baltimore) відкрили зворотну транскриптазу.
- 1972 – Берг (Paul Berg) створив першу рекомбінантну ДНК.
- 1975 – Максам і Гілберт (Allan Maxam, Walter Gilbert) і Сангер (Frederick Sanger) запропонували два методи секвенування ДНК.
- 1976 – Створено першу генноінженерну компанію – Genentech.
- 1977 – Сангер і співавт. встановили послідовність першого геному – бактеріофага φX-174.

- 1977 – У лабораторіях Робертса й Шарпа (Richard Roberts, Phillip Sharp) встановлено мозаїчну будову (наявність інтронів) еукаріотичних генів.
- 1982 – Створено першу загальнодоступну базу даних послідовностей ДНК GenBank.
- 1984 – Джефрі (Alec Jeffreys) розробив молекулярний метод ідентифікації особин – фінгерпринтинг ДНК.
- 1985 – Мелліс (Kary Mullis) розробив революційний молекулярно-генетичний метод – полімеразну ланцюгову реакцію.
- 1990 – Започатковано роботи з встановлення геному людини.
- 1995 – Встановлено послідовність перших прокаріотичних геномів – бактерій *Haemophilus influenzae* та *Mycoplasma genitalium*.
- 1996 – Встановлено послідовність першого еукаріотичного геному – дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2001 – Встановлено послідовність геному людини.
- 2007 – Протягом двох місяців встановлено послідовність двох перших індивідуальних геномів – Джеймса Уотсона та Крейга Вентера (J. Craig Venter).



# РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

## Основна

- Айала Ф., Кайгер Дж.* Современная генетика : в 3 т. – М. : Мир, 1988.
- Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. – М. : Академкнига, 2003.
- Бочков Н.П.* Клиническая генетика – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2002.
- Гершензон С. М.* Мутации. – Киев : Наук. думка, 1991.
- Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М. : Мир, 2002.
- Кайданов Л.З.* Генетика популяций. – М. : Высш. шк., 1996.
- Меттлер Л., Грегг Т.* Генетика популяций и эволюция. – М. : Мир, 1972.
- Пташне М.* Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг  $\lambda$ . – М. : Мир, 1988.
- Сингер М., Берг П.* Гены и геномы : в 2 т. – М. : Мир, 1998.
- Солбриг О., Солбриг Д.* Популяционная биология и эволюция. – М. : Мир, 1982.
- Тоцький В.М.* Генетика. – Одеса : Астропринт, 2002.
- Фогель Ф. Мотульски А.* Генетика человека : в 3 т. – М. : Мир, 1989.
- Хедрик Ф.* Генетика популяций. – М. : Техносфера, 2003.
- Brooker R.J.* Genetics: analysis and principles. – Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1999.
- Brown T.A.* Genomes. – New York ; London : Garland Science, 2002.
- Fairbanks D.J., Andersen W.R.* Genetics: the continuity of life. – Pacific Grove, CA : Brooks/Cole Publishing Company, 1999.

*Friedberg E., Walker G., Siede W.* DNA repair and mutagenesis. – Washington, DC : ASM Press, 1995.

*Lewin B.* Genes VIII. – Upper Saddle River, New Jersey : Pearson Prentice Hall, 2004.

*Lodish H., Berk A., Zipursky L.S. et al.* Molecular cell biology. – New York : W.H. Freeman and Company, 2000.

*Snustad D.P., Simmons M.J.* Principles of genetics. – New York : John Wiley and Sons, 2000.

## Додаткова

*Айала Ф.* Введение в популяционную и эволюционную генетику. – М. : Мир, 1984.

*Бочков Н.П., Чеботарев А. Н.* Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М. : Медицина, 1989.

*Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – М. : Мир, 1987.

*Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А.* Основы биотехнологии. – М. : Academia, 2003.

*Кимура М.* Молекулярная эволюция: теория нейтральности. – М. : Мир, 1985.

*Ли Ч.* Введение в популяционную генетику. – М. : Мир, 1978.

*Майр Э.* Популяции, виды и эволюция. – М. : Мир, 1974.

*Сьяксте Т.Г., Сьяксте Н.И.* Химические соединения, повреждающие ДНК. – Рига : Зинатне, 1991.

*Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art /ed. J. Zlatanova, S.H. Leuba.* – Amsterdam : Elsevier, 2004.

*Eisen J.A, Coyne R.S., Wu M. et al.* Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote // PLoS Biology. – 2006. – Vol. 4, № 9 (e286 doi:10.1371/journal.pbio.0040286).

The ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1 % of the human genome by the ENCODE pilot project // Nature. – 2007. – Vol. 447. – P. 799–816.

*Gerstein M.B., Bruce C., Rozowsky J.S. et al.* What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition // *Genome Res.* – 2007. – Vol. 17. – P. 669-681.

*Grindley N.G.F., Leschziner A.E.* DNA transposition: from a black box to a color monitor // *Cell.* – 1995. – Vol. 83. – P. 1063-1066.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome // *Nature.* – 2004. – Vol. 431. – P. 931-945.

*Koonin E.V.* How many genes can make a cell: the minimal-gene-set concept // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2000. – Vol. 1. – P. 99-116.

*Kornberg A., Baker T.A.* DNA replication. – New York : W.H. Freeman and Company, 1992.

*Manica A., Amos W., Balloux F., Hanihara T.* The effect of ancient population bottlenecks on human phenotypic variation // *Nature.* – 2007. – Vol. 448. – P. 346-348.

*Maison C., Almouzni G.* HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance // *Nature Rev.* – 2004. – Vol. 5. – P. 296-304.

*Matlin A.J., Clark F., Smith C.W.J.* Understanding alternative splicing: towards a cellular code // *Nature Rev.* – 2005. – Vol. 6. – P. 386-398.

*Matzke M.A., Birchler J.A.* RNAi-mediated pathways in the nucleus // *Nature Rev.* – 2004. – Vol. 6. – P. 24-35.

*Mikkelsen T.S., Wakefield M.J., Aken B. et al.* Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences // *Nature.* – 2007. – Vol. 447. – P. 167-177.

*Obe J., Pfeiffer P., Savage J.R.K., et al.* Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution // *Mutation Research.* – 2002. – Vol. 504. – P. 17-36.

*Orphanides G., Reinberg D.* A unified theory of gene expression // *Cell.* – 2002. – Vol. 108. – P. 439-451.

*Pearson H.* Genetics: what is a gene? // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – P. 398-401.

*Putnam N.H., Srivastava M., Hellsten U. et al.* Sea anemone genome reveals ancestral Eumetazoan gene repertoire and genomic organization. // *Science.* – 2007. – Vol. 317. – P. 86-94.

*Ramakrishnan V.* Ribosome structure and the mechanism of translation // *Cell.* – 2002. – Vol. 108. – P. 557-572.

*Richards E.J., Elgin S.C.R.* Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects // *Cell*. – 2002. – Vol. 108. – P. 489–500.

*Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual. – Cold Spring Harbor ; New York : CSHL Press, 2001.

*West S.F.* Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombinations // *Annu. Rev. Biochem.* – 1992. – Vol. 61. – P. 603–640.

*Wolfsberg T.G., Wetterstrand K.A., Guyer M.S. et al.* A user's guide to the human genome // *Nature Genetics Supplement*. – 2002. – Vol. 32. – P. 4–79.

*Wu H.-L., Bagby S., van den Elsen J.M.H.* Evolution of the genetic triplet code via two types of doublet codons // *J. Mol. Evol.* – 2005. – Vol. 61. – P. 54–64.

# ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

**Азотисті основи** 10  
Алель 26, 50-51, 90  
Анеуплоїдія 130, 136  
Антикодон 57-59  
Антитермінація 67  
Апоптоз 209-211  
АП-сайт 36, 132  
Атенюація 69-70  
Ацетилювання гістонів 24, 79-81  
Аутбридинг 253  
Аутосоми 26, 113, 195

**Бактеріофаги** 150-152  
– λ 152-156, 276-277  
Бібліотека клонів 277-278  
Біваленти 48-49  
Блот-гібридизація  
– нозерн 284  
– Саузерн 282-283

**Вектор** 274-277  
Відкрита рамка зчитування 57  
Віруси 140, 150, 157-159, 241

- Гамети 26, 48-51
  - Гаплоїдія 130
  - Гаплоїдний набір хромосом 26, 49
  - Генетична Єва 245
  - Генетична лінія 91
  - Генетичний Адам 245
  - Генетичний код 54-56
  - Гени
    - домашнього господарства 168
    - гомеозисні 206-207
    - з материнським ефектом 202
    - полярності яйця 203-204, 206
    - сегментації 204
  - Геном 19-20
  - Геномна бібліотека 277-278
  - Генотип 18, 89
  - Гетерозигота 51
  - Гетерозиготність 251-252, 260, 262
  - Гетеродуплекс 43
  - Гетерохроматин 25, 180-185
  - Гібрид 90
  - Гібридизація нуклеїнових кислот 278-279, 282-284
  - Гібридний дисгенез 173-174
  - Гістони 16, 23-24
  - Гістоновий код 24
  - Гомозигота 51
- 
- Дезоксирибоза** 9-11
  - Делеція 123, 126-128
  - Диплоїдний набір хромосом 26, 48-49
  - Дискордантність 227
  - ДНК-полімераза 30-33
  - Домінантний(а) ген (ознака) 51, 91-93
  - Домінування
    - неповне 93-94
    - повне 93
  - Дрейф генів 257-260

Дуплікація 123, 126-128

Дуплекс 12

**Екзон** 20-21

Експресивність 100, 143

Енхансер 72

Епістаз 104

– домінантний 104

– рецесивний 105

**Зворотна транскрипція** 158-159, 171-172

Зигота 49

**Імпринтинг** 100, 239

Інбридинг 194, 253, 260-262

Інверсія 127, 129, 175

Інсерція 126, 129, 138, 152

Інтерференція (між сусідніми хромосомними локусами) 120-121

Інтрон 20-21, 74-75

**Каріотип** 29

кДНК 216, 274, 278

Кеп 74-75

Клітинний цикл 47

Кленова фрагмент 273, 275

Клонування ДНК 274, 276-277

Кодомінування 94-95

Кодон 54-56

Комплементарність (азотистих основ) 12-13

Комплементарність (неалельних генів) 101-104, 106

Конверсія гена 46, 122

Конкордантність 227-228

Кон'югація 116, 147-148

Косміда 277

Кросинговер 46, 115-118  
– мітотичний 123-124  
– нерівний 123  
– подвійний 118-120

Лігаза 32, 273

**М**аленька ядерна РНК 74

Мейоз 48-49

Менделя закони

- перший 92
- другий 92
- третій 96

Метилювання

- ДНК 39, 151, 168, 182-183
- гістонів 24, 180-182

Метод

- близнюків 227-229
- родоводів 220-222, 224-225

Мінісателіти 170, 283

Мінливість

- кількісних ознак 109-111
- комбінативна 126
- модифікаційна 142-144
- мутаційна 125, 131-142
- неспадкова 125
- спадкова 125

Мікро-РНК 82

Мікросателіти 134-135, 170

Місметч 38, 133

Мітоз 47-48

Мобільні елементи 22, 85, 146, 170-175

мРНК 18, 53, 61, 76

Мутагенез 131

Мутагени 131, 137-140

Мутації 35, 126

- генеративні 126



- геномні 130-131
- міссенс 126
- нонсенс 126
- синонімічні 126
- точкові 126-127
- хромосомні 127-130

**Норма реакції** 100  
Нуклеаза 31-32, 272  
Нуклеозид 11  
Нуклеосома 23-24  
Нуклеотид 9-10

**Ознака** 90

- голандрична 198, 224
- залежна від статі 199
- зчеплена зі статтю 113-115, 198-199
- кількісна 106-111, 226, 251
- обмежена статтю 199
- статева 191-192
- якісна 108

Оказакі фрагменти 30-32  
Оперон 66-70  
Ориджин 30-31

**Панміксія** 252  
Піримідини 10-11  
Пенетрантність 100, 142  
Пентоза 9-11  
Плазміда 146, 274-275  
Плейотропія 100  
ПАР 280  
Поіаденілування мРНК 75-76  
Полімерія 106

- некумулятивна 106
- кумулятивна 107

- Поліморфність 251  
Поліплоїдія 29, 130, 136-137  
Подвійна спіраль 12-15  
Популяція, 247  
– генетична структура 253-256  
– мінливість 251-252  
– чисельність 248-250  
Послідовність  
– Козак 76  
– Шайна – Дальгарно 66  
Промотор 63, 65, 71-73  
Протеом 53, 168  
Процесинг 60, 71, 74-76  
Псевдоген 22, 169  
Пурини 10
- Рекомбінантна ДНК 274-275**  
Рекомбінація  
– гомологічна 42-46  
– імуноглобулінових генів 177-179  
– незаконна 46  
– сайт-специфічна 46, 152-153  
Ремодельовання хроматину 79-81  
Репарація  
– дволанцюгових розривів 41  
– ексцизійна 36-38  
– місметчів 38-39  
– пряма 35-36  
Реплікація 18, 29-35  
Реплікон 31  
Рестриктаза 151, 271-272  
Ретровіруси 158-159  
Ретропозони 171  
Рецесивний(а) ген (ознака) 51, 90-92  
Рибоза 9-11  
Рибосома 57, 59-61  
РНК-інтерференція 82, 183-184

РНК-полімераза 62-64, 71  
рРНК 18, 59-60

**Сайленсер** 72

Сантиморган 117

Секвенування ДНК 281-282

Спадкування

- епігенетичне 100, 180-185
- зчеплене зі статтю 113-115, 198-199
- цитоплазматичне 190-191

Сплайсинг 20-21, 74-75

- альтернативний 21, 82-84

Стать

- гетерогаметна 113, 195
- гомогаметна 113, 195

Стать, механізми визначення

- алельний 193-194
- епігамний 192-193
- сингамний 192-193
- прогамний 192
- хромосомний 194-198

Стекінг-взаємодії 14

Структура Холідея 43-45

Схрещування

- аналізуюче 93
- дигібридне 95
- моногібридне 91-93
- полігібридне 95-96
- реципрокне 114

**Тандемні повтори** 22, 34, 59, 134-135, 170

Таутомерія 133-134

Теломераза 33-34

Теломери 20, 28, 33-34

Транзиція 126

Трансверсія 126-127

Трансгенні організми 289, 293

Трансдукція 150  
– сигнальна 79  
Транс-елемент 66  
Транскрипт 20, 53  
Транскриптом 53  
Транспозони 146, 170-171  
Транс-сплайсинг 84  
Трансформація ДНК 275-276  
тРНК 18, 57-59

**Ф**енокопія 143  
Фенотип 90  
Фенотиповий радикал 92  
Фінгерпринтинг ДНК 220, 283  
Фосфодіефірний зв'язок 11-12

**Ж**арді – Вайнберга закон 255  
Хіазми 49  
Хроматинова фібрила 24-25  
Хромосоми 22, 26-29  
– акроцентричні 28  
– диференційне забарвлення 128, 218  
– метацентричні 28  
– мітотичні 26-27  
– політенні 29  
– статеві 26, 113, 194-195  
– субметацентричні 28

**Ц**ентральна догма молекулярної біології 17  
Центромери 20, 27-28, 180-181  
*Цис*-елемент 66  
Цукрофосфатний остов 11-12

**Я**дерний матрикс 25

Alu-повтор 172  
CpG-острівці 168  
DPE 72  
F-фактор 147-148  
HAT 79-80  
HD 180  
HP1 180-181  
LINE 171-172  
LTR-ретропозони 171  
MAR 25  
SINE 172  
TATA-бокс 72  
 $\chi^2$ -критерій 97-99

**Навчальне видання**

**СИВОЛОБ** Андрій Володимирович  
**РУШКОВСЬКИЙ** Станіслав Ричардович  
**КИР'ЯЧЕНКО** Сергій Сергійович  
**АФАНАСЬЄВА** Катерина Сергіївна  
**БЕЗРУКОВ** Володимир Федорович  
**КОЗЕРЕЦЬКА** Ірина Анатоліївна  
**ДЕМИДОВ** Сергій Вікторович

# ГЕНЕТИКА

Підручник

Редактор *В.Р. Філь*

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"  
Виконавець *К.Г. Степаненко*



Підписано до друку 29.12.08. Формат 70x100<sup>1/16</sup>. Вид. № 18. Гарнітура Bookman Old Style. Папір офсетний.  
Друк офсетний. Наклад 200. Ум. друк. арк. 25,8. Обл.-вид. арк. 23,0. Зам. № 28-4686

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"  
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43  
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28  
Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02