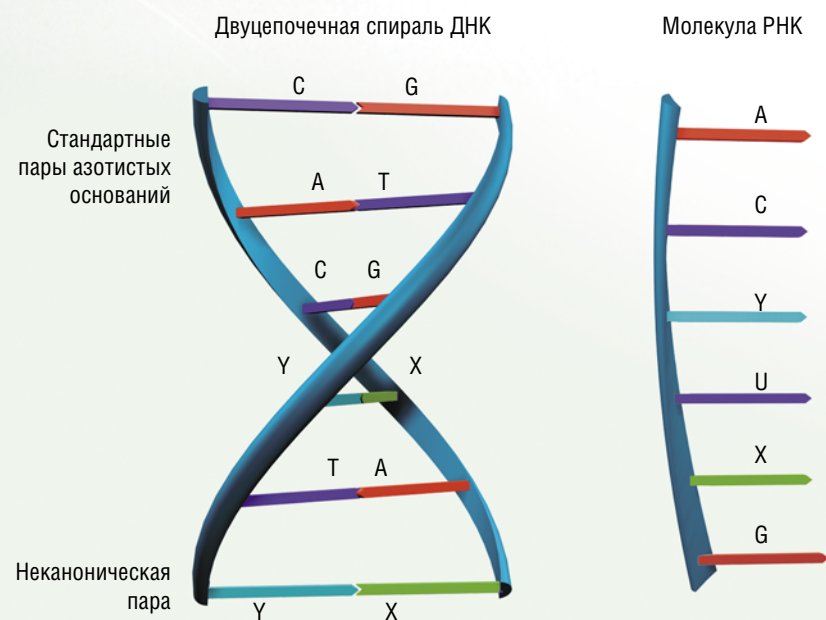
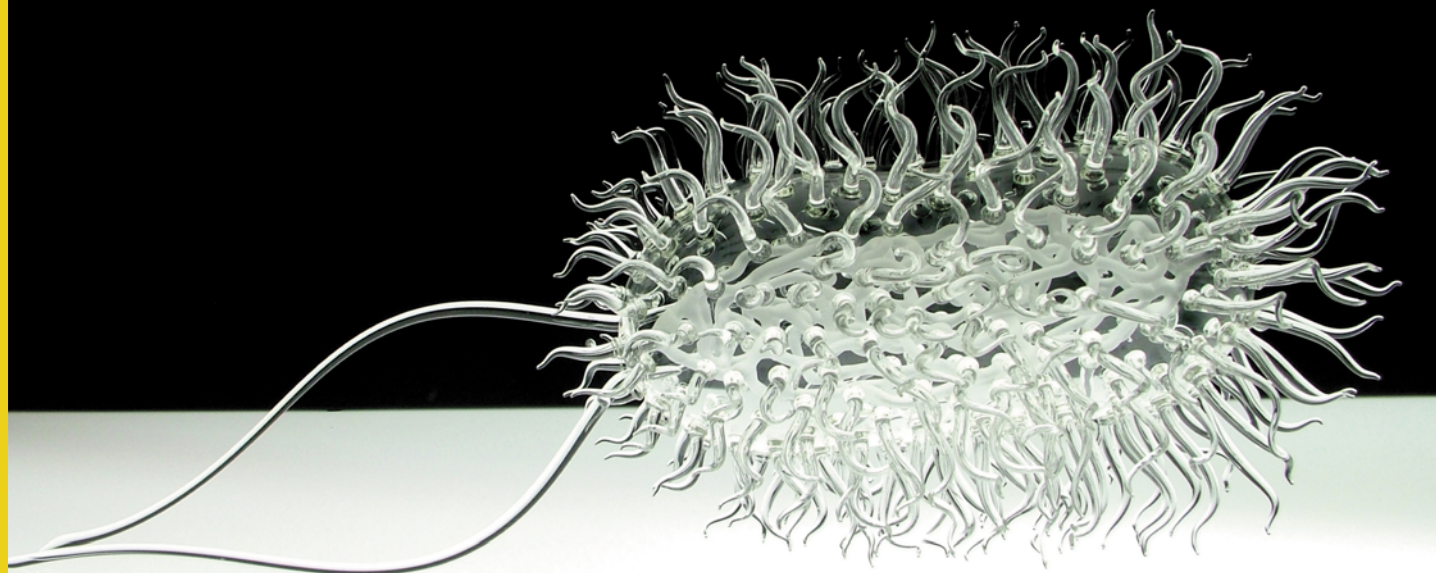


ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АЛФАВИТ



Американским исследователям впервые удалось заставить воспроизводиться в бактериальной клетке фрагменты «химерной» ДНК, в которую были введены неканонические «буквы» – основания, названные X и Y. В качестве модели использовалась кишечная палочка *E. coli*.
На фото вверху – скульптурное изображение кишечной палочки. Стекло. Худ. Л. Джеррам

РАСШИРЕН. ИЛИ НЕТ?

В десятку наиболее выдающихся результатов 2014 г. вошли работы исследователей из Скриппсовского института (Ла-Холья, США), которые не только создали ДНК с двумя новыми «буквами» генетического кода, но и заставили ее воспроизводиться внутри кишечной палочки – традиционного экспериментального объекта молекулярных биологов

Как всем известно со школьной скамьи, «текст» молекулы ДНК – хранилища наследственной информации – написан всего четырьмя «буквами»: А, Т, G и С. Буквы эти обозначают четыре азотистых основания – аденин, тимин, гуанин и цитозин, которые крепятся к сахарофосфатному остову. Две такие конструкции и составляют знаменитую двойную спираль ДНК, которая в итоге содержит все инструкции по постройке и работе нашего организма.

Две цепи ДНК связаны друг с другом по принципу комплементарности: напротив А в одной цепи всегда стоит Т в другой, а напротив G – всегда С. Между «противоположными» основаниями в этих парах образуются так называемые водородные связи, что и определяет соответствие оснований друг другу. Например, между А и С такие связи образоваться не могут, поэтому и говорят, что основания подходят друг к другу как ключ к замку.

Структура ДНК стала известна еще в середине прошлого века, и уже тогда ученые стали задаваться вопросами: почему живая природа использует именно эти две пары оснований, а не какие-нибудь другие, и нельзя ли как-нибудь «подкрутить винтики» в клетке, чтобы заставить ее использовать другие основания? Ответ на первый вопрос не получен до сих пор. Многие специалисты в области предбиологической эволюции предполагают, что такой выбор был случайностью, которая закрепилась в дальнейшем, когда был пройден самый трудный этап возникновения жизни на нашей планете – когда молекулы стали «репликаторами», т.е. научились воспроизводить сами себя.

Вероятность такого события очень мала, поэтому неудивительно, что если даже некогда и существовали комплементарные пары с другими основаниями, они просто не прошли через это «бутылочное горлышко» эволюции. Впрочем, первой молекулой-репликатором, скорее всего, была не ДНК, а РНК, которая, кстати сказать, вместо тимина использует еще одно азотистое основание – урацил, также образующий пары с аденином. При переходе к «миру ДНК» урацил заменился на тимин по причинам, связанным с надежностью хранения информации.

Самое интересное, что и сейчас известны организмы, у которых «великолепная четверка» отличается от описанной в школьном учебнике. Например, у многих бактериофагов – вирусов, поражающих бактерии, место тимина в ДНК занимает урацил либо гидроксиметилурацил или другие про-



ЖАРКОВ Дмитрий Олегович – доктор биологических наук, заведующий группой взаимодействия биополимеров Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). В течение восьми лет работал в лаборатории А. Гроллмана (США). Автор и соавтор 80 научных работ

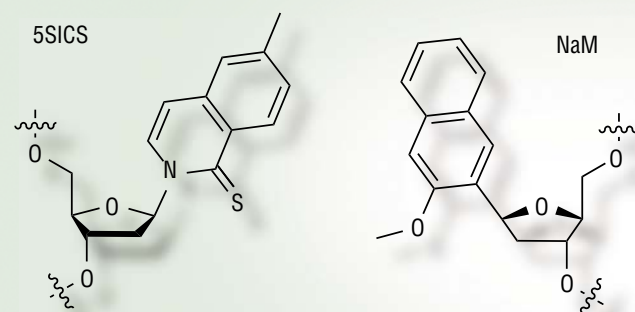
Ключевые слова: расширенный генетический код, синтетическая биология, репликация ДНК, неканонические основания ДНК, кишечная палочка.

Key words: expanded genetic code, synthetic biology, DNA replication, unnatural DNA bases, *Escherichia coli*

© Д. О. Жарков, 2015



а – классическая пара оснований C-G



б – неклассическая пара «безводородных» оснований X-Y

изводные урацила с дополнительно присоединенным углеводным остатком. Такая «подмена» помогает вирусу защищаться от охранных систем бактерий, расщепляющих проникающую внутрь чужеродную ДНК. А в 1970-х гг. в обыкновенной луже ленинградские микробиологи обнаружили бактериофаг, у которого аденин полностью заменен другим основанием, 2,6-диаминопурином.

Что касается второго вопроса, то он лег в основу нового направления молекулярной биологии – создания искусственного генетического кода. Специалисты в этой области занимаются не только поиском возможностей создания альтернативных пар оснований, но и способов введения в структуру белков неканонических аминокислот (как известно, генетические системы всех известных на сегодня живых организмов кодируют ровно 20 «стандартных» аминокислот). Понятно, что если научиться собирать ДНК из расширенного репертуара пар оснований и заложить в код возможность включения в белки нестандартных аминокислот, то это откроет невиданные перспективы перед синтетической биологией – областью науки, занимающейся созданием несуществующих в природе живых систем и процессов.

На фоне такой глобальной проблемы достижение, отмеченное

журналом *Science*, не выглядит чем-то сногшибательным. Скорее это – очередная ступенька лестницы, строительство которой началось два десятилетия назад, причем ступенька не очень высокая. Главный концептуальный прорыв на этом пути был совершен еще в конце 1990-х гг. группой под руководством Э. Кула (Рочестерский университет, США), которая показала, что для создания стабильной пары оснований, хорошо укладывающейся в двойную спираль ДНК, вовсе не нужны водородные связи. Можно сделать искусственные основания, вообще не содержащие ни одного атома, способного образовывать такие связи, и они смогут не только стабильно существовать в ДНК, но и без проблем включаться в нее обычными ферментами ДНК-полимеразами, по крайней мере, некоторыми из них.

В лаборатории Ф. Роумсберга, удостоенной внимания редакторов *Science*, неклассическими основаниями занимаются уже не первый год. Но до недавних пор все исследования в этом направлении выполнялись *in vitro*, т. е. «в пробирке», а не в живой клетке. В этот раз исследователи взяли одну из таких «безводородных» пар оснований и попытались заставить ее воспроизводиться внутри бактерии кишечной палочки, традиционно используемой для экспериментов молекулярными биологами.

Однако в живом организме основания не возникают по желанию экспериментатора. За каждой из четырех букв в ДНК стоит многоходовая схема их синтеза в клетке и, разумеется, основания, придуманные химиками, клетка сама делать не может. Поэтому ученые схитрили: они ввели в бактерии белок из клеточной стенки диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricorutum*, который способен захватывать те самые отдельные «буквы» ДНК непосредственно из внешней среды. Соответственно, ненатуральные основания (точнее, не сами основания, а дезоксирибонуклеозидтрифосфаты – «кирпичики» с частью сахарофосфатного остова, из которых и строится ДНК) просто добавляли в культуральную среду, в которой росли такие бактерии.

Но существовала еще одна проблема, которую требовалось разрешить. Дело в том, что если заставить бактериальные клетки использовать ненатуральные основания в большом количестве, то бактерии просто не выживут, потому что существующий генетический аппарат не будет их «узнавать». Поэтому ученые ввели лишь одну-единственную ненатуральную пару, и то не напрямую в саму бактериальную ДНК, а в плазмиду – отдельную маленькую кольцевую молекулу ДНК, способную существовать и самовоспроизводиться внутри бактериальной клетки. А поскольку фермент ДНК-полимераза III, которая отвечает у бактерий за репликацию основной части генома, нестандартные

основания вообще не узнает, ненатуральную пару оснований пришлось ставить даже не просто в плазмиду, а в очень маленький участок плазмиды, который синтезируется другим ферментом – ДНК-полимеразой I.

После всех этих манипуляций бактерии растили на обогащенной нестандартными основаниями среде в течение 15 часов – за это время клетки успевали поделиться 24 раза. Затем определяли, что находится в том месте плазмиды, где стояла ненатуральная пара. Если бы клетка не была способна при репликации использовать соответствующие друг другу неканонические нуклеотиды, а встраивала напротив них нормальные, то ненатуральная пара после 24 делений сохранилась бы только в 1 случае из 17 млн! Однако на самом деле ничего подобного не произошло: ненатуральная пара сохранялась в 86% случаев, замена произошла только спустя нескольких суток дальнейшего роста.

Важность работы Роумсберга и его коллег неоспорима, ведь им действительно впервые удалось показать работоспособность ненатуральной пары оснований в живой клетке. Но говорить о том, что в ней удалось «расширить генетический алфавит», очень и очень преждевременно – эта фраза вынесена в заголовок статьи в *Nature* явно с рекламными целями. В конце концов, авторы статьи обошли самые главные неразрешенные проблемы искусственного генетического кода. Ведь для того, чтобы на деле расширить алфавит ДНК, нужно как минимум встроить в клетку пути синтеза неканонических нуклеотидов, сделать их совместимыми с основной системой репликации и, главное, придумать, как при помощи новых букв заставить клетку производить и новые белки.

Задача по-прежнему выглядит чрезвычайно сложной – примерно, как полет в космос в эпоху начала авиации. В этом смысле работу Роумсберга и его коллег можно сравнить с запуском шара братьев Монгольфье. Но в космос в конце концов полетели не воздушные шары, так что хотя отмеченное *Science* достижение – безусловно, шаг в нужном направлении, пока непонятно, приведет ли к цели именно эта дорога.

Литература

Власов В. В., Воробьев П. Е. Мир РНК: вчера и сегодня // НАУКА из первых рук. 2012. № 3(45). С. 40–49.

Malyshev D. A., Dhami K., Lavergne T., et al. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet // *Nature*. 2014. V. 509. N. 7500. P. 385–388.

Две цепи нашей ДНК, состоящие из сахарофосфатного остова с присоединенными к нему азотистыми основаниями, связаны друг с другом по принципу комплементарности: напротив аденина в одной цепи всегда стоит тимин в другой, а напротив гуанина – всегда цитозин (а). Пары оснований удерживаются вместе так называемыми водородными связями. Однако стабильные пары оснований в ДНК могут формироваться и без участия таких связей (б). По: (Malyshev et al., 2014)