1. **Történeti áttekintés**

1.1. A molekuláris biológia története

A molekuláris biológia egy viszonylag fiatal tudományág. Születésének pontos időpontját nehéz lenne meghatározni, magát a kifejezést először **Warren Weaver** matematikus használta 1938-ban. Szerinte az élet nem volt más, mint fizikai és kémiai folyamatok összessége, ezen folyamatok **vizsgálati eszköztárát** nevezte ő molekuláris biológiának. Általánosan azt mondhatjuk, hogy a tudományterület elsősorban az élet szubcelluláris összetevőinek, azon belül is főleg az élethez szükséges szerves makromolekulák (elsősorban fehérjék és nukleinsavak) tulajdonságainak megfigyelését és megváltoztatását lehetővé tévő **technikák összessége**.

A molekuláris biológia tudományának fejlődése összefonódik a nukleinsavak megismerésének történetével. 1869-ben **Friedrich Miescher** svájci orvos és biológus (1-1. ábra) izolált sejtmagból egy foszfátgazdag anyagot, melyet **„mag-anyagnak” (nuclein)** nevezett el. 1889-ben **Richard Altmann** német patológus fedezte fel a maganyag **savas természetét**, és ő használta rá először a **nukleinsav** elnevezést. A nukleinsavakban lévő bázisok (adenin, guanin, citozin, uracil, timin) felfedezése és elnevezése **Albrecht Kossel** német orvos (1-2. ábra) nevéhez fűződik, aki 1885 és 1901 között végezte ez irányú kutatásait. A nukleinsavakban jelen lévő **ribóz és dezoxiribóz** felfedezése **Phoebus Levene** litván/amerikai biokémikus (1-3. ábra) nevéhez fűződik. Ugyancsak az ő nevéhez fűződik a **nukleotidok pontos szerkezetének**, és egymáshoz **cukor-foszfát kötéssel** való kapcsolódásuknak felfedezése is (1919), bár ő még úgy gondolta, hogy a négyféle nukleotid egymáshoz kapcsolódva gyűrűszerű tetranukleotidokat képez. Egészen 1950-ig ez volt az általánosan elfogadott vélemény, amikor is **Erwin Chargaff**(1-4. ábra) kimutatta, hogy a DNS-ben az adeninnek és atiminnek, valamint a guaninnak és a citozinnak a mennyisége **páronként megegyezik** (A%=T%, G%=C%). Ezt az összefüggést nevezzük az **első Chargaff-szabálynak**. A DNS kettős hélixének szerkezetét végül **Rosalind Franklinnak**, **James Watsonnak** és **Francis Cricknek** sikerült megfejteni 1953-ban (1-5. ábra, 1-6. ábra), Utóbbi kettő a felfedezésért Nobel-díjat is kapott **Maurice Wikins** fizikussal együtt.

1-1. ábra

http://www.mun.ca/biology/scarr/Friedrich\_Miescher.jpg

2013.08.01.

1-2. ábra

http://www.nobelprize.org/nobel\_prizes/medicine/laureates/1910/kossel\_postcard.jpg

2013.08.01.

1-3. ábra

http://ihm.nlm.nih.gov/luna/servlet/detail/NLMNLM~1~1~101421671~182946:-Dr--Phoebus-A--Levene--Photo-by-Lo?printerFriendly=1

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f0/Tetranucleotide\_.png/220px-Tetranucleotide\_.png

2013.08.01.

1-4. ábra

http://www.cumc.columbia.edu/psjournal/archive/winter-2004/img/fr\_chargaff.jpg

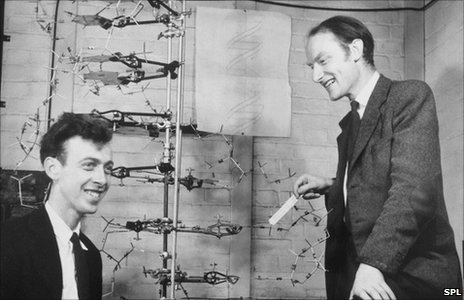
http://www.xtimeline.com/\_\_UserPic\_Large/85629/evt101129162000704.jpg

2013.08.01.

1-5. ábra

http://sciencemadefun.net/blog/wp-content/uploads/2013/07/rosalindfranklin\_photo51.jpg

2013.08.01.



1-6. ábra

http://m.cdn.blog.hu/cr/criticalbiomass/image/post\_img/2013/05/Watson\_Crick.jpg

http://sp.life123.com/bm.pix/biography3.s600x600.jpg

2013.08.01.

A nukleinsavak szerkezetének felfedezésén kívül más nagyon fontos felfedezések is szükségesek voltak a molekuláris biológia tudományterületének fejlődéséhez. Mindenképp említést kell tennünk **Emil Fischer** német kémikusról (1-7. ábra), aki a XIX. század végén és a XX. század elején igen jelentős felfedezéseket tett többek között a **szénhidrátok és a fehérjék szerkezetének** megismerésében. Többek között Fisher tudta először a sztereoizomereket elkülöníteni egymástól, ő szintetizált először monoszacharidokat, peptideket.

A tudósok körében egészen a XX. század közepéig vita volt arról, hogy a tulajdonságok átörökítésében a fehérjéknek, vagy a nukleinsavaknak van-e szerepe. A többség a fehérjék örökítő szerepét támogatta. Látszólag ezt az elméletet támogatta az a tudományos megfigyelés, mely az **egy gén – egy enzim** hipotézishez vezetett (**George Beadle**, **Edward Tatum**, 1941). Bár **Fred Griffith** 1928-ban híres kísérlete alapján már feltételezte, hogy az **örökítőanyag nem fehérje.** Kísérletében kétféle, patogén és nem patogén baktériummal fertőzött egereket. Észrevette, hogy a hővel elölt patogén baktériumok önmaguk nem pusztították el az egereket, de azokat élő, nem patogén baktériumokkal együtt injektálták, akkor az egerek elpusztultak. Ebből arra következtetett, hogy a patogén baktérium hővel történt kezelése után is megtartotta „transzformáló” tulajdonságát (1-8. ábra). Valódi áttörést azonban csak az 1944-ben publikált **Avery–MacLeod–McCarty-kísérlet** hozott. Ebben az elölt baktériumok különböző makromolekuláit (RNS, DNS, fehérje, szénhidrát, lipid) izolálták, és kiderítették, hogy csak a **DNS-nek volt transzformáló aktivitása** (a patogén baktériumból izolált DNS nem patogén baktériummal keverve megölte a kísérleti állatot, míg a többi összetevőnek nem volt ilyen hatása) (1-9. ábra). Egy másik, 1952-ben publikált kísérlet igazolta ezt az elméletet. A **Hershey–Chase**-kísérletben radioaktív foszforral, illetve radioaktív kénnel jelölt bakteriofágokkal fertőzött baktériumokból nyert bakteriofágok radioaktivitását vizsgálták. A kapszidok leválasztása után csak a radioaktív foszfort tartalmazó fágok által fertőzött baktériumok lettek radioaktívak. Ezzel a kísérlettel azt sikerült bizonyítani, hogy a baktériumba bejutó DNS tartalmazza a fágok szaporodásához szükséges örökítőanyagot, nem pedig a baktérium felszínén maradó, fehérjékből álló fág-kapszid (1-10. ábra).

1-7. ábra

http://www.nobelprize.org/nobel\_prizes/chemistry/laureates/1902/fischer.jpg

2013.08.01.

1-8. ábra

http://www.evi.com/images/thumbs/180/250/dca2bfb7e4db77887c0e5318b5ba0971.jpg

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6a/Griffith\_experiment.svg/450px-Griffith\_experiment.svg.png

2013.08.02.

1-9. ábra

http://www.xtimeline.com/\_\_UserPic\_Large/170191/evt120221194300189.jpg

http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/KH\_lecture\_images/How\_DNA\_works/FG11\_02.JPG

2013.08.02.

1-10. ábra

http://dnabioc.wikispaces.com/file/view/hersheychase1953.jpg/33687967/hersheychase1953.jpg

http://biologytb.net23.net/text/chapter11/11images/11-04.gif

2013.08.02.

Az 1950-es évektől kezdődő több mint három évtized rengeteg új molekuláris biológiai felfedezést hozott. 1956-ban felfedezték az első, DNS-polimerizációt katalizáló enzimet (**E. coli DNS-polimeráz I**, **Arthur Kornberg**) (1-11. ábra). Bár már évek óta feltételezték létezését, 1960-ban sikerült először az **mRNS** molekulák létét bizonyítani. 1961-ben történt az első áttörés a genetikai kód megfejtésében, amikor **Marshall Nirenberg** és munkatársai kimutatták, hogy a poliuracilt tartalmazó RNS polifenilalanin peptidet kódol. Nirenberg, majd **Har Gobind Khorana** segítségével sikerült a teljes, minden tripletet tartalmazó **kódszótárt** 1966-ig megalkotni. Kettejükkel együtt **Robert Holley** is Nobel-díjat kapott 1968-ban, ő az átíráshoz szükséges **tRNS** felfedezéséért (1-12. ábra). Az első **restrikciós hasításért** felelős enzimek jelenlétét **Werner Arber** fedezte fel 1962-ben, a restrikciós enzimek használatának kifejlesztéséért a molekuláris biológiában **Daniel Nathans**szal és **Hamilton Smith**-szel együtt kapott Nobel-díjat 1978-ban (1-13. ábra). Smith 1970-ben karakterizálta az első **restrikciós endonukleázt**, Nathans készítette el az első **restrikciós térképet** 1972-ben (az **SV40 vírusét**). **Paul Berg** (1-14. ábra) nevéhez fűződik az első, restrikciós endonukleázzal hasított DNS-darabok összeligálása, ezáltal az első **rekombináns DNS** létrehozása (1972). **Herbert Boyer** és **Stanley Cohen** (1-15. ábra) a rekombináns DNS-t már egy **élőlénybe** (*E. coli*) juttatta, ahol a genetikai anyag képes volt replikálódni, és **továbbörökítődni**.

1-11. ábra

http://www.nobelprize.org/nobel\_prizes/medicine/laureates/1959/kornberg.jpg

2013.08.03.

1-12. ábra

http://history.nih.gov/exhibits/nirenberg/images/photos/00\_portrait.jpg

http://im.rediff.com/news/2011/nov/24khorana2.jpg

http://www.nndb.com/people/316/000129926/robert-w-holley.jpg

http://www.virology.ws/wp-content/uploads/2011/11/genetic\_code.gif

2013.08.03.

1-13. ábra

http://www.nndb.com/people/478/000131085/werner-arber.jpg

http://www.asbmb.org/uploadedfiles/AboutUs/ASBMB\_History/nobel\_winners/images/nobel\_big/1978Nathans.jpg

http://www.nobelprize.org/nobel\_prizes/medicine/laureates/1978/smith.jpg

2013.08.03.

1-14. ábra

http://www.whatisbiotechnology.org/assets/images/people/berg.jpg

2013.08.03.

1-15. ábra

A molekuláris biológia ilyen gyors fejlődése megdöbbentette a tudományos világot. Most már képesek lettünk az örökítőanyag fajok közti célzott transzferére, ezáltal teljesen új, addig még nem létező tulajdonságú élőlények létrehozására. Reális veszélye látszott annak, hogy a kontrollálatlan kutatás olyan új, akár patogén organizmusok létrehozásához vezethet, amelyek súlyos, akár az egész világra kiterjedő járványok kialakulását okozhatják. Ezért vezető kutatók **moratóriumot** hirdettek az idegen organizmusokba ültetendő rekombináns DNS-kutatások területén, amíg általános megegyezés nem születik azokról a rendszabályokról, amelyek a kutatások további biztonságos folytatásához szükségesek. 1975 februárjában Paul Berg szervezett egy konferenciát a kaliforniai **Asilomar**ba, ahol a világ vezető kutatói megállapodtak a rekombináns DNS-technikát érintő korlátozásokról. A megállapodás kiterjedt a kutatásban használható élőlényekre, a szükséges kísérleti protokollok pontos betartására, megfelelő műszerezettségi kívánalmakra (steril fülke, alacsony nyomású laboratóriumok, veszélyes hulladékok kezelése). A kísérletek veszélyessége szempontjából **négy kategóriát** állítottak fel, mindegyik kategóriához megfelelő **elővigyázatossági intézkedéseket** rendelve. Megtiltották patogén organizmusok használatát transzgénikus kísérletekhez, és toxinok génjeinek használatát rekombináns DNS létrehozásakor.

A konferencia után immár az új rendszabályok szerint folytak a kutatások. 1975-ben **Edwin Southern** (1-16. ábra) felfedezte a DNS-szakaszok azonosítására szolgáló, hibridizáción alapuló technikát, melyet róla **Southern-blotnak** neveztek el. Ugyancsak 1975-ben állítottak elő először **monoklonális antitesteket** hibridóma sejtek segítségével (**Georges Köhler**, **Cèsar Milstein**) (1-17. ábra). A következő jelentős felfedezés a **DNS szekvencia-analízisének** technikája volt. A két legismertebb technika párhuzamosan került kifejlesztésre, az egyik a **Walter Gilbert** nevéhez fűződő **kémiai hasításos** módszer, a másik a **Frederick Sanger** (1-18. ábra) nevéhez fűződő **láncterminációs** módszer. Bár csak ez utóbbi terjedt el széles körben, a két kutató 1980-ban Nobel díjat kapott felfedezéseiért (Paul Berggel megosztva). 1978-ban **Michael Smith** (1-19. ábra) készítette az első **pontmutációt irányított mutagenezisse**l. 1978 több szempontból is jelentős év volt: ekkor készült el rekombináns technológiával az első **humán genomi könyvtár** és az első gyógyászati célra használt **rekombináns fehérje** (emberi inzulin: humulin). 1982-ben **Ralph Brinster** és **Richard Palmiter** (1-20. ábra) készítették el az első, idegen gént hordozó emlősállatot, a transzgenikus egeret. Ugyanebben az évben fejeződik be az első vírus, a λ-fág teljes genomjának megszekvenálása.

1-16. ábra

http://www.bioch.ox.ac.uk/glycob/rodney\_porter\_lectures/2006/southern.jpg

2013.08.04.

1-17. ábra

http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/[wordpress/wp-content/uploads](http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/wordpress/wp-content/uploads/Milstein-Kohler1982-copy-450x315.jpg)/Milstein-Kohler1982-copy-450x315.jpg

2013.08.04.

1-18. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/ce/WalterGilbert2.jpg/220px-WalterGilbert2.jpg

http://www.lifesciencesfoundation.org/content/media/2011/10/10/1953\_a\_complete\_protein\_sequence.jpg

2013.08.04.

1-19. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/d/d6/Michaelsmith.jpg

2013.08.04.

1-20. ábra

http://www.lifesciencesfoundation.org/content/media/2011/06/24/1982\_A\_transgenic\_mammal\_the-scientist.com\_Ralph\_Brinster-large.jpg

http://images.the-scientist.com/content/figures/images/yr1996/sept/sep\_art/palmiter.jpg

2013.08.04.

1985 igen jelentős dátum a molekuláris biológia történetében. **KaryMullis** (1-21. ábra) ekkor fejleszti ki a **polimeráz láncreakción** alapuló technikát (PCR), mely gyökeresen megváltoztatja a kutatási lehetőségeket. A PCR-technika segítségével DNS-szakaszok szaporíthatóak fel specifikusan, igen rövid idő alatt, igen nagy mennyiségben. Ugyanebben az évben kezdik el azt az akkor még kilátástalannak tűnő projektet, amely az emberi genom teljes bázissorrendjének megismerésére szolgál. Ehhez felhasználják az akkoriban ismert molekuláris biológiai technikák jelentős részét (restrikciós emésztés/ligálás, genomi könyvtárak készítése, PCR, Sanger-féle láncterminációs szekvenálás), és feltételezik, hogy a technikák fejlődésével a szekvenálás üteme nagyságrendekkel felgyorsul (ez valóban így is történt). Más, a kutatásokhoz használt élőlények genomjának feltérképezése vagy már elkezdődött, vagy csak ezután fog. A **human genom project** (HUGO) farvizén, vagy attól függetlenül sikerül megszekvenálni az első eukarióta kromoszómát (élesztő 3. kromoszóma, 1985), az első prokarióta genomot (***Haemophylus influenzae*** (1991). 1991-ben befejezik az **élesztő genomját**, majd megszekvenálják az ***E. coli* genomját**, (1997), a ***Caenorhabditis elegans* genomját** (1998). Többek között az ecetmuslinca (***Drosophyla melanogaster***) és a házi egér (***Mus musculus***) genomjának szekvenciája is elkészül. Az **emberi genom** teljes szekvenciájának felderítése **2003-ra** készül el.

1-21. ábra

http://www.aacc.org/SiteCollectionDocuments/hall\_of\_fame/Mullis\_Kary\_200.gif

2013.08.05.

Még egy nagyon fontos, viszonylag új technikáról muszáj szót ejteni. **Craig Mello** és **Andrew Fire** (1-22. ábra) 1998-ban felfedezik az **RNS-interferencia** jelenségét (amiért Nobel-díjat kapnak 2006-ban). Erre a jelensége épül a ma általánosan elterjedt **géncsendesítési technika** kis inhibitoros RNS-ek (**siRNS**-ek) felhasználásának segítségével.

1-22. ábra

http://www.boston.com/news/globe/west/mello.jpg

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7e/Andrew\_Fire,\_Stanford\_University.jpg

2013.08.05.

A molekuláris biológiai technikák napjainkban is fejlődnek. Elsősorban a műszerek fejlődésének köszönhetően ma már jó néhány munkaigényes folyamatot sikerült automatizálni; a nagy mintaszámmal dolgozó laborokban robotok sokkal gyorsabban és precízebben tudnak bizonyos részfolyamatokat elvégezni, mint az emberi munkaerő. Többek között a számítógépes adatfeldolgozás nagymértékű felgyorsulása tette lehetővé az olyan technikák kifejlődését, mint például az új generációs szekvenciaanalízis-technikák. Segítségükkel manapság egy-egy élőlény genomjának meghatározása nem évekbe, csak napokba telik.