

**A history of Molecular biology**  
**Michel Morange**  
**Harvard University press, 2000, 336 pages**

Превод Надя Петрова, F 54682  
Под редакцията на доц. Галина Сачанска

**Раждането на молекулярната биология**

**Глава 3**

***Химичната природа на гена***

В ретроспекция, първият опит, който убедително показва, че гените са изградени от ДНК, е проведен от американеца Осуалд Т. Ейвъри и неговите сътрудници, и е публикуван през 1944 г. в *Списание за Експериментална Медицина*. В най-ранните описания на произхода и развитието на молекулярната биология не се споменава за това проучване. Друг опит, проведен осем години по-късно, показва същите резултати и често е представян паралелно или вместо опита на Ейвъри. Това става причина за изобилието от литературен материал, представящ Ейвъри като непризнат учен в молекулярната биология, подобно на Мендел в генетиката.

Истината е едновременно проста и по-сложна – проста, защото Ейвъри не е непознат; по-сложна, защото откритието му не е разбрано, а важноста му не е оценена на време. По думите на Н. V. Wyatt, всеки знае за откритието на Ейвъри, но информацията не се е „превърнала в знание”.

Ейвъри работи в престижния Институт „Рокфелер” в Ню Йорк, където прекарва по-голямата част от научната си кариера, изучавайки пневмококите (бактериите причиняващи пневмония). А след заразяването, организмът реагира като произвежда антитела, насочени към патогенния причинител. Именно те позволяват охарактеризирането на различните видове пневмококи. Антителата взаимодействат с обвивката на бактерията, наречена капсула, която е изградена от захари. Ейвъри има най-голям принос в охарактеризирането на структурата на тази капсула в различните видове пневмококи и придобива голяма известност с високото качество на работата си.

Пневмококовата инфекция може да бъде възпроизведена в мишки. Тъй като предизвикват сериозни заболявания, пневмококите се превръщат в модел за изучаването на човешките инфекциозни заболявания. Работата на Ейвъри изцяло се вписва в научноизследователските планове на Института „Рокфелер”: разбиране на патологичните явления на фундаментално ниво чрез използването на най-новите физични и химични техники.

При определени условия в културата, пневмококите спонтанно унищожават техните захарни капсули. Тези пневмококи, наречени R (“rough” – „груби”), не са заразни, за разлика от S (“smooth” – „гладки”) пневмококите, които са покрити с капсула и по тази причина са по-гладки. Захарната капсула инхибира фагоцитозата на пневмококите от белите кръвни клетки в организма, като по

този начин увеличава патогенната сила на бактериите. Когато антителата атакуват самите капсули, те подпомагат фагоцитозата и по този начин помагат за защитата на организма.

През 1928г. , английския физик Фред Грифит открива странното явление трансформация. Когато на мишка се инжектират едновременно непатогенни пневмококи R (произхождащи например от бактерии тип II) и предварително умъртвени S пневмококи тип III, животното бързо се поддава на инфекцията и умира. Грифит е изолирал колонии от вирулентни S форми, тип III от кръвта на умрялата мишка. Единственото възможно обяснение е, че пневмококите тип III, които са вирулентни, но мъртви, са трансформирали живите непатогенни пневмококи от тип II.

През 1931 г. , Мартин Доусън и Ричард Сиа възпроизвеждат този резултат *in vitro*, а по-късно Дж. Лионел Алоуей показва, че е възможно да се трансформират *in vitro* невирулентни пневмококи от даден тип чрез екстракти с умъртвени вирулентни пневмококи от друг тип. Опитът на Алоуей проправя пътя към изолиране на трансформация фактор, който в извлеките от мъртви вирулентни пневмококи отговаря за трансформацията на пневмококовия тип.

През 1935г. , Ейвъри започва пречистване на трансформация фактор. Заедно с Колин Маклеод и Маклин Маккарти, Ейвъри продължава работата си – с няколко прекъсвания – в продължение на десетилетие. Статията им от 1944 г. , публикувана в *Списание за Експериментална Медицина*, представлява голяма част от работата му. Много страници са посветени на това да обяснят добре дефинирането и лесно възпроизводимите условия за трансформация *in vitro*, както и описването на детайлите за пречистването на трансформация фактор. Основната част от статията е охарактеризирането на пречистения трансформиращ фактор чрез серия от физични и химични методи.

Всички тези техники са насочени в една и съща посока: трансформация фактор не е белтък, а дезоксирибонуклеинова киселина. Факторът е в състояние да издържи на температури, при които белтъците се денатурират. Колориметричните тестове показват, че пречистения трансформиращ фактор съдържа само ДНК, без следа от белтък или от рибонуклеинова киселина (РНК). Прост химичен анализ потвърждава, че белтъците в пречистения материал са по-малко от 1 %. Ензимните тестове показват, че трансформация фактор не е засегнат от ензими, късащи белтъци, нито от фосфати, които разграждат РНК, но може да бъде засегнат от незатопен серум. Тази последна точка е важна: известно е че серумът съдържа ензим, който е способен да разгради ДНК.

Използвайки най-прецизни техники от физиката и химията, с които Института „Рокфелер“ разполага (вижте Глава 9), Ейвъри е в състояние да покаже, че пречистения трансформиращ фактор има висока молекулна маса и най-вероятно е нуклеинова киселина.

Накрая, значителна част от статията е посветена на имунологичен анализ, който показва, че пречистения материал не реагира с антителата, насочени срещу капсулата. Това подсказва, че независимо от значението му за формирането на тази капсула, трансформация фактор сам по себе си не съдържа никакви захари. Статията завършва с дискусия за природата и механизма на действие на трансформация фактор.

Обичайното обяснение за това, че откритието на Ейвъри е недостатъчно известно е, че статията му не е прочетена, или поне да бъде прочетена от някой, който наистина би я разбрал, и в частност от генетиците. *Списанието за Експериментална Медицина* е било предназначено повече за физиолози и патолози, отколкото за биохимици или генетици. Още повече, заглавието и резюмето на статията, насочени изцяло върху явлението трансформация, не предизвикват незабавен интерес към важните крайни резултати. Даже обсъждането е предпазливо – там Ейвъри изтъква хипотеза, че трансформиращото вещество е свързано с гените или има природа, близка до гените или вирусите (особено туморните вируси открити няколко години по-рано от Пейтън Раус), но той просто очертава възможна връзка, без да навлиза в по-нататъшни уточнения. Тази предпазливост съответствала на личността на Ейвъри. По това време той е на 67 години и предпочита лабораторната работа пред административната. Той никога не е пожелавал важен пост.

Всички тези ограничения не попречват на статията да бъде четена и дискутирана, както Н. V. Wyatt ясно показва. Не трябва да се забравя, че Институтът „Рокфелер” е един от най-престижните изследователски институти в Съединените Щати, самият Ейвъри е добре известен, работата му високо ценена, а списанието, в което е публикувал има голям тираж и солидна репутация.

Работата на Ейвъри не останала незабелязана: неговото откритие, популяризирано от списания като *Американски учен (American Scientist)*, не е пренебрегнато от основните биохимици и генетици, както и навлизащите молекулярни биолози. Резултатът изглежда много важен, но поражда толкова много проблеми, че е трудно да се оцени истинската му значимост.

С характерна простота, Макс Делбрюк споделя с Ейвъри за изследването му: „Ти наистина не знаеше какво да правиш с него”. Този коментар разкрива състоянието на познанията на времето и реалния статус на моделите, които често са използвани като заместители на познанието.

Трансформацията е нов и необикновен феномен, който в момента изглежда свързан само с пневмококите. Дори разпространението на бактерията *E. коли* от Андре Бойвин във Франция не подкрепя гледната точка на Ейвъри – тези резултати не могли да бъдат възпроизведени от други лаборатории, което означавало, че трансформацията ставала още по-маргинализираща се като процес. Освен това самите пневмококи са слабо изучени бактерии от гледна точка на състава и биохимичната им природа. Преди работата на Ейвъри, единствената характеризирана нуклеинова киселина в тези бактерии била РНК. Съществуването на гени в бактерията още не е единодушно прието – някои учени като британският биохимик сър Сирил Хиншелууд, смятат, че свойствата на бактерията, включително способността ѝ за адаптация и мутация, могат да бъдат обяснени с промени в биохимичното равновесие (вижте Глава 5).

Друго ограничение е фактът, че в онзи момент структурата на нуклеиновата киселина е слабо изяснена. Химичната структура на нуклеотидите и природата на връзките, които ги свързват в полимери, са все още обект на дискусии. Доминиращ модел по това време е този на тетра nukлеотида, предложен от Фебус А. Левин през 1933 г., според който ДНК е формирана от повторение на елементарни единици – верига от четири бази (аденин, тимин, гуанин и цитозин). Поради тази причина, за Левин, ДНК е монотонна молекула. Функцията ѝ също е слабо

разбирана, въпреки че, благодарение на опитите в областта на фината цитология, проведени основно в Швеция от Торбьорн Касперсон, показват, че е свързана с хромозомите. Според нуклеопротеиновия модел на хромозомите, ДНК е опорен материал за белтъците, които са отговорни за генната специфичност.

Няколко години по-рано, американския биохимик Фриц Липман открива, че нуклеотидът аденозин трифосфат (АТФ) действа като вътреклетъчен енергиен резерв. Това добавя енергийно измерение на този нуклеопротеинов комплекс в хромозомите – може би ДНК играе ролята на осигурител на енергията, която е необходима за генната репликация? Откритието на Ейвъри приписва на молекулата на ДНК специфична роля, която доста по-трудно се вписва в общата представа. Ейвъри си дава сметка за това затруднение; един от най-дълго обсъжданите въпроси в статията му е появата на неспецифична ДНК-молекула.

Освен тези трудности, свързани с непознаването на структурата и свойствата на нуклеиновите киселини, друг проблем с това проучване е, че то застава срещу широко споделяното мнение (с което Ейвъри е съгласен), според което белтъците са най-добрите кандидати за генетичната специфичност (вижте Глава 1). Идеята, че белтъците са основните съставни части на гените не е нова: тя е приета както от генетици като Мюлер, така и от младите молекулярни биолози от „фаговата група”, чията работа ще опишем в следващата глава. У. М. Стенли насърчава тази идея, когато изолира растителен вирус – вирусът на тютюневата мозайка (TMV) – като чист белтък (вижте Глава 6). Този протеинов модел на гените е в съответствие с всички експериментални данни, натрупани в продължение на половин век, които показват, че белтъците са „носители” на характерната за живота специфичност. Тази специфичност първоначално е разкрита от широк кръг клетъчни реакции, контролирани от белтъци. Джон Нортроп и Джон Б. Съмнер, двама колеги на Ейвъри от Института „Рокфелер”, пречистват и кристализират множество ензими и потвърждават, че те са белтъци.

Спецификата на белтъчната форма и функцията ѝ могат да бъдат изучавани чрез създаване на антители срещу белтъците. Имунологичните реакции първоначално са използвани, за да разкрият структурните разлики между белтъчната молекула, което никой друг физико-химичен метод не може да постигне. По-късно имунологичният критерий се превръща в критерий за специфичност – молекула се счита за „специфична”, ако е в състояние да индуцира образуването на специфични антители. До този момент, ДНК се проваля в преминаването на теста.

Има и други аргументи, подкрепящи хипотезата, според която белтъците са основните съставни части на гените: те със сигурност са един от двата ключови компонента на хромозомите, а Бийдъл и Тейтъм показват, че ензимите са отговорни за различни метаболитни реакции, които са под прекия контрол на гените. Работата на Бийдъл и Тейтъм сближават гените с ензимите и за много биолози това е допълнителен знак за идентичност на гените с ензимите и белтъците.

Нещо повече, Ейвъри получава значително голямо количество от трансформация материал: проследеното ниво на намерените замърсени белтъци може да обясни наблюдаваните данни. Както радетелите на протеиновата теория на гените, Алфред Е. Мирски от Института „Рокфелер”, вярва в нея.

През следващите години, колегите на Ейвъри доказват пречистването на трансформиращия фактор. Присъствието на аминокиселините, изграждащи белтъците е намален до по-малко от две на десет хиляди. Присъствието на тези следи от аминокиселини, в действителност не се дължи на замърсяването на белтъците, а на разграждането на един от нуклеотидите (аденин). Идентифицирането на ДНК като трансформиращ агент е потвърдено с директното ѝ инактивиране с дезоксирибонуклеаза, ензим наскоро преди това изолиран в Института „Рокфелер“. Въпреки всичко, тези потвърждения и подобрения на опита на Ейвъри не разколебават поддръжниците на идеята за основната роля на белтъците в наследствените явления.

Независимо от трудностите с ДНК, от доводите на поддръжниците на белтъчната природа на гените, основното препятствие пред признанието на откритието на Ейвъри остава невъзможността да се обясни полученият резултат. В писмата на Ейвъри до брат му и доказателствата на колегите му показват, че предпазливите изводи в статията от 1944 г. , той изразява дълбокото си убеждение, че изолирания материал – трансформиращият фактор – е чист ген.

Въпреки че пневмококовата трансформация се оказва идеална система за откриване на химичната природа на гените, тя със сигурност не е пригодена за разширяване и обобщаване на този резултат, и особено за обяснението му. Трансформацията е краен отделен феномен, с медицински интерес, който се отнася само до пневмококите. През следващите години, колегите на Ейвъри показват, че трансформацията може да се прилага и при други видове. Но разпространението на този в други бактерии, например в *E. коли*, се оказва много трудно. Още повече, че наблюдаването на трансформацията в пневмококите е особено напрегнато и трудно; действително, статията на Ейвъри подчертава грижата, която е необходима за намирането на експерименталните условия, при които може да се наблюдава трансформацията. Най-интересният аспект от резултата е как точно нуклеиновата киселина може да контролира структурата на капсула, съставена от захари. Проблемът е много добре описан в доклада на Ейвъри от 1943 г. до Института „Рокфелер“: „Трансформиращият фактор и нуклеиновата киселина са химически различни. . . Първият е свързан с гена, вторият с продукт на гена, който е получен от ензимен синтез.”

В модела си Ейвъри не би могъл да избегне етап, включващ ензим или белтък. Остава да разбере как нуклеиновата киселина, която се счита за съединение без специфичност – може да контролира белтъчната активност или по-точно ензимите, отговорни за синтеза на капсулата. Привържениците на протеиновата теория на гените нямат този проблем. За тях било лесно да обяснят как протеините (гените) могат да контролират активността на други протеини, и оттам как нуклеиновата киселина може да контролира ензимите. Или поне така са смятали.

Трябвало да се преодолеят две препятствия, за да се покаже убедително ролята на ДНК като съставна част на гените. Противно на очакванията, не е трябвало да се чака появяването на идеята за генетичен код. Всъщност идеята е въведена постепенно, много по-късно, след откриването на двойно-спиралната структура на ДНК от Джейм Уотсън и Франсис Крик през 1953 г. В действителност, тя реално е приета през 1961 г., когато е дешифриран генетичният код. Първата

необходима стъпка е разделянето на два проблема разглеждащи природата на гена и механизма му на функциониране.

За разлика от биохимичните, генетиците от дълго време са подготвени за такъв вид подход към проблема. Дори повече от генетиците, физиците виждат генетиката като информационен трансфер, а генът като преносител на информация. Това прозрение в действителност е резултат от липсата на разбирането и отчаянието им, когато се сблъскват с на пръв поглед ирационално сложната биохимия. Физиците са в състояние да подхождат към проблема от друг ъгъл и с абстрактно понятие към спецификата от биохимични и протеинови конотации. Те отдалечават гена от действието му в клетката и оставят свободата за търсене на друг вид взаимодействие между гените и белтъците, различни от директните белтък-белтъчни взаимодействия.

Този различен подход за разглеждане на ролята на гените изисква прилагането на нова експериментална система, в която по-основно да се изучава преносът и репликацията на гените, отколкото характеризиранието на функциите им. Тази система би могла да бъде свързана с изучаването на растителни или животински вируси; такава се оказва бактериофагът, изцяло нова експериментална система, описана в следващата глава.

Това ново виждане за ролята на гените спомага за постепенното отхвърляне на идеята, че гените контролират по непряк начин, като катализатори, функционирането на организмите, в полза на сегашния модел на молекулярната биология, според който гените определят до най-малкия химичен детайл развитието и функционирането на живите организми.

Изследването на Ейвъри е трудно прието от съвременниците му, и още по-трудно интерпретирано. Макар че опитът е добре познат, той не провокира очакваната концептуална революция.

Ейвъри може би не е праволинеен в изследванията си, както би могъл да бъде. Между 1937 г. и 1940 г., заедно с няколко негови колеги, за кратко обръща гръб на трансформацията. Никола Ръсел даже предполага, че благодарение на откритието на сулфонамидите (което обезсмисля предишните изследвания на Ейвъри за производство на противокочкова ваксина), го кара да посвети цялото си време през последните години на научната си кариера на изучаване на трансформиращия фактор. С подготовка и личен темперамент, Ейвъри е по-подходящ за решаването на определени проблеми, отколкото за определянето на дългосрочни програми за научни изследвания.

Въпреки всичко, не трябва да се твърди, че работата на Ейвъри не оказва влияние върху понататъшното развитие на молекулярната биология. Всъщност несъвместимостта между резултатите на Ейвъри и тетрауклеотидния модел на Левин, заинтригуват Ъруин Чаргаф, американски биохимик от австрийски произход. Чаргаф повтаря експерименталните изследвания, на които е базиран модела на Левин, и да определи с голяма точност процента на четирите нуклеотида в извлечената от различни организми ДНК.

Данните на Чаргаф са важни от различни гледни точки. Чаргаф показва, че съотношението между четирите нуклеотида е променливо според изучавания организъм, като по този начин отстранява основна пречка в представата за генетичната роля на ДНК. Освен това, в подобно

изследване Чаргаф разделя нуклеотидите чрез високо чувствителна хроматографска техника, която има разнообразни приложения в по-нататъшните анализи в молекулярната биология. И накрая, той намира известна подреденост в съотношението на четирите нуклеотида и четирите бази, които ги изграждат. Във всички проби ДНК, които изучава, той установява, че количеството на аденина и тимина е еднакво с това на гуанина и цитозина. Този резултат е познат като правилото на Чаргаф, и както ще видим по-нататък, то изиграва важна роля в откриването на двойно-спиралната структура на ДНК.

Н. V. Wyatt показва, че „фаговата група” проявява интерес към резултатите на Ейвъри, и това че някои членове на групата се опитват да ги повторят. За други, това просто означава, че приемат по-сериозно хипотезата, че ДНК е основен елемент при възпроизвеждането на бактериофага.

Накрая, и може би най-важното е, че експериментът на Ейвъри е първият, който разклаща убеждението на много биохимици и генетици, че гените са белтъци. И въпреки че не успява да ги убеди, че гените са изградени от ДНК, той посочва изход и начертава нова насока на научното търсене, която бъдещето трябва да прокара.