

THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.212+577.216

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj93.06.139>

РОЗШИФРУВАННЯ ГЕНЕТИЧНОГО КОДУ – НОВИЙ РЕВОЛЮЦІЙНИЙ ЕТАП РОЗВИТКУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ: ЛАУРЕАТИ НОБЕЛІВСЬКОЇ ПРЕМІЇ М. В. НІРЕНБЕРГ, Г. Г. КОРАНА, Р. В. ГОЛЛІ, 1968 р.

О. П. МАТИШЕВСЬКА[✉], В. М. ДАНИЛОВА, С. В. КОМІСАРЕНКО

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

Отримано: 28 жовтня 2021; Затверджено: 12 листопада 2021

*«Генетичний код є квінтесенцією людства
і буде актуальним, доки існують люди».*

Майкл Декстер,
керівник британської частини міжнародного
проекту HGP (Human Genom Project)

У статті представлено біографічні дані М. Нirenберга, Г. Корани, Р. Голлі – лауреатів Нобелівської премії з фізіології і медицини 1968 року, історію зроблених цими вченими відкриттів. Докладно обговорюються методичні підходи, використані в їхній роботі. Завдяки роботам М. Нirenберга та Г. Корани було розшифровано нуклеотидний склад усіх триплетних кодонів мРНК; Г. Корана вперше експериментально довів безпосередній зв'язок між нуклеотидною послідовністю ДНК та амінокислотною послідовністю синтезованого протеїну, а також здійснив синтез штучного гена. Р. Голлі вперше повністю розшифрував послідовність транспортної РНК, встановив її вторинну структуру та роль у синтезі протеїнів на рибосомі. Присуджена вченим Нобелівська премія стала визнанням їхнього внеску в розуміння механізмів кодування і зчитування генетичної інформації та знаменувала новий проривний етап розвитку молекулярної біології.

Ключові слова: М. Нirenберг, Г. Корана, Р. Голлі, генетичний код, ДНК, триплетний кодон, мРНК, рибосоми, ензими, синтез протеїнів.

На початку розповіді коротко нагадаємо основні віхи бурхливого розвитку молекулярної біології в другій половині ХХ сторіччя. У 1953 році Джеймс Вотсон та Френсіс Крік, ґрунтуючись на даних здійсненого Морісом Вілкінсом та Розалінд Франклін рентгеноструктурного аналізу, продемонстрували структуру подвійної спіралі ДНК [1, 2]. Френсіс Крік припустив існування матричної РНК та адаптерних молекул, що за-

безпечують відповідність послідовностей мРНК амінокислотному складу майбутнього протеїну. Існування матричної РНК було підтверджено роботами Жакоба і Моно, які встановили закономірності регуляції активності генів прокаріот [3]. За допомогою ензиму полінуклеотидфосфорилази, відкритого Северо Очоа в співробітництві з Маріанною Грюнберг-Манаго вперше поза клітиною було синтезовано РНК-подібну високополімерну сполуку з

відомою полінуклеотидною послідовністю [4]. Завдяки цим відкриттям з 1950-х років у науці закріпилось уявлення про передачу генетичної інформації від ДНК до мРНК та про синтез протеїнів на рибосомах і стало зрозумілим, що код із триплетів нуклеотидів, які відповідають певній амінокислоті у синтезованому протеїні, має міститись у мРНК. Але як зламати цей код?

Саме Ніренбергу–Корані–Голлі, цій біохіміко-генетичній трійці вчених, які працювали незалежно один від одного, вдалося експериментально розшифрувати всі літери генетичного коду, а також структуру транспортної РНК та встановити її роль у перенесенні амінокислот до рибосом під час синтезу протеїнів. І цілком закономірно, що у 1968 році усі троє отримали Нобелівську премію з фізіології та медицини із формулюванням «за розшифровку генетичного коду і його ролі в синтезі протеїнів» (*for their interpretation of the genetic code and its function in protein synthesis*).



Маршалл Ніренберг (1927-2010)

Маршалл Воррен Ніренберг (англ. *Marshall Warren Nirenberg*) народився 10 квітня 1927 року в Брукліні, найнаселенішому районі Нью-Йорка, США, в сім'ї вихідців з Російської імперії – кравця Харі Едварда Ніренберга та Мінерви Биковської. У Нью-Йорку Маршалл прожив лише десять років. Через ревматичну хворобу йому було рекомендовано змінити клімат. Сім'я переїхала до м. Орlando (Флорида), де батько працював управителем молочної фер-

ми та заснував ліберальну іудейську спільноту. У 1944 р. Маршалл вступив до університету Флориди для вивчення загальної біології та зоології. У 1952 р. він отримав ступінь магістра з таксономії та екології за дослідження флоридської мухи-веснянки. Згодом Маршалл зацікавився біохімією і почав викладати цей предмет в університеті Мічигана. У 1957 р. він захистив докторську дисертацію, присвячену поглинанню гексоз раковими клітинами та розпочав роботу в Національному інституті здоров'я (НИН) у Бетесді, продовжуючи започатковані ще в дисертації дослідження [5].

Ніренберг не мав досвіду роботи в галузі молекулярної біології, він лише відвідував вечірні курси з генетики для вчених НИН, зацікавлених міждисциплінарними дослідженнями. Власне молекулярною біологією та проблемою синтезу протеїнів він почав займатися лише у 1960 р. – за рік до свого наукового триумфу. У 1962 р. він стає керівником відділу біохімічної генетики НИН і перебуває на цій посаді упродовж усієї своєї наукової кар'єри.

М. Ніренберг поставив за мету з'ясувати роль РНК як месенджера між ДНК та протеїнами. Як модель для дослідження він обрав безклітинну систему, що була отримана після руйнування клітин кишкової палички *Escherichia coli* і містила ДНК, РНК, рибосоми та ензими, необхідні для синтезу протеїнів. На його думку, така система надавала багато можливостей для вирішення питань щодо потоку інформації від нуклеїнової кислоти до протеїну і тому впродовж двох років він вивчав властивості цієї системи, зокрема оптимальні умови синтезу протеїнів, вплив нуклеїнових кислот та інших факторів на швидкість цього процесу. Як з'ясувалось пізніше, безклітинна система цілком виправдала очікування вченого. Вже перші експериментальні результати, одержані з її використанням, виявились переконливими. Так, Ніренберг показав, що у разі додавання ДНК-ази включення мічених амінокислот у протеїн пригнічувалось, що переконливо доводило залежність синтезу протеїнів у безклітинній системі від ДНК як матриці.

На цьому етапі до експериментів Ніренберга приєднався молодий німецький дослідник Генріх Маттеї (*Heinrich Matthaei*). Вчені значно оптимізували умови проведення експериментів. Так, хоча відділена від рибосом РНК стимулювала включення мічених амінокислот у протеїни,

однак таке включення швидко відбувалось і без додавання РНК, тому зафіксувати РНК-залежний синтез протеїну було складно. Цю проблему дослідники вирішили, коли додали до середовища ДНКазу, що розрізала фосфодієфірні зв'язки між нуклеотидами, в такий спосіб запобігаючи синтезу мРНК із цієї ДНК. За цих умов синтез протеїнів зупинявся і поновлювався лише після додавання екзогенної матричної РНК. Окрім того, для прискорення експериментів було розроблено швидкий метод фільтрації отримуваних ^{14}C -протеїнових преципітатів.

Це дозволило оцінити специфічність та активність багатьох одержаних із різних джерел препаратів РНК як матриць для синтезу протеїнів у клітинному екстракті. Було виявлено, що РНК з дріжджів, рибосом та вірусу мозаїки тютюну дуже активно стимулювали включення до протеїну кожної з досліджуваних амінокислот.

Далі було здійснено простий, але красивий і витончений експеримент. До безклітинної системи замість природної додавали синтетичну РНК, яку було одержано за допомогою відкритого Северо Очоа ензиму полінуклеотидфосфорилази і яка містила лише один повторюваний нуклеотид – уридилову кислоту (UUUUUUUUUUUU...). Виявилось, що в разі внесення поліU жодна з перевірених амінокислот не включалась до складу синтезованого протеїну, окрім однієї – *фенілаланіну*. Кінцевим продуктом синтезу був *поліфенілаланін*.

Ці результати переконливо свідчили, що РНК є матрицею для синтезу протеїну і що *залишки U в складі поліU відповідають фенілаланіну в протеїні*.

Якщо для кодування генетичної інформації достатньо 64 комбінацій, утворюваних за поєднання 4 нуклеотидів трійками (43), то одержані Ніренбергом і Маттеї дані означали, що кодоном для фенілаланіну буде UUU. І хоча теоретично ним могли бути і UUUU, і UUUUU, перша частина «головоломки» генетичного коду знайшла своє місце. Стало зрозуміло, що *з'явився метод розшифрування* і генетичний код буде невдовзі прочитаним.

У 1961 році Ніренберг і Маттеї опублікували у *Proc Natl Acad Sci USA* свою, тепер визнану класичною, роботу: «*Залежність безклітинного*

синтезу протеїну в E. coli від природних або синтетичних полірибонуклеотидів» [6].

У тому ж році, але ще до опублікування цієї статті, Ніренберг презентував результати своїх експериментів із *полі-U* в Москві на Міжнародному біохімічному конгресі, учасником якого був і Френсіс Крік. Повідомлення Ніренберга про те, що йому вдалося (за допомогою синтетичної РНК, отриманої методом Очоа) розшифрувати перший триплет, було зустрінуте оглушними оплесками, а один молодий співробітник біохімічної лабораторії Нью-Йоркського університету негайно зателефонував своєму вчителю Северо Очоа, щоб повідомити цю надзвичайну новину.

На той час у лабораторії Очоа також проводились інтенсивні дослідження залежності між складом штучної РНК та вмістом включених до синтезованого поліпептиду амінокислот. У 1963 році було показано, що *полі-A РНК* транслюється у *полілізиновий*, а *полі-C РНК* – у *поліпроліновий* пептид. Виявилось також, що за використання *poly-G* матрична активність була відсутня [7].

Таким чином, можливий склад певних кодонів було визначено, однак кількість та послідовність розміщення основ всередині кодону залишались невідомими. Складність полягала в тому, що в разі створення РНК, що містила більше однієї основи, послідовність основ була випадковою. Так, РНК, створена за співвідношення U до C як 2:1, з високою частотою містила кодони *UCU*, *CUU*, *UUC*. У разі трансляції такої РНК рибосомами синтезувався протеїн, що містив амінокислоти *серин*, *лейцин* та *фенілаланін*, проте залишалося незрозумілим, який саме з кодонів відповідає певній амінокислоті.

Вирішенню цього питання М. Ніренберг присвятив другий етап досліджень з розшифрування генетичного коду. Використаний для цього метод ґрунтувався на експериментальних даних про те, що обов'язковим проміжним продуктом на шляху синтезу *поліфенілаланіну* є специфічна до фенілаланіну транспортна РНК (*феніл-тРНК*). Також було показано, що у відповідь на додавання *полі-U* спочатку відбувається приєднання *феніл-тРНК* до рибосом і лише потім утворюються пептидні зв'язки [8].

Ніренберг припустив, що тринуклеотиди або гексануклеотиди з відомою послідовністю також стимулюватимуть зв'язування певних C^{14} -аміноацил-тРНК із рибосомами.

Для перевірки цього припущення Ніренберг та його колега *Філіп Ледер* спочатку розробили швидкий метод відокремлення зв'язаної з рибосомами *аміноацил*-мРНК від незв'язаної. Метод ґрунтувався на пропусканні реакційної суміші через нітроцелюлозний фільтр, який пропускав вільну тРНК, але захоплював рибосоми, і якщо тРНК була зв'язаною з рибосомою, вона також залишалася на фільтрі разом із прикріпленою міченою амінокислотою. За допомогою цього методу вчені успішно продемонстрували, що тринуклеотид *AAA* стимулював зв'язування [^{14}C]лізил-тРНК з рибосомами. Також було встановлено, що тринуклеотиди *UUU*, *AAA* та *CCC* спричинюють зв'язування з рибосомами відповідно *фенілаланін*-, *лізил*- та *пролін*-тРНК [9].

Оскільки відповідні динуклеотиди не стимулювали такого зв'язування, дійшли висновку, що саме три послідовні основи у складі тРНК кодують одну амінокислоту в складі синтезованого протеїну.

Подальший план експериментів був зрозумілим: синтезувати усі 64 комбінації тринуклеотидів та з'ясувати, яка з аміноацил-тРНК після інкубації з певним тринуклеотидом зв'яжеться з рибосомами і залишиться на фільтрі. Проте, отримання чистих тринуклеотидів зі змішаними послідовностями основ, наприклад, *GUU*, було складним завданням. У новаторських дослідженнях *Ф. Ледера* було використано тринуклеотиди, одержані шляхом розщеплення довгої випадкової полі-GU панкреатичною РНК нуклеазою з подальшим розділенням тринуклеотидів методом паперової хроматографії. З'ясувалось, що *UGA*, *UGU* і *UUG* кодують амінокислоти *метіонін*, *цистеїн* та *лейцин* відповідно. Пізніше у групі Ніренберга для конструювання тринуклеотидів було використано ензими, що приєднували основи до початку або до кінця молекули динуклеотидів. Було визначено, що *UUU* і *UUC* кодують *фенілаланін*, *UCU* і *UCC* – *серин*, а *CCC* і *CCU* – *пролін*, що вказувало на надлишковість генетичного коду та його *виродженість* за третьою основою триплету.

Якщо в лабораторії Ніренберга для синтезу тринуклеотидів було використано ензиматичні методи, то група під керівництвом *Корани* досягла значного успіху в синтезі усіх 64 тринуклеотидів та олігонуклеотидів із відомою

послідовністю хімічними методами, про що йтиметься нижче.

Завдяки спільним зусиллям *М. Ніренберга* та співробітників його лабораторії у *НІН* у 1966 р. було повністю розшифровано кодони РНК для всіх 20 природних амінокислот.

Під час отримання Нобелівської премії у 1968 році свою лекцію *М. Ніренберг* розпочав такими словами: «*Генетична пам'ять зберігається в специфічних молекулах нуклеїнової кислоти. Інформація закодована в лінійній послідовності основ 4 різновидів, яка відповідає послідовності 20 амінокислот у протеїні. Передача інформації від нуклеїнової кислоти до протеїну відбувається послідовно, відповідно до коду та за порівняно простими правилами. Кожна одиниця нуклеїнової кислоти визначає вид молекули, яку слід відібрати, її положення та час події щодо попередньої події. Таким чином, нуклеїнова кислота функціонує одночасно як матриця для інших молекул і як біологічний годинник*» [10].

Після отримання Нобелівської премії Ніренберг не став «спочивати на лаврах». Він зацікавився нейробіологією. Його дослідження нейробластами було одним із перших, де було використано тканинну культури як експериментальний метод, що зараз є поширеним у нейробіології. У 1970-х Ніренберг вивчав вплив морфіну на центральну нервову систему і створив клітинну лінію нейробластами з великою кількістю морфінових рецепторів. А використавши як модель клітини сітківки курчати, вчений дослідив процес формування нервових синапсів.

Однак наприкінці 1980-х Ніренберг знову повернувся до генетики. Він зосередився на так званих гомеобоксних генах, що кодують транскрипційні фактори та контролюють програми формування органів і тканин. Результати експериментів Ніренберга щодо взаємозв'язку між активністю гомеобоксних генів та складанням частин нервової системи плодової мушки *Drosophila* мали важливе значення для прогресу в галузі нейробіології та досліджень розвитку нервової системи в людини.

Ніренберг переймався відповідальністю вчених перед суспільством, етичними та моральними аспектами досліджень з генетики. У 1998 році він підписав адресований президенту США Біллу Клінтону та членам американського конгресу лист проти клонування людини, допоки не

буде з'ясовано його безпечність для можливого застосування у профілактиці хвороб людини. У 2001 році Ніренберг підтримав направлену президентові Джорджу Бушу заяву нобелівських лауреатів про необхідність дослідження стовбурових клітин, а у 2002 році приєднався до сорока американських нобелівських лауреатів щодо підтримки терапевтичного клонування.

...А ще Ніренберг сумував за колишніми часами в науці: *«Раніше наука була зовсім іншою – набагато вільнішою. Зараз вона змалювальна. Молоді вчені борються за позиції, більші зрілі – за фінансування. Це великий тиск і вимога: ти повинен видавати, видавати і видавати результат. А в науці все не так просто. Коли розпочинаєш тему, то не знаєш, чи правильний напрям ти обрав. А зробити нічого не можеш – лише взяти низький старт та бігти. Інколи це допомагає, інколи – ні».*

Ніренберг був двічі одружений. У 1961 р. він одружився з випускницею хімічного факультету університету Ріо-де-Жанейро *Перолі Зальцман*; в 2005 р. – з *Мірною Вайсман*, професором епідеміології та психіатрії Колумбійського університету.

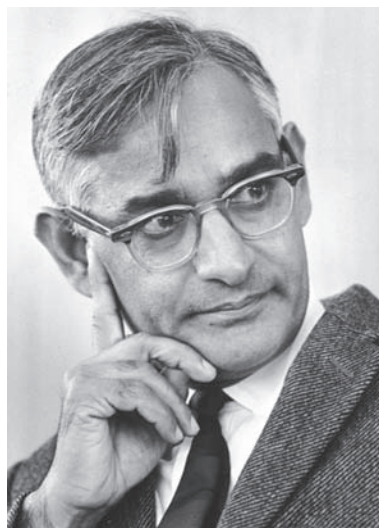
Маршалл Ніренберг помер у віці 83 років 15 січня 2010 року від раку у своїй квартирі в Нью-Йорку.

Гар Гобінд Корана

Національну належність нобелівського лауреата Гара Корани визначити непросто. Він народився в Британській Індії на території сучасного Пакистану, працював у Великій Британії, Швейцарії та Канаді, а останню половину свого життя провів у США.

Гар Гобінд Корана (англ. *Har Gobind Khorana*) народився 9 січня 1922 року в індуїстській сім'ї в селищі Райпур у Західному Пенджабі, який на той час був частиною Індії, а тепер належить Пакистану. Його батько був сільським секретарем з питань оподаткування сільського господарства в системі державного управління Британської Індії. У сім'ї було п'ятеро дітей, одна дівчинка та чотири хлопчики. Гар Гобінд був наймолодшим. Сім'я була дуже бідною, проте батько навчав своїх дітей читати та готував їх до школи. Тому діти були одними з небагатьох грамотних людей на селі.

У дитинстві Гар Гобінд прокидався рано, а щоб розпалити вогнище для приготування



Гар Гобінд Корана (1922–2011)

сніданку полював на вугілля біля будинків, з димаря яких йшов дим. Вдень звичним для нього було сидіти на сходах пошти та писати листи для неписьменних селян. Перші чотири роки навчання Гар здобував знання в сільського вчителя, сидячи під деревом, а потім навчався в середній школі у сусідньому місті Мултан. Хлопець ріс сором'язливим, проте після успішного закінчення школи наважився подати заяву на вивчення англійської літератури та хімії в Урядовому коледжі Пенджабського університету і був прийнятий. Зрештою він вирішив вивчати хімію і у 1943 р отримав ступінь бакалавра. У 1945 році Гар закінчив навчання у Пенджабському університеті і отримав не лише диплом магістра з відзнакою, а ще й стипендію від уряду Індії для здобуття ступеня PhD у Ліверпульському університеті (Велика Британія) [11].

Планувалось, що Корана вестиме дослідження у відділі інсектицидів та фунгіцидів Ліверпульського університету, проте через нестачу місць він розпочав роботу в лабораторії органічної хімії у групі під керівництвом професора Дж. С. Роджера, який не лише керував його дослідницькою роботою, але й турботливо доглядав, залучаючи до західної цивілізації та культури.

У 1948 р. за дослідження *синтезу меланіну та алкалоїдів* Корана отримав ступінь доктора філософії з хімії. Він приділяв багато часу вивченню німецької наукової літератури з органічного синтезу і зацікавився синтетичним реагентом *карбодіімідом*, який не згадувався в

англомовній літературі. Через багато років він застосує саме цей реагент у своїх революційних наукових роботах.

Вирішивши підвищити свій науковий рівень, Корана обрав німецькомовну країну і наприкінці 1948 року вирішив продовжити роботу у Вищій Технічній школі в Цюриху (Швейцарія), де працював *Володимир Прелог* – один з найвідоміших хіміків-органіків минулого століття, який вніс неоціненний вклад у розвиток стереохімії, за що спільно з Д. У. Корнфортом в 1975 році був удостоєний Нобелівської премії з хімії. Корана не мав рекомендаційного листа чи направлення, він просто зайшов до кабінету Прелога і сказав: «*Я хочу у Вас працювати, ось моя дисертація*». Вчений перегорнув сторінки автореферату докторської дисертації Корани і сказав: «*Беру, але грошей немає*». Упродовж наступних 11 місяців Корана жив у лабораторії, спав на стільцях та столах і харчувався самим рисом та молоком. Він тримався, підживлюючись любов'ю до науки та палким бажанням вчитися. Незважаючи на побутові труднощі, він налагодив тривалий творчий зв'язок з Прелогом і до кінця життя був вдячний наставнику за своє становлення як хіміка [12].

На жаль, Корані довелося перервати свій візит до Швейцарії, бо його скромні заощадження закінчувалися. У 1949 р. Гар Корана повернувся додому, щоб відпрацювати борг за попередню стипендію уряду Індії, однак вдома відбулись радикальні зміни, спричинені нещодавнім поділом Британської Індії. Індія здобула незалежність, його рідне селище відійшло до Пакистану, а велика сім'я розсіялася по різних містах. Доктору хімії довелося жити в будинку прислуги і проводити час за пошуками роботи. На щастя, уряд скасував його борг за стипендію, а на допомогу прийшла пропозиція про стипендію від Кембриджського університету. Велика сім'я Корани спільними зусиллями оплатила квиток на корабель. Так, у віці 27 років Гар повернувся до Англії.

У Кембриджі Корана досліджував реакції активації кінцевих карбоксильних груп пептидів за дії *карбодіімиду*. Це був час його перебування в Кембриджі, коли Фредерік Сенгер займався встановленням послідовності протеїнів і вперше секвенував інсулін [13], а Макс Перутц і Джон Кендрю одержали перші рентгенівські знімки міоглобіну та гемоглобіну. Ця атмосфе-

ра надихнула Корану уважніше придивитись до протеїнів і нуклеїнових кислот.

У 1952 р. до лабораторії завітав голова Дослідницької ради Британської Колумбії (Канада) з проханням порекомендувати хіміка, який би згодився переїхати до університету у Ванкувері для створення нової, поки що недостатньо облаштованої дослідницької лабораторії, проте з наданням абсолютної свободи дій. Йому запропонували кандидатуру Гара Гобінда Корани. Вчений погодився, бо найбільше цінував свободу та можливість проводити власні дослідження.

Роботу у Ванкувері Корана розпочав із синтезу ADP та АТР за допомогою *карбодіімідної реакції* і в 1954 р. опублікував одержані результати. Пізніше він синтезував усі відомі *нуклеотиди, динуклеотиди, кофактори*, а у 1960 році – *коензим А*, найскладніший з нуклеотидних кофакторів. Багато хто з відомих вчених, зокрема Пол Берг, А. Корнберг, Ю. Кеннеді відвідували лабораторію Корани, щоб навчитися в нього отримувати *карбодіімідні реагенти* [14].

Однак, на піку свого успіху Корана заявив, що його роботу в цій сфері завершено і переїхав до Віконсинського університету в Медисоні, США. Саме тут, на початку 1960-х, Корана підхопив естафету М. Ніренберга – *він хотів синтезувати ген*.

Групі Корани належало отримати всі можливі типи кодонів, необхідні для перевірки кодування 20 амінокислот. *Якщо в лабораторії Ніренберга для цього було застосовано ензиматичні методи синтезу тринуклеотидів, то Корана використав хімічні*.

Спочатку він планував синтезувати рибополінуклеотидні месенджери з повністю відомою послідовністю основ. Проте, існуючими на той час хімічними методами вдавалося синтезувати рибонуклеотиди лише з декількох одиниць, тоді як хімічний синтез дезоксирибонуклеотидів був розвиненішим і давав можливість синтезувати довші ланцюги з 10-15 нуклеотидних одиниць. Для цього Корана мав успішно вирішити такі завдання:

- активувати фосфомоноестерну групу мононуклеотиду для того, щоб забезпечити фосфорилювання гідроксильної групи іншого нуклеотиду;
- віднайти групи, придатні для захисту функціональних гідроксильних груп цукро-

вих пентозних кілець та аміногруп пуринових і піримідинових кілець;

- розробити методи поетапного синтезу дезоксиолігонуклеотидів з відомою послідовністю.

Зрештою вчений синтезував не лише 64 нуклеотиди, але й оліго- та полінуклеотиди, необхідні для розшифрування генетичної інформації.

Корана високо оцінював розроблений Ніренбергом метод розшифрування кодонів, що ґрунтувався на зв'язуванні різних аміноацил-тРНК з рибосомами у присутності специфічних синтезованих тринуклеотидів та міченої амінокислоти. Цей метод був дуже ефективним, проте, на його думку, мав певні недоліки. Так, інколи зв'язування було дуже незначним, певні нуклеотиди стимулювали зв'язування неочікуваної тРНК і, навпаки, аутентичні тринуклеотидні кодони взагалі не спричинювали зв'язування тРНК з рибосомами. Тому для розшифрування коду Корана запропонував оригінальний альтернативний метод із використанням коротких хімічно синтезованих дезоксиолігонуклеотидів з відомою послідовністю, ДНК-полімерази, РНК-полімерази та безклітинної системи синтезу поліпептидів. Він сподівався, що ензим РНК-полімераза зможе використати короткі хімічно синтезовані дезоксирибонуклеотиди як матрицю для транскрипції на зразок того, як цей ензим використовує біологічно активну ДНК і що синтезовану РНК можна буде використати для синтезу поліпептидів з відомою амінокислотою послідовністю *in vitro*. Було показано, що РНК-полімераза дійсно здатна синтезувати *рибополіаденілат* у присутності хімічно синтезованих *тимідинових олігонуклеотидів*, при цьому РНК продукт завжди був набагато довшим за матрицю і містив, принаймні, 100 нуклеотидних одиниць.

Для роботи з ДНК-полімеразою Корана відвідав лабораторію Корнберга. Під час експериментів Корана пересвідчився, що цей ензим також може використовувати дуже короткі синтетичні олігонуклеотиди з почерговим розташуванням А- та Т-основ і синтезувати dAT полімери з високою молекулярною масою [15].

Отже, як РНК-, так і ДНК-полімеразами була властива ампліфікація утворених продуктів за наявності хімічно синтезованої

дезоксиполінуклеотидної матриці. Спочатку ці результати видавались невтішними, оскільки дослідники втрачали контроль за довжиною продукту, хоча ретельно перевіряли розмір матриці. Однак пізніше з'ясувалось, що таке повторне копіювання може бути дуже корисним для ампліфікації інформації, закованої в короткому хімічно синтезованому полінуклеотиді.

Корана зазначав: «*Особливості реакцій, каталізованих ДНК-полімеразою, насправді чудові: (1) ензим забезпечує абсолютну точність відтворення послідовностей; (2) синтез екстенсивний, 50–200-кратний, а продукти мають високу молекулярну масу (від 300000 до понад 1 000000); (3) таким чином ензим підсилює та примножує інформацію, створену хімічними методами; (4) зрештою, мене як органічного хіміка найбільш задовольняє той факт, що отримані у такий спосіб полімери ДНК можна повторно використовувати для подальшого виробництва таких самих полімерів. Немає потреби повертатися до трудомісткого хімічного синтезу, щоб знову отримати матриці. ДНК-полімераза забезпечує безперервність їх послідовності*» [16].

Слід зазначити, що розроблений Кораною підхід не лише дав можливість повністю розшифрувати генетичний код, але й став основою для розробки методу *полімеразної ланцюгової реакції*, який дозволяє ампліфікувати невеликі фрагменти ДНК до мільярдів копій протягом декількох годин і широкого застосовується наразі не лише в експериментальних, але й в клінічних дослідженнях, про що йшлося в нашій попередній статті [17].

Використання у безклітинній системі синтезованих Кораною довгих полінуклеотидів із повторюваною послідовністю основ було корисним ще з однієї причини. Грубий бактеріальний екстракт, без сумніву, містив потужні *нуклеази* та *пептидази*. Тому очікувалось, що використання месенджерів з повністю визначеними та чітко повторюваними нуклеотидними послідовностями дасть можливість отримати однозначну відповідь, не зважаючи на спричинені екзо- чи ендонуклеазами пошкодження синтетичних месенджерів та на активність протеолітичних ензимів щодо синтезованих поліпептидних продуктів.

Ці обнадійливі результати і лягли в основу схеми (Рис. 1), використаної Кораною для

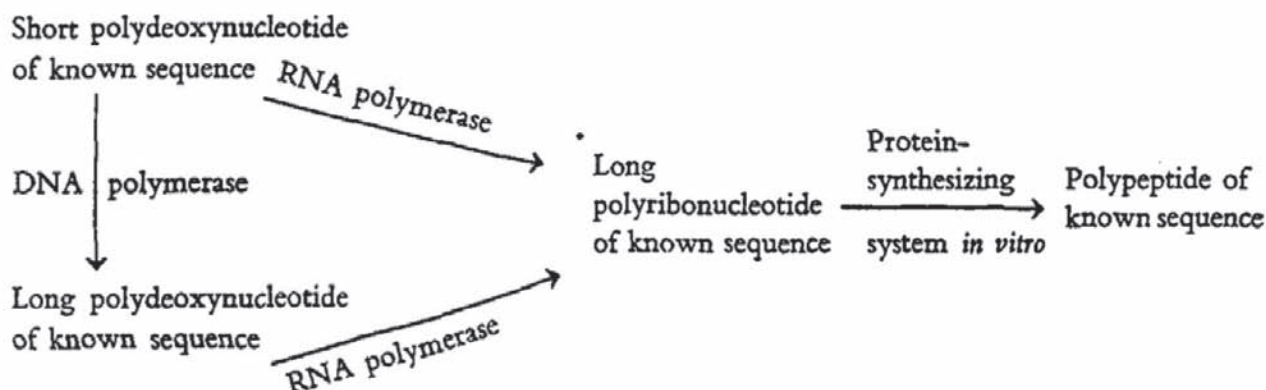


Рис. 1. Використана Кораною послідовність реакцій для отримання високомолекулярної месенджерної РНК та подальшого синтезу *in vitro* поліпептидів з відомою амінокислотною послідовністю [16]

дослідження кодування амінокислот *in vitro*. Період з весни 1963 до кінця 1967 був періодом безперервного успіху у роботі, присвяченій генетичному коду.

На початку в роботі виникали певні труднощі. Так, єдиною ДНК, що містила більш ніж один нуклеотидний залишок була вищезгадана полі-dAT. І хоча РНК-полімераза ефективно продукувала очікувану полі-rAU з двома чітко повторюваними основами, цей продукт через самокомплементарність мав щільну дволанцюгову структуру і у безклітинній системі не використовувався рибосомами як матриця для синтезу поліпептиду. Тому наступним етапом роботи стало застосування таких ДНК-подібних полімерів, транскрипція яких РНК-полімеразою дає одноланцюгові рибополінуклеотиди.

Другий момент полягав у тому, що ДНК-полімераза не могла каталізувати реакцію полімеризації за наявності лише одного ланцюга як матриці. Зрештою, використовуючи коротколанцюгові матриці, що містили три- і тетрануклеотидні послідовності, Корана домогся достатнього синтезу дволанцюгового ДНК-подібного полімеру. Окремі ланцюги такого полімеру містили дві або максимум три відмінні основи і тому, додаючи нуклеозидтрифосфати, необхідні для копіювання лише одного ланцюга, можна було обмежити дію РНК-полімерази на іншому.

Тепер можна було почати експерименти з безклітинною системою та використати синтезовані РНК-полімеразою рибополінуклеотиди з відомою послідовністю як месенджери для синтезу поліпептидів на

рибосомі. Для прикладу наведемо таке передбачення групи Корани. Полімери з повторюваною динуклеотидною послідовністю $(UC)_n$ міститимуть два триплети UCU та CUC у почерговій послідовності. Враховуючи трибуквеність та неперекривання коду слід було очікувати, що такі полімери мають забезпечити включення двох амінокислот у чітко повторюваній послідовності. Дійсно, з використанням мічених амінокислот було переконливо доведено, що за присутності полі-UC до синтезованого на рибосомах поліпептиду включаються $[^{14}C]$ -серин та $[^{14}C]$ -лейцин. Передбачалось, що полімери з повторюваною тринуклеотидною послідовністю $(ABC)_n$ залежно від стартової точки міститимуть три повторюваних триплети ABC, BCA, та CAB і у разі включення певних амінокислот у гомополіпептидні ланцюги очікувалось утворення трьох таких ланцюгів. Усі ці передбачення були повністю підтверджені експериментально. Винятком виявились два полімери – полі-rUAG та полі-rAUG, які стимулювали включення лише двох амінокислот та містили, як з'ясувалось пізніше, кодони термінації UAG та UGA.

Результати трудомістких досліджень групи Корани свідчили що:

- ДНК дійсно визначає послідовність амінокислот у протеїнах, і ця інформація передається через РНК. Отже, вперше було експериментально доведено безпосередній взаємозв'язок між послідовностями ДНК та амінокислот у протеїні.

- Генетичний код є трибуквеним і не перекривається.

Зрештою одержані результати дозволили встановити призначення кодонів для шифрування кожної з амінокислот [16].

Таблицю для виведення кодонів РНК для різних амінокислот, яка на сьогодні є загально-визнаною і відомою як карта генетичного коду, представлено на Рис. 2. Хоча її було складено для *Escherichia coli*, усі живі організми (від бактерії до людини) використовують єдиний генетичний код. Таблиця враховує традиційний спосіб запису послідовності нуклеїнових кислот: перша буква (5'-кінець) тринуклеотиду знаходиться ліворуч, а третя (3'-кінець) – праворуч від середньої основи.

		2nd base in codon				
		U	C	A	G	
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G
		3rd base in codon				

Рис. 2. Таблиця кодонів РНК [16]

Аналізуючи структуру кодонів, Корана показав, що код є виродженим, переважно за третьою основою. Так, кодонами для фенілаланіну є UUU та UUC, а для аланіну – GCU, GCC, GCA та GCG. Кодон GUG, який відповідає метіоніну, використовується також як сигнал для ініціації синтезу поліпептидного ланцюга (старт-кодон), а кодони UGA, UAA та UAG не відповідають жодній амінокислоті і використовуються для термінації синтезу (стоп кодони).

Після отримання Нобелівської премії у 1968 році за розшифрування генетичного коду Корана продовжував безперервно працювати. Недаремно про нього говорили як про людину повністю віддану науці – він не ходив у відпустку впродовж 12 років!

У 1970 році Корана став професором у Массачусетському технологічному інституті, де працював до 2007 року – до самої пенсії.

Коли у 1970 році на зустрічі біохіміків та молекулярних біологів в його рідному Університеті Вісконсин-Медісон у Корани запитали, чим він наразі зайнятий, то вчений відповів, що його група працює над синтезом гена вже впродовж п'яти років і йому нарешті вдалося отримати **ген у пробірці!**

У той час Роберт Голлі, який одержав Нобелівську премію разом з Кораною, вже встановив послідовність нуклеотидів транспортної РНК, що переносить аланін. На основі цих даних Корана намалював на папері схему структури гена (ДНК), що відповідає за синтез цієї тРНК і у 1970 році дійсно отримав перший синтетичний ген, що складався із 77 пар нуклеотидів, розташованих у послідовності, з якої зчитувалась необхідна для синтезу аланіл-тРНК інформація. Для цього спочатку було здійснено хімічний синтез фрагментів ДНК довжиною від 5 до 12 нуклеотидів, потім їх з'єднали в певному порядку за допомогою ДНК-лігази фага T4 та розмножили, використовуючи ДНК-полімеразу Корнберга. Проте, у разі введення у безклітинну систему синтезований ген аланіл-тРНК не виявляв функціональної активності, оскільки був позбавлений промоторних та термінальних ділянок. Згодом Корані вдалося синтезувати ген тирозинової тРНК кишкової палички довжиною 207 пар основ, який окрім структурної ділянки (126 нуклеотидних пар) містив необхідні регуляторні елементи [18].

Цього разу штучно синтезований ген, вбудований в геном фага T4, за введення в живу кишкову паличку виявився працездатним.

Здійснений Кораною хімічний синтез функціональних генів тРНК став безпрецедентним і неперевершеним досягненням в галузі хімічної біології та поворотним пунктом в генетиці. Ця робота поклала початок епосі рекомбінантної ДНК і лежить в основі методів збирання цілих геномів із коротколанцюгових ДНК.

Гар Гобінд Корана був одним з останніх в університеті Медісона, хто дізнався про призначення йому Нобелівської премії. У той день 1968 року він виїхав з міста до свого котеджу на березі озера без телефону та радіо, щоб писати статті. Сповістила йому цю новину його дружина Естер, яка спеціально приїхала туди.

Корана одружився з Естер Сільбер, швейцаркою за народженням, у 1952 році. Вони познайомились у 1947 році на фестивалі пива у Празі. На відміну від усіх присутніх, екзотичний індієць споживав цей напій досить стримано, чим і привернув до себе увагу жінки. На той час після багатьох років життя поза рідною країною Корана скрізь почувався не на своєму місці, ніде не почувався як вдома. Естер принесла в життя Гобінда впевненість у меті, разом з ним переїхала до Ванкувера в Канаді, стала для нього надійною опорою і підтримкою впродовж майже 50 разом прожитих років. У них було дві дочки і син. Естер познайомила Корану із західною класичною музикою, якою він захопився; їхній будинок був наповнений картинами та книгами про науку, мистецтво і філософію. Вони були дуже гостинною парою, а сам Корана завжди пишався тим, що готував і подавав гостям пенджабські делікатеси.

Корана отримав американське громадянство у 1966 році, проте ніколи не забував про свою рідну країну. На честь великого вченого Університет Вісконсин-Медісон, уряд Індії та Індо-Американський науково-технічний форум у 2007 році заснували «*Програму Корани*» для полегшення обміну студентами та аспірантами між Університетом та індійськими науковими установами.

Незважаючи на всесвітнє визнання його наукових досягнень та популярність, Корана був дуже скромною людиною з незгасимим бажанням дізнаватись нове та звичкою працювати понад 12 годин щодоби. Він любив класичну музику, природу, плавання, регулярно ходив у походи, ніколи не користувався ліфтом і, як справжній йог, ніколи нічим серйозним не хворів.

У 1979 р померла одна з доньок Корани, а у 2001 р. померла його дружина Естер Сільбер. Він залишився вдівцем з двома дорослими дітьми Джулією та Дейвом.

Гар Корана пішов із життя у віці 89 років 9 листопада 2011 року у Конкорді, штат Массачусетс [12].

Роберт Вільям Голлі

Дивлячись на обличчя Роберта Голлі не здогадаєшся, що цей хитрий і веселий очкарик – знаменитий американський біохімік і лауреат Нобелівської премії.



Роберт Голлі (1922–1993)

Роберт Вільям Голлі (англ. *Robert William Holley*) народився 22 січня 1922 р. у м. Ербана, штат Іллінойс, США. Він був одним з чотирьох синів у сім'ї шкільних вчителів Чарльза та Віоли Голлі.

Роберт вчився в загальноосвітній школі в Іллінойсі і по її закінченні у 1938 р. вступив до Університету Іллінойсу (University of Illinois) на факультет хімії. У 1942 р. він отримав ступінь бакалавра і перевівся до Університету Корнелла (Cornell University) для продовження вивчення органічної хімії та підготовки дипломної роботи. Проте навчання було перерване Другою світовою війною. Після вступу США у війну за завданням військового відомства Роберту довелося упродовж 1944–1946 років працювати в медичному коледжі Корнелльського університету у складі команди хіміків, біологів та медиків, які займалися синтезом та промисловим виробництвом *пеніциліну* – антибіотика, відкритого А. Флемінгом у 1928 р. і вкрай потрібного мільйонам поранених. По закінченні війни Роберт Голлі повернувся до виконання дипломної роботи у своєму Корнелльському університеті і у 1947 р. отримав ступінь PhD з органічної хімії. Того ж року від Американського хімічного товариства, талановитому вченому надали стипендію, завдяки чому він отримав можливість цілих два роки вести дослідження в лабораторії Вашингтонського університету [19].

У 1949 р. Голлі повернувся до Корнелльського університету, де працював на посаді доцента кафедри органічної хімії до 1957 р.

Наукові інтереси вченого не обмежувались хімічними дослідженнями, а поступово зміщувались у бік органічної хімії натуральних продуктів, а згодом до біологічних об'єктів і, врешті-решт, до проблеми біосинтезу протеїнів. У 1955 р. фонд Гуггенхайма (Solomon R. Guggenheim Foundation) надав Роберту Голлі субсидію для проведення наукових досліджень у Департаменті біології Каліфорнійського технологічного інституту (California Institute of Technology; Caltech). Тут вчений і започаткував серію експериментів, які продовжувались цілих десять років і завершилися визначенням хімічної структури РНК.

Слід зазначити, що дивовижні здібності, жвавість та наполегливість допомагали Роберту Голлі, порівняно з іншими вченими, отримувати набагато більше різних грантів і стипендій, тому процес дослідження РНК був безперервним.

У 1958 р. Голлі зайняв посаду хіміка-дослідника в лабораторії сільського господарства Департаменту США на території Корнелльського університету. Одночасно він викладав біохімію та молекулярну біологію в Корнелльському університеті. Основною темою його наукових пошуків стало дослідження транспортних РНК.

На той час завдяки роботам Ліппмана (F. Lippman) та Замечника (P. Zamechnik) було відомо, що всі активовані амінокислоти приєднуються до термінального аденозинового залишку розчинної низькомолекулярної транспортної РНК. Оскільки різні амінокислоти не конкурували за одне й те саме місце приєднання, видавалось вірогідним існування різних транспортних РНК як акцепторів різних амінокислот. Для Голлі як для хіміка існування таких РНК було інтригуючим, адже малий розмір їх дозволяв детально проаналізувати їхню структуру.

У 1964 р. Голлі став професором, а згодом завідувачем кафедри біохімії і молекулярної біології в рідному Корнелльському університеті. За три роки до цього Маршалл Ніренберг відкрив основний триплетний код матричної РНК для амінокислоти фенілаланіну. Залишалось відповісти на запитання, як за участю матричної РНК на рибосомі відбираються необхідні для синтезу протеїну амінокислоти і як вони вбудовуються в послідовність у

потрібному порядку? Натхнений успіхом Ніренберга, Голлі поставив за мету спочатку отримати високоочищену тРНК, специфічну для аланіну, а потім визначити її нуклеотидну послідовність та структуру.

Для роботи було обрано пекарські дріжджі, оскільки з них можна було отримати значну кількість транспортної РНК. Через чотири роки напруженої роботи Голлі та колегам вдалося за допомогою методу противотокового розподілу отримати препарати аланінової, тирозинової та валінової тРНК, що були відносно гомогенними та позбавленими акцепторної активності щодо інших амінокислот. Усього впродовж роботи над структурою аланінової тРНК було використано 1 г високоочищеного матеріалу, ізольованого приблизно з 200 г загальної маси РНК дріжджів, які, в свою чергу, було отримано шляхом фенольного екстрагування комерційних пекарських дріжджів у кількості 140 кг.

Група Голлі запропонувала такий алгоритм з'ясування послідовності аланінової тРНК: розщеплення ланцюга, що складався приблизно з 80 нуклеотидних залишків, на окремі невеликі фрагменти; їх ідентифікація та реконструкція вихідної послідовності шляхом визначення порядку, за яким ці фрагменти поєднуються в молекулі РНК. Як зазначав Голлі, це завдання було аналогічним до розбиття речення з 80 літер на окремі слова, визначення літер в їх складі та відбудови послідовності літер у реченні за порядком розташування слів.

Щоб отримати набір фрагментів тРНК, кожен з яких закінчувався залишком цитидилової (C-) чи уридилової (U-) кислот, команда Голлі використала рибонуклеазу підшлункової залози, а для отримання набору фрагментів, що закінчувались залишком гуанілової кислоти (G-) – рибонуклеазу T1. Окремі фрагменти ізолювали іонообмінною хроматографією та електрофорезом на папері, гідролізували лугом та ідентифікували мононуклеотиди хроматографічним, електрофоретичним та спектральними методами.

Особливо багато часу знадобилося для визначення структури великих олігонуклеотидів та для ідентифікації таких незвичних нуклеотидів, як 1-метилінозилова (*metI-*) та 5,6-дигідроуридилова (*DiHU-*) кислоти. Останній нуклеотид ніколи не траплявся в природних нуклеїнових кислотах, він не поглинав світло за

довжини хвилі 260 нм і тому був невидимим за звичайної процедури визначення нуклеотидів [20].

Проте наявність незвичних нуклеотидів та певних унікальних послідовностей дозволила виявити ділянки перекриття між двома наборами послідовностей тРНК. Так, було відомо, що в молекулі присутній лише один залишок І – і він був виявлений як у послідовності С-У-С-С-С-У-У-І фрагмента, отриманого після розщеплення рибонуклеазою Т1, так і у послідовності І-Г-С фрагмента після розщеплення панкреатичною рибонуклеазою. Обидві послідовності перекривались, що дало можливість встановити послідовність С-У-С-С-С-У-У-І-Г-С-. Наявність вільної 5'-фосфатної групи (р) на лівому кінці молекули та вільної 3'-гідроксильної групи (ОН) на її правому кінці допомогла з'ясувати, що лівий кінець аланінової транспортної РНК має послідовність рG – G-G-C-, а правий – U-C-C-A-C-C – АОН.

Зрештою, аналіз великих фрагментів дав достатньо інформації для встановлення послідовностей двох половинок молекули РНК, отриманих після розщеплення рибонуклеазою Т1, а оскільки кінцеві послідовності вже були відомі, ці половинки можна було поєднати лише в один спосіб. *Одже, наприкінці 1964 року було з'ясовано повну нуклеотидну послідовність аланінової транспортної РНК дріжджів. Результати цього багаторічного дослідження важко переоцінити, адже це була перша нуклеотидна послідовність нуклеїнової кислоти, яку вдалося повністю розшифрувати!*

Голлі згадував: «Звичайно, було дуже приємно мати можливість розв'язувати кожне експериментальне завдання по мірі виникнення і врешті-решт встановити послідовність нуклеотидів. Задоволення було тим більшим, що ми почали з відкриття аланінової тРНК і змогли перейти до її виділення та структурного аналізу» [21].

Проте Роберт Голлі не зупинився на цьому і визначення послідовності РНК було не єдиним відкриттям, зробленим вченим та його колегами. Їм вдалося встановити ще й *вторинну структуру* тРНК та з'ясувати *основний принцип взаємодії між тРНК та матричною РНК*.

Припускалось, що в структурі тРНК має міститись кодувальний триплет нуклеотидів (антикодон), експонований таким чином, щоб

він міг взаємодіяти з відповідним триплетом нуклеотидів (кодоном) у складі інформаційної РНК.

Голлі встановив, що антикодоном аланінової тРНК є послідовність І-Г-С в експонованій посередині ланцюга ділянці, де й містився зв'язок, чутливий до атаки рибонуклеазою Т1. Запропонований спосіб розташування ланцюга враховував його симетрію, а також формування як дволанцюгових ділянок спарювання А з У та Г з С згідно з моделлю Вотсона–Кріка, так і петель у неспарених ділянках. Така модель вторинної структури тРНК отримала назву «*листка конюшини*» (cloverleaf) і стала класичною (Рис. 3).

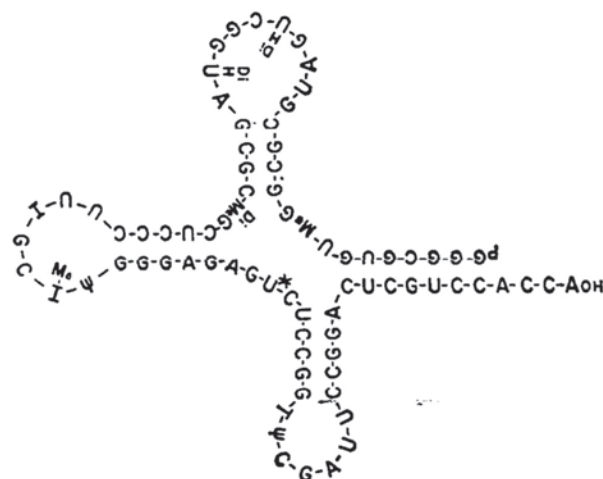


Рис. 3. Передбачувана Р. Голлі структура аланінової тРНК [21]

Згодом, даними одержаними в багатьох інших лабораторіях було підтверджено, що усім тРНК властивий саме такий тип спарювання основ, як і розміщення антикодонової послідовності в одному і тому самому положенні середньої петлі. Завдяки компліментарності антикодонової послідовності та послідовності нуклеотидів в інформаційній РНК навантажена амінокислотою транспортна РНК знаходить правильне місце взаємодії з інформаційною РНК на рибосомі і забезпечує правильне розташування амінокислот у складі протеїну, що синтезується.

Стаття Голлі зі співавторами під простою назвою «*Структура рибонуклеїнової кислоти*» була опублікована у 1965 р. в журналі Science в рубриці коротких повідомлень. Вона налічувала чотири сторінки, дві з яких були заповнені зображеннями первинної і вторинної структури тРНК.

Анотація також була короткою: «Встановлено повну нуклеотидну послідовність аланінової транспортної РНК, виділеної з дріжджів. Це перша нуклеїнова кислота, структуру якої вдалося визначити» [22]. А через три роки після цієї публікації Р. Голлі разом з М. Ніренбергом та Х. Кораною отримав Нобелівську премію.

Як і передбачав у своїх дослідженнях Роберт Голлі, подальше вивчення транспортної РНК поглибило уявлення про її структуру та функціонування. Так, було з'ясовано причину включення незвичного нуклеозиду інозину до складу антикодону аланінової тРНК та його зв'язок з виродженістю генетичного коду. Дріжджова аланіл-тРНК має антикондон GGC, який впізнає кодони GCU, GCC та GCA. Перші дві основи кодону впізнаються точно і спарюються у звичайний спосіб, а от І може спарюватись з U, C, або з A, а це означає, що інозин збільшує кількість кодонів, які здатна читувати аланінова тРНК.

Підтвердилось і передбачення Голлі про те, що нові методи дослідження, зокрема рентгеноструктурний аналіз, дозволять встановити третинну структуру транспортної РНК. На сьогодні відомо, що усі тРНК мають однакову L-подібну 3D-структуру, яка забезпечує доступ до аміноацил-тРНК- та до пептидил-тРНК-зв'язувальних ділянок рибосоми (Рис. 4).

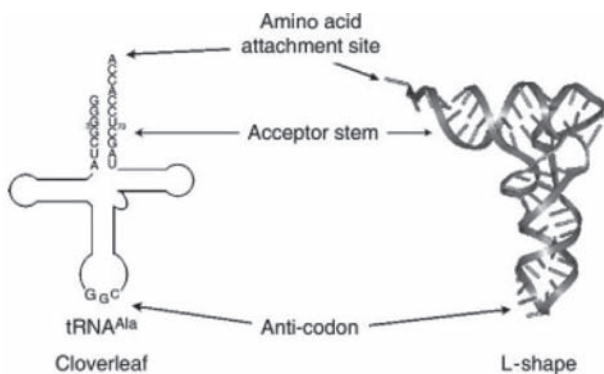


Рис. 4. Вторинна та третинна структура транспортної РНК [23]

Після отримання Нобелівської премії Роберт Голлі працював професором з молекулярної біології Американського онкологічного товариства та науковим співробітником Інституту біологічних досліджень Солка, де займався механізмами регуляції росту клітин ссавців.

У 1945 р., після війни, Голлі одружився з Анною Дворкін, вчителькою математики. У них

народився син Фредерік. Усі троє понад усе полюбляли подорожі в гори та до океану.

Помер Роберт Голлі від раку легень у 1993 році в Лос-Гатосі (США) у віці 71 рік.

Наостанок маємо ще раз наголосити, що розшифрування генетичного коду і його ролі в синтезі протеїнів було одним із найважливіших наукових досягнень ХХ століття. Присуджена М. В. Ніренбергу, Г. Г. Корані та Р. В. Голлі Нобелівська премія 1968 р. з фізіології і медицини стала визнанням їх істотного внеску в розуміння механізмів кодування і зчитування генетичної інформації та знаменувала новий стрімкий етап розвитку молекулярної біології.

BREAKING THE GENETIC CODE - A NEW REVOLUTIONARY STAGE IN THE DEVELOPMENT OF MOLECULAR BIOLOGY: 1968 NOBEL PRIZE LAUREATES M. W. NIRENBERG, H. G. KHORANA, R. W. HOLLEY

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

This review presents the life stories of M. Nirenberg, H. Khorana, and R. Holley, winners of the 1968 Nobel Prize in Physiology or Medicine, the history of the discoveries made by these scientists, and the methodological approaches used in their works. Owing to the M. Nirenberg and H. Khorana research, the nucleotide compositions of all mRNA triplet codons were decoded. H. Khorana was the first scientist to experimentally prove the direct link between the nucleotide sequence of DNA and the amino acid sequence of the synthesized protein and to obtain a synthetic gene. R. Holley was the first to completely decode the sequence of transport RNA, determine its secondary structure and role in protein synthesis on the ribosome. The Nobel Prize awarded to the scientists was a recognition of their contribution in understanding the mechanisms of coding and reading genetic information and marked a breakthrough moment in the development of molecular biology.

Key words: M. Nirenberg, H. Khoran, R. Holley, genetic code, DNA, triplet codon, tRNA, ribosomes, enzymes, protein synthesis.

References

1. 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.
2. 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.
3. Matyshevska OP, Danilova VM, Komisarenko SV. The discovery of genetic control of enzyme and virus synthesis: 1965 Nobel Prize Laureates André Lwoff, François Jacob, Jacques Monod. *Ukr Biochem J.* 2021; 93(4): 111-119.
4. Matyshevska OP, Danilova VM, Komisarenko SV. The discovery of the mechanisms of biological synthesis of nucleic acids: 1959 Nobel laureates S. Ochoa and A. Kornberg. *Ukr Biochem J.* 2021; 93(1): 129-138.
5. Marshall Warren Nirenberg. Regime of access : [https://uk.wikipedia.org/wiki/Marshall Warren Nirenberg](https://uk.wikipedia.org/wiki/Marshall_Warren_Nirenberg).
6. Nirenberg MW, Matthaei JH. 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.
7. Speyer JF, Lengyel P, Basilio C, Wahba AJ, Gardner RS, Ochoa S. Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 1963; 28: 559-567.
8. Kaji A, Kaji H. Specific interaction of soluble RNA with polyribonucleic acid induced polysomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963; 13(3): 186-192.
9. Nirenberg M, Leder P. RNA codewords and protein synthesis. The effect of trinucleotides upon the binding of sRNA to ribosomes. *Science.* 1964; 145(3639): 1399-1407.
10. Marshall W. Nirenberg. Nobel Lecture. Regime of access : <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1968/nirenberg/lecture/>
11. Har Gobind Khorana. Regime of access : [https://uk.wikipedia.org/wiki/Har Gobind Khorana](https://uk.wikipedia.org/wiki/Har_Gobind_Khorana).
12. Har Gobind Khorana. Regime of access : [https://en.wikipedia.org/wiki/Har Gobind Khorana](https://en.wikipedia.org/wiki/Har_Gobind_Khorana)
13. Danylova TV, Komisarenko SV. Double Nobel prize winner: Frederick Sanger – the father of genomics. *Ukr Biochem J.* 2021; 93(2): 116-122.
14. Professor Har Gobind Khorana. Biographical summary. Regime of access : <https://www.whatisbiotechnology.org/index.php/people/summary/Khorana>
15. Kornberg A, Bertsch LL, Jackson JF, Khorana HG. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid, XVI. Oligonucleotides as templates and the mechanism of their replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1964; 51(2): 315-323.
16. H. Gobind Khorana. Nobel Lecture. Regime of access : <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1968/khorana/lecture/>
17. Danilova VM, Matyshevska OP, Komisarenko SV. Nobel Prize laureate Kary Mullis and the polymerase chain reaction (PCR). *Ukr Biochem J.* 2021; 93(5): 122-131.
18. Khorana HG. Total synthesis of a gene. *Science.* 1979; 203(4381): 614-625.
19. Robert W. Holley. Regime of access : [https://en.wikipedia.org/wiki/Robert W. Holley](https://en.wikipedia.org/wiki/Robert_W._Holley)
20. Madison JT, Holley RW. The presence of 5,6-dihydrouridylic acid in yeast "soluble" ribonucleic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965; 18: 153-157.
21. Robert W. Holley. Nobel Lecture. Regime of access : <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1968/holley/lecture/>
22. Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, Penswick JR, Zamir A. Structure of a ribonucleic acid. *Science.* 1965; 147(3664): 1462-1465.
23. Ewalt KL, Schimmel P. tRNA synthetases. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (P. Modrich and W. J. Lennarz, eds.), Elsevier (Academic Press). 2003; 4: 263-266.