

MARTA M. GABRYELSKA, MACIEJ SZYMAŃSKI, JAN BARCISZEWSKI

DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć

DNA

Nie tylko zamiana,
nie tylko substytucja,
źródło życia,
sprawca różnorodności.

Nasze przetrwanie zawdzięczamy jego równowadze
nasze powstanie jego błędom.

Od błędu do powstania,
tajemnica ciągłości,
żywy łańcuch łączący ogniwa.

Ogniwo jest pełne wtedy i tylko wtedy,
gdy świętuje z łańcuchem.

Helisa,
dziedziczenie zawsze inne,
nigdy różne [...]
wyprawa z bycia,
do stawania się.

Suresh I.S. Rattan (*The Best Poems of 1996, The National Library of Poetry, Library of Congress, USA*)
Tłum. Ewa Tomaszewska

Wstęp

Jedną z największych tajemnic życia, która nurtowała ludzkość od zarania, jest wzrost i rozwój organizmów oraz przekazywanie cech z pokolenia na pokolenia. Starożytni filozofowie sądzili, że dziedziczenie następuje pod wpływem boskiego lub naturalnego pierwiastka, a jego wynikiem jest dostosowanie do harmonii przyrody (Arystoteles, 384-322 p.n.e.). Inni, nie dostrzegając żadnego celu w porządku rzeczywistości, twierdzili, że żyjące organizmy rosną i zmieniają się według praw deterministycznych [1]. Impulsem do poszukiwania naukowej odpowiedzi na pytania dotyczące mechanizmów zmienności organizmów i dziedziczenia było opublikowanie ponad 150 lat temu przez Charlesa Darwina pracy *O powstawaniu gatunków*, będącej fundamentem teorii ewolucji, dla której podstawą są właśnie dziedziczność i zmienność cech [2].

Za ojca genetyki uważa się Grzegorza Mendla, augustiańskiego zakonnika i naukowca, który w latach 60. XIX wieku przeprowadził obserwacje dziedziczenia cech u grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*). Wyniki tych badań doprowadziły do zdefiniowania podstawowych praw genetyki nazwanych później „prawami Mendla” [3]. Zrozumienie prawi-

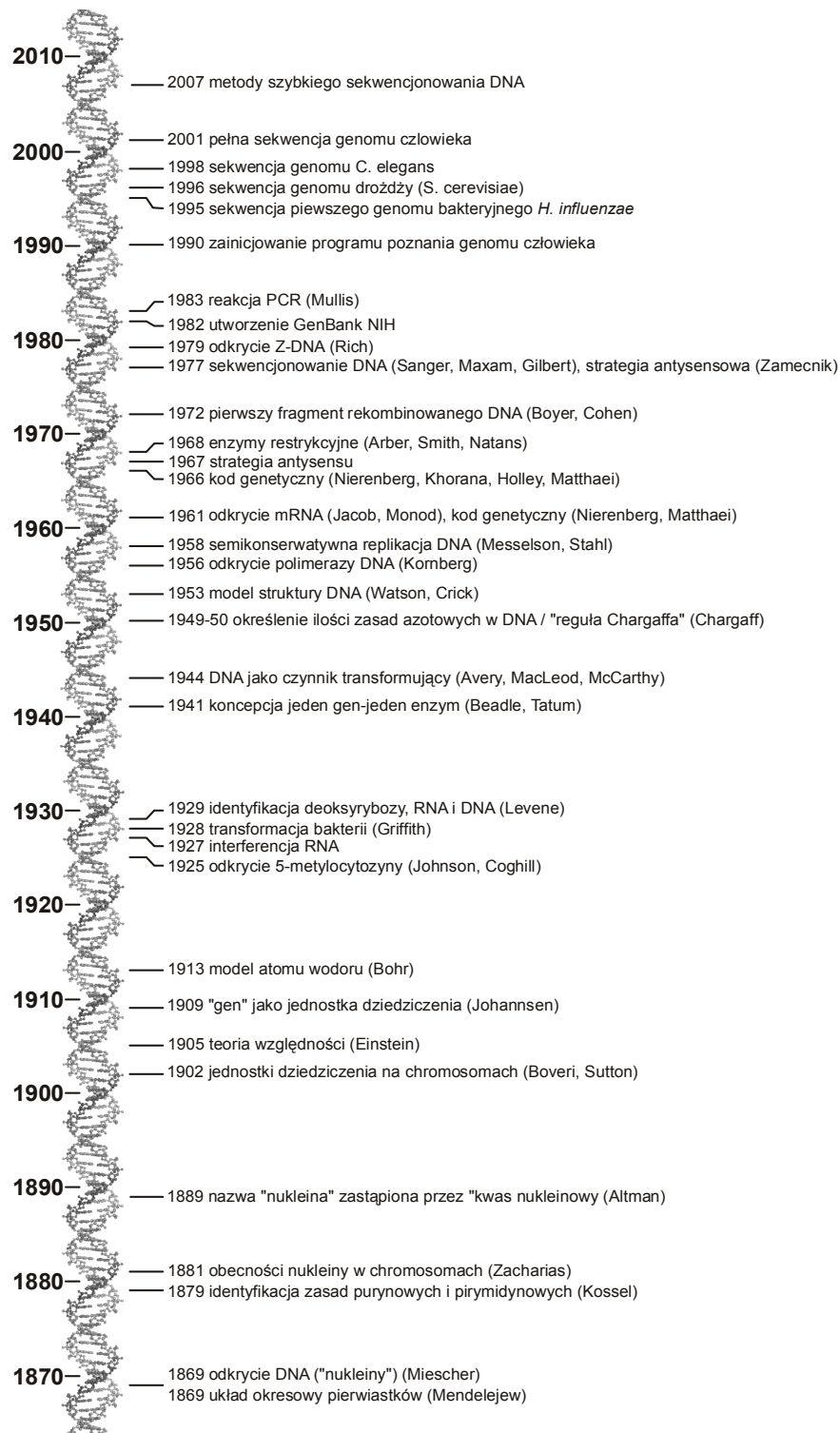
Mgr Marta M. Gabryelska, dr Maciej Szymański, prof. dr hab. Jan Barciszewski, Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

dłowości zaobserwowanych przez Mendla wymagało przyjęcia nowej jednostki dziedziczenia, dla której w 1909 roku zaproponowano termin „gen”. Zapomniane przez wiele lat „prawa Mendla” zostały ponownie odkryte niezależnie w 1900 r. przez Carla Corrensa [4], Hugo de Vriesa [5] i Ericha von Tschermaka [6]. Te przełomowe koncepcje stanowiły podstawę rozwoju współczesnej genetyki (tabela 1, ryc. 1) [7].

Tabela 1. Najważniejsze etapy w historii odkryć DNA

Data	Naukowcy	Odkrycie
1859	Ch. Darwin	Selekcja naturalna i ewolucja
1865	G. Mendel	Cechy dziedziczone są według określonych zasad („praw Mendla”)
1866	E. Haeckel	Jądro komórkowe posiada czynniki odpowiedzialne za przekazywanie cech dziedzicznych
1869	F. Miescher	Pierwsza izolacja DNA
1871	F. Miescher, F. Hoppe-Seyler, P. Plósz	Pierwsza publikacja opisująca DNA („nukleinę”)
1879	A. Kossel	Identyfikacja puryn i pirymidyn
1881	E. Zacharias	„Nukleina” jest obecna w wydłużonych strukturach (nazwanych później chromosomami) w jądrze komórkowym roślin w trakcie podziału
1882	W. Flemming	Chromosomy i ich zmienne zachowanie podczas podziału komórkowego
1884-1885	O. Hertwig, A. von Kölliker, E. Strasburger, A. Weismann	Jądro komórkowe zawiera podstawowy materiał dziedziczości
1889	R. Altman	„Nukleina” zmienia nazwę na „kwas nukleinowy”
1900	C. Correns, H. de Vries, E. von Tschermak	Ponowne odkrycie „praw Mendla”
1902	T. Boveri, W. Sutton	Jednostki dziedziczości są zlokalizowane na chromosomach
1902-1909	A. Garrod	Dziedziczne choroby metaboliczne są wynikiem defektów genetycznych powodujących utratę enzymu
1909	P. Levene W. Johannsen	Odkrycie rybozy. „Gen” – jednostka dziedziczenia
1910	T.H. Morgan	<i>Drosophila</i> modelem do badania dziedziczenia
1913	A. Sturtevant, T.H. Morgan	Pierwsza mapa sprzężenia genetycznego (for <i>Drosophila</i>)
1928	F. Griffith	„Czynnik transformujący” umożliwia przeniesienie właściwości jednej bakterii do drugiej
1929	P. Levene	Identyfikacja deoksyrybozy i nukleotydów; rozróżnienie RNA i DNA
1939	C. Waddington	Epigenetyka
1941	G. Beadle, E. Tatum	Koncepcja „Jeden gen – jeden enzym”

1944	O.T. Avery, C. MacLeod, M. McCarty	DNA jako materiał genetyczny i „czynnik transformujący” Griffitha
1949	C. Vendrely, R. Vendrely, A. Boivin	Jądro komórkowe zawiera połowę ilości DNA w porównaniu do komórek somatycznych
1949-50	E. Chargaff	Skład zasad azotowych w DNA i „reguła Chargaffa”
1952	A. Hershey, M. Chase	Podczas infekcji wirusowej DNA zostaje wprowadzony do bakterii, a białka wirusa zostają na zewnątrz. DNA znajdujący się w potomnych cząstkach wirusowych
1953	R. Franklin, M. Wilkins, J. Watson, F. Crick	Analiza rentgenowska kryształu DNA, DNA ma regularną powtarzającą się strukturę. Molekularna struktura DNA
1956	A. Kornberg	DNA polimeraza
1957	F. Crick	Centralny dogmat biologii molekularnej
1958	M. Meselson, F. Stahl	Semikonserwatywna replikacja DNA
1961-66	R.W. Holley, H.G. Khorana, H. Matthaei, M.W. Nirenberg	Kod genetyczny
1968-70	W. Arber, H. Smith, D. Nathans	Pierwsze wykorzystanie enzymów restrykcyjnych do hydrolizy DNA w specyficznych miejscach
1972	G. Khorana, P. Berg	Synteza pierwszego genu <i>in vitro</i> . Pierwszy rekombinowany fragment DNA
1973	S. Cohen, H. Boyer	Konstrukcja funkcjonalnego plazmidu <i>in vitro</i> (inżynieria genetyczna)
1977	F. Sanger, A. Maxam, W. Gilbert, E.L. Kuff	Sekwencjonowanie DNA. Strategia antysensu
1979	A. Wang	Struktura Z-DNA
1983	K. Mullis	Reakcja łańcuchowa polimerazy
1990	The International Human Genome Sequencing Consortium	Początek projektu poznania genomu człowieka
1995	C. Venter	Sekwencja nukleotydowa wolno żyjącego organizmu (<i>Haemophilus influenzae</i>)
1996	A. Goffeau	Sekwencja nukleotydowa pierwszego eukarionta (<i>S. cerevisiae</i>)
1998	The <i>C. elegans</i> Sequencing Consortium	Sekwencja nukleotydowa pierwszego organizmu wielokomórkowego (<i>C. elegans</i>)
1999	K.P. O'Brien	Sekwencja nukleotydowa chromosomu ludzkiego 22
2000	<i>Arabidopsis</i> Genome Initiative	Sekwencja nukleotydowa genomu <i>Drosophila</i> i <i>Arabidopsis</i>
2001	Celera, NIH (C. Venter, F. Collins)	Sekwencja nukleotydowa genomu człowieka
2002	Mouse Genome Sequencing Consortium	Sekwencja nukleotydowa genomu myszy
2005	American Association for Cancer Research	Warsztaty na temat epigenomu człowieka
2007	J. Rothberg, K. McKernan, J. West	Metody głębokiego sekwencjonowania

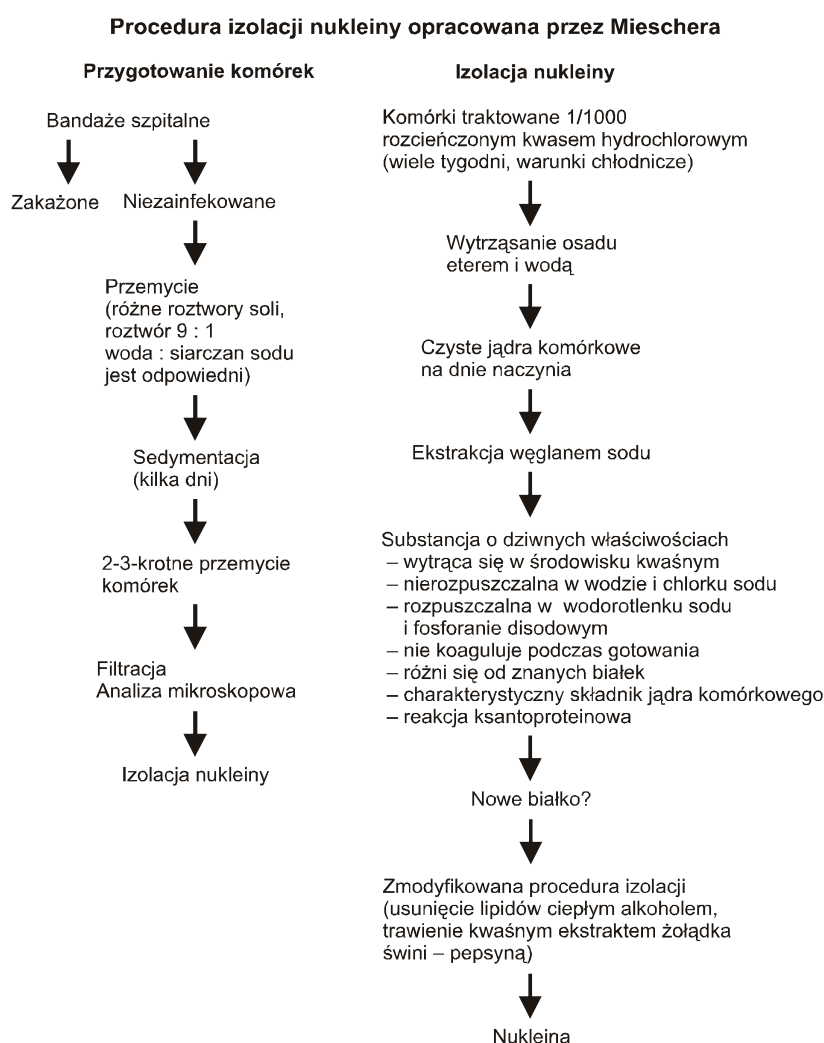


Ryc. 1. Krótka historia DNA

Kluczowe znaczenie dla zrozumienia funkcjonowania komórek miał też rozwój mikroskopii, dzięki której w 1866 roku odkryto jądro komórkowe i zrozumiano jego rolę w procesach dziedziczenia [8].

Odkrycie DNA

Friedrich Miescher urodził się w 1844 roku w Szwajcarii [9]. Jego ojciec, Johann Friedrich Miescher, i jego wuj, Wilhelm His, byli znanymi lekarzami i profesorami anatomii i fizjologii na Uniwersytecie w Bazylei [10].



Ryc. 2. Procedura izolacji nukleiny opracowana przez Mieschera. Można wyróżnić dwa etapy: przygotowanie komórek oraz izolację nukleiny poprzedzoną uzyskaniem jąder komórkowych.

Ze względu na brak odpowiedniego sprzętu, procedura wymagała wiele pracy i czasu

Miescher studiował medycynę w Bazylei, ale nie był szczególnie zainteresowany jej praktykowaniem ze względu na kłopoty ze słuchem, które utrudniały badanie pacjentów [9]. W związku z tym skoncentrował się głównie na „teoretycznych podstawach życia” i karierze naukowej. Po ukończeniu uniwersytetu przeniósł się do Tübingen w Niemczech, gdzie studiował chemię w laboratorium Adolpha Streckera, a następnie histochemię pod kierunkiem Felixa Hoppego-Seylera [10].

Miescher badał leukocyty, które łatwo można było wówczas uzyskać z ropy ze świeżych bandaży zebranych w klinice w Tübingen. Początkowo interesował się białkami, które uznawane były za najważniejsze składniki komórki. Ostatecznie z jąder komórkowych wyodrębnił substancję, która ulegała wytrąceniu w środowisku kwaśnym, nie rozpuszczała się w wodzie i chlorku sodu, ale rozpuszczała w wodorotlenku sodu i wodorofosforanie sodu [11]. W tym celu opracował własną metodę izolacji jąder komórkowych, pozwalającą uzyskać w dużych ilościach nieznaną substancję, którą nazwał „nukleina” (ryc. 2). Zasugerował, że może ona być kwasem, występującym także w innych tkankach [10].

Publikacja o izolacji nukleiny przygotowana była już w 1869 r., ale ukazała się dopiero w 1871 r. ze względu na sceptyczny do niej stosunek Hoppego-Seylera, który chciał powtórzyć eksperymenty.

DNA materiałem genetycznym

Wielu naukowych odkryć dokonano spontanicznie, tak jak w przypadku Fredericka Griffitha i transformacji genetycznej. Był on brytyjskim lekarzem wojskowym, poszukującym szczepionki na zapalenie płuc w okresie pandemii grypy hiszpanki, która zabiła blisko 50 mln ludzi pod koniec I wojny światowej [12]. Pracował on z dwoma szczepami *Streptococcus pneumoniae*: niewirulentnym szczepem R (ang. *rough*), nieposiadającym otoczki polisacharydowej oraz chorobotwórczym szczepem S (ang. *smooth*), mającym taką otoczkę [13]. Wprowadzenie do myszy szczepu S powodowało zapalenie płuc i śmierć w ciągu kilku dni, podczas gdy myszy infekowane szczepem R pozostawały zdrowe. Wiadomo było, że wysoka temperatura powoduje inaktywację bakterii. Jednakże podanie mieszaniny inaktywowanego szczepu S i normalnego szczepu R także powodowało śmierć myszy. Griffith stwierdził, że tylko bakterie szczepu S były chorobotwórcze i postulował istnienie w inaktywowanych bakteriach S „czynnika transformującego” (ang. *transforming principle*) o nieznannej naturze, dzięki któremu niewirulentne bakterie szczepu R nabierały właściwości chorobotwórczych. Ponieważ ekstrakt inaktywowanych termicznie bakterii szczepu S zawierał niemal czysty DNA, a jego zdolność do transformacji zanikała po traktowaniu DNazą, Oswald Avery wykazał, że „czynnikiem transformującym” Griffitha był DNA [14]. Dla większości biochemików trudnym do zaakceptowania był pogląd, że cząsteczka DNA może stanowić materiał genetyczny. Uważano, że geny zbudowane są z białek [15]. Przełomowe znaczenie odkryć Griffitha i Avery'ego potwierdza fakt, że zjawisko transformacji za pomocą dostarczonego z zewnątrz mate-

riału genetycznego stanowi podstawę współczesnej biologii molekularnej, inżynierii genetycznej i biotechnologii.

Kluczową rolę dla rozwoju biologii molekularnej odegrały badania nad bakteriofagami i wirusami. Wykazano, że po przyłączeniu się cząstki faga T2 do komórki bakteryjnej, większość fagowego DNA zostaje wprowadzona do komórki, pozostawiając białkowy płaszcz na zewnątrz [16]. Doświadczenia te potwierdziły, że wirusowy DNA może być czynnikiem transformującym zarówno komórki bakteryjne, jak i eukariotyczne.

Stary dobry gen

W 1906 roku William Bateson podczas konferencji poświęconej „hybrydyzacji i udokonalaniu roślin” zaproponował, żeby dział biologii zajmujący się studiowaniem dziedziczenia i zmienności nazywać genetyką [1]. Trzy lata później botanik Wilhelm Johannsen, dla ujednoczenia terminologii genetycznej, wystąpił z koncepcją „fenotypu” i „genotypu” oraz po raz pierwszy użył terminu „gen” w odniesieniu do mendlowskich czynników dziedziczenia. Zastąpił również określenie Batesona „alleomorf” słowem „allel” w odniesieniu do różnych alternatywnych form genu. Terminów tych po raz pierwszy użyto podczas Międzynarodowego Kongresu Genetycznego w Berlinie w 1927 roku [1].

Jednym z przełomowych odkryć w historii DNA było stwierdzenie przez Waltera Suttona, Theodora Boveri i Thomasa Hunta Morgana, że geny są fizycznie istniejącymi jednostkami, ułożonymi liniowo w ściśle określonych miejscach na chromosomach [18]. Morgan określił gen jako jednostkę dziedziczenia niepodzielną w procesie rekombinacji, zlokalizowaną w loci pary chromosomów homologicznych, która może ulegać mutacji i przynależy do jednostki sprzężenia [19].

Te pierwsze wyobrażenia o naturze genów uzyskane w początkowym okresie rozwoju genetyki zostały znacząco rozwinięte w wyniku rozwoju technik biologii molekularnej. Odkrycie procesów składania genów (ang. *splicing*), alternatywnego składania oraz innych elementów struktury i funkcji genu pokazało niespójność dotychczasowej definicji genu. Obecnie gen określa się jako związek sekwencji genomowych kodujących spójny zestaw potencjalnie nakładających się funkcjonalnych produktów [20].

DNA i RNA

Występowanie dwóch rodzajów kwasów nukleinowych (nazwę zaproponował R. Altman w 1889 roku) zasugerowało odkrycie przez Phoebusa Levene’a rybozy w 1909 roku i deoksyrybozy 20 lat później [21]. Na początku lat 30. XX wieku stwierdzono, że RNA i DNA wykazują różne właściwości w środowisku zasadowym i faktycznie stanowią odrębne klasy cząsteczek [22].

Odkrycie kodujących funkcji RNA wirusa mozaiki tytoniu (TMV) przypisuje się Amerykaninowi Heinzowi Fraenkel-Conratowi oraz Niemcom Alfredowi Giere i Gerhar-

dowi Schrammowi, którzy niezależnie doszli do tych samych wniosków w 1956 roku [23], chociaż już w 1948 roku Roy Markham, Kenneth Smith i Richard Matthews oczyszczili i scharakteryzowali wirus żółtej mozaiki rzepy (ang. *turnip yellow mosaic virus*, TYMV) i po raz pierwszy pokazali, że RNA decyduje o infekcyjności i zdolności do powielania się wirusa [23].

W latach 50. wykazano, że RNA ma znacznie bardziej złożoną strukturą niż DNA [24]. W 1956 roku uzyskano obraz dyfrakcyjny podwójnej helisy RNA dla zhybrydowanych nici poli(A) i poli(U) [25]. Wykazano, że RNA bierze udział w przenoszeniu informacji genetycznej z DNA do cytoplazmy i syntezie białek. W 1960 roku eksperymentalnie potwierdzono możliwość bezpośrednich oddziaływań RNA i DNA [26] oraz reasocjacji rozdzielonych w wyniku termicznej denaturacji komplementarnych nici DNA [27]. Dwadzieścia lat później określono strukturę hybrydy RNA-DNA [28]. Odkrycia te stały się podstawą nowoczesnych technik eksperymentalnych biologii molekularnej. W 1967 roku zidentyfikowano oddziaływania komplementarnych sekwencji DNA i RNA (tzw. strategia antysensowa) [29], której funkcjonalność wykazano *in vitro* 10 lat później z wykorzystaniem syntetycznych oligonukleotydów [30]. W 1960 roku Samuel Weiss wykazał, że RNA jest syntetyzowany na matrycy DNA przez polimerazę RNA, wykorzystując trifosforany rybonukleotydów, udowadniając, że sekwencje DNA i RNA są komplementarne [1]. Rok później François Jacob i Jacques Monod scharakteryzowali informacyjny RNA (ang. *messenger RNA*, mRNA) [1]. Pierwszym kwasem nukleinowym, dla którego określono sekwencję nukleotydową, był transferowy RNA specyficzny dla alaniny z drożdży [31].

Erwin Chargaff i skład zasad DNA

Pierwsze badania wykazały, że kwasy nukleinowe zawierają dwie zasady purynowe i dwie pirymidynowe w przybliżeniu w równomolarnych proporcjach [32]. Przez wiele lat uważano, że kwasy nukleinowe są małymi cząsteczkami, składającymi się z jednego powtórzenia każdego nukleotydu, tworząc tetranukleotyd [22]. Hipoteza tetranukleotydu, sformułowana w 1931 roku, stała się impulsem dla podjęcia systematycznych badań nad składem zasad w DNA przez Erwina Chargaffa [33]. Jego praca dotycząca składu zasad w DNA z różnych organizmów, oraz różnych tkanek tego samego gatunku, nie potwierdziła założeń hipotezy [22]. Zasady Chargaffa brzmiały następująco: (a) suma puryn (adeniny i guaniny) równa się sumie pirymidyn (cytozyny i tyminy), (b) stosunek molarny adeniny do tyminy równa się 1, (c) stosunek molarny guaniny do cytozyny równa się 1, (d) liczba grup 6-aminowych (adenina i cytozyna) jest równa ilości grup 6-ketownych (guanina i tymina) [37]. Arthur Mirsky w 1943 roku zauważył, że ilość puryn wydaje się być zawsze równa ilości pirymidyn (czyli $A+G = C+T$ lub $(A+G)/(C+T) = 1$) [35]. Obserwacje te zostały początkowo zignorowane przez Chargaffa, który określił je jako „bez znaczenia” czy „przypadkowe” [36]. Chargaff nie przewidział jednak komple-

mentarności zasad, kluczowej cechy DNA, która stała się podstawą zaproponowanego przez Watsona i Cricka modelu podwójnej helisy [22].

Struktura DNA i centralny dogmat biologii molekularnej

Zastosowanie dyfrakcji promieni X do badań DNA wykazało, że ma on uporządkowaną i powtarzalną strukturę. Fakt ten zachęcał do budowania modeli jego struktury [38]. Zainteresowania Jamesa Watsona cząsteczką DNA ukształtowały się pod wpływem tzw. grupy fagowej zorganizowanej przez Maxa Delbrücka i Salvadora Luria. Wbrew powszechnie obowiązującej wówczas opinii, uważali oni, że DNA może stanowić materiał genetyczny. Po wysłuchaniu wykładu Maurice'a Wilkinsa na konferencji w Neapolu w 1951 roku, Watson zdecydował się podjąć pracę w laboratorium Maxa Perutza w Cambridge, w którym wykorzystywano już techniki dyfraktometryczne do badań struktury. Pracujący w King's College w Londynie Maurice Wilkins, badając DNA w świetle spolaryzowanym, zauważył, że jego włókna zbudowane są z długich, równolegle ułożonych cząsteczek. Wilkins we współpracy z Raymondem Goslingiem uzyskał w 1950 roku pierwszy czysty obraz rozpraszania promieni X na kryształach DNA (wynik ten prezentowany był na wspomnianej konferencji w Neapolu). W styczniu 1951 roku do tego zespołu dołączyła Rosalind Franklin [39]. Miała ona duże doświadczenie w pracy z technikami dyfraktometrycznymi oraz krystalizacji DNA w komorze dyfrakcyjnej w warunkach kontrolowanej wilgotności za pomocą nasyconych roztworów soli. Umożliwiło to uzyskanie obrazów dyfrakcyjnych dwóch rodzajów DNA, nazwanych później formami A i B. W listopadzie 1951 roku Franklin na seminarium w King's College (w którym uczestniczył również Watson) na podstawie obrazów dyfrakcyjnych wskazała na możliwość struktury helikalnej DNA zbudowanej z dwóch lub trzech nici z resztami fosforanowymi na zewnątrz [39].

W styczniu 1953 roku Franklin zauważyła, że forma A-DNA może zawierać dwa, biegnące w przeciwnych kierunkach łańcuchy. W lutym tego samego roku Watson i Crick, po pierwszych nieudanych próbach, powrócili do budowy modelu DNA. W „Nature” z 25 kwietnia 1953 roku pojawiły się trzy publikacje dotyczące struktury DNA: pierwsza Watsona i Cricka [40], druga Wilkinsa, Stonesa i Wilsonsa [41], a trzecia Franklin i Goslinga [42]. Po latach Francis Crick w rozmowach z Aaronem Klugiem stwierdził, że Rosalind Franklin sama rozwiązałaby strukturę DNA, chociaż trwałoby to dłużej [39]. Za odkrycie molekularnej struktury kwasów nukleinowych Francis Crick, James Watson i Maurice Wilkins otrzymali Nagrodę Nobla w 1962 roku.

W 1957 roku na corocznym spotkaniu Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Francis Crick zaproponował hipotezę cząsteczki adaptorowej pośredniczącej w biosyn-tezie białka na rybosomach i sformułował tzw. centralny dogmat biologii molekularnej [43, 44]. Według tej hipotezy, kwasy nukleinowe są źródłem jednokierunkowego prze-

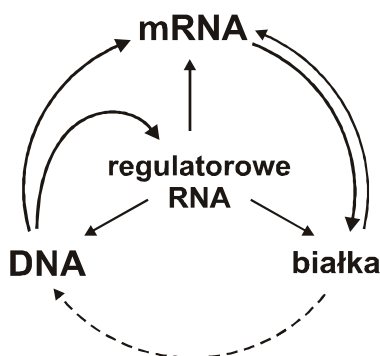
plywu informacji ostatecznie określającej białka, gdzie DNA jest matrycą do syntezy RNA, a ten do biosyntezy białka w procesie translacji (ryc. 3).

CENTRALNY DOGMAT BIOLOGII MOLEKULARNEJ

DNA → RNA → protein

Przepływ informacji genetycznej jest możliwy tylko między kwasami nukleinowymi i od kwasu nukleinowego do białka, ale nie może zachodzić między białkami i od białek do kwasów nukleinowych.

F. H. C. Crick 1958, 1970



Informacja genetyczna z DNA jest przepisywana z DNA na mRNA, zawierające instrukcje dla syntezy białek, oraz niekodujące RNA, będące elementami systemów kontroli ekspresji genów.

M. Szymański, V. A. Erdmann, J. Barciszewski 2005

Ryc. 3. Centralny dogmat biologii molekularnej sformułowany przez Francisa Cricka w 1958 roku i jego współczesna interpretacja [98]

Trzeba podkreślić, że już na początku lat 50. XX wieku postulowano kwasy nukleinowe jako matrycę do syntezy białka [45]. Interpretacja centralnego dogmatu była kwestią sporną, ponieważ ograniczono go do nakazu przepływu informacji od DNA do RNA i od RNA do białek, podczas gdy według najbardziej oczywistego rozumowania centralny dogmat jedynie zabrania pewnych form przekazywania informacji, czyli od białek do białek i od białek do kwasów nukleinowych [44]. Według Francisa Cricka można było rozróżnić trzy typy przenoszenia informacji: „mało prawdopodobny” – od białek do kwasów nukleinowych, „możliwy” – od RNA do DNA i od DNA do białek oraz „znany” (jak od DNA do RNA i dalej do białek, a także autotransfer DNA i RNA) [44]. Crick wspierał rozwijający się od lat 20. pogląd, że w procesach biologicznych centralną rolę odgrywa

gen [44]. 50 lat po pierwszym sformułowaniu centralny dogmat jest postrzegany jako jedna z przełomowych idei biologii molekularnej [44].

Arthur Kornberg – ojciec enzymologii DNA

Odkrycie w 1955 roku polimerazy DNA odpowiedzialnej za zależną od matrycy syntezę DNA było przełomowe dla rozumienia replikacji, naprawy DNA i transkrypcji [46]. Przyczyniło się także do opracowania techniki PCR i metod sekwencjonowania DNA, bez których niewyobrażalny byłby rozwój współczesnej biologii molekularnej i biotechnologii.

W 1955 roku nie było jasne, w jaki sposób syntetyzowany jest DNA w komórce. Było kwestią sporną, czy powstawał on w wyniku polimeryzacji z monomerów, czy też w wyniku przyłączania zasad do wcześniej syntetyzowanego rdzenia fosfocukrowego [46]. Arthur Kornberg pokazał, że znakowane [¹⁴C] tymidyną cząsteczki DNA były rozpuszczalne w środowisku kwaśnym po potraktowaniu DNazą. Wykorzystując tę metodę, zidentyfikowano polimerazę DNA oraz jej substraty, czyli trifosforany deoksynukleozydów (dNTP) [46]. Wyjaśniony został sposób działania enzymu, który wykorzystuje starterowe DNA i matrycę do polimeryzacji dNTP 5'–3'. Opisano również aktywność egzonukleazy 3'–5' oraz scharakteryzowano mechanizm tworzenia wiązań fosfodiesterowych [47-49].

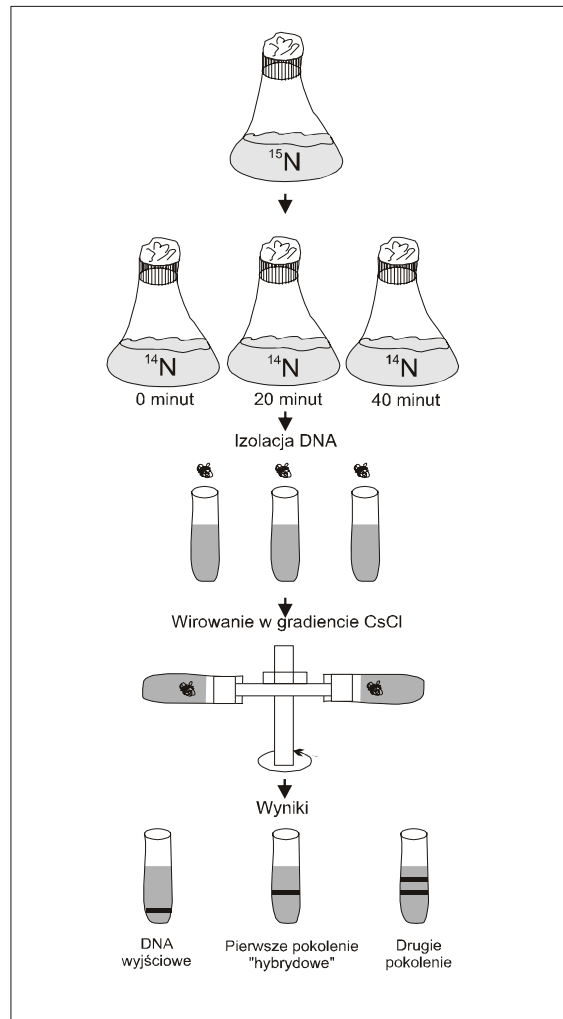
Za odkrycie i badania nad polimerazą DNA Artur Kornberg wyróżniony został w 1959 roku Nagrodą Nobla. Interesujące jest, że Kornberg jest jednym z siedmiu laureatów Nagrody Nobla, których dzieci także otrzymały to wyróżnienie. W 2006 roku, Roger Kornberg otrzymał Nagrodę Nobla za badania molekularnych podstaw transkrypcji u Eukaryota.

W następnych latach uzyskano czyste preparaty enzymów *E. coli*: DNA polimerazę II, holoenzym DNA polimerazy III, DNA polimerazy IV i V, natomiast enzym odkryty przez Kornberga nazwano DNA polimerazą I [50]. Ponieważ DNA polimeraza I nie może inicjować syntezy łańcucha *de novo*, zainteresowano się inicjacją replikacji. W ciągu dziesięciu lat Kornberg zidentyfikował i wykorzystał replisom do przekształcenia jednociowej kolistej formy DNA faga ΦX174 w dwuniciową formę replikacyjną, co przyczyniło się do zrozumienia wszystkich etapów replikacji chromosomu *E. coli* [51-53].

Możliwość klonowania genów i postępująca rewolucja w biologii była możliwa dzięki wykorzystaniu enzymów odkrytych przez Kornberga. DNA polimeraza I oraz jej analogi stały się kluczowymi reagentami technologii reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) oraz współczesnych technik sekwencjonowania DNA [46]. Ciekawostką może być fakt, że Frederick Sanger wpadł na pomysł sekwencjonowania DNA metodą „dideoksy”, czytając rozdział poświęcony DNA polimerazie I w książce Kornberga [46].

Semikonserwatywna replikacja DNA

Komplementarność zasad obu nici DNA zasugerowała możliwy mechanizm kopiowania materiału genetycznego. Rozważane były trzy hipotezy. Pierwszy model replikacji semikonserwatywnej, zaproponowany przez Watsona i Cricka, zakładał, że w trakcie syntezy nici DNA ulegają rozdzieleniu i każda z nich wchodzi w skład jednej z dwóch cząsteczek potomnych [40].



Ryc. 4. Eksperyment Meselsona i Stahla. Bakterie hodowano na pożywce zawierającej sól azotową z ciężkim izotopem ^{15}N . Następnie bakterie przeszczepiono do pożywki zawierającej źródło azotu wyłącznie ^{14}N i hodowano przez 20 minut (uzyskując pierwsze pokolenie) i 40 minut (uzyskując drugie pokolenie). DNA izolowano i wirowano w gradiencie chlorku cezu. W zależności od zawartości poszczególnych izotopów azotu, prążek DNA znajdował się na określonej wysokości w probówce

Model replikacji konserwatywnej zakładał zachowanie nienaruszonej macierzystej cząsteczki DNA i tworzenie całkowicie nowej cząsteczki potomnej. Kolejna hipoteza zakładała, że powstawałyby dwie cząsteczki DNA, a każda zawierałaby rozproszone fragmenty macierzystej cząsteczki. Chociaż pierwszy mechanizm wydawał się bardziej prawdopodobny, nie do końca było jasne, jak można to potwierdzić [54]. Głównym problemem była topologia związana z rozplataniem nici DNA. W 1958 roku potwierdzono, że replikacja zachodzi w sposób semikonserwatywny [55]. W procesie tym każda z nici DNA stanowi matrycę dla syntezy nici komplementarnej, w której kolejność ułożenia nukleotydów określona jest przez sekwencję zasad nici macierzystej. Każda cząsteczka potomna zawiera jedną nić matrycy i jedną nowo dobudowaną.

Meselson i Stahl wykorzystali fagowy DNA znakowany 5-bromouracylem (5BU) i analizowali jego skład metodą wirowania w gradiencie gęstości. Znakowany „ciężki” DNA osiadał w próbkówce szybciej, na poziomie odpowiadającym gęstości roztworu, podczas gdy „lekki” DNA powinien migrować wolniej. Hodowle bakterii prowadzono na pożywce, w której jedynym źródłem azotu był $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Po wielu pokoleniach rosnących na tym podłożu rozcieńczano je 10-krotnie roztworem zawierającym $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$, a hodowle kontynuowano. Po wirowaniu DNA rodzicielski z pierwszej próbki znajdował się przy dnie próbkówki w pozycji ciężkiego izotopu ^{15}N (ryc. 4).

DNA pobrany po 20 minutach hodowli na zmienionej pożywce znajdował się na wysokości między pozycją ciężkiego izotopu ^{15}N a lekkiego ^{14}N (kontroli). Dla pierwszego pokolenia obserwowano tylko jeden prążek charakteryzujący hybryd. Po następnym cyklu podziałowym obserwowano dwa prążki – jeden hybrydowy i drugi charakterystyczny dla lekkiego DNA, którego ilość zwiększała się po każdym cyklu replikacyjnym.

Kod genetyczny

Sama struktura DNA nie tłumaczyła sposobu kodowania informacji i jej odczytywania. Rdzeń fosfocukrowy ma charakter regularny i niezmienny niezależnie od sekwencji zasad. Ponieważ w długiej cząsteczce możliwe są różne kombinacje, wydawało się prawdopodobne, że to sekwencja zasad stanowi kod niosący informację genetyczną [56].

W 1957 roku Crick zaproponował hipotezę cząsteczki adaptorowej, która tłumaczyła zdolność tRNA do tłumaczenia informacji genetycznej [57]. Gdyby reszta aminokwasowa kodowana była przez dwie zasady, możliwych byłoby jedynie 16 kombinacji, podczas gdy czteronukleotydowy dawałby zbyt wiele możliwości. Jako najbardziej prawdopodobny rozważano kod trójkowy [58]. Hipoteza ta została poparta eksperymentami *in vivo*, z wykorzystaniem zmiany ramki odczytu podczas translacji, oraz *in vitro*, z wykorzystaniem aminoacylo-tRNA rozpoznających określone trójki zasad [59-60]. Rozszyfrowywanie zasad kodowania kolejnych trójek nukleotydów doprowadziło w latach

1961-1966 do pełnego poznania kodu genetycznego oraz stworzenia jego reprezentacji w postaci tabeli (ryc. 5) [61].

		Druga litera kodonu				
		U	C	A	G	
Pierwsza litera kodonu	U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
		Leu • STOP	Ser STOP	STOP Gln Leu Ala	STOP Cys Trp Sec	A
		Leu •	Ser	STOP Gln Pyl	Trp	G
	C	Leu Thr	Pro	His	Arg	U
		Leu Thr	Pro	His	Arg	C
		Leu Thr	Pro	Gln	Arg	A
		Leu • Thr Ser	Pro	Gln •	Arg	G
	A	Ile •	Thr	Asn	Ser	U
		Ile •	Thr	Asn	Ser	C
		Ile • Met	Thr	Lys Asn	Arg Ser Gly STOP	A
		Met •	Thr •	Lys	Arg Ser Gly STOP	G
	G	Val	Ala	Asp	Gly	U
		Val	Ala	Asp	Gly	C
		Val	Ala	Glu	Gly	A
		Val •	Ala	Glu	Gly	G

Ryc. 5. Współczesna reprezentacja kodu genetycznego w postaci tabeli

W 1968 roku Marshall Nirenberg, Robert Holley i Gobind Khorana otrzymali Nagrodę Nobla za rozpracowanie kodu genetycznego i odkrycie jego roli w syntezie białek.

Sekwencjonowanie genomów

Badania Fredericka Snydera nad insuliną wykazały, że białka składają się z liniowych polipeptydów, zbudowanych z reszt aminokwasowych połączonych ze sobą w ściśle określonej kolejności, oraz że dla struktury i funkcji makrocząsteczek istotną rolę odgrywają ich sekwencje [62]. Pionierskie próby określania sekwencji zasad w DNA natrafiły na wiele przeszkód wynikających z podobieństwa różnych cząsteczek DNA i problemu z ich rozdzielaniem, jak również braku DNaz specyficznych dla poszczególnych zasad. Mniej problemów przysporzyło sekwencjonowanie RNA, które powiodło się dla tRNA^{Ala} z drożdży już w 1965 roku [31].

W 1959 roku oczyszczono dokładnie pierwszą cząsteczkę DNA z faga ΦX174 [63], a rok później DNA faga lambda [64]. Rezultatem pierwszych prób sekwencjonowania DNA było uzyskanie częściowej sekwencji kohezyjnych („lepkich”) końców faga lambda

[65]. Odkrycie enzymów restrykcyjnych klasy drugiej [66] było decydującym osiągnięciem, ułatwiającym przygotowanie materiałów do sekwencjonowania DNA. Metody oznaczenia sekwencji nie były wystarczająco efektywne do czasu zaproponowania przełomowej metody „plus minus” przez Fredericka Sangera, z której wywodzą się współczesne technologie [67]. Sanger wykorzystał polimerazę DNA, specyficzne startery i znakowane ^{32}P nukleotydy w ośmiu reakcjach, w których syntezę zatrzymano w sposób zależny od sekwencji, poprzez uzupełnianie tylko jednego z czterech fosforanów deoksynukleozydów (reakcja „plus”) lub trzech z czterech (reakcja „minus”) [68]. Mieszanki reakcyjne były rozdzielane w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a pozycje poszczególnych zasad odczytywano z autoradiogramów. W pojedynczym eksperymencie można było określić sekwencję około 50 zasad [67]. Metodą tą w 1977 roku określono pełną sekwencję DNA genomu faga ΦX174 [69]. W tym samym roku Allan Maxam i Walter Gilbert opisali metodę sekwencjonowania, w której DNA znakowany przy jednym końcu ^{32}P był chemicznie modyfikowany i hydrolizowany. W pierwszej reakcji modyfikowano puryny (reakcja A+G), w drugiej preferencyjnie adeniny (A>G), w trzeciej pirymidyny (C+T), a w czwartej cytozyny (C). Modyfikowane DNA ulegały chemicznej hydrolizie. Podobnie jak w metodzie „plus minus” sekwencja odczytywana była z autoradiogramów żeli poliakrylamidowych mieszanin reakcyjnych [70].

W tym samym roku Sanger opracował metodę „dideoxy”, w której wykorzystał trifosforany 2',3'-dideoksy nukleotydów (ddNTP), prowadzące do zależnej od sekwencji terminacji łańcucha [71]. Metoda ta została wykorzystana do potwierdzenia sekwencji faga ΦX174 w 1978 roku. Wraz z wprowadzeniem metod sekwencjonowania wykorzystujących żele poliakrylamidowe, tempo badań uległo przyspieszeniu, pociągając za sobą postęp technologiczny. Na początku lat 90. długość sekwencji otrzymywanych metodą „dideoxy” wzrosła z 100 do 400 nukleotydów [67].

Kolejny przełom stanowiło wprowadzenie automatyzacji sekwencjonowania z wykorzystaniem znakowania fluorescencyjnego [72]. Metoda ta została pierwszy raz wykorzystana do określenia sekwencji genu przez Craiga Ventera [73]. W 1992 roku założył on Instytut Badań Genomowych (The Institute for Genomic Research, TIGR) oraz firmę Celera posiadającą 30 automatycznych sekwenatorów ABI 373A i 17 robotów ABI Catalyst 800 [67]. Była to prawdziwa fabryka, w której pracowały zespoły ludzi ze ściśle określonym zakresem zadań, jak np. przygotowanie matrycy, żeli czy samo sekwencjonowanie [67]. Rok później centrum Sangera w Cambridge zostało przemianowane na Wellcome Trust Sanger Institute z udziałem Wellcome Trust i Medical Research Council. Od tej pory ilość danych uzyskiwanych co roku wzrastała gwałtownie. W latach 90. poznano sekwencję genomów wielu wirusów, organelli, mikroorganizmów i małych organizmów wielokomórkowych [74]. Umożliwiło to rozwój nowych kierunków badań, takich jak kontrola ekspresji genów oraz poznawanie transkryptomu, proteomu, inter-

aktomu, metabolomu oraz genomiki nowotworów. Powstała koncepcja komórki jako zintegrowanego systemu procesorów informacyjnych [74].

Po trzech dekadach stosowania metoda Sangera może być stosowana do odczytywania sekwencji o długości do około 1000 par zasad z dokładnością 99,999% i przy koszcie 0,5 dolara [75]. Pojawienie się nowych technologii umożliwiło redukcję kosztów i przyspieszenie procesu uzyskiwania danych. „Nature” ogłosiło nowe techniki sekwencjonowania „Metodą Roku 2007”, głównie ze względu na szeroki zakres ich zastosowań oraz fakt, że wykroczyły one już poza swoje oryginalne zastosowanie. Istnieje wiele implementacji cyklicznego sekwencjonowania, które zostały w ostatnich latach skomercjalizowane, takie jak sekwencjonowanie 454 (wykorzystane w Sekwencjonatorach Genomowych 454, Roche Applied Science; Bazylea), technologia Solexa (wykorzystana w Analitycznym Sekwencjonatorze Genomowym Illumina; San Diego), platforma SOLiD (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Polonator (Dover/Harvard) oraz technologia HeliScope Molecule Sequencer (Helicos; Cambridge, MA, USA) [75].

Interesującym jest fakt, że Frederick Sanger jest jedną z czterech osób nagrodzonych dwukrotnie Nagrodą Nobla. Po raz pierwszy otrzymał ją w 1958 roku za pracę nad strukturą białek, a w szczególności insuliny. Drugi raz razem z Paulem Bergiem i Walterem Gilbertem uzyskał ją w 1980 roku za wkład w określanie sekwencji kwasów nukleinowych.

Manipulacje genetyczne

W latach 60. XX wieku Gobind Khorana opracował pierwszą metodę chemicznej syntezy oligonukleotydów. Jednakże przełomowym momentem w badaniach DNA było opracowanie metody chemicznej syntezy deoksynukleotydów na podłożu stałym, używając fosforoamitydów [76]. Rozwój technik syntezy DNA doprowadził do opracowania metod automatycznych, które z kolei umożliwiło rozwój inżynierii genetycznej, sekwencjonowania oraz techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Pierwszy gen uzyskany metodami chemicznymi został zsyntetyzowany w laboratorium Khorany w 1972 roku [77].

Chociaż poznano strukturę DNA, nie rozwiązano problemu związanego z kontrolowaną fragmentacją dłuższych cząsteczek. Specyficzne enzymy odkryto dopiero pod koniec lat 60. wraz z badaniami restrykcji i modyfikacji DNA zależnej od gospodarza w warunkach infekcji bakterii fagiem λ [78]. Okazało się, że modyfikacja bakteryjnego DNA w określonym szczepie może chronić przed infekcją fagiem ze względu na szczególny wzór metylacji i swoiste enzymy restrykcyjne. Było to kluczowe odkrycie dla rozwoju inżynierii genetycznej. W 1972 roku Paul Berg stworzył pierwszy rekombinowany DNA, łącząc dwa odcinki, pochodzące z różnych wirusów [79]. Były to właściwie narodziny inżynierii genetycznej. Nieco później Herbert Boyer i Stanley Cohen stwo-

rzyli pierwszy plazmid *in vitro*, udowadniając, że można otrzymać funkcjonalne produkty poprzez reasocjację fragmentów uzyskanych przez hydrolizę enzymami restrykcyjnymi większych replikonów oraz że można połączyć dwa plazmidy różnego pochodzenia [80].

Reakcja łańcuchowa polimerazy

W 1970 roku opisano zmodyfikowaną wersję DNA polimerazy I z *E. coli* pozbawioną aktywności 5'→3' egzonukleazy, nazwaną później „fragmentem Klenowa” [81]. Mając taki enzym, Khorana opisał sztuczną replikację DNA, z wykorzystaniem dwóch starterowych oligonukleotydów i matrycy, w której synteza DNA zachodziłaby w cyklicznej reakcji z dodawaniem nowej porcji enzymu po każdym cyklu [82]. Idea ta nie była jednak dalej rozwijana.

W 1969 roku Thomas Brock wyizolował z gorących źródeł w Yellowstone nowy gatunek bakterii – *Thermus aquaticus* [83]. Sześć lat później wyizolowano z niego DNA polimerazę z *T. aquaticus* (Taq), która, podobnie jak inne enzymy z tej bakterii, wykazywała stabilność w wysokich temperaturach (ok. 80°C) [84]. Termostabilność Taq stała się podstawą metody amplifikacji DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), podobnej do tej zaproponowanej przez Khoranę. Twórcą metody PCR jest Kary Mullis, który twierdził, że wymyślił ją w 1983, w trakcie nocnej jazdy samochodem przez góry Kalifornii [85]. Właśnie za PCR otrzymał on Nagrodę Nobla w 1993 roku.

Projekt poznania genomu człowieka

Rozwój technik klonowania i sekwencjonowania DNA, dokonany na początku lat 80. XX wieku pozwalał zakładać, że możliwe będzie określenie pełnych sekwencji genomów, w tym genomu człowieka. Idea podjęcia wysiłków w tym kierunku narodziła się w 1985 roku, podczas konferencji nt. „Czy możemy zsekwencjonować genom człowieka?” na Uniwersytecie Kalifornijskim Santa Cruz (UCSC) [74]. Na spotkaniu tym rozważane były m.in. problemy rozdziału chromosomów, tworzenia fizycznych map nakładających się fragmentów, polimorfizmu oraz potrzeby tworzenia zaawansowanych programów komputerowych i rozwoju technologii. Koszty przedsięwzięcia oszacowano na około 3 mld dol. dla genomu człowieka (1 dolara na zasadę). Uważano, że jego realizacja wymagać będzie 15 lat pracy, co w rezultacie okazało się trafne [74]. W tym samym roku odbyła się pierwsza konferencja w Santa Fe (Kalifornia, USA), dotycząca określenia wykonalności inicjatywy poznania genomu człowieka, a rozważania trwały aż do roku 1990, kiedy to Departament Energii USA (DOE) i Narodowy Instytut Zdrowia zaprezentowały Kongresowi USA 5-letni plan projektu poznania genomu człowieka [67]. Rozpoczęła się międzynarodowa współpraca w zakresie sekwencjonowania poszczególnych regionów genomu (USA, Europa i Japonia). Pod koniec lat 90. opublikowano pierwszą pełną sekwencję ludzkiego chromosomu 22 [86]. 25 czerwca 2000 roku w Waszyngtonie prezy-

dent USA Bill Clinton i premier Wielkiej Brytanii Tony Blair wspólnie ogłosili uzyskanie wstępnej wersji sekwencji genomu człowieka w ramach projektu publiczno-prywatnego (NIH i Celera) [67]. Wyniki zostały opublikowane w roku 2001 w „Science” [87] i „Nature” [88].

Epigenetyka i projekt poznania epigenomu człowieka

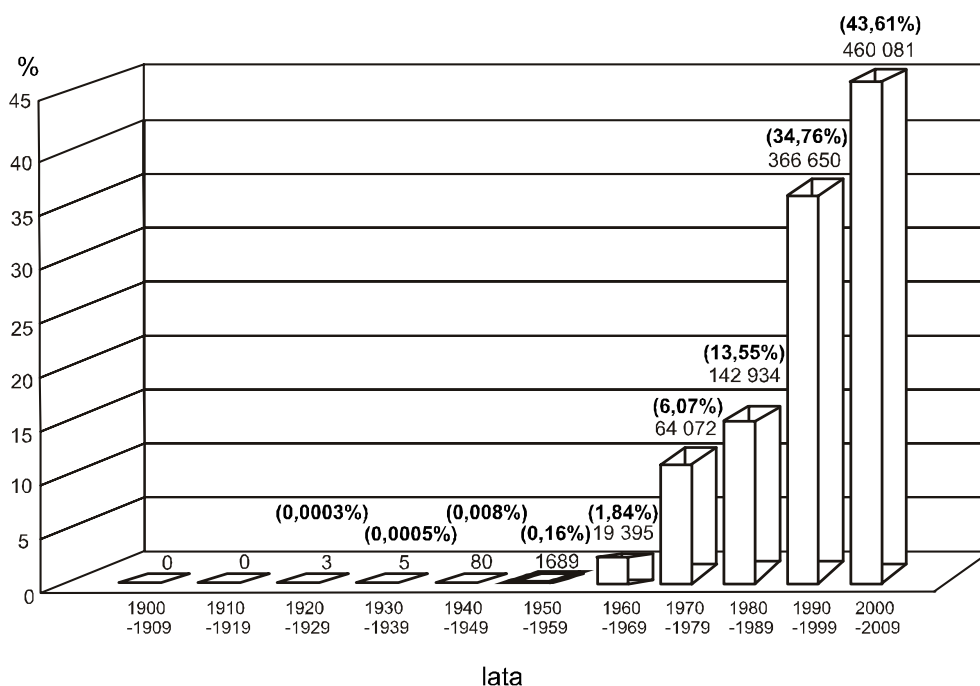
Już w XIX wieku uważano, że dziedziczenie i rozwój stanowią tę samą problematykę, ale dopiero w pierwszej połowie XX wieku biologia rozwoju i genetyka stanowiły odrębne dyscypliny [17]. Konrad Waddington, dobrze rozumiejący oba obszary badań, zaproponował dla nich wspólną dyscyplinę, którą nazwał epigenetyką [89]. Można ją określić jako program genetyczny kierujący rozwojem. Dla Waddingtona nie różniła się ona jednak od embriologii [17]. Początków epigenetyki należy upatrywać w identyfikacji 5-metylocytozyny jako składnika DNA prątków gruczolicy [90]. W 1948 roku Hotchkiss zaobserwował mały punkt na chromatogramach hydrolizatów DNA grasicy cielęcej, który nazwał „epicytozyną” [34]. Sugestia, że metylacja DNA może mieć wpływ na ekspresję genów pojawiła się w latach 70. [91, 92]. W 1987 roku Robin Holliday zawęził rozumienie epigenetyki do sytuacji, w których zmiany metylacji DNA decydują o aktywności ekspresji genów [93]. Kolejną zmodyfikowaną zasadą wykrytą w DNA była N6-metyloadenina.

Postęp w epigenetyce oraz nowe podejścia technologiczne pozwoliły na analizy wzorów metylacji w DNA oraz modyfikacji histonów zaangażowanych w strukturę i funkcję genomu człowieka [94]. Duże zainteresowanie tą dziedziną doprowadziło do powstania w 2005 roku projektu poznania epigenomu człowieka (ang. *human epigenome project*, HEP). Celem HEP jest identyfikacja chemicznych zmian w elementach chromatyny, które określają funkcjonalność DNA, oraz pełniejsze zrozumienie rozwoju fizjologicznego, starzenia, niekontrolowanej ekspresji genów w nowotworach i innych chorobach, a także wpływu środowiska na zdrowie człowieka mimo braku zmian w sekwencji DNA [94]. Obecna definicja epigenetyki mówi, że są to badania zmian dziedzicznych funkcji genomu, które nie zależą od zmian w sekwencji DNA [95]. Rozwijane technologie, takie jak określanie profilu metylacji w oparciu o wykorzystanie żeli, macierzy, sekwencjonowania, a także bisulfidowy PCR dają nadzieje na określenie wkrótce pierwszego metylomu [96]. Wśród innych projektów i inicjatyw związanych z badaniami epigenetycznymi można wyróżnić Epigenome Network of Excellence (NoE), National Methylome 21 (NAME21), Epigenetic Treatment of Neoplastic Disease (EPITRON), High-throughput Epigenetic Regulatory Organization in Chromatin (HEROIC), Epigenetic Control of the Mammalian Genome (GEN-AU), AACR Human Epigenome Taskforce, Alliance for the Human Epigenome and Disease (AHEAD) oraz the NIH Roadmap: Epigenomics [96].

DNA w XXI wieku

DNA został odkryty 140 lat temu, a biologia molekularna w XIX wieku dopiero stwarzała swoje podstawy. XX wiek przyniósł ogromny postęp wiedzy oraz rozwój technik, które pozwoliły na wyodrębnienie nowych obszarów badań, takich jak biotechnologia, medycyna molekularna, kryminologia i inne. Liczba doniesień dotyczących DNA stopniowo wzrasta od początku XX wieku, ale niemalże 80% publikacji z sumy ponad miliona zostało opublikowanych w ciągu ostatnich 20 lat (ryc. 6).

Wzrost zainteresowania badaniami DNA prawdopodobnie doprowadzi do wielkich odkryć XXI wieku. Możemy zgodzić się z Phoebusem Levene, wielkim biochemikiem, który już w 1931 roku opisał swoją wizję przyszłości biochemii: „I tak, krok po kroku, kolejne tajemnice życia są odkrywane. Nie jest istotne, czy ludzki umysł kiedykolwiek osiągnie stan wysycenia wiedzą dotyczącą doskonałości życia. Jest jednak pewne, że bunt biochemików przeciwko idei ograniczenia ludzkiej ciekawości będzie postępował.



Ryc. 6. Wzrastająca ilość publikacji na temat DNA w bazie danych PubMed NCBI od roku 1900 do 6 stycznia 2009 r. Bazę przeszukano stosując zapytania: „DNA” OR „nucleic acid” OR „nuclein” OR „D.N.A.”. Od 1950 roku można zaobserwować zwiększanie się ilości publikacji, ale niemal 80% z sumy 1 054 869 zostało opublikowanych w ciągu ostatnich 20 lat

Biochemia będzie trwała tak, jakby wiedza, nawet ta dotycząca istoty życia, była dostępna dla ludzkiego pojmowania. Przeszłość pokazała, że rozwiązanie jednego problemu,

stawia kolejne pytania. Nowe odkrycia w fizyce, matematyce, chemii teoretycznej, uzupełniają nowe narzędzia biochemii, nowe narzędzia do rozwiązania starych problemów i stworzenia nowych. Tak długo, jak istnieje życie, ludzki umysł będzie tworzył zagadki, a biochemia odegra dużą rolę w ich rozwikłaniu” [97].

Piśmiennictwo

- [1] Frías D.L. *The history of the Mendelian gene*. „Riv. Biol.” 2007, 100, s. 69-92.
- [2] Darwin C. *On the origin of species by means of natural selection, or preservation of favoured races in the struggle for life*. (1st ed.) London, John Murray 1859.
- [3] Mendel G. *Versuche über Pflanzenhybriden*. „Verh. Nat. Forsch. Ver. Brünn.” 1866, 4, s. 3-47.
- [4] Correns C. *G. Mendels Regeln über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde*. „Ber Dtsch. Bot. Ges.” 1900, 18, s. 158-168.
- [5] de Vries H. *Sur la loi de disjonction des hybrides*. „Comp. Rend. Acad. Sci. Paris” 1900, 130, s. 845-847.
- [6] von Tschermak E. *Über künstliche Kreuzung bei Pisum sativum*. Ber Dtsch. Bot Ges. 1900, 18, s. 232-239.
- [7] Collins F.S., Green E.D., Guttmacher A.E., Guyer M.S. *A vision for the future of genomics research. A blueprint for the genomic era*. Nature 2003, 422, s. 835-847.
- [8] Haeckel E. *Generelle Morphologie der Organismen*. Reimer, Berlin 1866, s. 287-288.
- [9] His W. F. Miescher. [w:] His W. et al. (eds) *Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher*. vol. 1 F.C.W. Vogel 1897, Leipzig, s. 5-32.
- [10] Dahm R. *Friedrich Miescher and the discovery of DNA*. „Dev. Biol.” 2005, 278, s. 274-288.
- [11] Miescher F. *Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen*. „Medicinischemische Untersuchungen“ 1871, 4, s. 441-460.
- [12] Vasil I.K. *A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops*. „Plant Cell Rep.” 2008, 27, s. 1423-1440.
- [13] Griffith F. *The significance of pneumococcal types*. „J. Hyg.” 1928, 27, s. 113-119.
- [14] Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pseudococcus Type III*. „J. Exp. Med.” 1944, 79, s. 137-158.
- [15] Fink G.R. *A transforming principle*. „Cell” 2005, 120, s. 153-154.
- [16] Hershey A.D., Chase M. *Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage*. „J. Gen. Physiol.” 1952, 36, s. 39-56.
- [17] Holliday R. *Epigenetics. A historical overview*. „Epigenetics” 2006, 1, s. 76-80.
- [18] Morgan T.H. *The theory of the gene*. 1926, Yale Univ Press.
- [19] Morgan T.H. *La relación de la genética con la medicina y la fisiología. Conferencia Nobel presentada en Estocolmo el 4 de Junio de 1934*. „Genetica” 1934, 2, s. 627-631.
- [20] Gerstein M.B., Bruce C., Rozowsky J.S. et al. *What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition*. „Genome Res.” 2007, 17, s. 669-681.
- [21] Van Slyke D.D., Jacobs W. *Biographical memoir of Phoebus Aaron Theodor Levene*. “Biogr. Mem. Natl. Acad. Sci.” 1945, 23, s. 75-86.

- [22] Manchester K.L. *Historical opinion: Erwin Chargaff and his 'rules' for the base composition of DNA: why did he fail to see the possibility of complementarity?* "Trends Biochem. Sci." 2008, 33, s. 65-70.
- [23] Pennazio S., Roggero P. *Tobacco mosaic virus RNA as genetic determinant: genesis of a discovery.* "Riv. Biol." 2000, 93, s. 431-455.
- [24] Rich A. *Discovery of the hybrid helix and the first DNA-RNA hybridisation.* "J. Biol. Chem." 2006, 281, s. 7693-7696.
- [25] Rich A., Davies D. *A new two-stranded helical structure: polyadenylic acid and polyuridylic acid.* "J. Am. Chem. Soc." 1956, 78, s. 3548-3549.
- [26] Rich A. *A hybrid helix containing both deoxyribose and ribose polynucleotides and its relation to the transfer of information between the nucleic acids.* "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1960, 46, s. 1044-1053.
- [27] Doty P., Marmur J., Eigner J., Schildkraut C. *Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies.* "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1960, 47, s. 137-146.
- [28] Wang A.H.J., Fujii S., van Boo J.H. et al. *Molecular structure of r(GCG)_d(TATACGC): a DNA-RNA hybrid helix joined to double helical DNA.* „Nature” 1982, 299, s. 601-604.
- [29] Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. *Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues.* „Tetrahedron Lett.” 1967, 37, s. 3557-3562.
- [30] Paterson B.M., Roberts B.E., Kuff E.L. *Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation.* „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1977, 74, 4370-74.
- [31] Holley R.W., Apgar J., Everett G.A. et al. *Structure of a ribonucleic acid.* „Science” 1965, 147, s. 1462-1465.
- [32] Wyatt G.R. *The purine and pyrimidine composition of deoxyribose nucleic acids.* „Biochem. J.” 1951, 48, s. 584-590.
- [33] Levene P.A., Bass L.W. *Nucleic Acids.* Chemical Catalog Company 1931, New York.
- [34] Hotchkiss R.D. *The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography.* „J. Biol. Chem.” 1948, 175, s. 315-332.
- [35] Mirsky A.E. *Chromosomes and nucleoproteins.* „Adv. Enzymol.” 1943, 3, 1-34.
- [36] Chargaff E., Zamenhof S., Green C. *Composition of human deoxyribose nucleic acid.* „Nature” 1950, 165, s. 756-757.
- [37] Chargaff E. *Heraclitean Fire, Sketches from a life before Nature.* 1978 Rockefeller University Press.
- [38] Arnott S. *Historical article: DNA polymorphism and the early history of the double helix.* „Trends Biochem. Sci.” 2006, 31, s. 349-354.
- [39] Klug A. *The discovery of the DNA double helix.* „J. Mol. Biol.” 2004, 335, s. 3-26.
- [40] Watson J.D., Crick F.H.C. *A structure for deoxyribonucleic acid.* „Nature” 1953, 171, s. 737-738.
- [41] Wilkins M.H., Stokes A.R., Wilson H.R. *Molecular structure of deoxyribose nucleic acids.* „Nature” 1953, 171, s. 738-740.
- [42] Franklin R.E., Gosling R.G. *Molecular configuration in sodium thymonucleate.* „Nature” 1953, 171, s. 740-741.
- [43] Crick F. *On protein synthesis.* „Symp. Soc. Exp. Biol.” 1958, 12, s. 138-163.
- [44] Thieffry D. *Forty years under the central dogma.* „Trends Biochem. Sci.” 1998, 23, s. 312-316.

- [45] Dounce A.L. *Nucleic acid template hypotheses*. „Nature” 1953, 172, s. 541-542.
- [46] Lehman R.I. *Historical perspective: Arthur Kornberg, a giant of 20th century biochemistry*. „Trends Biochem. Sci.” 2008, 33, s. 291-296.
- [47] Lehman I.R., Bessman M.J., Simms E.S., 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, s. 163-170.
- [48] Bessman M.J., Lehman I.R., Simms E.S., Kornberg A. *Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction*. „J. Biol. Chem.” 1958, 233, s. 171-177.
- [49] Lehman I.R., Zimmerman S.B., Adler J. et al. *Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. V. Chemical composition of enzymatically synthesized deoxyribonucleic acid*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1958, 44, s. 1191-1196.
- [50] Lehman R.I. *Discovery of DNA polymerase*. „J. Biol. Chem.” 2003, 278, s. 34733-34738.
- [51] Brutlag D., Schekman R., Kornberg A. *A possible role for RNA polymerase in the initiation of M13 DNA synthesis*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1971, 68, s. 2826-2829.
- [52] Schekman R., Wickner W., Westergaard O. et al. *Initiation of DNA synthesis: synthesis of Φ X174 replikative form requires RNA synthesis resistant to rifampicin*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1972, 69, s. 2691-2695.
- [53] Schekman R., Weiner A., Kornberg A. *Multienzyme systems of DNA replication*. „Science” 1974, 186, s. 987-993.
- [54] Hanawalt P.C. *Density matters: the semiconservative replication of DNA*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 2004, 101, s. 17889-17894.
- [55] Meselson M.S., Stahl F.W. *The replication of DNA in Escherichia coli*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1958, 44, s. 671-682.
- [56] Watson J.D., Crick F.H.C. *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*. „Nature” 1953, 171, s. 964-967.
- [57] Crick F.H. *On protein synthesis*. „Symp. Soc. Exp. Biol.” 1958, 12, s. 138-163.
- [58] Crick F.H., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R.J. *General nature of the genetic code for proteins*. „Nature” 1961, 192, s. 1227-1232.
- [59] Streisinger G., Okada Y., Emrich J. et al. *Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday*. „Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.” 1966, 31, s. 77-84.
- [60] Khorana H.G. *Polynucleotide synthesis and the genetic code*. „Fed. Proc.” 1965, 24, s. 1473-1487.
- [61] Crick F.H. *Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis*. „J. Mol. Biol.” 1966, 19, s. 548-555.
- [62] Sanger F., Tuppy H. *The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymatic hydrolysates*. „Biochem. J.” 1951, 49, s. 481-490.
- [63] Sinsheimer R.L. *A single-stranded DNA from bacteriophage phi X174*. „J. Mol. Biol.” 1959, 1, s. 43-53.
- [64] Kaiser A.D., Hogness D.S. *The transformation of Escherichia coli with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg*. „J. Mol. Biol.” 1960, 2, s. 392-415.
- [65] Wu R., Kaiser A.D. *Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA*. „J. Mol. Biol.” 1968, 35, s. 523-537.
- [66] Smith H.O., Wilcox K.W. *A restriction enzyme from Haemophilus influenzae. I. Purification and general properties*. „J. Mol. Biol.” 1970, 51, s. 379-391.

- [67] Hutchison III C.A. *DNA sequencing: bench to bedside and beyond*. „Nucleic Acids Res.” 2007, 35, s. 6227-6237.
- [68] Sanger F., Coulson A.R. *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. „J. Mol. Biol.” 1975, 94, s. 441-448.
- [69] Sanger F., Air G.M., Barrell B.G. et al. *Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA*. „Nature” 1977, 265, s. 687-695.
- [70] Maxam A.M., Gilbert W. *A new method for sequencing DNA*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1977, 74, s. 560-564.
- [71] Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. *DNA sequencing with chain terminating inhibitors*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1977, 74, s. 5463-5467.
- [72] Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J. et al. *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. „Nature” 1986, 321, s. 674-679.
- [73] Gocayne J., Robinson D.A., FitzGerald M.G. et al. *Primary structure of rat cardiac beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptors obtained by automated DNA sequence analysis: further evidence for a multigene family*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1987, 84, s. 8296-8300.
- [74] Sinsheimer R.L. *To reveal the genomes*. „Am. J. Hum. Genet.” 2006, 79, s. 194-196.
- [75] Shendure J., Ji H. *Next-generation DNA sequencing*. „Nat. Biotech.” 2008, 26, s. 1135-1145.
- [76] Caruthers M.H. *Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses*. „Science” 1985, 230, s. 281-285.
- [77] Khorana H.G., Agarwal K.L., Büchi H. et al. *Studies on polynucleotides. CIII. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast*. „J. Mol. Biol.” 1972, 72, s. 209-217.
- [78] Arber W., Linn S. *DNA modification and restriction*. „Annu. Rev. Biochem.” 1969, 38, s. 467-500.
- [79] Morrow J.F., Berg P. *Cleavage of Simian virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1972, 69, s. 3365-3369.
- [80] Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B. *Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1973, 70, s. 3240-3244.
- [81] Klenow H., Henningsen I. *Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1970, 65, s. 168-175.
- [82] Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R. et al. *Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases*. „J. Mol. Biol.” 1971, 56, s. 341-361.
- [83] Brock T.D., Freeze H. *Thermus aquaticus, a nonsporulating extreme thermophile*. „J. Bact.” 1969, 98, s. 289-297.
- [84] Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. *Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus*. „J. Bact.” 1976, 174, s. 1550-1557.
- [85] Mullis K.B. *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. „Sci. Am.” 1990, 262, s. 56-61, s. 64-65.
- [86] Dunham I., Shimizu N., Roe B.A. et al. *The DANN sequence of human chromosome 22*. „Nature” 1999, 402, s. 489-495.
- [87] Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al. *The sequence of the human genome*. „Science” 2001, 291, s. 1304-1351.

- [88] Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. *Initial sequencing and analysis of the human genome*. „Nature” 2001, 409, s. 860-921.
- [89] Waddington C.H. *Introduction to modern genetics*. Allen and Unwin, London 1939.
- [90] Johnson T.B., Coghill R.D. *Researches on pyrimidines. CIII. The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the Tubercle bacillus*. „J. Am. Chem. Soc.” 1925, 47, s. 2838-2844.
- [91] Riggs A.D. *X inactivation, differentiation and DNA methylation*. „Cytogenet. Cell Genet.” 1975, 14, s. 9-25.
- [92] Holliday R., Pugh J.E. *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. „Science” 1975, 187, s. 226-232.
- [93] Holliday R. *The inheritance of genetic defects*. „Science” 1987, 238, s. 163-170.
- [94] Jones P.A., Martienssen R. *A blueprint for a human epigenome project: the AACR human epigenome workshop*. „Cancer Res.” 2005, 65, s. 11241-11246.
- [95] Probst A.V., Dunleavy E., Almouzni G. *Epigenetic inheritance during the cell cycle*. „Nat. Rev. Mol. Cell Biol.” 2009, 10, s. 192-206.
- [96] Beck S., Rakyán V.K. *The methylome: approaches for global DNA methylation profiling*. „Trends Genet.” 2008, 24, s. 231-237.
- [97] Simoni R. D., Hill R. L., Vaughan M. *The structure of nucleic acids and many other natural products: Phoebus Aaron Levene*. „J. Biol. Chem.” 2002, 277, s. 23-24.
- [98] Szymanski M., Barciszewska M.Z., Erdmann V.A., Barciszewski J. *A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs*. „Biochim. Biophys. Acta” 2005, 1756, s. 65-75.

DNA – a molecule that transformed science. A short history of research

Deoxyribonucleic acid (DNA) was identified 140 years ago by a Swiss physician Friedrich Miescher. His discovery was fundamental for the development of biochemistry, genetics and molecular biology. Contemporary biology, biotechnology and medicine largely depends on our ability to analyze, synthesize and manipulate DNA. We present highlights of the history of DNA research from the very beginning to the sequencing of human genome.

Key words: DNA, molecular biology, genomics, genetics