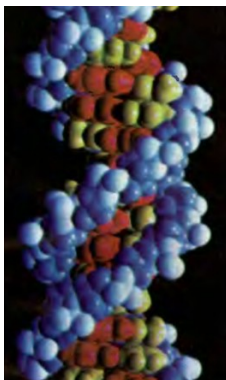


Двойная спираль или лента-спираль?

«Химия и жизнь», 1999, № 9, с.26—29

Лев Верховский



Прошло уже почти полвека с момента обнародования Дж. Уотсоном и Ф. Криком («Nature», апрель 1953 г.) предложенной ими структуры молекулы ДНК, которая вскоре стала символом новой науки — молекулярной биологии. Все перипетии, связанные с этим достижением, описаны Уотсоном в его известной книжке «Двойная спираль» (М.: Мир, 1969); она публиковалась и на страницах «Химии и жизни» в 1968—1969 гг. Но есть ли полная уверенность, что эта модель верна?

Есть закрученность — есть проблема

Еще в прошлом веке В. Флемминг открыл явление продольного расщепления хромосом в делящихся клетках. Модель носителя наследственной информации в виде двух комплементарных цепей дала замечательно простое и красивое объяснение процессам удвоения и передачи генетической информации; предложенная структура стала конкретным химическим воплощением «матричной» идеи Н. К. Кольцова, высказанной им в 1927 г. Именно в открытии принципа комплементарности нуклеиновых кислот заключалось революционное значение модели ДНК Уотсона и Крика.

Но двойная спираль сразу приводила к противоречию, которое не могли не заметить ее авторы: в ней сахарофосфатные тяжи закручены друг на друге, а при делении клеток (при репликации ДНК) двум цепям необходимо разделиться. Однако в одной хромосоме молекула ДНК может быть длиной в сантиметры и, значит, содержать миллионы витков; к тому же она чрезвычайно плотно упакована в микроскопическом объеме клеточного ядра. Как же в этих условиях нити могут разойтись?

Почему вообще Уотсон и Крик пришли к выводу, что цепи закручены и образуют однородную двойную спираль? Просто из общих соображений, точнее, стремления к максимальной симметрии. Вот что говорится об этом в «Двойной спирали» (с.46): «...Мы решили, пока не зайдем в тупик, считать строение сахарофосфатного остова весьма регулярным и искать такую пространственную конформацию, при которой все группы этого остова имели бы одинаковое химическое окружение... При постройке модели мы намеревались исходить из того, что сахарофосфатный остов имеет строго регулярное строение...»

Такую правозакрученную спираль они в итоге и построили — в виде винтовой лестницы, в которой все ступени равноправны, а две цепи перекручены. М. Дельбрюк,

одним из первых узнавший об их открытии, сразу написал Уотсону, что он уверен в правильности принципа комплементарности, но закрученность нитей считает ошибочной. В 50—60-е годы проблема разделения нитей стояла довольно остро, но и сами авторы модели, и большинство других ученых надеялись, что в будущем её всё же удастся как-то разрешить.

Свет в начале туннеля

И действительно, в 70-е годы в ней как будто наметился выход: в клетках обнаружили белки (топоизомеразы), разрезающие и сшивающие одиночные цепи ДНК. Значит, подобные ферменты в принципе могут делать надрезы сразу во многих местах, в которых нити будут раскручиваться, а затем ферменты способны снова соединить концы отдельных кусков. Эта идея, хотя и не подкреплённая конкретными доказательствами (участие таких белков в репликации экспериментально не подтверждено), многих успокоила.

Многих, но не всех, потому что процесс разделения нитей все равно остаётся очень сложным. И этот факт стал основанием для поиска других — альтернативных — моделей ДНК, в которых цепи вообще не перекручены. А что, спросит читатель, разве многолетние исследования ДНК всеми возможными методами в сотнях лабораторий мира еще не определили однозначно ее строение? Как это ни удивительно, ответ будет отрицательным.

Разглядеть структуру нативной (биологически полноценной) ДНК с атомным разрешением пока не удаётся. Например, для рентгеноструктурного анализа необходимы монокристаллы, а их умеют получать только из коротких отрезков ДНК. Понятно, что на конформацию таких «обрубков» будут влиять их свободные концы, из-за чего естественный вид молекул ДНК может быть искажен (кстати, первая полностью расшифрованная этим методом структура неожиданно выглядела как изломанная левая спираль, которую называли Z-формой).

В случае же длинных ДНК получают волокна, в которых молекулы лежат параллельно, но могут вращаться вокруг своих продольных осей, то есть не упорядочены азимутально. Их рентгенограммы изучала еще Розалинда Фрэнклин; она была хорошим кристаллографом, и кто читал книгу Уотсона, помнит об ее «антиспиральных» взглядах. Как писал после ее смерти А.Клуг, в ее рабочем дневнике (зима 1952—53 гг.) есть соображения о том, что «рентгенограммы волокон указывают не на регулярную спираль, а скорее на полосу или псевдоспираль с неэквивалентными фосфатами, которая в проекции выглядит как цифра восемь».

В электронный микроскоп уже видят контур ДНК (хотя и не настолько четко, чтобы делать решительные выводы), и можно заметить, что он не такой, как у двойной спирали. А вот зондовые микроскописты учинили настоящий суд над этой моделью и уже близки к тому, чтобы вынести ей окончательный приговор, — они стали механическим усилием разрывать водородные связи между комплементарными основаниями (иначе говоря, денатурировать ДНК) и убедились, что две нити в длинных молекулах как будто свободно расходятся («Новости науки», 1999, № 5—6. См. Приложение).

Мода на модели

В 1976 г. индийские и новозеландские авторы независимо выдвинули так называемую «бок о бок» (БОБ) модель, в которой направление закрученности обеих цепей меняется через каждые полвитка, поэтому в целом они остаются неперевернутыми. Опубликованная в солидных научных журналах, эта структура вызвала тогда небольшой переполох: оказалось, что, несмотря на очевидную ее нелогичность (по какой причине спираль все время меняет свою закрутку?), опровергнуть ее не так-то просто.

Для этого были поставлены специальные, и довольно изощрённые, эксперименты, основанные на эффекте суперспирализации замкнутых в кольцо ДНК. Суть в том, что ДНК ведет себя как упругий телефонный шнур, который при перекручивании, как мы знаем, сбрасывает напряжение, образуя сверхвитки. Так вот, БОБ-модель из-за своей право-левой закрученности должна в отношении суперспирализации вести себя несколько отлично от двойной спирали, и в результате удалось показать ее несоответствие полученным данным (см. статью «Метаморфозы двойной спирали» в «Химии и жизни», 1980, № 2).

Б. С. Филипп из Института прикладной физики АН МССР (Кишинев) отстаивал мысль, что вдоль молекулы одни ее протяженные участки представляют собой правые спирали, другие — левые, так что в целом у ДНК опять закрученности нет.

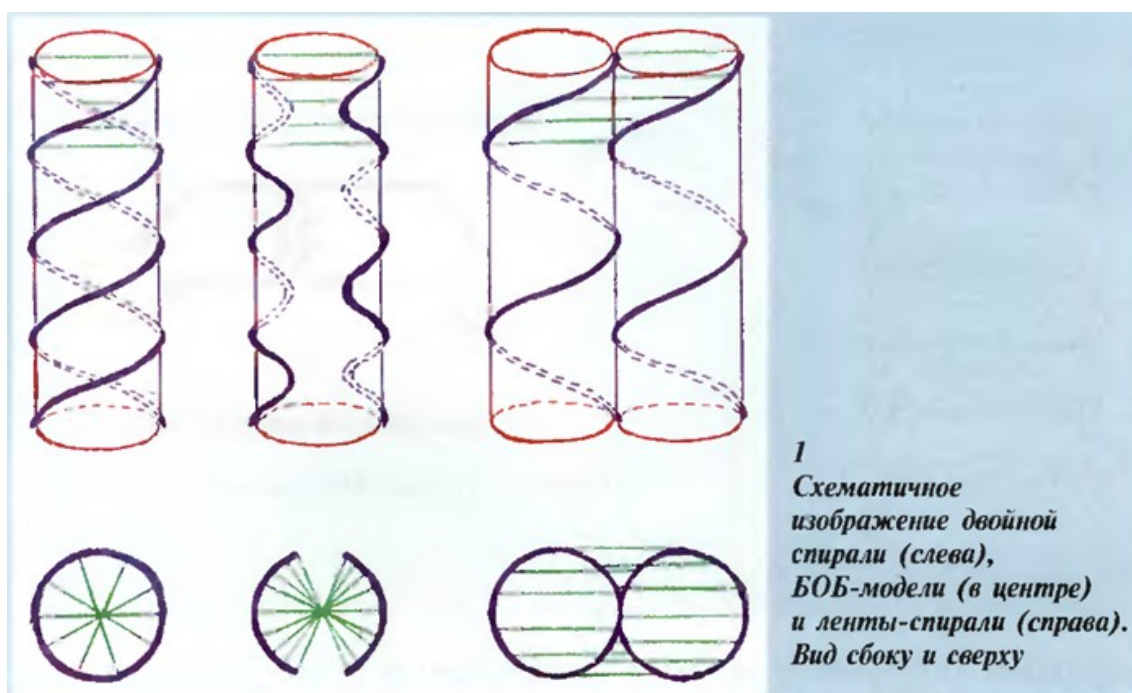
Еще одну модель, названную «лентой- спиралью», предложил в 1979 г. автор этих строк. В ней две сахарофосфатные цепи образуют противоположно направленные параллельные спирали, сдвинутые друг относительно друга на длину мостика пары оснований; размер витка и расстояние между соседними парами такие же, как в двойной спирали. От БОБ-структуры ее отличает однородный правовращательный характер цепей — никаких «виляний» нет.

Вместе с Р.-Х. Микельсааром из Тартуского университета на объемных тартуских моделях (см. «Химию и жизнь», 1985, №11, с.58) был построен один виток ленты-спирали, то есть была показана ее стерическая (пространственная) возможность. Эта работа отражена в тезисах «Первой республиканской конференции по биофизике», АН МССР, Кишинев, 1984; годом раньше о ней было сделано краткое сообщение на Всесоюзной школе по биофизике нуклеиновых кислот в Харькове. (Кстати, в 90-е годы главный редактор «Nature» Дж. Мэддокс говорил, что теперь исходная статья Уотсона и Крика, наверное, не была бы принята к публикации: рецензенты сказали бы, что это лишь построение моделей, одни спекуляции, к тому же рентгеновские данные получены не ими, а Р.Фрэнклин.)

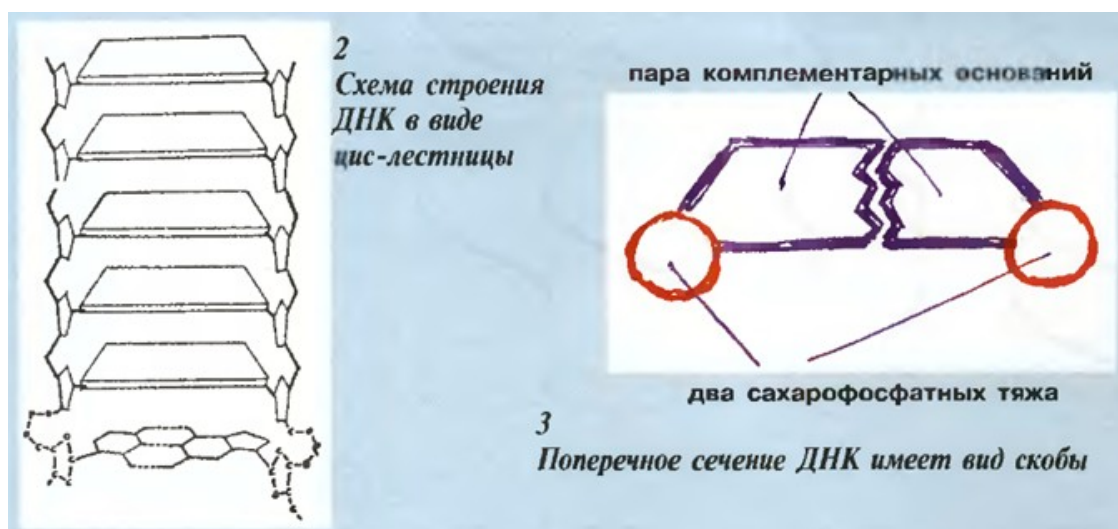
Три карты, три карты...

Схематически все три структуры — двойная спираль, БОБ-модель и лента-спираль показаны на «триптихе» (рис. 1). Ясно, что те свойства модели Уотсона и Крика, которые определили ее значение для генетики, — наличие двух цепей, связанных парами

комплементарных оснований, — эти альтернативные модели не отвергают. Они лишь предполагают другие пространственные формы цепей и их взаимного расположения.



Часто в учебниках и статьях ДНК рисуют просто в виде двух параллельных прямых, соединенных перпендикулярными им перемычками, то есть в виде лестницы, что отражает самое существенное в ее строении; другая, более реалистичная схема, называемая «цис-лестницей», показана на рис. 2.



Лента-спираль похожа на эту цис-лестницу, но только оба ее поручня образуют самостоятельные спирали (точнее, винтовые линии); при этом плоские пары оснований (ступени) сближаются и укладываются в стопку. Вид сверху ее остова дает как раз восьмерку — вспомним мысль Фрэнклин.

Неэквивалентность фосфатов, о которой она писала, тоже есть, и у ДНК ее действительно выявляют по данным ЯМР. Дело в том, что лента-спираль, в отличие от двойной спирали, не представляет собой регулярную спираль, поскольку внутри витка взаимные расположения соседних пар оснований (не поворот на определенный угол, как у

Уотсона и Крика, а параллельные сдвиги) неодинаковы. Значит, разными будут и двугранные углы в сахарофосфатных цепях — вот где расхождение с тем требованием симметрии, из которого исходили Уотсон и Крик. (Однако в центре витка ленты-спирали есть ось симметрии второго порядка, поэтому наименьшим повторяющимся мотивом в ее структуре будет полвитка.)

Конечно, главное достоинство предложенной модели состоит в том, что нити не перевиты, поэтому они могут легко расходиться при репликации или денатурации (нет закрученности — нет проблемы). Но, как мы увидим, она хороша и в других отношениях — многие молекулярно-генетические процессы резко упрощаются. Важно, что эта модель сочетает в себе, как это отражено в ее названии, свойства и ленты, и спирали.

Плоды незакрученности

В самом деле, она похожа на перфоленту, которую можно свободно читать, держа за концы (для двойной спирали из-за ее перекрученности это невозможно); поэтому будут легко происходить зависящие от текста ДНК нуклеино-нуклеиновые и нуклеино-белковые узнавания. Кроме того, из-за своего ленточного характера такая молекула может легко сгибаться, чтобы оборачиваться вокруг белковых «катушечек»-нуклеосом, или для того, чтобы поместиться внутри белковой оболочки вируса; изогнуть же сильно двойную спираль без ее излома нельзя. Понятно, что ленту вообще можно упаковать плотнее (в хроматине и вирусах), чем цилиндр.

А благодаря однородной винтовой закрученности обеих своих цепей лента-спираль будет вести себя и как упругая пружинка. Поэтому она не будет противоречить опытам по суперспирализации, на основании которых была отвергнута БОБ-модель (некоторые специалисты решили, что эксперименты, опровергшие БОБ-структуру, одновременно позволяют отбросить и любые другие незакрученные модели, но это неверно.)

Далее, одна и та же лента-спираль может иметь различные конформации, поскольку внутри витка любая фиксированная пара оснований способна в принципе занимать стерически неравноправные положения — на гребне, во впадине или где-то посередине (назовем эту степень свободы фазой ленты-спирали). Теперь представим, что с ДНК взаимодействует в каком-то месте белок или другая молекула. Из-за этого может произойти локальный сдвиг фазы, и волна ее изменения станет распространяться вдоль полимера. Понятно, что таким способом сигналы могли бы передаваться на большие расстояния, а подобные дальние действия в ДНК сейчас хорошо известны.

Еще один факт. Расположение нуклеосом относительно ДНК может быть разным, но отличаться на целое число периодов спирали. В уотсон-криковской модели из-за ее винтовой симметрии нет никаких выделенных, предпочтительных положений. А структура ленты-спирали повторяется только через виток (через десять пар оснований), тем самым задавая естественную дискретность.

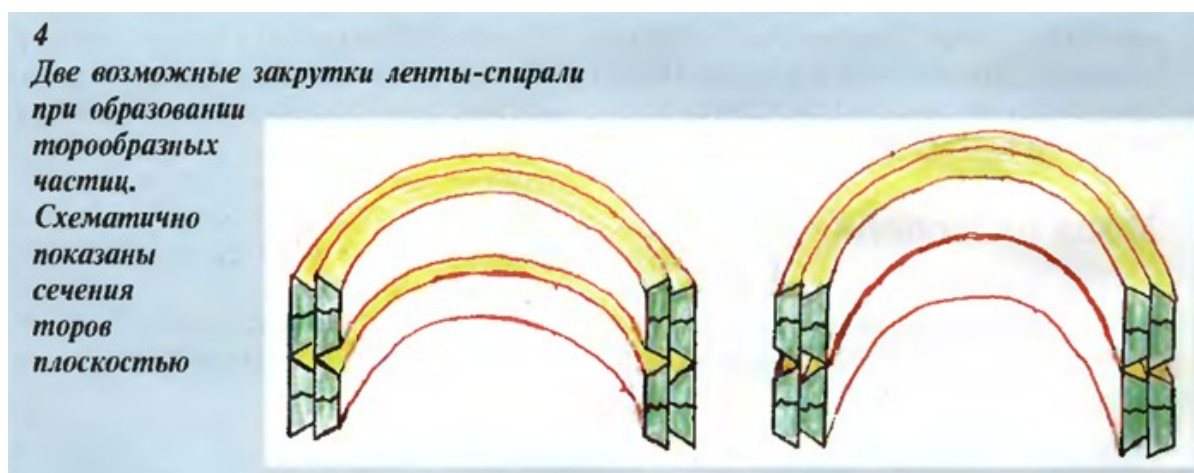
Нуклеиновые бублики

Известно, что при изменении свойств раствора, взаимодействии с другими молекулами ДНК скручивается, образуя компактные торообразные частицы, которые видны в электронный микроскоп (так называемая пси-форма ДНК). В случае двойной спирали для объяснения этого эффекта пришлось разработать сложную термодинамическую теорию (см., например, популярную книгу А. Ю. Гросберга и А. Р. Хохлова «Физика в мире полимеров». М.: Наука, 1989).

С лентой-спиралью все будет проще. Дело в том, что две ее широкие стороны стереохимически неодинаковы (ведь в поперечном сечении ДНК выглядит как скоба — рис. 3); одна из них соответствует малому желобку двойной спирали (там расположены фосфатные группы остова), а другая — большому. Поэтому такая молекула будет вести себя как биметаллическая пластинка, то есть при изменении условий она закрутится.

Получающиеся ДНКовые торы, как выяснили, оптически активны, что указывает на дальний порядок в расположении азотистых оснований; при этом знак полосы в спектре может быть разным. Необычные оптические свойства частиц ДНК обычно объясняют образованием холестерических жидких кристаллов.

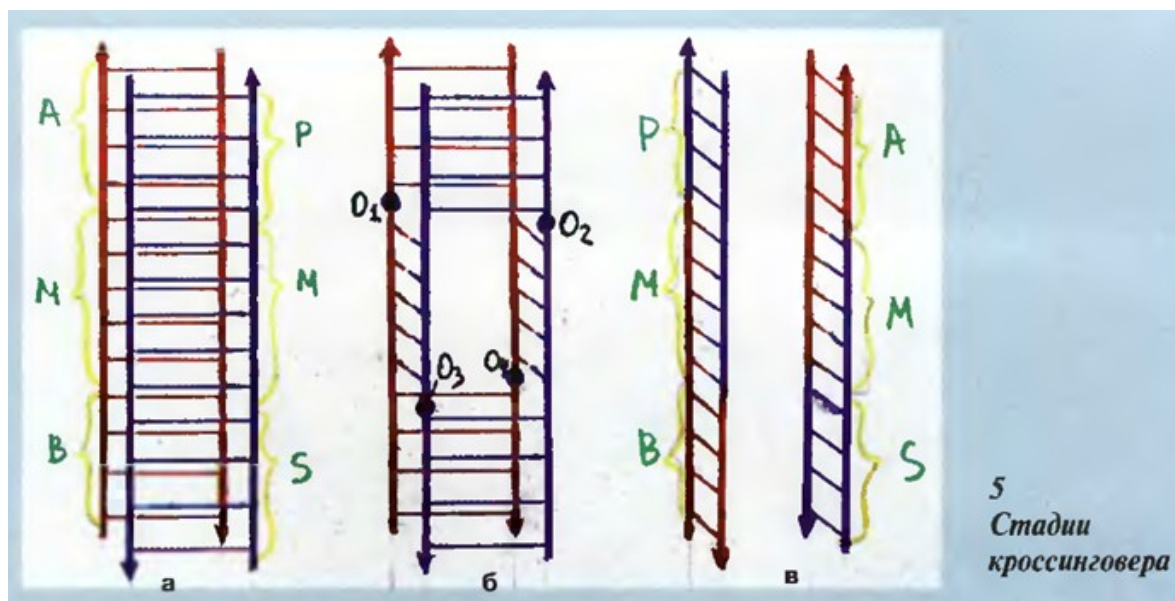
Лента-спираль снимает проблему. Ведь если она закрутится (как ремень на руку), то в сечении тора будет пучок одинаково азимутально ориентированных молекул (рис. 4) — как бы кристалл из параллельно уложенных пар оснований, что и даст оптическую активность. При других параметрах среды (или опять же взаимодействии ДНК с некоторыми молекулами) ремень перекрутится в другую сторону, то есть весь исходный тор вывернется наизнанку, как перчатка, — «Я на правую руку надела перчатку с левой руки» (А. Ахматова). Результат такого выворачивания аналогичен переходу от одного энантиомера к другому — спектр трансформируется в свое зеркальное отражение (знак полосы в нем изменится).



Хромосома — невод

Теперь давайте взглянем на процесс взаимного узнавания двух молекул ДНК, имеющих области с одинаковыми последовательностями оснований. Оно происходит, например, при мейозе, когда две гомологичные родительские хромосомы сближаются, выстраиваются параллельно, а затем между ними происходит обмен участками (кроссинговер).

В отличие от двойной спирали, две ленты-спирали (схематично показаны как синяя и красная «лестницы» на рис. 5а) могут расположиться так, чтобы водородные связи, соединяющие основания внутри каждой молекулы, разорвались, основания повернулись на 90° и возникли новые пары оснований, но уже межмолекулярные (рис. 5б). Такой гетеродуплекс служил бы ключевым этапом кроссинговера.



Затем цепи рвутся в точках O_1 , O_2 , O_3 и O_4 и после поворотов их концов на 90° зашиваются уже по-новому (рис. 5в). В результате происходит обмен участками (рекомбинация) — в исходных молекулах были последовательности блоков А—М—В и Р—М—S, а в итоге получились А—М—S и Р—М—В.

Лента-спираль открывает интересные возможности с точки зрения организации ДНК в хромосомах. Ведь известно, что в геноме есть много повторяющихся участков (их так и называют «повторами»). Эти повторы, расположенные в одной хромосоме, тоже могут сближаться между собой, поэтому будут формироваться внутривнутрихромосомные гетеродуплексы (рис. 5б). Если теперь разрывов цепей (как при кроссинговере) не произойдет, а параллельно расположенные ленты разойдутся, то возникнут петли, из которых (в целом по хромосоме) может получиться сложная, разветвленная сеть.

Вообще о сетевом устройстве хромосом знают давно, но здесь становится ясен принцип их строения. Образующиеся петли могли бы отражать ассоциативные связи между удаленными участками генома, а структура сети — сохраняться при удвоении хромосом, то есть нести дополнительную (эпигенетическую) наследственную информацию.

Энергетика и кинетика

Но всё-таки почему при рентгеноструктурном анализе коротких отрезков ДНК ленту-спираль пока не наблюдали? Видимо, энергетически более выгодна двойная спираль, причем ее параметры сильно зависят от последовательности оснований (в частности, может получаться Z- форма). А конформация в виде ленты-спирали — это метастабильное состояние двухцепочечной ДНК. Ведь, как мы знаем, при сворачивании белковых цепей энергетический минимум может быть недостижим кинетически.

Представим, например, что есть две длинные комплементарные нити. Когда они сблизятся на каком-то участке, основания там развернутся навстречу друг другу и «молния» сразу застегнется по всей длине участка (произойдет восстановление двухцепочечной структуры, или ренатурация), но закрутиться друг на друге нити не смогут из-за их «висящих» концов.

Как сказал в свое время Э. Бауэр, «жизнь — это устойчивое неравновесие». Возможно, что такой принцип верен и относительно структуры ДНК, которая тоже оказывается неравновесной.

Наверное, именно из-за этого для репликации ДНК нужен начальный двухцепочечный участок — «затравка», который строят специальные ферменты. После того как затравка получена, дальше уже может идти формирование ленты-спирали — от двойной спирали ее будет отделять большой потенциальный барьер, преодолеть который без нарушения стэкинг-взаимодействия соседних пар оснований (их тесного контакта, обусловленного дисперсионными и гидрофобными эффектами), то есть без разрушения своей нативной структуры, молекула ДНК не сможет.

Сейчас доказана широкая вариабельность формы самой главной молекулы, известны и заведомо незакрученные состояния, скажем, когда спариваются два замкнутых кольца из одиночных комплементарных цепей (так называемая V-форма). Вероятно, при некоторых условиях отдельные участки внутриклеточной ДНК могут иметь конформацию двойной спирали.

Виток спирали

*Оставь свою теорию, как Иосиф оставил
одежду в руках блудницы, и беги.
Р.У.Эмерсон*

Как уже сказано, никаких серьезных оснований для выбора модели с перекрученными нитями у Уотсона и Крика не было. Конечно, стремление к простоте — важнейший эвристический принцип, но он может и подвести. Вспомним И. Кеплера с его открытием эллиптичности планетных орбит — ведь, казалось бы, они должны быть круговыми. А. Эйнштейн говорил, что «надо пытаться все сделать настолько простым, насколько это возможно, но не проще».

Простота двойной спирали оказалась мнимой — эта модель породила массу трудностей в объяснении основных молекулярно-биологических процессов, в которых она участвует. Почему же она все-таки выстояла столько лет? Наверное, это нормальный

консерватизм науки, о котором писал еще Ф. Бэкон в «Новом Органоне»: «Разум человека всё привлекает для поддержки и согласия с тем, что он однажды принял... Какова бы ни была сила обстоятельств, свидетельствующих о противном, разум или не замечает их, или пренебрегает ими...»

Лента-спираль имеет много преимуществ перед двойной спиралью. Конечно, эту структуру необходимо уточнить методами теоретического конформационного анализа, а также исследовать в других аспектах. (Кстати, не исключено, что такой полимер окажется перспективным с точки зрения поиска органических сверхпроводников — ведь он сочетает в себе стопочную структуру плоских оснований с периодическим изменением электронных свойств остова.)

Развитие, как нас учили, идет по спирали. Вот и в проблеме ДНК, видимо, пришло время выйти на следующий ее виток.

ПРИЛОЖЕНИЕ («Химия и жизнь», 1999, № 5-6, с.8-9. Заметка в рубрике «Новости науки»)

Дыба для ДНК

U.Bockelmann et al., «Phys.Rev.Lett.», 1997, v.79, p.4489; «Phys. Rev.», 1998, v.E58, p.2386

Как только ни изучали самую главную молекулу, однако некоторые свои тайны она, похоже, так и не открыла. Но вот к ней стали применять зондовые микроскопы, и, не выдержав «пытток», ДНК «заговорила». Эти инструменты позволяют манипулировать отдельными атомами и молекулами, причем вместо косвенных и сложных для интерпретации данных, которые дают химические и спектроскопические методы, тут имеют дело с наглядной механикой.

Физики из Высшей нормальной школы (Париж) поместили в раствор (близкий к физиологическому) одиночную молекулу ДНК фага лямбда длиной более 16 мкм — она содержит 48 502 пар оснований. С одного конца молекулы две ее нити слегка разошлись, и конец одной из них закрепили (пришили к стенке), а конец другой присоединили к микрошарику, установленному на игле зондового микроскопа, поэтому его можно было передвигать. И начали растягивать концы в разные стороны, прикладывая силу порядка 10 пн. При этом они разрывали водородные связи между комплементарными основаниями, то есть денатурировали ДНК. В результате получена зависимость требуемой для этого силы от порядкового номера основания в геноме фага, а так как их последовательность расшифрована, то, значит, и от текста ДНК; приложенные в каждом месте усилия зависят от содержания в нем АТ- и ГЦ-пар, что неудивительно, поскольку энергетически они неодинаковы (А и Т связывают две водородные связи, Г и Ц — три).

Самое интересное, что концы удалось развести на десятки микрометров, то есть разделить два сахарофосфатных тяжа по всей длине исходной молекулы. Но ведь в двойной спирали они закручены друг на друге! Значит, чтобы эти тяжи могли расходиться, вся ДНК должна вращаться (как карданный вал автомобиля) вокруг своей длинной оси, то есть растяжением концов нужно вызвать вращение огромной молекулы, которая к тому же еще как-то скручена. Как это может происходить, непонятно, ведь

диаметр ДНК около 2 нм, а ее длина была, как сказано, 16 мкм (для сравнения представим, что растягивая за два конца перекрученные шнуры, диаметры которых равны 1 см, нужно полностью раскрутить двойную спираль из них длиной 160 м, содержащую почти 5000 витков).

Авторы работы ни слова не сказали (простоты ради) о проблеме раскручивания, но пренебрегать ею никак нельзя, — возможно, именно в обнаружении этого противоречия и состоит самая важная информация, добытая в эксперименте. Можно вспомнить, что в 70—80-е годы за рубежом и у нас в стране были предложены несколько альтернативных моделей ДНК, в которых две нити не закручены; наверное, теперь стоит вернуться к их рассмотрению. Но прежде необходимо провести *experimentum crucis* — закрепить второй конец ДНК так, чтобы раскручивание в принципе не могло происходить, и повторить опыт. Если нити опять разойдутся, то, значит, модель Уотсона—Крика действительно неверна.

Подготовил Л. Верховский