

MARTA M. GABRYELSKA, JAN BARCISZEWSKI

Odyseja 1961: 50 lat kodu genetycznego

Wstęp

W tym roku obchodzimy 50. rocznicę odkrycia kodu genetycznego, stanowiącego uniwersalny szyfr, wspólny dla wszystkich żywych organizmów na Ziemi. W 1961 roku Marshall Warren Nierenberg oraz Johann Heinrich Matthaei opracowali układ doświadczalny *in vitro* składający się z oczyszczonych rybosomów bakteryjnych oraz frakcji RNA o małej masie cząsteczkowej, w którym kwas poliurydylowy koduje polifenyloadeninę. W ten sposób zaczęto rozumieć, odkrywać i poznawać kod genetyczny. Ważne osiągnięcia, które prowadziły do jego odkrycia oraz kluczowe doświadczenia z tym związane stanowią bardzo ciekawy i niezwykle inspirujący obszar zagadnień historii nauki. Jego wpływ na rozwój nauk biologicznych, a w szczególności biologii molekularnej i medycyny jest niepodważalny.

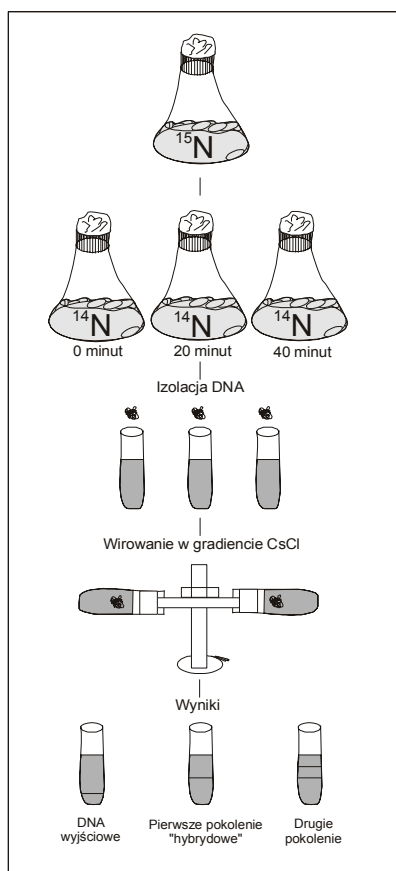
Pierwsze eksperymenty

Pytanie o mechanizm, w jaki sposób organizmy dziedziczą cechy z pokolenia na pokolenie, cieszyło się zawsze wielkim zainteresowaniem w biologii. W XIX wieku zakonnik Gregor Mendel sformułował podstawowe zasady dziedziczenia, potwierdzone później przez E. Tschermaka, H. De Vriesa i C. Corrensa. Mendel sugerował, że w proces ten zaangażowane są pewne czynniki, obecnie nazywane genami, oraz zdefiniował cechy dominujące i recesywne. Odkrycie to wyznaczyło narodziny nowej dziedziny – genetyki. Dzięki obserwacjom Mendla możliwe było wyhodowanie roślin hybrydowych o pożądanym cechach – m.in. odporniejszych na chwasty i szkodniki [1].

W 1913 roku wykazano, że geny, ułożone na liniowych chromosomach w jądrze komórki, stanowią podstawowe jednostki informacji [2]. W kolejnych latach pojawiały się nowe informacje na temat genów oraz ich roli w organizmach żywych [2]. Przełomowym etapem na drodze do odkrycia kodu genetycznego było zidentyfikowanie kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) jako nośnika informacji genetycznej. Oswald Avery wraz z Colinem MacLeodem i Maclynem McCartym zasugerowali, że DNA, a nie białka, jest odpowiedzialny za przekazywanie informacji genetycznej. Wykazali oni, że DNA stanowi podstawową cząsteczkę dziedziczności. Po opublikowaniu tych odkryć wielu badaczy skupiło swoją uwagę na kwasach nukleinowych [3].

Właściwości kwasów nukleinowych

W 1950 roku Alfred Hershey i Martha Chase potwierdzili, że DNA rzeczywiście stanowi materiał genetyczny [4], a Erwin Chargaff [5] wykazał, że w DNA wszystkich gatunków występuje równomolarny stosunek czterech podstawowych cegiełek budujących DNA (A do T i G do C). W roku 1953 James D. Watson i Francis Crick zaproponowali dla DNA model struktury podwójnej helisy [6], składającej się z dwóch przeciwległych łańcuchów nukleotydowych, które połączone są wiązaniami wodorowymi (pary zasad „Watsona-Cricka” AT i GC). Watson i Crick zasugerowali, że ułożenie zasad może stanowić podstawowy kod określający kolejność, w jakiej aminokwasy powinny być ułożone w białkach oraz że to szczególne parowanie zasad wskazuje na możliwy mechanizm kopiowania materiału genetycznego [6]. Model struktury DNA pokazał możliwości przekazywania i kodowania informacji [7]. W 1954 roku Marianne Grunberg-Manago i Severo Ochoa rozpoczęli prace nad enzymem biorącym udział w syntezie kwasów nukleinowych, fosforylaza polinukleotydową, która umożliwia otrzymanie *in vitro* preparatywnych ilości kwasów nukleinowych [8].



Ryc. 1. Eksperyment Meselsona i Stahla. W zależności od zawartości poszczególnych izotopów azotu, prążek DNA znajdował się na określonej wysokości w probówce [12]

Nieco później Alexander Rich i Robert Davies wykazali, że pojedyncze nici RNA mogą łączyć się razem (hybrydyzacja), tworząc dwuniciowy RNA [9, 10]. Obserwacja, że kwasy nukleinowe hybrydują, stanowi podstawę współczesnej inżynierii genetycznej i biotechnologii. Obecnie metody hybrydyzacji kwasów nukleinowych są rutynowo wykorzystywane do identyfikacji, izolowania, manipulacji, wymiany i hamowania ekspresji genów w układach żywych.

W kilka lat po zaproponowaniu modelu struktury DNA przez Watsona i Cricka, Matthew Meselson oraz Franklin Stahl opracowali unikalną metodę odróżniania „nowych” i „starych” nici DNA w trakcie replikacji [11]. Hodowali oni komórki *Escherichia coli* na pożywkach początkowych zawierających jedynie ciężki izotop azotu [^{15}N]. W następnym pokoleniu komórki bakteryjne były przenoszone do pożywki zawierającej tylko lekki izotop [^{14}N]. Następnie wyizolowali oni DNA z różnych pokoleń bakterii i analizowali ich właściwości poprzez wirowanie w gradiencie chlorku cezu (ryc. 1). Na tej podstawie wykazali, że replikacja odbywa się zgodnie z semikonserwatywnym mechanizmem, tj. w trakcie każdego podziału komórki potomne otrzymują jedną „stara” i jedną „nową” nić DNA w chromosomach [11].

W 1960 stało się jasne, że sam DNA nie jest bezpośrednio zaangażowany w syntezę białek, ale jest przepisywany (kopiowany) w procesie transkrypcji DNA do jednoniciowego RNA, zwanego mRNA [13]. Kluczowe pytanie pozostawało w tym czasie bez odpowiedzi. W jaki sposób sekwencja zasad określa poszczególne aminokwasy?

Klub Krawatów

Twórcą klubu „The RNA Tie Club” („Klub Krawatów RNA”) był fizyk George Gamow. Jego członkowie zastanawiali się głównie nad tym, w jaki sposób język nukleotydów może być przetłumaczony na język białek w komórkach [14]. Klub RNA liczył dwudziestu członków. Każdy z nich otrzymał dodatkowo nazwę aminokwasu (na przykład: Crick-tyrozyna, Watson-prolina, Rich-arginina, Chargaff-lizyna itp.). Ponadto każdy członek klubu miał na sobie krawat oznaczony jego symbolem. Dyskutowano ilość zasad (2, 3 lub 4) niezbędnych do jednoznacznego kodowania określonego aminokwasu [15].

Gdyby były tylko dwie zasady w każdym kodonie, to istniałoby 4^2 , czyli jedynie 16 unikalnych kombinacji nukleotydów. Ponieważ było znanych 20 aminokwasów, należało założyć istnienie co najmniej trzech zasad w kodonie, czyli 4^3 , dając 64 kombinacje. Mimo olbrzymiej aktywności członków Klubu, nie udało im się złamać kodu. Co ciekawe Marshall Nierenberg nie był członkiem „RNA Tie Club”.

W 1955 roku w liście do „The RNA Tie Club” Francis Crick zasugerował istnienie małych adaptorowych cząsteczek RNA, przyłączających aminokwasy i oddziałujących z matrycą RNA, umożliwiając biosyntezę białka. Adaptory te, większe niż przewidywał Crick, odkryli Zamecnik i Hoagland w 1958 roku [16]. Są to transferowe kwasy nukleinowe (tRNA).

Już w 1953 roku Paul Zamecnik opisał pierwszy bezkomórkowy system syntezy polipeptydów. Razem z Elizabeth Keller i Machlonem Hoaglandem wykazali, że pierwszym krokiem w procesie syntezy białek jest aktywacja aminokwasów przez tworzenie aminoacyloadenylationów z aminokwasów i ATP [16]. Stwierdzili oni, że cząsteczki cytoplazmatycznych RNA przyłączają radioaktywne aminokwasy [^{14}C], które przenoszą do mikrosomalnych frakcji białkowych. Transport ten był zależny od fosforanu guanozyny (GTP). Doszli oni do wniosku, że RNA, nazwany później transportującym RNA lub tRNA, funkcjonuje jako pośredni nośnik aminokwasów w procesie syntezy białek [16].

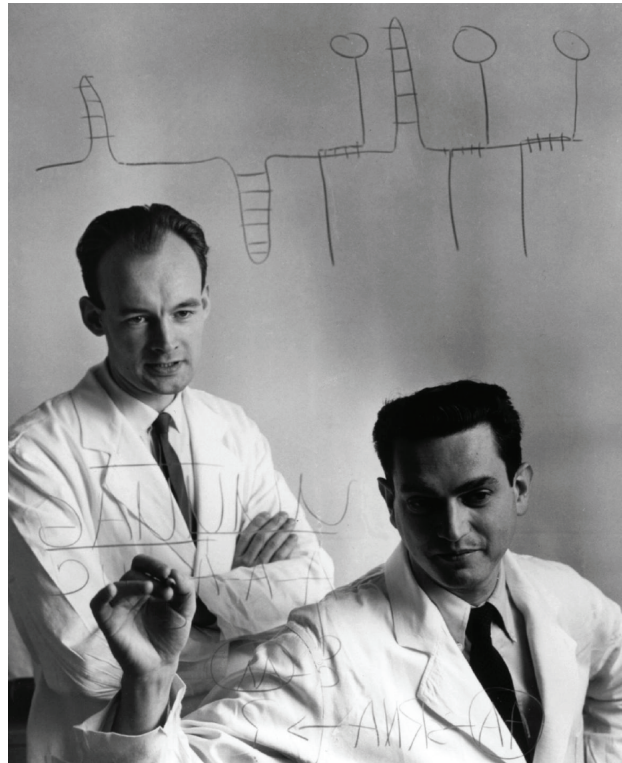
Kluczowe doświadczenie – rok 1961

W 1959 roku Marshall W. Nirenberg w National Institutes of Health (NIH) podjął eksperymentalne próby odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób informacja zawarta w DNA ulega ekspresji w postaci białek. Zakładał, że sekwencja aminokwasów w białkach jest kodowana w kwasach nukleinowych, ale nie wiedział, w jaki sposób i które cząsteczki w tym uczestniczą. Pierwszym pytaniem było, czy DNA lub RNA są w stanie stymulować włączanie aminokwasów do białek w układzie bezkomórkowym?

Leon A. Heppel, Maxine Singer i inni [17] syntetyzowali RNA składający się z powtórzeń pojedynczych zasad. Wykorzystując fosforylaze polinukleotydową, uzyskali homopolimery poli-(U), cząsteczki RNA składające się wyłącznie z reszt urydyny.

Na początku 1961 roku Peter Lengyel i Joseph Speyer, podczas pracy w laboratorium Severo Ochoa, rozpoczęli pracę nad systemem syntezy białka w układzie pozakomórkowym. Chcieli oni zastosować syntetyczne poliribonukleotydy o znanym składzie uzyskane z pomocą fosforylazy polinukleotydowej w roli mRNA do bezpośredniego włączania aminokwasów do białek [18]. Hipoteza była bardzo fascynująca, a laboratoria Ochoa i Nirenberga zaangażowały się w wysoce konkurencyjny wyścig do rozwiązania zagadki kodu genetycznego.

W przełomowym eksperymencie zaprojektowanym przez Nirenberga i Matthaei (ryc. 2), który przeprowadzono w sobotę, 27 maja 1961 roku, o 3 nad ranem (!), poli-(U) inkubowano w ekstrakcie *Escherichia coli* w pożywce zawierającej znakowaną węglem [^{14}C] fenyloalaninę. Rezultaty były jednoznaczne. Poli-(U) koduje fenyloalaninę (ryc. 3). Kolejne eksperymenty potwierdziły, że poli-(U) jest matrycą do syntezy polifenyloalaniny i że kod składa się z trzech nukleotydów, czyli tripletu UUU. W podobny sposób na matrycy poli-(C) otrzymano poliprolinę i ustalono, że pojedynczy aminokwas kodowany jest przez CCC. W obecności ekstraktu *E. coli* i oczyszczonego RNA aminokwasy określone przez grupy zasad zwane kodonami były włączane do białek. Związek między RNA i jego sekwencją nukleotydową, która koduje kolejność aminokwasów w białku, stał się faktem [17, 19].



Ryc. 2. Marshall Warren Nirenberg (po prawej) oraz Johann Heinrich Matthaei podczas projektowania eksperymentów translacji *in vitro* w celu rozwikłania kodu genetycznego. Zdjęcie zrobiono w roku 1962 w the National Institutes of Health w Bethesda w Maryland (udostępnione przez the National Institutes of Health, USA)

27-Q in cub. 5-27-61, 3 a.m. for 60' at 36°, 10% CH₂Cl₂ 60' 100% EtOH.

(see M1, p. 107) ✓

#	System	Special treatment	no. tubes	cpm (total)	cpm (total)	cpm (total)
1	Complex		60	50.53	202	167
2	Complex		60	48.69	210	144
3		+ 10% Poly-U	50	2.69	3810	3748 26x (23x)
4		+ 100% RNAase	50	261.73	39.2	>?
5		# O-t.	50	164.12	62.4	>?
6			60	113.29	90	>92
7	Complex		60	108.39	94	36
8		+ 10% Poly-U	50	94.81	108 108	52 1.45x
9		+ 100% RNAase	50	181.87	56 56	0
10		at O-t.	50	184.48	55.5	

Ryc. 3. Kopia strony z zeszytu laboratoryjnego Heinricha Matthaei'sa z opisem warunków eksperymentu z poli(U) wykonanego 27 maja 1961 roku o 3 rano w the National Institutes of Health w Washington DC. Eksperyment prowadził do wniosku, że sekwencja UUU koduje fenylalaninę podczas syntezy białka na rybosomie (udostępnione przez Heinrich Matthaei, Göttingen)

Kluczowym etapem odkrycia kodu było wytrącanie homopolipeptydów w kwasie trichlorooctowym (TCA). Polifenyloalanina oraz poliprolina nie są rozpuszczalne w TCA i łatwo można je odzyskać jako osady na filtrach. Polilizyna, która jest rozpuszczalna w TCA, może być wytrącona w mieszaninie kwasu trichlorooctowego-wolframianu (TCA/ W04). W pierwszych eksperymentach z poli-(A) i znakowaną [¹⁴C] lizyną, TCA nie wytrącał polilizyny i dlatego jej synteza na matrycy poli-(A) nie została wykryta.

Co ciekawe, Nirenberg i Matthaei wykazali również, że tylko jednoniciowy poli-(U), a nie dwuniciowy czy heterodupleksy poli-(U) – poli-(A) może pełnić funkcję matrycowego RNA (mRNA). W rzeczywistości wynik ten i wspomniane wcześniej obserwacje Aleksandra Richa były pierwszymi badaniami dotyczącymi antysensownych RNA!

Kod genetyczny

Do roku 1966 zidentyfikowano 64 potencjalne kodony trójnukleotydydowe. Ponieważ RNA zbudowany jest z czterech rodzajów nukleotydydów, istnieją 64 możliwe sekwencje trójkowe (4^3). Trzy z tych możliwych kodonów określają terminację łańcucha polipeptydowego (tzw. kodony „stop”), a pozostałe 61 – 20 różnych aminokwasów. Z tego powodu większość aminokwasów może być zapisana przez więcej niż jeden kodon [17, 20]. W kolejnych doświadczeniach M. Nirenberg pokazał, że ten sam kod dotyczy innych organizmów i zasugerował, że występuje on u wszystkich gatunków na Ziemi [21].

W 1965 roku Nirenberg z pomocą kolegów z NIH Mertona Bernfielda, Leona Hoppela, Philipa Ledera oraz Maxine Singer byli pierwszymi, którzy zakończyli definiowanie kodu genetycznego. Można było zaprezentować kod genetyczny w postaci graficznej. Patrząc na sekwencje nukleotydydów, czytelnik może zidentyfikować odpowiedni aminokwas. W celu odczytania kodu należy wybrać literę z lewej, górnej i prawej kolumny (tabela 1).

Na początku lat 60. Har Gobind Khorana potwierdził i rozszerzył koncepcję kodu genetycznego dzięki zastosowaniu chemicznej syntezy dezoksyrybonukleotydydów o znanej sekwencji zasad. Wykazał również, że kwasy nukleinowe kierują włączaniem określonych aminokwasów do białek [22]. Z jednej strony kod genetyczny jest jednoznaczny, co oznacza, że każdy kodon określa tylko jeden aminokwas. Z drugiej strony jest także zdegenerowany, czyli jeden aminokwas może być określony przez więcej niż jeden kodon. Największe znaczenie mają pierwsze dwie zasady, trzecia odgrywa mniejszą rolę. Na przykład, cztery triplety określające glicynę (GGU, GGC, GGA i GGG) zaczynają się od GG (tabela 1). Kodony o podobnej sekwencji określają aminokwasy o zbliżonych właściwościach chemicznych. Te, które określają treoninę, różnią się od tych dla seryny nukleotydem przy końcu 5'. Triplety dla kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego różnią się tylko w pozycji 3. Kodony, które zawierają pirymidynę w pozycji środkowej, z reguły określają aminokwas hydrofobowy.

Tabela 1. Współczesna wersja tabeli kodu genetycznego zawierająca wszystkie dotychczas zidentyfikowane odstępstwa od wersji podstawowej [26]

KOD GENETYCZNY

		Druga litera kodonu				
		U	C	A	G	
Pierwsza litera kodonu	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr Gln Leu Ala Gln Pyl	Cys Cys Trp Sec	U C A G
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	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 Ser Gly Gly	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

Odstępstwa od standardowego kodu. Liczby w nawiasach odnoszą się do tabeli kodu w bazach GenBank/EMBL (lista pod tabelą)

UUA kodon stop w mitochondriach *Thraustochytrium* (23); kodon inicjatorowy w mitochondriach pierwotniaków i *Mycoplasma/Spiroplasma* (4);
 UUG kodon inicjatorowy w standardowym (1), bakteryjnym (11) i niektórych mitochondrialnych kodach (4,5,13);
 UCA kodon stop w mitochondriach *Scenedesmus obliquus* (22);
 UAA Gln w kodzie jądrowym orzęsków (6); Tyr w alternatywnym kodzie mitochondrialnym plazińców (14); Pyl (pyrrolizyna) u Archaea (*Methanosarcinaceae*) czytany przez PytRNA;
 UAG Gln w kodzie jądrowym orzęsków (6,15); Leu w kodach mitochondrialnych Chlorophyceae, and *Scenedesmus* (16,22);
 UGA Trp w kodach mitochondrialnych (2,3,4,5,9,13,14,21); Cys w kodzie jądrowym *Euplofea* (10); Sec (selenocysteina) zależnie od obecności elementu SECIS (SElenoCysteine Insertion Sequence) w mRNA;
 CUU Thr w kodzie mitochondrialnym drożdży (3);
 CUC Thr w kodzie mitochondrialnym drożdży (3);
 CUA Thr w kodzie mitochondrialnym drożdży (3);
 CUG Thr w kodzie mitochondrialnym drożdży (3); w alternatywnym kodzie mitochondrialnym drożdży (12); kodon inicjatorowy w kodzie standardowym (1) bakteryjnym (11) i niektórych mitochondrialnych (4,12);
 AUU kodon inicjatorowy w kodach bakteryjnym (11) i mitochondrialnych (2,4,5,23);
 AUC kodon inicjatorowy w kodach bakteryjnym (11) i mitochondrialnych (2,4,5);
 AUA Met w kodach mitochondrialnych kregowców (2); drożdży (3) i niektórych bezkregowców (5,13,21); kodon inicjatorowy w kodach bakteryjnym (11) i mitochondrialnych (2,3,4,5,13);
 AAA Asn w kodach mitochondrialnych plazińców (9,14,21) i szkarłupki (9);
 AGA kodon stop w mitochondriach kregowców (2); Gly w mitochondriach zachw (13); Ser w kodach mitochondrialnych (5,9,14,21);
 AGG kodon stop w mitochondriach kregowców (2); Gly w mitochondriach zachw (13); Ser w kodach mitochondrialnych (5,9,14,21);
 GUG kodon inicjatorowy w kodach bakteryjnym (11) i mitochondrialnych (2,4,5).

Tabela kodu genetycznego. Kodony inicjatorowe i terminatorowe są oznaczone odpowiednio zielonymi kropkami i znakami STOP. W prawej kolumnie zaznaczono odstępstwa od standardowego kodu kolorami zielonym (20 podstawowych aminokwasów), pomarańczowym (selenocysteina i pyrrolizyna) i małymi symbolami (kodony inicjatorowe i stop). Żółte to oznaczają kodony nie wykorzystywane przez niektóre organizmy. Kodony inicjatorowe i terminatorowe w standardowym kodzie oznaczone są dużymi znakami.

Aminokwasy: Ala-Alanina, Arg-Arginina, Asn-Asparagina, Asp-Kwas asparaginowy, Cys-Cysteina, Gln-Glutamina, Glu-Kwas glutaminowy, Gly-Glicyna, His-Histydyna, Ile-Izoleucyna, Leu-Leucyna, Lys-Lizyna, Met-Metionina, Phe-Fenylalanina, Pro-Prolina, Pyl-Pyrrolizyna, Sec-Selenocysteina, Ser-Seryna, Thr-Treonina, Trp-Tryptofan, Tyr-Tyrozyna, Val-Walina.

Numer tabeli kodu wg GenBank. 1. kod standardowy; 2. kod mitochondrialny kregowców; 3. kod mitochondrialny drożdży; 4. kod mitochondrialny pierwotniaków, jamochłonów oraz niektórych bakterii (*Mycoplasma/Spiroplasma*); 5. kod mitochondrialny bezkregowców; 6. kod jądrowy orzęsków; 9. kod mitochondrialny szkarłupki i orzęsków; 10. kod jądrowy *Euplofea*; 11. kod bakteryjny i plastydowy; 12. alternatywny kod mitochondrialny drożdży; 13. kod mitochondrialny zachw; 14. alternatywny kod mitochondrialny plazińców; 15. kod jądrowy *Blepharisma*; 16. kod mitochondrialny Chl. orczykowiec; 21. kod mitochondrialny Trematoda; 22. kod mitochondrialny *Scenedesmus obliquus*; 23. kod mitochondrialny *Thraustochytrium*. (Źródło: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi>)

Według: Maciej Szymanski, Jan Barciszewski, The genetic code - 40 years on, *Acta Biochimica Polonica* 54, 51-54, 2007.

Mutacje tych kodonów prowadzą do zastąpienia aminokwasów innymi, podobnymi chemicznie. Kodony „stop” powodują zakończenie biosyntezy białka na rybosomie. W szczególnych warunkach kodon AUG dla metioniny może być używany jako kodon start [23].

Odstępstwa od kodu genetycznego

Mitochondrialny DNA człowieka koduje tylko 22 rodzaje tRNA, które są używane do translacji mitochondrialnych mRNA. Zasada „U” w antykodonie tRNA może oddziaływać z każdą z czterech zasad w trzeciej pozycji kodonu w mRNA (hipoteza wahadła). Dzięki temu cztery triplety w mRNA mogą zostać rozpoznane przez jeden tRNA. Zidentyfikowano wiele różnic w kodonach genomów jądrowych, jak i mitochondrialnych [24]. Są to zamiany typu „stop-to-sens”, „sens-to-sens” oraz „sens-to-stop”. Główną różnicę w mitochondriach stanowi kodowanie przez UGA tryptofanu realizowane przez tRNA^{Trp} z mutacją w antykodonie. Ponadto w mitochondriach kilku gatunków drożdży AUA koduje metioninę zamiast izoleucyny poprzez nieprawidłowe rozpoznanie AUA przez tRNA^{Met} [24]. Obecnie tabela kodu genetycznego została rozszerzona o wiele informacji (tabela 1) [25, 26]. Najnowsze wyniki badań pokazują, że kodony „stop” mogą być interpretowane jako kodujące w wyniku prostej modyfikacji reszt urydyny (poliurydylacja) [27].

Rola RNA i rybosomów w biosyntezie białka

W 1958 roku Georg E. Palade odkrył rybosomy [20]. U prokariotów składają się one z ponad 50 indywidualnych białek oraz trzech dużych rybosomalnych RNA. Są one odpowiedzialne za tworzenie wiązania peptydowego. Wczesne badania biochemiczne i fizyczne ukazały obraz ogólnej struktury, reakcji biochemicznych i molekularnych interakcji, które odbywają się w rybosomach w trakcie biosyntezy białka [28, 29]. Jak się okazało, synteza łańcucha polipeptydowego jest niezwykle złożoną reakcją. Składa się z etapów inicjacji, wydłużania i terminacji. Te z kolei wymagają kilku różnych stanów konformacyjnych rybosomu. Zmiany te w procesie syntezy białka są zwykle kontrolowane przez czynniki translacji i hydrolizę GTP. W ostatnim czasie uczyniono duży postęp w tej dziedzinie poprzez połączenie technik mikroskopii krioelektronowej i krystalografii rentgenowskiej [30]. Kluczowa rola RNA (mRNA) została wyjaśniona przez François Jacoba, Jacquesa Monoda i Sydneya Brennera w 1961 roku [31].

Przełomowy eksperyment, który potwierdził biologiczne znaczenie aminoacylacji właściwego tRNA do prawidłowego odczytania kodu genetycznego przeprowadził w 1962 roku Francois Chapeville [32]. Wykazał on, że właściwość kodowania przez cząsteczkę adaptorową nie jest określana przez niesiony aminokwas, ale poprzez oddziaływanie aminoacylowanego tRNA z matrycą mRNA. Zaobserwowano, że cysteinylowy tRNA^{Cys} oraz alanylo-tRNA^{Cys} są donorami obu aminokwasów do syntezy polipeptydów na rybosomach w systemie poli (UG) dla włączania cysteiny [32].

W 1965 roku zsekwencjonowano pierwszy tRNA^{Ala} w laboratorium Roberta Holleya [33]. W wyścigu do poznania sekwencji pierwszego tRNA Hans Zachau i jego współpracownicy byli również bardzo bliscy sukcesu, ale przygotowany przez nich tRNA^{Ser} w rzeczywistości zawierał dwa specyficzne tRNA [34]. Trzeci tRNA (tRNA^{Phe}) zsekwencjonował U. RajBhandary w 1967 roku, pracując jako adiunkt w pracowni Khorany [35]. Pracę RajBhandary'ego szczególnie warto wspomnieć, ponieważ był to pierwszy tRNA, którego struktura 3D została rozwiązana metodami krystalografii rentgenowskiej przez Aleksandra Richa w Cambridge w USA [36] oraz Aarona Kluga w Cambridge w Anglii [37]. Badania te wykazały, że struktura drugorzędowa „liścia koniczyny” tRNA^{Phe}, związując się, przyjmuje kształt litery „L”. Późniejsze badania strukturalne z innymi tRNA potwierdziły, że kształt litery „L” ma charakter uniwersalny.

Pierwsze informacje, że struktura rybosomów może być badana metodami krystalografii rentgenowskiej, pojawiły się w pracy Ady Yonath i jej współpracowników w Berlinie już w 1980 roku, gdzie po raz pierwszy wykrystalizowano rybosomy [38]. Pierwsze kryształy uzyskano dla rybosomalnych podjednostek 50S z *Bacillus stearothermophilus*, ale metody rozwiązywania struktury tak dużego kompleksu rybonukleoproteinowego nie były w tym czasie znane [29]. W rzeczywistości minęło ponad dwadzieścia lat, zanim struktury rybosomów mogły być wyjaśnione w laboratoriach A. Yonath [39], T. Steitza [40],

V. Ramakrishnana [41] i H. Nollera [42]. Najnowsze struktury o wysokiej rozdzielczości wniosły wiele cennych informacji dotyczących nie tylko budowy, ale także funkcji rybosomów. Obecnie możliwe jest zlokalizowanie różnych tRNA w miejscach A, P i E rybosomu, które zostały odkryte przez K. Nierhausa i jego współpracowników [43] oraz określenie ich interakcji z kodonami mRNA [44].

Problem rozwiązany

Rozszyfrowanie kodu genetycznego zmieniło oblicze nie tylko biologii molekularnej. Przyczyniło się także do narodzin nowoczesnej biotechnologii, projektu poznania genomu człowieka (ang. *Human Genome Project*) i nowych odkryć, które pogłębiły wiedzę na temat podstaw życia i zmienności z pokolenia na pokolenie. Pomogło to lepiej zrozumieć procesy komórkowe, czynniki niezbędne do wzrostu komórek oraz sposób, w jaki cechy przekazywane są następnym pokoleniom. Być może ważniejsze dla społeczeństwa jest to, że wchodzimy obecnie w nową fazę medycyny molekularnej, która będzie prowadzić w kolejnych etapach do rozwoju bardzo obiecującej dziedziny medycyny spersonalizowanej i medycyny regeneracyjnej, w których każdy pacjent będzie traktowany zgodnie z jego osobistymi potrzebami.

Ekonomiczny wpływ takiego projektu jak Human Genome Project (HGP), zainicjowanego przez Stany Zjednoczone w 1988 roku przy wsparciu finansowym 3,8 mld dol. zależał od znajomości kodu genetycznego. Jak podsumowano w ostatnim raporcie „Economic Impact of Human Genome Project” [45], stało się jasne, że opłacało się społeczeństwu amerykańskiemu inwestować w początkowe etapy sekwencjonowania ludzkiego genomu. W USA otrzymano zyski rzędu 800 miliardów dolarów w dziedzinie biologii molekularnej, biotechnologii i medycyny. Część tej kwoty wykorzystano do zapłaty prawie 250 mld dol. wynagrodzeń dla 310 000 pracowników oraz tylko w 2010 roku 3,7 miliarda dolarów podatków dla rządu Stanów Zjednoczonych Ameryki.

Z pewnością początkowe eksperymenty przeprowadzone przez Nirenberga i Mathaei 50 lat temu warto pamiętać, jako jeden z klasycznych eksperymentów w dziedzinie biologii.

Piśmiennictwo

- [1] Orel V., Wood R.J. *Essence and origin of Mendel's discovery*. „C. R. Acad. Sci. III” 2000, 323, s. 1037-1041.
- [2] Roll-Hansen N. *The Crucial Experiment of Wilhelm Johannsen*. „Biol. Philos.” 1989, 4, s. 303-329.
- [3] 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 desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III*. „J. Exp. Med.” 1944, 79, s. 137-158.

- [4] Hershey A.D., Chase M., *Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacte-riophage*. „J. Gen. Physiol.” 1952, 36, s. 39-56.
- [5] Chargaff E., Zamenhof S., Green C., *Composition of human desoxypentose nucleic acid*. „Nature” 1950, 165, s. 756-757.
- [6] Watson J.D., Crick F.H.C., *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. „Nature” 1953, 171, s. 737-738.
- [7] Ochoa S., *The Chemical Basis of Heredity – The Genetic Code*. „Experientia” 1964, 20, s. 57-69.
- [8] Rose I.A., Grunberg-Manago M., Korey S.R., Ochoa S., *Enzymatic phosphorylation of acetate*. „J. Biol. Chem.” 1954, 211, s. 737-756.
- [9] Rich A., Davies D.R., *A new two-stranded helical structure: polyadenylic acid and polyuridylic acid*. „J. Amer. Chem. Soc.” 1956, 78, s. 3548-3549.
- [10] Varshavsky A., *Discovering the RNA double helix and hybridization*. „Cell” 2006, 127, s. 1295-1297.
- [11] Meselson M.S., Stahl F.W., *The replication of DNA in Escherichia coli*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1958, 44, s. 671-682.
- [12] Gabryelska M.M., Szymański M., Barciszewski J. *DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć*. „Nauka” 2009, 2, s. 111-134.
- [13] 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.
- [14] Gamov G., *Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structure*. „Nature” 1954, 173, s. 318-320.
- [15] Crick F.H., *On protein synthesis*. „Symp. Soc. Exp. Biol.” 1958, 12, s. 138-163.
- [16] Hoagland M.B., Stephenson M.L., Scott J.F., Hecht L.I., Zamecnik P.C., *A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis*. „J. Biol. Chem.” 1958, 231, s. 241-257.
- [17] Nirenberg M., *Historical review: Deciphering the genetic code – a personal account*. „Trends Biochem. Sci.” 2004, 29, s. 46-54.
- [18] Lengyel P., Speyer J.F., Ochoa S., *Synthetic polynucleotides and the amino acid code*. „Proc. Natl. Acad. Sci.” USA 1961, 47, s. 1936-1942.
- [19] Nirenberg M.W., Matthaei J.H., *The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1961, 47, s. 1588-1602.
- [20] Palade G.E., *A small particulate component of the cytoplasm*. „J. Biophys. Biochem. Cytol.” 1955, 1, s. 59-68.
- [21] Marshall R.E., Caskey C.T., Nirenberg M.W., *Fine structure of RNA codewords recognized by bacterial, amphibian, and mammalian transfer RNA*. „Science” 1967, 155, s. 820-826.
- [22] Khorana H.G., *Polynucleotide synthesis and the genetic code*. „Fed. Proc.” 1965, 24, s. 1473-1487.
- [23] Crick F.H., *Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis*. „J. Mol. Biol.” 1966, 19, s. 548-555.
- [24] Sengupta S., Yang X., Higgs P.G., *The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes*. „J. Mol. Evol.” 2007, 64, s. 662-688.
- [25] Wang Q., Parrish A.R., Wang L., *Expanding the genetic code for biological studies*. „Chem. Biol.” 2009, 16, s. 323-336.
- [26] Szymański M., Barciszewski J., *The genetic code – 40 years on*. „Acta Biochim. Polon.” 2007, 54, s. 51-54.

- [27] Karijolic J., Yu Y., *Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation*. „Nature” 2011, 474, s. 395-398.
- [28] de Chadarevian S., Rheinberger H.J., *Introduction*. History of molecular biology. „Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.” 2009, 40, s. 4-5.
- [29] Sprinzl M., Erdmann V.A., *Protein biosynthesis on ribosomes in molecular resolution: Nobel Prize for chemistry 2009 goes to three chemical biologists*. „Chem. Biochem” 2009, 10, s. 2851-2853.
- [30] Nierhaus K.H., *Nobel Prize for the elucidation of ribosome structure and insight into the translation mechanism*. „Angew. Chem. Int. Ed. Engl.” 2009, 48, s. 9225-9228.
- [31] Jacob F., Monod J., *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. „J. Mol. Biol.” 1961, 3, s. 318-356.
- [32] Chapeville F., Lipmann F., von Ehrenstein G., Weisblum B., Ray Jr W.J., Benzer S., *On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1962, 48, s. 1086-1092.
- [33] Holley R.W., Apgar J., Everett G.A., Madison J.T., Marquisee M., Merrill S.H., Penswick J.R., Zamir A., *Structure of a ribonucleic acid*. „Science” 1965, 147, s. 1462-1465.
- [34] Zachau H.G., Dütting D., Feldmann H., *Nucleotide sequences of two serine-specific transfer ribonucleic acids*. „Angew. Chem. Int. Ed. Engl.” 1966, 5, s. 422-422.
- [35] Rajbhandary U.L., Chang S.H., Stuart A., Faulkner R.D., Hoskinson R.M., Khorana H.G., *Studies on polynucleotides, LXVIII The primary structure of yeast phenylalanine transfer RNA*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1967, 57, s. 751-758.
- [36] Kim S.H., Suddath F.L., Quigley G.J., McPherson A., Sussman J.L., Wang A.H., Seeman N.C., Rich A., *Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA*. „Science” 1974, 185, s. 435-440.
- [37] Robertus J.D., Ladner J.E., Finch J.T., Rhodes D., Brown R.S., Clark B.F., Klug A., *Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution*. „Nature” 1974, 250, s. 546-551.
- [38] Yonath A., Mussig J., Tesche B., Lorenz S., Erdmann V.A., Wittmann H.G., *Crystallization of the large ribosomal subunits from Bacillus stearothermophilus*. „Biochem. Int.” 1980, 1, s. 428-435.
- [39] Yonath A., *Polar bears, antibiotics, and the evolving ribosome (Nobel Lecture)*. „Angew. Chem. Int. Ed. Engl.” 2010, 49, s. 4341-4354.
- [40] Steitz T.A., *From the structure and function of the ribosome to new antibiotics (Nobel Lecture)*. „Angew. Chem. Int. Ed. Engl.” 2010, 49, s. 4381-4398.
- [41] Ramakrishnan V., *Unraveling the Structure of the Ribosome (Nobel Lecture)*. „Angew. Chem. Int. Ed. Engl.” 2010, 49, s. 4355-4380.
- [42] Korostelev A., Laurberg M., Noller H.F., *Multistart simulated annealing refinement of the crystal structure of the 70S ribosome*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 2009, s. 18195-18200.
- [43] Nierhaus K.H., Brimacombe R., Nowotny V., Pon C.L., Rheinberger H.J., Wittmann-Liebold B., Wittmann H.G., *New aspects of structure, assembly, evolution, and function of ribosomes*. „Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.” 1987, 52, s. 665-674.
- [44] Di Giacomo V., Márquez V., Qin Y., Pech M., Triana-Alonso F.J., Wilson D.N., Nierhaus K.H., *Shine-Dalgarno interaction prevents incorporation of noncognate amino acids at the codon following the AUG*. „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 2008, 105, s. 10715-10720.
- [45] Zwahlen R., *Battelle Report: \$3.8 Billion Investment in Human Genome Project Drove \$796 Billion in Economic Impact Creating 310,000 Jobs and Launching the Genomic Revolution*. „Biotech-now on line”, 11 May 2011.

Odyssey 1961: 50 years of the genetic code

This year we are celebrating the 50th anniversary of the discovery of the genetic code, which turned out to be universal for all living organisms on earth. In 1961 Marshall Warren Nirenberg and Johann Heinrich Matthaei set up an in vitro translation system composed of purified bacterial ribosomes and a fraction of low molecular weight RNA and demonstrated that poly-uridilic acid codes for polyphenylalanine. This was how the genetic code started to be revealed. Important developments that led to its discovery and key experience associated with it are very interesting and inspiring area of the history of science. Its influence on the development of biological sciences, especially molecular biology and medicine is indisputable.

Key words: genetic code, DNA, RNA, protein biosynthesis