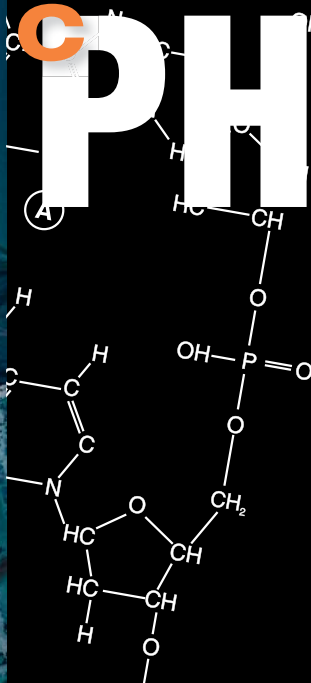


ПРОИСХОЖДЕНИЕ
и ЭВОЛЮЦИЯ
ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ

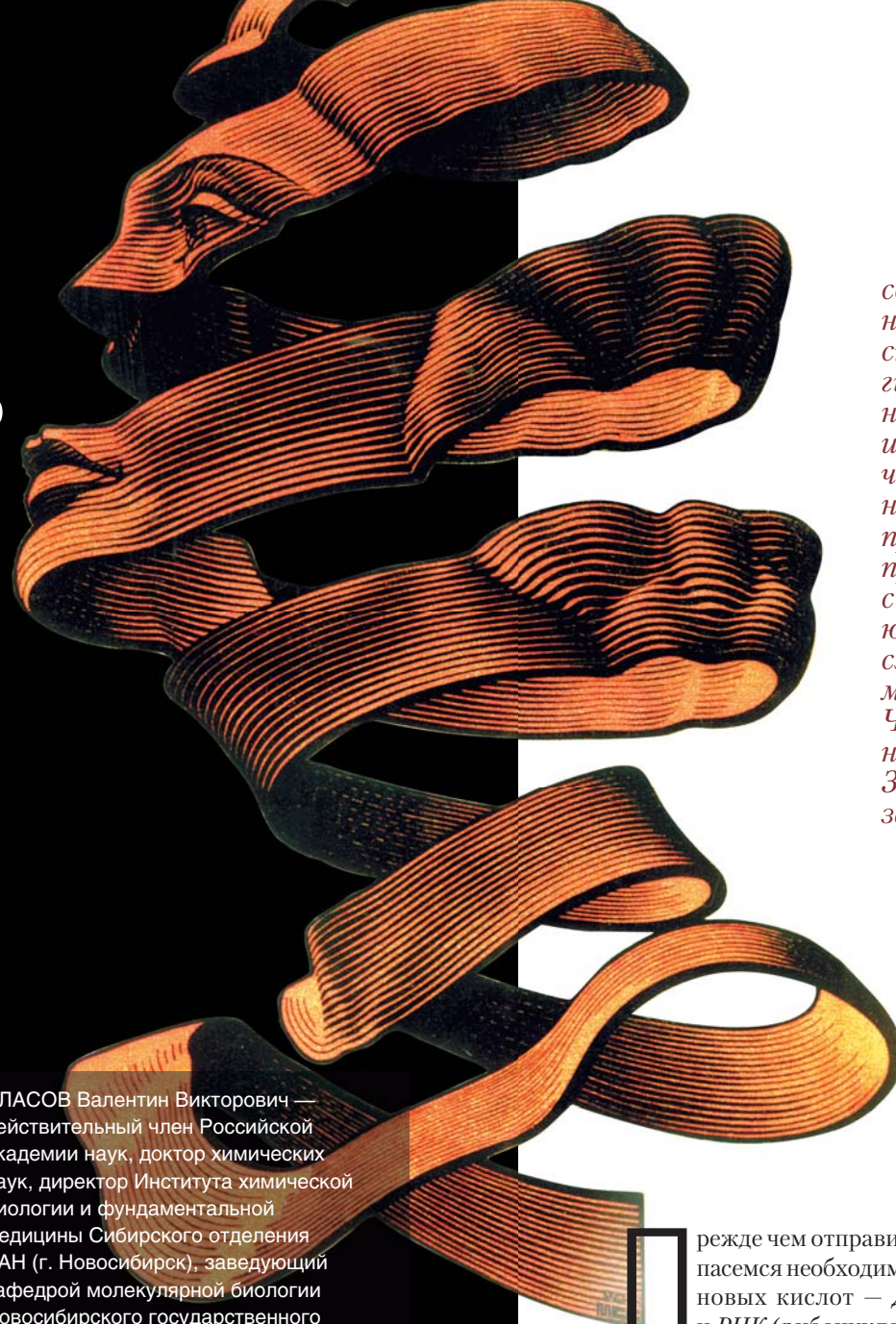
ЖИЗНЬ начиналась с РНК



ВЛАСОВ Валентин Викторович — действительный член Российской академии наук, доктор химических наук, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск), заведующий кафедрой молекулярной биологии Новосибирского государственного университета, лауреат Государственной премии РФ



ВЛАСОВ Александр Валентинович — кандидат химических наук, научный сотрудник Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск)

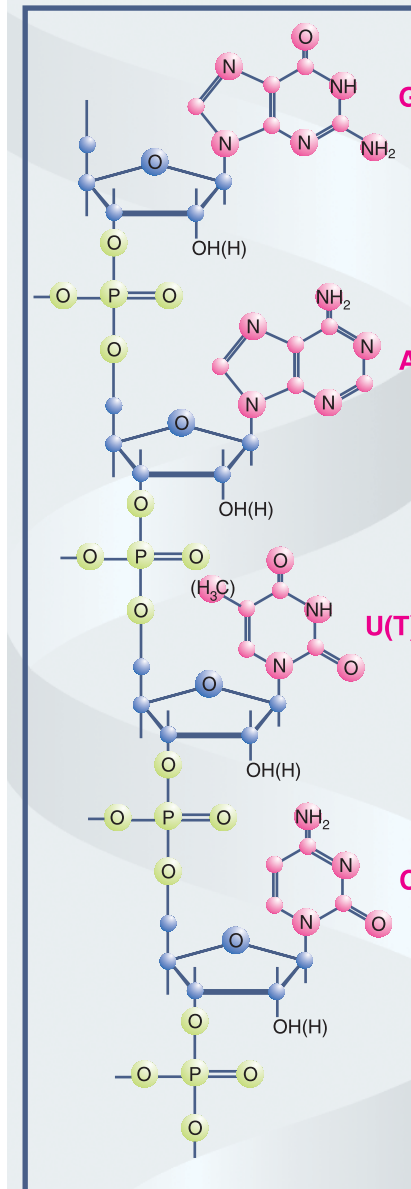


Валентин ВЛАСОВ, Александр ВЛАСОВ

Почему в цикле статей, посвященных проблеме возникновения жизни, появляется статья об РНК, а не о других, более известных органических молекулах — ДНК или белках? Возможно, наши читатели слышали и об РНК, но вот что? Уверены, ничего примечательного — по одной простой причине: пока лишь специалисты-биологи знают, что именно РНК являются «волшебными» молекулами, давшими начало жизни. Что когда-то в древности, на только что остывшей Земле, возник и существовал загадочный «мир РНК»...

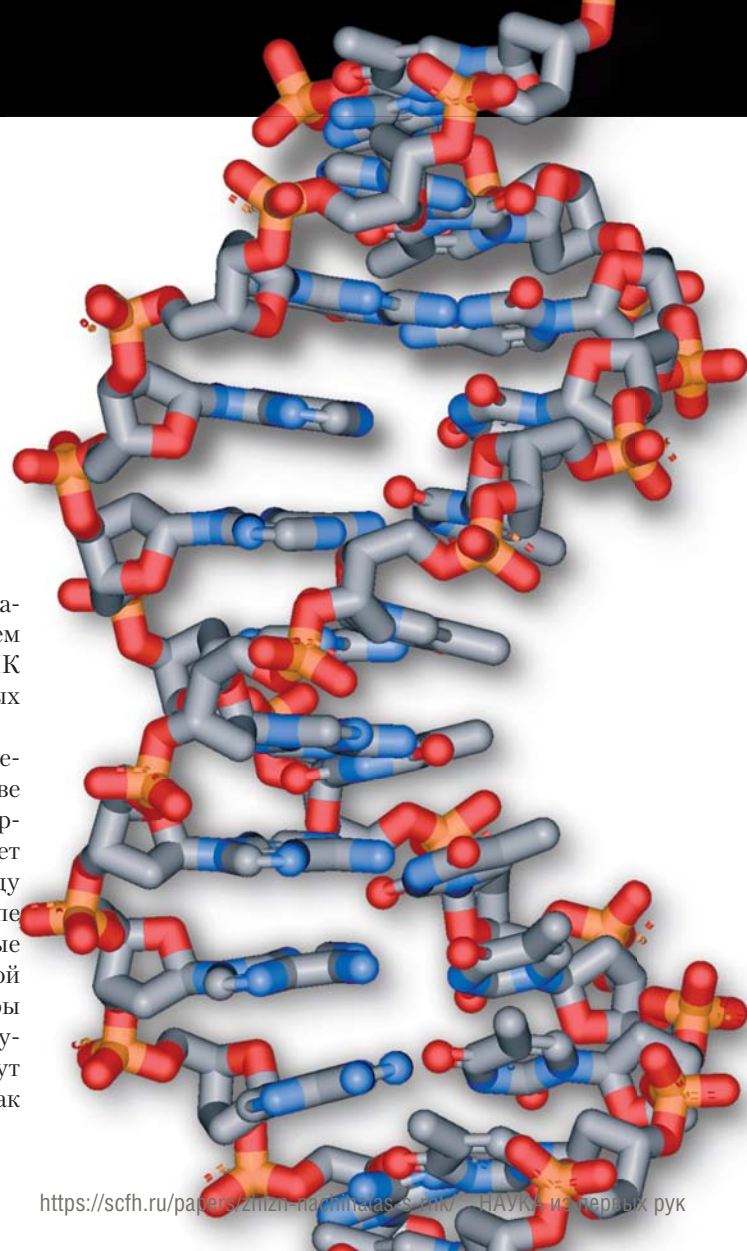
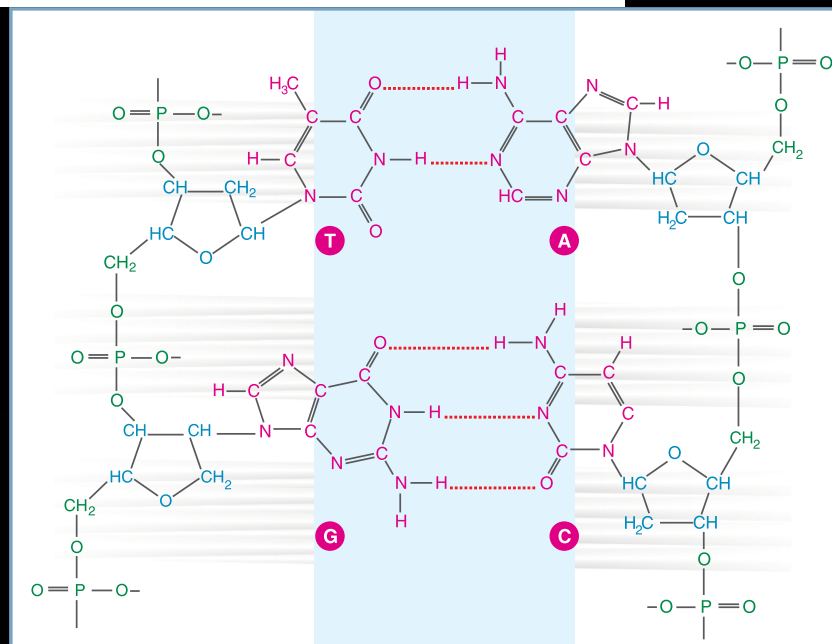
Прежде чем отправиться к «началу начал», давайте запасемся необходимыми знаниями о строении нуклеиновых кислот — ДНК (дезоксирибонуклеиновой) и РНК (рибонуклеиновой). По своему химическому составу РНК является двойняшкой, хотя и не полным близнецом, ДНК, основного хранителя генетической информации в живой клетке. Нуклеиновые кислоты представляют собой полимерные макромолекулы, состоящие из отдельных звеньев — нуклеотидов. Скелетом макромолекулы являются молекулы пятиуглеродного сахара, соединенные остатками фосфорной кислоты. К каждой молекуле сахара присоединяется одно азотистое основание. Нуклеотиды, которые различаются между собой только разными азотистыми основаниями, обозначаются буквами А, U, G, C (в РНК) и А, T, G, C (в ДНК).

Главное отличие нуклеиновых кислот заключается в их углеводной компоненте. В РНК сахар — рибоза, а в ДНК — дезоксирибоза: там, где у ДНК имеется атом водорода (H), у РНК стоит оксигруппа (OH). Результаты таких незна-



Нуклеиновые кислоты — ДНК и РНК — устроены по одному принципу. Это сложные полимерные молекулы, состоящие из множества звеньев, каждое из которых включает в себя сахар, фосфорную кислоту и азотистое основание.

Однако различия между ними существуют. В сахаре РНК (рибозе) присутствует OH-группа, в отличие от сахара ДНК (дезоксирибозы). Кроме того, ДНК и РНК отличаются по одному из четырех азотистых оснований: тимин (Т) в ДНК отличается от урацила (U) в РНК наличием метильной группы

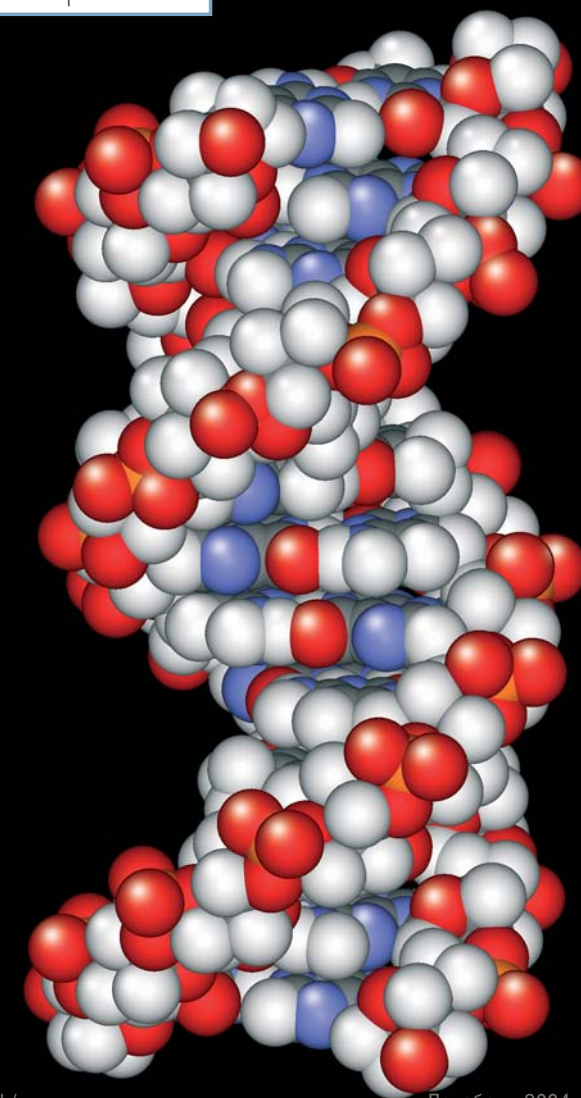


чительных, на неискушенный взгляд, различий поражают. Так, ДНК существуют в основном в форме всем известных жестких спиралей, в которых две цепи ДНК удерживаются вместе за счет образования водородных связей между комплементарными нуклеотидами.

РНК также могут формировать спирали из двух цепочек, похожие на спирали ДНК, однако в большинстве случаев РНК существуют в виде сложных структур-клубков. Структуры эти формируются не только за счет образования упомянутых водородных связей между разными участками РНК, но и благодаря оксигруппе рибозы, которая может образовывать дополнительные водородные связи и взаимодействовать с фосфорной кислотой и ионами металлов. Глобулярные структуры РНК не только внешне напоминают белковые структуры, но и приближаются к ним по свойствам: они могут взаимодействовать с самыми разными молекулами, как маленькими, так и полимерными.

Знаменитая двойная спираль ДНК представляет собой жесткую структуру. Две цепи ДНК удерживаются вместе за счет образования множества слабых водородных связей между парами нуклеотидов. Такие подходящие друг к другу молекулы, способные к взаимодействию, называют комплементарными

Честно говоря, насчет РНК никто не задумывался долгие годы. Существовала догма, что вот есть клетка, есть хромосомы, в которых есть ДНК — хранитель генетической информации. В конце концов, на рибосомах синтезируются белки. А РНК — она где-то в промежутке, переносчик информации от ДНК — и только. А потом посыпались открытия, которые заставили совершенно по-другому взглянуть на РНК





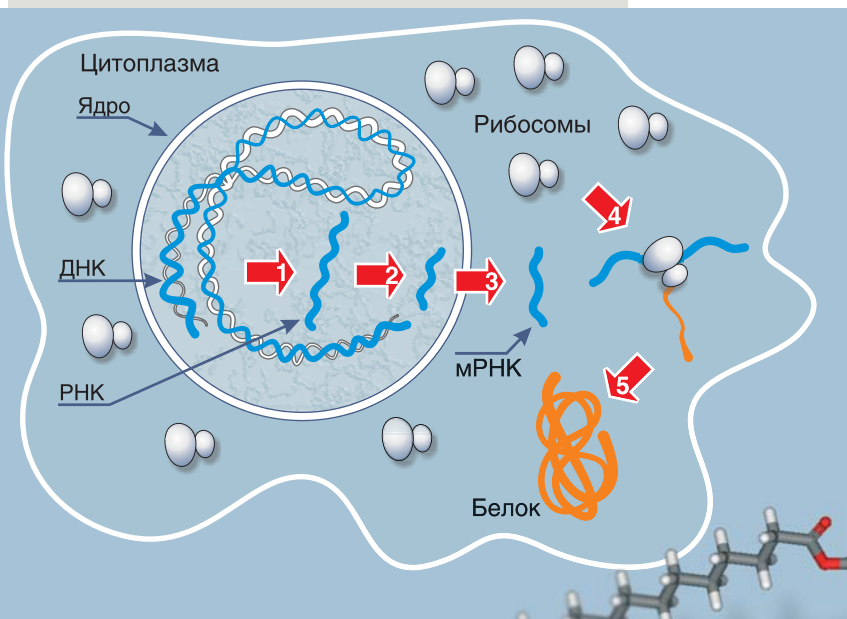
РНК УМЕЕТ ВСЕ?

Жизнь, без сомнения, должна была начаться с образования «умелых» молекул, которые могли бы сами себя размножать и выполнять все другие «хозяйственные работы», необходимые для существования клетки. Однако на роль таких умельцев не подходит ни ДНК, ни белок. ДНК — отличный хранитель генетической информации, но сама себя размножить не умеет.

Белки — непревзойденные катализаторы, но не могут работать в качестве «генетических программ». Возникает парадокс курицы и яйца: ДНК не может образоваться без белка, а белок — без ДНК. И только РНК, как выяснилось, может ВСЕ. Но не будем забегать вперед.

Рассмотрим давно известные функции РНК, связанные с работой (экспрессией) гена в клетке. При включении гена сначала происходит локальное расплетение ДНК и синтезируется РНК-копия генетической программы. В результате сложных обработок ее специальными белками получается

матричная РНК (мРНК), которая и является программой для синтеза белка. Эта РНК переносится из ядра в цитоплазму клетки, где она связывается со специальными клеточными структурами — рибосомами, настоящими молекулярными «машинами» для синтеза белка. Белок синтезируется из активированных аминокислот, присоединенных к особым транспортным РНК (тРНК), причем каждая из аминокислот присоединена к своей специфической тРНК. Благодаря тРНК аминокислота фиксируется в каталитическом центре рибосомы, где она «пришивается» к синтезируемой белковой цепи. Из рассмотренной последовательности событий видно,



Молекулы РНК выполняют ключевые функции в ходе биосинтеза белка.

При «включении» гена происходит локальное расплетение спирали ДНК. Затем с гена, кодирующего белковую молекулу, синтезируется его РНК-копия. После ряда «превращений» она становится матричной РНК, т. е. матрицей для синтеза белка. мРНК переносится из ядра клетки в цитоплазму, где связывается с рибосомами, на которых и «производится» белок. Он синтезируется из активированных аминокислот, присоединенных к специальным транспортным РНК

что молекулы РНК играют ключевую роль в декодировании генетической информации и биосинтезе белка.

Чем больше углублялись в изучение различных биосинтетических процессов, тем чаще обнаруживали ранее неизвестные функции РНК. Оказалось, что кроме процесса транскрипции (синтеза РНК путем копирования участка ДНК) в ряде случаев, наоборот, может происходить синтез ДНК на РНК-матрицах. Этот процесс, названный обратной транскрипцией, используют в ходе своего развития многие вирусы, в том числе печально известные онкогенные вирусы и ВИЧ-1, вызывающий СПИД.

Таким образом, выяснилось, что поток генетической информации не является, как первоначально считалось, односторонним — от ДНК к РНК. Роль ДНК как изначально главного носителя генетической информации стала подвергаться сомнению. Тем более что многие вирусы (гриппа, клещевого энцефалита и другие) вообще не используют ДНК в качестве генетического материала, их геном построен исключительно из РНК. А далее посыпались одно за другим открытия, которые заставили совершенно по-другому взглянуть на РНК.

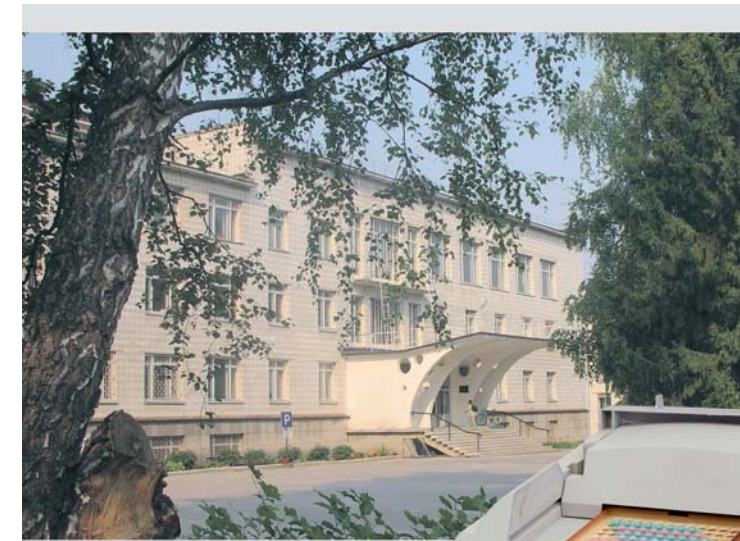
НА ВСЕ «МОЛЕКУЛЫ» МАСТЕР

Наиболее удивительным было открытие каталитической способности РНК. Прежде считалось, что катализировать реакции умеют только белки, ферменты. Ученые, например, никак не могли выделить ферменты, осуществляющие разрезание и сшивание некоторых РНК. После длительных исследований выяснилось, что РНК прекрасно справляется с этим сами. Структуры РНК, действующие подобно ферментам, назвали рибозимами (по аналогии с энзимами, белками-катализаторами). Вскоре было обнаружено множество разнообразных рибозимов. Особенно широко их используют для манипулирования своими РНК вирусы и другие простые инфекционные агенты. Таким образом, РНК оказались мастерами на все руки: они могут выступать в роли носителей наследственной информации, могут служить катализаторами, транспортными средствами для аминокислот, образовывать высокоспецифичные комплексы с белками.

Окончательная уверенность в том, что «мир РНК» действительно существовал, наступила после выявления деталей строения кристаллов рибосом методом рентгеноструктурного анализа. Ученые рассчитывали обнаружить там белок, катализирующий сшивание аминокислот в белковую последовательность. Каково же было их удивление, когда выяснилось, что в каталитическом центре рибосом белковых структур нет совсем, что он полностью построен из РНК! Оказалось, что все ключевые стадии биосинтеза белка осуществляются

молекулами РНК. Точка в дискуссии о возможности существования «мира РНК» как особой стадии биологической эволюции была поставлена.

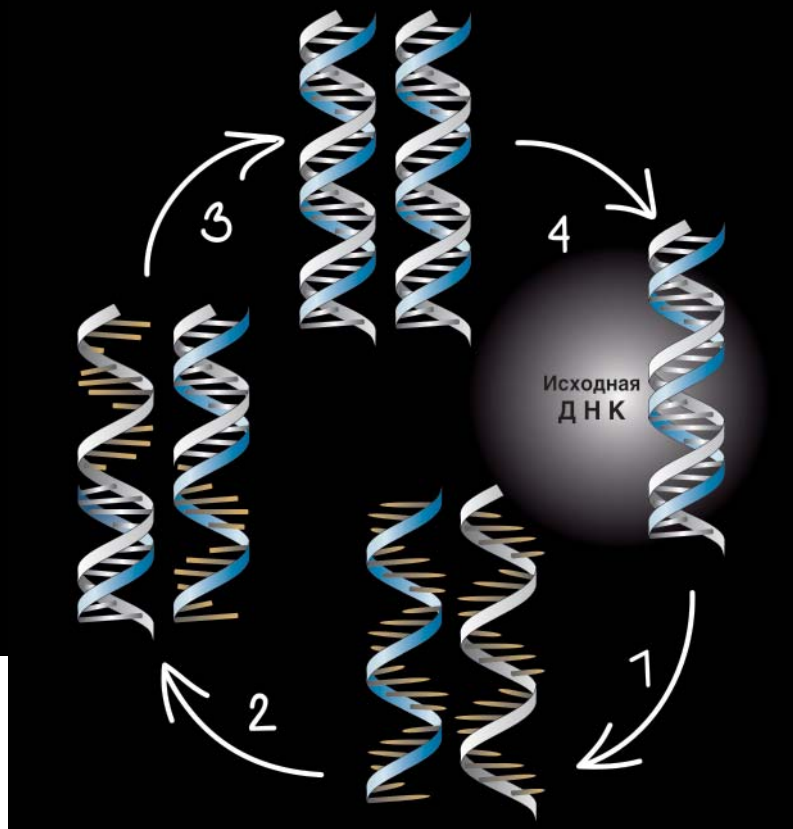
Конечно, полную картину еще предстоит реконструировать — осталось много нерешенных вопросов. Например, в современной клетке активацию аминокислот и их присоединение к соответствующим тРНК осуществляют специфичные белки-ферменты. Возникают вопросы: могла ли эта реакция осуществляться без участия белков, только с помощью РНК? Могли ли сами РНК катализировать синтез РНК из нуклеотидов или присоединение азотистых оснований к сахару? В общем-то, после открытия рибозимов такие потенциальные способности РНК уже не вызвали особых сомнений. Но наука требует, чтобы гипотезы экспериментально подтверждались.



ЦКП «Секвенирование ДНК» СО РАН.

Центр коллективного пользования дорогостоящим оборудованием для секвенирования ДНК был создан в 2000 году на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) и Института цитологии и генетики (ИЦиГ). ЦКП располагает полным комплексом современных автоматических приборов для анализа и расшифровки структуры генов и других участков ДНК





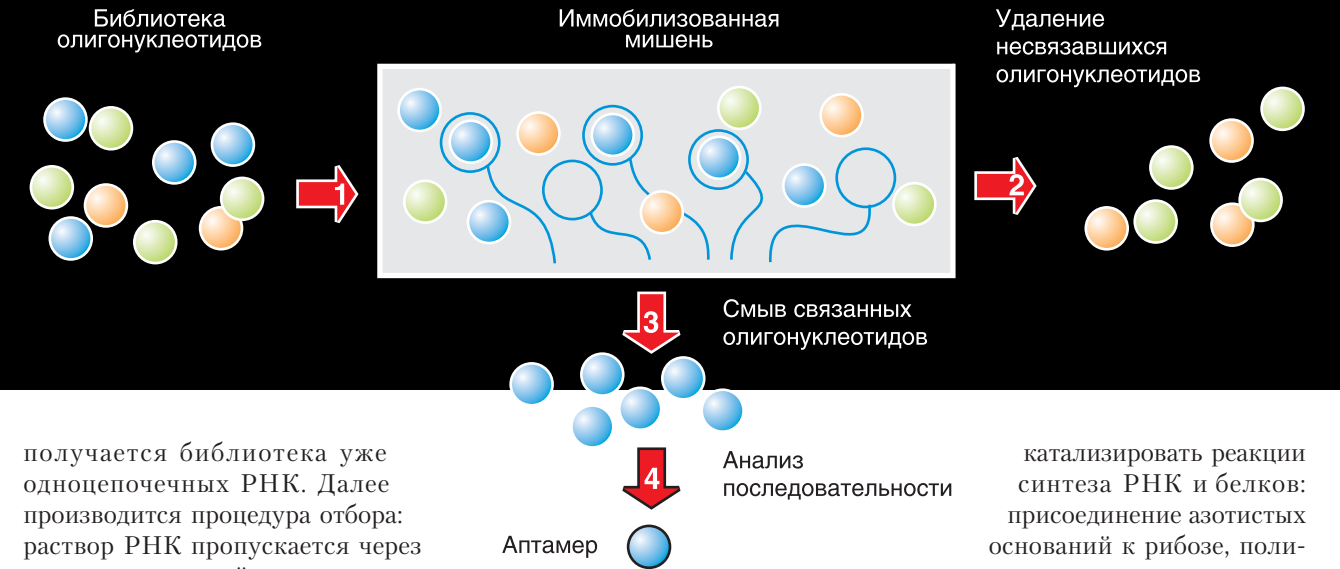
Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который позволяет в неограниченном количестве «размножать» нуклеиновые кислоты, произвел настоящую революцию в биологии.
Суть метода проста: спираль ДНК разделяют нагреванием, а затем на каждой цепи с помощью специального фермента собирают цепочку, комплементарную исходной. В результате из одной двуцепочечной ДНК получается две. Из двух — четыре и т. д. Процесс можно повторять до бесконечности!

Изобретение ПЦР и разработка методов химического синтеза ДНК позволили создать потрясающую технологию *молекулярной селекции*. Принцип молекулярной селекции тоже прост: сначала синтезируется множество молекул, обладающих разными свойствами (так называемая *молекулярная библиотека*), а затем из этой смеси отбираются молекулы с желаемым свойством.

Библиотеки нуклеиновых кислот — это смеси молекул, имеющих одинаковую длину, но отличающихся последовательностью нуклеотидов. Получить их можно в том случае, если при химическом синтезе на автоматическом синтезаторе добавлять на каждой стадии удлинения нуклеотидной последовательности одновременно все четыре нуклеотида. Каждый из них будет включаться в растущую нуклеиновую кислоту с равной вероятностью, в результате чего на каждом этапе присоединения будет получаться 4 варианта последовательностей. Если таким образом синтезировать нуклеиновую кислоту длиной в n звеньев, то разнообразие полученных молекул составит 4^n в степени n . Поскольку обычно используются участки длиной 30–60 мономеров, то в результате синтеза получается от 4^{30} до 4^{60} разных молекул! Цифры, привычные разве что для астрономов.

Так как в зависимости от состава нуклеиновые кислоты сворачиваются в разные пространственные структуры, синтез статистических последовательностей дает огромное множество молекул, различающихся по свойствам. С образовавшихся ДНК — с помощью фермента РНК-полимеразы — считывается РНК. В результате

Принцип молекулярной селекции очень прост: сначала синтезируют несколько миллиардов (!) молекул нуклеиновых кислот одной длины, но разного состава, а потом из смеси отбирают молекулы с нужными свойствами.
Чтобы получить РНК, способные связываться с определенным веществом, его молекулы прикрепляют к специальным колонкам. Раствор с РНК пропускают через колонку, и несколько молекул из множества непременно свяжутся с молекулами-«мишенями». «Пойманные» РНК — *аптамеры* можно выделить и затем размножить с помощью ПЦР



получается библиотека уже одноцепочечных РНК. Далее производится процедура отбора: раствор РНК пропускается через колонку, в которой находится неразрывимый носитель с химически присоединенными молекулами-мишенями, чтобы «выловить» так называемый будущий *аптамер*, т. е. РНК, способную связывать определенные молекулы. Затем колонку промывают для удаления несвязавшихся РНК, а затем смывают РНК, задержавшиеся на колонке за счет связывания с целевыми молекулами (это можно сделать, например, нагревая колонку).

С выделенных РНК с помощью обратной транскрипции делают ДНК-копии и получают из них обычные двуцепочечные молекулы ДНК. С последних же можно считывать искомые РНК-аптамеры, а затем — размножать их методом ПЦР в неограниченных количествах. Конечно, так происходит в идеальном случае, на практике все получается сложнее. Обычно исходный препарат РНК содержит огромный избыток «посторонних» молекул, избавиться от которого трудно. Поэтому полученную РНК вновь и вновь пропускают через колонку, чтобы выделить РНК, образующие самые прочные комплексы с целевыми молекулами. С помощью такого метода были получены тысячи разных РНК-аптамеров, которые образуют специфические комплексы с различными органическими соединениями и молекулами.

Рассмотренная схема молекулярной селекции может быть применена для получения молекул с любыми свойствами. Например, были получены РНК, способные

катализировать реакции синтеза РНК и белков: присоединение азотистых оснований к рибозе, полимеризацию активированных нуклеотидов на цепочках РНК, присоединение аминокислот к РНК.

Эти исследования еще раз подтвердили, что в условиях предбиологической эволюции из случайных полимеров могли возникать молекулы РНК со специфическими структурами и функциями.

ДЕЛАЙТЕ ВАШ ЗАКАЗ!

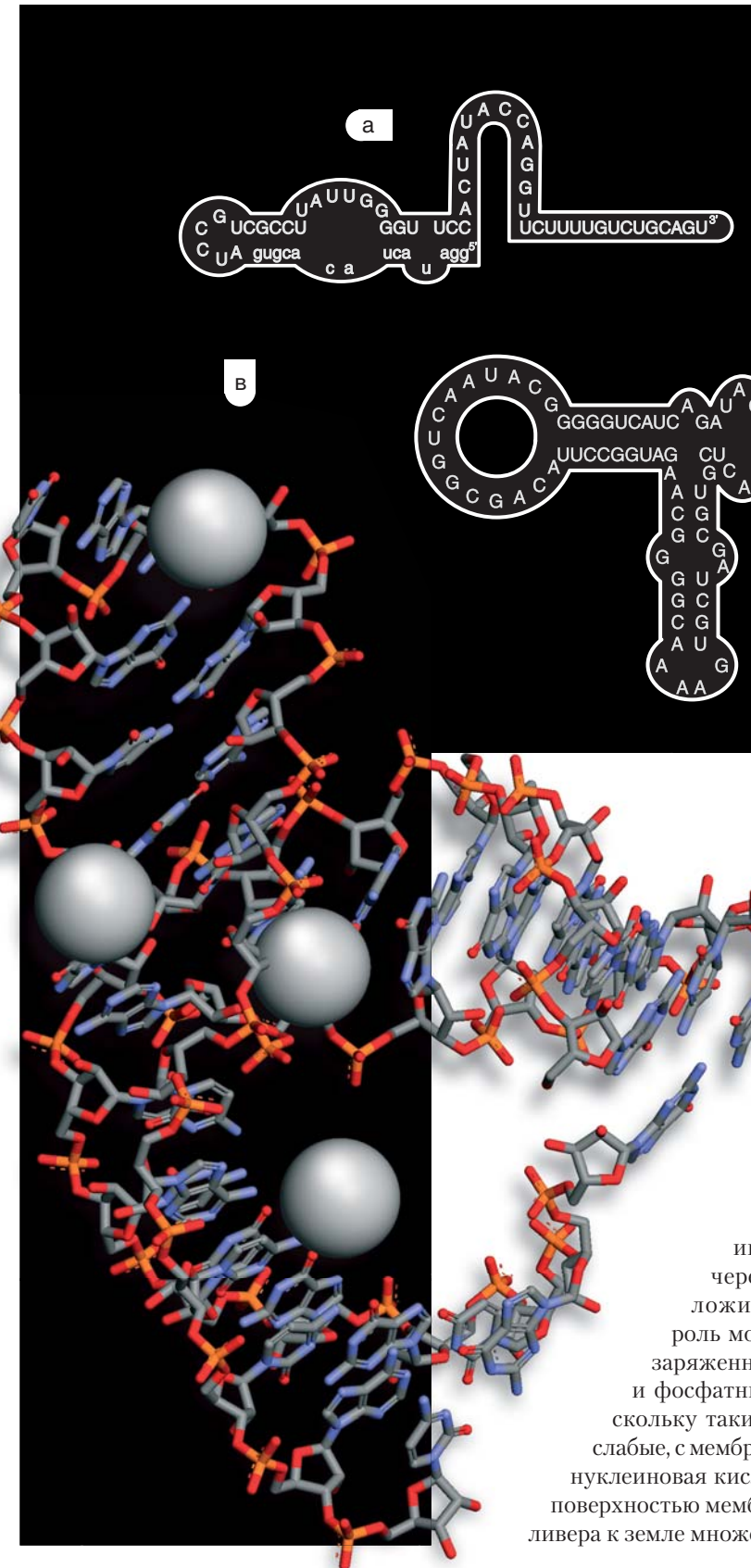
Метод молекулярной селекции обладает очень большими возможностями. С его помощью можно решать задачи поиска нужных молекул даже в том случае, если исходно нет идеи, как такие молекулы должны быть устроены. Однако, если придумать процедуру отбора, их можно выделить по принципу требуемых свойств, а затем уже заняться и вопросом, как эти свойства достигаются. Продемонстрируем это на примере выделения РНК, способных связываться с клеточными мембранами и модулировать их проницаемость.

Древние рибозиты должны были поглощать «питательные» вещества из окружающей среды, удалять продукты метаболизма и делиться в ходе размножения. И все эти процессы требуют управления проницаемостью мембран. Поскольку мы полагаем, что никаких других функциональных молекул, кроме РНК, в рибозитах не было, какие-то РНК обязательно должны были

ДАРВИНОВСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ В ПРОБИРКЕ

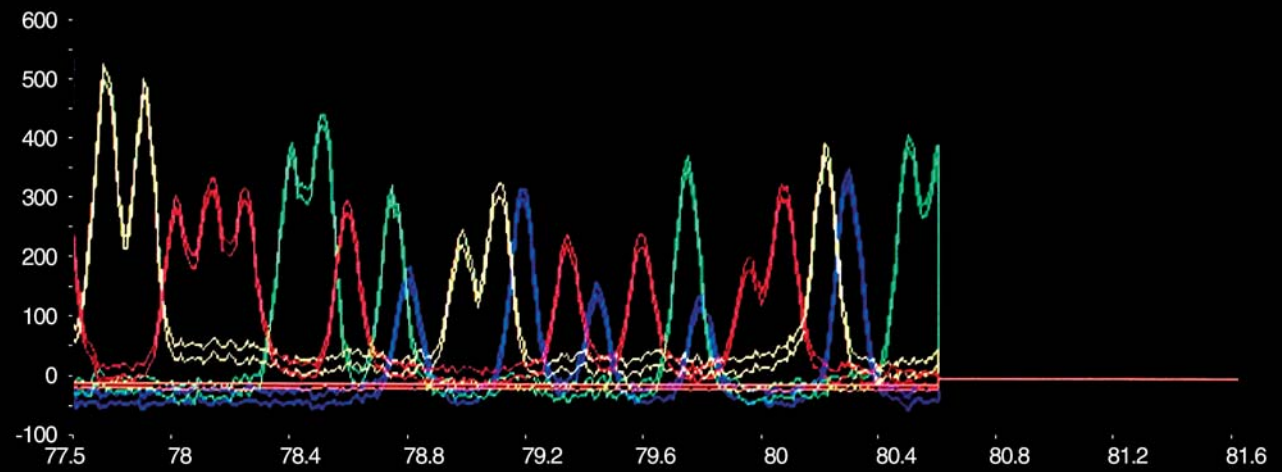
Хороший метод зачастую позволяет осуществить революцию в науке. Именно так можно сказать о методе *полимеразной цепной реакции (ПЦР)*, который позволяет размножать нуклеиновые кислоты в неограниченных количествах. Кратко опишем суть метода. Для размножения ДНК в методе ПЦР используются ферменты *ДНК-полимеразы*, т. е. те самые ферменты, которые при размножении клеток синтезируют из активированных мономеров-нуклеотидов комплементарные цепочки ДНК.

При методе ПЦР в пробирку с ДНК вносят смесь активированных нуклеотидов, фермент ДНК-полимеразу и так называемые *праймеры* — олигонуклеотиды, комплементарные концам размножаемой ДНК. При нагревании раствора цепи ДНК расходятся. Затем, при охлаждении, с ними связываются праймеры, образуя короткие фрагменты спиральных структур. Фермент присоединяет к праймерам нуклеотиды и собирает цепочку, комплементарную цепочке исходной ДНК. В результате реакции из одной двуцепочечной ДНК получается две. Если повторить процесс, получится четыре цепочки, а после n повторений — 2^n молекул ДНК. Все очень просто.



Методом молекулярной селекции были выделены тысячи разных РНК-аптамеров, способных образовывать комплексы с самыми разными молекулами.

а) аптамер, связывающий аминокислоту изолейцин; б) аптамер, связывающий аминокислоту тирозин; в) трехмерная структура *hammerhead* рибозима (Dunham C. M., Murray J. B., Scott W. G., 2003)

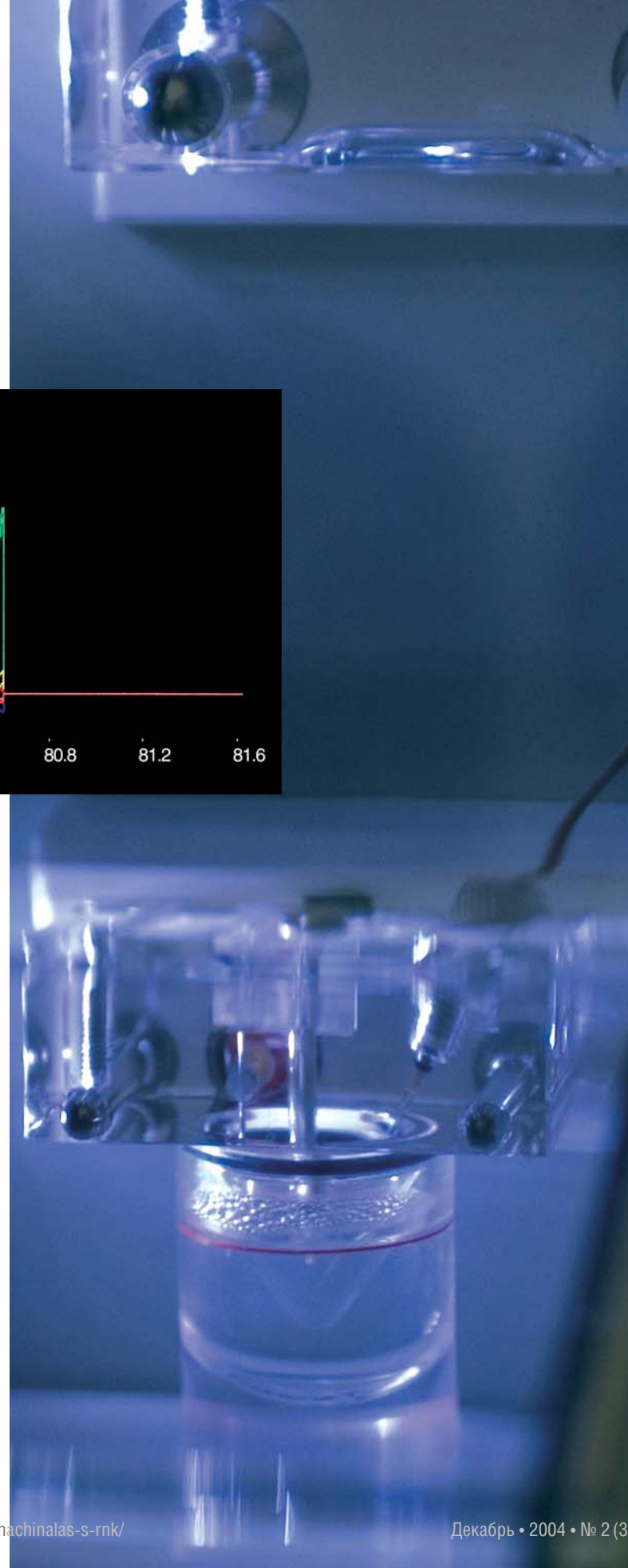


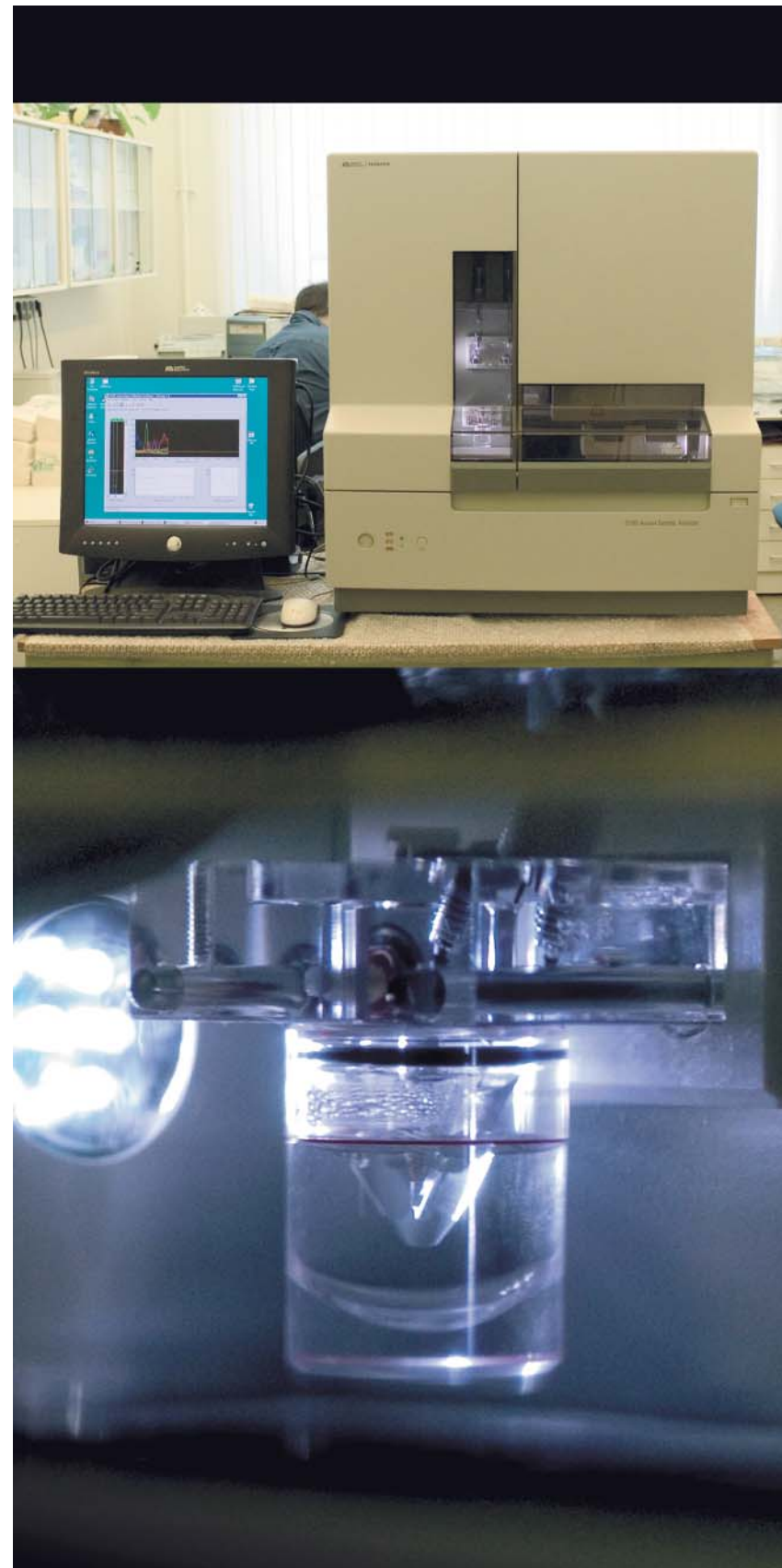
взаимодействовать с мембранами. Однако с химической точки зрения они совершенно не подходят для роли регуляторов проницаемости мембран. Мембраны современных клеток и липосом, построенные из жирных кислот, несут отрицательный заряд. Поскольку РНК также заряжены отрицательно, то по закону Кулона они должны отталкиваться от липидной поверхности и тем более не могут проникать в глубь липидного слоя. Единственный известный способ взаимодействия нуклеиновых кислот с поверхностью мембран — через двухзарядные ионы металлов. Эти положительно заряженные ионы могут играть роль мостиков, располагаясь между отрицательно заряженными группами на поверхности мембраны и фосфатными группами нуклеиновой кислоты. Поскольку такие мостиковые взаимодействия достаточно слабы, с мембраной может связаться только очень большая нуклеиновая кислота благодаря множеству слабых связей с поверхностью мембраны. Так маленькие враги привязали Гулливера к земле множеством тоненьких веревок.

Тут и помог исследователям метод молекулярной селекции. Из библиотеки РНК удалось выделить несколько молекул, которые очень успешно связывались с мембранами, а при достаточно высокой концентрации — даже разрывали их! Эти РНК обладали необычными свойствами. Они как бы

помогали друг другу: смесь молекул разных сортов связывалась с мембранами гораздо лучше, чем молекулы одного сорта. Все стало ясным после изучения вторичных структур этих РНК. Оказалось, что в них имеются петли с комплементарными участками. За счет этих участков «мембранные» РНК могут формировать комплексы-сообщества, которые способны образовывать множественные контакты с мембраной и делать то, что одной молекуле РНК не под силу.

Этот селекционный эксперимент подсказал, что у РНК есть дополнительный способ приобретения новых свойств путем образования сложных надмолекулярных комплексов. Этот механизм мог использоваться и для удерживания эволюционирующих систем РНК в виде колоний на поверхностях еще до того, как эти системы обзавелись изолирующей мембраной.





**«МИР РНК»:
БЫЛ, ЕСТЬ И БУДЕТ!**

Множество данных свидетельствует о том, что «мир РНК» действительно существовал. Правда, не совсем ясно — где. Некоторые специалисты полагают, что начальные этапы эволюции происходили не на Земле, что на Землю были занесены уже функционально активные системы, которые приспособились к местным условиям. Однако с химической и биологической точки зрения это не меняет сути дела. В любом случае остается загадкой — в результате каких процессов в окружающей среде рибозиты образовались и за счет каких компонентов существовали. Ведь требуемые для жизни рибозитов нуклеотиды — сложные молекулы. Трудно представить, что эти вещества могли образовываться в условиях пребиотического синтеза.

Вполне возможно, что древние РНК значительно отличались от современных. К сожалению, следов этих древних РНК экспериментально обнаружить нельзя, речь идет о временах, удаленных от нас на миллиарды лет. Даже скалы тех времен давно «рассыпались в песок». Поэтому речь может идти только об экспериментальном моделировании процессов, которые могли протекать на самых ранних стадиях молекулярной эволюции.

Почему произошел переход от «мира РНК» к современному миру? Белки, располагающие гораздо большим набором химических групп, чем РНК, являются лучшими катализаторами и структурными элементами. По-видимому,

Автоматический секвенатор ДНК — прибор, с помощью которого «читают» гены

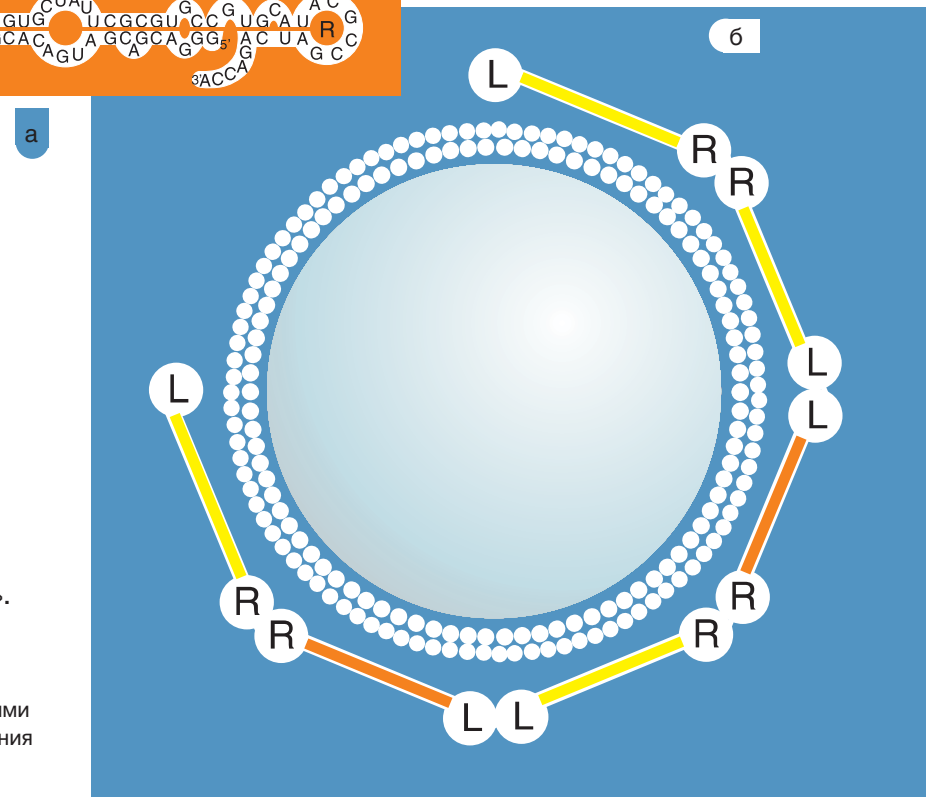
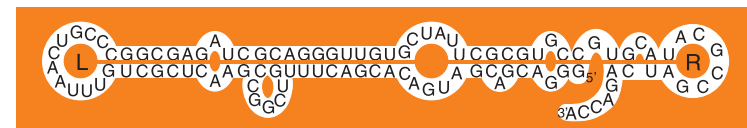
некоторые древние РНК стали использовать белковые молекулы в качестве «орудий труда». Такие РНК, способные к тому же синтезировать для своих целей полезные молекулы из окружающей среды, получали преимущества в размножении. Естественным путем отбирались соответствующие аптамеры и рибозимы. А затем эволюция сделала свое дело: возник аппарат трансляции, и постепенно ответственность за катализ перешла к белкам. Орудия оказались столь удобными, что вытеснили своих «хозяев» из многих сфер деятельности.

Читатель вправе спросить: а зачем вообще нужно исследовать эволюцию РНК, ведь древний «мир РНК» исчез? Неужели только ради «чистого искусства», удовлетворения интересов фанатичных исследователей? Однако, не зная прошлого, нельзя понять настоящее. Изучение эволюции и возможностей РНК может подсказать новые направления поиска процессов, протекающих в современных живых клетках. Например, совсем недавно были обнаружены мощные системы регуляции активности генов с участием двуцепочечных РНК,

с помощью которых клетка защищает себя от вирусных инфекций. Эта древняя система клеточной защиты, вероятно, скоро найдет применение в терапии.

Поэтому неудивительно, что в наше время исследования нуклеиновых кислот продолжают оставаться одной из самых «горячих точек» в молекулярной биологии. Благодаря уникальным свойствам РНК находят все более широкое применение в медицине и технике. Возникший в незапамятные времена «мир РНК» будет не только продолжать незримо существовать в наших клетках, но и возрождаться в виде новых биотехнологий.

Редакция благодарит сотрудников Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к. х. н. В. В. Ковалева, к. х. н. С. Д. Мызину и к. х. н. А. А. Бондаря за помощь в подготовке статьи



Отрицательно заряженные РНК могут взаимодействовать с отрицательно заряженными мембранами! Для этого они научились работать в «команде».
а) запись нуклеотидных последовательностей РНК, выделенных из препарата РНК, связывающегося с фосфолипидными мембранами; б) схема формирования «мембранного» комплекса РНК на поверхности липосомы