

# ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ, БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ ТВАРИН

## PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL AND BIOTECHNOLOGICAL WAYS OF ANIMAL PRODUCTIVITY INCREASING

УДК 575.113.1:577.113.4

Вигнан Д.С.<sup>1</sup>, к.б.н., доцент (dmvygnan@yahoo.com) ©

Оліярник О.Д.<sup>2</sup>, к.б.н. (ooliyarnuk@yahoo.com)

<sup>1</sup>Львівський національний університет ветеринарної медицини та  
біотехнологій імені С.З. Гжицького

<sup>2</sup>Інститут клінічної і експериментальної медицини, Прага, Чеська Республіка.

**ДОСЯГНЕННЯ І ПРОБЛЕМИ ПІСЛЯГЕНОМНОЇ ЕРИ** ( До 60-річчя  
відкриття структури ДНК та 10-річчя завершення геномного проекту).

*В огляді обговорюються літературні дані за результатами проекту  
ENCODE та деякі прблеми функціонування геному і регуляції експресії генів  
некодуючими РНК (нкРНК). Розглядаються можливості використання даних  
по регуляції експресії генів міРНК для діагностики і лікування вірусних,  
онкологічних та інших захворювань,*

**Ключові слова:** геном, експресія генів, міРНК, ДНК

25 квітня 1953 року , день виходу трьох наукових публікацій в журналі  
“Nature” під спільним заголовком “Молекулярна структура нуклеїнових  
кислот,” вважається днем відкриття структури ДНК. У першій із них, під  
авторством Дж. Уотсона і Ф.Кріка “Структура дезоксирибонуклеїнової  
кислоти” поміщена знаменита схема (не модель, як дехто вважає; дослівно -  
this figure is purely diagrammatic ) подвійної спіралі ДНК. В останній із трьох  
публікацій під авторством Розалінди Франклін і Р.Гослінга поміщено не менш  
знамениту фотографію №51- зображення рентгенограми В-форми ДНК(13). До  
60-річного ювілею одержано першу реальну фотографію ДНК.Щоправда, це  
зображення не індивідуальної молекули , а “канату” із 6 молекул, закручених

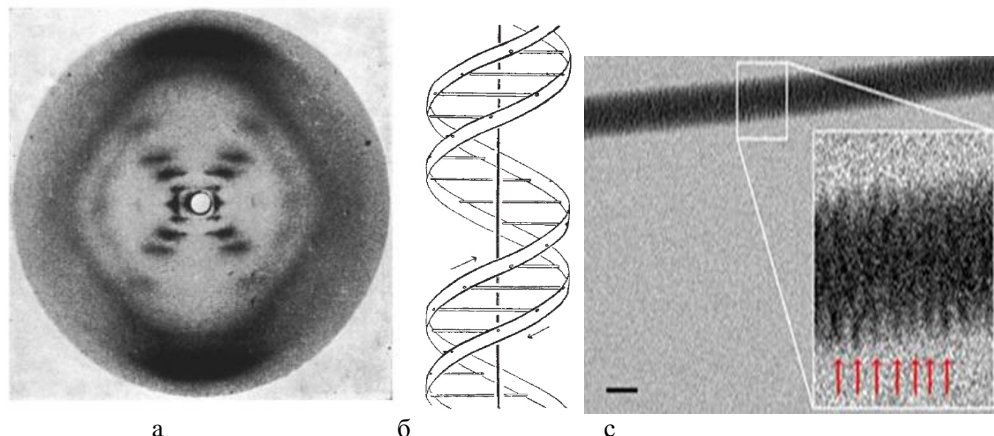
навколо сьомої, проте спіральна структура цього комплексу добре проглядається. Не зважаючи на дискусії на тему “Хто сказав спіраль?” (14), які тривають вже 60 років, важливим є те, що ця подія стала поворотним моментом як у дослідженні нуклеїнових кислот, так і в розвитку всієї біологічної науки.

Ювілейний календар 2013 року містить ще декілька визначних дат, які стали наслідком відкриття структури ДНК.

• **2013 рік.** Ювілейний календар визначних подій у молекулярній біології, які надихнули вчених усього світу:

- 60 років (1953 рік) - відкриття структури ДНК; Д. Уотсон і Ф. Крік.
- 40 років (1973 рік) - перше секвенування фрагмента ДНК; (Ф. Сенгер).
- 30 років (1983 рік) - винайдення ПЛР (К. Мюлліс).
- 20 років (1993 рік) - відкриття міРНК (В. Амброс).
- 10 років (2003 рік) - завершення міжнародного геномного проекту.
- 10 років (2003 рік) - початок виконання міжнародного проекту ENCODE.

Кожне десятиліття ставало вирішальним кроком до кінцевої мети – розшифрування генетичного коду, встановлення послідовності нуклеотидів всього геному і з'ясування структури генів, яка була досягнута до 50-річчя ДНК разом із завершенням геномного проекту.



**Мал.1.** Від схеми до реального фото подвійної спіралі. ( За “Nature” 171,737-741,1953, *Nano Letters*, 12 (12), pp 6453–6458,2012.)

а- рентгенограма В-форми ДНК Розалінд Франклін;

б-схема подвійної спіралі ДНК Уотсона-Кріка;

с -фотографія препарату ДНК під електронним мікроскопом Енцо ді Фабріціо.

Як виявилось, геном людини, ця сукупність усієї спадкової інформації, містить зовсім не одні тільки гени, тобто ділянки ДНК, які кодують білки. Значно більшу частину його становлять некодуючі послідовності дезоксирибонуклеотидів. У розрахованому сумарному розмірі геному людини

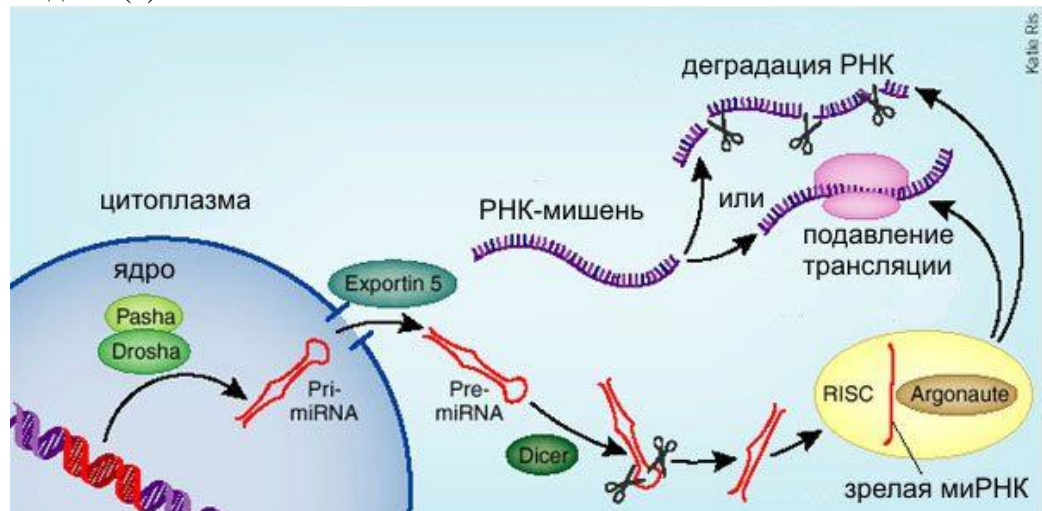
більше половини ДНК займають різні види повторюваних та мобільних елементів (транспозони, ретротранспозони), а в другій половині 75% складають міжгенні ділянки, 24% –інтрони і тільки 1,1% екзони (12). Коли у 1990-х роках йшла робота над міжнародним проектом “Геном людини”, основна увага, звичайно, була приділена саме кодуєчим генам. Замість очікуваних більше ніж 100 000 генів в кінцевому підсумку їх виявилось біля 21000. На здивування вчених, із 3 млрд. основ ДНК тільки 3% їх складають основу кодуєчого геному. Решта – міліарди основ ДНК здавалося взагалі непотрібними. Виник ледве не образливий термін смітєва ДНК (junk DNA – англ.), який у 1972 році, ще задовго до розшифрування геному, запропонував Сусумі Оно (Susumu Ohno) (1) для обґрунтування теорії нейтральної еволюції. На думку деяких вчених обширні ділянки ДНК між генами, що кодуєть білки (екзонами), є марними, і єдиною функцією яких є розділення генів у хромосомі. Відносно біологічної ролі некодуєчої частини геному були різні припущення. По-перше, вона може кодувати ядерцеві, рибосомальні і транспортні РНК, приймати участь у регуляції експресії генів, упаковці ДНК у хромосоми, і навіть у пониженні небезпеки мутацій, які з більшою вірогідністю можуть відбуватися у некодуєчих ділянках ДНК.

З метою з'ясування функціональної організації та регуляції геному у 2003 році стартував масштабний міжнародний проект – “Енциклопедія елементів ДНК” (Encyclopedia of DNA elements (ENCODE)). В рамках роботи по проекту понад 400 науковців із 35 інститутів різних країн світу проводять секвенування геномів 147 типів клітин людини із застосуванням найновіших технологій секвенування NGS (Next generation sequence), комп'ютерний аналіз послідовностей ДНК, інші генетичні та біохімічні експерименти. Кінцевою масштабною метою є встановлення конкретної ролі кожної із 3 млрд. основ, що знаходяться у геномі і складення повноцінної карти людського геному. За підсумками першого етапу роботи по проекту ENCODE у вересні 2012 року опубліковано 30 наукових робіт (в т.ч. у “Nature” і “Science”), які поховали ідею смітєвої ДНК (2,3). Як виявилось 80 % геному активні і виконують важливі біохімічні функції. Крім кодування структури білків (власне генів), це сайти зв'язування регуляторних білків, які впливають на активність генів, місця хімічної модифікації генів, тощо. Було виявлено 11224 фрагменти псевдогенів (генів, які зовсім не проявляють активність). Найбільшим сюрпризом виявилось те, що 93% основ кодуєть багаточисленні молекули РНК. Більшість з яких транскрибується в так звані короткі (19-28 нуклеотидів) і довгі (понад 200 нуклеотидів) некодуєчі РНК (нкРНК, ncRNA), small noncoding RNA (snRNA), long noncoding RNA (lncRNA). На даний час було ідентифіковано біля 10000 lncRNA та 9000 snRNA і кількість їх продовжує стрімко зростати. Це навіть створює певні інформаційні проблеми, що змусило спеціальний комітет по РНК посилити методичні вимоги до публікацій на дану тему. Разом з відкриттям, що ncRNA у геномі несподівано багаточисленні, зростає і кількість молекулярних, генетичних, медичних і інших даних, які показують важливість і різноманітність регуляторних ролей ncRNA як у клітинах прокаріот, так і в

еукаріот. Не виключено, що деякі частини геному з малою специфічністю послідовностей не впливають на геномну регуляцію, а складають немовби кістяк, на який опирається трьохвимірний “хмарочос” геному. По мірі того, як все більша частина геному виявляється функціональною, ускладнюються наші знання і уявлення щодо механізмів регуляції його активності. З відкриттям нкРНК потужний поштовх одержали дослідження механізмів епігенетичної регуляції клітинної диференціації, онтогенезу, тобто процесів, які не обумовлюються безпосередньо специфічністю послідовностей ДНК у геномі, але можуть якимось чином передаватись спадково.

Одним із примітних прикладів епігенетичної регуляції експресії генів за допомогою РНК, відкритий дещо раніше, є інактивація однієї з Х-хромосом 23-ої пари організмів жіночої статі з метою урівноваження її генетичного матеріалу із чоловічою Y-хромосоною (механізм дозової компенсації гена). Даний механізм здійснюється шляхом посиленої експресії гена *Xist* на ранніх етапах ембріогенезу. Транскрипт гену, некодуюча lncRNA *Xist* RNA специфічно покриває Х-хромосому на протязі клітинного циклу. Це призводить до багаточисленних модифікацій гістонів, які сприяють становленню і підтриманню транскрипційно неактивного гетерохроматину.

Значним кроком на шляху епігенетичної регуляції було відкриття регуляції експресії генів за допомогою РНК-інтерференції, в механізмі якої задіяні мікро РНК (міРНК, miRNA) довжиною 19-22 нуклеотиди. РНК-інтерференція – специфічний і ефективний процес припинення експресії генів за допомогою коротких дволанцюгових міРНК. Відкритий спочатку у рослин, цей механізм виявився розповсюдженим і в інших еукаріот в т.ч. тварин і людини (9)



Мал.2 Біогенез міРНК і регуляція роботи генів за допомогою міРНК (пояснення в тексті).

Pri-miRNA ,Pre miRNA – двох ланцюгові попередники міРНК

Pasha, Drosha, Exportin-5, Dicer, Argonaute – білки і ферментні комплекси, які приймають участь у біогенезі міРНК і регуляції роботи генів за механізмом РНК-сайленсінгу (RNA-silencing). Мал. із сайту elementy.ru по [www.nature.com](http://www.nature.com)

Процес біогенезу таких міРНК розпочинається біосинтезом первинного транскрипту РНК на матриці ДНК, частина якого складається в подвійний ланцюг згідно з правилом комплементарності, утворюючи петлю. Гени цих транскриптів знаходяться переважно у некодуючій частині геному, хоча можуть бути і в кодуючих ділянках. Із первинного транскрипту за допомогою ферментного комплексу **Drosha** вирізається двохланцюговий фрагмент пре-міРНК довжиною 70 нуклеотидів, що має структуру петлі. Основними компонентами цього комплексу є рибонуклеаза (РНК-аза III) і білок **Pasha**, який зв'язує двохланцюгову РНК. Пре-міРНК переноситься із ядра в цитоплазму за допомогою білка **Exportin**, де рибонуклеаза **Dicer** розрізає її на двохланцюгові фрагменти довжиною 20-25 нуклеотидів. Далі двохланцюгова міРНК зв'язується з мультиферментним комплексом RISC (*RNA-induced silencing complex*), каталітичним компонентом якого є білок **Argonaute**. Один із ланцюгів вбудовується в RISC-комплекс, а інший негайно руйнується. Активованний комплекс RISC з'єднується з нетранслюючою ділянкою мРНК, яка є транскриптом гена, що кодує певний білок. Внаслідок цього, готова до трансляції мРНК руйнується, і білок не синтезується. Кінцевим результатом є те, що відповідний ген хоч і транскрибується, проте біосинтез білку не відбувається, ген – мовчить (*silencing* (англ.) – мовчання). Тому даний процес ще називають РНК-сайленсінгом. Складні і унікальні ферментні комплекси, задіяні в процесі РНК-інтерференції і працюють синхронно, називають молекулярними машинами (*machines for RNAi*).

Інактивація генів може здійснюватись як на посттранскрипційному (деградація комплементарної мРНК, або гальмування її трансляції), так і на транскрипційному рівнях (метилування ДНК по CpG-парах, утворення неактивного гетерохроматину, видалення ділянок ДНК). Явище РНК-інтерференції лягло в основу методичного підходу функціональної геноміки, що дозволяє вибірково включати чи виключати гени із відомою нуклеотидною послідовністю, виявляючи їх біологічні функції. Більше того, специфічність РНК-інтерференції і відносна стабільність міРНК у біологічних рідинах створює можливості використання даного процесу в діагностиці і терапії різних генетичних і вірусних захворювань, включаючи рак, діабет, нейродегенеративні і серцеві захворювання. Розглядаються можливості використання синтетичних міРНК і розробляються методи їх транспорту в клітини за допомогою нанотехнологій (5,6,7,8,11).

Із досліджень останніх 10-15 років стало зрозумілим, що некодуючі РНК (ncRNA) являють собою величезний регуляторний потенціал, зокрема, у регуляції генної експресії, диференціації клітин, онтогенезі, тощо. В ході проекту ENCODE було виявлено біля 4 млн. сайтів – регуляторів генної активності, які можуть діяти окремо, або в різних комбінаціях по-різному у різних клітинах усіх

організмів. Існує теоретична можливість існування  $10^{23}$  послідовностей РНК довжиною 22 нуклеотиди, які в рамках біологічної специфічності можуть взаємодіяти з РНК чи ДНК. Бази даних, які постійно оновлюються, вже містять тисячі секвенованих молекул нкРНК. Регуляція в геномі виявляється ледве не більш важливою і складною, ніж самі гени.

Стає все більш очевидним, що немає жодного фізіологічного чи патологічного процесу, в якому не задіяні механізми регуляції з допомогою нкРНК. З цих позицій набувають не меншої ваги проблеми довкілля (4) чи генетично модифікованих організмів. В зв'язку із цим, важко передбачити в майбутньому наслідки тих чи інших втручань в функціонування геному. З одного боку це надії і сподівання на ефективну діагностику і лікування усіх без винятку захворювань, де відбуваються значні зміни в експресії міРНК. Нещодавно (11) одержано повідомлення про застосування у клініці першого лікарського препарату, створеного на основі miR-122 для лікування гепатиту С (HCV)- міравірсену (miravirsen). Проводяться інтенсивні дослідження ряду міРНК при онкологічних захворюваннях (miR-27A), діабеті ( miR-375, miR-124), хворобах серця ( miR-208 ), які задіяні в патогенезі хвороб і можуть бути використані для терапії та служити діагностичними біомаркерами (5,6,7,8). Певні надії покладають на можливість корекції негативних наслідків при генетично обумовлених нейродегенеративних розладах, зокрема, синдрому Дауна і Ретта, в розвитку яких безпосередньо задіяні механізми РНК-інтерференції (15).

З іншого боку не можна ігнорувати приховані небезпеки незворотних функціональних порушень у геномі під впливом ксенобіотиків (4) і продуктів з ГМО, які до того ж можуть успадковуватись. Всі основні групи ксенобіотиків, такі як важкі метали, гербіциди, діоксини, бісфеноли, компоненти ракетного палива, виявляють потужний вплив на експресію генів., що в окремих випадках проявляється навіть клінічно (діоксини). Недавно китайські дослідники з університету Нанкіна знайшли мікроРНК (miR-168a) рису в крові та органах людей, що може розглядатися як засвоєння рослинних міРНК через органи травлення (10). До того ж виявилось, що miR-168a негативно впливає на синтез білка, який приймає участь у виведенні ліпопротеїнів низької густини (LDL) у мишей. Це свідчить про те, що екзогенні рослинні міРНК регулюють експресію генів у ссавців і трансгенні міРНК з ГМО рослини можуть негативно впливати на експресію генів у людей і тварин.

#### Література

1. Ohno, S. So much "Junk" DNA in our genome. Evolution of genetic systems// Brookhaven Symposia In Biology (Ed. Smith, H.H.) -1972-V.23-P.366-370.
2. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. The ENCODE Project Consortium// Nature-2012-V.489- P.57-75.
3. Pennisi, E. Encode Project writes eulogy for junk DNA// Science-2012-V.337-P.1159-1161.

4. Lifang Hou, Don Wang, Andrea Baccarelli. Environmental chemicals and micro RNAs// Mutat Res.- 2011-V.714-P. 105-112. (Autor manuscript, available in PMC 2013, August 09).
5. Seung-Yoon Park, Hyo-Jin Jeong, Won-Mo Yang, Wan Lee. Implications of microRNAs in the pathogenesis of diabetes// Arch. Pharm. Res.- 2013-V.36 -P. 154-166.
6. Kseniya Gavrilov, W. Mark Saltzman. Therapeutic siRNA: principles, challenges and strategies// Yale J. Biol. Med.-2012.- V.85(2)-P.-187-200.
7. Jing Chen, Jianping Xie Progress on RNAi-based molecular medicines// International Journal of Nanomedicine-2012.-V.7-P. 3971-3980.
8. T.A. Farazi, J.I. Hoell, P. Morozov, T. Tuschl. MicroRNAs in Human Cancer// Adv. Exp. Med. Biol.- 2013-V.774-P.1-20.
9. Yukihide Tomari, Phillip D. Zamore. Perspective: machines for RNAi // Genes & Development-2005. -V.19-P. 517-529.
10. Lin Zhang<sup>1</sup>, Dongxia Hou<sup>1</sup> et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA// Cell Research -2012- V.22-P.107-126.
11. Harry L.A. Janssen, Hendrik W. Reesink et al. Treatment of HCV Infection by targeting microRNA// New Engl. J. Med.- 2013 -V.368(18)- P.1685-1694.
12. Свердлов Е.Д. Великое открытие: революция, канонизация, догмы и ересь// Вестник РАН- 2003-Т. 73, №6-С.496-513..
13. Watson J.D., Crick F.H.C. A structure for deoxyribose nucleic acid// Nature-1953-V.171-P.737-738., Franklin R., Gosling R.G. Molecular configuration in sodium thymonucleate// Nature-1953-V.171-P.740-741.
14. Watson Fuller. Who said "helix"?// Nature-2003-V.424-P.876-878.
15. Szulwach KE, Jin P, Alisch R.S Noncoding RNAs in mental retardation// Clinical Genetics- 2009 -V.75, № 3-P.209-219..

..

### Summary

Vyhnan D.S<sup>1</sup>. Oliyarnyk Olena, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj, Lviv, Ukraine.

<sup>2</sup>Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

### ACHIEVEMENTS AND PROBLEMS OF THE POSTGENOMIC PERIOD

(For the 60th anniversary of DNA structure discovery and for the 10th anniversary of the genomic project completion).

*In this review are discussed the literature data about of the ENCODE project results, several problems of genome function and regulation of gene expression by non-coding RNAs (ncRNA).*

*Possibilities of using knowledge about the regulation of gene expression by miRNA for the diagnosis and treatment of viral, cancer and other diseases are considered.*

Рецензент – д.б.н., професор Калачнюк Г.І.