

ВІДКРИТТЯ МЕХАНІЗМІВ БІОЛОГІЧНОГО СИНТЕЗУ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ: НОБЕЛІВСЬКІ ЛАУРЕАТИ 1959 р. С. ОЧОА І А. КОРНБЕРГ

О. П. МАТИШЕВСЬКА, В. М. ДАНИЛОВА, С. В. КОМІСАРЕНКО

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: matysh@yahoo.com*

Отримано: 12 вересня 2020; **Затверджено:** 17 грудня 2020

Поряд з хімічними і фізичними дослідженнями нуклеїнових кислот в 40–50-ті роки ХХ ст. проводились дослідження механізмів їх біосинтезу. Так, Северо Очоа і Артур Корнберг були удостоєні Нобелівської премії в галузі фізіології і медицини у 1959 році за відкриття механізмів біологічного синтезу РНК і ДНК. Здійснені Очоа і Корнбергом експерименти сьогодні вважають наріжним каменем генної інженерії, тому що вони вперше продемонстрували можливість синтезу РНК та ДНК поза живою клітиною і тому, що відкриті ними ензими, були одними з перших інструментаріїв цієї технології.

Ключові слова: Северо Очоа, Артур Корнберг, РНК, ДНК, ензими, полінуклеотидфосфорилаза, ДНК-полімераза I, ДНК-лігаза, реплікація.

Поряд із хімічними і фізичними дослідженнями нуклеїнових кислот в 40–50-ті роки ХХ ст. проводились дослідження, метою яких було висвітлення механізмів їх біосинтезу. В 1946 р. у Нью-Йоркському університеті зустрілися Северо Очоа – баск із Іспанії, і Артур Корнберг із Нью-Йорка; з того часу розпочалося їхнє тривале і плідне співробітництво. Очоа працював з РНК бактерій, які спричинюють оцтовокислу ферментацію, а Корнберг – з ДНК відомої бактерії *E. coli*, що живе в травному тракті людини. Вченим пощастило виявити ензими, які синтезують довгі полімерні ланцюги ДНК і РНК, за що вони й отримали Нобелівську премію. Саме про ці великі постаті і йтиметься в нашому наступному нарисі.

Нобелівську премію з фізіології й медицини 1959 року було присуджено С. Очоа та А. Корнбергу «за відкриття механізмів біологічного синтезу РНК і ДНК» (“*for their discovery of the mechanisms in the biological synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid*”) [1].

Северо Очоа



Северо Очоа (1905–1993)

Северо Очоа (ісп. *Severo Ochoa de Albornoz*) – іспано-американський біохімік, народився 25 вересня 1905 року у невеликому містечку Луарка (Іспанія) на узбережжі Атлантичного океану [2].

Він був наймолодшим із сімох синів у сім'ї адвоката Северо Мануеля та Кармен де Аль-

борнос. Сім'я не була бідною і вирізнялась «артистизмом у крові» - племінниця Северо стала знаменитою іспанською поетесою, а дядько – главою Другої республіки у вигнанні. Очоа старший помер, коли молодшому виповнилось сім років. Сім'я переїхала до Малаги, де Северо пішов спочатку до ієзуїтської, а згодом – до вищої школи. Під час навчання він захопився біологією і гістологією; його мрією стало працювати в одного з найвідоміших в Іспанії вчених – гістолога *Сантьяго Рамон-і-Кахаля* (ісп. *Santiago Ramón y Cajal*), який у 1906 р. отримав Нобелівську премію. Северо не хотів ставати медиком, але Р. Кахаль працював у Медичній школі Мадридського університету, тож Северо вступив до цього закладу. На момент вступу його кумир відійшов від науки, тому керівником Северо став учень *Кахаля Хуан Негрін* (ісп. *Juan Negrín López*), який пізніше займе посаду прем'єр-міністра Республіки.

Негрін доручив молодому вченому виділити креатинін із сечі та спробувати визначити його вміст у м'язах. Северо зумів розробити простий мікрокількісний метод визначення креатиніну. Негрін заохотив Северо читати наукові статті не лише іспанською, але й англійською, і коли той поїхав на два місяці у відрядження до Шотландії, то мав на меті не лише впровадити розроблений метод, але й вивчити англійську. По поверненні до Іспанії Северо добре говорив англійською і навіть зумів написати та подати до *Journal of Biological Chemistry* свою першу статтю, яка після незначної правки була прийнята до друку [3], розпочавши, таким чином, біохімічну кар'єру Северо Очоа.

А розбудовував Северо свою наукову кар'єру в провідних лабораторіях Німеччини, Англії, США, Іспанії, переїжджаючи від країни до країни, де оволодівав новими методами та з безпрецедентним ентузіазмом проводив дослідження.

Вивчення обміну креатину обумовило інтерес Очоа до хімії скорочення м'язів та до робіт німецького вченого *Отто Мейєргофа* (нім. *Otto Fritz Meyerhof*) присвячених фосфокреатину. Саме до нього в Інститут Кайзера Вільгельма у Німеччині Очоа їде у 1929 році для роботи над докторською дисертацією, присвяченою впливу фосфокреатину на м'язове скорочення. Молодому вченому була властива природжена здатність до вивчення мов і за час роботи в лабораторії Мейєргофа він опанував німецьку.

Повернувшись до Мадрида, С. Очоа захистив дисертацію у 1930 р. і тоді ж одружився з Кармен Гарсія. У подружжя не було дітей. У 1931 р. С. Очоа разом з дружиною відбув до Лондона, де працював у Національному Інституті медичних досліджень над своїм першим ензимом – *гліоксилазою*, водночас підтримуючи зв'язки з Мадридським університетом.

У 1935 р. Очоа був призначений на посаду директора відділу фізіології у новоствореному інституті в Мадриді. Проте через декілька місяців у країні розпочалася громадянська війна. Вчений спочатку вирішив продовжити дослідницьку роботу в лабораторії Мейєргофа, проте Німеччина у 1936 р. переживала пік нацизму. Зрештою, Очоа знайшов місце в університеті Оксфорда в Англії [4]. Тут йому вдалося довести, що окислення *пірувату* супроводжується *фосфорилуванням АМР до АТР*, що вказувало на *спряження процесів окислення і фосфорилування*. Проте, через початок Другої світової війни, оксфордський період тривав недовго. Лабораторію було використано для потреб війни і Очоа, як іноземця, було ввічливо звільнено.

Тоді вчений вирішує їхати до США і пише листа видатним вченим біохімікам Карлу і Герті Корі, які працювали на медичному факультеті Вашингтонського університету в Сант-Луїсі, з проханням його прийняти. Лабораторія Корі на той час займала провідне місце в світі в галузі дослідження ензимів, зокрема *глікогенфосфорилази* (у 1947 р. подружжю буде присуджено Нобелівську премію) [5]. Працюючи з 1940 р. у Вашингтонському університеті, Очоа набув неоціненного досвіду з виділення, очистки та вивчення властивостей ензимів.

У 1942 р. С. Очоа виповнилось 37 років і він мав рухатися далі як самостійний дослідник. Ситуація стабілізувалась, коли Очоа отримав роботу в університеті Нью-Йорка. Спочатку він працював на посаді наукового співробітника медичного факультету, потім як асистент професора біохімії (1945), професор і керівник відділу фармакології (1946), професор біохімії (з 1954) і, зрештою, деканом факультету біохімії цього університету (1954–1974). В університеті Нью-Йорка наукова кар'єра вченого набула справжнього розмаху. Саме тут на початку 1940-х він зустрівся і деякий час працював з *Артуром Корнбергом* (англ. *Arthur Kornberg*), який був на той час стажером, і саме в університеті

Нью-Йорка Северо Очоа у 1955 р. зробить своє головне відкриття – відкриття *ензиму полінуклеотидфосфорилази* [4].

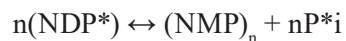
Улюбленою темою досліджень вченого у Нью-Йоркському університеті було окисне фосфорилування. Особливу зацікавленість викликав один з відкритих на той час ензимів циклу трикарбонових кислот – *сукцинілтіокіназа*. Механізм здійснюваної цим ензимом реакції субстратного фосфорилування було вивчено з використанням ADP та міченого ортофосфату $^{32}\text{PP}_i$, що лише нещодавно став доступним для біохіміків. Метод видавався дуже перспективним і Очоа вирішив застосувати його для вивчення інших реакцій, пов'язаних з фосфорилуванням.

У середині 50-х років лабораторія Очоа вже була обладнана устаткуванням, необхідним для роботи з ізотопами, тож вчений запропонував своїй новій аспірантці із Франції *Маріанні Грюнберг-Манаго* (фр. *Marianne Grunberg-Manago*), яка у 1982 р. стане першою жінкою – президентом Міжнародного біохімічного товариства, а у 1995 – першою жінкою – президентом Французької академії наук, дослідити реакції *окисного фосфорилування в бактерій із застосуванням мітки. Метою цієї роботи було вивчення включення радіоактивного ортофосфату в АТР з використанням бактеріальної ензиматичної системи як каталізатора*. Історія цього дослідження, що завершилось неочікуваними результатами, свідчить про талант й інтуїцію молодої дослідниці, яка працювала в лабораторії і ніколи раніше не займалася нуклеїновими кислотами [4].

Як виявилось, в аморфному препараті АТР, що використовувався для досліджень, містився домішок ADP і в екстрактах *Azotobacter vinilandi* дослідниця спостерігала включення міченого ортофосфату не лише в АТР, але й в ADP. Коли було використано очищений препарат АТР виробництва фірми Sigma, включення взагалі не спостерігалось, тоді як за використання лише ADP реакція обміну з ортофосфатом значно пришвидшувалась. *На основі цього факту група Очоа дійшла висновку, що у бактеріальному екстракті присутній раніше невідомий ензим, що каталізує включення мітки в ADP. У подальшому виявилось, що ензим каталізує включення ортофосфату і в інші дифосфатні нуклеотиди (UDP, CDP, GDP, IDP)*. Під час роботи з

чистим протеїновим препаратом у ході реакції виділявся фосфат, що було дивним, адже препарат був очищений від фосфатаз. Це наводило на думку, що ензим каталізує також реакцію гідролізу, у ході якої утворюється PO_4^{2-} . Хоча зворотність гідролітичної реакції здавалась неможливою, насправді це було саме так. Маріанна Грюнберг-Манаго вирішила ідентифікувати інший продукт реакції методом розділення на дауексівській колонці, але їй це не вдалося, з чого вона зробила висновок, що продукт є високомолекулярною сполукою, який утримується в колонці. Дослідниця вирішила застосувати метод хроматографії на папері. Пізніше вона писала: *«...Ніколи не забуду той день, коли після розділення реакційної суміші я побачила свіжу пляму на хроматограмі і зрозуміла, що утворений продукт – полінуклеотид. Мене переповнювали емоції і я зателефонувала Очоа. Він був вкрай здивований і, звісно, втішений цим відкриттям, хоча у глибині душі все ще сподівався, що синтезований продукт має пірофосфорний зв'язок і якимось пов'язаний з окисним фосфорилуванням. Це добре ілюструє, як далеко від молекулярної біології були тодішні ензимологи...»*.

Поглибленіший аналіз показав, що ензим каталізує синтез полірибонуклеотидів з нуклеозиддифосфатів із вивільненням неорганічного фосфату, а у зворотній реакції у присутності неорганічного фосфату розщеплює РНК-подібні полімери з утворенням нуклеозиддифосфатів:



Очоа сподівався, що за умов *in vivo* ензим може брати участь у синтезі РНК і спочатку пропонував назвати його РНК-синтетазою, проте зрештою ензиму було дано назву, яка враховує зворотню реакцію фосфоролізу РНК – *полінуклеотидфосфорилаза*.

Зараз із досліджень багатьох вчених стало зрозумілим, що *полінуклеотидфосфорилаза* бере участь у розщепленні РНК, видаляючи інформаційну РНК та забезпечуючи попередниками синтез РНК і ДНК.

У 1955 р. за допомогою *полінуклеотидфосфорилази* та з використанням суміші аденозин-, уридин-, цитозин- та гуанозиндифосфатів у лабораторії Очоа було синтезовано РНК-подібний полімер, нуклеозидні одиниці якого були зв'язані 3,5'-фосфодіефірними містками, а константа седиментації та молекулярна

маса були подібними до таких натуральної РНК. Для ініціації синтезу РНК необхідно було додати в розчин невелику кількість олігомеру – тоді відбувалось нарощування ланцюга. Для підтвердження факту відкриття нового ензиму знадобилася низка публікацій у найпрестижніших виданнях упродовж 1955–1956 рр. [6].

Ця робота викликала неабиякий інтерес, адже це був перший випадок позаклітинного синтезу РНК-подібної високополімерної сполуки. Відкриття полінуклеотидфосфорилази спонукало біохіміків в усьому світі вивчати не лише проміжний метаболізм і окисне фосфорилування, але й синтез нуклеїнових кислот та протеїнів. Так розпочинався новий період розвитку біохімії – період становлення молекулярної біології.

Через два роки учень Очоа Артур Корнберг виділив із бактерії *E. coli* ензим ДНК-полімеразу і з його допомогою здійснив синтез ДНК. У 1959 р. обом вченим було присуджено Нобелівську премію. На церемонії вручення нагороди в Стокгольмі Очоа назвав Корнберга «своїм крацим студентом».

Восени 1961 р. Ніренберг (англ. *Marshall Warren Nirenberg*) та його колега Матеї (нім. *Heinrich Matthaei*), використавши для трансляції екстракт кишкової палички та синтезовану за методом Очоа РНК, що містила лише залишки урацилу, показали, що синтезований пептид складається лише із залишків фенілаланіну. Так вперше було встановлено значення триплетного коду: кодон *UUU* кодує фенілаланін [7].

Стало зрозумілим, що відкриваються великі можливості для експериментів із вивчення генетичного коду. Між лабораторіями Очоа і Ніренберга наступними місяцями почалися перегони з дослідження залежності між складом штучної РНК та вмістом включених до синтезованого поліпептиду амінокислот. Очоа особисто здійснював цей проект і технічні ресурси факультету були повністю кинуті на синтез за допомогою полінуклеотидфосфорилази як найбільшої кількості РНК-подібних полімерів, необхідних для роботи з декодування.

Поступово в лабораторії Северо Очоа було показано, що поліаденілова РНК (AAA...) транслюється в полілізиновий пептид, а на матриці поліцитозинової РНК (CCC...) синтезується пептид, що складається лише

із залишків проліну. Усього за допомогою різноманітних кополімерів вдалося розшифрувати триплетний код для 11 амінокислот. Використовуючи полінуклеотиди, що починалися з кодону ініціації AUG, Очоа визначив, що зчитування відбувається в напрямку 5'→3', а одним із кінцевих кодонів є UAA [8, 9].

Таким чином, вперше у тестовій системі вдалося синтезувати РНК з відомою послідовністю азотистих основ та протеїнові молекули з відповідними амінокислотними залишками. Це було першим в історії біохімії досягненням, яке дозволило вченим у подальшому розшифрувати роль генетичного коду в синтезі протеїнів у клітині, що ще в 30-х роках передбачав у своїй класичній роботі видатний фізик-теоретик Ервін Шредінгер [10].

На початку 1970-х предметом досліджень Северо Очоа стає процес ініціації трансляції в еукаріот та роль у цьому процесі протеїну eIF2B, який каталізує обмін між GTP и GDP [11].

Влітку 1974 р. 69-річний Очоа залишає крісло декана біохімічного факультету Нью-Йоркського університету і приєднується до роботи в Інституті молекулярної біології Рош у Натлі (штат Нью Джерсі, США), де до 1985 року продовжує дослідження ролі фосфорилування в процесі ініціації трансляції.

У 1985 р. Очоа з дружиною повернулись до Іспанії, де вчений продовжив працювати почесним директором Центру молекулярної біології при Мадридському університеті. Центр був заснований за його ініціативи і на сьогодні є одним з провідних центрів молекулярної біології.

Смерть дружини Кармен у 1986 р. спустошила вченого. Адже саме Кармен підтримувала баланс між його напруженою роботою і дозволям – відвідуванням концертів, художніх виставок, театрів.

Северо Очоа помер від пневмонії у 1993 році в Мадриді; похований у місті Луарка, де народився, а присвячену Очоа як члену Королівського товариства біографію-некролог написала його вірна учениця Маріанна Грюнберг-Манаго, та сама Грюнберг-Манаго, чиїми руками Очоа зробив перший крок до своєї Нобелівської премії [12].

Маючи громадянство США з 1956 р. і насолоджуючись життям у цій країні, Северо Очоа зберіг особливу любов до Іспанії, своєї Батьківщини (практично, в його групі завжди

працював іспанець). І ця любов, безумовно, була взаємною. Він був одним з найвідоміших людей у своїй країні, хоча і жив переважно за кордоном. Його зображення є в музеї воскових фігур у Барселоні, а в більшості іспанських міст є вулиця, названа його ім'ям; його портрет можна побачити в ресторані у Мадриді, який він любив відвідувати; у Валенсії є його музей, створений його колегою Сантьяго Гризолія. Очоа надавав імпульс кар'єрам багатьох своїх талановитих студентів, починаючи з Артура Корнберга і закінчуючи Чарльзом Вайсманом; багато його учнів стали видатними вченими.

В Очоа завжди були аристократичні манери і поведінка європейського джентельмена, він дуже рідко бував напружений, але завжди був непорушним у конфліктах, що виникали під час інтерпретації результатів, написанні статей та визначенні пріоритетів авторів. Як усякий патріарх, він засмучувався, коли кращі студенти і співробітники вилітали з-під його крила у самотійне незалежне життя.

Окрім Нобелівської премії за 1959 рік, Северо Очоа отримав багато інших нагород. Він був членом Американської національної академії наук, Американської академії наук і мистецтв, іноземним членом Лондонського королівського товариства, іноземним членом Академії наук СРСР, президентом Міжнародного товариства біохіміків у 1961–1967 рр. У нього було 36 почесних докторських ступенів і понад ста медалей [12].

Артур Корнберг

Артур Корнберг (англ. *Arthur Kornberg*) – американський біохімік, народився 3 березня 1918 у Брукліні, Нью-Йорк, США. Він був молодшим із трьох дітей в сім'ї Джозефа Корнберга та Лені Кац, які походили з польської Галіції і володіли невеликим магазином товарів для дому. Артур був дуже розвиненою дитиною, він закінчив середню школу в 15 років, а в 1933 р. вступив до Сіті-коледжу в Нью-Йорку, проте особливо не цікавився наукою чи світом природи і не мріяв про кар'єру в цій сфері. На вибір майбутньої спеціальності вплинула Велика депресія – перспективним вибором видавалась медична школа. За успіхи в навчанні його у 1937 р. прийняли до Школи медицини Університету Рочестера. У 1941 р. Артур Корнберг став доктором медицини. У медичній школі



Артур Корнберг (1918–2007)

Корнберг провів невелике дослідження хвороби печінки, що супроводжувалась накопиченням білірубіну в крові і легкою формою жовтяниці, яка відома сьогодні як синдром Жільбера. Цю хворобу він переніс особисто [13].

Із початком Другої світової війни Корнберга як медика надсилають на фронт. Він служив лікарем на кораблі берегової охорони США у Карибському морі і мав залишатись на морі до кінця війни. Проте його кар'єра несподівано змінилась. У 1942 р. йому вдалося опублікувати свою першу медичну статтю, присвячену результатам дослідження хвороби печінки, яке він провів під час навчання в медичній школі. Сталося так, що саме на момент цієї публікації керівництво Національних інститутів здоров'я (НИН) США терміново шукало нові відомості про жовтяницю через її спалах у військах, спричинений новою вакциною проти жовтої лихоманки. Завдяки цьому восени 1942 р. Корнберга було відізвано з військової служби і призначено на посаду дослідника в Лабораторію харчування НИН [14].

Першим проектом Корнберга було вивчення механізмів дії нещодавно синтезованих сульфаніламідних антибіотиків, які спричиняли в щурів вітамінну нестачу та смертельні хвороби крові. Корнберг з колегами встановили, що сульфаніламідні препарати за структурою дуже схожі на параамінобензойну кислоту, ключовий компонент фолієвої кислоти і конкурують з нею за ензим синтезу фолієвої кислоти, тим самим попереджаючи її продукування кишковими бактеріями та негативно впливаючи на самі бактерії. Оскільки бактерії продуку-

ють необхідний для згортання крові вітамін К, сульфаніламідні препарати спричиняли дефіцит цього вітаміну в шурів.

У 1945 р. Корнберг зацікавився не так відкриттям нових вітамінів, як механізмами їх функціонування, адже багато вітамінів функціонують як компоненти ензимів (коензими). Його особливо цікавили ензими, що каталізують розщеплення глюкози для одержання енергії АТР. Проте вчений розумів, що для дослідження синтезу АТР необхідно оволодіти методами очистки ензимів. У 1946 р. він стажувався в Університеті Нью-Йорка, де вчився виділяти ензими під керівництвом Северо Очоа, з яким через 13 років розділить вищу наукову нагороду – Нобелівську премію. На той час ні Корнберг, ні Очоа і думки не мали про синтез ДНК і РНК у пробірці. Очоа доручив Корнбергу очистку *аконітази*, і той старанно працював над цим упродовж шести місяців [14].

У науковій долі цих Нобелівських лауреатів є ще один збіг – Корнберг проходив стажування в Університеті Вашингтона в Карла і Герті Корі у 1947 р., які отримали Нобелівську премію цього ж року за дослідження метаболізму глюкози і в яких незадовго до того стажувався сам Очоа.

Восени 1947 р. Корнберг повернувся до НІН, щоб реалізувати здобуті навички та організувати Відділ ензимів в Інституті артриту та хвороб обміну речовин. Його зацікавили ензими, що відповідають за обмін *коензиму NAD*, і він легко виділив з картоплі *нуклеотидпірофосфатазу*, яка розщеплює динуклеотид, а згодом – і *NAD-синтетазу*. Успіхи у з'ясуванні обміну *коензимів* не лише затвердили авторитет Корнберга як біохіміка, але й наштовхнули його на думку, що синтез інших складних молекул, таких як РНК і ДНК, може відбуватись подібним шляхом.

Корнберг розпочав свої дослідження синтезу нуклеїнових кислот у ті самі роки (на початку 1950-х), коли Джеймс Вотсон і Френсіс Крік намагались встановити вірогідну структуру ДНК [15, 16]. Корнберг припустив, що ДНК і РНК мають синтезуватися ензимами, які поєднують разом не фрагменти нуклеїнової кислоти, а окремі *нуклеотиди*. Тому, насамперед, треба було дослідити, як синтезуються ці будівельні блоки. Корнберг розпочав із синтезу *урацилу*, *цитозину* та *тиміну*. У цьому дослідженні він використовував дріжджі, а також нові методи радіоактивного

мічення та йонно-обмінної хроматографії для відстеження продуктів реакцій [14].

Після того, як Корнберг приступив до цієї роботи, він покинув НІН, де все більше уваги приділялось клінічним, а не фундаментальним дослідженням, і став завідувачем кафедри мікробіології Школи медицини Університету Вашингтона в Сент-Луїсі. Викладачі та наукові співробітники, які увійшли до його команди, упродовж наступних десятиріч стануть важливими учасниками дослідження синтезу ДНК поза клітиною.

Корнберг припустив, що *ймовірним попередником урацилу є оротова кислота*, яка є *карбоксильованим урацилом*. Наприкінці 1953 р. він підтвердив це припущення і показав, що першим продуктом на шляху його синтезу є *фосфорибозилпірофосфат (PRPP)*, який поєднується з оротовою кислотою з утворенням *ороторибозофосфату*. Після відщеплення CO_2 від ороторибозофосфату утворюється урацилрибозофосфат, відомий як *уридинмонофосфат*, який і є нуклеотидом. Після цього Корнберг з колегами швидко віднайшли ензими, які синтезують *цитозин*, *аденін* та *гуанін* [14].

Маючи в розпорядженні усі необхідні для синтезу нуклеотиди, Корнберг був готовий до пошуку ензимів, відповідальних за їх збирання в РНК або ДНК. У 1955 лабораторія Северо Очоа оголосила про відкриття ензиму *полінуклеотидфосфорилази*, що синтезує РНК, проте згодом з'ясувалось, що цей ензим здійснює лише нематричний синтез РНК-подібних ланцюгів. Тому Корнберг зосередився на синтезі ДНК.

Щоб віднайти необхідний ензим в екстракті клітин кишкової палички *Escherichia coli*, вчений додав до середовища АТР суміш чотирьох дезоксинуклеозитрифосфатів, з яких дТТР був мічений ^{32}P за α -фосфатною групою, зв'язаною ефірним зв'язком з 5'-гідроксильною групою дезоксирибози, а також фрагмент ДНК як праймер для ініціації синтезу ланцюга. Після інкубації радіоактивний фосфат був виявлений у складі фосфатних груп міжнуклеотидних зв'язків синтезованої високомолекулярної ДНК. Для виділення ензиму, що здійснював синтез ДНК, знадобились тривалі експерименти з міченим тимідином, а також широкий спектр методів фракціонування та очистки від інших протеїнів та ензимів, що впливають на синтез.

Зрештою, Корнбергу вдалося одержати невелику кількість високоочищеного ензиму, який він назвав *ДНК-полімеразою* (сьогодні відомою як *ДНК-полімераза I*). Очищена ДНК-полімераза каталізувала приєднання мононуклеотидних одиниць до вільного 3'-гідроксильного кінця ланцюга ДНК, тобто синтез ДНК відбувався у напрямі 5' → 3'.

Перше повідомлення про «синтез ДНК у пробірці» Корнберг опублікував у 1956 році в журналі *Biochimica et Biophysica Acta*. Воно зайняло дві сторінки і в ньому зазначалось: «Для полімеризації дТТР необхідні АТР, стійкий до нагрівання фрагмент ДНК, тимчасово названий *затравкою*, та дві фракції ензимів» (одна містила ДНК-полімеразу, інша – суміш нуклеаз та нуклеотидкіназ).

За допомогою ДНК-полімерази та ДНК із різних організмів Корнбергу вдалося упродовж року шляхом включення чотирьох дезоксирибонуклеотидів синтезувати нові комплементарні ланцюги ДНК. Результати роботи Корнберг описав у двох статтях, поданих у жовтні 1957 р. до *Journal of Biological Chemistry* (JBC). Але ці статті було відхилено, тому що один із рецензентів – Ервін Чаргафф – не сприймав молекулярної біології та був проти «втручання у гени», а редактори заперечували проти назви ДНК як продукту реакції; вони надавали перевагу громіздкому терміну «*полідезоксирибонуклеотид*», а також стверджували, що генетична активність синтезованого продукту є сумнівною. Навесні 1958 року було призначено нового редактора JBC, який негайно відкинув заперечення проти статей Корнберга і опублікував їх [17, 18]. Ці публікації про вперше здійснений синтез ДНК і стали основою для номінації на здобуття Нобелівської премії з медицини і фізіології, яку Корнберг отримав у 1959 році, розділивши її з Северо Очоа [19].

Від 1959 року Корнберг працює професором та завідувачем кафедри біохімії факультету медицини Стенфордського університету. Умови для наукової діяльності тут були оптимальними і він привів із собою більшу частину співробітників і викладачів з Вашингтонського університету. Вчений продовжив намагання синтезувати генетично активну ДНК, що виявилось набагато складнішим, ніж просто копіювати шаблон ДНК, адже будь-яке пошкодження високомолекулярної ДНК-матриці по-

значалось на її життєвій функції. Тому Корнберг розпочав роботу з найменшими з бактеріальних вірусів (фагів) ϕ 1 X174 та M13 кишкової палички. Ці віруси містили коротколанцюгові ДНК, і їхню біологічну активність було нескладно оцінити.

Корнбергу та його команді вдалося синтезувати обидві вірусні ДНК, проте вони не були кільцевими. Між тим виявилось, що саме кільцева форма ДНК є необхідною умовою інфекційності. Постає задача віднайти ензим, що здатен поєднати вільні кінці ниток ДНК разом, а також полагодити розриви ДНК. У 1967 р. п'ять різних дослідницьких груп, серед яких і група Корнберга, виявили ензим *ДНК-лігазу*. Того ж року Корнберг з використанням цього ензиму синтезував ДНК ϕ 1 X174, що за кільцевою формою, складом та інфекційністю була тотожною до ДНК із природнього вірусу. Так було здійснено першу реплікацію життєздатної ДНК вірусу.

Щоб оголосити про це досягнення Артур Корнберг і бюро новин Стенфорда організували прес-конференцію, наперед домовившись із журналістами, щоб результати не були охарактеризовані як «синтез життя у пробірці», адже вірусна ДНК є нежиттєздатною поза клітиною. Однак у той же день президент США Ліндон Джонсон, виступаючи у Смітсоновському інституті, несподівано відклав підготовлений спічрайтером текст і повідомив своїй аудиторії: «Деякі генії зі Стенфордського університету створили життя у пробірці!». Наступного дня усі газетні статті про роботу Корнберга починались з цієї заяви.

За подальшої роботи з вірусною ДНК було виявлено низку інших ензимів, задіяних у синтезі ДНК. Корнберг показав, що ДНК-полімераза не лише збирає молекули ДНК, але може руйнувати їх, здійснюючи редагування невідповідних нуклеотидів, видаляти частину нуклеотидів та здійснювати репарацію. Ці відкриття змусили деяких вчених замислитись над тим, чи дійсно ДНК-полімераза Корнберга відповідає за реплікацію ДНК. Сумнівів додало відкриття Джоном Кернсом мутантної кишкової палички, здатної нормально ділитися за відсутності цього ензиму.

З урахуванням цього на початку 1970-х років було здійснено серію досліджень, провідну роль в яких відіграв старший син

Корнберга Томас. У результаті було виявлено, що *Escherichia coli* містить різні полімерази (до п'яти), які здатні синтезувати і копіювати ДНК. Відкрита Корнбергом ДНК-полімераза (ДНК-полімераза I) брала участь у процесах редагування та репарації ДНК, інша (ДНК-полімераза III) працювала переважно на синтез ДНК. Це був триумфальний науковий дебют Томаса, талановитого віолончеліста, який лише нещодавно розпочав дослідницьку роботу після травми руки, що зашкодила його роботі на сцені.

Відкриття репаративної здатності *ДНК-полімерази I* та існування інших полімераз свідчило про те, що синтез і реплікація ДНК були набагато складнішими, ніж уявлялось. Корнберг і його Стенфордська команда повернулись до досліджень на бактеріофагах Phi X 174 і M13 і упродовж двох наступних десятиріч ретельно дослідили процеси, що відбуваються у реплікативній вилці, де два ланцюги розходяться і кожний подвоюється. Вони ідентифікували комплекс із семи різних протеїнів, які ініціювали синтез нового ланцюга ДНК та багатокомпонентний ензим, названий *ДНК-полімераза III холофермент*, який завершував збирання нової молекули ДНК.

Пізніше Корнберг писав: «... ми відкрили та застосовували реагенти, необхідні для маніпуляції з ДНК: *полімеразу* для синтезу довгих ланцюгів ДНК та заповнення пробілів, *лігазу* для з'єднання суміжних кінців, *екзонуклеазу III* для видалення фосфатних груп на кінцях ланцюга, *екзонуклеазу фага лямбда* для відщеплення одного кінця ланцюга ДНК і *термінальну трансферазу* для додавання нуклеотидів на іншому кінці ланцюга ДНК. Ці п'ять ензимів були реагентами, які уможливили створення технології рекомбінантної ДНК та генної інженерії» [19].

Через зацікавленість у придбанні вигідних патентів на рекомбінантну ДНК до Корнберга звертались біотехнологічні та фармацевтичні компанії, але їхні пропозиції було відхилено через їхню виключно комерційну спрямованість. Водночас Корнберг підтримував ідею організації Науково-дослідного інституту для створення нових терапевтичних продуктів на основі технології рекомбінантної ДНК і у 1980 р. став одним із засновників DNAX Інституту молекулярної і клітинної біології, до якого вдалося залучити найкращих молодих вчених. Згодом DNAX став частиною дослідницького

відділу Biopharma та спрямував роботу на вирішення імунологічних і онкологічних проблем. Корнберг продовжував працювати у Раді директорів компанії та допомагати у підборі персоналу.

У 1991 році, після багатьох десятиріч роботи над реплікацією ДНК, Корнберг зацікавився *неорганічними поліфосфатами* і продовжував їх дослідження до кінця життя, значно розширивши уявлення про біологічні функції цих сполук.

Артур Корнберг помер у 2007 році у віці 89 років. Упродовж своєї довгої кар'єри він опублікував понад 300 наукових робіт, монографії з реплікації ДНК, свою наукову автобіографію, інсайдерську оцінку біотехнологічної промисловості, а також дитячу книжку під назвою «*Germ stories*» з історіями, які він розповідав своїм дітям і онукам. І головне – він встиг побачити, як Нобелівську премію у 2006 р. отримував його молодший син Роджер «за дослідження молекулярних основ транскрипції в евкаріот».

Артур Корнберг був тричі одружений; у нього було троє синів: Томас – професор біохімії та біофізики в Університеті Каліфорнії в Сан-Франциско, Роджер – професор структурної біології в Стенфорді та Кеннет – архітектор і засновник фірми *Kornberg Associates*, що спеціалізується на лабораторному дизайні, та вісім онуків. Він любив подорожі, музику, теніс і цінував час, проведений із сім'єю.

Серед його особистих відзнак, окрім Нобелівської премії з фізіології та медицини (1959), слід навести членство в Національній академії наук, Королівському товаристві, Американському філософському товаристві, а також низку почесних ступенів, Національну медаль за науку (1979), нагороду Космос-клубу (1995) та інші медалі та нагороди.

Віра Корнберга в цінність фундаментальних досліджень та необхідність їх підтримки залишалися незмінними протягом усього його життя. В листі журналу SCIENCE у 1996 році він закликав до безперервного державного фінансування фундаментальних наукових досліджень: «Я можу документально підтвердити, що усі великі досягнення медицини в діагностиці, терапії та запобіганні хворобам були спричинені зацікавленістю біологів, хіміків і фізиків, інтереси яких лежали далеко від практичного застосування результатів

фундаментальних досліджень у виробництві ліків і приладів» [20]. Роботи Артура Корнберга з дослідження синтезу ДНК є яскравим прикладом того, як суто науковий інтерес, просте прагнення зрозуміти, як працюють клітинні машини і як вони можуть бути зібрані в пробірці, приводить (і вже привело) до неймовірного технічного прориву [21].

Здійснені Очоа і Корнбергом експерименти вважають нарізним каменем генної інженерії, тому що вони вперше продемонстрували можливість синтезу РНК та ДНК поза живою клітиною, і тому що відкриті ними ензими були одними з перших інструментаріїв цієї технології. Корнберга також часто називають піонером штучного синтезу життя, адже він синтезував ДНК як життєздатну молекулу з вірусу і довів її інфекційність.

THE DISCOVERY OF THE MECHANISMS OF BIOLOGICAL SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS: 1959 NOBEL LAUREATES S. OCHOA AND A. KORNBERG

O. P. Matyshevska, V. M. Danilova,
S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: matysh@yahoo.com

Alongside the chemical and physical research of nucleic acids in the 1940s-50s, the mechanisms of their biosynthesis were investigated. Thus, in 1959, Severo Ochoa and Arthur Kornberg were awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine for the discovery of the mechanisms of biological synthesis of RNA and DNA. The experiments performed by Ochoa and Kornberg are considered today the cornerstone of genetic engineering, as they first demonstrated the possibility of synthesizing RNA and DNA outside the living cell, and also as the enzymes they discovered were among the first tools of this technology.

Keywords: Severo Ochoa, Arthur Kornberg, RNA, DNA, enzymes, polynucleotide phosphorylase, DNA polymerase I, DNA ligase, replication.

References

1. Regime of access: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1959 (engl.)
2. Severo Ochoa. Regime of access: <https://indicator.ru/medicine/nobelevskie-laureaty-severo-ochoa.htm>
3. Ochoa S, Valdecasas JG. A micro method for the estimation of total creatinine in muscle. *J Biol Chem.* 1929; 81(2): 351-357.
4. Ochoa-Severo. Regime of access: https://www.krugosvet.ru/biologiya/OCHOA_SEVERO
5. Vynogradova RP, Danilova VM, Komisarenko SV. The Nobel laureates' contributions to the study of carbohydrate metabolism and its regulation. A. Harden, H. Euler-Chelpin, C. F. Cori, G. T. Cori, E. Sutherland, L. F. Leloir, H. Krebs, F. Lipmann, P. Mitchell. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(1): 135-163.
6. Grunberg-Manago M, Ochoa S. Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides; polynucleotide phosphorylase. *J Amer Chem Soc.* 1955; 77: 3615-3166.
7. Nirenberg MW, Matthaei HJ. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1961; 47(10): 1588-1602.
8. Salas M, Smith MA, Stanley WM Jr, Wahba AJ, Ochoa S. Direction of reading of the genetic message. *J Biol Chem.* 1965; 240(10): 3988-3995.
9. Last JA, Stanley WM Jr, Salas M, Hille MB, Wahba AJ, Ochoa S. Translation of the genetic message, IV. UAA as a chain termination codon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1967; 57(4): 1062-1067.
10. Danylova TV, Komisarenko SV. Nobel prize winner Erwin Schrödinger: the physicist, philosopher, and godfather of molecular biology and genetics. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(3): 93-100.
11. Zasloff S, Ochoa S. Polypeptide chain initiation in eukaryotes. IV. Purification and properties of supernatant initiation factor from *Artemia salina* embryos. *J Mol Biol.* 1973; 73(1): 65-76.
12. Severo Ochoa. Regime of access: https://ru.wikipedia.org/wiki/Severo_Ochoa
13. Arthur Kornberg. Regime of access: https://uk.wikipedia.org/wiki/Arthur_Kornberg
14. Kornberg, Arthur. Regime of access: https://ru.wikipedia.org/wiki/Kornberg,_Arthur
15. Danylova TV, Komisarenko SV. Standing on the shoulders of giants: James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin and the birth of molecular biology. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(4): 154-164.
16. Matyshevska OP, Danilova VM, Komisarenko SV. The discovery of the DNA double helix, or the revolution that ushered in the era of molecular biology (Nobel Prize 1962). *Ukr Biochem J.* 2020; 92(6): 183-198.

17. Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1958; 233(1): 163-170.
18. Bessman MJ, Lehman IR, Simms ES, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *J Biol Chem*. 1958; 233(1): 171-177.
19. Kornberg A. Regime of access: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1959kornberg/biographical/>
20. Ianniello L, Burk M, Kornberg A. Funding Basic Research. *Science*. 1996; 273(5277): 857a-861.
21. Burgers PM. Arthur Kornberg (1918-2007). *Mol Cell*. 2007; 28(4): 530-532.