

EDITORIAL

The Main Event in Biology of XX Century

Plotnikov V.K.*

Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

*E-Mail: vkpbio21@mail.ru

Received January 23, 2013

In the article the 60-years history of molecular biology, the central discipline of modern biology: its achievements and problems

Key words: molecular biology, achievements and problems, DNA, RNA, protein

EDITORIAL

Самое главное событие в биологии XX века (К 60-летию молекулярной биологии)

Плотников В.К.*

Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, ул. Калинина, 13, Российская Федерация

*E-Mail: vkpbio21@mail.ru

Поступила в редакцию 23 января 2013 г.

В статье рассматривается 60-летняя история развития молекулярной биологии, центральной дисциплины современной биологии: её достижения и проблемы

Key words: molecular biology, achievements and problems, DNA, RNA, protein

Как родилась и развивалась королева биологии.

В апреле 1953 года произошло событие, непосредственно положившее начало молекулярной биологии. В журнале «Nature» вышла статья американца Джеймса Уотсона (1928 г.р.) и англичанина Френсиса Крика (1916-2004), работавших в Кембридже (Великобритания), о расшифровке структуры ДНК (натриевой соли дезоксирибонуклеиновой кислоты) - двойной спирали. Их работа базировалась на данных М. Уилкинса и Р. Франклин (Великобритания) по рентгеноструктурному анализу ДНК и на данных Э. Чаргаффа (США) о нуклеотидном составе ДНК. Поэтому 1953 год считают обычно годом рождения молекулярной биологии.

Это открытие сразу прояснило механизм удвоения, "репликации", генов через

образование комплементарных пар G-C и A-T (G - дезоксигуаниловая, C - дезоксицитидиловая, A - дезоксиадениловая, T - тимидиловая кислоты). Стал ясен молекулярный механизм наследования.

С тех пор исследованию нуклеиновых кислот, как ДНК, так и РНК придаётся особое значение. Положение "самой главной молекулы" от ДНК в настоящее время переходит к РНК как центральному звену живой материи, обладающему и свойствами матрицы, подобно ДНК, и ферментативными свойствами, подобно белкам.

Существует мнение, что сама идея репликации, т.е. синтеза молекулы на молекуле была позаимствована у нашего соотечественника Н.К. Кольцова, ученик которого Н.В.Тимофеев-Ресовский долгое время работал в Германии совместно с физиком М.

Дельбрюком, который в свою очередь был учителем Дж. Уотсона. Однако сам Дж. Уотсон этой догадки никогда не подтверждал.

Кольцов предполагал, что веществом наследственности является белок, так как о биологической роли ДНК в 30-е годы XX века ещё ничего не было известно. Кольцов продолжил цепь рассуждений биологов предыдущих веков. Если Франческо Реди (первый учёный –экспериментатор: до него наука была умозрительной и описательной) в XVII веке сформулировал принцип «*Omne vivum ex vivo*» («всё живое из живого»), опровергающий возможность самозарождения жизни, то XIX век добавил принципы «*Omnis cellula ex cellula*» («каждая клетка из клетки») и «*Omnis nucleus ex nucleus*» («каждое ядро из ядра»). И Кольцов завершает: «*Omnis molecula ex molecula*» - «каждая молекула из молекулы», имея в виду «наследственные молекулы».

В 1954 году, через год после открытия двуспиральной структуры молекулы ДНК, в США Георгий Гамов (самый молодой член-корреспондент АН СССР, советский учёный-физик, покинувший СССР в 1933 году) неожиданно внёс существенный вклад в становление молекулярной биологии, впервые поставив задачу генетического кода. Он понял, что структура белков, состоящих из 20 основных (природных) аминокислот – должна быть зашифрована в последовательности из четырёх возможных нуклеотидов, входящих в состав молекулы ДНК.

Исходя из простых арифметических соображений, Гамов показал, что при сочетании 4-ёх нуклеотидов тройками получается 64 различные комбинации, чего вполне достаточно для записи наследственной информации. Таким

образом, он был первым, кто предложил кодирование аминокислотных остатков триплетами нуклеотидов.

Предположение Гамова было подтверждено в 1961 году экспериментами Ф. Крика с сотрудниками, а к 1967 году генетический код был окончательно расшифрован.

В 1957 году Ф. Криком и Г. Гамовым была сформулирована «центральная догма» молекулярной биологии, согласно которой поток информации от ДНК к белку необратим. Эти представления были подкреплены выделением ферментов синтеза ДНК на матрице ДНК и синтеза РНК на матрице ДНК, т.е. ДНК-зависимых ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы.

В начале 50-ых годов XX века было твёрдо установлено, что синтез белка происходит в рибосомных частицах, содержащих РНК и белок. Предполагали, что рибосомная РНК участвует в передаче информации от ДНК к белку. Однако, в конце 50-ых годов А.Н. Белозёрский и А.С. Спиринов (Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР) показали, что в то время как нуклеотидный состав ДНК у разных бактерий варьирует в широких пределах, нуклеотидный состав РНК является весьма монотонным. Наблюдалась лишь небольшая корреляция между нуклеотидным составом ДНК и РНК. Стало очевидным, что рибосомная РНК не может считываться с разных участков ДНК, т.е. она, вероятно, не несёт информационной нагрузки. Возникло представление, что такую роль может выполнять особая фракция РНК, составляющая малую долю от всей РНК клетки.

Тогда же было обнаружено, что РНК, синтезирующаяся в клетках при заражении их бактериофагом, по своему нуклеотидному

составу резко отличается от общей, т.е. рибосомной РНК бактерии, и соответствует ДНК бактериофага. Эта РНК была названа ДНК-подобной. Предполагалось, что она участвует в переносе генетической информации от ДНК к РНК.

В 1960-1961 годах Ф. Жакоб и Ж. Моно (Франция) на основании генетического изучения индуцированного синтеза ферментов у микроорганизмов сделали ряд важных выводов. Они доказали, что передача генетической информации от ДНК к белку осуществляется короткоживущим соединением, очевидно, особой РНК, которую они назвали мРНК (messenger RNA). В 1961 году две группы исследователей подтвердили предсказание о существовании мРНК и изолировали её из бактериальных клеток. Оказалось, что мРНК составляет лишь несколько процентов от всей РНК и что она в основной своей массе весьма нестабильна, распадаясь после того, как с её участием произойдёт несколько циклов белкового синтеза.

Эта способность целого ряда бактерий быстро синтезировать относительно нестабильную мРНК придаёт им особую подвижность, позволяющую приспособлять синтез определённых белков и ферментов к изменениям во внешней среде. Изменения в физиологии бактерий, происходящие в результате индукции ферментов, никогда бы не были столь эффективными, если бы мРНК не обновлялась так быстро. Клеткам животных и растений столь высокая гибкость не требуется, поэтому их мРНК присуща большая стабильность.

В дальнейшем было показано, что стабильность определяется, в частности,

относительно высокой степенью полиаденилирования 3'-конца мРНК эукариот (до 200 адениловых остатков), чего нет у прокариот. Первый важный результат в этом направлении был получен М. Эдмондс и Дж. Браверманом (США), которые обнаружили, что на 3'-конце почти всех мРНК находится отрезок поли-(А) длиной от 50 до 200 нуклеотидов.

Открытие мРНК совпало во времени с первыми работами по расшифровке генетического кода, которые проводилась с помощью системы бесклеточного синтеза белка, с использованием синтетических полинуклеотидов в качестве мРНК, и была завершена в начале 60-х годов. В 1972 году американские исследователи Х.Авив и П. Ледер предложили метод выделения поли-А-содержащей мРНК из клеток эукариот при помощи аффинной хроматографии на колонке с олиго-дТ-целлюлозой. Эта работа открыла новую главу в молекулярной биологии, однако, была не в полной мере оценена современниками на фоне сообщений Пола Берга (США, 1972 г) о создании первой рекомбинантной молекулы ДНК.

Молекулярная биология непрерывно заимствует методы физики и химии. Последние три десятилетия XX века ознаменовались новыми технологиями и методами, которые определили не только прогресс прошедших десятилетий, но и ближайших десятилетия. Наиболее поразительными методическими достижениями этих десятилетий было разработка методов геной инженерии в 70-е годы, достигших массового распространения в 80-е годы и виртуозного совершенства и практически безграничного применения в 90-е годы XX века и переходом к реальному

управлению экспрессией генов в первые десятилетия XXI века.

Открытие мобильных генетических элементов дрософилы, прямое следствие методов геной инженерии, является самым значительным и выдающимся достижением советской молекулярной биологии 70-ых годов XX века. Именно в СССР впервые были получены прямые молекулярные доказательства перемещения генетического материала у эукариот. Первые наблюдения Евгения Витальевич Ананьева (1947-2008) в институте молекулярной генетики СССР «прыгающих» генов у плодовой мушки дрософилы были началом нового представления о структурной организации генетического материала высших организмов. Классическая хромосомная теория наследственности утверждала, что положение генов на хромосомах строго фиксировано, подобно бусинкам, нанизанным на нитку. Тот факт, что некоторые кусочки ДНК не имеют фиксированного положения на хромосомах, положило начало принципиально новому представлению о структурной организации генома. Мобильные элементы оказались обязательным компонентом геномов высших организмов. Они составляют основную массу хромосом. Так, до 60 % генома человека состоят из мобильных элементов, а на долю белок-кодирующих генов, которых у человека всего около 20 тыс., приходится только около 1,4 % генома.

1970-е годы стали эпохой ещё одной методической революции - были созданы два метода секвенирования ДНК (метод Максама-Гилберта и метод Сэнгера), что превратило ДНК и РНК из объекта биологического в объекты, имеющие точную химическую структуру -

нуклеотидную последовательность. В результате этих разработок были прочитаны (секвенированы) геномы ряда животных и растительных организмов. Здесь тоже можно поговорить об упущенных возможностях нашей отечественной науки. В основе метода Максама-Гилберта лежит идея простого школьного учителя из СССР.

В самом начале XXI в. было официально объявлено об окончании первого этапа проекта "Геном человека". Ученым удалось полностью расшифровать последовательность нуклеотидов, составляющих более чем 80 тысяч генов человеческого организма. Работа по картированию генома заняла долгих десять лет, но по оценкам специалистов, затраченное время того стоило. В ближайшие годы это достижение позволит справиться с десятками болезней, против которых современная медицина бессильна. Будет найдено средство от рака, заболеваний сердечнососудистой системы, многих наследственных нарушений и пороков развития, будет замедлено старение организма. По словам доктора Майкла Декстера, руководителя британской части проекта, важность полученных результатов можно сравнить лишь с важностью высадки человека на Луну.

Расшифровка генома - плод совместных усилий международного проекта "Геном человека", финансируемого как британским фондом Wellcome Trust, так и американскими Национальными институтами здравоохранения, и частной компании Celera Genomics. Следующим шагом станет интерпретация полученного материала. Посильный вклад в реализацию этого проекта внесла и наука России, переживающая свои очень трудные

времена. Перед учеными встанет задача обобщения данных, установление взаимосвязей между различными генами, изучение механизмов развития болезней на генном уровне (Тарантул, 2003).

Принципиально новые перспективы в исследовании ДНК и РНК и в их практическом использовании появляются в последние 20 лет в связи с развитием методов нанобиотехнологий, позволяющих использовать уникальные свойства материи на уровне 10^{-9} для развития интегральной молекулярной биологии (Плотников, 2009).

Молекулярная биология и селекция

В книге 1970-го года «Хозяин моря пшеничного», посвящённой академику АН СССР и ВАСХНИЛ П.П. Лукьяненко, Филарет Плосков пишет в связи с одним из учеников великого селекционера, будущем академике РАСХН Ю.М. Пучкове: «... многие учёные считают, что наступает эпоха биологии и в первую очередь генетики.

Юра думает об этом. Успехи молекулярной биологии всё сильнее «подталкивают» другие её разделы. В частности, произошло вторжение методов и понятий молекулярной биологии в генетику, что привело к важнейшему открытию природы наследственного аппарата. Генетика начала движение к вершинам величайшей проблемы естествознания, к разработке методов направленных мутаций – прямому получению организмов с заранее заданными свойствами» (Плосков, 1970).

Верные были ощущения будущего у людей в 60-е годы XX века! Уже через 25 лет после этого на полях мира появились первые трансгенные растения (1994 год), которые несли заранее

заданные человеком свойства и совершенно не заданные проблемы экологии и этики.

Однако молекулярная биология успешно находит и выходы из тупиков, типичных для современного бурного прогресса науки

Интегрализм биологии XXI века означает, что ответ на нерешённые в прошлом проблемы будут искать не путём изолированного изучения отдельных генов или генных продуктов, а через анализ интегральных ответов клетки на то или иное воздействие или состояние. Ясно, что ответ клетки на сигнал (например, воздействие биорегулятора на рецептор, появление низкомолекулярного биорегулятора в окружающей клетку среде и т.д.) носит всегда многозвенный характер: отвечает не один ген, а множество, подчас самых неожиданных и внешне не связанных с исходным воздействием.

То обстоятельство, что успехи современной молекулярной биологии не столь решительно сказались в таких областях, как, например, биология развития, напрямую имеющую отношение к проблемам селекции, во многом связано именно с тем, что только интегральный подход - анализ тысяч генов, а не единиц действительно ведёт к пониманию закономерностей эмбриогенеза, дифференцировки и других составляющих биологии развития. В развитии интегрализма, идущему на смену редукционизму, огромную роль призвана играть новая технология - биологические микрочипы, позволяющая на ничтожном пространстве в несколько квадратных сантиметров анализировать тысячи молекул, например, функционирование тысяч генов.

Сложность биологии эукариот и их

продуктивности в первую очередь связана с тем, что многие признаки, такие как урожайность, стрессоустойчивость, время созревания, содержание белка и особенности морфологии, являются сложными количественными признаками, находящимися под контролем множества генов (полигенов). Конечный генотип отделён от основных биохимических стадий - элементарных единиц селекции - несколькими уровнями биологической организации и взаимодействием генотипа и среды. В настоящее время у селекционера нет другого выбора, кроме использования морфологического фенотипа в качестве основы селекции. Он имеет очень ограниченный выбор, как экспериментального материала, так и круга проблем, которые может решить. Не установлено никаких чётких корреляций между продуктивностью растений и какими-либо конкретными процессами, дающими вклад в окончательный результат.

Значительного прогресса в усовершенствовании методов селекции можно было бы достичь в том случае, если бы удалось установить надёжные способы выявления узловых моментов в ряду элементарных процессов, формирующих хозяйственно-ценные признаки. Молекулярная биология базируется на двух основных элементах: редуccionистском взгляде на мир, свойственном фундаментальным наукам, и мощном наборе аналитических экспериментальных методов. В селекции же растений целесообразен более холистский, целостный подход.

Ближайшая задача состоит не столько в том, чтобы найти новые способы создания генетического разнообразия, но, сколько в том, чтобы найти новые методы критического

анализа того разнообразия, которое уже обеспечено природой, и идентифицировать разные компоненты ценных признаков, в основе которых лежат молекулярно-биологические механизмы реализации генетической информации в особенности физиологии и развития растения.

Важнейшей вехой методической революции в молекулярной биологии 80-ых годов XX века было создание метода размножения ДНК в пробирке с помощью цепной полимеразной реакции (PCR). На основе этого метода развиваются новые методы диагностики и молекулярного маркирования в медицине и сельском хозяйстве.

Как только будут найдены отдельные компоненты и лимитирующие стадии важнейших признаков, можно будет создавать новые методы отбора изменённых признаков. Поэтому первоочередной задачей является распространение общих идей молекулярной биологии на изучение признаков растений и животных, имеющих важное хозяйственное значение и развитие молекулярно-генетических (Глазко, Глазко, 2006) и молекулярно-кинетических маркёров (Плотников, 2009), способствующих масштабному сканированию особенностей генетики и физиологии селекционного материала.

Вместе с тем необходимо отметить, что появление трансгенных организмов, усиливших горизонтальный перенос генов, открыло новый этап эволюции жизни на планете Земля.

Время простоты никогда не настанет?

"Простота и краткость
не просто свойства науки,
они составляют её сущность"
Ганс Селье

В 1985 году Дж. Уотсон с женой Элизабет

побывали в Москве. В весьма обширном интервью Уотсона представителю журнала «Химия и жизнь» на вопрос о возможности больших обобщений и упрощений в молекулярно-биологических знаниях, подобно тому, как это периодически происходит в физике, когда в процессе накопления фактов и деталей вдруг наступает момент, когда они все охватываются единым и очень экономичным объяснением, он ответил: «Нет, у нас, я думаю, время простоты никогда не настанет. Мы всегда, рассуждая о гене, будем вынуждены говорить о считывании с него информации и о регуляции этого считывания, о воплощении этой информации в белки и о регуляции этого воплощения, и о многом-многом другом. Ведь даже простейшая форма жизни нуждается примерно в тысяче разных белков». Но в дальнейшем течении интервью Дж. Уотсон озадаченно отмечает: «Я думаю, что самым важным из неожиданных событий последних лет было открытие «сплайсинга» РНК (сшивания РНК) без всяких ферментов. Это очень важно для проблемы происхождения жизни» (Уотсон, 1988).

Это было в самом начале экспериментального процесса в науке, который привёл к созданию концепции «мир РНК». Дж. Уотсон ещё не мог в полной мере представить те изменения, которые стремительно последуют в ближайшие годы в мировоззрении учёных.

После открытия Т. Чеком (США) с соавторами в 1981–1982 гг. аутосплайсинга рибосомной РНК у *Tetrahymena thermophila* стало ясно, что сами молекулы РНК могут обладать каталитическими свойствами, вполне сопоставимыми со свойствами ферментов-протеинов. Именно открытие рибозимов (РНК-ферментов) привело к

созданию концепции «мира РНК» - мира, который, вероятно, возник и существовал задолго до оформления ныне существующего «ДНК-белкового мира». Вскоре после открытия рибозимов в одной из работ родоначальник и классик молекулярной биологии Ф. Крик писал: «Эти эксперименты (по каталитической РНК) поддерживают гипотезу, что биохимия РНК предшествовала традиционной биохимии, основанной на нуклеиновых кислотах и белках».

Около двадцати лет назад в Институте белка РАН А.Б. Четверным с сотрудниками экспериментально была показана способность молекул РНК формировать *молекулярные колонии* на гелях или других твёрдых средах, если на этих средах им были предоставлены условия для репликации (все четыре рибонуклеотидтрифосфата, катионы магния (Mg^{+}) и фермент РНК-зависимая РНК-полимераза). Дальнейшие исследования этой же группы исследователей показали, что молекулы РНК при столкновении в водной среде могут спонтанно обмениваться частями, то есть, обладают способностью к неэнзиматической рекомбинации. Возможность легкого распространения молекул РНК через среду, в том числе атмосферную, также было продемонстрировано в прямых экспериментах.

В теоретическом отношении это открытие в контексте мировой научной концепции о рибозимах ("РНК-мир") способствует возможности в корне пересмотреть теорию происхождения жизни на Земле. Смешанные колонии РНК на твёрдых или полутвёрдых носителях могли быть первыми эволюционирующими бесклеточными ансамблями, где одни молекулы выполняли генетические функции (репликацию молекул

РНК всего ансамбля), а другие формировали необходимые для успешного существования структуры (например, такие, которые адсорбировали нужные вещества из окружающей среды) или были рибозимами, ответственными за синтез и подготовку субстратов для синтеза РНК. Эта коммунальная форма существования мира РНК - своего рода "Солярис" С. Лема - должна была очень быстро эволюционировать. В ходе этой молекулярной эволюции первую функцию РНК передала ДНК, а вторую - белкам. Что же стало с РНК после распада коммуны?

Хотя коммуна распалась, мир РНК сохранился в каждой клетке каждого живого организма. Основой современной жизни является наследуемый биосинтез белков, который определяет все признаки ныне существующих организмов. В качестве центрального звена этого процесса биосинтеза белков выступает совокупность взаимодействующих друг с другом молекул РНК различных типов, прежде всего рибосомной РНК, формирующей аппарат белкового синтеза, тРНК, доставляющей в рибосому активированные аминокислоты для построения полипептидных цепей белков, и мРНК, несущей в своей нуклеотидной последовательности программу для синтеза белка. Кроме этих трёх основных представителей внутриклеточного мира РНК, обнаружен целый ряд некодирующих РНК (нкРНК).

С практической стороны нанокolonии РНК в настоящее время составляют один из классов РНК-маркёров. Так как практически каждая нанокolonия происходит из одной матричной молекулы, с помощью нанокolonий можно обнаружить и идентифицировать одиночные

молекулы ДНК и РНК, в том числе - с диагностическими целями. В настоящее время нанокolonии применяются в нашей стране и за рубежом для различных научных и прикладных задач. Важнейшим направлением исследований является разработка ранней диагностики онкологических заболеваний.

Сейчас очевидно, что перестало быть проблемой установление первичной структуры гена, но всё ещё остаётся проблема, как узнать его функцию и как ею управлять. Первое десятилетие XXI века ознаменовано стремительным прорывом в важнейшую биологическую проблему - регуляцию экспрессии генов с помощью явления *РНК-интерференции* и основанных на этом явлении методов "нокаутов" - техники, позволяющей выводить из строя экспрессию заранее выбранного гена, а затем смотреть, как это скажется на организме. Суть явления, механизм которого пока изучен очень слабо, состоит в том, что двуспиральные РНК определённой структуры вызывают распад мРНК мишени - гена, экспрессию которого необходимо подавить. Это широко распространённое в природе явление (по-видимому, от бактерий до млекопитающих) может эффективно использоваться для идентификации новых генов, выяснения их функциональной роли и управления их экспрессией *in vitro* и *in vivo*. Исследования этого явления позволяют в настоящее время решать проблемы медицины (новый класс лекарств) и сельского хозяйства (новые пути создания зерна злаков с высокими питательными свойствами).

Оказалось, что нкРНК выполняют множество функций с использованием не известных ранее механизмов: нкРНК участвуют в регуляции транскрипции генов, сплайсинге и регуляции

деградации РНК. Они вовлечены в трансляцию и её регуляцию, в процессинг и модификацию рибосомной РНК, в защиту от вирусных инфекций и мутагенной активности мобильных генетических элементов, а также в ряд других процессов. РНК явно потеснили белки на пьедестале главных молекул, обеспечивающих жизнедеятельность клеток.

Можно сказать, что совокупность молекул РНК - мир РНК - по-прежнему составляет ядро жизни. Современная жизнь - это РНК, передавшая часть своих генетических функций рождённому ей же полимеру - ДНК и синтезирующая белки для всеобъемлющего эффективного функционирования содержащих её компонентов - клеток и многоклеточных организмов. Так что большие обобщения и упрощения знаний в молекулярной биологии вполне вероятны на основе исследования центрального звена живой материи – молекул РНК (Плотников, 2009).

Многие достижения и направления

исследований молекулярной биологии звучат почти как философский камень алхимиков. Но очень солидные мужчины и женщины не покладая рук трудятся, чтобы претворить эту «алхимию» в жизнь. Безусловно, трудностей на этом пути много. Но, ни одна не выглядит непреодолимой. Затаив дыхание мир следит за событиями в молекулярной биологии на 7-м её десятке...

ЛИТЕРАТУРА

- Глазко В.И., Глазко Т.Т. (2006) ДНК-технологии в генетике и селекции, Краснодар, 400 с.
- Плосков Ф.П. (1970) Хозяин моря пшеничного, Краснодарское книжное издательство, 232 с.
- Плотников В.К. (2009) Биология РНК зерновых культур, Краснодар, 375 с.
- Тарантул В.З. (2003) Геном человека, Москва, 390 с.
- Уотсон Дж. (1988) «Время простоты никогда не настанет» *Химия и жизнь*, №1, 22-27.