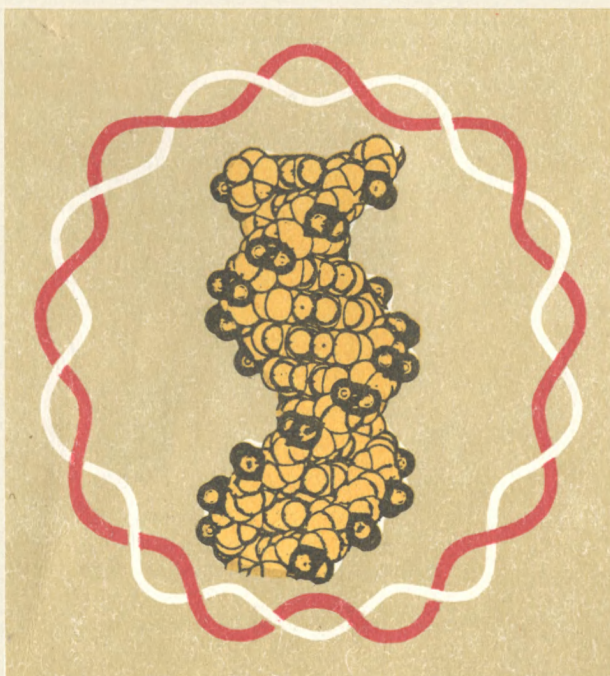




БИБЛИОТЕЧКА • КВАНТ •
выпуск 25

М. Д. ФРАНК-КАМЕНЕЦКИЙ

САМАЯ ГЛАВНАЯ МОЛЕКУЛА





БИБЛИОТЕЧКА • КВАНТ •

выпуск 25

М. Д. ФРАНК-КАМЕНЕЦКИЙ

САМАЯ ГЛАВНАЯ МОЛЕКУЛА

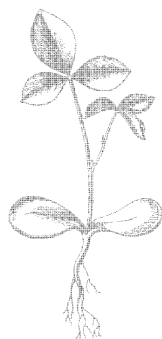


Москва «Наука»

Главная редакция

физико-математической литературы

1983



Scan AAW

28.070

Ф 83

УДК 574/578

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Академик И. К. Кикоин (председатель), академик А. Н. Колмогоров (заместитель председателя), доктор физ.-мат. наук Л. Г. Асламазов (ученый секретарь), член-корреспондент АН СССР А. А. Абрикосов, академик Б. К. Вайнштейн, заслуженный учитель РСФСР Б. В. Воздвиженский, академик В. М. Глушков, академик П. Л. Капица, профессор С. П. Капица, академик С. П. Новиков, академик Ю. А. Осипьян, академик АПН РСФСР В. Г. Разумовский, академик Р. З. Сагдеев, кандидат хим. наук М. Л. Смолянский, профессор Я. А. Смородинский, академик С. Л. Соболев, член-корреспондент АН СССР Д. К. Фаддеев, член-корреспондент АН СССР И. С. Шкловский

Франк-Каменецкий М. Д.

Ф 83 Самая главная молекула. — М.: Наука. Главная редакция физико-математической литературы, 1983. — 160 с. (Библиотечка «Квант», Вып. 25). — 30 к.

В увлекательной форме рассказано о физических, химических и биологических свойствах самой главной молекулы живой природы — молекулы ДНК. Особенно большое внимание уделено открытиям последних десяти лет, приведших к возникновению прикладной ветви науки о ДНК — геной инженерии. В книге показано, как идеи и методы точных наук преобразили биологию XX века. Теперь это приводит к рождению новой отрасли техники — биотехнологии XXI века.

Для школьников, преподавателей, студентов.

Ф $\frac{2001040000-020}{053(02)-83}$ 212-83

ББК 28.070
57.04

Ф $\frac{2001040000-020}{053(02)-83}$ 212-83

© Издательство «Наука».
Главная редакция
физико-математической
литературы, 1983

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
Глава 1. ОТ НОВОЙ ФИЗИКИ К НОВОЙ БИОЛОГИИ	7
Тридцатые годы (7). Фаговая группа (10). Эрвин Шредингер (11). Рентгеноструктурный анализ (13). Уотсон и Крик (17).	
Глава 2. ОТ ДНК К БЕЛКУ	22
Как делается белок (22). Генетический код (27). Универсален ли код? (31).	
Глава 3. ЗНАКОМЬТЕСЬ: САМАЯ ГЛАВНАЯ МОЛЕКУЛА	33
Она похожа на... штопор (33). Она похожа на оконное стекло (36). Она плавится, но не так, как лед (39). Она похожа на путь человека, заблудившегося в лесу (46).	
Глава 4. ПОД ЗНАКОМ ДНК	49
Кризис молекулярной биологии (49). Перелом (54).	
Глава 5. МЫ УМЕЕМ ТАСОВАТЬ ГЕНЫ!	57
Вековая мечта человека (57). Плазмиды (60). Бактерия вырабатывает нужный нам белок (62).	
Глава 6. ДНКОВЫЕ ТЕКСТЫ	64
Еще раз о кризисе (64). Гель-электрофорез (65). Как читают ДНКовые тексты (67). Первые неожиданности (69). Коды митохондрий (72).	
Глава 7. ОТКУДА БЕРУТСЯ ГЕНЫ?	75
Теория эволюции и генетика (75). Расчленённые гены (78). Прыгающие гены (80).	
Глава 8. КОЛЬЦЕВЫЕ ДНК	87
ДНКовые кольца (87). Сверхспирализация и топоизомеразы (90). Зачем нужна сверхспирализация? (94). Физики и математики за работой (96).	
Глава 9. УЗЛЫ ИЗ ДНК	105
Об узлах (105). Узлы в полимерах (109). Узлы на однонитевой ДНК (114). Узлы из двойной спирали (115).	

Г л а в а 10. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ — ОПАСЕНИЯ И НАДЕЖДЫ	119
Наука и изобретательство (119). Опасна ли генная инженерия? (120). Генноинженерная фармакология (122). Грядущий золотой век (126).	
Г л а в а 11. СПОРЫ ВОКРУГ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ	128
Правы ли Уотсон и Крик? (128). Z-форма (134). Подвижная ДНК (138).	
Г л а в а 12. НА ПЕРЕДНЕМ КРАЕ	141
Проблема узнавания (141). ДНК и рак (143).	
Словарь терминов	152

Из всего, что нас окружает, самой необъяснимой кажется жизнь. Мы привыкли, что она всегда вокруг нас и в нас самих, и потеряли способность удивляться. Но пойдите в лес, взгляните так, будто вы их увидели впервые, на деревья, траву, цветы, на птиц и муравьев, и вас охватит чувство беспомощности перед лицом великой тайны жизни. Неужели во всем этом есть нечто общее, нечто такое, что объединяет все живые существа, будь то человек или невидимый глазом микроб? Что определяет преемственность жизни, ее возрождение вновь и вновь из поколения в поколение? Эти вопросы стары как мир, но только нам, живущим во второй половине XX века, посчастливилось впервые узнать ответы. В сущности, ответы оказались не слишком сложными и, главное, ослепительно красивыми. О том, как их удалось получить и в чем они состоят, рассказывается в этой книжке. Центральное место в новой науке молекулярной биологии, которая призвана дать ответ на вечный вопрос: «Что такое жизнь?», занимает молекула ДНК. О ней, главным образом, и пойдет речь. Учитывая интересы читателей «Библиотечки «Квант», а также собственные вкусы, автор уделит больше внимания тем вопросам, при решении которых особенно важную роль играют физика и математика.

Там, где это возможно, автор избегал применения научных терминов. Но совсем без них обойтись невозможно.

Основу жизни составляет большое число достаточно сложных молекул и не называя их, ни о чем рассказать было бы нельзя. Помощь в освоении терминологии призван оказать «Словарь терминов» в конце книги.

Книга написана с таким расчетом, что ее не обязательно читать подряд. Главы в значительной степени независимы друг от друга. Часть из них была опубликована в виде отдельных статей в журналах «Химия и жизнь» и «Квант». Читатель, которому не терпится познакомиться с биологическими проблемами, связанными с молекулой ДНК, может опустить при первом чтении главы 3, 8, 9 и 11.

Июнь 1982 г .

М. Д. Франк-Каменецкий

«Потрясающие вещи происходят в биологии. Мне кажется, Джим Уотсон сделал открытие, сравнимое с тем, что сделал Резерфорд в 1911 году.»

Из письма *Макса Дельбрюка*
Нильсу Бору от 14 апреля 1953 г.

ГЛАВА I

ОТ НОВОЙ ФИЗИКИ К НОВОЙ БИОЛОГИИ

Тридцатые годы

В первой трети нашего века наиболее значительные, революционные преобразования происходили в физике. Создание теории относительности и квантовой механики до самого основания потрясло эту старую науку, дав ей новый, неслыханной силы импульс к дальнейшему развитию как вглубь, в поисках универсальных физических законов, так и вширь, в смежные области.

Одной из главных вех на пути создания новой физики было открытие Резерфордом в 1911 г. атомного ядра. Само существование атома Резерфорда находилось в вопиющем противоречии с основными законами классической физики. На смену старой физике пришла новая, квантовая физика, которая призвана была объяснить устойчивость атомов и их удивительные линейчатые спектры.

Эта теория, разработка которой была начата Планком, Эйнштейном и Бором, нашла замечательно ясную формулировку в 1926 г. в виде знаменитого уравнения Шредингера. Квантовая механика не только позволила физикам решить все головоломки, которые накопились в области атомных спектров. Она поставила на прочный теоретический фундамент всю химию. Наконец-то был понят сокровенный смысл атомного номера в таблице Менделеева! Стал ясен истинный смысл валентности, выяснена природа химической связи, скрепляющей атомы в молекулах.

К началу тридцатых годов у физиков появилось ощущение всемогущества. И так, с атомами все ясно, с молекулами тоже, что там еще? Ага, не понятно, как устроено атомное ядро. Занялись ядром. «Ну, здесь вряд ли есть работа на всех», — считали лидеры. «Надо бы придумать что-нибудь покрупнее». И их взоры обратились к святой святых, к тому, о чем физики раньше не могли и помышлять — к самой жизни. Не поможет ли новая физика разгадать тайну жизни? Или, может быть, наоборот, окажется, что жизнь противоречит квантовой механике и тогда придется опять изобретать какие-то новые законы? Это было бы особенно интересно.

В то время молодой немецкий физик-теоретик Макс Дельбрюк искал себе занятие по вкусу. Он попробовал заняться квантовой химией, потом ядерной физикой. Интересно, конечно, но не очень. И вот, будучи на стажировке в Институте Бора в Копенгагене, он в августе 1932 г. попал на лекцию Бора на Международном конгрессе по световой терапии. Лекция называлась «Свет и жизнь». В ней Бор поделился своими мыслями о проблеме жизни в связи с последними достижениями квантовой механики. И хотя Дельбрюк в то время был полным профаном в биологии, лекция Бора так его вдохновила, что он твердо решил посвятить себя этой науке. Вернувшись в Берлин, Дельбрюк стал искать контактов с биологами. Ему повезло. В это время в Берлине работал русский генетик Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский.

Дельбрюк стал собирать у себя дома друзей-физиков. Он приглашал Тимофеева-Ресовского, и тот часами обучал их своей науке — генетике. Рассказывая, Тимофеев-Ресовский, по своему обыкновению, бегал из угла в угол, словно тигр в клетке. Он говорил о математически строгих законах Менделя, управляющих наследственностью. О генах и о замечательных работах Моргана, доказавших, что гены расположены цепочкой в хромосомах — маленьких червеобразных тельцах, находящихся в клеточных ядрах. Он говорил о плодовой мушке дрозофиле и о мутациях, то есть изменениях генов, которые можно вызвать рентгеновскими лучами. Этим последним вопросом он как раз занимался вместе с физиком-экспериментатором Циммером.

Дельбрюка крайне заинтересовала их работа. Вообще в генетике было столько созвучного квантовой механике, что дух захватывало. Ведь квантовая механика принесла

в физику дискретность, скачкообразность. Она также заставила серьезно относиться к случайности. И вот оказывается, что биологи тоже обнаружили дискретную неделимую частицу (ген), которая случайно переходит из одного состояния в другое (этот переход и называют мутацией).

Что же такое ген? Как он устроен? Об этом часто спорили на вечерах у Дельбрюка. Тимофеев-Ресовский говорил, что вообще-то этот вопрос мало интересовал генетиков. Для них ген был тем же, чем для физиков электрон — элементарной частицей наследственности.

«Вот, я вас спрошу, — сказал как-то Тимофеев-Ресовский, когда от него особенно настойчиво требовали ответа на вопрос об устройстве гена, — из чего состоит электрон?» Все рассмеялись. «Вот видите, так же смеются генетики, когда их спрашивают, из чего состоит ген». «Вопрос о том, что такое ген, выходит за рамки генетики и его бессмысленно адресовать генетикам, — продолжал Тимофеев. — Вы, физики, должны искать ответ на него».

«Ну, все же, — настаивал Дельбрюк, — неужели нет никаких гипотез, пусть чисто умозрительных?» Тимофеев-Ресовский задумался на минутку и воскликнул: «Ну, как же. Мой учитель Николай Константинович Кольцов считает, что ген — это полимерная молекула, скорее всего, молекула белка». «Ну и что это объясняет?» — длинный Дельбрюк прямо-таки кричал на широкоплечего, могучего Тимофеева-Ресовского. «От того, что мы назовем ген белком, мы поймем, как гены удваиваются? Ведь главная-то загадка в этом! Ты же сам рассказывал нам, как в роду Габсбургов из поколения в поколение переходила характерная форма губы? Что делает возможным столь точное копирование генов в течение веков? Каков механизм? Разве химия дает нам такие примеры? Во всяком случае, я никогда ничего подобного не слышал. Нет, тут нужна совершенно иная идея. Тут действительно таится загадка. Великая загадка. Возможно, новый закон природы. Сейчас главный вопрос — как к этому подступиться экспериментально».

Благодаря Тимофееву-Ресовскому Дельбрюк стал неплохо разбираться в генетике. Главное, — его больше не смущала эта дьявольская терминология, как будто специально придуманная, чтобы отпугивать непосвященных. Раньше, когда ему случалось слушать выступления генетиков, он недоумевал, зачем им понадобилось придумывать специальный тарабарский язык. Уж не жулики ли они? Ведь

это уголовники изобретают свой особый жаргон, чтобы их преступные намерения не были понятны окружающим.

И вот теперь знаменитая фраза, которой генетики особенно любят поражать непосвященных, «рецессивный аллель влияет на фенотип, только если генотип гомозиготен», стала казаться ему не только кристально ясной, но и прямо-таки красивой. «Черт возьми, — думал он. — А ведь и вправду иначе-то не скажешь!»

Фаговая группа

Великая тайна, скрывавшаяся за коротким словом «ген», окончательно пленила Дельбрюка. Как происходит удвоение или, опять-таки на жаргоне, репликация генов при делении клеток? В особенно сильное возбуждение пришел Дельбрюк, когда узнал о существовании бактериальных вирусов или, как их чаще называют, бактериофагов (буквально — «пожиратели бактерий»).

Эти удивительные частицы, которых и живыми-то не назовешь, вне клетки ведут себя просто как большие молекулы — из них даже выращивают кристаллы. Но когда вирус попадает в клетку, то через 20 минут клеточная оболочка ломается и из нее вываливается сотня абсолютно точных копий исходной частицы. Дельбрюка осенило, что на бактериофагах гораздо легче будет изучать процесс репликации, удвоения генов, чем на бактериях, не говоря уже о животных; возможно, удастся понять, наконец, как устроен ген. «Вот он — ключ к разгадке», думал Дельбрюк. «Это очень простое явление, гораздо более простое, чем деление целой клетки. Здесь нетрудно будет разобраться. В самом деле, надо посмотреть, как внешние условия будут влиять на воспроизводство вирусных частиц. Надо провести эксперименты при разных температурах, в разных средах, с разными вирусами».

Так физик-теоретик превратился в биолога-экспериментатора. Но мышление — мышление осталось чисто физическим. А главное — цель. Во всем мире не было другого человека, который занимался бы вирусами с единственной целью — раскрыть физическое строение гена.

В 1937 г. Дельбрюк покинул нацистскую Германию. В этот год Рокфеллеровский фонд начал субсидировать работы по применению физических и химических идей и методов в биологии. Распорядитель фонда Уоррен Вивер посетил Берлин и предложил Дельбрюку переехать в США, чтобы

целиком посвятить себя проблеме репликации бактериофагов. Разумеется, Дельбрюк поспешил воспользоваться этим предложением, так как жизнь в Германии становилась просто невыносимой. Бивер ясно понимал значение работ, проводимых Дельбрюком. Кстати, это он первым назвал новую область науки, финансовую поддержку которой стал оказывать Рокфеллеровский фонд, молекулярной биологией.

В Америке Дельбрюк собрал вокруг себя горстку энтузиастов, заразившихся его идеей изучения природы наследственности на бактериофагах. Так возникла «фаговая группа». Шли годы, и участники фаговой группы все больше и больше узнавали о том, как протекает фаговая инфекция и как процесс воспроизведения фагового потомства зависит от внешних условий и т. д. Было проведено много замечательных исследований, в особенности в области изучения мутационного процесса у бактерий и бактериофагов. Именно за работы этого периода много лет спустя Дельбрюк был удостоен Нобелевской премии. Но все эти исследования, казалось, даже не приближали к решению основной проблемы.

Как часто бывает в науке, люди, объединившиеся для решения большой и очень важной задачи, постепенно занялись скрупулезным изучением частных вопросов, сделались маститыми специалистами в той или иной узкой области, но перестали видеть исходные цели. Так путники видят издали сияющие горные вершины, но, по мере приближения к ним, попадают в лесистые предгорья, откуда этих вершин уже не видно. К тому же эти леса изобилуют ягодами, грибами и прочими маленькими радостями.

Если долго бродить по предгорьям, то виденные издали снежные вершины постепенно начинают казаться миражом. Да, скорее всего это были лишь облака, похожие на снежные горы. Но если это и в самом деле были горы, зачем туда спешить? Ведь здесь, в почти не хоженных лесах, так хорошо. Для того чтобы путники вновь вспомнили о главной цели, нужен зычный голос лидера.

И такой голос прозвучал — это был голос Эрвина Шредингера, создателя волнового уравнения.

Эрвин Шредингер

Об истории создания квантовой механики написаны горы научно-популярной и исторической литературы. Конечно, центральное место во всех этих книгах по

праву занимает исполинская фигура Нильса Бора. Но возьмите любой учебник по квантовой механике. Вы увидите, что уравнение Шредингера — альфа и омега этой науки. Безусловно, квантовая механика, как и любая другая наука, создавалась усилиями многих замечательных ученых. Несомненно, на Шредингера радикальное влияние оказала гениальная догадка де Бройля о волнах материи. Все это так. Но решающий шаг сделал все же Шредингер. Он собрал воедино все накопленное до него, чтобы совершить скачок замечательной интеллектуальной смелости и силы.

Хотя, в отличие от Эйнштейна и Бора, имя Шредингера не столь известно широкой публике, это имя глубоко почитается в кругах физиков и химиков. В 1944 г. вышла в свет его небольшая книжка под броским заголовком «Что такое жизнь? С точки зрения физика». Поначалу она не привлекла почти никакого внимания. Шла война, и большинство тех, кому адресована была эта книга, с головой ушли в научно-технические проблемы, от решения которых во многом зависел исход борьбы с гитлеровской Германией.

Но когда война кончилась, появилось много специалистов, особенно среди физиков, которым надо было все начинать сначала, снова искать себе место в мирной науке, — вот для них книга Шредингера оказалась как нельзя кстати.

В своей книжке (на русском языке она вышла впервые в 1947 г.) Шредингер прежде всего дал очень ясное и сжатое изложение основ генетики. Физикам представилась уникальная возможность узнать (причем в блестящем изложении их прославленного коллеги), в чем же состоит суть этой затуманенной тарабарской терминологией и все-таки загадочно привлекательной науки. Но этого мало. Шредингер популяризовал и развил идеи Дельбрюка и Тимофеева-Ресовского о связи генетики и квантовой механики. Пока эти идеи выдвигались не известными физикам людьми, им не придавали особого значения. Но когда об этом заговорил сам Шредингер...

По признанию всех, кто в последующие годы штурмовал проблему гена, включая основных действующих лиц — Уотсона, Крика и Уилкинса, книга Шредингера послужила важным толчком к этому штурму. Шредингер был именно тем человеком, кто крикнул: «Вот они, сияющие вершины, посмотрите, они совсем уже близко. Что же вы мешкаете?»

Рентгеноструктурный анализ

Среди тех мест, где был услышан призыв Шредингера, особенно большую роль суждено было сыграть двум английским научным центрам — прославленной Кавендишской лаборатории в Кембридже, главой которой некогда был Резерфорд, и Королевскому колледжу в Лондоне. Здесь разыгрались завершающие сцены драмы, развязкой которой стало выяснение физической природы гена.

Место действия не было случайным. Именно в Англии сформировалась к тому времени самая сильная в мире научная школа рентгеноструктурного анализа. И именно этот метод оказался тем инструментом, который помог физикам проникнуть в тайну жизни.

Квантовая механика явилась теоретическим фундаментом для понимания внутреннего строения окружающих нас веществ — атомов, молекул и всевозможных состоящих из них материалов, будь то кусок железа или кристалл обыкновенной поваренной соли. Но многообразие структур, которые могут получаться из атомов, необозримо. Как узнать, какова структура того или иного конкретного материала? Тут теория обычно мало помогает. Можно, конечно, выдвинуть те или иные предположения, но нельзя утверждать наверняка — слишком много мыслимых вариантов. Необходим экспериментальный метод, который позволял бы напрямую выяснить атомное строение вещества. Именно таким методом и является рентгеноструктурный анализ.

Рентгеновские лучи знакомы всем — ими просвечивают, если вы сломали ногу или заболели воспалением легких. Физическая природа этих лучей та же, что и у видимого света или у радиоволн — это электромагнитное излучение, но с очень малой длиной волны, порядка 10^{-10} м. Расстояние между атомами в молекулах и кристаллах имеет тот же масштаб. Это обстоятельство навело немецкого физика Макса фон Лауэ на мысль, что при прохождении рентгеновских лучей через кристалл, в котором атомы расположены строго регулярно, должна возникать дифракционная картина, подобная той, которая наблюдается при прохождении видимого света сквозь дифракционную решетку.

Опыты полностью подтвердили эту догадку. Когда пучок рентгеновских лучей направили на кристалл, за которым поместили фотопластинку, то после проявления фотопластинки на ней обнаружили причудливую, но весьма регуляр-

ную систему пятен (см. рис. 1). Опыты были впервые проведены в 1912 г. Вскоре стало ясно, что по распределению пятен на рентгенограмме и по их яркости можно судить о взаимном расположении атомов или молекул, образующих кристалл, и в случае молекул — даже об их внутреннем строении. Так возник метод рентгеноструктурного анализа.

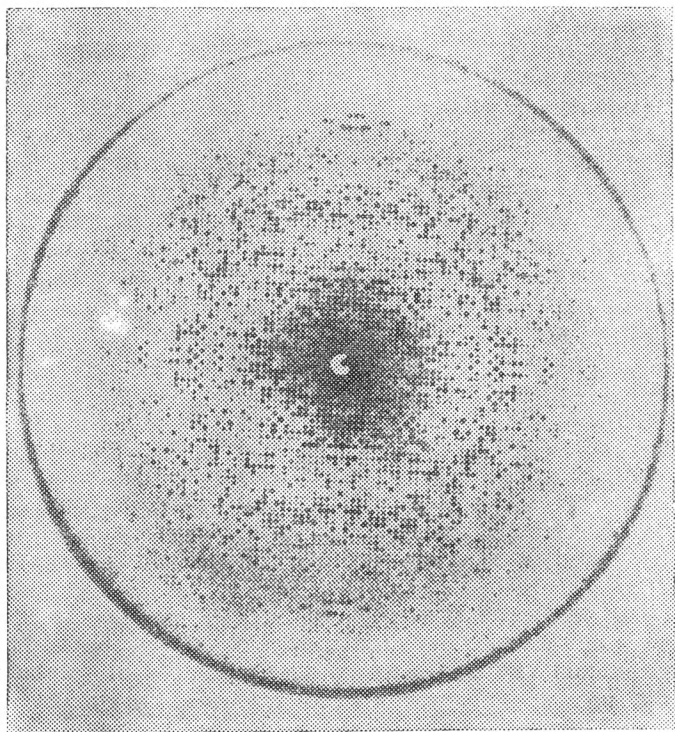


Рис. 1. Так выглядит рентгенограмма, полученная от кристалла белка.

Наибольший вклад в его развитие внесли английские ученые Генри (отец) и Лоуренс (сын) Брэгг. Рентгеноструктурный анализ позволил точно определить структуру всех минералов, а также бесчисленного множества молекул.

Мало-помалу «рентгеноструктурщики» переходили к все более сложным объектам исследования и, наконец, в 30-е годы обратили свои взоры к биологическим молекулам. Однако после первых же попыток стало ясно, что задача

им пока еще не по плечу. Прежде всего из биологических молекул очень трудно получить кристаллы. Но даже если это удавалось, десятки тысяч атомов, входящих в каждую молекулу, создавали на рентгенограмме такой причудливый узор, что восстановить по нему координаты всей этой массы атомов было просто невозможно. Потребовались многие годы, пока научились решать столь сложные задачи.

Этим занимались в Кавендишской лаборатории в довоенные и послевоенные годы. Усилия Кавендишской лаборатории, руководимой Лоуренсом Брэггом, были сосредоточены на определении пространственного строения белков. Это и понятно. В те годы все были убеждены, что главная молекула живой природы — молекула белка. В самом деле, ферменты, то есть молекулы, проводящие в клетке всевозможные химические превращения, — это всегда белки. Белок представляет собой главный строительный материал клетки. Не удивительно, что всеобщим было убеждение, что и гены устроены из белка. Казалось несомненным, что путь к разгадке всех тайн жизни лежит через изучение строения белков.

Белок представляет собой полимерную молекулу, мономерными звеньями, «кирпичиками» которой служат аминокислотные остатки (рис. 2). Аминокислотные остатки располагаются всегда строго линейно, плечом к плечу, подобно солдатам, стоящим по стойке «смирно». Но так устроен и биологически активный белок, и белок, нагретый, скажем, до 60 °С, когда он уже полностью теряет свою биологическую активность. Значит, одного химического строения белка, т. е. последовательности аминокислотных остатков, недостаточно для того, чтобы белок был биологически активен. Необходима еще совершенно определенная укладка в пространстве групп, закодированных на рис. 2 в виде сокращенных названий аминокислот, которые на самом деле вовсе не кружочки и не шарики, а имеют каждая свою весьма причудливую форму. Вот за то, чтобы определять пространственную структуру всей молекулы белка по рентгенограммам типа приведенной на рис. 1, и велась затяжная борьба в стенах Кавендишской лаборатории. Лишь в середине 50-х годов Джону Кендрию и Максусу Перуцу удалось добиться успеха — они научились определять трехмерную структуру белков. Это случилось уже после того, как была решена проблема устройства гена — к чему, как оказалось, белки отношения вовсе не имеют.

Уотсон и Крик

Из тех, кто откликнулся на призыв Шредингера, двоим посчастливилось первыми подняться на вершину. Это были совсем еще юный воспитанник фаговой группы Джим Уотсон и не столь юный, но в то время мало кому известный сотрудник Кавендишской лаборатории Фрэнсис Крик.

Будучи одержим идеей узнать, как устроен ген, и считая, что фаговой группе эта задача не по плечу, Уотсон добился в 1951 г., чтобы его отправили поработать в Европу. Вскоре он осел в Кавендишской лаборатории, так как встретил там Крика, который был настроен так же по-боевому, как и он сам. Уотсон к тому времени уже был уверен, что ключ к разгадке тайны гена лежит вовсе не в определении структуры белка, а в выяснении структуры ДНК.

Вообще-то молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты, а это неуклюжее название и кроется за сокращением ДНК, не была чем-то новым. Она была открыта в клеточных ядрах швейцарским врачом И. Ф. Мишером еще в 1868 г. Затем было показано, что ДНК сосредоточена в хромосомах, и это, казалось бы, говорило о ее возможной роли в качестве генетического материала. Однако в 20-х и 30-х годах прочно утвердилось мнение, что ДНК — это регулярный полимер, состоящий из строго повторяющихся четверок мономерных звеньев (аденинового, гуанинового, тиминового и цитозинового) и поэтому эта молекула не может нести генетическую информацию.

Считали, что ДНК играет в хромосомах какую-то структурную роль, а гены состоят из белка, который входит в состав хромосом. Что же заставило усомниться в справедливости этих представлений? Главную роль здесь сыграла работа, законченная к 1944 г. тремя американскими бактериологами из Рокфеллеровского института во главе с шестидесятилетним О. Эвери. Эвери многие годы изучал явление трансформации, открытое в опытах с пневмококками — возбудителями пневмонии (воспаления легких). Эти удивительные опыты состояли в следующем. Брали два вида пневмококков. Одни были способны вызывать болезнь, а другие — нет. Затем болезнетворные клетки убивали путем нагревания и к ним добавляли живые «безобидные» клетки. И вот оказалось, что некоторые из живых клеток после контакта с убитыми каким-то образом «научились» вызывать болезнь. Было ясно, что в этих опытах что-то переходит

из убитых бактерий к живым. Но что? На этот вопрос и удалось дать ответ Эвери и его соавторам. И хотя их работа была напечатана в медицинском журнале, ею заинтересовались скорее генетики, химики, физики, чем медики. В этой скрупулезно выполненной работе было показано, что при трансформации способность вызывать болезнь переносится от убитой бактерии к живой только с одним веществом — с ДНК. Ни белки, ни какие-либо другие составляющие клетки в передаче признака при трансформации никакой роли не играют. Собственно, эта работа Эвери теперь считается первой работой, в которой было доказано, что вещество наследственности, или гены, есть именно молекула ДНК.

Так что же, выходит, Эвери со своими помощниками, а вовсе не Уотсон и Крик первыми побывали на вершине?

Бесспорно, Эвери сделал очень важный шаг в нужном направлении, но до вершины он не добрался. Эйнштейн как-то сказал изумительные по своей глубине слова: «Лишь теория решает, что мы ухитряемся наблюдать». У Эвери не было в запасе ничего такого, что можно было бы назвать теорией, и он предпочел ограничиться сухим изложением фактов. Тем не менее, несогласие его данных с концепцией белковой природы гена было очевидным.

Генетики оказались перед выбором — либо не поверить данным Эвери, либо признать, что веществом наследственности оказался не белок, как принято было считать, а ДНК. Опровергнуть Эвери было трудно — в его работе просто-напросто не к чему было придаться. Но и от устоявшихся представлений о белковой природе гена отказаться ни за что не хотели. Опытам Эвери было дано следующее объяснение: ДНК, конечно, никаких генов не содержит и содержать не может. Но она может вызывать мутации, т. е. изменять гены, которые, как им и положено, состоят из белка. Правда, ДНК оказалась весьма необычным мутагеном, вызывающим от опыта к опыту одни и те же мутации, в отличие от обычных мутагенов, которые вызывают мутации случайным образом, ненаправленно. Это не могло не заинтересовать генетиков, уже давно искавших способы направленного изменения наследственности. Так удалось спасти, казалось бы, уже испускавшую дух белковую теорию гена, но при этом генетики и все те, кто занимался проблемой химической (или физической) природы наследственности, вынуждены были, наконец, признать, что на ДНК следует обратить серьезное внимание.

Итак, работа Эвери заставила усомниться в том, что ДНК — это всего лишь полимерная молекула, выполняющая в хромосомах структурную роль. Стало ясно, что в ДНК есть что-то еще... Но — не более того. Той теорией, которая решила, что же на самом деле ухитрился наблюдать Эвери, была модель строения молекулы ДНК, придуманная Уотсоном и Криком в 1953 г.

Уотсон и Крик не имели собственных экспериментальных данных. Вообще в то время в Кавендишской лаборатории, где работал Крик и стажировался Уотсон, никто не занимался ДНК. Ею занимались Морис Уилкинс и Розалинда Франклин в Королевском колледже в Лондоне.

Исследовать ДНК с помощью рентгеноструктурного анализа оказалось даже сложнее, чем белок. Молекулы ДНК как следует не кристаллизовались и давали весьма бедные рентгенограммы, вроде той, что приведена на рис. 3. Нечего было даже пытаться решить с помощью таких рентгенограмм обратную задачу рентгеноструктурного анализа, то есть научиться восстанавливать пространственную структуру молекулы, как это пытались сделать для белков Перуц и Кендрю.

Однако кое-какие очень важные параметры молекулы все же удалось извлечь. Эти параметры, полученные М. Уилкинсом и Р. Франклином, а также детальные данные о химическом строении ДНК и были положены Уотсоном и Криком в основу их работы. То, как они действовали, больше всего походило на игру. Они знали, как устроены отдельные элементы — мономерные звенья ДНК. Из этих элементов, как из деталей детского конструктора, надо было собрать структуру, отвечающую рентгеновским данным. Результатом этой «игры» стало одно из величайших научных открытий в истории человечества.

Собственно, тому, что в результате получилось, посвящена вся эта книжка. Мы постепенно расскажем обо всех главных особенностях строения молекулы ДНК и о том, к каким головокружительным последствиям в понимании основ явления жизни они привели. Но сначала давайте выделим в модели Уотсона и Крика только ее суть, самую главную «изюминку».

Итак, согласно модели Уотсона и Крика, молекула ДНК состоит из двух полимерных цепочек. Каждая цепочка построена из звеньев четырех сортов — А (адениновое), Г (гуаниновое), Т (тиминное) и Ц (цитозинное). Последовательность звеньев в каждой цепи может быть со-

вершенно произвольна. Но эти последовательности в одной молекуле ДНК строго связаны друг с другом следующим

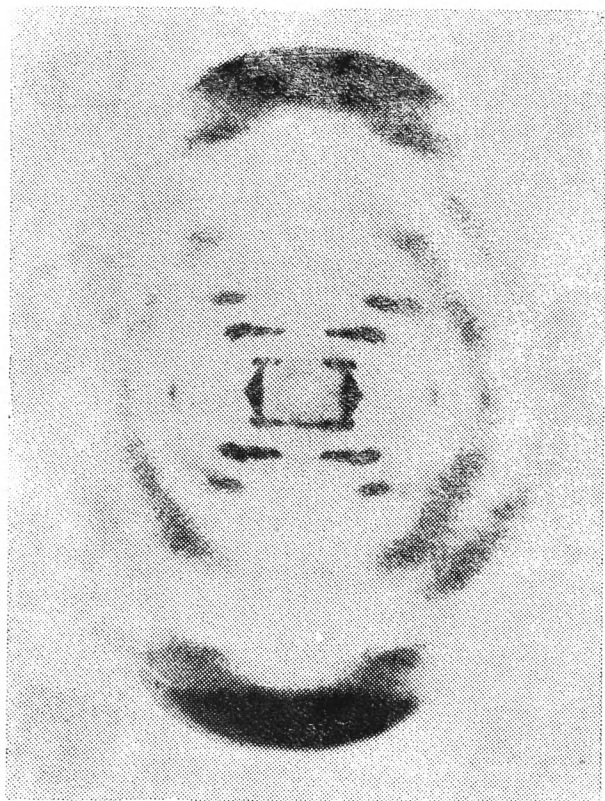


Рис. 3. Рентгенограмма ДНК. Такую рентгенограмму получила впервые Розалинда Франклин.

принципом комплементарности, или дополнительности (см. рис. 4):

против А должно быть Т,
против Т должно быть А,
против Г должно быть Ц,
против Ц должно быть Г.

В открытии этого правила комплементарности, которое и составляет главную «изюминку» модели Уотсона и Крика, очень большую роль сыграли данные о том, в каком

соотношении встречаются в ДНК различные звенья, т. е. нуклеотиды. Данные эти были получены чуть ранее в замечательных химических работах Эрвина Чаргаффа.

Если внутри каждой полимерной цепочки атомы скреплены очень мощными ковалентными связями, то между комплементарными цепями действуют сравнительно слабые взаимодействия, подобные тем, которые удерживают молекулы друг возле друга в кристаллах.

Самой замечательной особенностью модели Уотсона—Крика было то, что она необыкновенно изящно решала самую главную проблему — проблему репликации гена. Если мы разведем в стороны две нити, а потом на каждой нарастим, согласно принципу комплементарности, по новой нити, то получим из одной молекулы ДНК две, причем обе будут идентичны исходной (рис. 5).

Можно представить себе, в какое возбуждение пришел Дельбрюк, когда получил от Уотсона письмо, содержащее, наконец-то, решение загадки удвоения гена. Он сразу и безоговорочно поверил в предложенную модель. Под впечатлением письма Уотсона он и написал те слова, которые взяты эпиграфом к этой главе.

Не только Дельбрюк, очень многие были сразу покорены красотой модели Уотсона и Крика. И хотя некоторые генетики продолжали фанатично держаться за белки, их единственным аргументом осталось такое общее соображение: не может быть, чтобы такая сложная штука, как жизнь, была в своей основе устроена столь просто. Аргумент, прямо скажем, не из сильных.

Так было установлено, что ДНК является самой главной молекулой живой природы. Нет, новых законов физики в биологии не обнаружили. Но центральную проблему, проблему строения гена, решить удалось.

Теперь, тридцать лет спустя, можно констатировать, что открытие структуры ДНК сыграло в развитии биологии такую же роль, как в физике — открытие атомного

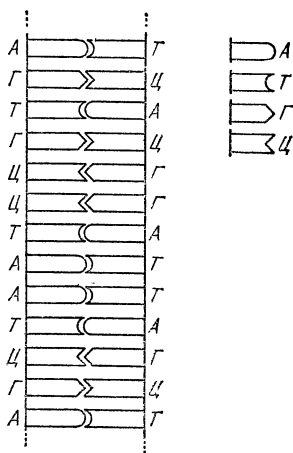


Рис. 4. Молекула ДНК похожа на веревочную лестницу, состоящую из перекладин двух сортов — пар нуклеотидов АТ и ГЦ.

ядра. Выяснение строения атома привело к рождению новой, квантовой физики, а открытие строения ДНК привело к рождению новой, молекулярной биологии. Но на этом параллель не заканчивается. Чисто теоретические, фундаментальные исследования атома позволили человеку овладеть

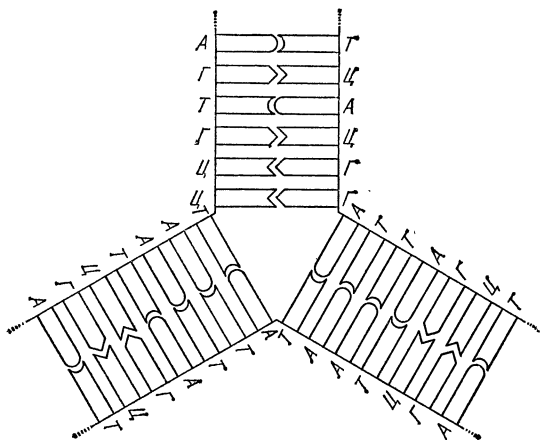


Рис. 5. Так, согласно Уотсону и Крику, происходит процесс репликации ДНК, в результате которого из исходной молекулы, изображенной на рис. 4, получаются две абсолютно такие же молекулы.

практически неисчерпаемым источником энергии. Развитие молекулярной биологии открыло в последние годы возможность неслыханным образом вмешиваться в свойства живой клетки, направленно изменять наследственность. Это, безусловно, окажет в будущем не менее радикальное воздействие на жизнь людей, чем овладение энергией атомного ядра.

ГЛАВА 2

ОТ ДНК К БЕЛКУ

Как делается белок

Далекие от науки люди часто ворчат, что, мол, новые теории порождают больше вопросов, чем дают ответов. Это действительно так. Непонятно только, что здесь плохого. В действительности, чем больше вопросов порождает новая теория, тем она ценнее. Ведь вопросы-то тоже новые — те, которые никому не приходили в голову,

а подчас и не могли быть даже сформулированы до возникновения теории. В этом отношении модели ДНК Уотсона и Крика принадлежит, пожалуй, абсолютный рекорд. История науки едва ли знает еще теорию, которая породила бы столько новых вопросов. И каких вопросов! Они касались самой сути явления жизни.

Самый первый и самый главный вопрос был поставлен уже в 1954 г. известным физиком-теоретиком Г. Гамовым. Еще до войны он построил теорию альфа-распада, а после войны предложил модель горячей вселенной, согласно которой в начале был гигантский взрыв. И вот неожиданно этот ученый выступил с кардинальной идеей в области биологии.

Как известно, рассуждал Гамов, основными рабочими молекулами в клетке являются белки. Всеми химическими превращениями в клетке ведают белки-ферменты. Почти весь строительный материал клетки также белковой природы. Даже хромосомы лишь наполовину состоят из ДНК, а наполовину из белка. Значит, работа клетки определяется набором белков в ней.

Отдельная молекула белка может содержать от десятков до нескольких сотен мономерных звеньев. Но если взять все белки клетки и расчленить их на отдельные звенья, то окажется, что наберется всего 20 сортов аминокислот. Собственно, разновидностей аминокислот как химических соединений может быть бесчисленное множество и химики могут, в принципе, синтезировать любые аминокислоты. Но живая природа использует только 20 вполне определенных аминокислот, которые поэтому получили название природных или канонических. Этот набор из 20 аминокислот абсолютно одинаков, универсален для всей живой природы на Земле. Возьмете ли вы самую ничтожную букашку или самого мудрого корифея, вы обнаружите в них один и тот же набор аминокислот. Чем же отличается букашка от корифея? Отличие заключается в том, какие цепочки образуют аминокислоты. Иными словами, оно сводится к последовательностям аминокислотных остатков в белках.

Чем же определяются последовательности белков? Ответ классической генетики на такой вопрос звучал очень формально: эти последовательности задаются генами. Как именно? Ничего вразумительного классическая, или, как ее еще часто в достаточной степени справедливо называли, формальная генетика ответить на этот вопрос не могла.

Вот на этот главный вопрос, утверждал Гамов, теперь, после работы Уотсона и Крика, имеется четкий и ясный ответ. Аминокислотные последовательности всех белков клетки определяются последовательностью звеньев в одной из двух комплементарных цепочек ДНК. Эти звенья ДНК, называемые нуклеотидами, бывают, как уже говорилось в предыдущей главе, четырех сортов (А, Т, Г и Ц). Таким образом, информация о последовательности 20 сортов аминокислотных остатков в белках записана в ДНК в виде последовательности нуклеотидов четырех сортов. Значит, провозгласил Гамов, клетка должна обладать словарем, переводящим четырехбуквенный текст ДНК в двадцатибуквенный текст белков! Так родилась идея генетического кода.

Тут же возник целый каскад вопросов. Каким образом код реализуется, то есть где в клетке и при помощи чего происходит перевод ДНКового текста на белковый язык? Как получается, что длинный нуклеотидный текст ДНК дает в конечном счете сравнительно короткие белковые цепи? Наверное, ДНКовый текст состоит из отдельных «предложений», каждое из которых отвечает одному белку? Так может быть эти «предложения» и есть гены классической генетики? А что между ними? Что играет роль «точек», разделяющих «предложения»? Иными словами, чем отличаются в физическом, химическом, то есть в молекулярном смысле, сами гены от промежутков между ними? Ну, и наконец, каков же он, генетический код, этот словарь живой клетки?

Небольшая по численности, разбросанная по разным лабораториям мира, но преисполненная боевого духа, армия ученых приступила к штурму новых высот. Вел незримые полки Фрэнсис Крик. Он был в те годы признанным лидером среди молекулярных биологов. За период с 1954 по 1967 г. на все основные вопросы были получены ответы. Совокупность этих ответов впоследствии стали называть основной догмой молекулярной биологии. Не все из полученных ответов, казавшихся найденными раз и навсегда, выдержали испытание бурных 70-х годов. И все же эти ответы, хотя они и перестали быть догмой, и по сей день являются фундаментом, на котором строится все здание молекулярной биологии.

Прежде всего, никаких особенностей в химическом строении ДНК, которые отличали бы одни участки от других, обнаружено не было. По всей своей длине молекула ДНК

представляет собой непрерывную последовательность нуклеотидных звеньев четырех сортов — А, Т, Г и Ц. В этом смысле ДНКовый текст отличается от типографского текста, в котором есть точки, запятые, промежутки между словами. ДНКовый текст — это непрерывная последовательность букв. Роль «знаков препинания» играют сами же буквы. Это особые последовательности нуклеотидов, расположенные между участками, последовательности которых отвечают аминокислотным последовательностям в белках. Отдельный такой участок стали называть геном.

Итак, ген — это часть ДНКового текста, которая содержит информацию об аминокислотной последовательности одного белка. Теперь «элементарная» частица наследственности, о которой спорили когда-то Дельбрюк и Тимофеев-Ресовский, приобрела совершенно конкретный молекулярный, атомный смысл. Оказалось, что ген вовсе не «неделимая частица», а построен из сотен нуклеотидов. Вот нуклеотиды — это уже действительно элементарные частицы генетического материала — мономерные звенья полимерной молекулы ДНК.

Как же ген порождает белок? Это происходит в два этапа. На первом этапе, который получил название транскрипции, специальный фермент узнает последовательность нуклеотидов, расположенную между генами (эту последовательность называют промотором) и, двигаясь вдоль гена, снимает с него копию в виде молекулы РНК.

Молекула рибонуклеиновой кислоты, что и скрывается за сокращением РНК, весьма сходна по своему химическому строению с молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты, т. е. ДНК. Она тоже представляет собой полимерную цепочку, построенную из мономерных звеньев — нуклеотидов. Как и ДНК, РНК строится из нуклеотидов четырех сортов. Их химические формулы, которые, следует признать, выглядят довольно устрашающе, приведены на рис. 6. Чем отличаются нуклеотиды ДНК от нуклеотидов РНК? Для Ц, А и Г это отличие состоит только в том, что в каждом из них самая нижняя и самая правая ОН-группа заменяется в ДНК на Н (отсюда и приставка «дезокси»). Случай уридинового нуклеотида (У) несколько сложнее, так как для него при переходе к ДНК не только происходит замена ОН на Н, но и в шестичленном кольце водород в верхней группе СН заменяется на метильную группу СН₃. Этим и объясняется отличие в названиях РНКового нуклеотида (уридиновый) и ДНКового (тимидиновый), хотя они

очень похожи друг на друга и оба служат партнерами А при образовании комплементарных пар. В отличие от ДНК, РНК представляет собой одиночную цепочку.

Копирование гена происходит по тому же правилу комплементарности, по которому идет репликация ДНК, только роль, которую играет в ДНК Т, в РНК играет У.

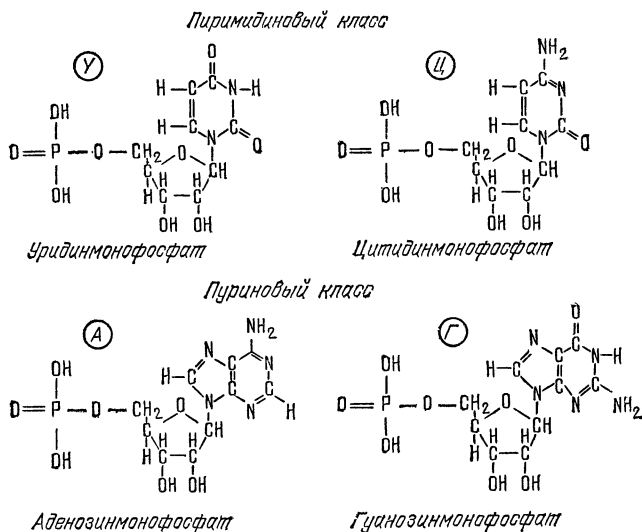


Рис. 6. Полные химические формулы мономерных звеньев РНК-нуклеотидов. Сверху приведены пиримидиновые нуклеотиды (У и Ц), а снизу — пуриновые (А и Г). Нуклеотиды, входящие в состав ДНК, отличаются тем, что у них вместо правой нижней группы ОН стоит просто Н. Кроме того, в ДНК вместо уридинового нуклеотида входит тимидиновый, у которого верхняя СН-группа в кольце заменена на группу СCH_3 .

Синтез РНК ведется по одной из двух комплементарных цепей гена. Фермент, ведущий синтез, то есть осуществляющий процесс транскрипции, называется РНК-полимеразой.

Итак, РНК-полимераза снимает с участка длинной молекулы ДНК, с гена, РНКовую копию. Этот РНКовый отпечаток гена используется на втором этапе синтеза белка, в процессе, получившем название трансляции. Собственно, этот этап является решающим, именно здесь вступает в силу генетический код.

Процесс трансляции очень сложен, в нем принимает участие множество действующих лиц. Главное из них — рибосома. Рибосома — это самый сложный агрегат, построенный из полусотни различных белков и молекулы РНК. Имеется ввиду не та РНК, которая служит матрицей для синтеза белка на рибосоме, а другая, рибосомальная РНК, которая является неотъемлемой частью рибосомы. Чтобы эти два класса РНК отличать друг от друга, рибосомальную РНК обозначают как рРНК, а матричную мРНК. Рибосома — это молекулярная вычислительная машина, переводящая тексты с нуклеотидного языка ДНК и РНК на аминокислотный язык белков. Эта «молекулярная ЭВМ» узко специализирована — она работает только по одной программе, по программе, название которой «генетический код».

Генетический код

На рубеже 50-х и 60-х годов Фрэнсис Крик и его сотрудники выяснили основные свойства генетического кода. Было доказано, что код триплетный, то есть одной аминокислоте соответствует последовательность из трех нуклеотидов на мРНК. Эта тройка нуклеотидов была названа кодоном. Текст, записанный в мРНК, считывается рибосомой последовательно, кодон за кодоном, начиная с некоторого начального иницирующего кодона по следующей схеме:

мРНК: ... ААГААУГГАУЦАУЦААЦГЦЦЦЦУАУ...
 белок: $a_0 - a_1 - a_2 - a_3 - a_4 - a_5 - a_6 - a_7$

На этой схеме a_0, a_1, \dots обозначают аминокислотные остатки белка. Напомним, что их может быть 20 сортов. А сколько сортов кодонов? Легко подсчитать, что всего существует $4^3 = 64$ различных кодонов. Так что же, не всякому кодону соответствует аминокислота? Да, не всякому.

Но таких бессмысленных, или незначащих, кодонов очень немного, и они выполняют специальную функцию — служат стоп-сигналами, обозначают конец белковой цепи. Поэтому их еще называют терминирующими кодонами. Подавляющее же большинство кодонов соответствует какому-либо аминокислотному остатку. А это значит, что код вырожден — большинству, если не всем, аминокислотным остаткам должно отвечать несколько кодонов.

К 1961 г. стало ясно, что код триплетный, вырожденный и неперекрывающийся (то есть считывание происходит кодон за кодоном) и что он содержит иницирующие и терминирующие кодоны. Дело было за тем, чтобы установить соответствие каждого аминокислотного остатка конкретным кодонам и узнать, какие кодоны обозначают начало и конец синтеза белковой цепи. Было совершенно ясно, что именно для этого требуется. Нужно «только» прочесть параллельно два текста — ДНК-овый (или РНК-овый) текст гена и аминокислотный текст соответствующего этому гену белка. Затем сравнить эти два текста — и дело сделано.

Вспомним, что именно так были когда-то расшифрованы египетские письмена. Но беда в том, что если белковые последовательности к этому времени умели расшифровывать, то ни последовательности ДНК, ни последовательности РНК читать не умели. Поэтому пришлось пойти по иному пути.

Представьте себе, что вместо Розеттского камня, на котором один и тот же текст был написан египетскими иероглифами и по-гречески, откопали бы во время наполеоновского похода в Египет живого древнего египтянина. Тогда не потребовался бы гений Шампольона, чтобы составить французско-древнеегипетский словарь. Достаточно было бы показывать египтянину различные предметы, а он рисовал бы соответствующие иероглифы.

Именно этим принципом дешифровки кода и воспользовались М. Ниренберг и Дж. Маттеи. Ведь клетки-то знают код! Значит, надо предложить клеткам распознавать разные последовательности нуклеотидов, лишь бы было точно известно, что это за последовательности. К этому времени как раз научились синтезировать кое-какие искусственные РНК (но отнюдь еще не любые!). Но, конечно, живой клетке предлагать такую РНК бесполезно — она ее просто-напросто съест, то есть расщепит до отдельных нуклеотидов, а их использует для строительства собственных РНК. Поэтому Ниренберг и Маттеи использовали не живые клетки, а клеточные экстракты, которые сохраняли способность синтезировать белок на РНК, но не содержали ферментов, расщепляющих РНК. Эти экстракты не умели, разумеется, многого другого, что умеет делать клетка, но важно лишь одно — они были способны синтезировать белок по внесенной извне РНК. Такие экстракты называли бесклеточной системой.

Ниренберг и Маттеи получили экстракт из кишечной палочки и добавили к нему искусственную РНК, состоящую только из урацилов. Так бесклеточной системе был задан первый вопрос: какой аминокислоте соответствует кодон УУУ? Ответ был однозначен: кодону УУУ отвечает фенилаланин. Этот ответ, о котором Ниренберг сообщил на Международном биохимическом конгрессе в Москве в 1961 г., произвел настоящую сенсацию. Путь к расшифровке кода был открыт!

Очень быстро удалось сделать подобный перевод для многих аминокислот. Однако определять последовательность нуклеотидов в искусственных мРНК было довольно трудно. В то время еще не умели синтезировать даже короткие фрагменты с заданной последовательностью. Умели лишь получать полинуклеотиды со случайной последовательностью из смеси мономеров, да и то не из любой смеси. Начали думать, как попытаться иными способами расшифровывать кодоны. Но неожиданно произошел новый прорыв, и ситуация резко изменилась.

Мы видели, что у истоков проблемы кода стоял физик, общие свойства кода были выяснены генетическими методами, после чего за дело взялись биохимики. Окончательно проблема была решена, когда на помощь биохимикам пришли химики-синтетики.

К 1965 г. Хар Гобинд Корана научился синтезировать короткие фрагменты РНК с заданной последовательностью — сначала двойки (динуклеотиды), а потом тройки (тринуклеотиды). Из таких двоек и троек с помощью ферментов синтезировали длинные полинуклеотиды, в которых эти двойки или тройки повторялись много-много раз. Затем полинуклеотиды со строго определенной и известной последовательностью добавляли в бесклеточную систему и определяли их соответствие белковым цепям.

К 1967 г. расшифровка генетического кода была окончательно завершена. Этот код изображен на рис. 7. В центральном круге таблицы обозначены первые нуклеотиды кодонов, в следующем — вторые, а затем третьи. На внешней части круга указаны соответствующие кодоном аминокислотные остатки.

Символ Тер обозначает терминирующие кодоны. А где же иницирующие кодоны? Специальных иницирующих кодонов не существует. Эту роль в определенных условиях играют кодоны АУГ и ГУГ, обычно отвечающие аминокислотам метionину и валину.

Даже беглого взгляда на рис. 7 вполне достаточно, чтобы заметить определенную закономерность. Вырожденность кода носит явно не случайный характер; то, какой аминокислоте будет соответствовать данный кодон, определяются главным образом два первых нуклеотида. Каков третий нуклеотид — не так уж важно, то есть, хотя код и триплетный, главную смысловую нагрузку несет дублет, стоящий в начале кодона. Иными словами, код квазидублетный.

Эта главная особенность кода была замечена еще на самой ранней стадии его расшифровки. Конечно, дублетами нельзя закодировать все двадцать аминокислот, так

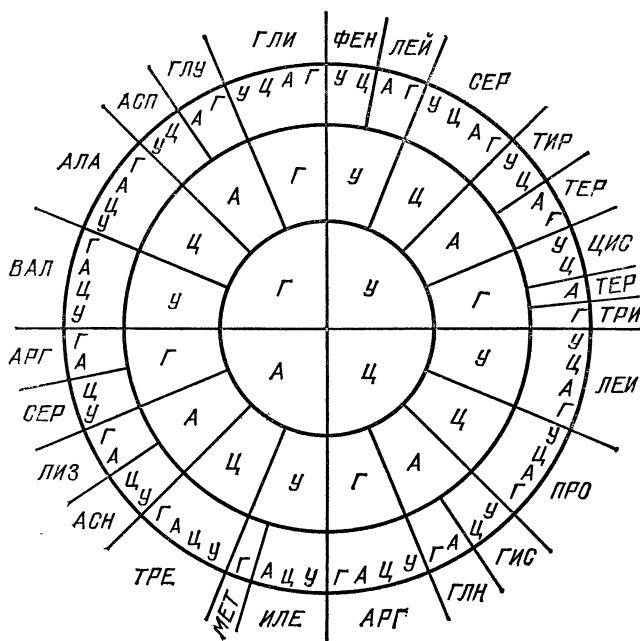


Рис. 7. Генетический код. Первая буква кодона расположена в центральном круге, вторая — в первом кольце и третья — во втором. В наружном кольце записаны сокращенные названия аминокислот.

как различных дублетов может быть всего $4^2 = 16$. Поэтому третий нуклеотид в кодоне должен нести некоторую смысловую нагрузку.

Существует, однако, правило, которому код подчиняется почти строго. Чтобы его сформулировать, нам надо вспомнить, что четыре нуклеотида — урациловый, цитозинный, адениновый и гуаниновый — принадлежат по строению к двум разным классам — пиримидиновому (У и Ц) и пуриновому (А и Г) (см. рис. 6). Так вот, правило вырожденности кода можно сформулировать следующим образом: если два кодона имеют два одинаковых первых нуклеотида и их третьи нуклеотиды принадлежат к одному классу (пуриновому или пиримидиновому), то они кодируют одну и ту же аминокислоту.

Взгляните еще раз на таблицу кода, и вы убедитесь, что это правило выполняется очень хорошо. Но два исключения все же существуют. Если бы сформулированное выше правило выполнялось совсем строго, то кодон АУА должен был бы отвечать метионину, а не изолейцину, а кодон УГА — триптофану, а не быть сигналом окончания синтеза.

Универсален ли код?

Но позвольте, вправе спросить читатель, ведь бесклеточная система получена из конкретного организма. Где гарантия, что опыты по расшифровке кода в бесклеточной системе, взятой из другого организма, дадут тот же результат? Вопрос совершенно резонный. И естественно, он возник уже в ходе работ по расшифровке кода.

Первоначально авторы исследований аккуратно оговаривали, что речь идет не о коде вообще, а о коде *E. coli* (кишечной палочки). Именно из этой бактерии была впервые получена бесклеточная система, и именно с ней вели работы, о которых рассказано выше. Однако все свидетельствовало о том, что код других организмов не отличается от кода *E. coli*.

М. Ниренберг повторил опыты, взяв бесклеточные системы из организмов жабы и морской свинки. Никаких отличий от кода *E. coli* эти исследования не выявили. Итак, сомнений как будто бы не оставалось — код универсален.

Правда, были получены мутанты кишечной палочки с некоторыми отклонениями в коде: отдельные терминирующие кодоны читались в них как значащие, то есть отвечали определенным аминокислотам. Такое явление было названо супрессией.

Было ясно, однако, что структура генетического кода должна быть весьма консервативной, устойчивой в ходе эволюции. В самом деле, представим себе, что код внезапно изменился. Пусть даже совсем немного — один из кодонов поменял свой смысл, то есть стал соответствовать другой аминокислоте.

Но этот кодон определенно встречается не в одном гене, а во многих генах. И на всех этих генах будут синтезироваться белки, в которых одна аминокислота заменена на другую. Для некоторых белков такая замена произойдет безнаказанно, они сохраняют свои функции. Но очень трудно представить себе, что ни в одном случае не произойдет порча какого-то важного белка. Ведь хорошо известно, что замена одной аминокислоты в одном белке может полностью нарушить его функции и как следствие привести к гибели всего организма.

Ставший классическим пример такой мутации — серповидно-клеточная анемия. Это очень тяжелое наследственное заболевание, вызванное, как совершенно точно установлено, заменой лишь одной аминокислоты в одном белке — гемоглобине.

Более точно — одна молекула гемоглобина представляет собой агрегат из четырех сцепленных межмолекулярными силами полиаминокислотных цепей — двух идентичных α -цепей и двух идентичных β -цепей. Так часто бывает, что функциональный белок получается слипанием нескольких цепей. Так вот, мутация, о которой идет речь, приводит к тому, что шестой аминокислотой в β -цепи становится не Глу, как в нормальном гемоглобине, а Вал. Из таблицы генетического кода можно заключить, что в кодоне, отвечающем шестой аминокислоте β -цепи, в гене гемоглобина произошла замена А на Т во втором положении.

Такая замена меняет структуру гемоглобина, и он в значительной степени теряет свою способность переносить кислород. Название болезни обусловлено тем, что это изменение, происшедшее на молекулярном уровне, приводит к изменению формы клеток-переносчиков кислорода в крови (красных кровяных шариков); они становятся серповидными, а не круглыми.

Такие примеры оставляют мало сомнений в том, что код должен сохраняться неизменным в ходе эволюции, а это означает, что он должен быть универсальным для всей живой природы.

«Мы полагаем, что ген или, может быть, целое хромосомное волокно представляет собой аperiodическое твердое тело.»

Э. Шредингер «Что такое жизнь?
С точки зрения физика». (1944).

ГЛАВА 3

ЗНАКОМЬТЕСЬ: САМАЯ ГЛАВНАЯ МОЛЕКУЛА

Она похожа на... штопор

План того, каким получится каждый из нас, готов в тот момент, когда половые клетки наших родителей, мамы и папы, сливаются в одно целое, называемое зиготой или оплодотворенной яйцеклеткой. План заключен в ядре этой одной-единственной клетки, в ее молекуле ДНК, и в нем значится очень многое: и то, каким будет цвет наших глаз и волос, и насколько высоким будет рост, и какой формы нос, и насколько тонким — музыкальный слух и многое, многое другое. Конечно, наше будущее зависит не только от ДНК, но и просто от превратностей судьбы. Но очень, очень многое в нашей судьбе определяется качествами, заложенными от рождения, нашими генами, то есть последовательностью нуклеотидов в молекулах ДНК.

ДНК удваивается при каждом делении клеток, так что каждая клетка несет в себе информацию о строении всего организма. Это как если бы в каждом кирпичике здания хранился миниатюрный план всего здания. Вот бы архитекторы с давних времен так поступали! Тогда реставраторам не пришлось бы ломать себе голову, скажем, над тем, как выглядел когда-то Пергамский алтарь, даже если бы от него сохранился один-единственный камень.

То, что специализированная клетка целого организма на самом деле знает, как устроен весь организм, было очень эффектно продемонстрировано английским биологом Дж. Гердоном. Он брал ядро клетки из кишечника взрослой лягушки и используя тончайшую микрохирургическую технику, пересаживал его в лягушачью икринку, из которой было удалено ее собственное ядро. Из гибридной икринки вырастала нормальная лягушка — абсолютно идентичная той, чье клеточное ядро было взято. Так удалось впервые искусственно вырастить настоящих двойников. Природа сама иногда создает двойников. Это получается, когда

после первого деления зиготы дочерние клетки не остаются вместе, а расходятся и из каждой получается свой организм. Так рождаются однояйцевые или идентичные близнецы. У близнецов совершенно одинаковые молекулы ДНК, поэтому они так похожи.

Как же устроена молекула ДНК, эта королева живой клетки? Она вовсе не простая веревочная лестница, как можно подумать, глядя на рис. 4. Эта лестница завита в правую спираль. Она напоминает штопор, но штопор двойной; такие редко, но встречаются. Каждая из нитей ДНК образует правую винтовую линию, точь-в-точь как на штопоре (рис. 8). Азотистые основания четырех

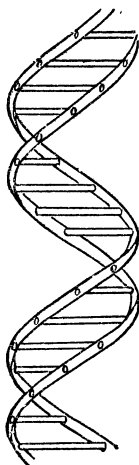


Рис. 8. ДНК — это веревочная лестница, завитая в правую спираль.

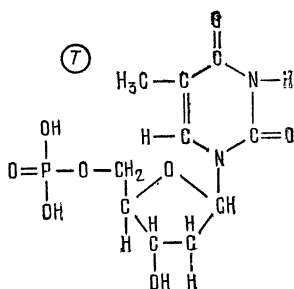


Рис. 9. Тимидинмонофосфат—тиминный нуклеотид, входящий в состав ДНК. Остальные три нуклеотида ДНК имеют сходное строение, только у каждого — свое азотистое основание (верхняя группировка). Эти три основания (аденин, гуанин и цитозин) одинаковы для ДНК и РНК (см. рис. 6).

сортов, в последовательности которых и заключена генетическая информация, образуют как бы начинку этого штопорообразного кабеля, на поверхности которого располагается сахаро-фосфатный остов полимерных цепей, из которых состоит ДНК. Мономерные звенья, из которых строится ДНК, очень похожи на мономерные звенья РНК, химическое строение которых показано на рис. 6. Мы не будем поэтому снова рисовать все четыре нуклеотида, покажем только, как выглядит Т (рис. 9), который больше всего отличается от своего РНКового

аналога — У. Отметим, что верхнее кольцо называется азотистым основанием, пятичленное кольцо — сахаром, а слева расположена фосфатная группа.

Каковы главные размеры ДНК? Диаметр двойной спирали 2 нм, расстояние между соседними парами оснований вдоль спирали — 0,34 нм. Полный оборот двойная спираль делает через 10 пар. Ну, а длина? Длина зависит от того, какому организму ДНК принадлежит. ДНК простейших вирусов содержит всего несколько тысяч звеньев, бактерий — несколько миллионов, а высших — миллиарды.

Если выстроить в одну линию все молекулы ДНК, заключенные лишь в одной клетке человека, то получится нить длиной около 2 м. Следовательно, длина этой нити в миллиард раз больше ее толщины. Чтобы лучше представить себе, что это значит, вообразите, будто ДНК на самом деле вдвое толще, чем на рис. 8 — около 4 см. Такой ДНК, взятой всего из одной клетки человека, можно было бы опоясать земной шар по экватору. В этом масштабе клеточное ядро имеет размеры стадиона, а человек — это уже земной шар.

Ясно, что одна из весьма серьезных проблем, особенно в многоклеточных организмах, где молекулы ДНК очень длинные, это укладка молекулы, чтобы она поместилась в клеточном ядре. Уложить-то ее надо так, чтобы ДНК была доступной по всей длине для белков, например, для РНК-полимеразы, считывающей нужные гены.

Другая проблема — репликация столь длинных молекул. Ведь после удвоения ДНК две комплементарные нити, которые первоначально были многократно закручены одна относительно другой, должны оказаться разведёнными. Это значит, что молекула должна прокрутиться вокруг своей оси миллионы раз, прежде чем закончится репликация. Из этого следует, что вопросы, порожденные работой Уотсона и Крика, отнюдь не ограничивались проблемой генетического кода и связанными с ней вещами.

Эти вопросы порождали и сомнения. А верна ли модель Уотсона — Крика? Насколько надежен тот фундамент, на котором строятся все данные молекулярной биологии? Модель Уотсона — Крика была столь конкретна, столь детализирована, что прямо-таки дразнила своей уязвимостью. Достаточно было найти хотя бы один четкий факт, противоречащий ей, чтобы двойная спираль оказалась сброшенной с пьедестала. Это была работа для физиков, и они принялись за работу.

Если каждая молекула ДНК действительно состоит из двух полимерных цепочек, рассуждали одни, и эти цепочки связаны друг с другом слабыми нековалентными силами, то они должны расходиться при нагревании раствора ДНК, что можно четко зафиксировать в опыте. Если азотистые основания в ДНК действительно образуют друг с другом водородные связи, рассуждали другие, то это можно проверить, измеряя спектры ДНК в инфракрасной области или исследуя скорость обмена обычного (легкого) водорода на тяжелый (дейтерий). Если внутри двойной спирали и впрямь запрятаны азотистые основания, рассуждали третьи, то можно выяснить, действуют ли на ДНК те вещества, которые способны реагировать только с этими, запрятанными группами. И эти, и многие другие опыты были поставлены.

К концу 50-х годов стало ясно — модель выдержала первое испытание. Попытки опровергнуть ее терпели неудачу одна за другой.

Она похожа на оконное стекло

Физики занялись изучением ДНК не только потому, что понимали важность проверки всех деталей ее структуры. Молекула ДНК привлекла их внимание и сама по себе.

В книге Э. Шредингера «Что такое жизнь? С точки зрения физика.» есть слова (они взяты эпитафией к этой главе), оказавшиеся пророческими. ДНК действительно похожа на твердое тело. Пары оснований уложены в ней как в кристалле. Но это кристалл линейный, как бы одномерный — каждая пара оснований имеет только двух соседей. Кристалл ДНК — аperiodический, так как последовательность пар оснований нерегулярна, как нерегулярна последовательность букв в осмысленном тексте книги. Но подобно буквам в печатном шрифте, пары оснований А-Т и Г-Ц имеют одинаковые размеры как в ширину, так и в высоту.

Конечно же, кристалл совершенно нового типа, одномерный кристалл ДНК страшно заинтриговал физиков. Не полупроводник ли он? А может быть, сверхпроводник, да еще при комнатной температуре? ДНК была подвергнута очередному обследованию. Нет, она не полупроводник и, уж подавно, не сверхпроводник. Она оказалась обыкновенным изолятором, вроде оконного стекла. Да она и про-

зрачна, как стекло. Водный раствор ДНК (а в воде она растворяется очень хорошо) просто прозрачная жидкость. Этим сходство со стеклом не заканчивается. Обычное стекло, в том числе и оконное, прозрачно для видимого света и очень сильно поглощает ультрафиолетовые лучи. ДНК тоже поглощает в этой части спектра. Но, в отличие от стекла, которому ультрафиолетовые лучи не вредны, ДНК к ним очень чувствительна.

Ультрафиолетовые лучи настолько губительны для молекулы ДНК, что клетка выработала в ходе эволюции специальную репарирующую систему, которая залечивает повреждения, нанесенные этими лучами. Что же это за повреждения?

Когда квант ультрафиолетового излучения (фотон) попадает в ДНК, то он передает свою энергию азотистому основанию. Основание оказывается в возбужденном состоянии. Далее события могут развиться по-разному. Если фотон поглощен аденином, гуанином или цитозином, то ничего особенного не произойдет — поглощенная энергия быстро превратится в тепло (как это бывает в оконном стекле), а ДНК останется такой же, какой была. Другое дело, если фотон поглотится тиминном, причем не любым, а тем, который соседствует в цепи с другим тиминном. В этом случае поглощенная энергия не успевает еще превратиться в тепло, как два соседних тимина вступают в химическую реакцию. Результат — новое химическое соединение, называемое фотодимером тимина, $T \diamond T$ (рис. 10).

Строение димера довольно необычно. В самом деле, углерод обыкновенно бывает либо тетраэдрическим, когда его связи с соседними атомами идут из центра тетраэдра в его вершины, либо треугольным, когда связи лежат в одной плоскости и направлены из центра в вершины правильного треугольника. Но в фотодимере две связи у каждого атома углерода, участвующего в сцеплении тимinov, образуют прямой угол! А все четыре атома углерода образуют квадрат (он носит название циклобутана).

Итак, в ДНК возникло повреждение — вместо двух тимinov образовалось совершенно новое химическое сое-

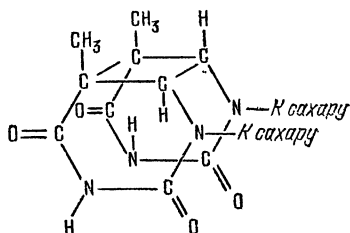


Рис. 10. Тиминный димер.

динение, дойдя до которого ферменты, работающие на ДНК, остановятся. Они знают только четыре буквы: А, Т, Г и Ц, а тут какой-то новый значок $T \diamond T$. Им он не известен. Если эту пометку не выправить, не убрать из текста, то ферменты не смогут ни снять с ДНК копию, ни считать с нее информацию (синтезировать РНК). Вся жизнь клетки остановится, и она погибнет. Но тут на помощь приходят ферменты репарирующей системы.

Сначала фермент УФ-эндонуклеаза узнает тиминовый димер и рвет в этом месте сахаро-фосфатную цепь. Далее фермент экзонуклеаза расширяет возникший разрыв. В одной из нитей ДНК, там, где образовался тиминовый димер, получается огромная брешь — в несколько тысяч нуклеотидов. При этом оказываются удаленными не только тиминовый димер, но и масса нормальных нуклеотидов, как говорится, на всякий случай. Но это не беда — другая, комплементарная нить остается целой и по ней специальный фермент, ДНК-полимераза Корнберга, надстраивает вторую нить, создавая нормальную двойную спираль, идентичную исходной, неповрежденной ДНК.

Так вот, оказывается, в чем смысл двунитчатости ДНК! Она нужна не только для создания двух идентичных копий генетического материала, но и для того, чтобы информацию, заключенную в ДНК, можно было уберечь от повреждений. Если бы между циклами удвоения ДНК была одонитевой, то ее невозможно было бы починить.

Репарирующие системы есть во всех клетках, от простейших до человека. Это не удивительно — жизнь зародилась под Солнцем. Может показаться странным, что репарирующая система активна даже в таких клетках, которые никогда не испытывают действия солнечного излучения — например, клетки кишечника. Остроумное объяснение этому предложил Г. М. Баренбойм. Он полагает, что ДНК защищается от излучения Вавилова—Черенкова, возникающего в клетках при распаде естественной примеси радиоактивных элементов.

Если же в результате мутации репарирующая система выйдет из строя — это настоящее бедствие. Иногда рождаются дети с дефектом, который называется ксеродерма пигментозум. Они совершенно не могут быть на свету — их кожа покрывается язвами, которые постепенно переходят в злокачественные опухоли. Таких детей не удается спасти, даже тщательно оберегая их от солнца. Вообще

прямыми опытами на животных показано, что тиминовые димеры могут вызывать рак.

Выходит, загорать — это действительно совсем не невинное занятие. Конечно, мы не можем отказать себе в этом удовольствии, но не следует перегружать репарирующую систему. Кроме того, репарация — не вполне безобидная вещь. Считают, что ферменты репарирующей системы, в особенности ДНК-полимеразы Корнберга, склонны допускать ошибки, так что репарация может приводить к мутациям. А соматические мутации (т. е. происходящие в неполовых клетках тела) также рассматриваются в качестве важного фактора, приводящего к злокачественному перерождению ткани.

Вот сколько хлопот от того, что ДНК чувствительна к ультрафиолетовым лучам. А ведь эти лучи едва достигают поверхности Земли, основная их часть поглощается в атмосфере. Так что стоит ли сожалеть, что ДНК прозрачна, как оконное стекло?

Она плавится, но не так, как лед

И все-таки те, кто ждал от молекулы ДНК необычных физических свойств, были вознаграждены. Одномерность и аperiодичность кристалла ДНК в полной мере проявляются при его плавлении. Но если кристаллическое состояние ДНК — это понятно, что такое, то как представить его переход в жидкое? Во что может превратиться одномерный кристалл ДНК при плавлении?

Чтобы разобраться в этом, вспомним, почему плавится лед. Лед представляет собой кристалл, построенный из молекул H_2O . В нем царит строгий порядок, при котором молекулы воды связаны друг с другом максимально возможным числом межмолекулярных связей. В жидкой воде большинство этих связей рвется. Что же заставляет воду быть жидкой при температуре выше нуля по Цельсию? Потеряв многие из связей, молекулы воды приобретают возможность гораздо свободнее двигаться (перемещаться и вращаться), что становится очень выгодным с ростом температуры. При еще большем нагревании молекулы воды ради полной свободы жертвуют последними связями друг с другом — происходит переход из жидкого в газообразное состояние. Это общая тенденция. С ростом температуры вещества проявляют готовность пожертвовать энергией связи между молекулами ради увеличения энтропии.

Все это в полной мере относится и к ДНК — с ростом температуры существование двойной спирали становится невыгодным. Межмолекулярные связи, удерживающие две комплементарные цепи друг около друга, рвутся, и из одной двунитевой молекулы образуется две одонитевые цепи (рис. 11). Энтропийно (то есть в смысле получения большей свободы) это выгодно потому, что, не будучи связанной с комплементарным партнером, каждая цепь чувствует себя гораздо свободнее, может приобретать намного больше различных конфигураций в пространстве.

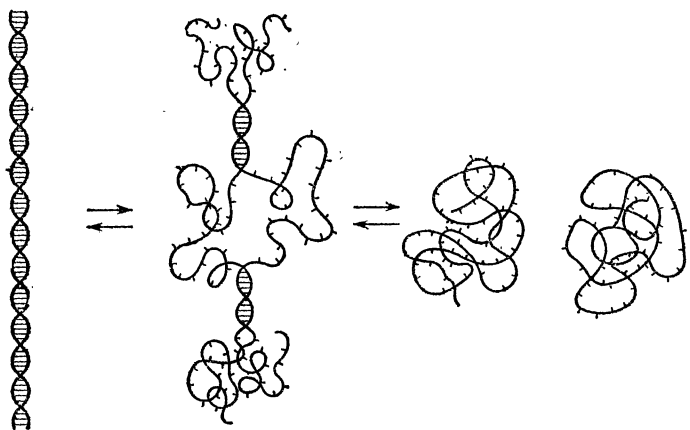


Рис. 11. Так плавится ДНК.

Сами нити ДНК порвать простым нагреванием нельзя — связи, соединяющие нуклеотиды в цепочку, настолько прочны, что их можно разрушить либо сильной кислотой, либо порезать ферментами нуклеазами.

Несмотря на аналогию, плавление ДНК принципиально отличается от плавления льда. Отличие состоит в том, что плавление ДНК происходит в широком интервале температур; этот интервал равен нескольким градусам, а плавление льда происходит строго в одной точке на шкале температур. Этот так называемый фазовый переход. При таком переходе скачкообразно изменяется фазовое состояние вещества — из твердого оно становится жидким, из жидкого газообразным.

Мы каждый день сталкиваемся с фазовым переходом, когда кипятим чайник. В процессе кипения система вода —

пар находится в самой точке фазового перехода — температура чайника ни на йоту не превысит 100°C , пока не выкипит вся вода. То же самое будет происходить при нагревании льда или снега. Температура растет до 0°C , потом рост прекратится, пока весь лед полностью не растает, а затем температура вновь пойдет вверх.

В отличие от фазовых систем, у ДНК температура растет непрерывно, и с ее повышением все новые участки молекул переходят из спирального состояния в расплавленное. Интересно, что это отличие — прямое следствие одномерности кристалла ДНК.

Осознавать, что такое поведение вещества возможно, физики начали еще в довоенные годы, когда и не думали о ДНК или о реальных одномерных кристаллах. Просто никак не удавалось построить полную теорию фазовых переходов в настоящих трехмерных кристаллах (это получилось лишь совсем недавно — в 70-х годах), и возникла мысль, что, может быть, удастся это сделать хотя бы для одномерного или двумерного кристаллов. Проанализировать первый вариант оказалось совсем просто. Но вот беда — никакого фазового перехода не получалось. Глубокий смысл этой неудачи был понят нашим знаменитым соотечественником Львом Давидовичем Ландау. Вот что он писал (вместе с Е. М. Лифшицем) в 1938 г.: «Во всякой одномерной системе не может существовать фаз, так как они стремились бы перемешиваться друг с другом». Это утверждение, известное во всем мире как «теорема Ландау», долгое время считалось чисто негативным, означающим только, что одномерная система — никуда негодная модель для теоретического рассмотрения проблемы фазовых переходов.

Вряд ли Ландау думал, что когда-нибудь найдутся реальные системы, к которым удастся применить это его утверждение. Но ДНК — это действительно почти такая система. Слово «почти» здесь поставлено потому, что теорема Ландау была доказана для строго однородных систем, а ДНК, как мы помним, — аperiодический кристалл. Его составляют два сорта звеньев — пары А-Т и Г-Ц, отличающиеся силой связи. Пару А-Т легче порвать, чем пару Г-Ц. Поэтому ДНК, которая содержит больше пар А-Т, плавится при более низкой температуре.

Важно ли то, сколько сортов пар — два или один, как в строго однородном кристалле? Да, важно. Это очень интересный вопрос, и его исследовали многие теоретики уже прямо в связи с проблемой плавления ДНК. У наших соотечест-

венников следует отметить, прежде всего, работы А. А. Веденова, А. М. Дыхне и И. М. Лифшица. Много занимался данной проблемой и автор этих строк.

Что же оказалось? Вывод, сделанный Л. Д. Ландау, остается в силе. И в аperiодической ДНК фазового перехода быть не может. Принципиально это также объясняется одномерностью системы, но происходит по иной причине, чем в строго однородном кристалле. Фазы отсутствуют не потому, что они стремились бы перемешиваться, как говорил Ландау, а потому, что участки ДНК, обогащенные

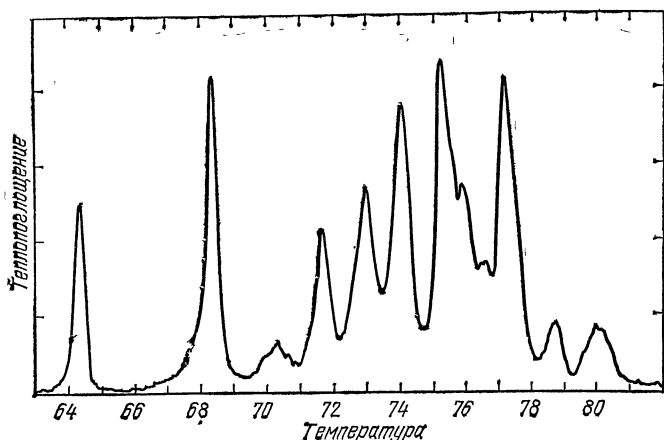


Рис. 12. Зависимость теплопоглощения ДНК от температуры. Такую кривую часто называют также дифференциальной кривой плавления. Приведенная кривая получена для ДНК, носящей кодовое название ColE1 и содержащей около 6,5 тысяч пар нуклеотидов.

парами А-Т, плавятся при более низкой температуре, чем участки, обогащенные парами Г-Ц. Поэтому переход в новое состояние происходит не скачком, с ростом температуры, а поэтапно, участок за участком.

Если мерить зависимость поглощения тепла от температуры для раствора молекул ДНК, то на графике, отражающем эту зависимость, вместо одного бесконечно узкого пика, который характерен для плавления льда, мы должны наблюдать множество пиков, отвечающих выплавлению отдельных участков в молекуле. Ширина каждого пика, как предсказывает теория, должна соответствовать примерно 0,5 °C. Эксперимент полностью подтвердил это предсказание. На рис. 12 видно, как идет поэтапное плавл-

ление ДНК (плазмиды ColE1), содержащей около шести с половиной тысяч пар оснований.

Конечно, никто не может измерить теплопоглощение одной-единственной молекулы. Экспериментатор всегда имеет дело с образцом, состоящим из миллиардов и миллиардов молекул, но у всех у них строго одинаковая последовательность нуклеотидов. И при той или иной температуре во всех молекулах раскрываются одни и те же участки. Поэтому, исследуя эффект на множестве одинаковых молекул, можно судить о том, что происходит с каждой из них в отдельности.

Сотрудникам Института молекулярной генетики АН СССР (Ю. Любченко, А. Боровик, Ю. Каламбет и Е. Голованов), работающим в лабораториях Ю. С. Лазуркина и А. А. Александрова, удалось буквально воочию наблюдать поэтапное плавление ДНК. Они научились фиксировать раскрытые участки в молекуле с помощью специально подобранного химического агента. Обработанные препараты изучались под электронным микроскопом.

Опыт шел так. Раствор ДНК нагревали до определенной температуры, попадающей в интервал плавления. При этом раскрывались отдельные участки молекулы (нити в этих местах расходились, и азотистые основания оказывались торчащими наружу). Затем в раствор добавляли вещество, реагирующее с раскрытыми основаниями, но не способное связываться с основаниями, запрятанными внутри двойной спирали. Когда реакция заканчивалась, образец охлаждали до комнатной температуры — прореагировавшие участки уже не могли вновь закрыться и образовать двойную спираль.

Обработанные таким образом молекулы ДНК исследовали под электронным микроскопом. Один из полученных электронно-микроскопических снимков показан на рис. 13. Получив множество снимков молекул, раскрытых при разных температурах, построили результирующую картину (рис. 14). По горизонтальной оси здесь отложена координата пары оснований вдоль цепи ДНК. По вертикальной оси — вероятность того, что данная пара раскрыта, а по третьей оси — температура. Сравнение с кривой зависимости теплопоглощения от температуры (слева вверху на рис. 14) показывает, что каждому пику действительно соответствует выплавление определенного участка ДНК. Рисунок позволяет определить, какой вид имеет молекула ДНК при любой температуре в интервале плавления. На-

пример, видно, что при 72 °С в молекуле должны быть расплавлены оба конца, а также участок, отстоящий от левого конца на 60 % от общей длины молекулы. Это как раз отвечает снимку, приведенному на рис. 13. Отметим, что в ДНК вовсе не всегда плавление начинается с концов, как в данном случае. Просто у этой молекулы на обоих концах расположены участки, сильно обогащенные парами АТ.

Да, изучать плавление ДНК оказалось гораздо более интересным делом, чем плавить лед. Вместо одного пика, у которого ширину-то не измерить, — множество пиков,

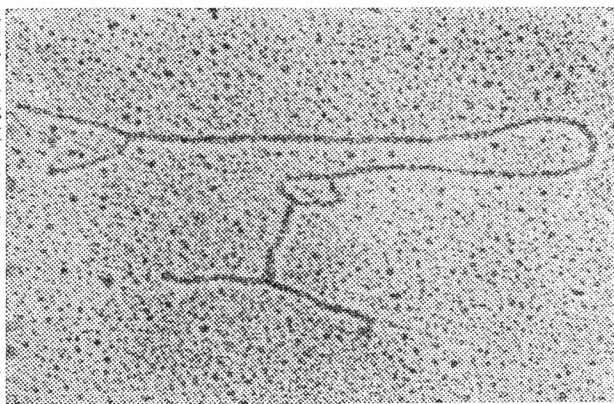


Рис. 13. Так выглядит ДНК ColE1 под электронным микроскопом, после того, как ее состояние зафиксировали при температуре 72 °С. Ясно видны три раскрытых, расплавленных участка — два на концах и один в середине.

положение и ширина которых определяются последовательностью нуклеотидов в ДНК. Каждая молекула ДНК имеет свой, характерный «профиль» плавления, в зависимости от хранящейся в ней генетической информации.

Но плавление ДНК — это не просто уникальное физическое явление. Это процесс, который постоянно происходит в клетке. В самом деле, и при удвоении ДНК и при считывании с нее информации комплементарные нити должны быть разведены, чтобы на каждой из них (в случае репликации) или на одной из них (в случае транскрипции) начался синтез цепей ДНК или РНК.

Как же разводятся нити? Что играет роль утюга, способного расплавить участок ДНК? Эту роль играют

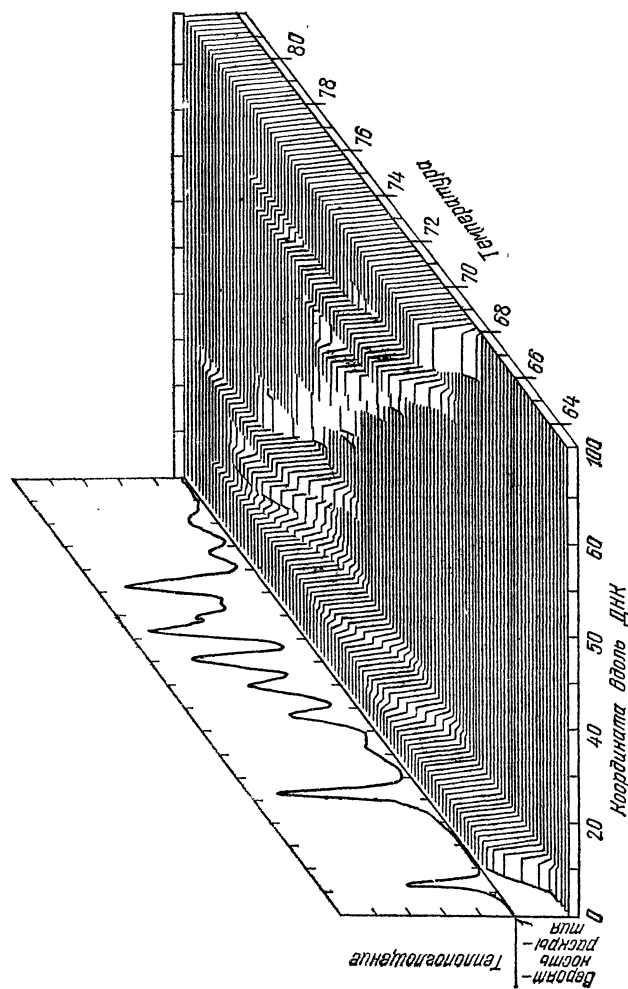


Рис. 14. Полная картина плавления ДНК CoIE1, полученная путем обработки с помощью ЭВМ большого числа электронномикроскопических снимков, типа приведенного на рис. 13.

специальные ферменты, в частности, РНК-полимераза. Фермент прочно связывается с ДНК и расплетает ее, но не любой участок молекулы, а определенную последовательность нуклеотидов, промотор, расположенную между генами. После того как РНК-полимераза связалась с промотором и расплавила его (раскрывается около десяти нуклеотидов),

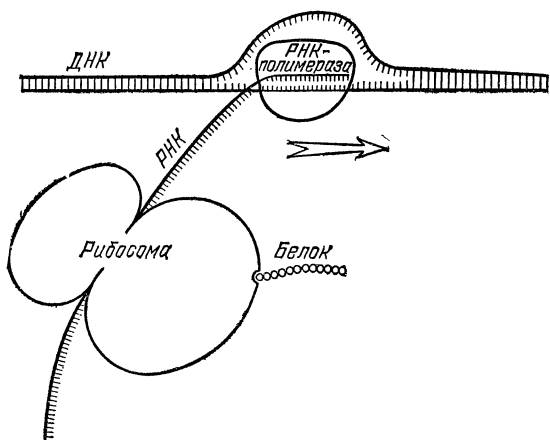


Рис. 15. РНК-полимераза ползет по ДНК, синтезируя РНК. Рибосома считывает информацию с РНК, синтезируя белок, в соответствии с генетическим кодом.

она начинает двигаться вдоль гена, расплетая на своем пути все новые участки и ведя синтез молекулы мРНК. Те участки гена, с которых полимераза «съехала», вновь захлопываются, а синтезируемая молекула РНК свешивается в раствор. К ней подплывает рибосома и начинает синтез белка по законам генетического кода. Все это схематически показано на рис. 15.

**Она похожа на путь человека,
заблудившегося в лесу**

Почему человек, старающийся идти в лесу только вперед, обязательно заблудится в пасмурную погоду? Почему он вновь и вновь будет возвращаться на место, где уже побывал? Существуют разные поверья на этот счет. Одни говорят, что человек ходит по кругу потому, что у него одна нога чуть короче другой. Вторые видят причину в том, что шаги у нас разные — один длиннее, другой короче. Все

это полнейшая чушь. Причина в ином. Человек старается идти прямо, но, не имея перед собой удаленных ориентиров, постоянно сбивается с прямой линии. Эта потеря памяти о первоначальном направлении происходит тем быстрее, чем гуще и однообразнее лес. Путь человека при этом носит случайный характер, и вовсе не выглядит движением по кругу.

Чтобы представить себе такой путь, можно взять листок бумаги, положить его на стол и прижать к нему острый карандаш. Затем, закрыв глаза, прокрутить листок, а затем сдвинуть карандаш. Поступив так раз пять, — откройте глаза. Вы увидите, что получилась ломаная линия, причем в ней, скорее всего, будет хотя бы одно самопересечение. Это и есть нечто вроде движения человека в лесу, а самопересечение — это возврат в то место, где он уже был.

Конечно, человек лишь постепенно отклоняется от исходного направления, он не движется зигзагами, если только не пьян. Путь пьяного и впрямь очень похож на зигзагообразную ломаную. Поэтому случайное блуждание называют иногда движением абсолютно пьяного человека. Впрочем, если даже наш путник абсолютно трезв, но не имеет удаленных ориентиров, то его путь в лесу в конечном счете будет очень похож на ломаную линию. Вопрос сводится лишь к тому, какой длины будет каждый прямолинейный отрезок. Обозначим этот отрезок буквой b . Для пьяного b — это один шаг. Следующий будет уже совершенно в другую сторону. Трезвый старается сделать величину b как можно большей, но без удаленных ориентиров, она все равно гораздо меньше общего пути, если, конечно, путь достаточно долг.

Блуждают не только люди. Блуждают и молекулы — они стараются двигаться прямо, но из-за столкновений друг с другом их путь искривляется. Так возникает знаменитое броуновское движение.

Теория случайных блужданий была построена Альбертом Эйнштейном. Она составила предмет одной из трех статей, опубликованных в 1905 г. и определивших пути развития физики XX века (две другие статьи посвящены теории относительности и теории световых квантов). Теория Эйнштейна гласит, что если частица пройдет путь L , то она сместится из исходной точки на расстояние $r = \sqrt{Lb}$. Что это значит?

Вернемся к человеку в густом лесу в пасмурную погоду. Вряд ли значение b будет здесь больше двадцати метров. Скорость составит, по-видимому, километра два в час.

Это значит, что за девять часов, а дольше идти вряд ли возможно (сил не хватит) — человек сместится из исходной точки всего на 600 м! Не удивительно, что за это время он много раз пересечет свой собственный след, так и не выбравшись из леса. Единственный способ не заблудиться — любой ценой увеличивать значение b .

Но какое отношение имеет все это к ДНК? Поверьте, самое непосредственное. Подобно пути человека в лесу и частицы в среде, молекула ДНК стремится вытянуться в одну прямую линию, так как это отвечает минимуму ее энергии. Но тепловое движение портит все дело. Молекулу ДНК бомбардируют окружающие молекулы воды, и она начинает извиваться подобно червяку, скрючивается в полимерный клубок, постоянно меняющий форму.

Поэтому двуспиральная ДНК, если, конечно, она достаточно длинна, свернута чаще всего в клубок. Размеры клубка описываются все той же формулой Эйнштейна $r = \sqrt{Lb}$, где L — длина молекулы, а b определяется тем, насколько молекула ДНК сможет выпрямиться (то есть жесткостью двойной спирали). Надежные измерения показали, что для ДНК $b = 100$ нм.

Тот факт, что двойная спираль способна изгибаться, имеет немалое биологическое значение. Дело в том, что если бы молекула ДНК была очень жесткой, вроде спицы для вязания, то она никак не могла бы уместиться внутри клетки, не говоря уже о клеточном ядре. Ведь в клетке, особенно у высших организмов, содержится очень много ДНК, причем сосредоточена она главным образом в ядре. Если принять, что вся ДНК в клетке человека — это одна молекула, то ее длина L составит около 2 м. Это в миллион раз больше диаметра ядра. Как же она все-таки там умещается?

Может быть, достаточно теплового движения, чтобы ДНК была втиснута в ядро? Чтобы ответить на этот вопрос, оценим диаметр полимерного клубка с $L = 2$ м. Приняв $b = 100$ нм, легко убедиться, что $r = 0,5$ мм. Это в тысячу раз меньше полной длины молекулы, но все еще в тысячу раз больше диаметра ядра. Следовательно, теплового движения недостаточно, чтобы ДНК уместилась в столь малом объеме.

Чтобы справиться с задачей, в клетках высших организмов предусмотрен специальный механизм насильственного изгибания двойной спирали. Молекула навивается, как нитка на катушку, на особый комплекс ядерных белков

(гистонов). На каждой «катушке» молекула делает около двух оборотов, затем она переходит на следующую «катушку» и так далее. «Катушка» с намотанной на нее ДНК называется нуклеосомой, так что ДНК в ядре высших — это ожерелье из нуклеосом. Конечно, и это ожерелье не вытянуто в одну линию, а очень сложным образом компактно уложено в особые тельца, называемые хромосомами. Именно таким хитрым способом клетка умудряется проделать трюк, который по плечу лишь искусному магу — запихнуть полимерный клубок диаметром 0,5 мм в ядро, диаметр которого меньше микрометра.

ГЛАВА 4

ПОД ЗНАКОМ ДНК

Кризис молекулярной биологии

В основе того, что зовется здравым смыслом, лежит принцип, согласно которому из различных возможных объяснений мы отдаем предпочтение, при прочих равных условиях, простейшему. Сознательно или бессознательно этим принципом руководствуются все здравомыслящие люди — и старушка, потерявшая очки, и криминалист, раскрывающий преступление, и ученый, исследующий природу. Правда, объяснение, представляющееся нам самым простым, вовсе не обязательно оказывается верным. Но хотя во многих случаях мы понимаем, что выбор, скорее всего, окажется неверным — другого пути у нас нет. Простейшее объяснение имеет приоритет перед всеми остальными уже потому, что его легче всего опровергнуть и поэтому именно его нужно прежде всего проверять.

Несколько упрощая, можно сказать, что картина мира, которую мы в данный момент себе представляем — это совокупность простейших, для данного уровня знаний, объяснений. Но насколько эти объяснения истинны — данный вопрос выходит за рамки науки сегодняшнего дня. И, конечно, движет науку вперед именно убеждение в несовершенстве наших представлений. Однако чтобы сделать шаг вперед, одного этого убеждения мало — надо доказать, что старое представление, кажущееся таким естественным, неверно или неполно. В том и состоит прелесть и вечная молодость истинной науки, что предлагаемая ею картина

мира постоянно меняется. Особенно это касается такой еще и в самом деле молодой науки, как молекулярная биология.

На заре молекулярной биологии, в 50-х годах, ответить на вопрос о том, как функционирует молекула ДНК в клетке, ничего не стоило. В самом деле, что нужно объяснить? А вот что: как ДНК удваивается и как на ней синтезируется мРНК. Или, выражаясь на научном языке, как протекают в клетке два главных процесса — репликация ДНК и транскрипция.

Если идут два процесса, то должны существовать два фермента: ДНК- и РНК-полимеразы. Эти белки искали, и их действительно нашли в клетке. Все просто и ясно. Правда, много лет спустя выяснилось, что та ДНК-полимераза, которую при этом обнаружили (ее называют ДНК-полимеразой Корнберга) вовсе не главное действующее лицо при репликации. Оказалось, что эта ДНК-полимераза служит в клетке для залечивания брешей, образующихся в ДНК в процессе репликации и репарации. Самим процессом репликации ДНК ведает в клетке совсем другой фермент.

К счастью, с РНК-полимеразой такой ошибки не произошло. Она действительно оказалась тем самым ферментом, который ведает в клетке транскрипцией. Однако открытие этого фермента отвечало отнюдь не на все вопросы, связанные с синтезом мРНК. В самом деле, РНКовая копия снимается каждый раз не со всей ДНК, а с ее небольшого участка, содержащего один или несколько генов. Что же происходит с другими генами? Если они молчат, то почему? Может быть, есть не одна, а много РНК-полимераз, которым положено «читать» разные гены? Или, может быть, существуют еще другие белки (назовем их репрессорами), которые не подпускают РНК-полимеразу к молчащим генам, не дают их считывать? Какое объяснение предпочесть?

Не будем понапрасну ломать голову. При изучении живой природы сплошь и рядом бывает так, что два или даже более объяснений сосуществуют — в одних случаях годится одно, в других — другое. Так случилось и с проблемой регуляции транскрипции — реализуются обе возможности.

Из кишечной палочки был выделен белок-репрессор, который очень прочно связывается с ДНК у самого начала определенного гена, между промотором и иницирующим кодоном, и не дает РНК-полимеразе считывать этот ген. Так реализовалось одно возможное объяснение.

Потом наступила очередь второго. Когда кишечная палочка заражается бактериофагом Т7, то сначала часть генов фаговой ДНК считывается «хозяйской» РНК-полимеразой. Но потом появляется совсем другая, фаговая РНК-полимераза, которая начинает считывать остальные, так называемые «поздние», гены фаговой ДНК. Так в зараженной клетке происходит процесс «перехода власти» от законного хозяина, ДНК *E. coli*, к вторгшемуся паразиту — фаговой ДНК. Заметим, между прочим, что факт переключения синтеза молекул РНК с ранних на поздние при фаговой инфекции был открыт нашим соотечественником Р. Б. Хесиным и его сотрудниками на рубеже 50-х и 60-х годов.

Считывание РНК с ДНК и тесно связанная с ним проблема синтеза белка по РНКовым матрицам на рибосомах — это центральные темы молекулярной биологии 50-х и 60-х годов. Процесс репликации в то время считался совершенно понятным, а что еще может происходить с ДНК?

И вот в конце 60-х годов стали поговаривать, что, мол, с ДНК все ясно, с проблемой синтеза белка тоже покончено (к тому времени был расшифрован генетический код), и молекулярным биологам пора переключаться на новые проблемы, например, на проблему высшей нервной деятельности мозга. Некоторые, кстати, так и поступили. Потом-то стало ясно, что это был период, когда старые идеи и методы уже исчерпали себя, а новые еще не появились. А многим показалось, что и самих проблем не осталось. Простейшие ответы были возведены в ранг абсолютных истин. Впрочем, все это ясно только теперь — задним умом все крепки — а тогда, наверное, никто не подозревал, что 70-е годы пройдут под знаком ДНК.

Напомним, что основные положения молекулярной биологии, считавшиеся установленными раз и навсегда, сводились к следующему. Все живые организмы на Земле имеют одинаковое устройство самого основного клеточного аппарата, ведающего синтезом белка. Этот аппарат устроен так.

Генетическая информация хранится в виде последовательности нуклеотидов в линейной молекуле ДНК. ДНК можно разбить на непрерывные участки (гены), на каждом из которых записана последовательность аминокислот одного белка. Гены разделены регуляторными участками, с которыми связываются РНК-полимеразы и белки-репрессоры. Гены не могут перекрываться и не могут быть пре-

рваны какими-либо другими последовательностями. С гена, от его начала, считывается РНКовая копия, по которой на рибосомах идет синтез белка согласно универсальному генетическому коду. Таким образом, в клетке идет строго однонаправленный поток информации ДНК → РНК → белок.

Отдельные положения этой схемы, этой главной догмы молекулярной биологии, были доказаны на разных объектах, хотя главным «полигоном» была, конечно, знаменитая кишечная палочка *E. coli*. Но схема получилась настолько простой и естественной, она так хорошо объясняла все генетические данные, что ее универсальность для всего живого не вызвала ни малейших сомнений. Разумеется, некоторые отличия ожидалось при переходе к высшим организмам. Так, предполагалось, что у высших большая часть ДНК будет занята «управленческим аппаратом», т. е. регуляторные участки, сопровождающие гены, будут гораздо более протяженными, чем у бактерий.

«Вот и хорошо», — вправе заключить рассудительный читатель. — «Ученые славно потрудились и общими усилиями выяснили все главные вопросы — от атомного строения молекулы ДНК до того, как она работает в клетке. Теперь пора всем так же дружно заняться решением прикладных задач. Ведь не может же быть, чтобы такой прогресс в понимании самых глубинных жизненных процессов не привел бы к столь же головокружительным успехам в направленном их изменении. О каком кризисе может идти речь?»

Так-то оно так, но вся беда заключалась в том, что, хотя в принципе все казалось понятным, никакой возможности приложить на деле полученные знания не проглядывало. Разумеется, недостатка в разговорах о пересадке генов, о геной инженерии не было. Но дальше разговоров дело не шло. Попытки сделать что-то реальное упирались в отсутствие методов, которые позволяли бы резать ДНК на куски, отделять разные куски друг от друга и потом сшивать их вновь, как того хочет экспериментатор. Без овладения этой техникой все разговоры о геной инженерии оставались маниловщиной.

Разумеется, порвать молекулу ДНК ничего не стоит. Труднее ее не порвать, особенно, если она очень длинная. Но случайные разрывы — это вовсе не то, что нужно. Нужно было научиться рвать все одинаковые молекулы в за-

данном образце строго в одних и тех же местах, то есть точность разрезания не должна превышать размера одного нуклеотида. Но где взять такой скальпель, который позволял бы резать молекулу с точностью до миллиардных долей метра? Это все равно, что научиться нарезать один батон колбасы так аккуратно, чтобы каждому жителю земного шара досталось по кусочку. Да, задача казалась почти безнадежно сложной.

Обсуждали всевозможные проекты. Физики и химики перебирали свои арсеналы средств. А не ударить ли по ДНК лазером? А может быть, ее чуть-чуть подплавить, и потом подействовать ферментом, расщепляющим только одиночную нить? Ведь все молекулы с одинаковой последовательностью должны плавиться в одних и тех же местах. Идея неплохая. Стали пробовать. Оказалось, что так резать ДНК можно, но разные молекулы хоть чуть-чуть, но отличаются по длине. Это отличие составляет несколько десятков нуклеотидов, так что эта методика еще на порядок не дотягивала по своей разрешающей способности до предъявляемых генной инженерией жестких требований.

Да, наступление золотого века генной инженерии, казалось, отодвигалось на неопределенный срок. Но дело было не только в генной инженерии. В проблему разрезания ДНК на куски упиралась и другая задача — задача определения нуклеотидной последовательности. Ведь, несмотря на уверенные рассуждения о промоторах и других регуляторных участках, о генах и всем прочем, ни одна последовательность нуклеотидов в ДНК не была расшифрована. А поэтому и генетический код оставался лишь красивой картинкой, которую приятно повесить на стену, в лаборатории. Ведь код — это словарь для перевода с нуклеотидного языка ДНК на аминокислотный язык белка. А ДНКовых текстов-то и не было!

Расшифровывать последовательности сравнительно коротких полимеров таких, как белки, научились, а вот с ДНК ничего не получалось, прежде всего из-за ее длины. Если бы удалось разбить ее на короткие участки по сотне-другой нуклеотидов, то и прочесть последовательности в них как-то бы удалось. Но как разбить длинную цепь на маленькие куски строго определенным образом? Опять та же проклятая проблема. И опять требовалась та же дьявольская точность — до одного нуклеотида. Мы видим, что молекулярная биология в самом деле оказалась в тупике.

Во всем мире тогда, на рубеже 60-х и 70-х годов, едва ли удалось бы отыскать горстку чудаков, которые считали, что слишком рано ставить точку в фундаментальных исследованиях ДНК, что сложившиеся представления хоть логически и замкнуты, но представляют собой лишь простейшие, еще очень далекие от истины, решения, что природа устроена гораздо сложнее и интереснее. Их никто не слушал. Их не принимали всерьез. А если и выслушивали, то разводили руками. Чего вам не хватает в этом практически законченном здании? Нет, конечно, кое-какие детали еще оставалось выяснить. Но они не дадут ничего принципиально нового. Если вам не жаль попусту тратить время — что же, занимайтесь пустяками. А мы поищем себе занятие поважнее. Что же касается проблемы разрезания ДНК, то это, конечно, достойная задача, но, по видимому, неразрешимая. Стену лбом не прошибешь.

Перелом

На этом фоне произошло событие, в короткий срок изменившее атмосферу. Этим событием, ознаменовавшим начало нового этапа в молекулярной биологии, было открытие в 1970 г. ревертазы — фермента, синтезирующего ДНК по РНКовой матрице, то есть ведущего процесс, как бы обратный транскрипции. Поскольку до этого все прекрасно объяснялось без него, считалось, что такого фермента быть не может. А оказалось, что он существует.

Значит, в клетке возможен обратный поток информации, от РНК к ДНК? Открытие вызвало прямо-таки брожение умов. Стали говорить о ниспровержении всех основ молекулярной биологии, о возможности синтеза РНК по белку, о наследовании благоприобретенных признаков, и бог знает о чем еще. А поскольку ревертазу обнаружили у вирусов, способных вызывать рак у животных, казалось очевидным, что от открытия обратной транскрипции до решения проблемы рака — ну, просто рукой подать...

Но прошли годы, ажиотаж улегся, и фермент ревертаза занял свое, достаточно скромное место в ряду других ферментов. Нет, обратный поток информации в клетке не идет. Просто у некоторых вирусов генетическим материалом служит не ДНК, а РНК. Такие вирусы снабжены ревертазой, чтобы после проникновения в клетку можно было в ней синтезировать вирусную ДНК.

Где ревертаза, действительно, незаменима, так это в генной инженерии. Именно с помощью этого фермента получают ДНК на матрицах РНК, выделенных из клеток человека, чтобы перенести эти ДНК в бактериальную или дрожжевую клетку и заставить эту клетку вырабатывать, например, интерферон или другие нужные для медицины белки. Но об этом мы расскажем ниже.

Открытие ревертазы было важно не только и даже не столько само по себе. Гораздо важнее был психологический эффект. Это открытие показало, что догмы молекулярной биологии вовсе не так незыблемы, как это представлялось. И новые сенсации не заставили себя долго ждать. В течение 70-х годов были обнаружены целые классы ферментов, работающие на ДНК, о существовании которых никто не подозревал. Эти ферменты неслыханно расширили возможность вмешиваться в генетические процессы, то есть они легли в основу новых методов, отсутствие которых застопорило развитие молекулярной биологии в конце 60-х годов. Теперь здесь был сделан гигантский шаг вперед. При этом рухнули казавшиеся незыблемыми представления о строении генов как у вирусов, так и у высших («уцелели» только бактерии). Возникла генная инженерия — прикладная ветвь молекулярной биологии.

Ферменты, с которыми в наибольшей степени связана новая революция в генетике — это рестриктазы. Как и для ревертазы, этим ферментам не было места в логически завершенном здании молекулярной биологии конца 60-х годов. Где-то на самых задворках, правда, маячил неясный вопрос о роли метилирования ДНК. Но ведь никто не говорил, что все отделочные работы в здании закончены и мусор убран — просто почти не было охотников заниматься кропотливой, но неблагодарной работой по выяснению малозначительных деталей. Да и кто будет субсидировать такую скупищу? Ведь, чтобы получить возможность заниматься какой-то научной разработкой, обычно нужно наперед указать, что и когда вы откроете. Говорят, что открывшего ревертазу (и получившего за это Нобелевскую премию) американца Г. Темина собирались уволить перед самым завершением его многолетних поисков фермента. Еле упротил чуть-чуть повременить. А если бы работа еще затянулась?

Но допустим даже, что кто-то пообещал бы в течение пяти или, там, трех лет выяснить роль метилирования в ДНК. Чтобы такое исследование, явно не сулящее фундаментальных открытий, поддерживали, нужно, чтобы оно

могло дать хотя бы практический эффект. В сельском хозяйстве или в медицине. Но это же смешно, какое это может иметь прикладное значение, тем более, что речь шла о метилировании ДНК бактериофагов.

К счастью, любознательность ученых неистребима. А проблема метилирования, хоть и казалась очень частной, все же давала пищу для ума. Было обнаружено, что часть нуклеотидов в ДНК химически модифицируется уже после завершения репликации. Модификация заключается в добавлении к основанию метильной группы (CH_3).

Любопытным было то, что число метилированных звеньев в ДНК было очень мало — одно на тысячи. Значит, фермент метилаза, ведущий этот процесс, должен узнавать какие-то специальные последовательности нуклеотидов. Другой интересный факт: если метилазу вывести из строя (путем мутации), то фаги, созревающие в такой бактерии, оказываются неинфекционными. Такой фаг нормально присоединяется к бактериальной стенке, как положено, впрыскивает внутрь бактерии свою ДНК, но эта фаговая ДНК как бы «растворяется» в клетке.

Что же происходит? Оказалось, что с помощью метилазы бактерия метит ДНК созревших в ней бактериофагов — подобно тому, как пастух метит своих овец. В отличие от пастуха, бактерия делает это как бы себе во вред. Ведь меченый фаг вовсе не безобидная овечка. Проникнув в клетку-хозяйку, он губит ее. Что заставляет бактерию расставлять метки — не совсем ясно. Но если метки нет, то фагу приходится туго. Как пастух не оставит в своем стаде овцу с чужой меткой или вообще без метки, так и бактерия немедленно расправляется с «чужой» ДНК, попавшей в нее. Что служит орудием расправы? По-видимому, какие-то ферменты, узнающие те же последовательности, что и метилазы. И если эти последовательности не прометилированы, клеточные ферменты рвут молекулу ДНК, причем сразу обе комплементарные нити. Такая порванная на куски ДНК уже биологически неактивна.

В поисках ответа на вопрос, как бактерия расправляется с вирусом-чужаком, и были открыты ферменты рестриктазы.

Рестриктазы — это созданный самой природой инструмент для геной инженерии. Поскольку разные бактерии по-разному метят свои ДНК, то были выделены рестриктазы, узнающие самые разные последовательности нуклеотидов. Это дает возможность разрезать ДНК на какие угодно

куски, а затем сшивать их так, как того хочет экспериментатор. В результате получают химерные или рекомбинантные молекулы, состоящие из фрагментов ДНК, выделенных из разных организмов. Сшивают куски неспецифическим ферментом, ДНК-лигазой, способным залечивать разрывы в цепи ДНК. О том, какие удивительные вещи делают и открывают при помощи рестриктаз, будет много рассказано в следующих главах.

ГЛАВА 5

МЫ УМЕЕМ ТАСОВАТЬ ГЕНЫ!

Вековая мечта человека

Наверное, самым важным периодом в истории человечества, определившим дальнейшее развитие цивилизации, было время (от X до V тысячелетий до нашей эры), когда выводились домашние животные и культурные растения. Ведь именно появление домашних животных и культурных растений избавило людей от повседневной заботы о добывании пищи, позволило им вести оседлый образ жизни со всеми вытекающими отсюда социальными, культурными и экономическими последствиями.

До нас дошло мало сведений о том, как проходила эта многовековая селекционная работа. Очевидно, навыки ее передавались и совершенствовались из поколения в поколение. Мы знаем только, что даже сегодня, в наш стремительный век, работа селекционера требует чудовищного терпения и упорства. Обычно после десятилетий каждодневного труда селекционер добивается результатов лишь на склоне лет. А сколько селекционеров так и не дожили до того, что их усилия стали приносить плоды!

К моменту, когда человек стал вмешиваться в живую природу, она уже прошла длительный путь эволюции, причем ветви древа жизни так давно разошлись в разные стороны, что развивались уже как бы совершенно независимо. Природа позаботилась о том, чтобы эти разные ветви (виды) не могли переплетаться между собой: скрещивание представителей разных видов либо вообще невозможно, либо не дает воспроизводящегося потомства. Так, нельзя скрестить кошку с собакой, а мул, помесь осла и лошади, хотя вполне жизнеспособен, но бесплоден.

Этот запрет накладывает колоссальные ограничения на селекционную работу. Фактически селекционеры вынуждены перетасовывать одни и те же гены, с небольшими вариациями. Это как если бы вы пришли в магазин купить колоду карт и вдруг обнаружили, что продаются только такие колоды, в которых все карты одинаковы (в одной — только семерки пик, в другой — только дамы трэф и т. д.). А все различия внутри колод состоят лишь в том, что некоторые карты пропечатались чуть-чуть лучше, некоторые имеют едва заметные пятнышки и т. д. И, как назло, каждая колода имеет свою характерную рубашку, так что их не перемешаешь — сразу по рубашке можно будет узнать карту. Примерно в таком положении находятся селекционеры, которым приходится тасовать, в сущности, почти одни и те же гены. Можно лишь восхищаться тем, каких замечательных результатов удалось достичь им в столь тяжелых условиях.

Но насколько свободно было бы творчество селекционеров, если бы не было межвидовых барьеров! Каких только замечательных гибридов не стремились вывести селекционеры-любители, упорно пытаясь преодолеть эти барьеры. Один из таких гибридов, существующих лишь в пламенном воображении энтузиастов, — растение с клубнями картофеля и плодами помидора. Подобного рода заманчивые гибриды были одно время в большой моде. Сообщалось даже о том, что удалось получить гибрид капусты и редьки. Все в этом гибриде было замечательно — и набор хромосом и способность давать потомство. Правда, он **имел** корни капусты, а ботву — редьки. Долгие годы потом некоторые сатирики и юмористы не могли забыть этот случай.

Следовательно, перетасовка генов — такой же застарелый «пунктик» человека, как превращение одних веществ в другие (философский камень алхимиков). Недаром сказки и мифы изобилуют случаями превращения людей в животных и обратно, а также густо заселены межвидовыми гибридами (кентаврами, фавнами, пегасами, русалками, сиренами и т. д. и т. п.).

Поистине чудотворная черта науки нашего времени состоит в том, что она делает блью одну за другой сказки и легенды, накопившиеся за многие века. Ядерная физика позволила превращать одни элементы в другие. Молекулярная биология преодолела запрет на межвидовое скрещивание. И какими наивными кажутся нам мечты алхимиков

о золоте по сравнению с принципиально неограниченной возможностью производить энергию, и, с другой стороны, устрашающей возможностью истребить все живое на Земле, которые вытекают из нашего умения сегодня превращать одни элементы в другие в ядерных реакторах и бомбах.

Так и кентавры, и русалки кажутся безделками по сравнению с тем, что сулит человечеству генная инженерия — рождающаяся на наших глазах новая технология. Она позволяет тасовать гены организмов, сколь угодно далеко отстоящих друг от друга по эволюционной лестнице, — таких, например, как человек и бактерия.

Генная инженерия возникла как результат всего развития науки о ДНК. Но событием, позволившим непосредственно приступить к перетасовке генов, было открытие ферментов рестриктаз. Рестриктазы узнают определенные, короткие последовательности нуклеотидов и разрезают молекулу ДНК в этом месте. Такие последовательности могут случайно встретиться в любой ДНК. Поэтому если подействовать какой-то рестриктазой на ДНК, скажем, мухи, а одновременно ею же на ДНК слона, то произойдет случайная перетасовка генов мухи и слона. Чтобы получились длинные гибридные, химерные или, как их еще называют, рекомбинантные молекулы, нужно лишь добавить фермент лигазу, сшивающий фрагменты ДНК друг с другом. Так в пробирке можно создать какие угодно комбинации генов, причем все они заведомо никогда не реализовались в живой природе из-за запрета на межвидовое скрещивание.

Но одно дело — создать химерную молекулу ДНК в пробирке, а совсем другое дело сделать так, чтобы она была биологически активна, чтобы могла размножаться в составе живой клетки да еще менять генетические свойства клетки. В этом и состоит основная проблема геной инженерии. Сразу же подчеркнем, что проблема эта еще далека от своего окончательного решения. Более того, в ходе работы возникли совершенно новые трудности, о которых даже не подозревали, когда работа начиналась. Однако наряду с многочисленными трудностями природа приготовила для генных инженеров замечательный подарок в виде совершенно особых организмов, плазмид. Все достигнутые до сих пор успехи геной инженерии связаны с плазмидами.

Плазмиды

Когда в начале 50-х годов Джошуа Ледерберг открыл плазмиды, ничто, казалось, не предвещало этому открытию громкой славы. Собственно, все, что обнаружил Ледерберг, так это то, что в кишечной палочке, кроме основной ДНК, которая нормально не переходит из одной клетки в другую, есть еще маленькие молекулы ДНК, которые он назвал плазмидами и которыми бактериальные клетки охотно обмениваются. У высших организмов, кроме основной, ядерной, ДНК также существуют маленькие ДНК в цитоплазме, так что открытие плазмид у бактерий поначалу не вызвало особого интереса.

О плазмидах заговорили, причем не столько молекулярные биологи, сколько медики, после того как в 1959 г. японские исследователи обнаружили, что неэффективность хорошо зарекомендовавших себя антибиотиков при лечении дизентерии у некоторых больных обусловлена тем, что бактерии, которыми заражены эти пациенты, несут в себе плазмиду, содержащую сразу несколько генов устойчивости к разным антибиотикам.

Оказалось, что вообще гены устойчивости к антибиотикам, то есть те гены, из-за которых осложнилась в последние годы борьба с бактериальными инфекциями, всегда располагаются в плазмидах. Способность свободно переходить из одной бактерии в другую приводит к тому, что плазмиды, несущие такие гены, очень быстро распространяются среди бактерий, как только начинается широкое применение того или иного антибиотика. Стафилококковая инфекция, ставшая буквально бичом хирургических клиник, обязана своей дьявольской стойкостью тоже плазмидам.

Столь печальная известность привлекла к плазмидам самое пристальное внимание и медиков, и молекулярных биологов. Тщательное изучение плазмид привело к заключению, что это самостоятельные организмы совершенно особого типа. До этого считалось, что простейшие объекты живой природы — это вирусы. Вирусы всегда состоят из нуклеиновой кислоты (обычно ДНК, иногда РНК), помещенной в белковый чехол. Вне клетки вирус — просто комплекс сложных молекул. То, что свободный вирус больше похож на объект неживой природы, чем на живое существо, было ярко продемонстрировано еще до Второй мировой войны, когда из вирусов научились выращивать кристаллы. Однако, попадая в клетку, вирус как бы оживает,

становясь искусным, а следовательно, очень опасным хищником. Он начинает активно вмешиваться в работу клетки, переключает ресурсы клетки на удовлетворение своих нужд и в конце концов губит ее, сам при этом стократно умножаясь. Казалось бы, что может быть совершеннее и в то же время проще?

Плазмида вне клетки — это просто молекула ДНК. Внутри же клетки она ведет вполне «осмысленное» существование, используя часть ресурсов клетки для своего размножения, но строго ограничивая свои собственные аппетиты, чтобы не погубить клетку. В этом смысле плазмида ведет себя умнее вируса. Ведь губя клетку, вирус «рубит сук», на котором сам сидит. Плазмида же размножается вместе с клеткой-хозяйкой. Если вирус можно уподобить алчному хищнику, то плазмида напоминает домашнее животное, особенно собаку. Как у людей бывает одна собака, бывает несколько, а иногда и вовсе ни одной, так и у бактерий может быть одна плазмида, несколько или не быть вовсе. В благоприятных внешних условиях все эти клетки чувствуют себя примерно одинаково. Только иметь плазмиды чуть накладнее — их, подобно собакам, нужно кормить. Но вот условия изменились, клетка попала во враждебное окружение, скажем, в среде появился пенициллин, и плазмида, подобно верному псу, бросилась на борьбу с врагом. Вырабатываемый ею фермент, пенициллиназа, разрушает пенициллин, позволяя клетке выжить. Поэтому сосуществование плазмиды и бактериальной клетки — взаимовыгодный союз или, как говорят биологи, симбиоз.

Хозяин может отдать одну из своих собак другому, так и бактерии способны обмениваться плазмидами. Вот это свойство плазмид легко переходить «из рук в руки», доставляющее столько хлопот медикам, оказалось как нельзя кстати для генных инженеров. Если плазмиды извлечь из бактерий, вставить в них чужую ДНК, а затем примешать такие гибридные плазмиды к бактериальным клеткам, то по крайней мере часть гибридов будет успешно размножаться в бактериях. Иными словами, благодаря крайней простоте своего устройства плазмиды оказались теми организмами, которые легко переносят хирургическое вмешательство — встройку в них чужеродных генов. Более сложные организмы, даже вирусы, такую операцию переносят гораздо болезненнее.

Используя рестриктазы, получают гибридные плазмиды, содержащие фрагменты ДНК из любых организмов. Затем

гибридные плазмиды размножают вместе с бактерией-хозяйкой, и так удается многократно умножить включенный чужеродный участок ДНК. Эта процедура получила название клонирования. Клонируют, при помощи плазмид, любые участки ДНК. Этот прием дал молекулярным биологам уникальную возможность манипулировать генами, причем не только бактерий и вирусов, но и высших организмов. Это открыло путь к замечательным открытиям, о которых будет рассказано в следующих главах. Но главная цель генной инженерии — научиться получать в клетках одного вида конечные продукты генов другого вида, то есть белки.

Бактерия вырабатывает нужный нам белок

В плазмиду можно встроить участок ДНК, взятый откуда угодно, скажем, ген человека, и она внутри бактерии начинает вырабатывать белок, соответствующий человеческому гену. Это и есть тот трюк, который генные инженеры научились проделывать с проворством искусных магов. При этом используется один из трех приемов.

Первый прием был популярен на заре генной инженерии, в середине 70-х годов, когда в плазмиду встраивали, в основном, гены кишечной палочки или других бактерий. Он совсем прост. ДНК, один из генов которой хотят встроить, случайным образом дробят на куски. При этом даже не обязательно использовать рестриктазы. Затем такую случайно нарубленную ДНК примешивают к плазмиде, разрезанной рестриктазой в одном месте, и добавляют лигазу. Разные плазмидные молекулы захватывают разные куски ДНК, так что в результате получается масса различных плазмид. Весь этот «винегрет» добавляют к бактериальным клеткам.

Главная проблема в таком подходе — отобрать нужный штамм, несущий плазмиду с попавшим в нее искомым геном. Если существует критерий такого отбора, то этим методом можно получить хороший результат. И все же, хотя этим методом и был получен ряд ценных штаммов, вырабатывающих тот или иной бактериальный белок, за ним недаром закрепилось название «метод дробовика». Он действительно напоминает стрельбу из дробовика, причем с закрытыми глазами. В этом раннем методе генной инженерии еще слишком большая роль отводилась случаю — случайная фрагментация, случайное встраивание. Все по-

пытки получить с его помощью штаммы, вырабатывающие белок высшего организма, окончились полным провалом.

Поэтому в последние годы стали использовать два целенаправленных метода, с помощью которых и были достигнуты результаты, наделавшие столько шума. Первый метод состоит в том, что из клетки выделяют мРНК, отвечающую данному белку. С этой РНК с помощью ревертазы снимают ДНКовую копию, то есть получают нужный ген. Далее химическими методами к нему пришивают необходимые регуляторные участки (инициирующие и терминирующие кодоны), и встраивают в строго определенное место плазмиды. При этом используются плазмиды, специально сконструированные для целей генной инженерии. В такой плазмиде есть все, что необходимо для ее существования в бактериальной клетке, а также подготовлен промоторный участок, начиная с которого РНК-полимераза клетки считает любой ген, который будет встроен сразу вслед за промотором. Сюда и встраивают нужный ген.

Другой метод состоит в прямом химическом синтезе гена, исходя из нуклеотидной последовательности ДНК, которая должна соответствовать выбранному белку. Из-за вырожденности кода может быть много разных последовательностей, и экспериментатор волен выбирать, какую из них предпочесть. К синтетическому гену пришивают регуляторные участки и встраивают в плазмиду.

Плазмиду, несущую искусственный ген, добавляют к бактериальным клеткам. Чтобы отобрать только те бактерии, которые несут нужную плазмиду, поступают следующим образом. Наряду с нужным геном в плазмиду включают ген устойчивости к какому-либо антибиотику или даже целый тандем генов, обеспечивающий устойчивость сразу к нескольким антибиотикам. Клетки растят на среде, содержащей эти антибиотики. Этот прием не только обеспечивает отбор нужных бактерий, но и не позволяет им избавляться от искусственных плазмид. Существуют также методы, позволяющие заставить каждую клетку содержать не одну-две, а тысячи копий плазмиды. Использование этих приемов позволяет добиться фантастической производительности по отношению к белку, закодированному во встроенном гене. Есть случаи, когда этот белок по массе составляет чуть ли не половину всего белка клетки.

Разработка технологии, позволяющей заставлять бактериальную клетку вырабатывать в больших количествах

любой белок, ознаменовала начало нового этапа научно-технической революции — эры биотехнологии.

Но прежде всего эта новая технология произвела переворот в самих молекулярно-биологических исследованиях. Дело в том, что каждый конкретный белок производится клеткой, как правило, в очень малом числе, нередко всего по одной-две молекуле на клетку. В результате выделение индивидуального белка, нужного для экспериментов, превращается в труднейшую и весьма дорогую процедуру. Чтобы получить миллиграммы белка, приходится перерабатывать десятки килограммов, если не тонны, биомассы. Но все равно очистить как следует белок, когда он присутствует в столь малой концентрации, не удастся. Отсюда — чрезвычайная дороговизна многих белковых препаратов и их недостаточная чистота.

Генная инженерия радикально изменила ситуацию. Уже есть генноинженерные штаммы — суперпродуценты многих белков, о получении которых в чистом виде еще пять лет назад нечего было и думать. Резко расширился ассортимент и упали цены на ферментные и другие белковые препараты, выпускаемые фирмами, обслуживающими молекулярно-биологические исследования. Невиданно ускорились научные исследования. Молекулярная биология получила новый мощный импульс.

ГЛАВА 6

ДНКОВЫЕ ТЕКСТЫ

Еще раз о кризисе

К концу 60-х годов в молекулярной биологии сложилась парадоксальная ситуация. К тому времени были довольно хорошо разработаны методы определения последовательности аминокислот в белках (первый белок — инсулин, был расшифрован еще в самом начале 50-х годов). Банк белковых последовательностей быстро пополнялся все новыми текстами. Был полностью расшифрован генетический код — словарь для перевода ДНКовых текстов на белковый язык. Но вот парадокс: не было прочитано ни одного ДНКового текста!

Конечно, куски текста можно было попытаться прочесть, так сказать, обратным ходом, исходя из белковых последо-

вательностей. Но, во-первых, такое восстановление неоднозначно из-за вырожденности кода, а, во-вторых, и это самое главное, так не узнаешь, что стоит в промежутках между генами. А как раз генетические знаки препинания казались самым интересным, ведь это должны были быть регуляторные участки, управляющие работой РНК-полимераз и других белков, взаимодействующих с ДНК.

Фактически решение всех насущных вопросов молекулярной биологии уперлось в необходимость уметь читать последовательности ДНК. Как уже знает читатель, главной палочкой-выручалочкой, выведшей молекулярную биологию из состояния застоя, были рестриктазы. Они не только позволяли тасовать гены, но и сделали реальным определение последовательности нуклеотидов в ДНК. Ведь главная трудность заключалась в том, что молекулы ДНК очень длинные. Рестриктазы позволили разрезать длинные молекулы на достаточно короткие куски. Но оставалось решить еще две проблемы: научиться разделять фрагменты и определять последовательность в каждом из них.

Гель-электрофорез

На помощь пришла простая физическая методика, называемая электрофорезом. Молекула ДНК несет на себе отрицательный заряд, причем величина заряда пропорциональна длине цепочки. Это следствие обычной электролитической диссоциации дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая, как и любая кислота, распадается на анион и ион водорода. Только происходит это в каждом мономерном звене поликислоты. Диссоциирует водород фосфатной группы, которая расположена слева на рис. 9. Второго водорода у фосфатной группы, входящей в состав ДНК, нет, так как он отщепляется от нуклеотида при образовании полимерной цепи. При этом соседний нуклеотид теряет группу OH сахара (см. нижнюю часть химической формулы, приведенной на рис. 9), так что при присоединении нуклеотида к концу полимерной цепи ДНК выделяется молекула воды.

Конечно, каждому отрицательному заряду фосфатной группы ДНК соответствует положительный заряд катиона. Обычно это ион натрия, а вовсе не водорода, так как хотя ДНК и называют кислотой, на самом деле она всегда — соль. Так что буква «К» в знаменитом сокращении «ДНК» — это плод чистейшего недоразумения. Ведь никто не назы-

вает поваренную соль соляной кислотой! Но ничего не попишешь — название укоренилось навеки. Придется нам и далее называть соль ДНК просто ДНК.

Катионы в большинстве своем не сидят на ДНК, а плавают отдельно в растворе, образуя вокруг молекулы очень рыхлое облако. Поэтому, если раствор ДНК поместить в конденсатор, то анион ДНК поплывет к положительной обкладке. Чем длиннее молекула, тем больше заряд, больше сила, но больше и сопротивление среды. Сопротивление увеличивается с длиной быстрее, чем сила, и в результате скорость падает с ростом длины. Тут работает закон Стокса, согласно которому в вязкой среде тела, под действием силы, движутся с постоянной скоростью, пропорциональной приложенной силе.

Таким образом, поместив в электрическое поле смесь, состоящую из фрагментов ДНК разной длины и выключив через некоторое время поле, мы обнаружим, что наша смесь распалась на несколько скоплений фрагментов, причем в каждом таком скоплении все молекулы будут иметь строго одинаковую длину. Это произойдет потому, что фрагменты разной длины сместятся за данное время в поле на разные расстояния от исходной точки, а одинаковые — на одно и то же расстояние. Правда, если на самом деле все это продумать, то разделения молекул по их длине добиться не удастся — вместо отдельных скоплений получится размазня. В чем же дело?

Все портит броуновское движение. Фрагменты ДНК — очень маленькие частички, и на их поведение в растворе весьма заметно влияет тепловое движение. Поэтому электрофорез — как будто бы никуда не годный метод разделения ДНК. Так думали долгое время. Все же выход был найден. Хотя броуновское движение нельзя устранить, его можно сильно ослабить, увеличив вязкость среды. Правда, чтобы эффект стал ощутимым, вязкость необходимо увеличить во много тысяч раз. Ни глицерин, ни сахар здесь не помогут. Пришлось прибегнуть к принципиально иным средствам повышения вязкости.

Из повседневного опыта мы знаем, что существуют вещества, вроде бы жидкие, но долго сохраняющие приданную им форму. Это — студни, желе. В науке и технике за ними закрепилось название «гели». Что же они из себя представляют, эти гели, и чем обусловлены их необычные свойства?

Гель — это концентрированный раствор полимера, в котором полимерные молекулы сильно перепутаны, а кое-

где сшиты друг с другом химическими связями. В результате весь гель пронизывает единая трехмерная полимерная сеть, ячейки которой заполнены растворителем. Эта сеть служит как бы арматурой, придающей всей конструкции необычную для жидкости жесткость. Полимерная арматура составляет по массе ничтожную часть всего геля — несколько процентов. Основная масса геля приходится на растворитель. Способность переходить в гелеобразное состояние — одно из поразительных свойств макромолекул, которое еще ждет своего всестороннего изучения и технических применений.

Живая природа широко использует замечательные свойства гелей. Роговая оболочка и стекловидное тело, заполняющее всю внутреннюю часть глаза, есть не что иное, как гели. Полимерным компонентом служат белки, растворителем, разумеется, — вода. Издавна гели используются человеком в кулинарном деле. Студни и желе содержат в качестве полимерного компонента белок соединительной ткани — коллаген. Пожалуй, еще чаще мы сталкиваемся с другим белковым гелем — сваренным вкрутую (или всмятку) яичным белком. Мармелад — это тоже гель.

Использование геля как среды, где проводится электрофорез, полностью устранило трудность, связанную с броуновским движением. Червеобразные молекулы ДНК, подобно угрям, запутавшимся в рыбацкой сети, оказываются фиксированными в полимерной сетке геля. Лишь под действием электрического поля они очень медленно ползут, извиваясь, к аноду, едва протискиваясь сквозь тесные ячейки сетки. Разрешающая способность метода гель-электрофореза оказалась настолько высокой, что не слишком длинные фрагменты ДНК, отличающиеся всего на одно мономерное звено, четко отделяются друг от друга в виде хорошо различимых полосок.

Как читают ДНКовые тексты

Итак, с помощью рестриктаз можно нарезать ДНК на множество фрагментов. Метод гель-электрофореза позволяет выделить каждый фрагмент в изолированном виде. Это делается совсем просто — после выключения электрического поля гель разрезают обычным скальпелем на кусочки, чтобы каждый кусочек содержал одну полоску, одно скопление фрагментов ДНК строго определенной

длины. Остается только прочесть последовательность каждого из фрагментов. Но как это сделать?

Над этой проблемой бились многие годы. На какие ухищрения только ни шли! Предлагали, например, пришивать к каждому нуклеотиду данного сорта, скажем, к адениновому, соединение, содержащее атомы урана и смотреть в электронный микроскоп, в который такие тяжелые атомы можно, в принципе, разглядеть, как эти метки распределены вдоль цепи одиночной нити ДНК. Затем пришивать к тиминовым и т. д. Однако, несмотря на многолетние усилия, получить вразумительные результаты не удалось.

В конце концов проблема была решена чисто химическим методом. Идея метода была предложена советским ученым Е. Д. Свердловым (Институт биоорганической химии АН СССР) в 1972 — 1973 гг. Окончательно она была реализована в 1977 г. американскими учеными А. Максом и У. Гилбертом. Поясним сущность метода на примере одонитевых фрагментов ДНК. На практике метод может использоваться и для двунитевых фрагментов.

Итак, пусть у нас есть образец, состоящий из тождественных друг другу одонитевых фрагментов ДНК с неизвестной последовательностью. Прежде всего к одному (определенному) концу фрагмента (напомним, что одиночная нить ДНК имеет направление — ее концы отличаются друг от друга) пришивают с помощью специального фермента радиоактивный фосфор ^{32}P . Будем называть меченый конец началом. Другой конец каждой молекулы не несет метки. Далее образец делят на четыре части. К первой добавляют вещество, рвущее нить ДНК после любого аденинового нуклеотида (А). Реакция ведется с таким расчетом, чтобы в среднем приблизительно один А на фрагмент был атакован. Из исходной смеси фрагментов строго равной длины реагент сделает набор фрагментов разной длины. При этом нас интересуют только те фрагменты, которые несут радиоактивную метку. Если, скажем, А стоят в исходном фрагменте на местах 1, 3, 7, 13, 21, 25 и 26, то под действием реагента обязательно появятся несущие метку фрагменты длиной в 1, 3, 7, 13, 21, 25 и 26 нуклеотидов, но не будет ни одного такого фрагмента другой длины.

Аналогичным образом три другие части исходного раствора обрабатываются веществами, рвущими цепь после Т, Г и Ц. Затем все четыре образца параллельно разгоняются в одном и том же аппарате для гель-электрофореза. После выключения поля на гель накладывают фотопла-

стинку, на которой отпечатываются те полоски в геле, которые несут метку (именно поэтому длины немеченных фрагментов не имеют значения). Результат такого эксперимента схематически показан на рис. 16. Последовательность непосредственно читается по электрофореграмме. Она приведена слева. Длина фрагмента, который может быть расшифрован этим методом, ограничивается разрешающей способностью метода гелеэлектрофореза.

Реально за один опыт удается прочесть фрагменты длиной по 300-500 звеньев. Это очень высокая производительность, не доступная существующим методам определения последовательности в белках.

Для того чтобы определить последовательность всей молекулы ДНК, очевидно, недостаточно определить последовательности всех ее фрагментов, полученных при разрезании ее на куски. Необходимо еще знать, в каком порядке стыковать фрагменты. Чтобы это узнать, надо нарезать ДНК еще раз с помощью другого набора рестриктаз и вновь определить последовательности фрагментов. По перекрыванию последовательностей, полученных при различных способах разрезания, удастся установить порядок следования фрагментов. Эту работу делает ЭВМ.

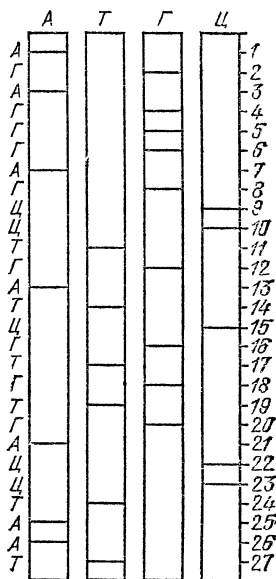


Рис. 16. Метод Свердлова — Максама — Гилберта (схема).

Первые неожиданности

В науке, да и не только в науке, часто бывает так, что находят вовсе не то, что ищут. Все ждали от первых последовательностей интересных сведений об устройстве промежутков между генами. Было множество предположений о том, как они должны быть устроены. Однако данные оказались разочаровывающими. Ничего особенного, в общем-то, не нашли — последовательности как последовательности. Ожидали, что расшифровав последовательно-

сти нескольких промоторов, которые узнает одна и та же РНК-полимераза, можно будет сразу догадаться, как она это делает. Ан, не тут-то было! Хотя последовательности оказались чем-то похожими друг на друга, но чем именно, — не вполне ясно. Так пока и непонятно, как белки узнают определенные последовательности ДНК, каковы принципы такого узнавания. Это одна из проблем, еще ждущих своего решения.

Чего ожидали меньше всего, так это каких-то неожиданностей в самих генах, то есть в участках ДНК, кодирующих последовательности аминокислот в белках. Ведь код, казалось, был твердо установлен, было четко известно, что каждому белку отвечает свой определенный участок ДНК, который, собственно, и есть ген. Короче, все опять свято верили в незыблемость основной догмы молекулярной биологии. От шока, вызванного открытием ревертазы, к середине 70-х годов уже оправились. И вот расшифровывали первую ДНК — из вируса кишечной палочки, известного под кодовым названием ФХ174 (читается «фи-десять-сто-семьдесят-четыре»). И вдруг оказалось, что у него на одном и том же участке ДНК записана информация о двух белках!

Как же это может быть? Представьте себе, в руки вам попала книга, в которой промежутков между словами нет, а слова разделяются стрелками. Сверху строк стоят одни стрелки, а внизу — другие. Деля текст на слова с помощью верхних стрелок, вы читали бы допустим «Анну Каренину», а по нижним «Поднятую целину». Скажете, это невозможно? Действительно, такого длинного текста, насколько я знаю, не существует. Но короткий текст такого типа я помню с детства. Вот он:

	↓	↓	↓	↓	↓	↓
НА	ПО	ЛЕ	ОН	КО	СИ	ЛТ
	↑	↑	↑	↑	↑	↑
СО	ЛОВЬ	ЯМИ				

А как обстоит дело у ФХ174 — показано на рис. 17.

Мы видим, что последовательность гена Е находится целиком внутри последовательности гена D. При этом последовательности аминокислот белков Е и D не имеют между собой ничего общего, так как они считываются со сдвигом фазы считывания. В этом ситуация в ДНК ФХ174 неожиданней и интересней, чем приведенный выше лингвистический пример. Ясно, что теоретически возможна запись

одного организма в другой, предполагает универсальность кода. Выяснилось, что гены, перенесенные в кишечную палочку из самых разных бактерий, прекрасно в ней работают, то есть синтезируют те же белки, что и в исходной, родной бактерии. Когда брали мРНК, выделенную из животных, включая человека, по ней с помощью ревертазы синтезировали ген, а затем встраивали его в бактерию, то вырабатываемый бактерией белок имел ту же последовательность аминокислот, что и белок, непосредственно выделенный из животных клеток. Казалось бы, какие еще нужны доказательства? И вот оказалось, что у митохондрий код другой.

Коды митохондрий

Что это такое, митохондрии? Это не бактерии и не вирусы, не одноклеточные, это просто тельца, плавающие в цитоплазме клеток эукариот, т. е. организмов, клетки которых имеют ядра. Просто, да не совсем. Вообще-то митохондрии выполняют очень важную для клетки функцию — в них идет процесс окислительного фосфорилирования, то есть происходит переработка энергии, образующейся при «сгорании» пищи, в энергию АТФ. Иными словами, митохондрия — это энергетическая станция клетки. Подобно тому как электричество — универсальный источник энергии у нас в быту, так и АТФ — универсальный источник энергии для клеточных ферментов.

АТФ — это адениновый нуклеотид, к фосфату которого присоединены еще две фосфатные группы. Его полное имя — аденозинтрифосфат. Забирая энергию у АТФ, фермент отщепляет у него одну фосфатную группу, делая из него АДФ, т. е. аденозиндифосфат. В митохондриях происходит «подзарядка» — к АДФ вновь присоединяется фосфатная группа. Но к нашему рассказу все это не имеет прямого отношения. Для нас важно другое: митохондрии имеют свою собственную ДНК. Более того, митохондрии располагают своей собственной РНК-полимеразой, которая снимает мРНКовую копию с митохондриальной ДНК! Но и это не все. В митохондриях есть свои рибосомы, свой собственный аппарат белкового синтеза. Это уже совсем странно — ведь в той же цитоплазме множество нормальных клеточных рибосом. Но на этих рибосомах синтезируется белок только с мРНКовых копий ядерной ДНК. Митохондрии ими пользоваться почему-то не желают.

У митохондрии все — малого размера. Мини-рибосомы, мини-РНК-полимераза, мини-ДНК. И вроде бы это понятно — ведь митохондрия, разумеется, гораздо меньше клетки. Но умение самостоятельно строить белок вовсе не означает, что митохондрия — это автономная часть клетки, не зависящая от ядерной ДНК. ДНК митохондрии столь мала по размеру, что на ней никак не может уместиться вся информация о молекулах белков, необходимая для автономного существования митохондрий. Большая часть этой информации находится в ядре клетки, то есть записана в виде последовательности нуклеотидов в ядерной ДНК. И вот ко всем странностям митохондрий добавилась еще одна, самая удивительная, — у митохондрий свой собственный генетический код.

Обнаружилось все это, по-видимому, случайно. Б. Берелл и его сотрудники из Лаборатории молекулярной биологии в Кембридже (Англия) занимались расшифровкой последовательности митохондриальной ДНК человека. Кстати, это тот самый Берелл, который обнаружил впервые, что гены могут налезать друг на друга. Сравнили последовательность гена, кодирующего одну из субъединиц цитохромоксидазы, с белковой последовательностью, правда, не человеческой, а бычьей цитохромоксидазы. Последнее обстоятельство не помешало совершенно точно определить код митохондрий человека. Он изображен на рис. 18.

Видно, что этот код в целом похож на код, уже известный ранее. Но четыре кодона изменили свой смысл. Кодон УГА отвечает триптофану, а АУА — метионину, а кодоны АГА и АГГ стали терминирующими. Но на этом чудеса не кончились. Когда сравнили последовательности ДНК и белков у дрожжевых митохондрий, то оказалось, что у них код и не такой, как обычно, и не такой, как у митохондрий человека. К тем изменениям, которые имеются у кода митохондрий человека, добавилось еще такое: все четыре лейциновых кодона, начинающихся с ЦУ, перешли к треонину. Треонину стало отвечать восемь кодонов! У лейцина осталось только два: УУА и УУГ. Правда, кодон АУА «вернулся» к Иле, как в «универсальном» коде.

Как же оценивать эти открытия? Безусловно, возможны разные трактовки. Можно сказать, что собственно ничего особенного и не произошло. Если бы сразу в процессе расшифровки были обнаружены маленькие вариации в коде, то они не вызвали бы тогда большого удивления. Правда, за прошедшие годы отношение к коду значительно измени-

лось. За эти годы привыкли считать код абсолютно универсальным. Кто осудит теперь тех, кто метнется в другую крайность и начнет поиск новых кодов? Ведь шутка ли сказать, оказалось, что в одной клетке, причем в нашей собственной, человеческой клетке, существуют два разных кода!

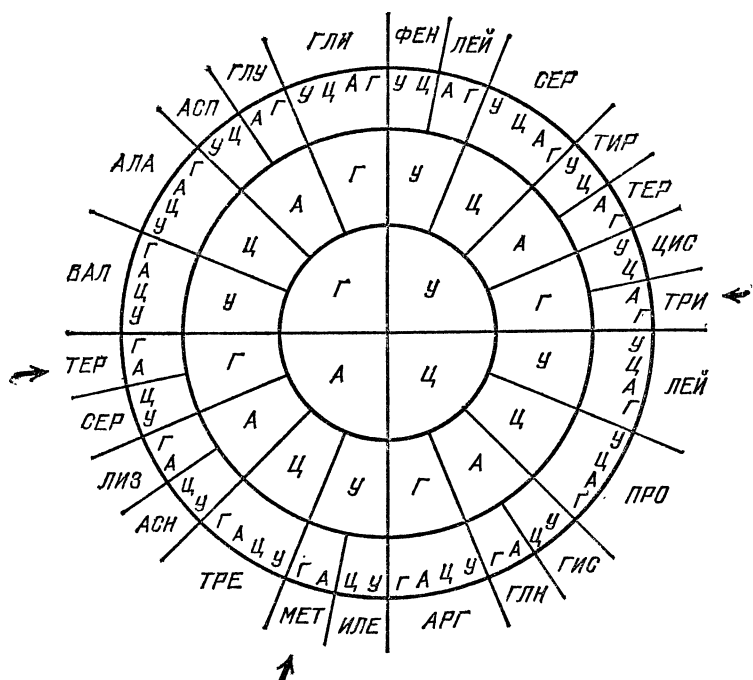


Рис. 18. Код митохондрий. Такой код имеют митохондрии человека. У митохондрий дрожжей кодоны, начинающиеся с ЦУ, кодируют треонин, а кодон АУА отвечает Иле. Стрелками указаны те места, в которых код митохондрий человека отличается от «универсального» кода, приведенного на рис. 6.

Нет, открытие новых кодов не следует недооценивать. Ведь получены первые доказательства того, что код эволюционировал, что он не сразу возник таким, каким мы его видим теперь.

Неоднократно высказывалась точка зрения, что митохондрия — это остатки одноклеточного организма, очень давно образовавшего симбиоз с эукариотической клеткой. То, что у митохондрии даже код другой, служит еще одним

очень веским доводом в пользу такого предположения. Быть может, у всех клеток был такой же код, как у нынешних митохондрий человека, а затем в коде произошли небольшие изменения. И, может быть, далеко не все живое на Земле произошло от клеток с уже изменившимся кодом? Может быть, часть видов — это прямые потомки древних клеток, имевших митохондриальный, «идеальный» код? А может быть, есть виды, которые эволюционировали от клеток, получившихся после каких-то других, пусть небольших, изменений «идеального» кода?

Но есть и другая точка зрения. Согласно ей, коды митохондрий не более древние, а наоборот, более молодые, чем основной код, и возникли, когда большая часть митохондриальных генов уже перешла в ядро. В митохондриальной ДНК осталось так мало генов, что изменение кода перестало быть обязательно смертельным событием для митохондрии и клетки в целом. После того, как такое изменение произошло из-за мутации в аппарате синтеза белка, в структурных генах произошли мутации, компенсирующие эти изменения кода. После этого процесс перехода генов из митохондрий в ядро прекратился, так как аппарат синтеза белка митохондрий не мог уже быть подменен аппаратом клетки. Эта гипотеза привлекательна тем, что объясняет, почему передача генов из митохондрий в ядро остановилась на полдороге.

Словом, неуниверсальность кода может оказаться лишь исключением, которое подтверждает общее правило, а может предвещать и более важные открытия.

ГЛАВА 7

ОТКУДА БЕРУТСЯ ГЕНЫ?

Теория эволюции и генетика

Между генетикой и теорией эволюции всегда были довольно сложные отношения. Эти науки опираются на весьма надежные, но принципиально различные методы исследования. Эволюционная теория выросла из анализа всего многообразия живущих на Земле существ. Это наблюдательная наука, подобная астрономии. В отличие от нее, генетика носит сугубо экспериментальный характер и весьма схожа с физикой. (Не случайно основоположник генетики

Грегор Мендель получил солидное физическое образование— он учился у К. Доплера.) Нет нужды доказывать, что наблюдательная наука, вообще говоря, очень сильно уступает в скорости и возможностях развития науке экспериментальной. Достаточно сравнить прогресс в эволюционной теории и в генетике, достигнутый за истекшую часть нашего века. Конечно, в действительности между наблюдательной и экспериментальной науками нет и не должно быть соревнования. Их уместнее уподоблять супружеской чете, а не двум спортсменам на дистанции. Но, как и между супругами, между ними, конечно, возможны разногласия, а порой даже бурные споры.

По мере того как множились успехи генетики (особенно с переходом ее на молекулярный уровень), все более разразился конфликт между нею и теорией эволюции, конфликт, который возник еще в начале века. Суть его состоит в следующем.

Теория эволюции зиждется на двух китах: изменчивости и отборе. Генетика как будто вскрыла механизм изменчивости — в его основе лежат точечные мутации в ДНК. Но та ли это изменчивость, которая способна объяснить эволюцию? Прозорливые умы уже довольно давно поняли, что на такой изменчивости далеко не уедешь. Все новое, что мы узнали в ходе развития молекулярной генетики, подтвердило эти сомнения.

В самом деле, точечные мутации приводят к заменам отдельных аминокислот в белках, в частности, ферментах. Слово «точечная» означает, что в результате мутации может быть заменен только один аминокислотный остаток в одном из белков целого организма. Мутации чрезвычайно редки, и одновременное изменение даже двух аминокислотных остатков в одном белке совершенно невероятно. Но к чему может привести одиночная замена? Она либо окажется нейтральной, то есть не повлияет на функцию фермента, либо ухудшит его работу.

Это то же самое, что приделывать к автомобилю хвост от самолета. Автомобиль не полетит, но ездить еще будет (правда, несколько хуже). Такова нейтральная мутация. А если приделывать к автомобилю правое крыло, то он опять-таки не полетит, но и ездить на нем вы не сможете: будете задевать за все фонарные столбы. Или вам придется ездить по левой стороне дороги, что очень скоро приведет к катастрофе. Кстати, с левым крылом тоже далеко не уедешь, да и полететь шансов мало.

Ясно, что превратить автомобиль в самолет просто так не удастся, нужна радикальная переделка всей машины. То же самое и с белком. Чтобы превратить один фермент в другой, точечными мутациями не отделаешься — придется существенно менять аминокислотную последовательность.

Отбор в этой ситуации не помогает, а, наоборот, очень сильно мешает. Можно было бы думать, что, последовательно заменяя по одному аминокислотные остатки, удастся в конце концов сильно переделать всю последовательность, а значит, и пространственную структуру фермента. Однако в ходе этих малых изменений неизбежно наступит время, когда фермент уже перестанет выполнять свою прежнюю функцию, но еще не начнет выполнять новую. Тут-то отбор его и уничтожит — вместе с несущим его организмом. Придется все начинать сначала, причем с теми же шансами на успех. Как преодолеть эту пропасть? Как сделать, чтобы старое не отбрасывалось до тех пор, пока создание нового не будет завершено?

Классическая генетика не могла предложить модель, которая допускала бы испытание новых вариантов без полного отстранения старых. Это и создало острый конфликт между генетикой и эволюционной теорией.

Успехи в исследовании генетической организации бактерий усугубили конфликт. Бактерии, посредством плазмид, довольно охотно обмениваются уже имеющимися генами. Это придает им способность быстро меняться. Взять, например, гены устойчивости к антибиотикам. Эти гены вовсе не возникают вновь и вновь у каждой бактерии, которая «привыкает» к данному антибиотику, как думали когда-то, а попадают к ней в готовом виде извне вместе с плазмидой. По-видимому, вообще источником этих генов, в конечном счете, являются сами продуценты антибиотиков, которые с самого начала должны были их иметь, чтобы защищать себя от своих же ядов.

Может быть, так же, на основе перегруппировки готовых генов, можно объяснить изменчивость и у высших организмов? Но тогда получается, что гены возникли однажды, раз и навсегда, а эволюция только тасует их как колоду карт. Новые признаки — это лишь новые комбинации старых генов. Самое неприятное в этой схеме то, что она вроде бы объясняет весь комплекс наблюдений, на котором базируется эволюционная теория. И многовековой опыт селекционеров ни в коей мере не противоречит этому. Все, что ими

достигнуто — это результат перетасовки генов, заранее заготовленных природой. Но вместе с тем остается без ответа главный вопрос — откуда все-таки взялись сами эти гены?

Итак, дарвиновский вопрос о происхождении видов превращается в вопрос о происхождении генов.

Может быть, на свете есть фабрика, на которой делаются новые гены, проверяются и отбраковываются негодные? А может быть, такое производство существовало когда-то, на ранних стадиях эволюции, а потом, наработав огромный набор генов, отмерло? Конечно, было бы куда приятнее, если бы эти живые фабрики генов сохранились до сих пор и их удалось бы обнаружить.

Так что же, давайте снаряжать экспедиции, заранее занеся некие диковинные реликтовые существа в Красную книгу? Вот и название уже готово — геногены!

Расчленённые гены

Но не будем торопиться. Если окажется верной гипотеза, выдвинутая У. Гилбертом (это тот самый Гилберт, который участвовал в разработке метода чтения ДНК-овых текстов, за что был удостоен Нобелевской премии), то далеко отправляться в поиски нам не придется. И нового названия тоже не потребуется. «Геногены» это не что иное, как эукариоты. Если яснее не стало, то, пожалуйста: это мы с вами!

К эукариотам принадлежим не только мы с вами. К ним относятся вообще все высшие организмы: и животные, и растения, и даже некоторые простейшие, так что если предположение Гилберта справедливо, то недостатка в фабриках генов нет и быть не может, пока есть жизнь на Земле.

Следует признать, что упомянутая гипотеза возникла не от хорошей жизни. Она потребовалась для того, чтобы объяснить совершенно неожиданные факты, обнаруженные после того как были определены первые же последовательности ДНК, выделенные из высших.

Совершенно естественно, что, поскольку аминокислотная последовательность в белках непрерывна, то непрерывной считалась и последовательность нуклеотидов в генах. Многочисленные исследования на бактериях и бактериофагах показали, что это действительно так.

Исследовать детальную структуру генов у высших до недавнего времени не умели. Это стало возможным лишь с появлением генной инженерии и после разработки мето-

дов чтения ДНК-овых текстов. Каково же было изумление и замешательство, когда оказалось, что гены у высших организмов не непрерывны, а состоят из отдельных кусков, разделенных какими-то другими последовательностями нуклеотидов! ДНК вдруг предстала таким винегретом из генов, порубленных на части. Когда сообщение о таком наблюдении на генах, кодирующих белки иммуноглобулины, появилось в серьезной печати, то подумали, что это какое-то недоразумение. Однако затем оказалось, что так же устроены и глобиновый ген у кролика, и овальбуминовый ген у цыпленка, и гены рибосомальной РНК у плодовой мушки дрозофилы. Короче, так оказались устроенными почти все изученные до сих пор гены высших организмов.

Промежутки между кусками генов бывают разными — от 10 до 20 000 пар оснований. Как же на таких расчленённых генах синтезируются единые молекулы мРНК, по которым далее идет синтез единых молекул белков? Оказалось, что с участка ДНК, по которому разбросаны куски данного гена, включая и промежутки, снимается копия в виде очень длинной молекулы РНК. Эта молекула-предшественник или, как говорят, про-РНК. Из про-РНК сложным путем нарезания и последующего сшивания (этот процесс иногда называют «созреванием») получают «зрелые» молекулы РНК, которые уже могут выполнять свои прямые обязанности. Таким образом, сам факт расчленённости генов заставляет высшие организмы заботиться о «созревании» РНК-овых копий. Отметим, что в зачаточном (или, наоборот, в рудиментарном) виде механизм созревания РНК есть и у бактерий, но там дело ограничивается отрезанием «лишних» концов у молекул.

Как в деталях идет процесс созревания? Конечно, существуют специальные ферменты, разрезающие молекулу про-РНК и сшивающие полученные фрагменты друг с другом. Но что указывает ферменту, как правильно нарезать молекулу и как правильно сшить получившиеся куски РНК? И как выбрасываются промежуточные участки? Кухня такой рубки-сборки совсем не проста: ведь если фермент просто разрежет РНК на куски, то эти куски разбегутся в разные стороны из-за броуновского движения — и пойдя, собери их!

Можно предложить целый ряд схем, как это может быть. Но вряд ли это стоит подробно обсуждать сегодня. Процесс «созревания» РНК интенсивно изучается в десятках лабораторий мира и, вероятно, скоро станет ясен во всех деталях.

Похоже, что в этом процессе принимают участие специальные коротенькие молекулы РНК, которые «склеивают» про-мРНК так, чтобы её было удобно нарезать на куски и вновь сшить. В любом случае ферменты, ведающие «созреванием», не могут быть безразличны к пространственной организации про-мРНК, к образованию двухнитевых шпильек и других структур.

Какие же преимущества дает высшим организмам такой запутанный механизм производства РНК? Ведь он не только очень сложен, но и таит в себе возможности очень грубых ошибок? В самом деле, физико-химические данные свидетельствуют, что пространственная структура РНК не жесткая, она колеблется между различными состояниями, сильно различающимися по тому, какие участки образуют шпильки или другие элементы пространственной структуры. Это значит, что в одном состоянии про-РНК будет нарезана на куски одним способом, а в другом — иным. Соответственно, разными окажутся выброшенные участки, и «зрелые» молекулы РНК будут очень сильно отличаться друг от друга. Кроме того, накопление небольшого числа (или даже одной) точечных мутаций в про-РНК может существенно нарушить соотношение пространственных структур, которые образует эта молекула.

Гилберт первым обратил внимание на то, что эти недостатки в организации генов эукариот, из-за которых они, по всей видимости, должны сильно уступать прокариотам в точности белкового синтеза, могут обернуться огромными преимуществами в эволюции. Судите сами: большая чувствительность к малым изменениям в ДНК и возможность одновременного синтеза зрелых РНК с совершенно различными последовательностями нуклеотидов — все это может обеспечить искомое. А именно: испытание самых разных новых вариантов без полного отказа от старого. Это значило бы, что высшие организмы обладают тем механизмом изменчивости и отбора, которого так не хватало для примирения генетики и теории эволюции.

Прыгающие гены

С наступлением новой эры в изучении генов высших организмов, связанной с появлением генной инженерии и методов чтения ДНКовых текстов, рухнуло не только представление о генах, как о непрерывных участках ДНК. Не устояло и другое положение генетики, казав-

шееся столь же незыблемым и утверждавшее, что все клетки организма имеют одинаковый набор генов. Справедливость его, казалось бы, была раз и навсегда доказана опытами Дж. Гёрдона по выращиванию лягушек-двойников, о которых мы рассказывали в начале третьей главы. Но выяснилось, что и для этого правила есть свои, очень существенные исключения.

Правда, надо сразу оговорить, что если «лоскутное» устройство генов — это правило для высших, то изменению в ходе развития организма, по-видимому, подвергаются лишь немногие гены — это, скорее всего, исключение. Важно, однако, что это исключение распространяется на гены, имеющие для организма особое значение. Это гены, отвечающие за иммунитет.

Способность к иммунному ответу на вторжение извне — важнейшее свойство нашего организма, позволяющее ему сохранить индивидуальность, бороться против инородных клеток и вирусов. Можно утверждать, что не будь у людей этой способности, они не могли бы жить так скученно, как живут сейчас. Средневековые хроники полны ужасающих рассказов об эпидемиях, опустошавших целые города, а иногда и обширные территории. Почему же этого не происходит теперь? Конечно, многое дало применение санитарно-гигиенических мер. Но все же главное — это вакцины, то есть прививки.

Прививка — это как бы заблаговременное предупреждение организма о грозящей ему опасности. Она включает иммунную систему, в результате возводится неприступная стена против потенциального агрессора (бактерии или вируса) заранее, еще до того, как он совершит нападение. Массовые прививки привели к тому, что страшные в прошлом враги человеческого рода, возбудители чумы, холеры, оспы и т. д. не могут теперь найти место, где они могли бы размножаться, их численность практически сведена к нулю. Это один из немногих случаев, когда исчезновение с лица Земли некоторых её обитателей не беспокоит даже наиболее ярых поборников охраны окружающей среды. Вообще защитникам среды обитания не плохо бы почаще вспоминать не только тихие берега рек, кишаших рыбой, но и таких маленьких и очень коварных тварей, как холерный вибрион, палочка Коха, возбудители оспы, чумы, полиомиелита и т. д. Вот в том, что их почти не стало, научно-технический прогресс действительно «повинен».

Что же позволяет иммунной системе успешно бороться с разнообразными возбудителями болезней?

Роль орудия борьбы играют клетки крови, лимфоциты (белые кровяные шарики) и особые белковые молекулы, иммуноглобулины, называемые также антителами, которые вырабатываются лимфоцитами. Иммунная система каждого организма способна вырабатывать невероятно большой набор разных иммуноглобулинов. Точнее, молекулы эти почти одинаковы, они построены по одному и тому же общему плану, но в них есть участки, называемые переменными частями, которые отличаются друг от друга своей аминокислотной последовательностью.

Каждый лимфоцит, способный вырабатывать антитела, несет на своей поверхности «фирменный знак», или, лучше сказать, «образец продукции» — прикрепленную к оболочке молекулу иммуноглобулина. Переменная часть этой молекулы «узнает» чужеродный белок, проникший в организм (его называют антигеном). Такое узнавание служит сигналом к тому, чтобы лимфоцит начал интенсивно производить антитела и выбрасывать их в свободном виде в кровь.

Лимфоциты — строго специализированные клетки, каждая клетка вырабатывает только один тип иммуноглобулинов. Будучи однажды «включенным» на синтез антител, лимфоцит многие годы, а иногда и всю жизнь, поддерживает в крови высокое содержание антител этого типа. Поэтому, попав повторно в организм, данный антиген (белок оболочки вируса или бактерии, или вообще любой белок) встречает уже целую армию антител, быстро узнающих в нем чужака и с помощью специальной системы уничтожающую этот белок, а заодно и всю бактерию или вирус, к которым он принадлежит.

Итак, в организме заранее имеются лимфоциты, способные узнать практически любой белок, даже тот, который ни разу до того не попадал в этот организм. Но если, скажем, вирус впервые проник в организм, то, хотя и найдется лимфоцит, на поверхности которого будет образец иммуноглобулина, способного связаться с белком оболочки вируса, и он «включится» на выработку антител, чтобы наработать достаточное количество свободных антител, требуется время. Поэтому, прежде чем сработает иммунная система, вирус успеет наделать много бед, а то и вообще погубить организм. Другое дело, если вирус уже до этого, скажем, в неинфекционной форме, побывал когда-то в этом

организме. Тогда уже имеются свободные антитела, которые тут же набросаются на вирус и не дадут ему развернуться.

Основной вопрос, на который очень долго не удавалось получить ответ, состоит в следующем. Что обеспечивает реакцию организма на самые разные антигены? Ведь каждый организм готов к выработке антител в ответ практически на любой чужеродный белок. В то же время иммуноглобулины очень специфичны — одна молекула, как правило, узнает только вполне определенный белок и теряет способность узнавать, если в молекулу белка внести минимальные изменения. Чтобы обеспечить одновременно и огромную специфичность и разнообразие иммунных реакций, организм держит наготове массу лимфоцитов, способных вырабатывать различные антитела. Их в каждом организме великое разнообразие — многие миллионы.

Так что же, существуют миллионы генов, каждый из которых кодирует свой иммуноглобулин? И откуда они берутся, эти гены? Они есть уже в зиготе, то есть достались от родителей? Что за дурацкие вопросы! Конечно! Как же может быть иначе, если химическое строение иммуноглобулинов определяется последовательностью ДНК (а чем еще может определяться строение белков?!).

Так-то оно так, но если наша ДНК несет в себе информацию о строении миллионов белков иммуноглобулинов, то в ней больше ни для чего не останется места. А ведь и кроме иммунной системы в нашей ДНК много чего записано. Это во-первых. А во-вторых, если гены иммуноглобулинов переходят к нам от наших родителей вместе с генами других белков, то почему внутри нас иммуноглобулины мамы не атакуют белки папы и наоборот?

Наши родители, как и все люди (за исключением идентичных или одноййцовых близнецов, получившихся из одной зиготы) иммунологически несовместимы. Иммунная система одного человека атакует белки другого человека. Отсюда — столько проблем при пересадке органов (почек, сердца и т. д.). Но факт есть факт. В каждом из нас вырабатываются и белки, унаследованные от папы, и белки, унаследованные от мамы, а вот ничего ужасного не происходит. Страшно подумать, что было бы, если бы у человека вырабатывались антитела к собственным белкам. К счастью, если это и случается, то очень редко. Но парадокс состоит в том, что объяснять надо не то, что такая болезнь бывает, а то, что она не поражает всех нас!

В 60-х годах те, кто пытались объяснить иммунитет на генетическом уровне, ясно понимали, что само существование иммунной системы явно противоречило молекулярной биологии того времени. Было ясно, что здесь кроется какая-то загадка, разгадка которой может произвести переворот в наших представлениях.

Поэтому, как только появилась возможность выяснить детальное строение генов высших организмов, в первые объекты изучения попали гены иммуноглобулинов. Наибольший вклад в решение проблемы методами генной инженерии внес швейцарский иммуногенетик Сусуми Тонегава. Изучая гены иммуноглобулинов, он впервые обнаружил расчленённые гены. Оказалось, что между участками ДНК, на которых записана информация о вариательной и постоянной частях иммуноглобулинов, есть участок, в котором не записано никакой белковой последовательности. А в готовой молекуле иммуноглобулина вариательная и постоянная части образуют единую полиаминокислотную цепь. Эта новость мгновенно облетела весь научный мир и буквально через несколько месяцев стало ясно, что «лоскутное» устройство — это типичная картина для любых генов высших организмов.

Но не успели привыкнуть к этой новости, как Тонегава сообщил уж совсем потрясающую вещь. Он сравнил ДНК, выделенную из лимфоцитов взрослой мыши, с ДНК из мышиногo эмбриона. Оказалось, что у эмбриона вариательная часть гена состоит не из одного, как у лимфоцитов взрослой мыши, а из двух кусков, которые были обозначены *J* и *V*. *J* — меньшая часть, она всегда находится на месте, а более длинная часть, *V*, отстоит от *J* так далеко, что даже не удалось определить расстояние до нее вдоль ДНК.

У эмбриона, как и во всех обычных клетках (не лимфоцитах) взрослого организма, гены иммуноглобулинов устроены так, как показано на рис. 19 вверху. Насчитывается около трехсот *V*-генов, четыре *J*-гена и один *C*-ген. Скопление *V*-генов отделено от скопления *J*-генов большим промежутком. Между *J*-генами и *C*-геном также имеется промежуток, но гораздо меньше. Клетки, имеющие устроенную таким образом ДНК, не способны вырабатывать антитела. Поэтому у эмбриона, и даже у новорожденного, собственные антитела отсутствуют — есть только антитела матери, поступившие в его кровь до рождения.

Вскоре после рождения начинает пробуждаться собственная иммунная система — образуются лимфоциты. В ка-

ждой лимфоцитной клетке происходит следующее. Из ДНК вырезается протяженный участок, начинающийся на конце одного из V -генов и оканчивающийся строго в начале одного из J -генов. В результате данный лимфоцит содержит ДНК, имеющую строение, как показано на рис. 19 (средняя строка). Далее со всего полученного участка, начиная с гена V и кончая геном C , снимается РНКовая копия. Эта РНК подвергается обработке ферментами в принципе так же, как это происходит с любыми расчленёнными генами у высших. При этом из РНК удаляется всё, кроме реплики с образовавшегося на предыдущей стадии единого гена VJ , а также гена C . Все три реплики образуют единую непрерывную РНКовую цепь (нижняя строка рис. 19), которая

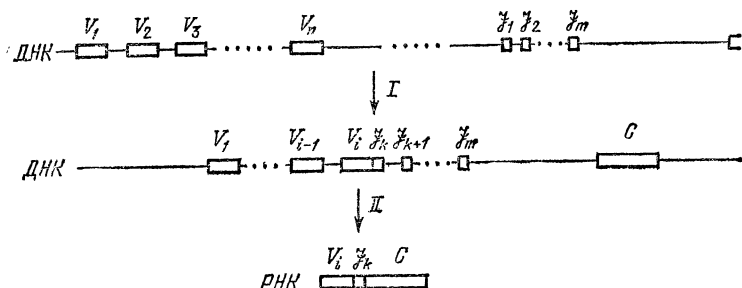


Рис. 19. Перегруппировка генов иммуноглобулинов. Стадия I происходит в процессе созревания лимфоцитов. Стадия II отвечает синтезу иммуноглобулина в лимфоците.

считывается рибосомой, давая белковую цепь иммуноглобулина.

Конечно, самое интересное происходит на стадии I, то есть тогда, когда образуется лимфоцит данного типа. Чем определяется то, какая именно пара генов V и J состыкуется, окажется рядом при вырезании участка ДНК? Это центральный вопрос, так как от этого целиком зависит строение вырабатываемого лимфоцитом иммуноглобулина.

Кардинальный факт состоит в том, что при этом перебираются все (или почти все) комбинации V и J генов. Это — первый шаг к созданию на базе сравнительно скромного набора исходных генов несметного разнообразия иммуноглобулинов. Ведь, если имеется n V -генов и m J -генов, то различных пар из них может получиться nm . Таким образом,

если, как упоминалось выше, $n = 300$, а $m = 4$, то число разных антител оказывается около тысячи. Но этого мало. Молекула иммуноглобулина состоит не из одной, а из четырех полиаминокислотных цепей, двух легких и двух тяжелых (рис. 20). Обе легкие цепи идентичны друг другу, как и обе тяжелые. Но тяжелые и легкие цепи синтезируются совершенно независимо, и для каждой из них происходит вся та перетасовка, о которой говорилось выше. Поэтому цифру тысяча нужно возвести в квадрат. Вот так и получается миллион.

Но и этого мало. Оказалось, что в какой-то момент включается механизм неизвестной пока природы, благодаря которому возникают мутации, причем только в V-генах. Окружающие V-гены участки ДНК не меняются, а в V-генах

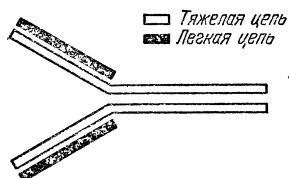


Рис. 20. Так устроена молекула иммуноглобулина (схема).

происходят случайные замены нуклеотидов. Это еще многократно повышает разнообразие иммуноглобулинов.

Вот какой хитроумный механизм придуман природой, чтобы снабдить нас с вами лимфоцитами и вырабатываемыми ими антителами на любой мыслимый случай. Загадка, мучившая несколько поколений медиков и биологов, была

решена быстро и однозначно, как только за нее взялись специалисты, вооруженные умением манипулировать молекулой ДНК.

И надо сказать, открывшаяся картина просто ошеломила даже привыкших к сенсациям последних десяти лет молекулярных биологов. Шутка ли сказать, оказывается в организме каждого человека, каждого млекопитающего (и еще шире — позвоночного), происходит перетасовка генов, образуются миллионы новых, причем это еще сопровождается интенсивным мутационным процессом.

А мы-то думали, мы были абсолютно убеждены, что весь план строения организма готов раз и навсегда, как только образовалась зигота. Мы думали, что этот план совершенно одинаков во всех клетках, просто одни клетки «читают» одну часть плана, другие — другую. Конечно, возможность мутаций в генах при развитии организма никем никогда не отрицалась, но к этому относились как к случайным помехам, ошибкам в ходе планомерного развития организма. А оказывается, каждый организм в ходе развития выраба-

тывает свой, совершенно уникальный набор генов (во всяком случае, генов иммуноглобулинов, а может быть, и еще каких-нибудь). Собственно, это и есть один из тех факторов, которые определяют индивидуальность, свое «я» каждого позвоночного.

Нет сомнений, что, как и все прежние выдающиеся завоевания науки, открытие перестроек генов в ходе индивидуального развития окажет серьезное влияние на наши представления об окружающем мире и о самих себе.

У молекулярной иммунологии, науки, переживающей буквально взрыв из-за вторжения в нее методов генной инженерии, еще масса нерешенных проблем. Как организм умудряется не вырабатывать антитела к собственным белкам? По-видимому, есть какой-то способ отбраковки лимфоцитов. Гигантская проблема — поиск связи между иммунитетом и раком. Ведь эта болезнь так же, как и иммунитет, — удел позвоночных. Несомненно, между этими двумя важнейшими для жизни всех людей явлениями существует очень тесная связь. Эту связь изучают на всех уровнях, включая уровень ДНК. Нет сомнений, что открытие возможности перегруппировки генов в ходе развития проливает совершенно новый свет и на проблему рака. Но все это — вопросы, на которые еще предстоит искать ответы.

ГЛАВА 8

КОЛЬЦЕВЫЕ ДНК

ДНКовые кольца

Внимательный читатель, должно быть, заметил, что для понимания биологических функций ДНК используются лишь те обстоятельства, что молекула эта состоит из двух комплементарных нитей и генетическая информация заключена в последовательности нуклеотидов четырех сортов (А, Т, Г и Ц). Собственно, на этих двух фактах зиждется все стройное здание современной молекулярной биологии, включая генную инженерию. Даже то, что ДНК — это спираль, а не просто веревочная лестница, биологам знать как бы ни к чему, а уж генным инженерам — и давно, не говоря уже о более тонких деталях физического строения молекулы. Во всяком случае есть люди, которые

действительно так считают. Эти люди говорят, что хватит, мол, копаться в этой ДНК, пора всем дружно взяться только за сугубо практические задачи, для решения которых вполне достаточно того, что известно.

Конечно, позиция эта недалековидна. То, о чем было рассказано в предыдущих главах, убеждает, что при изучении ДНК даже самые, казалось бы, пустяковые факты могут привести к открытиям первостепенной важности.

Вспомните историю открытия рестриктаз. Ведь все началось с выяснения очень тонкой химической особенности молекул ДНК — метилирования ничтожной доли нуклеотидов. Эта особенность не была связана с основными функциями ДНК, а лишь позволяла клетке отличать «свои» молекулы от «чужих». А где была бы сейчас молекулярная биология и генная инженерия, не будь открыты рестриктазы?!

Так кто же осмелится утверждать, что тщательное изучение структуры ДНК не откроет нам совсем новые характеристики молекулы, важные для ее работы, не выявит новые ферменты, о которых никто раньше и не подозревал? Где гарантия, что в результате мы не сможем еще активнее вмешиваться в генетические процессы? Исследования последних лет вселяют уверенность, что именно изучение биологической роли тонких особенностей структуры ДНК обещает наиболее интересные и неожиданные находки. Пожалуй, самое яркое свидетельство тому — открытие кольцевой формы ДНК, явления сверхспирализации и ферментов топоизомераз. При выяснении возникших здесь вопросов молекулярным биологам в наибольшей степени потребовалась помощь со стороны физики и математики.

Когда научились выделять из клеток молекулы ДНК, а биохимики овладели этим искусством очень давно, то вскоре убедились, что эти молекулы ведут себя так, как и положено себя вести обычным линейным полимерам. На каждую молекулу приходилось по два конца. И ни у кого не вызывало сомнений, что все молекулы ДНК — линейные цепи. Правда, генетикам часто было неясно, какие же гены считать концевыми. Поэтому им приходилось рисовать свои генетические карты в виде кольцевых диаграмм. Но можно себе представить, как посмеялись бы над тем чудачком, который стал бы утверждать, что эти условные кольцевые карты отражают истинное кольцевое строение самих молекул! Для того чтобы всерьез утверждать такое, надо было доказать,

что молекулы ДНК и впрямь бывают кольцевыми. Как это часто случается, ответ пришел оттуда, откуда его и не ждали.

Электронные микроскописты изучали маленькие ДНК онкогенных вирусов, т. е. вирусов, вызывающих рак. Генетические сведения об этих ДНК практически вообще отсутствовали, но работать с ними было удобно — маленькие ДНК не рвутся на куски, как это происходит с длинными молекулами, выделять которые в неповрежденном виде — очень трудная задача. Так вот, к величайшему удивлению своему, микроскописты обнаружили, что некоторые вирусные ДНК замкнуты в кольцо. Это наблюдение было сделано в начале 60-х годов. Стало ясно, что кольцевые генетические карты — штука вовсе не случайная.

Однако особого интереса открытие не вызвало. Мало ли какой бывает ДНК в вирусах! Иногда она находится там в виде одной из двух комплементарных нитей. Порой эта нить замкнута в кольцо. Но заведомо известно и много случаев, когда внутри вирусной частицы ДНК линейна.

Все же поиск кольцевых ДНК продолжался. И постепенно выяснилось, что даже в тех случаях, когда ДНК в вирусной частице линейна, она, как правило, замыкается в кольцо после проникновения вируса в клетку. Оказалось, что перед началом репликации такая линейная молекула переходит в форму (ее называют репликативной), в которой обе комплементарные цепи ДНК образуют замкнутые кольца (рис. 21). Кольцевыми оказались ДНК бактерий, в частности, кишечной палочки. Плазмиды, эти незаменимые в геной инженерии переносчики генов, всегда кольцевые. Короче, трудно назвать случаи, когда ДНК работает в клетке, не находясь в кольцевом состоянии.

Зачем клетке замыкать молекулы ДНК в кольца? Что это дает? К каким изменениям свойств молекул приводит? Чтобы ответить на эти вопросы, надо было подробно изучить эту новую форму ДНК.

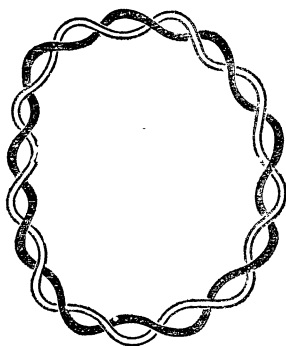


Рис. 21. В кольцевой замкнутой ДНК две комплементарные цепочки образуют зацепление высокого порядка.

Сверхспирализация и топоизомеразы

Для нас сейчас важнее всего то, что в молекуле ДНК комплементарные цепи обвивают друг друга подобно двум лианам, и когда каждую из цепей замыкают, то два кольца оказываются зацепленными так, что их невозможно развести. Простейшее зацепление двух колец известно всем — это символ бракосочетания (рис. 22). Только две комплементарные цепи в ДНК сцеплены друг с другом гораздо сильнее.

Количественно степень зацепленности двух колец характеризуется величиной, называемой порядком зацепления и обозначаемой Lk (от английского слова linking). Определить эту величину для любого зацепления очень легко.

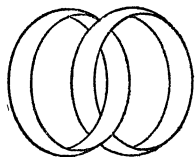


Рис. 22. Простейшее зацепление — символ бракосочетания.

Нужно представить себе, что на одно кольцо натянута мыльная пленка, и подсчитать, сколько раз второе кольцо протыкает эту пленку. Тогда легко убедиться, что для символа бракосочетания $Lk = 1$, а для зацепления, изображенного на рис. 21, $Lk = 9$.

Величина Lk замечательна тем, что ее значение для заданной пары колец не может измениться, как бы мы ни гнули эти кольца, лишь бы не рвали их. Поэтому математики говорят, что Lk есть топологический инвариант системы, состоящей из пары колец. А без помощи математиков молекулярным биологам никогда не удалось бы разобраться в свойствах кольцевых ДНК.

Итак, если мы превратили ДНК в кольцевую замкнутую молекулу, то созданный в ней порядок зацепления двух нитей не может измениться, что бы мы ни делали с молекулой, пока сахаро-фосфатные цепи, образующие «хребет» каждой из комплементарных цепочек, остаются целыми и невредимыми. Благодаря этому обстоятельству замкнутые кольцевые (зк) ДНК обладают совершенно особыми свойствами, резко отличающими их от линейных молекул. Самое главное заключается в том, что в зкДНК может быть запасена впрок энергия в виде так называемых сверхвитков.

Чтобы пояснить только что сказанное, представим линейную ДНК в каких-то определенных внешних условиях. В такой ДНК на один виток двойной спирали приходится

вполне определенное число пар оснований. Это величина γ_0 . В двойной спирали Уотсона—Крика $\gamma_0 = 10$, но она может немного меняться (всего лишь на десятые доли, но сейчас для нас это важно) при изменении внешних условий. Допустим теперь, что из линейной молекулы сделали кольцевую, прибегнув к минимальному насилию. Проще всего представить себе, что мы превратили молекулу в окружность и «заклеили» концы каждой из нитей. Чему будет равно Lk ? Ясно, что $Lk = N/\gamma_0$, где N — число пар оснований в молекуле.

Теперь изменим внешние условия. Молекула ДНК приобретает другое равновесное значение числа пар оснований на виток — γ'_0 , хотя величина Lk измениться не может. Что же происходит? Молекула стремится обрести положенный порядок зацепления: $Lk' = N/\gamma'_0$, но не в состоянии себе этого позволить, ей уже навязано иное значение Lk . Подобное случается и с брачными узлами. Когда они заключались,

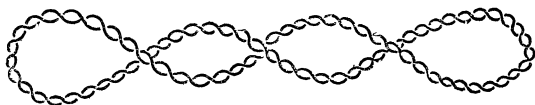


Рис. 23. Такой вид принимает сверхспиральная ДНК. Сверхспирализация отрицательна.

то $Lk = 1$, но вот условия изменились, той или другой стороне хочется расторгнуть брак, то есть сделать Lk равным нулю. Возникает очень напряженная обстановка. Нечто похожее происходит и с ДНК. Молекула оказывается в напряженном, энергетически невыгодном состоянии сверхспирализации.

Обычно сверхспирализованные молекулы принимают форму, показанную на рис. 23. Количественно сверхспирализация характеризуется величиной $\tau = Lk - N/\gamma'_0$. Подобно тому как самой двойной спирали приписывается определенный знак (положительный для правой спирали и отрицательный для левой), так и сверхспирализация может в принципе быть положительной или отрицательной. На рис. 23 двойная спираль правая, как и положено для ДНК, а сверхспирализация отрицательна.

Последнее утверждение может вызвать недоумение. Ведь кажется, что сверхспираль на рис. 23 правая, а не левая. Это один из парадоксов, с которыми приходится сталкиваться при изучении сверхспирализации. Чтобы проще

было во всем этом разобраться, возьмите кусок резинового шланга длиной чуть меньше метра, по возможности, жесткого. Вставьте в один конец шланга какой-нибудь штырь так, чтобы он немного торчал наружу, и на него можно было надеть другой конец, замкнув шланг в кольцо. Важно, что концы шланга после замыкания не должны свободно прокручиваться друг относительно друга.

Теперь можно моделировать сверхспирализацию. Для этого, держа один конец неподвижным, вращайте другой конец шланга вокруг оси штыря так, чтобы ось шланга образовала левую винтовую линию. Затем дайте замкнутому в кольцо шлангу принять наиболее выгодное для него положение, придерживая его двумя пальцами одной руки. Вы убедитесь, что он примет форму, аналогичную изображенной на рис. 23.

По мере того как из клеток аккуратно выделяли все новые ДНК и определяли их состояние, вновь и вновь убеждались в том, что эти ДНК не только замкнуты в кольцо, но и завиты в сверхвитки; при этом сверхспирализация абсолютно во всех случаях оказывалась отрицательной.

Стало ясно, что сверхспирализованное состояние ДНК не исключение, как думали вначале, а правило. Но тут возникло сомнение, — а такова ли ДНК там, внутри клетки? Пришлось признать, что, скорее всего, — нет, не такова. По-видимому, сверхспирализация — это реакция на насильственное извлечение ДНК из родной стихии, ведь условия, в которых пребывает ДНК внутри клетки, конечно же, отличаются от условий после ее извлечения.

В клетке ДНК связана с какими-то белками, в частности, с теми, которые раскрывают двойную спираль и расплетают в этих местах две нити. Но из-за расплетения среднее для всей молекулы значение γ_0 становится больше, чем для чистой ДНК, не связанной с белками. Поэтому, если ДНК все-таки не закручена в клетке в сверхспираль, то очистка ее от белков приведет к тому, что она обязательно перейдет в сверхспирализованное состояние с отрицательным знаком.

Таково было простейшее объяснение сверхспирализации ДНК, сложившееся к началу 70-х годов. Оно означало, что сверхспирализация не имеет никакого биологического значения.

В начале 70-х годов проблемой сверхспирализации ДНК занимались практически только две группы, обе в США, —

Джерома Винограда, открывшего само явление сверхспирализации, и Джеймса Уонга. Кому охота была изучать свойства ДНК, явно не имеющее биологического значения? Собственно, и Уонг подключился только потому, что решил выяснить, могут ли те или иные белки расплетать ДНК.

Опыты Уонга требовали времени и усилий: надо было в зкДНК разрывать одну из нитей, создавать комплекс между белком и разорванной ДНК, затем залечивать разрыв лигазой, отделять ДНК от белка и, наконец, измерять величину сверхспирализации. Хорошо бы иметь один белок, который и рвет нить, и залечивает разрыв, думал Уонг. Насколько меньше было бы возни. И он принялся искать такой белок в клеточных экстрактах кишечной палочки.

Что могло помочь в поисках? Приметы были ясны: если нужный белок существует, то с его помощью сверхспирализованная ДНК должна превращаться в кольцевую замкнутую молекулу, не имеющую сверхвитков. В самом деле, как только белок разорвет одну из нитей, напряжение в ДНК немедленно пропадет, то есть сверхспираль исчезнет. А когда белок залечит разрыв, то получится ДНК, у которой $Lk = N/\gamma_0$. Иными словами, шла охота за ферментом, способным менять величину Lk .

Уонгу удалось обнаружить такой фермент. Этот белок оказался родоначальником обширного класса ферментов, меняющих топологические свойства ДНК и названных впоследствии топоизомеразами. Открытие топоизомераз заставило усомниться в том, что сверхспирализация ничемна в биологическом смысле. Ведь, если есть ферменты, меняющие топологию, то, значит, сама топология клетке не совсем безразлична.

Начался планомерный поиск топоизомераз. И вот в 1976 г. группа Мартина Геллерта (Национальный институт здравоохранения, США) обнаружила фермент, который при помощи АТФ — этого универсального «аккумулятора» энергии в клетке, производит действие, обратное тому, что производит белок, открытый Уонгом. Этот фермент, названный гиразой, превращает расслабленную несверхспирализованную зкДНК в сверхспираль. И вот тут-то выяснилось, что если вывести из строя гиразу, то самые важные процессы в клетке, в частности репликация ДНК, полностью прекращаются. Стало ясно, что сверхспирализация — жизненно важное для клетки состояние ДНК.

Зачем нужна сверхспирализация?

Сверхспирализация — это важнейший пример того, как физическое состояние молекулы ДНК влияет на ее работу в клетке. Всю эту проблему интенсивно изучают специалисты самых разных профилей — от медиков до математиков. Поэтому неудивительно, что существует множество гипотез о роли сверхспирализации в работе клетки. Мы остановимся более подробно на одной из них, которая кажется сейчас наиболее простой и правдоподобной.

Гипотеза эта возникла потому, что было прямо доказано: для того чтобы начать удваиваться, молекуле ДНК обязательно надо закрутиться в сверхспираль, но для самого процесса репликации сверхспираль вовсе не нужна. Более того, иногда перед репликацией одна из нитей кольцевой замкнутой ДНК рвется, причем этот разрыв делает специальный белок и только в том случае, если ДНК сверхспирализована. Получается какая-то бессмыслица — клетка затрачивает усилия, чтобы превратить ДНК в сверхспираль с помощью одного белка (ДНК-гиразы) для того, чтобы другой белок эту сверхспирализацию немедленно ликвидировал. Но факты неопровержимы — без этого загадочного ритуала репликация не начнется, во всяком случае в тех объектах, которые были исследованы (например, в бактериофаге ФХ174).

Объяснение всему этому может быть, по-видимому, только одно. Описанный ритуал — не что иное, как проверка ДНК на целостность сахаро-фосфатной цепи, своеобразный ОТК для ДНК. В самом деле, не следует забывать, что ДНК в клетке постоянно повреждается — облучением, химическими агентами, собственными нуклеазами, тепловым движением в конце концов. В клетке есть целый арсенал средств, называемый репарирующей системой, для залечивания этих повреждений. В главе 3 мы рассказывали о том, как эта репарирующая система залечивает повреждения, наносимые ультрафиолетовыми лучами. Репарирующая система располагает множеством ферментов. Одни, нуклеазы, рвут нить ДНК вблизи поврежденного нуклеотида. Другие ферменты расширяют брешь, удаляя поврежденное звено. Однако генетическая информация при этом сохраняется — ведь есть вторая, комплементарная нить, по которой ДНК-полимераза Корнберга вновь наращивает расщепленную цепочку.

Итак, в клетке постоянно залечиваются раны, наносимые молекуле ДНК, причем сплошь и рядом приходится прибегать к хирургическому вмешательству — разрывать одну из нитей двойной спирали. Что произойдет, если одновременно с ремонтом начнется репликация? Дойдя до разрыва цепи, ДНК-полимераза, ведущая репликацию, остановится: не сможет идти ни тот, ни другой процесс. Это катастрофа. Значит, репликацию следует начинать, только надежно убедившись, что ремонт завершен, а судить об этом можно по тому, что обе нити ДНК целы. Но как это проверить? Пустить какой-нибудь белок вдоль ДНК, чтобы он ее прощупывал? Но на ДНК могут сидеть другие белки, которые не пропустят «ощупывающий» белок, и потом этот контроль очень долг. Где гарантия, что пока будет проверяться целостность цепи звено за звеном, не произойдет новсе повреждение? Нет, такой путь не годится.

И вот тут-то на помощь приходит сверхспирализация. Ведь она возможна только в той ДНК, в которой обе нити на всем протяжении целы. А убедиться в наличии сверхспирали очень просто — в сверхспиральной ДНК гораздо легче развести две комплементарные цепочки, то есть раскрыть участок двойной спирали. Раскрытие подобно действию расплетающего белка — оно снимает напряжение в отрицательно сверхспирализованной ДНК. Итак, белку, которому поручен контроль, следует связаться с нужным участком ДНК (он узнает его по определенной последовательности нуклеотидов) и попробовать развести в этом месте нити. Если получилось, то с этого места быстро-быстро начинается репликация. Если развести нити не удалось, то придется подождать — ДНК еще не готова к воспроизведению.

Не правда ли, очень похоже проверяем мы исправность электрического шнура? Мы не прощупываем его по всей длине, а просто пропускаем ток. Если ток проходит — все в порядке, если нет — ищем неисправность. Найдя дефект и устранив его, мы вновь проверяем прохождение тока — а вдруг есть еще разрыв? Во всяком случае, без такой проверки никто не станет прилаживать шнур. Но ДНК не проводник, по ней ток не течет, так что гришлось клетке избобрести свой, надо признать, весьма остроумный, тестер.

Сейчас доказано, что сверхспирализация нужна не только для того, чтобы началось копирование. Она оказы-

вает большое влияние на транскрипцию. Многие думают, что клетка регулирует считывание РНК с ДНК не только с помощью белков-репрессоров и РНК-полимераз, но и меняя сверхспирализацию, запуская топоизомеразы.

Физики и математики за работой

Конечно, чтобы понять как следует, в чем состоит роль сверхспирализации, необходимо всесторонне изучить не только ее влияние на биологические функции ДНК, но и на физическую структуру молекулы. За дело взялись физики. Однако сразу же возникли серьезные проблемы. Разные физические методы, с помощью которых пытались измерить величину сверхспирализации, давали разные результаты.

Как-то Джером Виноград встретил математика из Калтеха (так называют сокращенно Калифорнийский технологический институт) Брока Фуллера и попросил его помочь разобраться в проблеме кольцевых ДНК, поскольку сам он к тому времени совершенно запутался. Фуллер живо заинтересовался рассказом Винограда. Он почувствовал, что здесь могут оказаться полезными некоторые результаты, как раз привлекавшие внимание математиков в то время. Они касались неожиданной связи между топологией и дифференциальной геометрией.

Эти две области математики изучают одинаковые объекты, кривые и поверхности, но с абсолютно разных точек зрения. Дифференциальная геометрия исследует локальные свойства поверхности, такие, как кривизна, кручение. Топологию, напротив, совершенно не интересуют эти характеристики, ей важно, например есть ли в поверхности дырки (но неважно, какой формы эти дырки), сколько их и т. д. Так, мраморную статую может изучать и геолог, и искусствовед. Но геолога интересует только камень, а искусствовед — форма, приданная камню скульптором. Вряд ли эти люди нашли бы между собой общий язык, подходя к делу строго профессионально.

Столь же неожиданным оказалась для математиков связь между дифференциально-геометрическими и топологическими характеристиками одного класса поверхностей — двусторонних полос. С полосами знаком каждый читатель «Библиотечки «Квант» — ведь эмблемой этой серии является знаменитый лист Мёбиуса, частный случай полосы. Взгля-

ните еще раз на обложку этой книги, или, еще лучше, склейте лист Мёбиуса из полоски бумаги.

Начните с любой точки и ведите карандашом линию, параллельную краям полосы. Вскоре вы увидите, что вернулись к исходной точке, ни разу не оторвав карандаша от листа. Это и есть замечательное, даже несколько загадочное свойство листа Мёбиуса — он имеет всего лишь одну сторону. Поэтому его называют односторонней полосой.

Теперь вырежьте еще полоску из бумаги и вновь склейте концы. Но при этом перекручивайте их не на 180° , как при склейке листа Мёбиуса, а на угол, равный $m \cdot 360^\circ$, где m — целое число. Вы всегда будете получать двусторонние полосы. У двусторонней полосы два края представляют собой замкнутые кривые, причем они могут быть не зацепленными или образовывать зацепление с каким-то значением порядка зацепления Lk , причем очевидно, что $Lk = m$.

Фуллер сразу сообразил, что с точки зрения математики молекула зкДНК представляет собой двустороннюю полосу. Краями полосы следует считать сахаро-фосфатные цепи молекулы. То, что зкДНК может быть только двусторонней полосой — факт чисто химический, связанный с существованием направления в каждой из цепочек ДНК, причем комплементарные нити направлены друг другу навстречу. Легко убедиться, что если из такой молекулы попытаться склеить лист Мёбиуса, то ничего не получится — концы комплементарных нитей подойдут друг к другу в положении «голова к голове» и «хвост к хвосту», т. е. не смогут соединиться.

То, что сообщил Фуллер в статье, опубликованной вскоре после его разговора с Виноградом, состояло в следующем. Топологическая характеристика зкДНК (т. е. полосы) Lk не выражается однозначно через какую-либо геометрическую, а следовательно, и физическую характеристику молекулы. Она связана сразу с двумя геометрическими характеристиками.

Первая хорошо известна в дифференциальной геометрии. Это кручение, осевая закрутка полосы Tw (от английского слова *twist*). Это есть суммарное количество оборотов, которое делает вектор, лежащий в плоскости полосы и перпендикулярный оси полосы, при движении вдоль полосы. Вторая характеристика не имела названия. Фуллер впервые дал ей имя — райзинг Wr (от английского глагола *writhe*, что значит скрючиваться, корчиться), так что модой давать экзотические названия, возникшей сначала в физике эле-

ментарных частиц (вспомните кварки, очарование, цвет и т. д.), постепенно заражаются даже математики.

Результат, приведенный Фуллером, был впервые строго доказан американским математиком Джеймсом Уайтом в 1968 г. Он устанавливает однозначную связь между Lk , Tw и Wr

$$Lk = Tw + Wr.$$

Поразительно то, что столь простая формула была открыта так недавно. Она оказала неоценимую помощь в изучении свойств кольцевых ДНК. В чем же состоит значение этой, казалось бы, простой до примитивности формулы?

Прежде всего, очень важно то, что величина Wr зависит только от формы, которую имеет ось полосы в пространстве, но совершенно не зависит от того, как полоса закручена вокруг своей оси. Далее, для Wr существует общая формула, позволяющая вычислить эту величину для любой кривой. Эта формула была известна очень давно и называется интегралом Гаусса, но истинный смысл этого интеграла как разности между Lk и Tw для полосы, стал ясен только теперь, после построения теории полос.

Наконец, совсем необычно то, что в левой части формулы Уайта стоит величина, которая может принимать только целочисленные значения (это непосредственно следует из определения Lk — ведь количество протыканий поверхности не может быть не целым). В то же время обе величины, стоящие справа, могут принимать любые значения, вовсе не обязательно целочисленные.

В этом месте может, даже должен, возникнуть целый каскад недоуменных вопросов. Ведь величина Tw — это число оборотов, которые делает полоса вокруг своей оси. Почему же это не целое число, если полоса замкнута? Да и вообще, существует ли райзинг? Чем, собственно, Lk отличается от Tw ? Не находим ли мы, вычисляя Lk и Tw , разными способами одну и ту же величину? Чтобы разобраться во всем этом, поставим эксперимент.

Вырежем из бумаги узкую полоску, шириной в сантиметр. Обмотаем ею какой-нибудь цилиндрический предмет (удобно, чтобы он был толщиной с футляр от медицинского термометра) несколько раз, причем сделаем это так, чтобы полоска при наматывании не закручивалась вокруг ее собственной оси. Затем чуть-чуть выдвинем концы полоски

так, чтобы их можно было склеить. Это не вызовет сколько-нибудь значительной осевой закрутки.

Так мы получим замкнутую полосу, у которой, по самому способу ее получения, $Tw = 0$. Чему же будет равно Lk ? Это можно выяснить теперь экспериментально. Возьмем ножницы, проткнем ими полосу в любом месте и разрежем ее вдоль по всей длине. Получатся две сцепленные друг с другом совсем узенькие полоски. Порядок их зацепления и есть Lk краев исходной полосы. Это будет значительная величина, как раз равная числу оборотов, которое исходная, неразрезанная полоска сделала вокруг нашего цилиндрического предмета.

Вот и выходит, что можно создать Lk , не создав никакого Tw . То, что мы делали, когда обматывали полосу вокруг цилиндрического предмета, — это придавали ей райзинг. Вообще при намотке полосы на цилиндр так, чтобы она прилегала к поверхности цилиндра и делала R оборотов (см. рис. 24), получаются такие значения Lk , Tw и Wr :

$$\begin{aligned} Lk &= R, \\ Tw &= \frac{Rp}{\sqrt{p^2 + \pi^2 d^2}}, \\ Wr &= R \left(1 - \frac{p}{\sqrt{p^2 + \pi^2 d^2}} \right), \end{aligned}$$

где d — диаметр цилиндра, p — шаг спирали, которую образует полоса.

В нашем эксперименте мы имели дело со случаем $p \rightarrow 0$, когда $Tw = 0$ и $Lk = Wr$.

Противоположный предельный случай получается при намотке полосы на цилиндр нулевого диаметра ($d \rightarrow 0$). Равенство $Lk = Tw$ справедливо во всех случаях, когда ось полосы лежит на плоскости. Ощущение, что так должно быть вообще всегда, основано на том, что мы обычно представляем себе полосу (или молекулу ДНК) так, будто ее ось описывает простую фигуру, скажем, окружность или что-то вроде того.

После работы Фуллера стало ясно, что противоречия при исследовании сверхспирализации возникли потому, что одни методы измеряют физические характеристики, зависящие от Wr , а другие — от Tw . Получив в руки надежный



Рис. 24. Полоса, намотанная на цилиндр.

математический аппарат, физики начали планомерно изучать влияние сверхспирализации на свойства зкДНК.

Как раз в это время в обиход стал входить метод гель-электрофореза, о котором мы говорили в гл. 6. Была продемонстрирована очень высокая разрешающая способность метода при разделении молекул ДНК, имеющих разную длину. И тогда западногерманскому ученому Вальтеру Келлеру пришла в голову сумасшедшая идея. А что, если попробовать разделить при помощи гель-электрофореза молекулы зкДНК, с разными значениями Lk ? Принцип разделения здесь должен быть совсем не тот, что для линейных молекул ДНК разной длины.

У молекул, отличающихся только числом сверхвитков, длина будет одинакова. Следовательно, одинаков будет и заряд, и действующая со стороны электрического поля сила. Но скорость движения молекулы в геле определяется не только приложенной к ней силой, но и сопротивлением, которое она испытывает при движении. А это зависит в свою очередь от формы молекулы. Ясно, что если молекула имеет форму сильно переплетенной веревки, как на рис. 23, то она будет испытывать гораздо меньшее сопротивление среды при движении в поле, чем расправленная молекула. Иными словами, чем больше райзинг по абсолютной величине, тем быстрее должна двигаться молекула. Речь идет о райзинге, а не об Lk , потому что сопротивление среды определяется пространственной формой оси двойной спирали и не зависит практически от того, как закручена спираль вокруг оси.

Рассуждая таким образом, Келлер стал работать с гелем и вскоре показал, что если нанести на гель препарат сверхспиральной ДНК, выделенной из клетки, то получится набор отдельных полос, отстоящих друг от друга приблизительно на равные расстояния. Единственная дискретная характеристика зкДНК — величина Lk . Значит, молекулы ДНК, находящиеся в этих полосах, могут отличаться друг от друга только значением Lk . Скорее всего, соседние полосы отличаются по значению Lk на единицу. Впоследствии было доказано, что так оно и есть.

Результат разделения молекул зкДНК, отличающихся по величине сверхспирализации, показан на рис. 25. Справа дан снимок геля после окончания электрофореза. Чтобы ДНК была видна, гель прокрашивают флуоресцирующим красителем, который прочно связывается с ДНК и как бы метит ее. Слева показан график зависимости интенсивности флуоресценции красителя от координаты вдоль геля. Можно

видеть, насколько четкого разделения удастся достичь. По таким картинкам нетрудно подсчитать величину сверхспирализации, отвечающую каждой полоске.

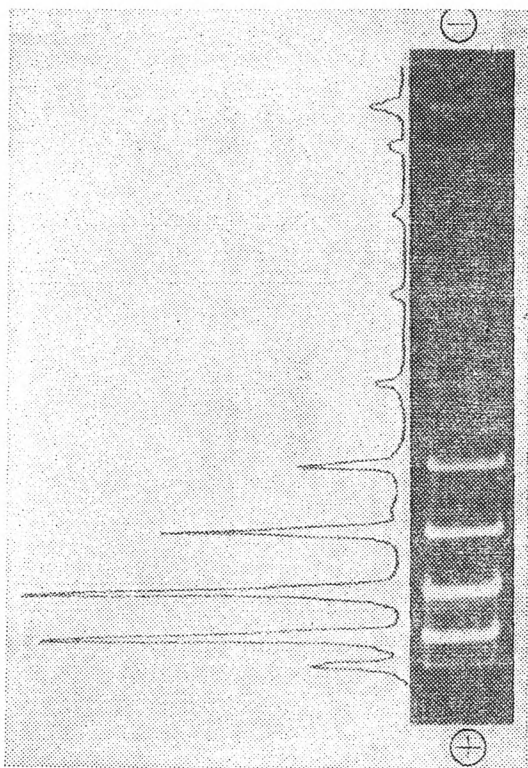


Рис. 25. Разделение молекул ДНК, отличающихся числом сверхвитков, методом гель-электрофореза. Опыт проводился с ДНК маленькой плазмиды рАОЗ, содержащей 1683 пары нуклеотидов. Первоначально молекулы были нанесены сверху, вблизи отрицательной обкладки (это место не показано на рисунке).

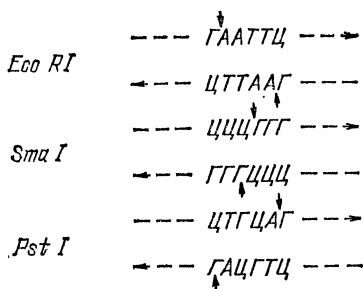
В изучении кольцевых ДНК и сверхспирализации метод гель-электрофореза дал столь же много, как и в определении ДНКовых последовательностей. Было сделано множество тонких измерений, позволивших определить важнейшие характеристики зкДНК. Именно с помощью гель-электрофореза была точно определена энергия, которая может быть запасена в ДНК с помощью сверхспирализации.

Какие изменения в структуре ДНК может вызывать сверхспирализация? Понятно, что выгодным будет любое изменение структуры, в результате которого произойдет ослабление напряжения, вызванного в зкДНК сверхспирализацией. Поэтому было ясно, что сверхспирализация должна способствовать образованию в двойной спирали раскрытых областей, а также крестообразных структур. Крестообразные структуры в ДНК могут возникать в участках с последовательностями-перевертышами.

Что такое перевертыши? Они существуют в любом языке, не только в ДНКовом. Вот пример на русском языке: ИСКАТЬТАКСИ. Читайте эту фразу слева направо или справа налево — будет одно и то же (промежутки между словами и знаки препинания при составлении перевертышей не принимаются во внимание). А вот перевертыш подлиннее: НАЖАЛКАБАНАБАКЛАЖАН.

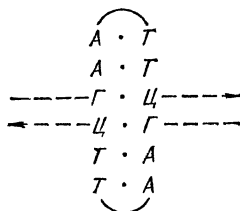
Одно время, когда поступили первые сообщения о существовании и возможной важной роли перевертышей в ДНКовых текстах (это было после открытия рестриктаз), началось повальное увлечение сочинением перевертышей на русском языке среди специалистов по ДНК. Мне очень нравится перевертыш, придуманный в то время Валерием Ивановичем Ивановым, нашим известным специалистом по физике ДНК: РИСЛИНГСГНИЛСИР. Я представляю себе при этом короля и его дворецкого, торжественно провозглашающего: «Рислинг сгнил, сир!».

В ДНКовых текстах часто встречаются перевертыши. Практически всегда бывают перевертышами те участки, которые узнаются рестриктазами. Вот примеры (слева дано название рестриктаз; эти названия весьма причудливы, так как включают в себя первые три буквы названия бактерии, из которой выделена рестриктаза; стрелками показаны места разрезания ДНК рестриктазой):



Из-за того что ДНК состоит из двух нитей, ДНКовые перевертыши следует читать слева направо и справа налево по разным нитям (направление чтения задается химической структурой; еще раз напомним, что две нити ДНК имеют противоположное направление).

Так вот, замечательное свойство ДНКовых перевертышей состоит в том, что они могут образовывать крестообразные структуры. В самом деле, ведь обязательно левая половина перевертыша будет комплементарна правой, то есть можно сделать так:



для места узнавания рестриктазой EcoRI и аналогично для любого другого перевертыша. Во всяком случае, это не противоречит правилу комплементарности.

Однако сразу возникают вопросы. Разрешает ли структура ДНК существование таких резких изломов, какие должны возникнуть в двух вершинах креста? Ведь нить ДНК обладает определенной жесткостью, не так просто сделать в ней резкий излом. В главе 3 мы уже обсуждали эту проблему в связи с укладкой ДНК в хромосомах. Двойная спираль — весьма жесткая штука, и для её изгибания в хромосомах существуют специальные белки (гистоны и другие). Правда, одиночная нить гораздо менее жесткая, так что вообще изломы в одиночной цепи возможны. Но они требуют затрат энергии. Поэтому совершенно не ясно, зачем в ДНК будет возникать крест, если он может превратиться в регулярную двойную спираль. Но все это так в случае линейных молекул. А в сверхспирализованных?

Образование креста приводит к снятию напряжения. Не может ли это сделать выгодным образование креста в сверхспиральной ДНК? Какая сверхспирализация для этого необходима?

Чтобы ответить на все эти вопросы, группа теоретиков Института молекулярной генетики АН СССР, В. В. Аншелевич, А. В. Вологодский, А. В. Лукашин и автор этих строк, подробно проанализировала вопрос об образовании

такой прием. Сверхспирализованную ДНК обрабатывали ферментом — однонитевой эндонуклеазой. Этот фермент рвет только одиночную нить ДНК, но не трогает двойную спираль. Поэтому обычную линейную, или кольцевую замкнутую, но не сверхспирализованную молекулу фермент не разрывает. Оказалось, однако, что сверхспирализованную ДНК он разрывает, причем в строго определенном месте. Определили последовательности нуклеотидов слева и справа от места разрыва. Оказалось, что во всех случаях разрезание шло строго в середине больших перевертышей, именно тех, в которых, согласно теоретическим расчетам, должны образовываться кресты. Такие опыты могут иметь только одно объяснение: в сверхспирализованных ДНК в местах длинных перевертышей двойная спираль с большой вероятностью превращается в крестообразную структуру; однонитевая эндонуклеаза разрывает образующиеся при этом в вершинах креста однонитевые петли.

Какова роль крестов в ДНК? Пока об этом ничего не известно. Думают, что крестообразные структуры могут служить местами посадки на ДНК каких-то белков. Во всяком случае кресты — это первый надежно доказанный пример того, что структура отдельных участков биологически активной ДНК может существенно нарушаться при условиях, близких к тем, в которых ДНК функционирует в живой клетке. Насколько важную роль играют эти и, возможно, другие нарушения в работе ДНК в клетке — это вопрос дальнейших исследований.

ГЛАВА 9

УЗЛЫ ИЗ ДНК

Об узлах

Каждый знает, что такое узел. Мы каждый день завязываем множество узлов. Обычно мы делаем это так:

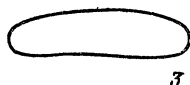


Не правда ли, самый простой узел?

Ну, а это что такое?



Немного подумав, благоразумный читатель ответит: «Просто закрученное в жгут кольцо. К узлам эта штука отношения не имеет. Зря это здесь нарисовано». Нет, я не зря изобразил жгут — он, как и само кольцо, из которого жгут образован:



имеет не меньше, а, пожалуй, даже больше прав именоваться узлом, чем фигура 1. Математик назовет третью или вторую фигуры тривиальным узлом. А первую вообще откажется считать узлом.

«Ох, уж эти математики! — думаете, наверное, вы. — Вечно они все запутывают». Пожалуй, я бы согласился с вами. Я не математик и часто сам думаю точно так же. Но в данном случае я решительно с вами не согласен.

Можно, конечно, называть первую фигуру узлом, но попробуйте четко объяснить, чем она отличается от такой:



Ведь узел на первом рисунке всегда можно распутать, и цепь вернется в исходное состояние. Этого нельзя сделать только в одном случае — если концы цепи бесконечно длинные. Поэтому лучше вообще избавиться от концов:



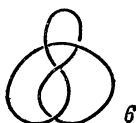
Попробуйте-ка теперь распутать! Каждому ясно, чем четвертая фигура отличается от третьей: их никаким образом нельзя перевести одну в другую, не порвав цепь.

Узел 4 называют трилистником или клеверным листом, так как его можно переделать вот так:



Думаю, теперь вы согласитесь, что понятие узла имеет строгий смысл только для замкнутых цепей, хотя в домашнем обиходе вы можете продолжать называть узлами фигуры типа первой, если вам это очень нравится.

Итак, мы уже знаем два узла — тривиальный (среди узлов он занимает то же положение, что и нуль среди чисел) и трилистник (4 или 5). Следующий после трилистника по сложности узел называется восьмеркой. Он выглядит так:



А это что такое?



Представьте себе, что такая штука сделана из веревки. Можно ли, не разрывая веревку, перевести ее в простое кольцо (тривиальный узел) или в трилистник, или в восьмерку? Или нельзя? Иными словами, до какого простейшего вида этот узел можно распутать?

С похожей задачей столкнулся еще Александр Македонский, но он, по существу, уклонился от ее решения. Правда, фракийский оракул тоже хорош — подсовывать человеку гордиев узел, чтобы тот его распутывал.

Первым всерьез заинтересовался узлами английский физик и математик П. Тэйт. Это было сравнительно недавно — в 60-х годах прошлого века. Тогда физики (как, впрочем, и сейчас) хотели понять, как устроены простейшие частицы материи. Тогда, как и сейчас, они думали,

что частицы могут представлять собой вихри электричества. Как-то в письме к Тэйту Максвелл написал: «А что, если этот вихрь будет заузлен?» И нарисовал трилистник.

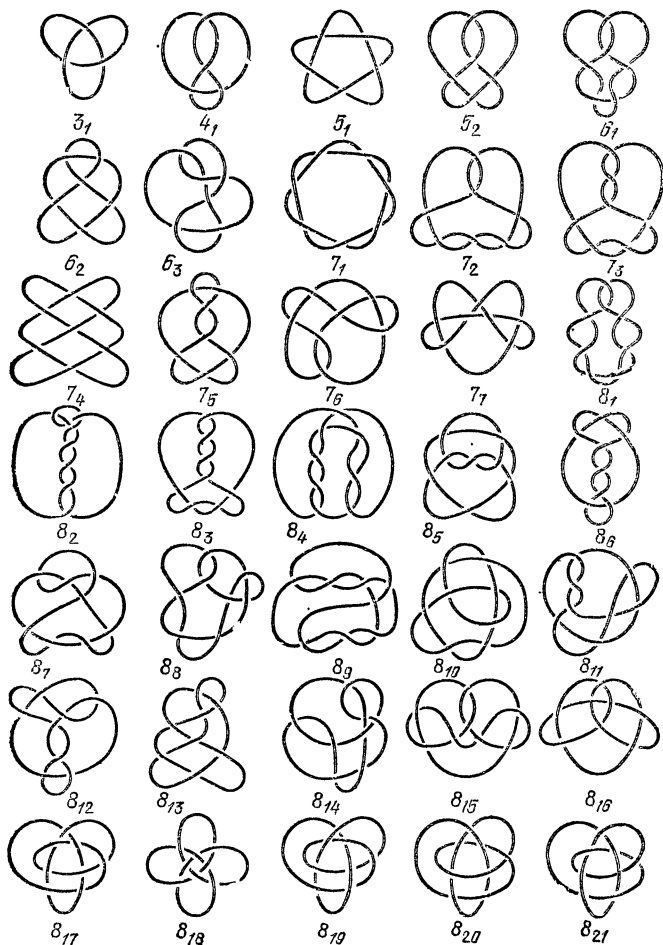


Рис. 27. Узлы.

Тэйт имел склонность к абстрактным математическим построениям. Он стал думать: какие еще бывают узлы? Вскоре он совсем забыл о частицах (будто знал, что с ними и через 100 лет не разберутся) и стал просиживать долгие часы с веревкой, завязывая всевозможные узлы. Тэйт

составил первую таблицу узлов. В ней он последовательно разместил те узлы, которые смог придумать. В дальнейшем была проведена полная «инвентаризация» всех узлов, имеющих менее десяти пересечений на их проекциях. Таких узлов набралось 84. Часть из них изображена на рис. 27.

Узлы располагают по возрастанию минимального числа пересечений на их проекции. Для трилистника это число равно трем, для восьмерки — четырем. Если есть несколько разных узлов с одинаковым числом пересечений, то они группируются в таблице вместе и каждый получает, кроме обозначения числа пересечений, еще и дополнительный индекс.

Тэйт оказался мудрее того фракийского оракула. Он не стал впутывать в дело посторонних, а заинтересовал проблемой узлов знакомых математиков. Повозившись с узлами лет шестьдесят, математики довольно здорово наловчились распутывать сложные узлы. В 1928 г. они придумали инвариант узла.

Инвариант узла — это такое алгебраическое выражение, значение которого не меняется, как бы вы ни запутывали узел. Умение вычислять инвариант позволяет в принципе распутать любой узел. Достаточно определить инвариант, а затем сравнить его со значениями инвариантов, вычисленными для узлов, вошедших в таблицу. Наиболее удобным инвариантом оказались так называемые полиномы (многочлены) Александра $\Delta(t)$. Для тривиального узла $\Delta(t) = 1$. Для трилистника $\Delta(t) = t^2 - t + 1$. Для восьмерки $\Delta(t) = t^2 - 3t + 1$ и так далее. Таким образом, каждый узел характеризуется не отдельным числом, а целым алгебраическим выражением, в котором есть некая переменная, не имеющая специального смысла.

Если вы умеете вычислять полином Александра, то довольно быстро убедитесь, что фигура 7 это на самом деле тривиальный узел, только сильно запутанный. Возможно, вы этого делать не умеете, и придется повозиться, чтобы в этом убедиться. Или вы должны будете мне просто поверить.

Узлы в полимерах

«Все это, конечно, очень мило, — скажете вы. — И даже довольно занимательно. Но какое это имеет отношение к «самой главной молекуле?» Прощу прощения, я действительно немного увлекся.

Идею завязать какую-нибудь молекулу в узел стали всерьез обсуждать в начале 60-х годов. Наверное, раньше об этом тоже говорили, но в шутку. Просто к указанному времени появились люди, для которых это перестало казаться смешным. Речь идет, разумеется, об истинном узле — трилистнике, восьмерке или более сложном. То, что молекулы могут образовывать тривиальные узлы, то есть быть замкнутыми, известно со времен Кекуле. Но попробуйте завязать бензол в узел. Ясно, что это невозможно — его кольцо имеет слишком маленькую дырку. Да и потом, как его завяжешь? Ведь молекулу не возьмешь руками за концы, как кусок веревки. Можно поступить иначе. Сделать концы молекул «липкими». Тогда можно надеяться, что при случайном сближении концов в молекуле возникнет узел.

Для того чтобы молекула завязывалась в узел, она должна быть достаточно длинной. Но какой все-таки должна быть ее длина? Так возникает вопрос, на который не просто ответить и который в более общем виде формулируется следующим образом: какова вероятность того, что при замыкании цепи, состоящей из n сегментов, возникнет нетривиальный узел?

Речь идет о сегментах, а не об атомах и даже не о мономерных звеньях, потому что разумно говорить о некоторой идеализированной цепи, в которой под сегментом понимается более или менее прямолинейный отрезок. В жестких полимерных цепях в этот отрезок входит очень много атомов и даже много мономерных звеньев. Так называемая свободно-сочлененная цепь, с помощью которой теоретики моделируют реальные полимерные молекулы (хотя эта модель, как и всякая модель вообще, имеет ограниченную область применения, в чем терпеливый читатель сможет еще убедиться), выглядит примерно так:



Узнаете? Да это же траектория движения абсолютно пьяного человека, о котором шла речь в главе 3. Я нарисовал плоский аналог незамкнутой полимерной цепи из 10 сегментов. Кружочки между сегментами означают шарниры. Представьте теперь, что вы заставляете эту цепь случайно замыкаться в трехмерном пространстве. (На плоскости, разумеется, вообще никаких узлов быть не может. Инте-

ресно, что в четырехмерном пространстве узлов тоже не бывает. Они возникают только в пространстве трех измерений.) Итак, свободно-сочлененная цепь случайно замыкается. Это происходит много раз.

Сколько же получится при этом нетривиальных узлов? Их доля и будет мерой вероятности образования узлов. Но не пытайтесь угадать эту вероятность. Вам это не удастся! Интуиция здесь не поможет. Около десяти лет назад этот вопрос превратился в навязчивую идею у меня и у моих товарищей по работе — В. В. Аншелевича, А. В. Вологодского и А. В. Лукашина. Мы тогда еще ничего не знали ни о Тэйте с его таблицей узлов, ни о существовании полиномов Александера.

Мы проводили часы в беседах о том, как бы оценить эту вероятность. Например, всерьез обсуждали такой проект. Построить из чего-нибудь большую кубическую (или еще какую-нибудь) решетку. Взять веревку и пропустить ее по ребрам решетки. Направление в каждом узле решетки разыгрывать с помощью обыкновенной игральной кости. Сделать так, чтобы траектория веревки всегда получалась замкнутой (как этого добиться, можно придумать). Замкнув концы веревки, снять ее с решетки и распутывать, чтобы узнать, получился ли узел, а если получился, то какой.

От реализации проекта нас удерживало только то, что мы не знали, как снимать веревочное кольцо с решетки. Но теперь мы знаем, что, даже и преодолев мы эту трудность (например, можно было бы сделать решетку разборной), остаток своих дней мы провели бы, лазая по этой дурацкой конструкции. И все равно ничего хорошего из этого бы не вышло (почему — об этом чуть ниже).

К счастью, очень вовремя нам в руки попала книжка Р. Кроуэлла и Р. Фокса «Введение в теорию узлов» (М.: Мир, 1967), откуда мы узнали о полиномах Александера, о таблице узлов и о многом другом. Тогда стало ясно, как действовать. Вместо того, чтобы вязать узлы самим, мы заставили это делать вычислительную машину. Оказалось возможным также научить машину вычислять полиномы Александера и тем самым научить ее распутывать узлы.

Что же в итоге получилось?

Оказалось, что вероятность образования узла зависит не только от числа сегментов в цепи. Именно поэтому я вам и не советовал заниматься угадыванием. Если цепь

очень гибкая, то есть в каждом сегменте содержится очень мало атомов, то вероятность образования узла ничтожно мала. Даже при $n = 100$ узел встречается один раз на десять тысяч случаев. Вы видите, что когда я говорил о грозившей нам участи бесславно провести остаток жизни, это были не пустые слова. Теперь становится понятным, почему были обречены на неудачу попытки синтезировать узел способом случайного замыкания простых полимерных (углеводородных) цепей, как это предлагали делать

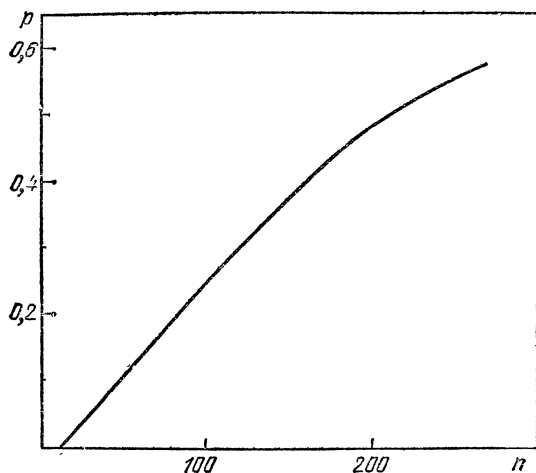



Рис. 28. Зависимость вероятности образования заузленной молекулы от числа сегментов в ней n . Кривая получена в результате расчетов на ЭВМ.

некоторые химики. Эти цепи слишком гибкие, и в них узлы практически не могут образоваться.

Другое дело — очень жесткие цепи, у которых в сегмент входит много мономерных звеньев. Для таких цепей вероятность образования узлов гораздо больше. Результаты расчетов этой вероятности приведены на рис. 28. Вы видите, что вероятность образования нетривиального узла растет почти линейно с ростом числа сегментов и при $n = 200$ приближается к 0,5. По мере удлинения цепи начинаются, конечно, отклонения от линейной зависимости (ведь вероятность не может стать больше единицы), но рассчитать дальнейший ход кривой трудно даже с помощью современных ЭВМ.

Ясно, что чем сложнее узел, тем меньше шансов его получить. Это видно из таблицы, в которой показано распределение (в процентах) разных узлов.



n	3_1	4_1	5_1	5_2	Все остальные
10	98	2	0	0	0
20	83	10	1	3	3
40	76	12	5	3	4
60	66	13	4	6	11
80	58	13	6	6	17
100	58	14	3	6	19
120	58	9	2	6	25
140	53	8	2	9	28
160	46	10	5	8	31

Синтезировать узел чисто химическим путем пока не удалось. Вот уже много лет это пытается сделать западно-германский химик Г. Шилл, один из авторов направленного синтеза катенанов. Катенан это вот что:



или вот:



Похоже на цепочку от карманных часов. Математики называют такие конструкции зацеплениями. Впрочем, эти самые зацепления вам уже порядком надоели, должно быть, в предыдущей главе.

О синтезе катенанов и о проблеме синтеза узлов Шилл написал книжку «Катенаны, ротаксаны и узлы» (М.: Мир, 1973). Вы хотите узнать, что такое ротаксан? Если очень интересно — прочтите в книжке. Но фраза в предисловии к этой книге (стр. 6): «Удалось зарегистрировать циклическую молекулу РНК с узлом», оказалась несколько преждевременной.

Завязать молекулу в узел удалось лишь в 1976 г. И не РНК, а ДНК.

Узлы из одонитевой ДНК

Уже в следующем году после публикации наших расчетов о вероятности образования узлов в полимерных цепях удалось завязать ДНК в узел. Дж. Уонг и его сотрудники обработали открытой ими топоизомеразой одонитевые кольца ДНК. А потом поместили препарат под электронный микроскоп. Конечно, под микроскопом не отличишь узлы от просто смятых колец. Однако авторы работы утверждали, что в тех же самых условиях исходные молекулы, которые не обрабатывались топоизомеразой, образуют расправленные кольца, практически не имеющие пересечений.

Эти данные вместе с другими аргументами, которые мы здесь опустим, не оставляют сомнений в том, что Уонгу и его сотрудникам действительно удалось завязать одонитевую молекулу ДНК в узел. И таких молекул было в препарате множество — около 90 %. Но позвольте, скажете вы, эти данные никак не согласуются с теоретическими расчетами, о которых шла речь выше! Действительно, никак нельзя было ожидать столь большой эффективности образования узлов в одонитевых ДНК.

Уонг очень эффектно объяснил это противоречие. По его мнению, в тех условиях, в каких шел эксперимент, никак нельзя уподоблять одонитевую ДНК простой свободносочлененной цепочке, как это делали в упомянутых расчетах. В любой достаточно длинной последовательности нуклеотидов всегда есть комплементарные участки, которые находят друг друга, образуя короткие спирали.

Конечно, дело не ограничивается спиральными участками. Одонитевая ДНК склонна принимать весьма причудливую пространственную конфигурацию. При этом замкнутость цепи в кольцо неизбежно вызывает напряжения, которые могли бы исчезнуть, будь кольцо разомкнуто.

Связывается топоизомераза, скорее всего, со спиральными участками, раскусывает одну нить, после чего вокруг целой нити может начаться свободное вращение одной части молекулы относительно другой. При этом снимается внутреннее напряжение — происходит релаксация. Далее топоизомераза вновь сшивает разорванную нить, закрепляя новое состояние молекулы. Дело сделано — узел готов.

Узлы из двойной спирали

Итак, впервые молекулу завязали в узел. То, что оказалось не под силу химикам-синтетикам, было сделано молекулярными биологами. Конечно, это было только начало. Было очень заманчиво завязать в узел двухнитевую ДНК. Сделать это в принципе нетрудно. Наиболее подходящим объектом казалась ДНК бактериофага λ .

Этот фаг был излюбленным объектом изучения в фаговой группе, собранной в свое время Дельбрюком. Когда возникла молекулярная биология, он стал, вместе со своей клеткой-хозяйкой (кишечной палочкой), главным полигоном для изучения репликации, транскрипции, организации генов.

Внутри фаговой частицы ДНК фага λ линейна, но у нее есть «липкие» концы — одноститые взаимно комплементарные участки, содержащие по 12 нуклеотидов, то есть она выглядит примерно так:



Если такую ДНК выделить в чистом виде (это умеют многие) и дать ей возможность свободно плавать в растворе, то «липкие» концы сомкнутся и ДНК превратится в кольцо. Поскольку эта молекула довольно длинная (в ней около 40 000 пар нуклеотидов), то при замыкании в кольцо она с довольно высокой вероятностью завяжется в узел.

Вспомним, что двухнитевая ДНК — это очень жесткая цепь, один ее сегмент содержит около 300 пар оснований. Поэтому оценивать вероятность образования узла в двухнитевой ДНК можно с помощью графика, приведенного на рис. 28 и основанного на машинных расчетах. По нему выходит, что около половины молекул ДНК фага λ при замыкании должны образовать узлы. Беда состоит в том, что для такой длинной ДНК очень трудно отличить нетривиальный узел от тривиального. Во всяком случае, пока это сделать не удалось. Липкие концы нужны ДНК фага λ как раз для того, чтобы замыкаться в кольцо, попадая в клетку-хозяйку. Если она не замкнется, то не сможет реплицироваться и вообще нормально работать (если, конечно, можно назвать работой тот разбой, который она учиняет, попав в кишечную палочку).

И вот тут возникает вопрос, на который необходимо найти ответ. А что будет, если при замыкании в кольцо ДНК завя-

жется в узел — ведь теория показывает, что это вполне вероятно. Не повредит ли это ее работе в клетке? Ведь вирусная ДНК должна произвести множество копий самой себя. Если завязывание в узел мешает этому, то, значит, в клетке должны существовать специальные механизмы, препятствующие образованию узлов. Но что это за механизмы?...

Убедиться в том, что ДНК, завязанной в узел, будет трудно удваиваться, вы можете сами. Возьмите полоску бумаги и склейте из нее нетривиальный узел, например, трилистник. Затем ножницами разрежьте полоску вдоль, на две половины. Это будет моделировать удвоение ДНК, во всяком случае один из возможных вариантов удвоения. Вы увидите, что вам не удастся развести два образовавшихся узла. Эти вопросы были подняты нами в той работе, в которой мы впервые подсчитали вероятность образования узлов. Это было в 1975 г. Ответ пришел спустя пять лет.

В 1980 г. Л. и Ч. Лю и Б. Олбертс сообщили, что после многолетних поисков им удалось, наконец, подобрать условия, в которых обычная двунитевая ДНК образует узлы. Они работали не с ДНК фага λ , в которой узлы трудно обнаружить из-за большой длины, а с короткими кольцевыми молекулами. Оказалось, что если к таким молекулам добавить одну из топоизомераз в большом избытке, то очень эффективно идет образование узлов. Об их возникновении можно судить по тому, что в геле при электрофорезе появляются фракции ДНК с большой подвижностью. Авторы пошли дальше — обработали заузленные молекулы топоизомеразой, но взятой в низкой концентрации и в присутствии АТФ. Что же произошло? Узлы развязывались!

Последнее событие произошло в полном соответствии с теорией, так как использовавшаяся ДНК была короткой и равновесная доля узлов в ней не должна была превышать 5 %.

Образование узлов при избытке фермента вызвано, по-видимому, тем, что белок, связываясь с ДНК, меняет физические свойства молекулы, прежде всего, усиливает слипание удаленных вдоль цепи звеньев. Как показывают расчеты, такое слипание должно резко увеличивать вероятность образования узла.

Открытие американских ученых вызвало целый поток аналогичных публикаций. Немедленно для получения узлов были применены методы генной инженерии.

Итак, топоизомеразы явно делились на две группы. Одни делают узлы на одонитевых ДНК. Их стали называть

топоизомеразы-I, другие специализируются на двунитевых молекулах, их называли топоизомеразы-II.

Но этими новостями события не кончились. Выяснилось, что топоизомеразы-II, к которым относится и ДНК-гираза, не только умеют завязывать и развязывать узлы, но и объединяют две или более молекул ДНК в катенаны (то есть делают их зацепленными).

Способность белков образовывать узлы вызвала большой интерес. Прежде всего, она позволила понять, как работают топоизомеразы и, в частности, важнейший фермент этого класса — ги́раза. Ведь завязать кольцевую замкнутую ДНК в узел невозможно, не разорвав двойную спираль. Но мало просто разорвать цепь. Нужно еще протаскать через образовавшуюся щель другую часть молекулы, а потом заделать щель. Вот какую сложную работу прodelывает топоизомераза-II.

Получается, что ДНК в присутствии этого фермента ведет себя так, будто на нее не распространяется запрет материальным телам проходить друг сквозь друга. Конечно, все дело здесь в ферменте — без него ничего не получилось бы. Ведь ДНК —

не электрон или α -частица, для которых возможен эффект квантового туннелирования. Топоизомеразы позволяют ДНК вести себя в клетке не менее странным образом.

Это как если бы вы, играя в теннис, попали мячом в сетку, а он взял и преспокойненько пролетел бы сквозь нее. Но подбежав к сетке, вы не обнаруживаете дырки, сетка совершенно цела и невредима. Теперь ясно, как клетка решает ДНКовые топологические проблемы и, в частности, проблему репликации заузленных молекул.

Можно ли на основе сказанного понять, как ДНК-гираза меняет сверхспирализацию ДНК? Оказывается, можно. На рис. 29 видно, что если протаскивать один участок ДНК

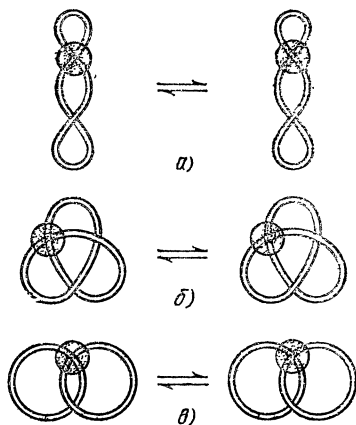


Рис. 29. Три «топологические реакции», катализируемые топоизомеразой типа II. а) Изменение числа витков сверхспирали ($\Delta Lk = \pm 2$); б) развязывание и завязывание узлов; в) расщепление и образование катенанов.

сквозь другой, то возникает сверхспираль, так как меняется величина райзинга, причем Wr всегда меняется на ± 2 . Именно это было и обнаружено экспериментально. В отличие от топоизомераз-I, меняющих Lk ДНК на любое целое число, топоизомеразы-II меняют Lk только на четное число.

В последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что и работа топоизомераз типа I также идет путем образования разрывов и протаскивания нити через образовавшуюся щель. Только, в отличие от топоизомераз типа II, топоизомеразы-I проделывают этот трюк не с двойной спиралью, а с одонитевой ДНК, так что, по-видимому, узлы в одонитевой ДНК завязываются топоизомеразой-I точно так же, как узлы в двонитевой молекуле — топоизомеразой-II.

Открытие топоизомераз и выяснение механизма их работы лишило почвы одно из основных возражений против двойной спирали, всплывавшее вновь и вновь за прошедшие тридцать лет. Очень многих в течение этих лет смущало то, что ДНК должна раскручиваться при репликации. Неужели она крутится в клетке, словно тросик спидометра?

Разные люди относились к этому по-разному. Одним это не казалось странным. Другие отмахивались — мол, как-нибудь все уладится. Третьи придумывали хитроумные объяснения. Один физик-теоретик, например, утверждал, что одна нить может пройти сквозь другую путем квантового туннелирования. И наконец, были такие, кто усматривал в этом явный дефект модели Уотсона—Крика. Они настаивали на том, что, по крайней мере в клетке, ДНК — не двойная спираль.

По-видимому, правы были те, кто занял выжидательную позицию. Похоже, что топоизомеразы решают все подобные проблемы. Во всяком случае, они способны создать в клетке такие условия, при которых нити и впрямь как бы туннелируют друг сквозь друга. Как все это происходит реально в клетке — еще предстоит выяснить. Пока ясно одно — основной аргумент критиков двойной спирали, которым они пользовались многие годы, потерял силу.

И, наконец, эти открытия последнего времени позволяют предполагать существование в природе новой формы ДНК — заузленной. Ведь до сих пор узлы удалось получить только искусственно. Правда, уже появи-

лись сообщения о том, что в головках некоторых мутантных бактериофагов ДНК находится в заузленном состоянии. Но бывает ли ДНК в форме узла в нормальном, естественном состоянии? На этот вопрос еще предстоит найти ответ.

ГЛАВА 10

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ — ОПАСЕНИЯ И НАДЕЖДЫ

«Мы говорим о вступлении в биологический век, и это не пустые слова. Это явление огромной значимости, один из поворотных пунктов в истории человеческой мысли. Ученые говорят о нуклеопротеинах и ультрацентрифугах, о биохимической генетике, электрофорезе и электронном микроскопе, о строении молекул и радиоактивных изотопах. Не подумайте, что все это — не более, чем еще одна их забава. Это надежный путь к решению проблем рака и полиомиелита, ревматизма и сердечно-сосудистых заболеваний. На этом пути будут получены знания, на основе которых мы сможем решить проблему обеспечения продовольствием все возрастающее население Земли. Это путь к познанию тайн жизни.»

У. Вивер, 1949 г.

Наука и изобретательство

За то время, которое существует на планете Земля вид *Homo sapiens*, с ним не произошло, с биологической точки зрения, сколько-нибудь значительных изменений. Наши дети рождаются такими же, какими рождались дети наших предков десять тысяч лет назад. Но насколько изменился мир! Земной шар покрыли сети стальных и асфальтовых дорог, а околоземное пространство исчерчивают невидимыми трассами тысячи самолетов и космических кораблей. Человек побывал в космосе, а сделанные им аппараты посетили Марс, Венеру, прислали на Землю потрясающие снимки Юпитера, Сатурна и их многочисленных спутников, побывали в самых отдаленных уголках Солнечной системы. Часто говорят, что все эти головокружитель-

ные успехи человечества — результат развития науки. Это не совсем верно.

Страсть к преобразованию окружающего мира — по-видимому, один из главных инстинктов человека и проявилась она задолго до возникновения науки. Давным-давно люди стали строить дороги, величественные храмы, пирамиды и другие сооружения, которые и тысячелетия спустя поражают воображение и даже порождают гипотезы о пришельцах из иных миров. Рассказы о пришельцах — это мифы эпохи научно-технической революции, когда люди перестали верить в возможности чистого изобретательства, не основанного на научных знаниях.

Но пирамиды, храмы, парусные и дизельные корабли, паровозы, автомобили и даже самолеты — все это в большей степени результат изобретательства, чем систематического научного исследования. Дерево науки стало обильно плодоносить только в XX веке. Но плоды эти оказались такими, что затмили собой все предыдущие достижения человека. За прошедшую часть XX века наука породила две совершенно новые технологии, радикально изменившие мир, в котором мы живем. Это — ядерная техника и электроника. И это произошло на глазах лишь одного поколения. Теперь на наших глазах рождается третья технология XX века — биотехнология.

Подобно тому как появление транзистора привело к рождению современной электроники, открытие рестриктаз и разработка других методов генной инженерии порождают биотехнологию. Как грибы после дождя, возникают заводы и отраслевые институты, создающие на основе совершенно новых технических принципов фармацевтические препараты, вакцины, другие биологически активные вещества. Так что же достигнуто сегодня и над чем будет работать завтра вся эта армия ученых и инженеров?

Но давайте по порядку. Когда в середине 70-х годов впервые возник шум вокруг генной инженерии, его вызвали не ее успехи, которых тогда еще не было, а наоборот, опасения, что она приведет к непредвиденным отрицательным последствиям. Страсти не улеглись и по сей день.

Опасна ли генная инженерия?

Рассказывают, что перед первым испытанием атомной бомбы руководители американского атомного проекта обратились к теоретикам со следующим вопросом. А что если взрыв совершенно нового типа, подобных кото-

рому не было на Земле, приведет к глобальной катастрофе? Вдруг атомная бомба послужит запалом для термоядерной реакции, которая охватит всю земную атмосферу? Первой реакцией теоретиков был ответ — скорее всего, ничего страшного не произойдет. Но что значит «скорее всего»? При ответе на подобные вопросы обычные допуски не годятся. Ведь на карту была поставлена, ни много, ни мало, судьба всего человечества.

Поэтому, поразмыслив, теоретики решили, что одному из них следует попытаться совершенно строго решить задачу: есть ли малейшая вероятность того, что подобная катастрофа произойдет? Был выбран самый дотошный, самый аккуратный из американских теоретиков — Г. Брейт. Представляете, какой груз ответственности был возложен на плечи одного человека!? Скрупулезно проанализировав все мыслимые возможности, Брейт дал ответ: возможность того, что взрыв атомной бомбы вызовет цепную реакцию в атмосфере, следует считать полностью исключенной.

Подобные драматические события разыгрались и при рождении генной инженерии. В 1974 г., после самых первых опытов по получению рекомбинатных молекул ДНК и доказательств их успешной работы в клетке, ученые сами себе задали вопрос. А что, если в ходе перетасовок генов, перетасовок, которые совершенно невозможны в естественных условиях, возникнет молекула ДНК с чудовищно губительными для человека качествами? Что, если она начнет безудержно размножаться, заразит массу людей, а потом всех их убьет?

Группа ведущих американских молекулярных генетиков во главе с Полом Бергом опубликовала в главных научных журналах, а затем и в широкой прессе сенсационное письмо, в котором сообщалось, что они временно прекращают работы по генной инженерии. Они призывали своих коллег во всем мире сделать то же самое, вплоть до чрезвычайного съезда специалистов, на котором предлагалось обсудить обоснованность возникших опасений и разработать меры, которые позволили бы максимально уменьшить риск генноинженерных работ.

И хотя съезд, состоявшийся в 1975 г., наложил запрет на работы по генной инженерии, через год этот запрет был снят. Однако за это время были разработаны четкие рекомендации, как следует проводить генноинженерные работы, сопряженные с разной степенью риска.

На некоторые исследования, включающие работу с генами болезнетворных микробов и онкогенных вирусов, был наложен полный запрет. Были также проведены специальные исследования, чтобы выяснить степень риска разнообразных генноинженерных работ и разработать приемы, практически исключающие опасность.

Понятно, что решить вопрос раз и навсегда в данном случае нельзя. Вопрос о риске генноинженерных работ связан со слишком сложным комплексом микробиологических, экологических и других проблем, и, по-видимому, единственный путь здесь — постепенное ослабление ограничений с тщательной проверкой каких-либо последствий. По этому пути и пошли. Первые правила работы с рекомбинантными ДНК были очень строгими, затем они были смягчены, и есть все основания ожидать дальнейших смягчений.

Пока что все мыслимые проверки, на которые были затрачены огромные средства, не выявили ни малейших следов влияния этих экспериментов на окружающую нас микробиологическую среду. Рекомбинантные ДНК оказываются совершенно нежизнеспособными вне тех искусственных условий, в которых их культивируют генные инженеры.

Во всяком случае, есть все основания считать, что ситуация находится под контролем — если когда-нибудь возникнут какие-либо неприятности, то они будут обнаружены до того, как станут необратимыми, и опасность удастся ликвидировать. В конце концов, пользование зажигалкой, газовой плитой, электрическим утюгом, не говоря уже об атомном реакторе — все это сопряжено с определенным риском для людей и имущества. Было бы безрассудством отказаться от исследований, сулящих решить многие острые проблемы, стоящие перед людьми, просто из соображений «кабы чего не вышло».

Так или иначе, вот уже более пяти лет работы по генной инженерии ведутся полным ходом, и в первых рядах находятся те, кто в 1974 г. выступил с призывом об их добровольном прекращении.

Генноинженерная фармакология

Первыми генной инженерией всерьез заинтересовались фармацевтические фирмы. Для них возможность сравнительно дешево производить практически любые белки в больших количествах открывает совершенно новые горизонты. Ведь, помимо того, что белки — основные «рабочие молекулы» в клетке, они играют ещё ключевую

роль в регуляции процессов, идущих в организме в целом. Почти все гормоны — это небольшие белковые молекулы, содержащие от десятка до нескольких десятков аминокислотных остатков.

Раньше производство гормонов часто было весьма щекотливым делом. Хорошо еще, если, как в случае с инсулином, животный белок (из крупного рогатого скота или свиньи) может служить заменой человеческого гормона. А если нет? У некоторых детей из-за генетического дефекта не вырабатывается гормон роста и без лечения они превращаются в лилипутов. Им необходимо вводить этот гормон, а взять его можно было до сих пор только из человеческих трупов. Генная инженерия открыла путь к широкому производству этого гормона.

Понятно, как фармацевтические фирмы ухватились за новые возможности. По их заказу генные инженеры в короткий срок получили штаммы бактерий, вырабатывающие различные человеческие гормоны. Конечно, наиболее широко используемый из них — инсулин, необходимый больным сахарным диабетом, недугом, распространенным весьма широко. Хотя большинство больных успешно обходятся животным инсулином, некоторым необходим человеческий, так как к животному белку у них вырабатывается аллергия.

Но наибольший интерес вызвала возможность получения человеческого интерферона. Хотя о нем говорят уже более двадцати лет, во многом он оставался загадкой. Твердо было установлено лишь то, что интерферон — это белок, обладающий очень эффективным антивирусным действием, причем действие это универсально, интерферон эффективен против самых разных вирусов. Иными словами, интерферон для вирусов — это то же самое, что антибиотики для бактерий. Но с одним важнейшим отличием.

Антибиотик эффективно подавляет бактериальное заражение в любом организме, лишь бы бактерия не несла гены устойчивости к нему. Интерферон обладает высокой видовой специфичностью — в организме человека подавлять вирусную инфекцию может только человеческий интерферон. И хотя борьба с вирусами (против которых антибиотики бессильны и, вообще, кроме вакцин, нет эффективных средств борьбы) — это проблема номер один, наладить получение достаточно дешевого и чистого интерферона не удавалось. О том, насколько плохо обстояло дело, можно судить по тому, что не удавалось даже определить его аминокислотную последовательность. Генная инженерия в ко-

роткий срок, буквально за год, радикально изменила ситуацию.

В случае с интерфероном были реализованы два способа заставить клетку вырабатывать чужеродный белок, о которых шла речь в главе 5. Из клеток крови человека, в которых производство интерферона было стимулировано вирусной инфекцией, выделили интерфероновую мРНК, на ней синтезировали с помощью ревертазы ген интерферона, внедрили его в плазмиду и так получили первый бактериальный штамм, вырабатывавший искусственный интерферон. Удалось добиться очень высокой производительности. Была определена полная аминокислотная последовательность интерферона.

Тогда наступила очередь второго способа — чисто химического. По аминокислотной последовательности была построена нуклеотидная последовательность гена интерферона, и этот ген был синтезирован. Его опять же встроили в плазмиду и получили еще один штамм, вырабатывающий интерферон.

Искусственный интерферон оказался весьма эффективным противовирусным препаратом. Были сделаны такие опыты. Взяли шесть обезьян и разделили их на две равные группы. Всем обезьянам ввели вирус энцефаломиокардита, и так как у них не было иммунитета к этому вирусу, то всем им суждено было погибнуть. Действительно, три обезьяны, входившие в первую, контрольную группу погибли через несколько дней после заражения. Второй группе обезьян за четыре часа до заражения, а также несколько раз после заражения, вводили внутривенно искусственный интерферон. Все три обезьяны остались живы.

Получение искусственного интерферона позволило приступить к широким биологическим и клиническим испытаниям препарата. Когда эти испытания будут завершены, станет ясно, оправдает ли интерферон те большие надежды, которые на него возлагают. Во всяком случае, без генной инженерии интерферон остался бы до сих пор, да и надолго, многообещающим, но загадочным белком.

Другим обширным полем применения генной инженерии в медицине и сельском хозяйстве стало производство вакцин. Вакцинация — это самое действенное средство предупреждения вирусных эпидемий. Обычно используют убитые вирусы, у которых тем или иным способом выведена из строя ДНК (или РНК), но белки сохранены. После введения в организм, к белкам этих убитых вирусов выраба-

тываются антитела, так что если в дальнейшем попадают в нее «живые» вирусы, то они узнаются этими антителами и обезвреживаются иммунной системой.

Многие болезни, от которых раньше умирали миллионы людей (прежде всего, чума и оспа), были полностью ликвидированы благодаря вакцинации. Но есть вирусы, от которых избавиться не удастся. Для человека это прежде всего вирус гриппа, для домашних животных — вирус ящура. Вакцинация приводит в борьбе с этими вирусами лишь к частичным успехам.

Одна из причин этого — большая изменчивость вирусов. Вирусы часто мутируют, в их белках происходят отдельные замены аминокислот и «старые» антитела уже не узнают эти белки. В результате вакцинацию приходится проводить вновь и вновь.

У частой вакцинации, проводимой в гигантских масштабах, есть крупный недостаток. Трудно обеспечить полную незаразность вакцины, то есть получить гарантию, что абсолютно все вирусные частицы в вводимом препарате убиты. А раз так — вакцина может обернуться не спасением, а бедствием, источником эпидемии. Как это ни парадоксально, но, по сообщениям зарубежной печати, большинство эпидемий ящура вызывается в наши дни именно недостаточно тщательно приготовленной вакциной.

Генная инженерия позволяет, в принципе, получать абсолютно безвредную вакцину. Нужно заставить бактерию вырабатывать один (или несколько) из белков оболочки вируса, и этот белок использовать для вакцинации. В этом случае вакцина вообще не содержит инфекционного начала (ДНК или РНК) и поэтому не может возбудить болезнь, хотя должна пробудить иммунитет. Такая вакцина принципиально нового типа была получена и испытана. Опыты проводились с одним из белков оболочки вируса ящура. Испытания дали неплохие результаты, хотя оказалось, что иммунизация такой вакциной приблизительно в 1000 раз менее эффективна, чем в случае убитого вируса.

Снижения эффективности следовало ожидать — ведь иммунная система «обучена» распознавать отдельный белок оболочки, а ей нужно узнать его в составе собранной вирусной капсулы. Несомненно, эту трудность как-то удастся преодолеть. Уже ведется работа по приготовлению аналогичных вакцин от гриппа, гепатита и других вирусных заболеваний человека.

Переход от лабораторных экспериментов к промышленному производству генноинженерных препаратов потребовал более критического подхода к выбору того организма, который вырабатывает белок. Дело в том, что кишечную палочку никогда не использовали ранее в микробиологической промышленности, а производство — дело весьма консервативное. Поэтому генным инженерам оказалось проще и быстрее перейти на привычные для производства объекты.

Выбор пал на дрожжи — организмы, стоящие на эволюционной лестнице где-то между бактериями и высшими. Дрожжи издревле используются в пищевой промышленности — и при выпечке хлеба, и при приготовлении вина, так что опыт работы с дрожжами у человека колоссальный. К счастью, оказалось, что у дрожжей, как у бактерий, есть плазмиды.

Поэтому переход от кишечной палочки к дрожжам оказался почти безболезненным. Были сконструированы плазмиды-кентавры, состоящие наполовину из плазмиды кишечной палочки, несущей нужный искусственный ген, а наполовину — из плазмиды дрожжей. Эта плазида успешно росла внутри дрожжевой клетки и вырабатывала нужный белок. Разными ухищрениями удалось добиться очень высокой производительности дрожжей по части выработки искусственных белков, в частности, интерферона и гормона роста. Поэтому первые фармакологические генноинженерные препараты, после того как они пройдут клинические испытания и появятся в аптеках, будут выработаны не бактерией, а дрожжами.

Грядущий золотой век

Итак, генные инженеры объявили новый поход на вирусные болезни. Есть веские основания рассчитывать на то, что это решительное наступление приведет к революции в медицине и ветеринарии, подобной той, какую вызвало в свое время открытие антибиотиков. Но, разумеется, одной медициной воздействие биотехнологии на жизнь людей не ограничится. Но вот какие формы примет это воздействие в других областях, сказать пока очень трудно.

Если в области медицинских и ветеринарных дел похоже, что многое уже «на мази», то в остальных областях, в основном, дело ограничивается пока достаточно туманными обещаниями чего-то вроде золотого века.

Впрочем, одна задача вырисовывается достаточно четко. Это — производство промышленным путем белка для корма скоту. Дело в том, что обычный корм (сено, зеленая масса кукурузы) обеднен белком, особенно некоторыми аминокислотами. Восполнение этого дефицита резко увеличивает эффективность усвоения обычных кормов. Это известно давно, и уже много лет некоторые аминокислоты производятся промышленным, микробиологическим способом и добавляются в корм. Методы генной инженерии позволяют сконструировать штаммы, обладающие невиданной ранее производительностью, так что задачу производства корма, оптимально сбалансированного по белку, биотехнология, несомненно, решит.

Но в этом нет ничего радикально нового. Худо-бедно проблема решалась и без генной инженерии. Окажется ли выгодным перейти к полностью индустриальному изготовлению кормов генноинженерным способом — покажет будущее. Если биотехнология вызовет такой поворот — это будет действительно революцией. Мне, например, золотой век мерещится так.

Где-то в пустынях стоят солнечные электростанции, от них ток, а также необходимое минеральное сырье, поступают на громадные биотехнологические заводы, где готовят оптимально сбалансированные корма из бактерий или дрожжей и в удобной упаковке рассылают их по всей стране на птице-, свино- и коровофабрики. Там, словно в инкубаторах, где сегодня растят кур, выращивают всю остальную живность, а может быть, и совсем новых, выведенных с помощью генной инженерии, животных. Кроме кормов, заводы изготавливают искусственную пищу.

Разумеется, в каком-то объеме сохранилось и обычное земледелие, с возделыванием пшеницы и других культур. Но потребность в этих весьма дорогих продуктах настолько снизилась, что их возделывают только в отдельных климатических зонах, с полной мелиорацией и т. д. Огромные пространства, которые были в добиотехнологическую эру заняты под пашни, освободились, люди перестали скучиваться в городах, а живут вольготно среди лесов, озер и рек и ездят на работу, в ближайший магазин и друг к другу в гости в электромобилях...

Новая технология всегда изменяет рано или поздно повседневную жизнь, но очень трудно угадать заранее, как это произойдет. Радиоэлектроника, например, уже радикально изменила привычные когда-то способы получения

и обработки информации. Сейчас, с переходом ее на качественно новую ступень (миниатюризация), она вторгается буквально во все области жизни. Случится ли нечто подобное с биотехнологией? Уверен, что да.

ГЛАВА 11

СПОРЫ ВОКРУГ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

Правы ли Уотсон и Крик?

В наше время слово «ДНК» становится столь же привычным, как «нефть» или «сталь». Вокруг ДНК царит обстановка бума: десятки лабораторий, генноинженерных институтов заняты производством «рекомбинантных ДНК», многотысячная армия специалистов манипулирует генами и ищет возможности практического приложения результатов этих манипуляций. А началось все с маленькой, на одну страничку, заметки в журнале «Nature» от 25 апреля 1953 г., подписанной двумя именами, мало кому известными в то время — Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик.

В заметке излагалось мнение авторов о том, как устроена молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты. Сообщалось, что она состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепочек, завитых в двойную спираль; что внутри двойной спирали находятся азотистые основания, образующие как бы начинку кабеля, а оболочка кабеля построена из отрицательно заряженных фосфатных групп. Азотистые основания из противоположных нитей образуют пары согласно принципу комплементарности: аденин (А) всегда против тимина (Т), а гуанин (Г) против цитозина (Ц) (рис. 30). Пары оснований располагаются строго перпендикулярно оси двойной спирали, подобно перекладинам в перевитой веревочной лестнице.

Эта структура, которую, по всеобщему убеждению, ДНК имеет при физиологических условиях, получила название В-формы. Структура ДНК сильно меняется только если молекулу поместить в совершенно необычные условия, скажем, в очень концентрированный раствор спирта (нет, не в водку, а гораздо более крепкое питье — в почти что 80° раствор). Но в широком интервале внешних условий структура ДНК, как показывали многочисленные данные, оставалась практически неизменной.

Как это ни покажется странным, до недавнего времени, однако, не было строго доказано, что ДНК — это действительно двойная спираль. Дело в том, что экспериментальные данные, на которых основывались Уотсон и Крик, а также те, кто шел за ними, не могут трактоваться вполне

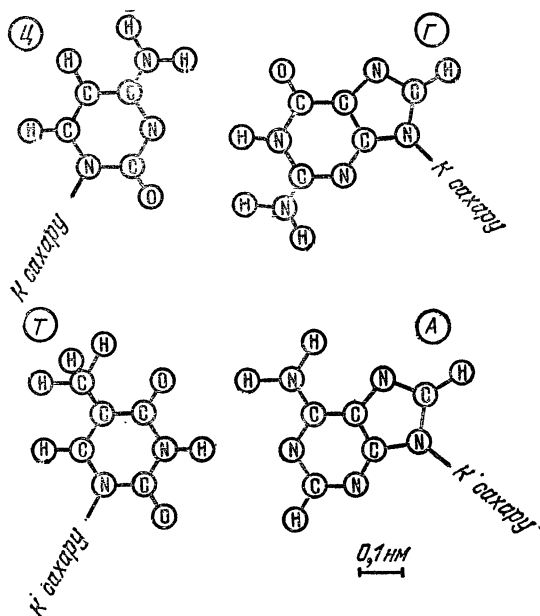


Рис. 30. Так устроены уотсон-криковские пары оснований. На рисунке правильно выдержан масштаб, относящийся к расстояниям между ядрами, но размеры атомов сильно занижены. На самом деле основания в парах нельзя сильнее сблизить, так как это привело бы к «налезанию» атомов водорода одного основания на атомы кислорода и азота другого. Замечательной чертой строения уотсон-криковских пар является то, что обе пары имеют почти точно одинаковые размеры (расстояния между атомами азота, связанными с сахаром). Именно благодаря этому в структуру двойной спирали «вписываются» любые последовательности пар оснований.

однозначно. Всегда остается, в принципе, возможность того, что тем же данным, в пределах экспериментальной точности, удовлетворит какая-то совсем другая структура.

В конце 70-х годов, например, много шума наделала модель новозеландских и индийских ученых, согласно которой две нити ДНК не переплетаются друг с другом, а идут параллельно бок о бок (ее так и называли БОБ-форма).

Первоначально утверждалось, что БОБ-форма дает такую же рентгенограмму, как и В-форма. Когда выяснилось, что это не так, стали говорить, что, мол, в волокнах и кристаллах, где изучают ДНК методом рентгеноструктурного анализа, она может быть и находится в В-форме, а в растворе, и уж подавно — в клетке, она в БОБ-форме. Большим преимуществом модели считалось отсутствие топологических проблем при репликации (не нужно раскручивать спираль).

Несостоятельность БОБ-формы как модели ДНК при обычных условиях была показана многими методами. Однако возникшие вокруг этой модели споры оказались полезными. Они заставили придирчиво пересмотреть вопрос о том, насколько мы уверены, что модель Уотсона и Крика

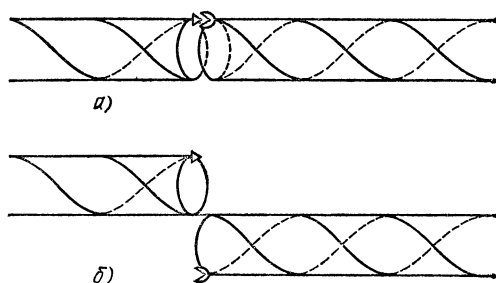


Рис. 31. Два предельных случая стыковки кольцевой молекулы ДНК в месте одонитевого разрыва: *а* — удачная стыковка; *б* — не удачная.

справедлива во всех главных чертах, а не только в том, что ДНК состоит из двух нитей и последовательности в них взаимно комплементарны.

Наиболее убедительные доказательства были получены в опытах с кольцевыми ДНК. Это было сделано все тем же Джеймсом Уонгом, имя которого нами не раз упоминалось. Уонг использовал методику Келлера, о которой было рассказано в гл. 8. Эта методика позволяет различать с помощью гель-электрофореза две молекулы ДНК, отличающиеся на единицу по числу витков сверхспирали. Чтобы понять суть опытов Уонга, представим себе, что мы имеем кольцевую ДНК, содержащую один одонитевой разрыв и что эта ДНК представлена самой себе в растворе.

Как будет выглядеть ситуация в месте разрыва? Может быть, так, что та нить, в которой имеется разрыв, готова к «стыковке», т. е. нужно только образовать связь (рис. 31, *а*). А может быть, что концы разорванной нити

ДНК не могут состыковаться, как показано на рис. 31, б. От чего это зависит? Это определяется тем, чему равно отношение N/γ_0 , где γ_0 — число пар оснований, приходящихся на один виток спирали в линейной ДНК при данных условиях.

В модели Уотсона—Крика $\gamma_0 = 10$, но мы сейчас должны забыть об этом, так как цель описываемых опытов в том и состояла, чтобы найти экспериментально значение γ_0 , а не предполагать его заранее известным. Так, ситуация, изображенная на рис. 31, а, будет в том случае, если $N/\gamma_0 = k$, где k — любое целое число. Если $N/\gamma_0 = k + \frac{1}{2}$, то будет иметь место ситуация, показанная на рис. 31, б. Возможны, естественно, и все промежуточные положения. Представим теперь, что мы меняем величину N , увеличивая длину ДНК (это можно делать, как того хочет экспериментатор, методами геной инженерии). Иными словами, пусть $N = N_0 + m$, причем, для простоты, предположим, что N_0 таково, что $N_0/\gamma_0 = k$. При разных m мы будем иметь то ситуацию рис. 31, а, то ситуацию рис. 31, б, то промежуточные ситуации.

Теперь добавим к каждому из образцов ДНК, отличающихся величиной m , фермент лигазу, зашивающий разрыв. Фермент может сделать свое дело, только если разорванные края подходят друг к другу «стык в стык». Что же, он зашьет только те молекулы, для которых $N/\gamma_0 = k$? Нет, не только. Дело в том, что молекула ДНК — это все-таки микроскопический объект. Одна из принципиальных особенностей микрообъектов, отличающая их от макрообъектов, к которым мы привыкли в повседневной жизни, состоит в том, что микрообъекты испытывают значительные изменения своей формы и размеров вследствие просто теплового движения. В нашем макромасштабе эти изменения не заметны, мы их просто не видим.

В свое время мы уже говорили о том, что тепловое движение изгибает линейную ДНК, не дает ей вытянуться как спице. Оно же не дает кольцевой ДНК принимать энергетически наиболее выгодную форму окружности. Молекула принимает в пространстве причудливую, постоянно меняющуюся форму. Кроме того, в результате теплового движения постоянно меняется угол поворота между соседними парами оснований в двойной спирали.

Используя обозначения, уже введенные нами в главе 8, можно сказать, что вследствие теплового движения проис-

ходят случайные изменения величин Wr и Tw . Следовательно, случайным образом меняется и их сумма $Tw + Wr$. Конечно, эти изменения происходят вокруг положения равновесия, вокруг наиболее вероятных значений этих величин, то есть $Tw = N/\gamma_0$, $Wr = 0$, следовательно, $Tw + Wr = N/\gamma_0$.

Тепловое движение приводит к тому, что с заметной вероятностью реализуются значения $Tw + Wr$, значительно отличающиеся от этого среднего значения.

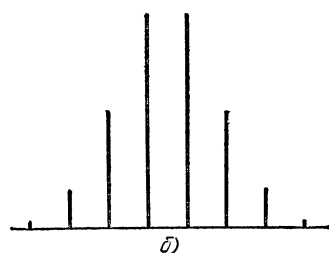
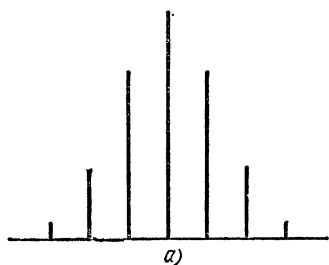


Рис. 32. Два предельных случая распределения молекул замкнутой кольцевой ДНК по величине Lk .

Поэтому, когда мы добавим фермент лигазу к образцу, состоящему из строго одинаковых молекул ДНК, содержащих односторонний разрыв, и потом проанализируем результат на геле электрофорезе по методу Келлера, то обнаружим, что получился набор молекул, отличающихся друг от друга величиной Lk . Ведь как только произошло заличивание одностороннего разрыва, молекула стала замкнутой кольцевой, и для нее вступает в силу теорема Уайта, согласно которой $Lk = Tw + Wr$. Сюда входят те самые Tw и Wr , которые были в момент замыкания.

Если отложить по оси абсцисс значение Lk , а по оси ординат количество молекул с данным Lk в образце, то получится распределение, изображенное на рис. 32. Для разных N/γ_0 будут получаться очень похожие распределения. Но все же они будут несколько отличаться друг от друга.

В чем же будет состоять отличие? Чем должно отличаться распределение молекул по Lk для ситуации на рис. 31, а (т. е. когда $N/\gamma_0 = k$) от ситуации рис. 31, б (т. е. когда $N/\gamma_0 = k + 1/2$)?

В первом случае лигаза может зашить молекулу, находящуюся в наиболее выгодном, наиболее вероятном состоянии. Во втором — не может. Поэтому в первом случае

максимуму распределения будут отвечать молекулы ДНК, а во втором — в максимуме никаких молекул не будет. В последнем случае пики, отвечающие молекулам, будут сдвинуты на одинаковое расстояние влево и вправо от максимума распределения.

Вот на это небольшое, но четко регистрируемое экспериментально отличие в распределениях молекул по величине Lk , и опираясь Уонг при определении точного значения γ_0 . Как он это делал? Чтобы понять, как он действовал, предположим, что опыт начинается с такого значения N_0 , для которого $N_0/\gamma_0 = k$, то есть максимуму распределения отвечает пик (рис. 32, а). Будем увеличивать N звено за звеном ($N = N_0 + 1, N_0 + 2, \dots, N_0 + m, \dots$). При этом максимум распределения сместится, перестанет отвечать пику, распределение пройдет через картину, изображенную на рис. 32, б, а затем при некотором m_1 впервые вновь максимум совпадет с каким-то пиком. Ясно, что $\gamma_0 = m_1$.

Правда, точность такого определения невелика, не выше, чем ± 1 , так как величину m нельзя менять меньшими порциями. Но давайте увеличивать m дальше. Ясно, что если максимум распределения k -й раз совпал с каким-то пиком и это отвечает значению $m = m_k$, то $\gamma_0 = m_k/k$.

Если величина m_k измеряется с точностью ± 1 , то точность определения γ_0 будет составлять $\pm 1/k$. Таким образом, метод позволяет не просто оценить величину γ_0 , но измерить ее с любой желательной степенью точности. Уонг установил, что $\gamma_0 = 10,5$.

Тем самым Уонг подтвердил правоту Уотсона и Крика. Тому, что у него получилось небольшое отличие в значении γ_0 от уотсон-криковской цифры 10,0, не следует придавать серьезного значения.

Замечательной чертой результата Уонга является то, что он получен для изолированных молекул в растворе. Ведь со времени классических работ М. Уилкинса и Р. Франклина, все сведения о детальной структуре ДНК получались на основе рентгеновских данных, полученных для волокон, в которых молекулы сильно взаимодействуют друг с другом.

Итак, ДНК в растворе находится в В-форме — в этом теперь уже нет никаких сомнений. Но это относится к несверхспирализованной ДНК. При сверхспирализации структура основной части молекулы не меняется заметным образом, но некоторые участки с характерными последовательностями могут радикально менять свою структуру. Вспом-

ним про перевертыши и кресты, существование которых доказано экспериментально. А какие еще изменения структуры ДНК могут происходить? Играют ли они какую-либо биологическую роль?

Z-форма

Как мы уже говорили, Уотсон и Крик, а также их последователи, занимавшиеся моделированием структуры ДНК, опирались на данные по рассеянию рентгеновских лучей от волокон ДНК. Это были именно волокна, а не кристаллы, так как естественные, выделенные из клеток молекулы ДНК не кристаллизуются. Причина этого понятна — молекулы ДНК слишком длинные, чтобы из них можно было получить кристалл.

Определенная упаковка молекул при частичном высушивании раствора происходит — они укладываются подобно бревнам в запани (на лесосплаве), только не в двух измерениях, как на поверхности воды, а в трех. Промежутики, как и в запани, заполнены водой. Рассеяние рентгеновских лучей от подобного частично упорядоченного расположения молекул дает довольно богатую информацию, но не достаточную для однозначного восстановления структуры молекул, исходя только из рентгенограмм. Это обстоятельство и явилось причиной долгих споров о том, правильно ли Уотсон и Крик «угадали» структуру ДНК в волокнах.

После опытов Уонга создалась, в определенном смысле, парадоксальная ситуация. Стало ясно, что в растворе изолированные молекулы ДНК имеют структуру, в своих основных чертах соответствующую модели Уотсона—Крика. А в волокнах, в условиях возникновения взаимодействия между молекулами? Не изменяется ли структура? Специалисты, занимающиеся моделированием ДНК и расчетами того, как происходит рассеяние рентгеновских лучей от этих моделей, убеждали, что только В-форма ДНК может дать наблюдаемую картину. Но могли оставаться сомнения, не упустили ли они из виду что-либо.

Проблема была бы решена, если бы удалось все же получить кристаллы из ДНК, исследовать рассеяние рентгеновских лучей от этих кристаллов, а потом строго решить обратную задачу восстановления структуры по картине рассеяния. Именно так определяют пространственное строение обычных химических соединений любой слож-

ности, а также белков. Но для ДНК это сделать не удавалось.

Ясно, что для длинных молекул или для коротких молекул, имеющих разную длину или разную последовательность, нет шансов получить кристаллы. Надежда была на то, что если взять короткие молекулы, содержащие около 10 пар оснований и имеющие одинаковую длину и последовательность, то их удастся как-то закристаллизовать. Но получение кристаллов — это весьма кропотливое дело. Нужно варьировать маточный раствор, из которого ведется кристаллизация, так что требуются очень большие количества вещества. А где взять много кусочков ДНК строго заданной длины? Такие препараты стали доступны только в конце 70-х годов благодаря потрясающим успехам в химическом синтезе ДНК с заданной последовательностью.

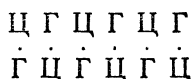
Успехи химиков в этой области действительно поражают. 20 лет назад синтез Кораной троек нуклеотидов разной последовательности вызвал сенсацию и в конечном счете принес автору Нобелевскую премию. (Как, возможно, помнит читатель, эти тринуклеотиды позволили провести полную расшифровку генетического кода, см. гл. 2.)

Сегодня можно заказать небольшой ящик размером с пишущую машинку. На ящике кнопки с буквами А, Т, Г, Ц. Вы нажимаете кнопки в том порядке, какую вы хотите получить последовательность (но не более 20 нуклеотидов), засыпаете в ящик исходные ингредиенты, также выпускаемые промышленностью, и идете обедать. Потом вы можете сходить в библиотеку или на семинар, и вернувшись через несколько часов, обнаружите в выходном устройстве вашего ящика несколько миллиграммов препарата, который вы заказали.

Понятно, что это чудо химической и инженерной мысли решает все проблемы, связанные с искусственным синтезом гена. Из лоскутков по 20 нуклеотидов можно при помощи лигазы сшить ген любой длины. Это решает также проблему получения в больших количествах коротких кусков ДНК для их кристаллизации. Впрочем, такие машины появились в самом начале 80-х годов, но в конце 70-х в некоторых лабораториях, занимавшихся синтезом генов, уже умели быстро синтезировать лоскутки ДНК, правда, вручную.

Первыми получили хорошие кристаллы маленьких кусочков ДНК в лаборатории Александра Рича в Массачусет-

ском технологическом институте (США). Кристаллы были из гексануклеотидов:



Каково же было удивление Рича и его сотрудников, когда, проделав все необходимые очень трудоемкие процедуры, они получили, наконец, структуру своих кусочков. Эта структура не имела ничего общего с моделью Уотсона и Крика!

Нет, разумеется, у нее были нормальные пары ГЦ и даже кусочек образовывал отрезок двойной спирали, но на виток спирали приходилось не 10, а 12 пар оснований. Но главное не это. Главное, что спираль была не правая, как в В-форме, а левая!

Имелся еще целый ряд принципиальных отличий этой новой структуры, названной авторами Z-формой, от В-формы ДНК. Название происходит от того, что, в отличие от В-формы, в которой сахаро-фосфатный остов образует плавную винтовую линию, в Z-форме эта линия имеет зигзагообразный вид (рис. 33).

Что же получается, неужели все-таки модель Уотсона—Крика оказалась в конечном счете неверной? Ведь первая же структура ДНК, найденная с помощью абсолютно надежных методов рентгеновской кристаллографии, оказалась принципиально отличной от В-формы.

Нет, открытие американских ученых, при всей своей сенсационности, не носит столь радикального характера. Опыты с кольцевыми ДНК однозначно свидетельствуют о том, что спираль ДНК в растворе правая и на виток спирали приходится 10 пар, что соответствует В-, а не Z-форме. Так что же, значит в кристалле вследствие межмолекулярных взаимодействий структура двойной спирали столь сильно меняется? Нет, дело и не в этом.

Как удалось установить, два фактора привели к тому, что изученный гексануклеотид оказался в Z-форме. Во-первых, строго чередующаяся последовательность Г и Ц, и, во-вторых, очень высокая концентрация противоионов, полностью заэкранировавших электростатическое поле фосфатных групп ДНК.

Р. Диккерсон и его сотрудники установили, что невыполнение любого из этих условий приводит к переходу ДНК в В-форму. Они определили структуру в кри-

сталле ДНК другой последовательности, в частности, додекамера

ЦГЦГААТТЦГЦГ
ГЦГЦТТААГЦГЦ

Он дал В-форму. Отсюда следует, что как только исчезает достаточно длинный участок строго чередующихся Г и Ц, сразу же ДНК оказывается в В-форме.

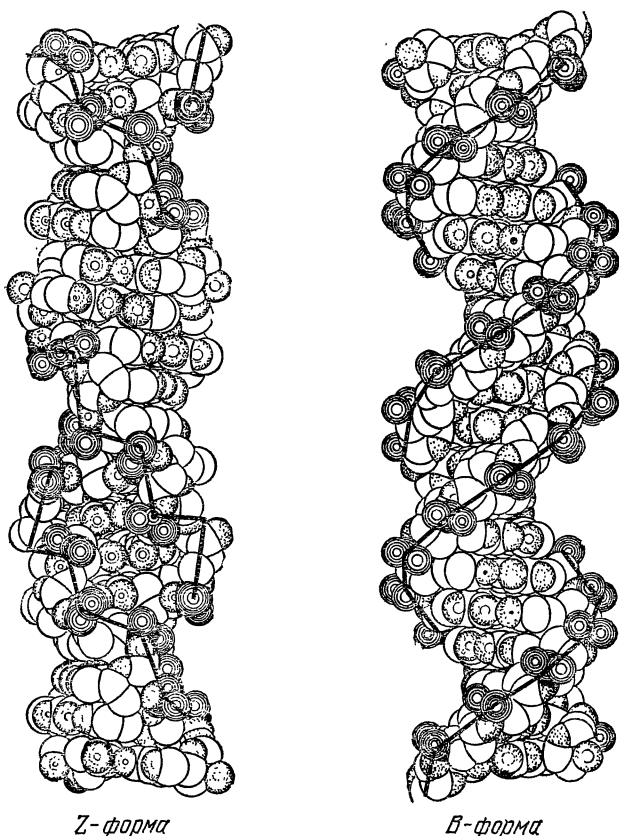


Рис. 33. Так выглядят объемные модели Z- и В-формы ДНК. Черные линии нарисованы, чтобы показать ход сахаро-фосфатной цепи.

Приближение к нормальным ионным условиям так же делает Z-форму менее выгодной, чем В-форма, даже для

гексануклеотида, который исследовал Рич. При обычных условиях, по крайней мере в линейной ДНК, Z-формы быть не должно. Ну, а в сверхспирализованной?

Конечно, сверхспирализация должна делать Z-форму более выгодной, так как изменение знака спирали из положительного на отрицательный в отрезке ДНК снимает напряжение в остальной части отрицательно сверхспирализованной молекулы. Поэтому вполне естественно предположить, что в сверхспирализованной ДНК участки, имеющие чередующуюся последовательность Г и Ц, будут переходить в Z-форму. Так ли это?

Пока не удалось решить этот вопрос, ответ зависит от того, какова энергия перехода В—Z для участка ДНК. Ведь помимо регулярной В-формы, образование Z-формы должно стать более выгодным, чем образование крестообразной структуры, чтобы эта форма существовала. Ведь последовательность

... Ц Г Ц Г Ц Г ...

... Ц̣ Г̣ Ц̣ Г̣ Ц̣ Г̣ ...

это перевертыш, так что вопрос о том, переходят ли участки ДНК с подходящей последовательностью в Z-форму, совсем не прост. Пока этот вопрос не исследован ни экспериментально, ни теоретически.

Так или иначе, но открытие Z-формы буквально всколыхнуло молекулярных биологов. Вместе с доказательством существования крестов в сверхспиральных ДНК, это открытие показало, что хотя в целом ДНК безусловно находится в В-форме, отдельные ее участки могут иметь резко отличающуюся структуру. Начался поиск этих и других структур в ДНК и выяснение их возможной биологической роли.

Подвижная ДНК

Одним из методов, очень много давших при изучении молекул, и особенно молекулы ДНК, является метод построения пространственных моделей. Хотя представление о молекулах как вполне реальных пространственных объектах завоевало право на существование еще на рубеже XIX и XX веков благодаря работам Вант-Гоффа, пространственные модели стали входить в обиход лишь в середине нашего века, главным образом благодаря деятельности Лайнуса Полинга. Были изобретены и выпу-

скаются в разнообразном виде очень удобные разъемные модели атомов и атомных группировок, в которых строго выдерживается масштаб реальных молекул. С помощью этих моделей можно собирать молекулы любой сложности, даже такие сложные, как молекула ДНК. Именно изображения такого рода моделей приведены на рис. 33.

Каждый, кто выбрал своей профессией изучение структуры ДНК, проводит долгие часы за занятием, которое может показаться детской игрой — собирая и разбирая сложные конструкции из ярких пластиковых «кубиков». Но это очень серьезные игры. Без таких игр с моделями (тогда еще весьма несовершенными и изготавливавшимися кустарным способом) Уотсону и Крику ни за что не удалось бы придумать свою двойную спираль.

Модель воспроизводит реальную молекулу, увеличенную более чем в сто миллионов раз. Конечно, работать с такой модельной молекулой несравненно удобней, чем с реальной ДНК. С помощью моделей можно пытаться отвечать на вопросы, к решению которых никак не удастся подобраться экспериментально.

Увлечение молекулярными моделями привело к тому, что постепенно многие стали забывать, что модель это всего лишь модель, а не реальный объект. Появилась тенденция приписывать все свойства модели реальной ДНК. Что же при этом упустили из виду? А то, что модель — это макро-объект, а ДНК — микрообъект. ДНК будет отличать от модели то, что на ней как-то должно сказываться тепловое движение. Но как? Насколько значительно тепловое движение «размывает» структуру ДНК? Может быть, отклонения от наиболее вероятной структуры, структуры В-ДНК, так малы, что их действительно можно не принимать во внимание?

Долгое время не удавалось ответить на этот вопрос, хотя о том, что тепловое движение как-то деформирует структуру, свидетельствовали многие эксперименты. Да что там далеко ходить! Вспомним опыты Уонга, о которых шла речь в начале этой главы. Ведь именно вследствие теплового движения при зашивании лигазой кольцевой ДНК, содержащей разрыв, образуется набор молекул с разным значением Lk . Значит, ширина этого распределения и есть мера тепловых колебаний, флуктуаций структуры.

Но ведь Lk состоит из двух слагаемых, из райзинга Wr и кручения Tw . Значит, флуктуации Lk связаны как с тепловыми колебаниями величины Wr , то есть со случайными

изгибаниями оси спирали, так и с тепловыми колебаниями $T\omega$, то есть случайными изменениями углов между соседними парами оснований. Получается одно уравнение с двумя неизвестными.

Но характер изгибных колебаний в ДНК хорошо известен — ведь они определяют то, что ДНК в растворе похожа на путь человека, заблудившегося в лесу. Благодаря этим колебаниям ДНК имеет вполне определенное значение сегмента $b = 100$ нм, так что второе уравнение все же есть. Нужно было только подсчитать, зная величину b , каковы флуктуации величины Wr в кольцевой молекуле. Эту задачу впервые удалось решить В. В. Аншелевичу, А. В. Вологодскому, А. В. Лукашину и автору этих строк в 1979 г. Вычтя из экспериментальной величины флуктуаций Lk найденное значение флуктуаций Wr , нам удалось определить амплитуду крутильных колебаний двойной спирали.

Что же в результате выяснилось? Оказалось, что в ДНК происходят весьма заметные колебания в угле закрутки соседних пар оснований. Этот угол равен в среднем около 36° . А амплитуда его колебаний составляет 5° .

Значительные крутильные колебания двойной спирали проявляются не только в поведении кольцевых молекул. Были проделаны такие опыты. Взяли линейные молекулы ДНК и добавили к ним молекулы красителя, прочно связывающиеся с двойной спиралью. Затем очень коротким импульсом лазерного излучения перевели эти молекулы красителя в электронно-возбужденное состояние. Импульс был действительно очень короткий. Он длился не секунду, не миллисекунду, не микросекунду и даже не наносекунду. Он был длительностью в несколько пикосекунд. Затем возбужденные молекулы начали высвечивать фотоны. В среднем, они это делали через несколько наносекунд, просто дольше они не могут существовать в электронно-возбужденном состоянии.

Если бы в молекуле ДНК не было крутильных колебаний, то все молекулы красителя, связанные с ней, излучали бы фотоны, находясь в том же положении в пространстве, в котором они были, когда поглощали фотоны. Конечно, двойная спираль как целое тоже поворачивается в растворе, но пока будут происходить эти медленные повороты, все молекулы красителя успеют излучить фотоны.

Свойства излучения ясно свидетельствуют, что за короткий стрезок времени, отделяющий момент испускания

фотона от момента его поглощения, успевает произойти значительное изменение ориентации молекул красителя. Это могут обеспечить только крутильные колебания. Количественный анализ этих данных позволил определить амплитуду таких колебаний. Работа была выполнена двумя группами в США и привела к близким результатам. Эти данные находятся в полном согласии с приведенными выше нашими оценками, основанными на изучении кольцевых ДНК.

Итак, в ДНК наряду с изгибами оси спирали наблюдаются также значительные крутильные колебания. Эти колебания имеют очень высокую частоту, порядка гигагерц.

Тепловое движение приводит к тому, что время от времени отдельные участки ДНК переходят в самые разные состояния. Так, время от времени каждая пара оснований в ДНК раскрывается, выставляя основания наружу. Это происходит уже довольно редко — всего раз сто в секунду. А кресты? В линейной ДНК данный перевертыш будет находиться в состоянии креста не чаще, чем один раз в год! Другое дело — сверхспиральная ДНК. В ней частота образования креста может очень резко возрасти. Ну, а Z-форма? Как мы уже отмечали, пока не известно, с какой частотой участок ДНК, содержащий чередующуюся последовательность Г и Ц, может переходить в Z-форму.

В какие еще состояния может с некоторой частотой переходить двойная спираль? Пока они существуют только на бумаге. Открытие Z-формы еще раз показало, что природа куда изобретательнее нас — никому из теоретиков такая структура и не снилась, так что в будущем нас, возможно, ждут новые неожиданности.

ГЛАВА 12

НА ПЕРЕДНЕМ КРАЕ

Проблема узнавания

Вот уже 30 лет молекула ДНК служит источником вдохновения для биологов и физиков, химиков и математиков, фармацевтов и медиков. Пожалуй, ни одно творение природы не приковывало к себе столь широкого внимания. И дело здесь не в последнюю очередь в том, что молекула ДНК была и остается ярчайшим примером того, как

важнейшие биологические функции могут прямо вытекать из строения молекулы.

Собственно, вопрос о связи между строением и функциями, свойствами вещества — это узловая проблема во многих областях науки и техники. В одних случаях нужно знать из чего и как построить материал, чтобы он был сверхпроводником и чтобы сверхпроводимость сохранялась до возможно более высокой температуры. В других, — как построить полимерную сетку, чтобы она была и прочной, и эластичной. В третьих, — как сконструировать молекулу, чтобы она убивала раковые клетки, и не трогала нормальные.

Получить ответы на подобные вопросы, число которых бесконечно, очень и очень трудно. Специалисты, будто старатели, добывающие золото, по крупичкам накапливают сведения о связи структуры и функции. На этом фоне модель ДНК Уотсона и Крика выглядит как самородок размером с небоскреб.

К сожалению, природа не балует нас подобными подарками. Из всех биологических структур ей угодно было снабдить столь ясным устройством только ДНК. Уже с белками все обстоит гораздо сложнее. В структуре белков нет того единообразия и связь между последовательностью аминокислот и пространственным строением установить весьма непросто. Эта задача не решена до сих пор, хотя было затрачено много усилий. Еще сложнее установить связь между строением белка и его биологической функцией.

Как только мы на один шаг отступаем от чистой, изолированной ДНК и начинаем изучать, как работают на ней белки, сразу все усложняется, запутывается. Многие надеялись, да некоторые надеются и поныне, что удастся найти столь же четкий принцип, как принцип комплементарности, для выяснения того, как отдельные участки ДНК узнаются белками. Сначала думали, что достаточно будет определить последовательности разных участков, узнаваемых одним и тем же белком, скажем, промоторы РНК-полимеразы фага Т7, и картина прояснится.

Но этого не произошло. Как и бывает обычно, а принцип комплементарности ярчайшее исключение из этого правила, очень трудно установить, чем определяется то, что с одними участками белок охотно связывается, а с другими — нет.

Неизвестно толком, что именно узнает белок — двойную спираль или он сначала раскрывает спираль и «ощупывает»

азотистые основания. А может быть, каждый белок по-своему изменяет структуру ДНК в процессе узнавания? Ведь значительная подвижность структуры ДНК даже под влиянием теплового движения говорит о том, что она может измениться при связывании с белком. Разобраться во всем этом сейчас пытаются во многих лабораториях мира.

Большие надежды возлагают на метод рентгеноструктурного анализа. В ближайшее время следует ожидать первых результатов по определению полной пространственной структуры белка (репрессора или РНК-полимеразы), связанного с узнаваемым им участком ДНК.

Вряд ли первые данные позволят понять, как это происходит. Но очень может быть, что накопление таких детальных данных и прояснит в конце концов картину.

Этот вопрос, то есть вопрос о том, как белки узнают отдельные участки ДНК и РНК, занимает сейчас одно из первых мест среди наиболее важных нерешенных проблем молекулярной биологии.

ДНК и рак

Несомненно, наиболее важных, принципиальных сдвигов следует ожидать в ближайшем будущем от областей биологии и медицины, изучение которых на самом глубоком уровне, на уровне ДНК, только началось. Это относится прежде всего к проблеме индивидуального развития многоклеточного организма.

До появления методов генной инженерии практически не удавалось даже подступиться к изучению устройства генов высших, к детальному сравнению генов в разных клетках многоклеточного организма.

Теперь это стало реальностью и уже привело к важнейшим открытиям, до основания потрясшим все здание классической и молекулярной генетики. Имеется в виду открытие расчленённости генов и их значительных перестроек и изменений в ходе формирования специализированных клеток или, как говорят биологи, при дифференцировке, о чем было рассказано в седьмой главе. Но главное, на что нацелены в этой связи усилия ученых, — это выяснение механизмов возникновения рака.

Рак стоит среди других болезней особняком — потому, что раковая клетка — это своя же клетка, но ведет она себя как чужак. Это, если угодно, «пятая колонна» в организме. До поры до времени такая клетка ничем не отличается

от других. Она строго подчиняется правилам общежития, принятым в многоклеточном сообществе. Согласно главному из этих правил во взрослом организме деление клеток происходит строго контролируемо, в разных тканях по-разному, а в некоторых (например, в нервных тканях) вообще строго запрещено. Иначе нельзя, ведь если бы каждая клетка делилась как ей вздумается, то организм быстро превратился бы в бесформенный сгусток клеток.

В какой-то момент такая «послушная» дифференцированная клетка перестает подчиняться правилам и начинает безудержно делиться, то есть превращается в раковую. Причем это свойство передается всему ее потомству. Отсюда и метастазы — множественные очаги болезни, возникающие в результате деления раковых клеток, разнесенных кровотоком от исходной опухоли. И все это — результат какого-то перерождения, наступившего в одной-единственной клетке.

Дьявольское коварство клетки-предательницы состоит в том, что для «сил безопасности», для иммунной системы, эта клетка — своя, вроде бы такая же, как и все остальные клетки. Вот почему организм, способный с помощью своей иммунной системы успешно бороться с вторжением всевозможных бактерий и вирусов извне, часто оказывается беспомощным перед лицом «внутреннего врага».

Что же служит причиной столь резкого изменения в поведении клетки? Так как это поведение передается по наследству, то первое, что приходит в голову, — предположить, что имеет место какое-то изменение в ДНК данной клетки, которое превращает нормальную клетку в «сумасшедшую». Впрочем, это предположение, которое не вызывало бы никаких возражений применительно к бактериям (вспомним опыты Эвери, о которых рассказывалось в первой главе), в отношении клеток высших далеко не столь очевидно.

Мы знаем, что клетки многоклеточного организма обладают способностью резко менять программу своего поведения и без изменения в ДНК. Так из одной-единственной оплодотворенной яйцеклетки возникает целый организм, построенный из клеток, весьма отличающихся друг от друга по свойствам и функциям (скажем, клетки печени и кости). Но во всех (точнее, почти во всех) этих клетках содержится вся исходная генетическая информация.

В большинстве случаев дифференцировка клеток связана с изменением активности генов — при неизменности самих генов и вообще последовательности ДНК. Просто

в одних клетках многоклеточного организма работают одни гены, в других — другие.

У весьма стройной теории, согласно которой рак — это просто дедифференцировка клетки, происходящая по какому-то внутренним причинам, есть свои трудности. Главная трудность выявилась еще в начале нашего века в опытах на животных.

Эти опыты показали, что рак можно вызывать извне, в частности, заражая животных вирусом. Вирусы, способные вызывать рак у животных, были названы онкогенными вирусами. Их в настоящее время известно множество.

Одной из самых плодотворных идей, выдвигавшихся за всю долгую историю изучения рака, была вирусно-генетическая теория, предложенная в 40-х годах нашим замечательным ученым Львом Александровичем Зильбером (1894—1966). На современном языке эту теорию можно сформулировать так. Попадая в здоровую клетку, ДНК онкогенного вируса встраивается в ДНК клетки и изменяет ее генетические свойства, из-за чего клетка начинает безудержно делиться. Встроенная вирусная ДНК удваивается вместе с ДНК клетки и передается следующим поколениям.

Вирусная теория с большим трудом пробивала себе дорогу. Конечно, то, что некоторые опухоли, наблюдаемые у животных, вызываются вирусами, никто не отрицал. Но относительно общности этой концепции и ее применимости к опухолям человека имелись серьезные сомнения. Ведь хорошо известно, что рак можно вызвать самыми разнообразными воздействиями — физическими и химическими. Известно огромное разнообразие веществ, называемых канцерогенами, которые резко повышают вероятность образования раковой опухоли. Причем же здесь вирусы?

Но наиболее сильный удар по вирусной теории был нанесен, когда выяснилось, что у многих онкогенных вирусов генетическим материалом служит не ДНК, а РНК. РНК не может встраиваться в ДНК. Что же в таком случае встраивать вирусу? То, что по РНК может синтезироваться ДНК, необходимая для встраивания, тогда не было известно и считалось просто невозможным. Получалось, что изменения, приводящие к раку, могут не затрагивать ДНК, а значит, вирусно-генетическая теория оказывалась несостоятельной.

Все же некоторые биологи никак не хотели расставаться с идеей Зильбера. Она импонировала своей простотой и конкретностью, да и эксперимент упорно показывал — онко-

генные вирусы могут вызывать рак. И хотя это явно противоречило представлениям молекулярной биологии того времени, все же продолжались поиски причин, которые позволяли бы РНКовым вирусам передавать свою генетическую информацию клетке. Особенно упорным был Говард Темин. И его настойчивость была вознаграждена. В 1970 г. он, а также Дэвид Балтимор обнаружили в РНКовых онкогенных вирусах фермент, названный ревертазой, который синтезирует ДНК по вирусной РНК, как только вирус попадает в клетку. Эта «вирусная» ДНК встраивается в ДНК клетки, что и вызывает злокачественные перерождения.

Это открытие, которое, как уже говорилось в гл. 4, было знаменательной вехой в молекулярной биологии, стало триумфом вирусно-генетической теории рака. Казалось несомненным, что вирусная природа рака доказана. Действие канцерогенов и многие неясности вирусной теории отступили на второй план. Главное — выделить вирусы, отвечающие разным видам рака, и научиться бороться с ними.

Но время шло, а реальные успехи не приходили. Прежде всего, никак не удавалось обнаружить вирусы рака человека.

Вообще-то значительному отставанию исследований в области рака человека по сравнению с раковыми заболеваниями животных не приходится удивляться. Конечно, можно попытаться выделить вирус из удаленной опухоли из крови больного лейкемией. Но как проверить, что это действительно вирус рака? Нельзя же заражать здорового человека! Правда, эту трудность, хотя и отчасти, удалось преодолеть. Уже довольно давно биологи научились культивировать клетки человека и других животных *in vitro*, вне живого организма. Растить такие клетки несравненно труднее, чем бактериальные или дрожжевые. Но зато это позволяет ставить эксперименты, невозможные в иных условиях.

Обычные, дифференцированные клетки и в пробирке ведут себя цивилизованно, подчиняясь тем правилам, к которым они приучены в многоклеточном организме. Они, например, образуют на дне стеклянного сосуда с плоским дном лишь один слой, после чего их рост прекращается.

Не то раковые клетки. Делясь, они начинают вылезать из монослоя, образуя хорошо видимый под микроскопом очаг, уплотнение. Так что раковое перерождение клеток вполне успешно изучают *in vitro*, вне организма.

И все же вирусов рака человека никак не удавалось обнаружить. Недостатка в сообщениях об их открытии не было. Но каждый раз оказывалось, что эти сообщения были чересчур поспешными. Они не подтверждались.

Да и с изучением рака животных, где выделенных и изученных онковирусов хоть отбавляй, тоже не все обстояло благополучно. Оказалось, что в большинстве случаев ДНК вируса уже встроена в ДНК животного от рождения, заранее. Тогда почему же все животные с детства не болеют раком? Получалось, что, кроме присутствия вирусной ДНК, в клетке для возникновения рака нужно еще что-то, еще какая-то команда. Может быть, сигналом к включению в работу вирусной ДНК и служит канцероген?

Но тогда получается, что канцероген и есть главная причина. Ведь если вирусная ДНК уже всегда заранее есть в клетке, то зачем вообще говорить о вирусе. Просто так устроена ДНК у данного животного, а рак возникает под действием канцерогена. Может быть, канцероген действует на встроенную ДНК вируса, может быть, на другие участки ДНК. А может быть он вообще действует не на ДНК, а на какой-то неведомый пока сигнал дифференцировки, после чего клетка «забывает» правила поведения?

Да, не прошло и десяти лет со времени торжества вирусной теории рака, как все опять сползло к старым вопросам и к старым аргументам. Получалось, что от проклятой проблемы дифференцировки никуда не уйти.

Правда, надежда все же оставалась. Что, если канцерогены все-таки действуют на ДНК (встроенную вирусную или на другие участки — не так важно), изменяя ее текст? Иными словами, что если канцерогены — это на самом деле мутагены?

Проблема канцерогенов уже давно привлекает внимание науки и вовсе не только в связи с теоретическими исследованиями природы рака. Каждое новое химическое соединение, с которым сталкивается человек, должно быть проверено на канцерогенность. История знает слишком много примеров того, как легкомысленное отношение к этой проверке приводило через много лет к гибели людей.

Но как проверить, канцероген данное вещество или нет? Вот уже многие годы предпринимаются попытки разработать быстрые и достаточно дешевые методы тестирования химических веществ на их канцерогенность. Собственно, именно эта проверка оказывается сейчас самой дорогой

и самой длительной процедурой при испытании любого нового лекарства.

Считается, что необходимо подвергнуть подопытных животных воздействию препарата, а потом проследить за ними и за контрольными животными, вплоть до их естественной (или неестественной, в случае, если испытываемое вещество окажется канцерогеном) смерти. Нельзя ли эту процедуру упростить?

Обширный материал, накопленный в результате трудоемких испытаний химических соединений на канцерогенность, позволил Б. Эймсу (Калифорнийский университет) разработать и обосновать весьма эффективный тест на канцерогенность.

В 1975 г. Эймс предложил проверять вещества не на канцерогенность, а на мутагенность.

Для проверки на мутагенность не нужно возиться с животными и даже с культурой их клеток. Можно взять бактерии, для которых существуют давно разработанные методы быстрого подсчета темпа мутирования, то есть изменения ДНКового текста. Эймс еще усовершенствовал эти методы. И он постарался проверить гипотезу, по которой мутагенность и канцерогенность — это на самом деле одно и то же.

Казалось бы, для проверки надо было брать химические соединения, известные как канцерогены, и проверять на мутагенную активность.

Но нет, так просто поступать нельзя. Ведь в организме химические соединения претерпевают перестройку, циркулируя в крови. Это случается в печени, которая прямо-таки напичкана ферментами, способными проводить самые разные модификации. Вполне может быть (и в ряде случаев показано, что это так), что рак вызывают не сами исходные вещества, а продукты их метаболизма в организме. Поэтому, прежде чем испытывать вещества на мутагенность в своем тесте, Эймс обрабатывал их экстрактом из печени животных.

Эймс проверил на мутагенность триста веществ, среди которых были как известные канцерогены, так и вещества вполне безобидные. Эта проверка показала, что между канцерогенностью и мутагенностью существует совершенно явная корреляция.

В девяноста случаях из ста канцерогены оказывались и сильными мутагенами. В то же время только 13 % соединений, не являющихся канцерогенами, оказывали мутагенное действие.

Это очень убедительный результат. Он показывает, что тест Эймса эффективен, во всяком случае — для массовых испытаний химических соединений. Ведь Эймс, вместе с одним всего лишь помощником, сумел за короткое время испытать 300 соединений. Чтобы накопить сведения о канцерогенности этих веществ обычными методами, потребовались десятилетия упорного труда многих людей.

Цель работы Эймса была сугубо практической: разработать эффективный и дешевый тест на канцерогенность. Но результаты работы имели большое значение для понимания природы рака. Реально они не оставляли сомнений в том, что канцерогены вызывают рак именно потому, что изменяют ДНК клетки.

Получалось, что первичные события, приводящие в итоге к раку, разыгрываются в генетическом материале, в ДНК. А раз так, то к штурму проблемы рака вновь приступили молекулярные биологи. Только на этот раз, спустя десять лет после работ Темина и Балтимора, они были уже во всеоружии мощных методов манипулирования с ДНК — методов генной инженерии.

В 1979 г. были поставлены опыты, в которых удалось, на этот раз, по-видимому, окончательно, доказать генетическую, ДНКовую природу рака. Эти опыты проводились на мышах, но принципиально они не отличаются от опытов по трансформации у пневмококков, которыми занимался Эвери сорок лет назад.

Автор работы Роберт Вайнберг (Массачусетский технологический институт, США) рассуждал так. Из экспериментов Эймса следует, что канцерогены должны что-то менять в ДНК, после чего она приобретает способность превращать нормальную клетку в раковую. Если это действительно так, то, выделив ДНК из раковых клеток и перенеся ее в здоровые клетки, мы должны (с некоторой вероятностью, разумеется, — как и при любой трансформации) наблюдать превращение здоровых клеток в раковые.

Вайнберг выделил ДНК из мышинных опухолевых клеток, перерождение которых было вызвано действием мощного канцерогена. Затем он провел опыты по трансформации. Раковая ДНК была добавлена к культуре здоровых клеток мыши, известной под кодовым названием N1H3T3.

Результаты опыта были таковы. В пяти случаях из пятнадцати клетки N1H3T3 превратились в раковые. Ни в одном из десяти контрольных опытов, в которых к куль-

туре N1H3T3 была добавлена нормальная ДНК, злокачественного перерождения не происходило.

Свойства клеток, перерожденных способом трансформации, были проверены на животных. Раковые клетки N1H3T3 были приживлены здоровым мышам, и у тех образовались самые настоящие раковые опухоли.

Но это еще не все. Перерождение клеток N1H3T3 в раковые удалось вызвать не только с помощью ДНК, взятой из раковых клеток мыши, но и с помощью ДНК, выделенной из раковых клеток человека! ДНК из здоровых тканей человека не приводит к злокачественному перерождению клеток N1H3T3.

Вот на этом этапе к работе подключились генные инженеры. Раз ДНК человека вызывает трансформацию, значит, в ней есть онкоген — участок, ответственный за роковые события. И значит, надо было выделить из всей молекулы ДНК наименьший участок, еще обладающий трансформирующим свойством. Такой участок был выделен. Он содержал около 6 тысяч пар нуклеотидов.

Пока последовательность онкогена не прочитана, но это уже дело техники. Гораздо важнее ответить на вопрос — что же такое онкоген?

Вайнберг считает, что онкоген — это видоизмененный нормальный ген клетки. В норме этот ген вырабатывает белок, стимулирующий быстрый рост и деление клеток на ранней стадии развития эмбриона. В дальнейшем, после завершения стадии быстрого роста, этот ген перестает активно работать. Но под влиянием канцерогена изменяется последовательность нуклеотидов, управляющая работой этого гена, и ген включается на всю мощь вновь. Он вырабатывает большое количество «эмбрионального» белка, который стимулирует быстрое неконтролируемое размножение клеток.

А как же быть с онкогенными вирусами? Опять они оказались не у дел! Этот вопрос сейчас, пожалуй, самый запутанный во всей истории. Может быть, при некоторых видах рака вирусы играют роль канцерогенов и, встраиваясь, включают работу онкогенов. В некоторых случаях они заведомо несут в себе онкоген, но при этом они, как правило, уже оказываются заранее встроенными в ДНК клетки. Говард Темин считает, что онкогенные вирусы вовсе не какие-то паразиты клетки, а нормальные участники раннего эмбрионального развития.

Но вообще вирусы как таковые отошли сейчас на второй план. Важно, что существует онкоген, доставшийся клетке по наследству или привнесенный в нее вирусом. Сейчас главная проблема не в том, откуда он взялся, а в том, что он делает, как превращает здоровую клетку в раковую.

Итак, обнаружен и выделен ген рака. Значит, существует, хотя еще и не охарактеризован как следует, «раковый белок». Начинается новый этап в борьбе с болезнью. Ведь после того, как белок будет выделен и детально изучено, что он делает, наверняка удастся придумать, как этот белок выводить из строя. Конечно, самым радикальным средством было бы испортить или «починить» сам онкоген. Но избирательно портить гены внутри клеток пока никто не умеет. Так что главные надежды возлагают сейчас на порчу белка, например, с помощью антител к нему.

Те, кто работает с онкогеном, а такие работы идут уже полным ходом в десятках лабораторий, настроены весьма оптимистично. «Похоже, что конец пути уже виден», — сказал недавно М. Виглер, один из участников этих исследований. М. Виглер работает в лаборатории Колд Спринг Харбор (США), возникшей на базе фаговой группы и возглавлявшейся долгое время Дельбрюком. Уже много лет этой лабораторией руководит Дж. Уотсон, который сделал главным направлением исследований изучение природы рака на уровне ДНК.

Обычно подобные оптимистические высказывания воспринимаются скептически. Слишком много раз казалось, что природу рака вот-вот удастся понять, а затем наступало горькое разочарование. Но, несомненно, сейчас оснований для оптимизма больше, чем когда-либо. И причина этому в том, что изучение проблемы рака прочно перешло на уровень ДНК.

Аденин, химическая группировка, входящая в состав ДНК и РНК. Одно из четырех оснований нуклеиновых кислот. Сокращенное обозначение — А.

Аллель, один из двух генов, ответственных за один и тот же признак. Один аллель поступает от одного родителя, другой — от другого.

Аллергия, чрезмерная реакция иммунной системы.

Аминокислота, химическое соединение вида $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$, где R — любой радикал. Является исходным продуктом для синтеза белка.

Аминокислотный остаток, химическая группировка строения $-\text{HN}-\text{CHR}-\text{CO}-$, являющаяся мономерным звеном белковой цепи. То, что остается от аминокислоты, когда она встраивается в белковую цепь.

Антибиотик, органическое вещество, подавляющее размножение бактерий, но не являющееся ядом для человека или животного. Первым антибиотиком был пенициллин, выделенный Александром Флемингом из плесени в 1929 г. Открытие антибиотиков произвело революцию в лечении многих заразных болезней, против которых медицина ранее была практически бессильна, таких, как воспаление легких, туберкулез и т. д. Однако широкое и бесконтрольное применение антибиотиков привело к «привыканию» бактерий к ним. В результате традиционные антибиотики теперь гораздо менее эффективны, чем были в первые десятилетия их использования. Антибиотики совершенно бесполезны в борьбе с вирусными заболеваниями.

Антиген, чужеродное вещество, вызывающее иммунную реакцию организма.

Антитело, белок, вырабатываемый иммунной системой в ответ на проникновение в организм чужеродного вещества — антигена. Синоним иммуноглобулина.

АТФ, сокращенное название аденозинтрифосфорной кислоты. Является универсальным аккумулятором энергии в клетке. Энергия запасается в трифосфатном «хвосте» молекулы. «Разрядка» происходит в результате отщепления одной фосфатной группы. «Зарядка» производится в митохондриях.

Бактериофаг, вирус, убивающий бактерию. Состоит из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), помещенной в белковую оболочку. Заражение бактерии происходит тогда, когда бактериофаг, присоединившись к оболочке, впрыскивает внутрь бактерии свою нуклеиновую кислоту. Вскоре после этого ресурсы бактерии переключаются на синтез вирусной нуклеиновой кислоты и вирусных белков. Минут через двадцать после заражения бактериальная оболочка лопается и из нее вываливается сотня готовых вирусных частиц, являющихся точной копией исходного бактериофага.

Бактерия, одноклеточный микроорганизм. Мир бактерий чрезвычайно многообразен и играет огромную роль в обеспечении существования других живых существ на Земле. Многие бактерии живут в самых примитивных условиях, требуя для своего размножения лишь про-

стейшие молекулы, содержащие химические элементы, входящие в состав биологических молекул. Так, для удовлетворения потребности в углеводе некоторым бактериям достаточно нефти; азот и кислород они берут из воздуха. Бактерии окружают нас повсюду, вызывая скисание молока или бульона, они находятся в нас самих, помогая нам переваривать пищу (кишечная палочка). Бактерии вызывают многие заразные болезни.

Белок, важнейший компонент живой клетки. Представляет собой полиаминокислотную цепь, образующую весьма сложную пространственную структуру. Природные белки — это гетерополимеры, состоящие из аминокислотных остатков 20 сортов. Один белок отличается от другого последовательностью аминокислотных остатков.

Благоприобретенный признак, признак, не заложенный от рождения, а появившийся под влиянием внешних воздействий. Благоприобретенные признаки не наследуются, так как не имеют отражения в генах. Так, в какой бы экзотический цвет ни красила женщина свои волосы, это никак не отразится на цвете волос ее будущего ребенка.

Близнецы (идентичные или однояйцовые), братья или сестры, выросшие из одной зиготы. Рождаются в тех случаях, когда до начала развития плода оплодотворенная яйцеклетка по каким-то причинам делится на две зиготы, каждая из которых дает начало отдельному ребенку. Идентичные близнецы имеют в точности одинаковый набор генов. Поэтому они всегда одного пола и так похожи друг на друга. Всестороннее обследование идентичных близнецов, разлученных по тем или иным причинам в раннем возрасте, дало очень богатую информацию о том, какая роль в судьбе человека принадлежит генам, а какая внешним условиям.

Броуновское движение, хаотическое движение микрочастиц. Является следствием теплового движения молекул.

Вакцина, препарат, содержащий обезвреженные, убитые бактерии или вирусы. Используется для прививок против заразных болезней.

Валин, одна из 20 канонических аминокислот.

Вид, одно из основных понятий описательной биологии, занимающейся систематизацией живых существ. Основным принципом деления на виды является невозможность дать при скрещивании потомство, способное к дальнейшему продолжению рода. Например, ослы и лошади принадлежат к разным видам, поскольку продукт их скрещивания (мул) не способен к размножению (стерилен).

Вирус, клеточный паразит, один из простейших объектов живой природы. Вне клетки вирус — это молекулярный комплекс, состоящий из нуклеиновой кислоты (ДНК, иногда РНК) и несколько белков, образующих оболочку вируса. После проникновения в клетку вируса (или его нуклеиновой кислоты) происходит переключение ресурсов клетки на синтез вирусной нуклеиновой кислоты и белков. Когда клеточные ресурсы исчерпываются, ее оболочка разрывается и из нее вываливаются готовые вирусные частицы. Вирусы животных устроены значительно проще, чем вирусы бактерий (бактериофаги). Животные вирусы не способны впрыскивать в клетку свою нуклеиновую кислоту и попадают внутрь клетки вместе с пищей. Вирусы вызывают многие заразные болезни, такие как грипп, оспа, полиомиелит, гепатит (болезнь Боткина) и т. д. В некоторых случаях вирус, оказавшись внутри клетки, не губит ее, а встраивает свою ДНК в ДНК клетки, после чего вирусная ДНК начинает размножаться вместе с ДНК клетки. При этом, однако, поведение самой клетки может резко измениться.

Вырожденность кода, одно из свойств генетического кода, заключающееся в том, что одной и той же аминокислоте может отвечать несколько кодонов.

Гель, полимерная сетка, пропитанная растворителем. Подобно твердому телу, гель сохраняет форму. Примеры: студни, желе. Электрофорез в гелях широко используется при определении последовательности ДНК, в генной инженерии и при исследовании кольцевых ДНК.

Гемоглобин, белок, переносящий кислород в крови. Обуславливает красный цвет крови.

Ген, основное понятие классической генетики, в которой под этим термином долгое время понималась неделимая частица наследственности. В 50-х и 60-х годах под словом ген понимали непрерывный участок ДНК, на котором в виде последовательности нуклеотидов записана информация об аминокислотной последовательности одного белка. В настоящее время, после открытий, о которых рассказано в главах 6 и 7, понятие гена перестало быть столь однозначным. Этим словом по-прежнему называют участок ДНК. Но в одних случаях имеется в виду непрерывный участок, который отвечает лишь части белковой цепи, а в других — совокупность участков, отвечающих целой белковой молекуле. А может быть и так, что один и тот же участок ДНК принадлежит сразу двум и даже трем генам.

Генетика, наука о наследственности.

Генная инженерия, прикладная ветвь молекулярной биологии, занимающаяся направленным изменением наследственности путем разрезания и сшивания молекул ДНК с последующим встраиванием их в живую клетку.

Геном, вся генетическая информация организма.

Генотип, понятие классической генетики, означающее всю совокупность генов данного организма. Теперь чаще используется термин *геном*, имеющий тот же смысл.

Гепатит, тяжелое вирусное заболевание печени. Известно также под названием инфекционной желтухи и болезни Боткина.

Гибридная ДНК, искусственная молекула, составленная методами генной инженерии из участков разных природных ДНК. Тот же смысл имеют термины *рекомбинантная* и *химерная ДНК*.

Гистоны, белки, входящие в состав хромосом. Образуют белковую сердцевину нуклеосом.

Гомозиготность, понятие классической генетики. Означает, что аллельные гены одинаковы в своем проявлении.

Гормоны, молекулы как белковой, так и иной природы, регулирующие многие процессы в организме. Недостаток или избыток того или иного гормона является причиной многих хронических заболеваний. Широко известны такие гормоны, как инсулин, гормон роста и др.

Гуанин, химическая группировка, входящая в состав ДНК и РНК. Одно из четырех оснований нуклеиновых кислот. Сокращенное обозначение — *Г*.

Дезоксирибонуклеиновая кислота, полное название молекулы ДНК.

Диабет, заболевание, состоящее в накоплении сахара в крови. Причина состоит в неспособности поджелудочной железы вырабатывать гормон инсулин.

Дифференцировка, специализация клеток в процессе развития многоклеточного организма. Причина формирования специализированных клеток, таких как клетки кожи, нервные клетки, клетки крови и т. д., является одной из наиболее важных нерешенных проблем науки.

ДНК, дезоксирибонуклеиновая кислота. Молекула, в которой содержится генетическая информация. Состоит из двух полинуклеотидных цепей, образующих двойную спираль. Линейная ДНК имеет два конца. Замкнутая кольцевая (зкДНК) не имеет концов. Каждая из полинуклеотидных цепей в зкДНК замкнута сама на себя. Однонитевая ДНК состоит из одной полинуклеотидной цепи.

ДНК-полимераза, фермент, ведущий синтез ДНК по матрице ДНК. Этот процесс называется репликацией.

Зацепление, топологическое состояние двух или более контуров, при котором они не могут быть разведены без того, чтобы хотя бы один из них был разорван.

Зигота, оплодотворенная яйцеклетка. Является той единственной клеткой, из которой вырастает целый организм.

Злокачественный, раковый. Злокачественным перерождением ткани называют процесс возникновения раковой опухоли.

Изолейцин, одна из 20 канонических аминокислот.

Иммунитет, невосприимчивость к данной заразной болезни того, кто ее перенес в прошлом. Изучение явления иммунитета привело к открытию иммунной системы, служащей для удаления из организма проникших в него чужеродных веществ, в первую очередь белков.

Иммуноглобулин, белок, вырабатываемый иммунной системой в ответ на проникновение в организм чужеродного вещества. Иммуноглобулины часто называют антителами.

Инсулин, белок, вырабатываемый поджелудочной железой. Является гормоном, регулирующим содержание сахара в крови.

Интерферон, белок, вырабатываемый в организме в ответ на вирусную инфекцию. Не является иммуноглобулином и не имеет отношения к иммунной системе. Эффективен против самых разных вирусов и поэтому принадлежит к числу наиболее многообещающих антивирусных препаратов. Производство интерферона в больших количествах стало возможно только благодаря генной инженерии.

Инфекция, заражение бактерией или вирусом.

Инфекционность, заразность.

Канцероген, агент, вызывающий рак.

Кишечная палочка, бактерия, живущая в природных условиях в кишечнике человека. Латинское название *Escherichia coli*, сокращенно *E. Coli*, читается «эшерихия коли». Излюбленный объект исследования молекулярных биологов.

Клонирование, получение большого числа клеток из одной-единственной клетки. Теперь используется также в отношении молекул ДНК.

Клубок (полимерный) — понятие физики полимеров. Служит для обозначения того, какую форму в пространстве имеет полимерная молекула. Из-за теплового движения форма полимерного клубка постоянно меняется.

Ковалентная связь, прочная химическая связь, обеспечивающая целостность молекул. Например, связь в молекулах H_2 , N_2 , CO и т. д.

Код (генетический), словарь для перевода ДНКовых и РНКовых текстов на белковый (аминокислотный) язык.

Кодон, термин, связанный с генетическим кодом. Означает тройку нуклеотидов, отвечающую одному аминокислотному остатку. Существует несколько бессмысленных (незначащих) кодонов, не отвечающих никакой аминокислоте. Они играют роль стоп-сигналов при синтезе белка по мРНК на рибосоме. Их называют терминирующими кодонами. Иницирующие кодоны служат сигналами начала синтеза белка.

Коллаген, белок соединительной ткани. Важнейший пример белка, не являющегося ферментом, а играющего структурную роль. Коллаген является главным компонентом костей и сухожилий. В быту известен под названием «желатин». Из него изготавливают студни, желе, столярный клей и т. д.

Комплементарность, свойство двойной спирали ДНК, согласно которому против А всегда стоит Т и наоборот, а против Г — всегда Ц и наоборот.

Крестообразная структура, структура ДНК, которая может образовываться в последовательностях — перевертышах.

Лигаза, фермент, заживляющий разрывы в ДНК.

Лимфоциты, клетки крови, ответственные за иммунитет.

Макро-, приставка, означающая, что речь идет о чем-то, состоящем из очень большого числа атомов.

Матрица, полимерная молекула, последовательность которой используется для задания последовательности другой полимерной молекулы. ДНК служит матрицей для синтеза ДНК при репликации и РНК при транскрипции. РНК служит матрицей для синтеза белка при трансляции и ДНК при обратной транскрипции.

Метастаз, вторичный очаг злокачественного перерождения. Признак далеко зашедшего заболевания раком. Способность давать метастазы — одна из наиболее неприятных особенностей ракового заболевания.

Метилаза, фермент, осуществляющий метилирование.

Метилирование, присоединение метильной группы CH_3 .

Метионин, одна из 20 канонических аминокислот.

Микро-, приставка, означающая, что речь идет о чем-то, содержащем не очень большое число атомов.

Митохондрия, сигарообразное тело, расположенное в цитоплазме. Является энергостанцией клетки, перерабатывающей продукты питания в энергию АТФ.

Мономер, повторяющийся элемент полимерной цепи. Например, в полиэтилене это группа CH_2 , в белке — аминокислотный остаток, в ДНК — нуклеотид. Правильнее говорить не мономер, а мономерное звено, так как мономером химии часто называют исходный продукт для синтеза полимера (этилен, аминокислота и т. д.).

Мутаген, агент, вызывающий мутацию.

Мутация, наследуемое изменение генетического материала. Мутации могут быть спонтанными, т. е. вызванными естественными причинами и индуцированными, т. е. вызванными искусственно (радиация, химические вещества и т. д.). В результате мутации происходит изменение последовательности нуклеотидов в ДНК.

Нанометр(нм), единица измерения длины (миллиардная доля метра).

Нуклеаза, фермент, расщепляющий ДНК или РНК.

Нуклеиновые кислоты, ДНК и РНК.

Нуклеосома, основной структурный элемент хромосомы. Представляет собой белковую (гистоновую) сердцевину, на которую намотана ДНК длиной в 140 пар оснований, которая делает около двух оборотов.

Нуклеотид, мономерное звено ДНК и РНК.

Онкоген, ген, вызывающий рак.

Онкогенный вирус, вирус, вызывающий рак.

Основание (нуклеиновое или азотистое), класс химических соединений, к которому принадлежит аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил.

Пенициллин, антибиотик.

Пенициллиназа фермент, расщепляющий пенициллин. Выработка этого фермента бактерией защищает ее от действия пенициллина.

Перевертыш, фраза, которая звучит одинаково, читать ли ее слева направо или справа налево. При написании перевертыша не принимаются во внимание промежутки между словами и знаки препинания. Примеры: ТОНЕТЕНОТ; ЛЕЗУВУЗЕЛ; НЕГНИПАПИНГЕН; ЛЕШАНАПОЛКЕКЛОПАНАШЕЛ; УЖРЕДКОРУКОЮОКУРОК-ДЕРЖУ. В ДНК-овых текстах, направление чтения которых строго задано химической структурой, перевертышем называется отрезок двойной спирали, который имеет одинаковую последовательность при чтении по одной и по другой нити. Например:

А	Т	Г	Ц	Г	Ц	А	Т
.
Т	А	Ц	Г	Ц	Г	Т	А

Пиримидин, класс химических соединений, к которому принадлежит тимин, урацил и цитозин.

Плазмида, кольцевая молекула ДНК, размножающаяся вместе с бактерией и способная переходить из клетки в клетку.

Поли-, приставка, обозначающая, что речь идет о полимере.

Полимер, химическое соединение, представляющее собой цепочку повторяющихся группировок. Простейшим полимером является полиэтилен ... —CH₂—CH₂—CH₂— ... , из которого делают пакеты, сумочки и многое другое. Гомополимеры состоят из совершенно одинаковых мономерных звеньев. Биологические полимеры являются гетерополимерами, так как в каждом из них звенья хотя и принадлежат к одному классу (аминокислоты в белке и нуклеотиды в нуклеиновых кислотах), но отличаются по своему строению. Белок состоит из мономеров 20 сортов, нуклеиновая кислота — четырех сортов.

Порядок зацепления, количественная характеристика степени зацепленности двух контуров. Порядок зацепления равен числу раз, которое один контур протыкает поверхность, натянутую на другой контур. Обозначается через *Lk*.

Прививка, введение в организм вакцины. Смысл прививки — выработать иммунитет к болезни без того, чтобы переболеть ею.

Прокариоты, одноклеточные, не имеющие клеточных ядер.

Промотор, участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, чтобы начать синтез мРНК.

Пурин, класс химических соединений, к которому принадлежит аденин и гуанин.

Райзинг, понятие теории полос. Величина райзинга зависит только от того, какую форму в пространстве имеет ось полосы, но не зависит от того, как полоса закручена вокруг этой оси. Обозначается через *W*.

Реввертаза, фермент, ведущий синтез ДНК по матрице РНК. Этот процесс называется обратной транскрипцией.

Рекомбинантная ДНК, искусственная молекула, составленная методами генной инженерии из участков разных природных ДНК. Тот же смысл имеют термины гибридная и химерная ДНК.

Рентгеновские лучи, коротковолновое электромагнитное излучение с длиной волны порядка 10⁻¹⁰ м.

Рентгенограмма, изображение на фотопластинке в результате ее засвечивания рентгеновскими лучами, рассеянными кристаллом.

Рентгеноструктурный анализ, метод определения внутренней структуры кристаллических веществ путем специальной обработки получающихся от них рентгенограмм. Является наиболее прямым и наиболее мощным методом определения строения вещества. Наши знания

- о строении молекул любой сложности, в том числе основных биологических молекул, белков и нуклеиновых кислот, являются прямым результатом использования этого метода.
- Репарация**, залечивание повреждений в ДНК.
- Репликация**, удвоение генетического материала. Синтез ДНК на ДНК.
- Репрессор**, белок, очень прочно связывающийся с определенным участком ДНК, расположенным между промотором и самим геном. Связавшись с ДНК, репрессор препятствует продвижению РНК-полимеразы от промотора к гену и тем самым блокирует синтез мРНК. Служит для регуляции транскрипции.
- Рестриктаза**, фермент, разрезающий двойную спираль в местах с определенной последовательностью нуклеотидов. Главный инструмент генной инженерии.
- Рестрикционный фрагмент**, кусок ДНК, вырезанный из молекулы при помощи рестриктаз.
- Рецессивность**, понятие классической генетики. Рецессивный ген проявляется только в гомозиготном состоянии.
- Рибосома**, сложный комплекс РНК и белков, осуществляющий в клетке процесс трансляции.
- Рибонуклеиновая кислота**, полное название молекулы РНК.
- РНК**, рибонуклеиновая кислота. Биологический полимер, очень близкий к ДНК по своему химическому строению. Способен образовывать двойную спираль, но в природе, как правило, существует в виде одночной нити. У некоторых вирусов является носителем генетической информации, т. е. подменяет ДНК. В клетке генетической роли не играет. Играет важную роль при передаче информации от ДНК к белку. По выполняемым функциям различают три типа РНК: информационная или матричная (мРНК), рибосомальная (рРНК) и транспортная (тРНК).
- РНК-полимераза**, фермент, осуществляющий синтез мРНК по матрице ДНК. Осуществляет процесс транскрипции.
- Сахар**, химическая группировка, входящая в состав нуклеотида. Принадлежит к тому же классу соединений, что и пищевой сахар.
- Сверхспирализация**, свойство кольцевой замкнутой ДНК. Сверхспирализация возникает тогда, когда порядок зацепления Lk в ДНК отличается от величины N/γ_0 , где N — число пар оснований в ДНК, а γ_0 — число пар оснований, приходящейся на один виток двойной спирали в линейной ДНК, находящейся в тех же условиях.
- Сегмент** (куновский или статистический), понятие физики полимеров. Элемент идеализированной полимерной цепи, состоящей из прямолинейных отрезков, соединенных свободными шарнирами.
- Селективные условия**, условия, в которых могут размножаться не все бактерии, а только те, которые обладают какими-то особыми свойствами. Например, среда, в которую добавлен антибиотик. На такой среде могут размножаться только те бактерии, которые несут ген устойчивости к данному антибиотику.
- Симбиоз**, взаимовыгодное сосуществование двух или более видов. Симбиоз имеет огромное значение для всего живого на Земле. Так, благодаря симбиозу фиксирующих азот бактерий и клубеньковых растений, азот из воздуха поступает в растения, где он совершенно необходим как один из элементов, входящих в белки и нуклеиновые кислоты. Сами растения не способны усваивать азот из воздуха.
- Спираль**, в отношении ДНК так принято называть винтовую линию.
- Тимин**, химическая группировка, входящая в состав ДНК. Одно из четырех оснований ДНК. Сокращенное обозначение — Т.

Топоизомеразы, класс ферментов, меняющих топологию кольцевой замкнутой ДНК.

Топология, область математики, изучающая общие свойства кривых и поверхностей, не меняющиеся при их всевозможных деформациях, производимых без разрезания и склеивания.

Транскрипция, синтез РНК на матрице ДНК. Обратная транскрипция — синтез ДНК на матрице РНК.

Трансляция, синтез белка по матрице мРНК на рибосоме.

Трансформация, изменение наследственности клеткой вследствие проникновения в нее чужеродного генетического материала.

Триптофан, одна из 20 канонических аминокислот.

Ультрафиолетовые лучи, не видимое глазом излучение электромагнитной природы с длиной волны, меньшей 400 нм.

Урацил, химическая группировка, входящая в состав РНК. Одно из четырех оснований РНК. Сокращенное обозначение — У.

Фаг, сокращенное название бактериофага.

Фаза, одно из трех состояний вещества (твердое, жидкое или газообразное).

Фазовые переходы, переход вещества из одного фазового состояния в другое.

Фенотип, понятие классической генетики. Означает всю совокупность внешних признаков и свойств живого организма, сложившихся в ходе его развития.

Фенилаланин, одна из 20 канонических аминокислот.

Фермент, молекула белка, осуществляющая одну из химических реакций в клетке. Ферменты являются катализаторами, т. е. они сами не изменяются в ходе реакции, но их присутствие очень сильно ускоряет протекание реакции. Ферменты также обеспечивают очень высокую специфичность, избирательность реакций, происходящих в клетке.

Фосфат, химическая группировка, входящая в состав нуклеотида.

Фотодимер (тими́на), особое химическое соединение, образующееся после того, как один из двух тиминов, стоящих рядом вдоль цепи в ДНК, поглотил фотон.

Химерная ДНК, искусственная молекула, составленная методами генной инженерии из участков разных природных ДНК. Тот же смысл имеют термины гибридная и рекомбинантная ДНК.

Хромосома, находящийся в клеточном ядре сложный организованный комплекс ДНК с белками, в котором хранится генетическая информация.

Цитозин, химическая группировка, входящая в состав ДНК и РНК. Одно из четырех оснований нуклеиновых кислот. Сокращенное обозначение — Ц.

Цитоплазма, содержимое клетки, за исключением ядра.

Штамм, совокупность бактериальных клеток, полученных из одной клетки. В том же смысле используется термин клон.

Экзонуклеаза, нуклеаза, расщепляющая нуклеиновую кислоту с концов, нуклеотид за нуклеотидом.

Электрофорез, движение молекул в электрическом поле.

Эндонуклеаза, нуклеаза, расщепляющая нуклеиновую кислоту в произвольном месте цепи, а не только с конца, как экзонуклеаза.

Энтропия, физическое понятие, количественно характеризующее степень разупорядочения системы.

Эукариоты, организмы, имеющие клеточное ядро.

Яйцеклетка, женская половая клетка.

Максим Давидович Франк-Каменецкий

САМАЯ ГЛАВНАЯ МОЛЕКУЛА

(Серия: Библиотечка «Квант»)

Редактор *В. К. Черникова*

Техн. редактор *И. Ш. Аксельрод*

Корректоры *Е. А. Белицкая, Н. Б. Румянцева*

ИБ, № 12263

Сдано в набор 01.09.82. Подписано к печати 29.12.82. Т-20997. Формат 84×108^{1/32}. Бум. тип. № 1. Литературная гарнитура. Высокая печать. Условн. печ. л. 8,4. Уч.-изд. л. 8,99. Тираж 150 000 экз. Заказ № 581. Цена 30 коп.

Издательство «Наука»

Главная редакция физико-математической литературы
117071, Москва, В-71, Ленинский проспект, 15

Ордена Октябрьской Революции, ордена Трудового Красного Знамени Ленинградское производственно-техническое объединение «Печатный Двор» имени А. М. Горького Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 197136, Ленинград, П-136, Чкаловский пр., 15

ВЫПУСК 25

М. Д. ФРАНК-КАМЕНЕЦКИЙ

**САМАЯ
ГЛАВНАЯ
МОЛЕКУЛА**

БИБЛИОТЕЧКА «КВАНТ»

ВЫШЛИ ИЗ ПЕЧАТИ

- Вып. 1. М. П. Бронштейн. Атомы и электроны.
Вып. 2. М. Фарадей. История свечи.
Вып. 3. О. Оре. Приглашение в теорию чисел.
Вып. 4. Опыты в домашней лаборатории.
Вып. 5. И. Ш. Слободецкий, Л. Г. Асламазов. Задачи по физике.
Вып. 6. Л. П. Мочалов. Головоломки.
Вып. 7. П. С. Александров. Введение в теорию групп.
Вып. 8. Г. Штейнгауз. Математический калейдоскоп.
Вып. 9. Замечательные ученые.
Вып. 10. В. М. Глушков, В. Я. Валах. Что такое ОГАС!
Вып. 11. Г. И. Копылов. Всего лишь кинематика.
Вып. 12. Я. А. Смородинский. Температура.
Вып. 13. А. Е. Карпов, Е. Я. Гик. Шахматный калейдоскоп.
Вып. 14. С. Г. Гиндикин. Рассказы о физиках и математиках.
Вып. 15. А. А. Боровой. Как регистрируют частицы.
Вып. 16. М. И. Каганов, В. М. Цукерник. Природа магнетизма.
Вып. 17. И. Ф. Шарыгин. Задачи по геометрии: Планиметрия.
Вып. 18. Д. В. Тарасов, А. Н. Тарасов. Беседы о преломлении света.
Вып. 19. А. Л. Эфрос. Физика и геометрия беспорядка.
Вып. 20. С. А. Пикин, Л. М. Блинов. Жидкие кристаллы.
Вып. 21. В. Г. Болтянский, В. А. Ефремович. Наглядная топология.
Вып. 22. М. И. Башмаков, Б. М. Беккер, В. М. Гольховой. Задачи по математике. Алгебра и анализ.
Вып. 23. А. Н. Колмогоров, И. Г. Журбенко, А. В. Прохоров. Введение в теорию вероятностей.
Вып. 24. Е. Я. Гик. Шахматы и математика.
Вып. 25. М. Д. Франк-Каменецкий. Самая главная молекула.

БИБЛИОТЕЧКА «КВАНТ»

ВЫШЛИ ИЗ ПЕЧАТИ

- Вып. 1. М. П. Бронштейн. Атомы и электроны.
Вып. 2. М. Фарадей. История свечи.
Вып. 3. О. Оре. Приглашение в теорию чисел.
Вып. 4. Опыты в домашней лаборатории.
Вып. 5. И. Ш. Слободецкий, Л. Г. Асламазов. Задачи по физике.
Вып. 6. Л. П. Мочалов. Головоломки.
Вып. 7. П. С. Александров. Введение в теорию групп.
Вып. 8. Г. Штейнгауз. Математический калейдоскоп.
Вып. 9. Замечательные ученые.
Вып. 10. В. М. Глушков, В. Я. Валах. Что такое ОГАС!
Вып. 11. Г. И. Копылов. Всего лишь кинематика.
Вып. 12. Я. А. Смородинский. Температура.
Вып. 13. А. Е. Карпов, Е. Я. Гик. Шахматный калейдоскоп.
Вып. 14. С. Г. Гиндикин. Рассказы о физиках и математиках.
Вып. 15. А. А. Боровой. Как регистрируют частицы.
Вып. 16. М. И. Каганов, В. М. Цукерник. Природа магнетизма.
Вып. 17. И. Ф. Шарыгин. Задачи по геометрии: Планиметрия.
Вып. 18. Д. В. Тарасов, А. Н. Тарасов. Беседы о преломлении света.
Вып. 19. А. Л. Эфрос. Физика и геометрия беспорядка.
Вып. 20. С. А. Пикин, Л. М. Блинов. Жидкие кристаллы.
Вып. 21. В. Г. Болтянский, В. А. Ефремович. Наглядная топология.
Вып. 22. М. И. Башмаков, Б. М. Беккер, В. М. Гольховой. Задачи по математике. Алгебра и анализ.
Вып. 23. А. Н. Колмогоров, И. Г. Журбенко, А. В. Прохоров. Введение в теорию вероятностей.
Вып. 24. Е. Я. Гик. Шахматы и математика.
Вып. 25. М. Д. Франк-Каменецкий. Самая главная молекула.