



Nagrody Nobla przyznane w 1993 r. w dziedzinach chemii, a także fizjologii lub medycyny łączy wspólny podmiot badań: geny. Nagroda z chemii przyznana została M. Smithowi (Kanada) i K. Mullisowi (USA). Pierwszy z nich opracował przed dziesięcioma laty metodę mutagenyzy sterowanej oligonukleotydami, drugi zajmował się metodą łańcuchowej reakcji enzymatycznego powielania DNA zwaną potocznie PCR (*Polymerase Chain Reaction*), opublikowaną w 1985 r. Obie metody istotnie przyspieszyły rozwój biologii molekularnej stwarzając szersze i bogatsze niż dotąd możliwości badawcze.

Zasada mutagenyzy sterowanej w uproszczeniu polega na uzyskaniu jednoniciowego kołistego DNA (nić „+”) zawierającego przeznaczoną do mutacji punktowej sekwencję oraz syntezie komplementarnego do mutowanego regionu oligonukleotydu (20 – 30 mer), którego centralnie położony nukleotyd jest inny niż w wyjściowej sekwencji (to jest właśnie ta zaplanowana mutacja). Po asocjacji oligonukleotydu z kołowym jednoniciowym DNA enzymatycznie (polimeraza DNA i ligaza) dobudowuje się drugą, zmutowaną nić (nić „-”) i produktem transformuje bakterie. Wynikiem replikacji takiego DNA będą dwa rodzaje cząsteczek: bez zmian i zmutowane. Tak jak każda dobra metoda, mutagenyza sterowana stała się od razu przedmiotem ulepszeń i modyfikacji, a najważniejsze dotyczą sposobów selekcji komórek zawierających tylko zmutowany DNA.

Mutagenyza sterowana umożliwia utworzenie zmutowanych genów oraz sekwencji regulacyjnych dowolnego typu, jest zatem zarówno nieoceniona w badaniach zależności aktywności określonych fragmentów kwasów nukleinowych od ich struktury chemicznej, jak i w zaspokajaniu potrzeb biotechnologicznych.

Przykładem pierwszego typu zastosowań jest dokonanie ok. 1250 różnych podstawień aminokwasów w 166-aminokwasowym białku, lizozymie faga T4, w celu uzyskania informacji o znaczeniu różnych aminokwasów dla przejawów jego aktywności. W dziedzinie stosowanej można m.in. przypomnieć o syntetyzowaniu ponad 100 białek, tzw. mutein, tkankowego aktywatora plazminogenu (lek skuteczny w stanach sprzyjających zakrzepom, stanach pozawałowych itp.), kilkudziesięciu mutein czynnika martwicy nowotworów (TNF, potencjalny lek przeciwnowotworowy), kilkunastu mutein hirudyny (perspektywny lek przeciwzakrzepowy). Muteiny te nie mają swoich natywnych odpowiedników, natomiast ich cechy terapeutyczne przewyższają właściwości lecznicze natywnego białka. Metodę mutagenезy sterowanej stosuje się w licznych polskich laboratoriach badawczych.

PCR to metoda, którą bardzo szybko wprowadzono do wszystkich laboratoriów biologii molekularnej, a co bardziej godne uwagi, do klinicznych pracowni analitycznych. Zasada tej metody polega na powielaniu *in vitro* dowolnego fragmentu DNA. W pierwotnej wersji należało znać ok. 20-nukleotydowe sekwencje otaczające sekwencję powielaną. Do tych znanych struktur syntetyzowano komplementarne oligonukleotydy, które asocjowano ze zdenaturowanym DNA, niosącym powielany odcinek. Oligonukleotyd hybrydyzowany do jednoniciowego DNA stawał się starterem dla polimerazy DNA. Produkty replikacji można było ponownie zdenaturować podnosząc odpowiednio temperaturę, powtórnie zasocjować pojedyncze nici ze starterami oligonukleotydowymi i poddać kolejnej polimeryzacji. Amplifikację, denaturację i asocjację prowadzi się cyklicznie w jednej probówce, stosując termostabilną polimerazę. Ilość DNA przyrasta w tempie wykładniczym, w ciągu 2–3 godzin uzyskuje się milionowe zwielokrotnienie powielanej sekwencji. Można zatem przeprowadzając PCR uzyskać znaczące ilości DNA wychodząc z DNA pojedynczej komórki.

Metoda ta została również ulepszona i zmodyfikowana na wiele sposobów; wykonuje się PCR dla RNA, z ligazą, przy różnych starterach polimeryzacji, z coraz trwałszymi polimerazami, w coraz bardziej zautomatyzowanych przyrządach. PCR jest już obecnie najczęściej stosowaną metodą namnażania pojedynczych sekwencji DNA (genów) przeznaczonych do dalszej analizy (sekwencjonowania). Metoda ta może być stosowana w badaniu chorób genetycznych, chorób zakaźnych, w przypadkach gdy materiału do analizy jest niewiele. PCR jest stosowany w diagnostyce przedimplantacyjnej przy zapłodnieniu *in vitro* (analiza DNA z pojedynczego blastomeru), w postępowaniach sądowych (ustalenie ojcostwa, czy też ustalenie sprawcy zbrodni itd.). Wiele aparatów PCR znajduje się już w polskich pracowniach i klinikach medycznych.

Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny przypadła w tym roku Ph. Sharpowi (USA) i R. Robertsowi (W. Brytania) za odkrycie zjawiska genów podzielonych. Na tę nagrodę świat naukowy czekał od dawna, ponieważ odkrycie o którym mowa uważa się za najbardziej owocne od czasu propozycji hipotezy podwójnej helisy. Obaj uczeni ogłosili jednocześnie i niezależnie wyniki badań mRNA adenowirusów (1976 r.), w których wykazali, że dojrzały RNA jest krótszy od kodującego go DNA. Wynikało to ze zdjęć kompleksu obu cząsteczek w mikroskopie elektronowym, które pokazywały, że odcinki kodujące białko w DNA (eksony) przedzielają odcinki niekodujące (intron). Na uzyskanych fotografiach można było także zmierzyć długość poszczególnych eksonów i intronów.

Prawdziwego blasku odkryciu podzielonych genów dodały prace P. Chambona, M. Flawella, a potem wielu innych badaczy, którzy udowodnili, że znakomita większość genów eukariotycznych jest podzielona. Dało to podstawę do licznych badań (jak i spekulacji naukowych) odnośnie do ewolucyjnej roli intronów i eksonów oraz ich genetycznej historii.

Badając sposoby usuwania intronów odkryto w tych procesach autokatalityczną rolę RNA (S. Altman, T. Cech, Nagroda Nobla 1989 r.). Zaburzenia w procesie usuwania intronów leżą u podstaw wielu chorób metabolicznych i genetycznych: niektórych typów dystrofii mięśniowych, mukowiscydozy, talasemii, zespołu Gaushera, niektórych chorób o podłożu autoimmunoagresji i in. Komentarzem do tegorocznych nagród mogą być słowa K. Mullisa, jednego z laureatów: „jeżeli odkrycie jest naprawdę ważne, to taką nagrodę musi dostać!”

*M. F.*