

Inżynieria genetyczna i terapia genowa

Zagadnienia podstawowe i aspekty praktyczne

Pod redakcją
Ilony Bednarek



Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Inżynieria genetyczna i terapia genowa

Autorzy

Ilona Bednarek

Krzysztof Cholewa

Magdalena Czajka-Uhryn

Sabina Gałka

Tomasz Loch

Grzegorz Machnik

Daniel Sypniewski

Inżynieria genetyczna i terapia genowa

Zagadnienia podstawowe i aspekty praktyczne

Pod redakcją
Ilony Bednarek



Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Recenzent

Prof. dr hab. Ryszard Słomski

Redakcja

Teresa Pawłok

Alicja Prochas

© Copyright by Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice 2008
Wszelkie prawa zastrzeżone

Dzieło może być wykorzystane tylko na użytek własny,
do celów naukowych, dydaktycznych lub edukacyjnych.
Zabroniona jest niezgodna z prawem autorskim reprodukcja,
redystrybucja lub odsprzedaż.

Wydanie I

ISBN 978-83-7509-076-5

Skład komputerowy i łamanie

Wydawnictwo SUM

40-752 Katowice, ul. Medyków 12

SPIS TREŚCI

Wprowadzenie (<i>Ilona Bednarek</i>)	7
I. Izolacja materiału genetycznego jako punkt wyjścia w procedurach molekularnych (<i>Daniel Sypniewski, Ilona Bednarek</i>)	9
1. Izolacja DNA	9
2. Izolacja plazmidowego DNA	11
3. Izolacja genomowego DNA	15
4. Ekstrakcja RNA	17
II. Transformacja bakterii – klasyczny przykład klonowania subkomórkowego (<i>Grzegorz Machnik, Ilona Bednarek</i>)	23
III. Wprowadzenie informacji genetycznej do komórek, wektory molekularne, metody transferu (<i>Ilona Bednarek, Krzysztof Cholewa, Magdalena Czajka-Uhryn</i>)	29
1. Wektory wirusowe	33
2. Metody wprowadzania genów do komórek eukariotycznych	41
IV. Transgeneza – zagadnienia ogólne (<i>Tomasz Loch</i>)	49
1. Konstrukcje genowe stosowane w transgenezie	49
2. Techniki otrzymywania zwierząt transgenicznych	53
3. Systemy warunkowej ekspresji genów	59
4. Systemy indukowalnej ekspresji genów	60
5. Genotypowanie zwierząt transgenicznych	62
6. Zastosowanie organizmów transgenicznych	64
V. Poszukiwanie roślin transgenicznych jako proces specyficznej reorganizacji materiału genetycznego (<i>Sabina Gałka</i>)	67
VI. RNA jako regulator ekspresji genów. Potranskrypcyjne wyciszenie genów techniką interferencji RNA (<i>Ilona Bednarek</i>)	75
VII. Zasady projektowania cząsteczek RNAi oraz tworzenie sekwencji typu <i>consensus</i> (<i>Grzegorz Machnik, Ilona Bednarek</i>)	83
VIII. Ilościowa ocena aktywności transkrypcyjnej genów i ich kopijności na podstawie techniki Real Time™ PCR (<i>Grzegorz Machnik, Ilona Bednarek</i>) ..	87

Wprowadzenie

Tematyka obejmująca zagadnienia inżynierii genetycznej i terapii genowej jest jedną z najbardziej rozbudowanych pośród nauk przyrodniczych i medycznych. Z kolei sam obszar obejmowany przez dziedziny inżynierii genetycznej czy terapii genowej należy do najszybciej rozwijających się dyscyplin wśród współczesnych tzw. *life sciences*. Podejmując się przygotowania przedstawionej pozycji książkowej, autorzy za główny cel postawili sobie zapoznanie czytelnika z wybranym zakresem podstawowych zagadnień teoretycznych i praktycznych, czyniąc to w taki sposób, aby umożliwić zrozumienie i ułatwić poruszanie się czytelnikowi po licznych danych literaturowych i materiałach instruktażowych dotyczących pracy opartej na założeniach technik inżynierii genetycznej i terapii genowej. Zdając sobie sprawę z ogromu zagadnień, które można tutaj omówić, a których jedynie niewielką część zaprezentowano, pragnę podkreślić, iż autorzy przedstawionej pozycji książkowej przede wszystkim zamierzają ukierunkować czytelnika tak, aby prześledził elementarne etapy i kroki postępowania pozwalające przeprowadzić pełną procedurę molekularną od etapu projektowania i analizowania sekwencji genetycznych, poprzez metody transferu informacji genetycznej do komórek, ocenę tego transferu, czy wreszcie poprzez regulację ekspresji genów, aż po tworzenie organizmów transgenicznych. Starając się zwrócić szczególną uwagę na etapy i tkwiące w nich obwarowania proceduralno-terytoryczne, opracowano zagadnienia poprawnej izolacji materiału genetycznego, jego oceny jakościowej i ilościowej, warunków przechowywania oraz wykorzystania jako wyjściowego bądź ostatecznego materiału przeznaczonego do rearanżacji genetycznych. Omówiono zagadnienia z zakresu klasycznych metod inżynierii genetycznej, w tym klonowania subkomórkowego, opierając się na procedurze rekombinacji wektorów molekularnych i ich namnażania w komórkach bakteryjnych z uwzględnieniem etapów ukompetentniania i transformacji bakterii. Większość modyfikacji genetycznych opiera się na transferze informacji genetycznej do komórek; rodzaje tegoż transferu i formy cząstek służących jako nośniki – wektory przenoszące daną informację genetyczną zostały omówione w osobnym rozdziale książki. Kompleksowym sposobem przedstawiającym manipulacje genetyczne na poziomie wektorów molekularnych, komórek i całych organizmów jest zebranie wiadomości w rozdziałach poświęconych transgenezie, w tym transgenezie roślin. Inżynieria genetyczna nie tylko pozwala na tworzenie organizmów/komórek o nowych właściwościach płynących z wprowadzania do nich obcej informacji genetycznej; jest to również dziedzina, która daje możliwość regulacji przebiegu cyklu komórkowego, interwencji w procesy zaangażowane w proliferację, czy apoptozę komórek, a dodatkowo umożliwia regulację ekspresji wybranych genów, ze szczególnym uwzględnieniem wyciszenia ekspresji tych genów, które w danych sytuacjach stają się niepożądane w komórce. Ten aspekt inżynierii genetycznej omówiono w rozdziale poświęconym zjawisku interferencji RNA. Na zakończenie autorzy zwracają uwagę na technikę pozwalającą szacować zmiany w poziomie ekspresji genów na szczeblu transkrypcji; omówiona technika Real Time™ RT-PCR jako jedno z nowszych narzędzi molekularnych daje szansę precyzyjnego monitorowania zmian w aktywności transkrypcyjnej genów, którą to aktywność możemy mierzyć w komórkach modyfikowanych genetycznie i odnosząc obserwowane dane do komórek pozostających w stanie niezmiennym – natywnym wyciągnąć odpowiednie wnioski.

Takie ujęcie przedstawionych zagadnień z obszaru inżynierii genetycznej i terapii genowej, zdaniem autorów, powinno przygotować czytelnika do kolejnej planowanej przez nas pozycji książkowej poświęconej zagadnieniom: analizie rekombinowanych kwasów nukleinowych i białek rekombinantowych, opartej na badaniach hybrydyzacji w układzie mikromacierzy, technik poszukiwania mutacji, sekwencji powtórzonych w genomie, analizie i modyfikacji pierwotnych produktów genowych oraz pozostałym zagadnieniom z zakresu terapii genowej, w tym: strategii antysensu, tripleksu, aptamerów, rybo- i deoksyrybozymów. W tych rozwijających się dziedzinach: inżynierii genetycznej i terapii genowej, ciągle pojawiają się nowe odkrycia i kolejne osiągnięcia, o których nie wspomniano w niniejszej monografii, a do poznania których to odkryć zachęcają autorzy.

Ilona Bednarek

I. Izolacja materiału genetycznego jako punkt wyjścia w procedurach molekularnych

Daniel Sypniewski, Ilona Bednarek

1. Izolacja DNA

W przypadku izolacji kwasu dezoksyrybonukleinowego dobór odpowiedniej metody izolacji uzależniony jest od tego, jaką frakcję DNA chcemy uzyskać w wyniku ekstrakcji z materiału biologicznego. Najczęściej izoluje się genomowy lub plazmidowy DNA. Ogólna procedura jego izolacji polega na przeprowadzeniu w standardowych warunkach kilku etapów, do których zalicza się:

- dezintegrację komórek,
- oddzielenie DNA od lizatu komórkowego,
- oczyszczanie DNA.

Jeśli materiałem wyjściowym są fragmenty tkanek (np. biopsaty) etapem wstępnym izolacji jest homogenizacja, która może mieć charakter homogenizacji mechanicznej (np. w homogenizatorze) bądź enzymatycznej, poprzez trawienie zrębu łącznotkankowego za pomocą proteinazy K lub innej proteazy. Bardzo dobrą metodą homogenizacji tkanek – ze względu na doskonale zabezpieczenie DNA przed degradacją – jest rozcieranie tkanki w ciekłym azocie.

Celem homogenizacji tkanek, a następnie dezintegracji komórek, jest uzyskanie lizatów komórkowych, z których następnie będzie izolowany DNA. Stosowane w tym celu metody muszą być odpowiednio delikatne, aby nie nastąpiła fizyczna lub chemiczna degradacja DNA – uwaga ta dotyczy zwłaszcza wysokocząsteczkowego DNA genomowego. Dezintegracja tkankowo-komórkowa może być przeprowadzana metodami fizycznymi. W tym celu można zastosować wspomniane wcześniej rozcieranie komórek w ciekłym azocie, bądź użyć różnego typu homogenizatorów. Rozbicie komórek następuje także po zadziałaniu na nie szoku osmotycznego. W przypadku materiału roślinnego często stosowana jest technika rozcierania komórek z żelami krzemionkowymi, drobnymi kuleczkami szklanymi (*glass beads*) lub z piaskiem. Środkami chemicznymi wykorzystywanymi do lizy komórek są najczęściej łagodne detergenty jonowe lub niejonowe. Detergentami niejonowymi stosowanymi w izolacji DNA są zwykle Triton X-100, Brij 58, Nonidet P-40, Tween 20. Najczęściej używanym detergentem jonowym jest SDS (siarczan dodecyłu sodu) lub związek o bardzo podobnej budowie i lepszej rozpuszczalności w wodzie – sarkozyl. Bardziej radykalne metody lizy wykorzystują zastosowanie alkaliów (tzw. liza alkaliczna – w zakresie pH około 12) lub wysokiej temperatury (tzw. *boiling lysis*). W przypadku komórek drożdży i bakterii można zastosować trawienie ścian komórkowych odpowiednimi enzymami degradującymi biopolimery obecne w strukturach ścian. W przypadku bakterii stosuje się komercyjnie dostępne preparaty lizozymu rozkładającego sieci peptydoglikanu. Do rozkładu chityny budującej ścianę komórek drożdży stosowane są zymola-

za lub litykaza. Środkami ułatwiającymi lizę są także wykorzystywane powszechnie w różnych metodach izolacji DNA chelatory jonów metali dwuwartościowych – przede wszystkim EDTA w postaci soli dwusodowej (sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego), rzadziej CDTA (sól sodowa kwasu cykloheksanodiaminotetraoctowego).

Już na etapie homogenizacji i lizy komórek należy zapewnić takie warunki izolacji, aby zminimalizować prawdopodobieństwo degradacji DNA przez obecne w środowisku komórkowym DNazy. W odróżnieniu od RNaz (enzymów degradujących RNA), dezo-ksyrybonukleazy to enzymy zależne od jonów metali. Fakt ten umożliwia łatwą inhibicję DNaz poprzez zastosowanie w buforach lizujących odpowiedniego stężenia chelatorów, np. EDTA, wiążących niezbędne do pracy enzymów jony metali, głównie metali dwuwartościowych. Wpływ egzogennych DNaz na wydajność izolacji można natomiast znacząco obniżyć dzięki stosowaniu odpowiednio przygotowanego do izolacji sprzętu i roztworów (autoklawowanie, praca w rękawiczkach i odzieży ochronnej, wolny od DNaz sprzęt jednorazowy).

Po uzyskaniu homogenatu tkankowo-komórkowego kolejnym etapem w pozyskiwaniu DNA jest właściwa izolacja, czyli oddzielenie DNA od pozostałych składników lizatu komórkowego, zwłaszcza białek, oraz od RNA. Białka są częściowo degradowane już na etapie lizy komórek w przypadku zastosowania odpowiednich proteaz – najczęściej proteinazy K (enzym izolowany z trzustek zwierzęcych lub pozyskiwany techniką rekombinacji DNA), rzadziej pronazy (enzym wyizolowany m.in. ze szczepu promieniowców *Streptomyces griseus*). Istnieje wiele procedur izolacji genomowego oraz plazmidowego DNA opartych na różnych technikach. Powszechnie stosowaną metodą izolacji DNA jest ekstrakcja fenolowo-chloroformowa lub ekstrakcja samym chloroformem, zapewniająca przede wszystkim dokładne odbiałczenie ekstraktów DNA. Najczęściej wykorzystuje się metodę z użyciem mieszaniny fenolu (nasyconego buforem o pH około 8) z chloroformem i alkoholem izoamylovym w stosunku 25:24:1 lub 50:49:1. Fenol zasadowy powoduje przejście DNA do fazy wodnej, podczas gdy fenol kwaśny (nasycony wodą) stosowany do ekstrakcji RNA powoduje zatrzymanie DNA w fazie organicznej oraz w tzw. międzyfazie tworzącej się na granicy środowiska organicznego i nieorganicznego. Oczyszczanie DNA z resztek RNA najczęściej prowadzone jest przez enzymatyczną degradację z zastosowaniem RNaz. RNA można także selektywnie precypitować z warstwy wodnej za pomocą chlorku litu. Należy pamiętać, że zastosowanie RNaz wymaga następczego ponownego odbiałczania próbek, co prowadzi się zwykle stosując ponowną ekstrakcję fenolowo-chloroformową próbki.

Denaturowane białka usuwa się najczęściej przez wirowanie, natomiast oczyszczony DNA w ostatnim etapie procedury zostaje wytrącony z roztworu zwykle przez precypitację roztworami etanolu lub izopropanolu. Wytrącenie DNA w tym wypadku jest niczym innym, jak odwodnieniem cząsteczki DNA przez bezwodny roztwór odpowiedniego alkoholu. Precypitacja DNA zawsze musi być przeprowadzana w obecności odpowiednio dobranych koprecypitantów: octanu sodu, octanu potasu, octanu amonu lub chlorku sodu. Sole te zwiększają wydajność precypitacji, ich nadmiar zaś z wytrąconego osadu jest usuwany poprzez zastosowanie tzw. przepłukania osadu etanolem, zwykle 70%. Zawartość wody w roztworze etanolu rozpuszcza współwytrącone z DNA sole, oczyszczając tym samym wyizolowany DNA. Oczyszczanie tego kwasu można także przeprowadzić na specjalnych kolumnach, stosując do tego celu metodę chromatograficzną. Często wyko-

rzystuje się ją do oczyszczania nie tylko natywnych wyizolowanych cząsteczek DNA, lecz także syntetycznych cząsteczek, np. amplimerów – produktów PCR służących między innymi do klonowania czy wykorzystywanych w kolejnych procedurach badawczych, np. w sekwencjonowaniu. Kolumny chromatograficzne stosowane do oczyszczania DNA zwykle wypełnione są żelom krzemionkowym. Stopniowe eluowanie z kolumny substancji balastowych, a na końcu eluowanie właściwego DNA daje ostatecznie czysty ekstrakt kwasu nukleinowego.

Po wytrąceniu alkoholem DNA jest wirowany, następnie suszony (najczęściej w temperaturze pokojowej) i w takiej postaci (lub ewentualnie po rozpuszczeniu w wodzie lub buforze TE – Tris-EDTA) jest przechowywany. Ekstrakty DNA można przechowywać temp. 4°C, niemniej jednak, w celu wydłużenia ich trwałości, zaleca się przechowywanie w temp. -20°C lub nawet -80°C.

2. Izolacja plazmidowego DNA

Wielkość plazmidowego DNA jest zróżnicowana – zwykle wynosi od 1000 do kilku tysięcy par zasad, jednak duże plazmidy mogą mieć wielkość nawet do 20 kbp. Ogólnie można przyjąć, że rozmiary plazmidów są znacznie niższe w porównaniu z rozmiarami genomowego DNA bakterii, czy też genomowego DNA komórek eukariotycznych. Typowe plazmidy są zbudowane z dwuniciowych cząsteczek DNA (dsDNA) przyjmujących trzy różne podstawowe konformacje: w formie kolistej zrelaksowanej, kolistej superhelikalnej (superskręconej – CCC – *covalently closed circles*) oraz formie liniowej. Na wydajność izolacji plazmidowego DNA wpływa między innymi kopijność plazmidów wynikająca z różnego tempa replikacji w komórkach bakterii. W celu relatywnego zwiększenia liczby plazmidów w hodowli można zastosować antybiotyki selektywnie hamujące replikację bakteryjnego genomu, natomiast preferującego w ten sposób replikację plazmidów w komórce bakteryjnej. Tak działającym antybiotykiem jest m.in. chloramfenikol, który blokując syntezę DNA genomowego nie wpływa na replikację plazmidów.

Uzyskanie plazmidowego DNA obejmuje kilka istotnych etapów, z których część dotyczy uzyskania komórek bakteryjnych będących źródłem plazmidu. Etapy te, to:

- transformacja bakterii wybranym plazmidem,
- selekcja transformantów na podłożach selekcyjnych,
- namnożenie czystej transformowanej plazmidem hodowli bakteryjnej,
- liza namnożonych komórek bakteryjnych,
- izolacja i oczyszczanie plazmidów.

Namnażanie hodowli bakteryjnej prowadzi się zazwyczaj do momentu osiągnięcia późnej fazy logarytmicznego wzrostu hodowli bakteryjnej (można ją określić na podstawie pomiaru gęstości optycznej OD *Optical Density*, przy długości fali $\lambda = 600$ nm; w zależności od używanej aparatury odczyt absorbancji może mieć miejsce przy długości fali 550 nm, wyznaczenie widma absorpcji ułatwi dobór właściwej długości fali do pomiarów); najczęściej hodowle prowadzi się w systemie hodowli całonocnych, trwających około 16 godzin. W fazie wzrostu logarytmicznego dochodzi do osiągnięcia maksymalnej liczby komórek w hodowli przy jednoczesnej intensywnej replikacji plazmidów, a niskiej już skali replikacji DNA chromosomalnego i niskiej biosyntezy RNA. W zależności od skali izolacji plazmidowego DNA wyróżnia się następujące rodzaje izolacji:

- na miniskalę, tzw. miniprep (izolacja z niewielkich objętości 1–2 ml hodowli),
- na średnią skalę, tzw. midiprep (umiarkowane ilości hodowli rzędu 10 ml),
- na dużą skalę, tzw. maxiprep (izolacja plazmidów preparatywna – minimum pół litra hodowli bakteryjnej).

Izolację plazmidowego DNA należy prowadzić ze świeżych hodowli po dokładnym usunięciu medium hodowlanego. W przypadku, gdy nie jest możliwe przeprowadzenie izolacji bezpośrednio po zakończeniu hodowli, odwirowane komórki należy przechowywać w postaci suchego, oddzielnego od medium osadu w niskiej temperaturze (-80°C). Nie należy wydłużać czasu przechowywania materiału, grozi to degradacją i spadkiem wydajności izolacji plazmidowego DNA.

Wybór metody izolacji plazmidowego DNA zależy głównie od wielkości plazmidu, istotne znaczenie ma jednak także szczep bakterii i dalsze przeznaczenie izolatu (np. sekwencjonowanie, klonowanie, transformacja itp.). Izolacja dużych plazmidów (około 15 kbp) musi być prowadzona stosunkowo ostrożnie, gdyż – podobnie jak w przypadku genomowego DNA – może łatwo dojść do mechanicznego uszkodzenia i fragmentacji plazmidowego DNA. W tym przypadku komórki poddawane lizie powinny być zabezpieczone w buforze izoosmotycznym (dodatek cukrów, takich jak: sacharoza, glukoza), a następnie trawione lizozymem w obecności EDTA. Właściwą lizę przeprowadza się zazwyczaj za pomocą SDS lub innego detergentu. Stosowanie łagodnych detergentów niejonowych (np. Tritonu X-100) i EDTA do lizy komórek w odpowiednich warunkach powoduje rozzerwanie błon komórkowych bakterii, przy czym genomowy DNA pozostaje połączony fizycznie z błoną, co jest podstawą separacji frakcji plazmidowego i genomowego DNA bakteryjnego. W takich warunkach powstały lizat można wirować przy wysokich obrotach (ok. 40 000 x g), uzyskując w nadsączu plazmidowy DNA oddzielony od reszty składników komórkowych oraz genomowego DNA bakterii, który – wraz z fragmentami komórek – osadzany jest na dnie probówek podczas wirowania. W kolejnym etapie można dodatkowo oczyścić izolat poprzez ultrawirowanie w gradiencie chlorku cezu. W przypadku izolacji mniejszych plazmidów można stosować bardziej radykalne metody lizy, gdyż nie wpływają one znacząco na integralność izolowanego DNA. Stosowane zwykle protokoły opierają się na lizie alkalicznej lub termicznej wraz z użyciem detergentów.

W przypadku izolacji tych samych plazmidów z różnych szczepów bakteryjnych zauważono różnice w wydajności i czystości izolatu. Najprawdopodobniej ich przyczyną są odmienne pod względem budowy strukturalnej ściany komórkowej bakterii różniące się czasami w subtelny sposób składem cukrowców występujących w tych strukturach komórkowych. Zdecydowanie łatwiej i o większej czystości izoluje się plazmidy ze szczepów *E. coli* C600, DH1, czy LE392, niż ze szczepów *E. coli* HB101, czy JM100. W przypadku izolacji plazmidów ze szczepu HB101 nierzadko uzyskuje się ekstrakt w znacznym stopniu zanieczyszczony polisacharydami, co utrudnia między innymi trawienie restryktazami takiego izolatu; dodatkowo szczep HB101 charakteryzuje się wysoką aktywnością endonukleazy A. W przypadku nieskutecznej inaktywacji tego enzymu, może dojść do strawienia plazmidu w trakcie procedury izolacji.

Metody izolacji plazmidowego DNA zwykle opierają się na wykorzystaniu charakterystycznych właściwości konformacji plazmidowego DNA. Forma kolistych superskręconych cząsteczek (CCC), w jakiej występuje plazmidowy DNA, znacząco wpływa na właściwości fizyczne tego kwasu, a tym samym umożliwia wykorzystanie praktyczne konfor-

macji w preparatyce plazmidów. Różnice w gęstości liniowych form DNA i DNA plazmidowego CCC nasilają się w środowisku alkalicznym oraz po dodaniu do roztworu zawierającego plazmidowy DNA związku interkalującego w strukturę dsDNA – bromku etydyny. Interkalacja powoduje częściowe rozluźnienie i rozwinięcie helisy dsDNA, a to powoduje obniżenie gęstości całej cząsteczki. W przypadku formy superzwiniętej intrerkalacja bromku etydyny jest utrudniona i nie wpływa znacząco na gęstość plazmidowego DNA. W gradiencie alkalicznej sacharozy (5–20%) następuje dodatkowo denaturacja dsDNA w formie liniowej lub kolistej, zrelaksowanej, natomiast forma CCC plazmidowego DNA mimo denaturacji pozostaje w postaci superzwiniętej. Ostatecznie powoduje to 3–4-krotne przyspieszenie sedymentacji plazmidów CCC w porównaniu z liniowym i zrelaksowanym DNA. Zjawisko to wykorzystywane jest w metodzie izolacji plazmidów za pomocą ultrawierowania w gradiencie chlorku cezu lub alkalicznej sacharozy.

Metody izolacji plazmidowego DNA wykorzystujące jego konformację to także metoda lizy alkalicznej oraz metoda lizy termicznej (ang. *boiling lysis*). Liza alkaliczna w połączeniu z retergentami (najczęściej SDS) jest najpopularniejszą metodą izolacji plazmidowego DNA. W warunkach wysokiego pH (około 12) lub krótkotrwałego gotowania lizatów dochodzi do denaturacji nici dsDNA. Po neutralizacji środowiska lub obniżeniu temperatury zachodzi renaturacja łańcuchów, jednak w przypadku długich nici genomowego DNA w warunkach stwarzanych w tych metodach zachodzi przypadkowe łączenie się fragmentów DNA, co przy dodatkowym zastosowaniu wysokich stężeń soli, powoduje precypitację genomowego DNA wraz ze denaturowanymi białkami i większością RNA. Obecność SDS dodatkowo odpowiada za denaturację białek bakteryjnych. Ponadto, w środowisku alkalicznym, długie, jednoniciowe cząsteczki DNA, a zwłaszcza cząsteczki RNA, są podatne na przypadkowe pęknięcia prowadzące do częściowej ich degradacji. Plazmidowy DNA w warunkach lizy alkalicznej lub gotowania również ulega denaturacji, jednak łańcuchy DNA nie podlegają fizycznemu rozdzieleniu ze względu na ich konformację umożliwiającą utrzymywanie stałego kontaktu. Neutralizacja środowiska zezwala wówczas pozostającym w bliskim sąsiedztwie łańcuchom plazmidowego DNA odtworzyć pierwotną dwuniciową strukturę.

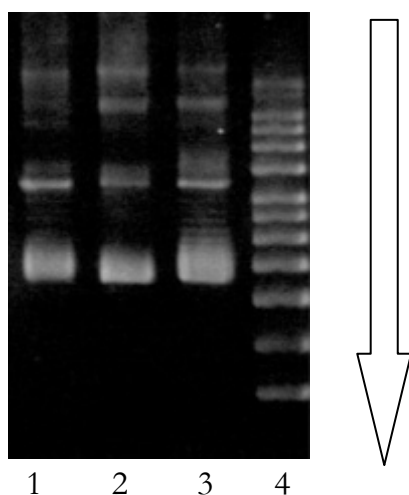
Metoda wykorzystująca lizę termiczną jest zalecana do izolacji na małą skalę niewielkich plazmidów (poniżej 15 kpz). Często jest łączona z procedurą oczyszczania przez różnicowe wytrącanie glikolami polietylenowymi.

Wśród metod izolacji plazmidowego DNA istnieją także takie, które są oparte są na zasadzie różnicowej precypitacji DNA plazmidowego i DNA genomowego. Najczęściej stosowane są protokoły wykorzystujące selektywną precypitację genomowego DNA z lizatu komórkowego glikolami polietylenowymi (głównie PEG-8000). Stosowaną zwykle odmianą tej metody jest modyfikacja oryginalnego protokołu (R. Treisman) przez Nicoletti i Condorelli. W pierwszym etapie lizat komórkowy (zwykle po lizie alkalicznej) jest traktowany chlorkiem litu lub RNazą w celu usunięcia RNA. Następnie na lizat działa się roztworem zawierającym PEG-8000 i chlorek magnezu w celu selektywnej precypitacji plazmidowego DNA. Można także zastosować dodatkowe oczyszczanie za pomocą ekstrakcji fenolowo-chloroformowej i przemywania etanolem. Ograniczeniem metod opartych na selektywnej precypitacji DNA jest wielkość izolowanych plazmidów – nie nadają się one do wykorzystania w przypadku izolacji bardzo dużych plazmidów (rzędu 15–20 kpz). W celu izolacji bakteryjnych DNA można także wykorzystywać kationowy detergent

CTAB (bromek cetylotrimetyloamoniowy), który w zależności od zastosowanej siły jono-wej służy do selektywnego otrzymywania bądź izolatów DNA genomowego (wysoka siła jonowa), bądź DNA plazmidowego i fagowego (niska siła jonowa). Eliminacja RNA z izolatów dokonywana jest zwykle poprzez ich trawienie RNazą. Czasami wykorzystuje się także selektywne strącanie RNA za pomocą chlorku litu. Dla mutagenizowanych szczepów *E. coli* K12 opracowano specyficzną metodę uzyskiwania tzw. minikomórek. Są to struktury subkomórkowe, które nie zawierają chromosomu bakteryjnego, a jedynie plazmidy. Ich wielkość stanowi około 10% typowej komórki *E. coli*.

Wszystkie opisane wcześniej metody izolacji plazmidowego DNA prowadzą do otrzymania preparatów znacznie zanieczyszczonych zarówno genomowym DNA, RNA, jak i resztkami lizatu komórkowego. Oczyszczanie izolatów, wymagane do większości aplikacji plazmidowego DNA, można przeprowadzić różnymi metodami. Najwyższą czystość można oczywiście osiągnąć przez ultrawierowanie w gradiencie chlorku cezu z bromkiem etydyny. Jednakże obecnie większość laboratoriów rezygnuje z tej metody ze względu na wysoki koszt aparatury i odczynników oraz długi czas przygotowania takich preparatów (nawet 3–5 dni). Obecnie stosowane metody oczyszczania bazują na selektywnej precipitacji, chromatografii jonowymiennej lub filtracji żelowej. Istnieje także wiele dostępnych komercyjnie gotowych zestawów do izolacji i oczyszczania plazmidowego DNA. Zestawy minikolumn do oczyszczania plazmidów wypełnione są najczęściej anionowymi żywicami typu DEAE (dietyloaminoetyloceluloza), ziemią okrzemkową albo krzemionką. Kolumny chromatograficzne wykorzystuje się zazwyczaj do celów minipreparatywnych, natomiast do izolacji plazmidów na większą skalę stosowane jest oczyszczanie metodą selektywnej precipitacji – najczęściej za pomocą PEG-8000 lub CTAB.

Metodą pozwalającą na najdokładniejszy rozdział genomowego i plazmidowego DNA od zanieczyszczeń RNA i białkami jest ultrawierowanie w gradiencie chlorku cezu w obecności bromku etydyny. W metodzie tej wykorzystywana jest różnica w wielkości i konformacji kwasów nukleinowych: plazmidowy DNA, występujący przede wszystkim w zamkniętej kowalencyjnie postaci kolistej (CCC – *covalently closed circles*) tworzy wyraźny prążek położony poniżej prążka zawierającego frakcję liniowego DNA i formy zrelaksowanej plazmidów (OC – *open circles*). Białka tworzą kożuch przy powierzchni, natomiast RNA ulega sedymentacji i opada na dno próbówki. Rozdział frakcji DNA można także uzyskać dzięki ultrawierowaniu lizatów komórkowych w gradiencie alkalicznej sacharozy. Wadą tej metody jest duża pracochłonność, długi czas rozdziału (kilkanaście godzin wirowania), a przede wszystkim wysoki koszt specjalistycznej aparatury (ultrawirówka). Bromek etydyny musi zostać usunięty po zakończeniu rozdziału. Można do tego celu zastosować bądź ekstrakcję fenolowo-chloroformową, bądź też oczyszczanie na kolumnach chromatograficznych (np. z żywicą jonowymienną Dowex). Obecność trzech podstawowych konformacji przestrzennych plazmidów ma swoje odzwierciedlenie również w obrazach elektroforetycznych rozdzielanych ekstraktów plazmidowego DNA. Formą najszybciej migrującą w żelu jest forma superskręcona, za nią migruje forma liniowa plazmidowego DNA, najwolniej zaś wędrującą w polu elektrycznym frakcją jest forma zrelaksowana OC plazmidu (*ryc. 1*). Pojawienie się między nimi dodatkowych prążków często jest wynikiem wysokiej zawartości soli w izolacie i spotęgowaniem superskręceń cząsteczek plazmidów, natomiast dodatkowe prążki znajdujące się w pobliżu formy liniowej plazmidu świadczą o jego częściowej degradacji lub pęknięciach cząsteczek.



Ryc. 1. Przykładowy rozdział w żelu agarozowym plazmidowego DNA. Na ścieżkach 1–3 przedstawiono rozdział izolatu plazmidowego DNA, na ścieżce 4 uwidoczniony rozdział wzorca wielkości DNA. Strzałką przedstawiono kierunek rozdziału elektroforetycznego. Najszybciej wędrującą frakcją jest frakcja CCC plazmidu, następnie frakcja liniowa, natomiast najwolniej wędruje frakcja OC plazmidu.

3. Izolacja genomowego DNA

Izolacja genomowego DNA nastęrcza sporo trudności, których źródło tkwi głównie w wielkości cząsteczek DNA. Duże cząsteczki DNA genomowego są wprawdzie dość trwale chemicznie, jednak ulegają łatwo mechanicznej degradacji przez zbyt intensywnie prowadzoną dezintegrację komórek lub zwykle pipetowanie lizatów. Najczęściej stosowane metody izolacji genomowego DNA opierają się bądź na wysalaniu białek stężonymi roztworami soli, bądź też na ekstrakcji fenolowo-chloroformowej. Odczyn fenolu musi być zasadowy, gdyż w kwaśnym pH DNA ulega ekstrakcji do fazy organicznej lub pozostaje w międzyfazie wraz ze zdenaturowanymi białkami, zamiast pozostawać w fazie wodnej. Otrzymywane po odbiałczeniu izolaty kwasu dezoksyrybonukleinowego (pozostające w nadsączu) są oczyszczane, analogicznie do wcześniej opisanej strategii postępowania, przez precypitację roztworami etanolu lub izopropanolu, albo są oczyszczane na kolumnkach chromatograficznych wypełnionych złożami krzemionkowymi. Trawienie błon komórkowych i lizę komórek przeprowadza się zwykle za pomocą proteiny K w obecności EDTA jako głównego czynnika hamującego aktywność DNaz oraz w obecności detergentów, np. SDS.

Znana jest metoda izolacji wysokocząsteczkowego DNA za pomocą formamidu; umożliwia ona otrzymanie bardzo dużych, niezdegradowanych cząsteczek DNA (ponad 200 kbp), w związku z czym stosuje się ją zwłaszcza w procedurach wykorzystywanych w konstrukcji bibliotek genomowych. Metoda izolacji z formamidem jest niestety bardzo czasochłonna i mało wydajna. Otrzymany lizat komórkowy jest traktowany stężonym roztworem formamidu, który pełni rolę czynnika denaturującego białka i ułatwiającego oddzielenie histonów od DNA. Oczyszczanie wyizolowanego tą techniką DNA przeprowadzane jest na drodze dializy.

Dobór metody izolacji genomowego DNA w dużym stopniu wiąże się z dalszym przeznaczeniem ekstraktu kwasu nukleinowego. Rozwój technik molekularnych, otrzymywanie zmodyfikowanych na drodze rekombinacji genetycznej enzymów o coraz wyższym stopniu trwałości, odporności na czynniki środowiska reakcyjnego, pozwala posługiwać się również prostymi metodami izolacji materiału genetycznego, często pobieranego do danej reakcji wprost z lizatu komórkowego. Do celów amplifikacji fragmentów DNA

techniką PCR stosowane są właśnie czasami metody szybkiej i prostej izolacji DNA, oparte na lizie komórek i oddzieleniu poprzez wirowanie składników lizatu od DNA. Czasami sam lizat jest bezpośrednio wykorzystany jako matryca w PCR. Takie procedury mogą być stosowane do celów szybkiej diagnostyki molekularnej, jednak jakość matrycy jest w tym przypadku niezadowalająca i nie nadaje się do bardziej wymagających odmian amplifikacji – np. reakcji typu *Long-PCR* czy *Real-Time PCR*.

W sytuacji, kiedy celem jest izolacja długich, niezdegradowanych cząsteczek genomowego DNA korzysta się ze specyficznej procedury izolacji DNA z materiału komórkowego zatapianego wstępnie w bloczkach agarozowych. Tak przygotowany materiał poddaje się działaniu proteaz, ewentualnie innych dodatkowych enzymów (np. lizozymu) w celu dezintegracji białek komórkowych czy składników ścian komórkowych. Uwolniony z komórek genomowy DNA pozostaje „zamknięty” w strukturze bloczka agarozowego, który następnie można zatopić w żelu rozdzielającym i stosując elektroforezę pulsacyjną – PFEG (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) rozseparować w zmiennym polu elektrycznym. Stosując napięcie prądu elektrycznego rzędu 6V/cm oraz zmianę impulsów w interwale 90 sekundowym można przeciętnie rozdzielić DNA o wielkości powyżej 2000 kbp, przy czym czas rozdziału to 1–2 dni, (np. chromosomy *S. cerevisiae* o wielkości 1,6 i 2,2 Mbp można rozdzielić stosując napięcie 5,4 V/cm i zmianę impulsu elektrycznego co 90 s).

Izolacja genomowego DNA może być prowadzona zarówno ze świeżego materiału biologicznego, jak i różnego rodzaju materiałów archiwalnych, np. szczątków kopalnych czy też materiałów śladowych, co ma miejsce w przypadku próbek kryminalistycznych (np. włosy, fragmenty tkanek, plamy krwi). Jakość izolowanego DNA z takich próbek jest jednak zadowalająca tylko wtedy, gdy materiał tkankowy bądź komórkowy został odpowiednio zabezpieczony i przechowany do czasu analizy. Zabezpieczenie materiału biologicznego stanowi punkt krytyczny, decydujący o wydajności izolacji i jakości wyizolowanego materiału. Należy pamiętać, że czynniki konserwujące, takie jak formalina, zabezpieczają/konserwują tkankę, ale wpływają degradująco na materiał genetyczny, stąd archiwalny materiał biologiczny w postaci bloczków parafinowych lub skrawków formalinowych, tak popularny w histopatologii, jest materiałem łatwo dostępnym, ale trudnym do izolacji wysokiej jakości DNA. W celu uzyskania jak najwyższej jakości materiału genetycznego fragmenty pobranych świeżych tkanek bądź materiał hodowlany powinien być jak najszybciej zabezpieczony przez zamrożenie w niskiej temperaturze – jest to najlepsza forma przechowywania materiału do badań molekularnych. Tak zwane głębokie zamrożenie w temperaturze ciekłego azotu stanowi najlepszą strategię zabezpieczenia materiału do badań.

Analiza jakości i ilości otrzymanych izolatów kwasów nukleinowych przeprowadzana jest dwiema technikami: elektroforezy w żelu agarozowym oraz pomiaru spektralnego, gdzie mierzonym parametrem jest absorbancja z zastosowaniem do pomiarów promieniowania z zakresu UV. Do wyznaczenia stężenia (ilości) DNA w otrzymanym izolacie stosuje się wartość absorbancji przy długości fali 260 nm. Wyznaczony molowy współczynnik absorbancji dla dwuniciowego DNA przy tej długości fali wynosi 50, a więc stężenie DNA w izolacie, który wykazuje absorbancję na poziomie 1 jednostki absorbancji przy $\lambda=260$ nm wynosi 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Odpowiednio dla dsRNA współczynnik ten wynosi 40, dla oligoDNA 36, a oligoRNA 33.

Do określenia czystości i jakości izolatu DNA służy wyznaczenie współczynnika absorbancji mierzonych przy długościach fal: 260 i 280 nm. Stosunek A₂₆₀/A₂₈₀ powinien mieścić się w zakresie 1,7–2,0. Znaczne odchylenia od tego zakresu mogą wskazywać na degradację kwasu (zwłaszcza w przypadku izolacji wysokocząsteczkowego DNA) oraz na zanieczyszczenie go odczynnikami organicznymi lub przez RNA. Zanieczyszczenie fenolem, często obecne w preparatach DNA pochodzących z ekstrakcji fenolowo-chloroformowej, powoduje wzrost absorbancji przy długości fali 270 nm. Dodatkową metodą wizualizacji i oceny jakościowej izolatów DNA jest elektroforeza w niskoprocentowych żelach agarozowych (np. 0,45%). Wysokocząsteczkowy DNA genomowy powinien być widoczny w postaci jednolitych prążków lub smug w początkowych odcinkach ścieżek żelu. W przypadku DNA plazmidowego możliwe jest rozróżnienie konformacji plazmidów. Forma OC migruje w żelu wolniej od formy superskręconej (CCC) i zlinearyzowanej.

4. Ekstrakcja RNA

Komórka eukariotyczna zawiera zazwyczaj około 10^{-5} µg (10–30 pg) całkowitego RNA. Przeważającą frakcją RNA jest rybosomalny RNA (28S, 18S, 5,8S, 5S rRNA) stanowiący 80–85% całkowitego RNA. Na resztę składają się głównie niskocząsteczkowe frakcje tRNA, snRNA i scRNA. Informacyjny RNA stanowi zatem, w zależności od typu i stanu metabolicznego komórki, tylko 1–5% całkowitego RNA komórki. Jest to frakcja bardzo heterogenna złożona z cząsteczek o wielkości od kilkuset do kilku tysięcy nukleotydów (średnio 1900). W pojedynczej komórce ssaków ogólna ilość mRNA utrzymuje się na poziomie około 360 tysięcy cząsteczek, co odpowiada około 12 000 rodzajów transkryptów – produktów ekspresji genów komórkowych. Także kopijność transkryptów poszczególnych genów jest bardzo heterogenna i może stanowić, w zależności od aktywności transkrypcyjnej genu, od mniej niż 0,01 do 3% całkowitego mRNA w komórce. Geny ulegające ekspresji na najwyższym poziomie mogą być transkrybowane na poziomie rzędu nawet 12 000 kopii mRNA na jedną komórkę, podczas gdy geny o bardzo niskiej ekspresji mogą być źródłem zaledwie 5–15 kopii mRNA. Geny ulegające tak niskiej ekspresji są jednak najczęstsze w genomie typowej komórki eukariotycznej. Typowa komórka ssaka zawiera aż 11 000 różnych rodzajów transkryptów takich genów, co stanowi 45% całkowitej puli mRNA. Średnia ekspresja genu oznacza zazwyczaj obecność 200–400 kopii mRNA w komórce. W materiale biologicznym, oprócz RNA komórkowego, może być obecny także RNA wirusowy zarówno jako produkt ekspresji genów wirusowych, jak i genom niektórych wirusów (np. retrowirusy, flawiwirusy itp.).

Podstawowym problemem izolacji RNA jest znacznie większa w porównaniu z DNA nietrwałość tego kwasu nukleinowego. Głównym problemem odróżniającym izolację RNA od izolacji DNA jest więc szybkość degradacji kwasu rybonukleinowego. Niestabilność RNA wynika zarówno z jego budowy (znacznie większa podatność wiązania fosfodiesterowego na hydrolizę w przypadku rybozy niż deoksyrybozy obecnej w DNA – zwłaszcza w środowisku alkalicznym), jak i z obecności w środowisku rybonukleaz (RNaz). Źródłem RNaz są zarówno czynniki zewnętrzne (szkło i sprzęt laboratoryjny, powierzchnia skóry, odczynniki itp.), jak i wewnątrz komórki (RNazy endogenne). Inaktywacja RNaz następuje znacznie większych trudności niż dezaktywacja DNaz. RNazy są bardzo trwałymi enzymami, nie są zależne od kofaktorów (np. jonów dwuwartościowych) i wykazują wysoką aktywność nawet w niewielkich stężeniach. Zahamowanie aktywności

RNaz powinno być głównym celem już w pierwszym etapie izolacji RNA. Podstawową zasadą jest znacznie większa ostrożność i czystość w pracy z RNA w porównaniu z izolacją i analizą DNA. Należy używać jednorazowego sterylnego sprzętu i odczynników, a w przypadku szkła laboratoryjnego i innych utensyliów wielokrotnego użytku należy przeprowadzać ich sterylizację oraz usuwanie RNaz – np. przez sterylizację gorącym suchym powietrzem w temperaturze 200–240°C przez kilka godzin lub/i przepłukiwanie 0,1 M roztworem wodorotlenku sodu. Woda i odczynniki używane do pracy z RNA powinny być unieczynniane 0,1% roztworem pirowęglaanu dietylu (DEPC), który jest silnym inhibitorem RNaz. Izolacja dobrej jakości RNA z komórek bakterii jest jeszcze trudniejsza niż w przypadku komórek eukariotycznych. Wynika to z ekstremalnie krótkiego czasu półtrwania mRNA prokariotycznego (nawet około 3 minut). Prokariotyczne transkrypty nie są chronione na końcach 3' i 5', najczęściej mają charakter policistronowy, a degradacja mRNA przez wewnątrzkomórkowe rybonukleazy rozpoczyna się często jeszcze przed zakończeniem procesu translacji.

Izolacja czystego, niezdegradowanego RNA wymaga także odpowiedniego przechowywania próbek w przypadku, gdy izolacja i pobór próbek są rozdzielonymi czasowo etapami. Proces degradacji RNA rozpoczyna się praktycznie tuż po pobraniu próbki do badań. Jedyną skuteczną formą zabezpieczenia RNA w przechowywanych próbkach jest jak najszybsze ich zamrożenie w ciekłym azocie lub temperaturze rzędu -70°C, -80°C. Dostępne są komercyjnie roztwory o specjalnie przygotowanym składzie jonowym (np. RNA-Later® dla bioptatów tkankowych, puli komórkowych roślinnych, zwierzęcych, bakteryjnych oraz dla ochrony całych organizmów, jak na przykład *Drosophila*). Inne dostępne komercyjne protektanty to: PAXgene dla próbek krwi pełnej, czy RNAprotect Bacteria Reagent dla hodowli bakteryjnych); roztwory te dodatkowo ułatwiają zabezpieczenie przechowywanego materiału w niskiej temperaturze oraz umożliwiają przechowywanie materiału również w temperaturach rzędu 4°C, hamując degradację RNA.

Z uwagi na ogromną podatność RNA na degradację zalecanym sposobem homogenizacji i dezintegracji tkanek do ekstrakcji RNA jest rozdrabnianie w ciekłym azocie. Jest to metoda gwarantująca pomyślną homogenizację tkanki przy jednoczesnym zachowaniu niezdegradowanego RNA do kolejnych etapów izolacji. Nie zawsze jednak jest ona konieczna. Często techniką jest mechaniczne rozdrobnienie fragmentów tkanek za pomocą jałowych narzędzi (np. skalpela) lub użycie homogenizatorów. W tym przypadku zaleca się jednak przeprowadzenie homogenizacji w roztworze do lizy komórek zawierającym inhibitory RNaz – zazwyczaj przeprowadza się homogenizację w tym samym roztworze, który używany jest w danej procedurze do lizy komórek i ekstrakcji RNA. Użycie homogenizatorów nie tylko skraca radykalnie czas przygotowania próbki do izolacji RNA (kilkanaście-kilkadziesiąt sekund), lecz także jest metodą rozbijania komórek, a więc prowadzi do uwolnienia z nich RNA. Izolacja RNA z bioptatów o wysokiej zawartości zrębu łącznotkankowego (np. mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, skóra) wymaga częściowego nadtrawienia tkanki łącznej przez proteazy (np. proteinazę K). Jest to etap, który w istotny sposób może wpłynąć na jakość i wydajność ekstrakcji RNA. Trawienie powinno być przeprowadzone w możliwie jak najkrótszym czasie i w łagodnych warunkach. W przypadku izolacji RNA z bakterii, drożdży oraz komórek roślinnych można zastosować homogenizację i dezintegrację komórek z użyciem szklanych kuleczek (*glass beads*). Powinny

one być odpowiednio przygotowane i ochłodzone w ciekłych azocie, aby zapobiec degradacji uwalnianego z komórek RNA.

Stosowane obecnie metody izolacji RNA bazują w ogromnej większości przypadków na klasycznej metodzie ekstrakcji fenolowo-chloroformowej z użyciem soli chaotropowych (izotiocyanian guanidyny) opracowanej przez Chomczyńskiego i Sacchi w 1987 roku. Sole chaotropowe – izotiocyanian (rodanek) guanidyny, chlorowodorek guanidyny, tiocyanian amonu – są związkami stosowanymi w wysokich stężeniach, o właściwościach denaturujących białka (niszczą strukturę przestrzenną białek). Sole chaotropowe są jednocześnie czynnikami denaturującymi białka (działanie odbiałczające), ułatwiającymi rozpad błon komórkowych oraz, co istotne, stanowią jedne z najsilniejszych inhibitorów RNaz. Możliwe jest oczywiście otrzymanie bardzo czystych izolatów RNA w wyniku ultrawierowania w gradiencie chlorku cezu, jednak ze względu na małą dostępność odpowiedniego sprzętu (wysoki koszt ultrawirówek), a przede wszystkim na czas wykonania izolacji, metoda ta jest obecnie niemal zupełnie niestosowana. Należy jednak podkreślić, iż metoda ultrawierowania pozwala uzyskać nieosiągalną innymi sposobami czystość izolatu RNA. Najlepsze wyniki można osiągnąć, stosując ultrawierowanie w gradiencie chlorku cezu lizatów powstałych z wykorzystaniem soli guanidyny. Metoda Chirgwina i współpracowników polega na ultrawierowaniu homogenatów tkankowych lub komórkowych z użyciem 4-molowego izotiocyanianu guanidyny. Metody ultrawierowania opierają się na zjawisku sedymentacji RNA w gradiencie chlorku cezu (gęstość RNA w CsCl wynosi ok. 1,8 g/ml – jest znacznie wyższa niż gęstość pozostałych składników komórkowych). Zdenaturowane białka oraz DNA pozostają w lizacie lub ulegają flotacji. Nowatorstwo metody Chomczyńskiego i Sacchi polegało na połączeniu zalet wykorzystania soli chaotropowych ze stosowaną dotychczas bez powodzenia (z powodu degradacji RNA) ekstrakcją fenolowo-chloroformową. Metoda nazywana w skrócie AGPC (*acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform*) jest jednostopniowa, szybka, tania i pozwala na jednoczesną izolację RNA z wielu próbek. Jedynymi ograniczeniami ekstrakcji AGPC, które mogą w skrajnych przypadkach uniemożliwić izolację RNA odpowiedniej jakości, są: dość wysoka zawartość polisacharydów i proteoglikanów w otrzymanych ekstraktach oraz mała wydajność ekstrakcji RNA z tkanek o wysokiej zawartości triglicerydów (np. tkanka tłuszczowa). Są to jedyne właściwie mankamenty, które niekiedy wymuszają użycie metod opartych na ultrawierowaniu zamiast ekstrakcji fenolowo-chloroformowej.

W klasycznej metodzie AGPC wg Chomczyńskiego i Sacchi liza komórek przeprowadzana jest w roztworze lizującym (roztwór D) zawierającym 4 M izotiocyanian guanidyny, 0,5% sarkozyl jako detergent, β -merkaptoetanol jako dodatkowy czynnik deproteinizujący (zrywanie mostków disiarczkowych) oraz cytrynian sodu stabilizujący pH roztworu. W kolejnym etapie dodawane są kolejno: octan sodu (pH=4,0), fenol nasycony wodą (pH=4,0) i mieszanina chloroform-alkohol izoamylowy. Kwaśne pH fenolu zapewnia ekstrakcję DNA do warstwy organicznej, podczas gdy RNA pozostaje w fazie wodnej. Zdenaturowane białka pozostają bądź na granicy faz, bądź przechodzą do fazy organicznej.

Klasyczna metoda AGPC stała się podstawą do opracowania w latach 90. XX wieku wielu komercyjnie dostępnych metod wykorzystujących zwykle gotowe mieszaniny fenolu z solami chaotropowymi. Są to mieszaniny jednofazowe, w których fenol jest solubilizowany odpowiednimi dodatkami (np. glicerolu). Najbardziej znane i najpowszechniej sto-

sowane to Trizol® (Gibco BRL) i Tri-Reagent (Sigma). Polska firma A&A Biotechnology produkuje odczynnik o nazwie Fenzol.

Należy podkreślić, iż ani klasyczna metoda fenolowo-chloroformowa, ani żadna jej modyfikacja nie zapewniają stuprocentowej czystości ekstraktu od zanieczyszczeń domieszkami DNA genomowego. Wynika to z faktu przechodzenia części DNA do fazy wodnej. Dodatkowo, przenoszenie nadsącza w wielu przypadkach jest trudne manualnie i może spowodować zaaspirowanie części międzywarstwy, a tym samym zanieczyszczenie ekstraktu DNA genomowym. Istnieją dostępne komercyjnie odczynniki, tzw. *phase lock gels* np. (firmy Eppendorf), ułatwiające fizyczne oddzielenie obu warstw – wodnej i organicznej – w czasie ekstrakcji i zmniejszenie do minimum ryzyka kontaminacji genomowym DNA. Najbardziej wiarygodne uniknięcie zanieczyszczenia ekstraktu genomowym DNA zapewnia jednak trawienie ekstraktu RNA deoksyrybonukleazami (DNazami). Strategia taka powinna być stosowana zawsze przy ekstrakcji całkowitego RNA.

Oczyszczanie ekstraktu przeprowadzane jest zwykle poprzez precypitację izopropanolem i przemywanie 70–75% etanolem. Rzadko stosowaną strategią oczyszczania jest różnicowe wytrącanie RNA za pomocą chlorku litu, co pozwala na uwolnienie ekstraktu od domieszek genomowego DNA. Można także stosować oczyszczanie metodą chromatografii na kolumnkach wypełnionych złożem krzemionkowym. Jest to metoda gwarantująca znacznie wyższą czystość RNA, co odbywa się jednak kosztem zmniejszonej wydajności ekstrakcji.

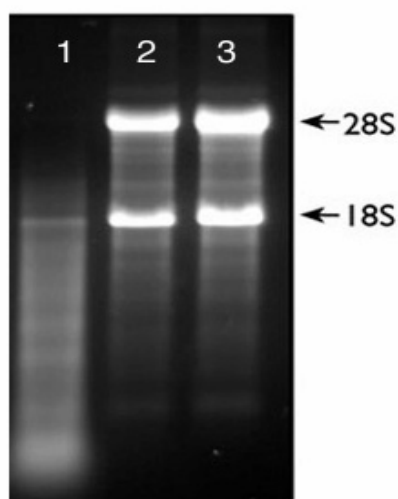
Przechowywanie ekstraktów RNA w postaci suchego osadu jest metodą zabezpieczającą integralność RNA na dłuższy czas pod warunkiem przechowywania w niskiej temperaturze (rzędu -70°C). Przechowywanie rozpuszczonego ekstraktu niesie już ryzyko degradacji, nawet jeżeli jest umieszczony w niskiej temperaturze. Największe straty powoduje kilkukrotne zamrażanie i rozmrażanie ekstraktów. Dodatkowym czynnikiem zabezpieczającym przed degradacją jest dodawanie do rozpuszczonego ekstraktu RNA enzymatycznych inhibitorów RNaz dostępnych komercyjnie.

Najczęstszym celem izolacji RNA jest następcza analiza frakcji mRNA. Jej olbrzymia heterogenność sprawia, że nie ma możliwości łatwego izolowania mRNA za pomocą elektroforezy, czy też innymi metodami opierającymi się na różnicach mas molekularnych. Skutecznym sposobem izolacji czystej frakcji mRNA jest technika chromatografii powinowactwa. Ekstrakt całkowitego RNA jest nanoszony na kolumnę wypełnioną złożem oligo(dT)-celulozowym lub oligo(dU)-sefarozą. Końce 3' większości transkryptów mRNA są poliadenylowane, co pozwala na ich selektywne związanie z oligonukleotydami politymidynowymi lub poliurydynowymi.

Kolejną, często analizowaną frakcją, zwłaszcza u bakterii, jest frakcja rybosomalnego RNA. W tym przypadku, ze względu na charakterystyczne masy cząsteczkowe, istnieje ewentualna możliwość izolacji rRNA z populacji całkowitego RNA po przeprowadzeniu jego wcześniejszego rozdziału elektroforetycznego. Tego typu procedura jest jednak stosunkowo rzadko przeprowadzana.

Ocena jakościowa i ilościowa ekstraktów RNA dokonywana jest spektrofotometrycznie oraz elektroforetycznie. Elektroforezę ekstraktów RNA przeprowadza się w 0,5–1% żelach agarozowych z dodatkiem czynnika denaturującego (mieszanina 50% formidu z glioksałem lub formaldehyd). Zadaniem czynnika denaturującego jest eliminacja struktur drugorzędowych RNA wynikających z tworzenia struktur pseudodwuniciowych

w obrębie komplementarnych fragmentów pojedynczych nici RNA. Nie należy przeprowadzać denaturacji RNA w środowisku alkalicznym, gdyż wysokie pH bardzo przyspiesza proces degradacji szkieletu cukrowo-fosforanowego RNA; zamiast pękających wiązań wodorowych w odcinkach pseudodwuniciowych RNA dochodzi do fragmentacji cząsteczki kwasu rybonukleinowego. W każdej z zastosowanych technik ekstrakcji całkowitego RNA po rozdziale elektroforetycznym powinien być widoczny charakterystyczny obraz złożony z dwóch głównych frakcji RNA – 28S i 18S rRNA – w postaci wyraźnych, jednolitych prążków wskazujący na brak degradacji ekstraktu RNA (ryc. 2. ścieżka 2 i 3). Pomiar spektrofotometryczny wykonywany jest przy kilku długościach fali. Do określenia ilości (stężenia) RNA służy wielkość absorbancji przy 260 nm. Współczynnik absorbancji dla RNA wynosi około 40. Jeżeli zatem wartość A_{260} jest równa 40, to stężenie RNA wynosi 40 $\mu\text{g/ml}$. Stosunek absorbancji przy 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}) powinien mieścić się w zakresie 1,8–2,0 lub według innych źródeł 1,8–2,1. Idealnie czysty ekstrakt powinien charakteryzować się stosunkiem $A_{260}/280$ równym 2,0. Zanieczyszczenia fenolem, dosyć powszechnie spotykane w przypadku ekstrakcji fenolowo-chloroformowej, powodują wzrost absorbancji przy fali długości 270 nm.



Ryc. 2. Rozdział elektroforetyczny ekstraktu całkowitego RNA; ścieżka 1: przykład zdegradowanego ekstraktu kwasu rybonukleinowego; ścieżki 2 i 3: rozdziel dobrej jakości izolatu RNA z widocznymi frakcjami 28 i 18 S rRNA.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Chomczynski P., Sacchi N.: A single-step method of RNA extraction and purification. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159. – [2] Gemmill R.M.: Pulsed field gel electrophoresis. [In:] *Advances of Electrophoresis* 1991 (A. Chrambach, M.J. Dunn, and B.J. Radola, eds.), Vol. 4, pp. 1–48. VCH, Weinheim, Germany. – [3] Kondo T., Mukai M., Kondo Y.: Rapid isolation of plasmid DNA and LiCl-ethidium bromide treatment and gel filtration, *Anal Biochem* 1991; 198: 30–35. – [4] Nicoletti V.G., Condorelli D.F.: Optimized PEG method for rapid plasmid DNA purification: high yield from „midiprep”, *BioTechniques* 1993; 14: 532–536. – [5] „Praktikum z wybranych zagadnień inżynierii genetycznej.” Praca zbiorowa pod red. Zofii Porwit-Bóbr. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1992. – [6] Przykłady analiz DNA. Praca zbiorowa pod red. R. Słomskiego. Akademia Rolnicza w Poznaniu, Poznań 2004. – [7] Sambrook J., Russell D.W.: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001. – [8] Zhang H.B.: *Construction and Manipulation of Large-Insert Bacterial Clone Libraries*. Manual. Department of Soil and Crop Sciences and Crop Biotechnology Center, Texas A&M University, College Station, TX 77843-2123, USA 2000 (<http://hbz.tamu.edu>).

II. Transformacja bakterii – klasyczny przykład klonowania subkomórkowego

Grzegorz Machnik, Ilona Bednarek

Transformacja bakterii jest procesem pojawienia się nowego markera genetycznego wskutek pobrania DNA ze środowiska do komórki. Istotną cechą tego procesu jest to, że pobierany do komórek jest tzw. „goly” DNA, tzn. że nie jest on przyłączony do żadnego nośnika. Stan, w którym komórka posiada zdolność do pobrania obcego DNA nazywany jest kompetencją. U niektórych drobnoustrojów stan kompetencji występuje naturalnie na określonych etapach wzrostu i jest jednym z elementów naturalnego systemu transformacji i rekombinacji materiału genetycznego. Przykładem naturalnej zdolności do transformacji są gram-dodatnie komórki bakterii *Streptococcus*, które stają się kompetentne przy osiągnięciu gęstości komórek pomiędzy 10^7 a 10^8 . U innych bakterii, gram-ujemnych *Haemophilus influenzae*, następuje indukcja stanu kompetencji podczas głodzenia komórek, o ile w tym stadium nie zostaje zaburzony system syntezy białek. Podobnie u *Azotobacter*, można mówić o naturalnym stanie kompetencji, gdy hodowla bakterii osiągnie stacjonarną fazę wzrostu. We wszystkich powyższych systemach wniknięciu do komórek podlega wyłącznie DNA homologiczny i jest to element procesu nazywanego rekombinacją homologiczną. Rekombinacja jest zjawiskiem powszechnym, występującym zarówno u bakterii gram-dodatnich jak i gram-ujemnych, przy czym obserwuje się pewne różnice w przebiegu procesu u obu wymienionych grup. Kompetencja nie występuje u wszystkich drobnoustrojów w sposób naturalny, brak jej np. u *Escherichia coli*.

W warunkach laboratoryjnych często zachodzi konieczność wprowadzenia do komórek (w tym komórek bakteryjnych) obcego DNA, najczęściej w postaci konstrukcji genowej – wektora zawierającego analizowany fragment DNA. Transformacja bakterii, a następnie replikacja obcego DNA w komórce, jest drugim, poza techniką PCR, sposobem powielania DNA w warunkach *in vitro*. Proces powielenia obcego materiału genetycznego w komórce bakteryjnej często określane jest jako proces klonowania subkomórkowego. W praktyce laboratoryjnej powszechnie wykorzystuje się fakt, że komórki drobnoustrojów mogą nabywać kompetencję na skutek działania pewnych czynników, takich jak na przykład zamrażanie i rozmrażanie komórek w obecności glikolu polietylenowego (np. u bakterii *Argobacterium tumefaciens*). W przypadku najczęściej wykorzystywanego w procedurach laboratoryjnych drobnoustroju – *E. coli*, do uzyskania kompetencji stosuje się zazwyczaj jony wapnia (pochodzące z soli o wysokich stężeniach, np. CaCl_2), których aktywność potęgowana jest szokiem termicznym: działaniem niską ($0\text{--}5^\circ\text{C}$), a następnie podwyższoną temperaturą (42°C).

Na stan kompetencji (i wydajność późniejszej transformacji) wpływa wiele różnych czynników, takich jak szczep drobnoustroju, rodzaj wprowadzanego DNA (a tu istotne są takie cechy, jak: forma wektora molekularnego – liniowa lub kłosa, długość wektora, obecność markerów selekcyjnych, stopień oczyszczenia, czyli jakość zastosowanego do transformacji DNA). Równie istotne są takie parametry, jak: sposób prowadzenia hodow-

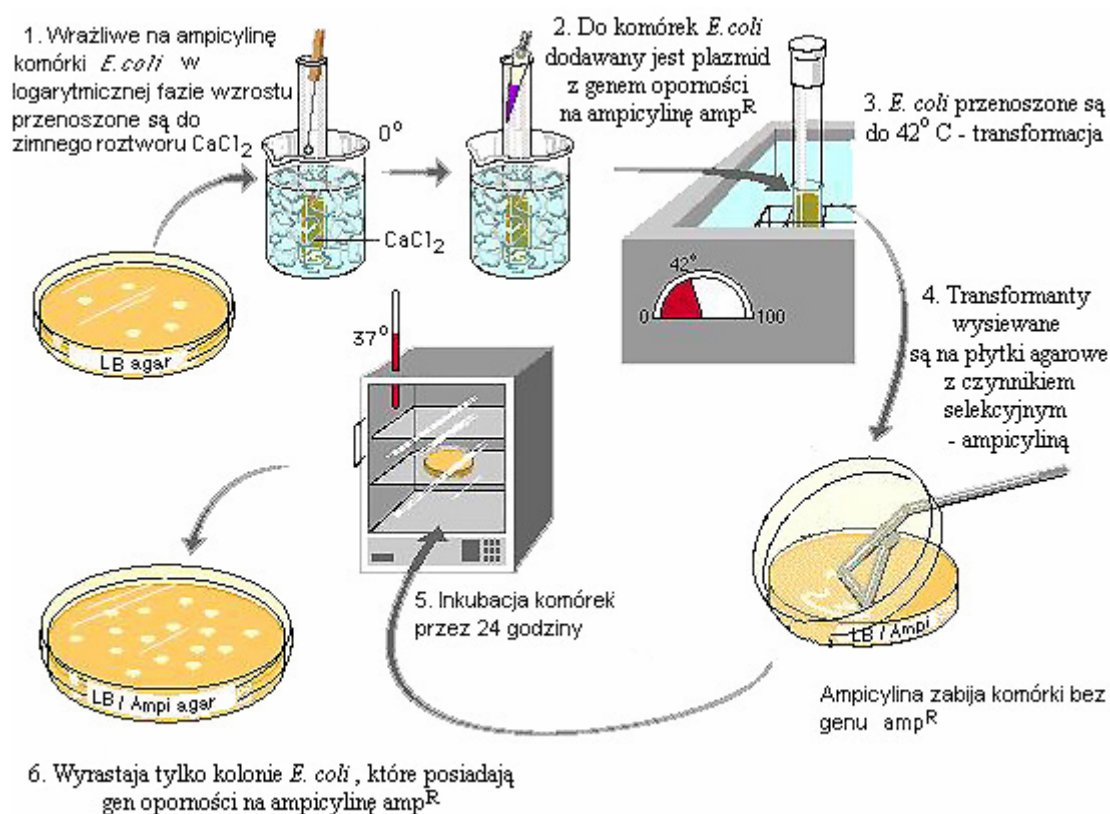
li, obecność wirusów lub mutagenów w środowisku. Stwierdzono, że przetrzymywanie komórek na lodzie wpływa pozytywnie na wydajność późniejszej transformacji. Niskie temperatury hodowli (w przypadku *E. coli* 18°C) wpływają na ogół korzystnie na kompetencję. Przechowywanie oraz hodowla komórek bakteryjnych przed etapem transformacji ma istotne znaczenie. Najbardziej optymalnym sposobem przechowywania bakterii *E. coli* jest sporządzanie zawiesiny komórek w czystym podłożu wzrostowym z dodatkiem 20% glicerolu i przeniesienie do temperatury rzędu -80°C.

Alternatywnym sposobem jest utrzymywanie powolnego wzrostu bakterii w półpłynnym agarze przetrzymywanym w temperaturze 20–25°C w ciemni. W obu przypadkach przed przystąpieniem do przygotowania bakterii do transformacji jest ich wysianie na świeże podłoże wzrostowe i hodowla do momentu wejścia w fazę wzrostu logarytmicznego, co monitorowane jest pomiarem gęstości optycznej hodowli (OD). Gęstość ta dla szczepów *E. coli* powinna wynosić około $1\text{--}5 \times 10^8$ komórek/ml, co odpowiada wartości $OD_{550-600} = 0.5\text{--}0.7$. Przechowywanie szczepów bakterii w formie tzw. ampulek glicerolowych bez ich rozmrażania praktycznie może być nieskończone, natomiast forma przechowywania w półpłynnym agarze umożliwia utrzymywanie żywych i aktywnych komórek bakteryjnych do lat pięciu. Zaleca się jednak czasowo przepasażować przechowywany szczep w celu „odmłodzenia” populacji komórek; należy również zwracać uwagę na to, aby nie doprowadzać do tzw. przerastania hodowli. Grozi to kontaminacją głównie bakteriami beztlenowymi, w tym *Clostridium*, a co za tym idzie błędnym bankowaniem komórek przeznaczonych do transformacji.

Jak wspomniano, najczęstszą metodą transformacji bakterii *E. coli* jest dodatek wielu dwuwartościowych jonów Ca^{2+} . Jony wapnia powodują strukturalne zmiany w ścianie komórkowej *E. coli*, co pozwala na проникnięcie DNA (np. plazmidu) do wnętrza komórek bakterii. Jony wapnia neutralizują ujemne ładunki w DNA oraz odpowiednie ładunki po zewnętrznej stronie błon komórkowych, co ułatwia zbliżenie się DNA do powierzchni komórek. Obecność dwuwartościowych jonów oraz niskiej temperatury powoduje tworzenie ośrodków krystalizacji w pobliżu komórek bakterii, co z kolei tworzy pory w błonie komórkowej i umożliwia проникnięcie DNA do wnętrza komórki. W procedurze transformacji bakterii wyróżnia się trzy główne etapy:

- przygotowanie komórek kompetentnych (indukcja zdolności do przyjęcia obcego DNA),
- transformacja komórek kompetentnych (wprowadzenie DNA do komórek),
- selekcja transformantów (odnalezienie i namnożenie tych komórek, które uległy transformacji).

Schemat postępowania uwzględniający otrzymywanie komórek kompetentnych i ich transformację przedstawia rycina 3.



Ryc. 3. Schemat procesu transformacji bakterii metodą szoku termicznego w obecności wysokich stężeń jonów Ca^{2+} .

Większość szczepów *E. coli* wykazuje wydajność transformacji rzędu 10^5 – 10^8 transformantów/ μg plazmidowego DNA, zależnie od użytej techniki i ze względu na różne, omówione wcześniej, czynniki. Wykazano, że najbardziej krytycznym momentem transformacji drobnoustrojów jest przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli*.

Opracowano wiele procedur laboratoryjnych, które zwiększają wydajność transformacji; na przykład użycie innych kationów: K^+ , Mg^{2+} czy Mn^{2+} lub takich związków, jak LiCl , glutaminian litu, RbCl_2 , zwiększa znacząco, bo aż około 1000 razy wydajność transformacji.

Wysoko wydajna i łatwa do przeprowadzenia transformacja została opracowana przez D. Hanahan. Polega ona na użyciu organicznego rozpuszczalnika – dimetylosulfotlenku (DMSO). Uzyskiwana wydajność wynosi do ok. 10^8 transformantów/ μg plazmidowego DNA. Podobne efekty przynosi zastosowanie w buforze do transformacji dodatku ditiotretolu (DTT). Należy podkreślić, że zarówno DMSO, jak i DTT zwiększają transformację *E. coli* szczepów: DH5 α , czy HB101, natomiast szczepy DH10B oraz MC1061 i ich pochodne w obecności wymienionych związków chemicznych tracą kompetencję, w związku z czym maleje ich zdolność do transformacji.

Technika transformacji, zaproponowana przez badacza Inoue, pozwalająca również uzyskać wysoką wydajność procesu transformacji, polega m. in. na prowadzeniu kultury bakterii w 18°C zamiast standardowych 37°C . Technika ta umożliwia uzyskanie ok. 100–1000x wyższej wydajności transformacji w porównaniu z tradycyjną metodą z zastosowa-

niem CaCl_2 . Komórki kompetentne otrzymane zgodnie z techniką opracowaną przez Inoue i wsp. są często nazywane komórkami „ultrakompetentnymi”.

Inną techniką wykorzystywaną do transformacji komórek, będącą alternatywą do metod chemicznych, jest metoda fizyczna – elektroporacja. Polega ona na wykorzystaniu prądu elektrycznego jako czynnika wymuszającego transfer DNA ze środowiska do komórek bakteryjnych. Przygotowując bakterie do elektroporacji prowadzi się ich hodowlę do fazy wzrostu logarytmicznego, a następnie umieszcza się komórki w buforze zawierającym 10% glicerolu. Tak przygotowane drobnoustroje poddaje się działaniu krótkich impulsów wysokiego napięcia prądu elektrycznego (12,5–15 kV/cm), które prowadzą do przejściowej destabilizacji błon komórkowych i umożliwiają wniknięcie DNA do wnętrza. Optymalna wydajność transformacji jest uzyskiwana dzięki użyciu specjalnych kuwet do elektroporacji i prowadzeniu całego procesu w temperaturze od 0°C do 4°C (w temperaturze pokojowej wydajność procesu spada przeciętnie 100 razy). W elektroporacji szczególnie ważne jest, aby używać do transformacji oczyszczonego DNA, a przede wszystkim, aby był on pozbawiony wszelkich soli; ich obecność wpływa na wzrost przewodnictwa elektrycznego i może doprowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia komórek. Stosowany DNA powinien być również pozbawiony resztek fenolu, chloroformu, etanolu czy detergentów, bufor zaś, w którym zawieszony jest DNA, powinien mieć jak najmniejszą siłę jonową. Metoda elektroporacji jest najbardziej efektywną ze wszystkich technik transformacji bakterii, pozwala uzyskać wydajność rzędu $1\text{--}3 \times 10^9$ transformantów/ μg plazmidowego DNA.

Podobnie jak dla metody chemicznej, wydajność transformacji w przypadku elektroporacji zależy tak od „parametrów” opisujących wprowadzaną cząsteczkę DNA, jak i od charakterystyki szczepów poddanych elektrotransferowi. W porównaniu z metodą chemiczną, do efektywnej transformacji bakterii elektroporacja wymaga mniejszych ilości DNA, wystarczy bowiem stosowanie stężeń DNA nawet rzędu 5 pg/transformację, przy czym wzrost stężenia automatycznie zwiększa wydajność transformacji. W przypadku elektroporacji mniejsza jest również zależność wydajności transformacji od wielkości wprowadzanej cząsteczki DNA; odpowiednio dla metody chemicznej, wraz ze wzrostem wielkości DNA, spada znacząco wydajność transformacji. Istotniejszym parametrem staje się jednak rodzaj szczepu użytego do elektroporacji. Przeżywalność bakterii z grubszą ścianą komórkową, jaka jest charakterystyczna np. dla szczepu *E. coli* JM109, jest wyższa (w obecności działającego impulsu elektrycznego), a przez to względna wydajność transformacji rośnie. Często jednak ze względu na dodatkowe utrudnienia w izolacji DNA z takich komórek transformantów do elektroporacji wybiera się inne szczepy, a wśród nich *E. coli* MC1061 czy DH10B. Hodowla tych dwóch ostatnich szczepów w obecności Mg^{2+} daje najwyższą wydajność transformacji rzędu $1\text{--}5 \times 10^{10}$ kolonii bakteryjnych transformantów/ μg DNA, natomiast w metodzie chemicznej wartość ta wynosi odpowiednio: $1\text{--}10 \times 10^8$ transformantów/ μg DNA.

Do transformacji niektórych komórek wykorzystywać można również inną technikę wprowadzania DNA, nazywaną techniką balistyczną (*gene-gun*). Polega ona na opłaszczeniu cząsteczek stałych (np. złota) wprowadzaniem DNA, a następnie wstrzeliwaniu ich do wnętrza komórek. Metoda ma stosunkowo niską wydajność i nie jest stosowana w przypadku *E. coli*, jest natomiast przydatna w przypadku komórek trudno ulegających transformacji. Jest też powszechnie wykorzystywana do transformacji komórek roślin.

PIŚMIENNICTWO

[1] *Hanahan D.*: Techniques for transformation of *E. coli*. [in:] *DNA Cloning: A Practical Approach* (Ed. D. M. Glover), vol. 1. IRL Press, Oxford 1987. – [2] *Hardin C., Pinczes J., Riell A.* et al.: Cloning, gene expression and protein purification. Experimental procedures and process rationale. Oxford University Press, New York 2001. – [3] *Inoue H., Nojima H., Okayama H.*: High efficiency transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 1990; 96: 23–28. – [4] *Karcher S.J.*: *Molecular biology. A project approach*. Academic Press, San Diego 1995. – [5] *Sambrook J., Russell D.W.*: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001.

III. Wprowadzenie informacji genetycznej do komórek, wektory molekularne, metody transferu

Ilona Bednarek, Krzysztof Cholewa, Magdalena Czajka-Uhryn

Terapia genowa i procedury laboratoryjne w inżynierii genetycznej wymagają wprowadzenia informacji genetycznej do komórki w taki sposób, aby ulegała ona w niej efektywnej ekspresji. Wprowadzenie obcego, niczym nieosłoniętego fragmentu DNA do komórki eukariotycznej czy prokariotycznej najprawdopodobniej zakończyłoby się jego degradacją przez obecne enzymy nukleolityczne w komórkach. Aby uzyskać zamierzony efekt: ekspresję wprowadzonego materiału, należy wprowadzać dany gen (np. gen terapeutyczny) do komórki za pomocą cząsteczek – nośników, których zadaniem jest z jednej strony ułatwienie wniknięcia materiału genetycznego do komórek, z drugiej zaś – zabezpieczenie go przed degradacją. Cząsteczki, które spełniają rolę nośników materiału genetycznego określa się mianem wektorów. Wektor, który zapewnia nie tylko transfer materiału genetycznego, lecz także jego ekspresję w komórce, do której został dostarczony, nazywany jest wektorem ekspresyjnym.

Często wykorzystuje się do transferu materiału genetycznego takie nośniki, które dodatkowo umożliwiają powielenie wprowadzonej informacji genetycznej wewnątrz komórki, a tym samym są odpowiedzialne za zjawisko amplifikacji wewnątrzkomórkowej, nazywanej również klonowaniem subkomórkowym. W tym wypadku nośniki informacji genetycznej cechuje zdolność do autonomicznej replikacji w określonym typie komórek. Najczęściej taką zdolność posiadać będą nośniki o charakterze plazmidów, fagów lub innych nośników wirusowych. Ponieważ te ostatnie nie mogą wskutek pojawienia się w organizmie – komórce wywołać efektów niekorzystnych, najczęściej są one tak modyfikowane genetycznie, aby zdolność do replikacji zostawała w komórkach wyłączona. Zdolność replikacyjną zachowują jedynie wybrane nośniki wirusowe i to najczęściej te, które służą do transferu genów do komórek innych niż ludzkie. Najczęściej wykorzystywanymi nośnikami informacji genetycznej, które mogą być wykorzystane do transferu DNA zarówno do komórek prokariotycznych, jak i eukariotycznych oraz mają zdolność autonomicznej replikacji w komórce są nośniki plazmidowe.

Wektory ekspresyjne, obok wektorów wirusowych czy sztucznych chromosomów: drożdżowego i ludzkiego, to konstruowane, najczęściej dwuniciowe, koliste cząsteczki DNA zbudowane na bazie plazmidu, faga, kosmidu zawierające wszystkie elementy DNA wymagane do osiągnięcia transfekcji, transkrypcji i translacji klonowanego fragmentu w komórkach.

W obrębie schematycznej budowy wektora molekularnego można wyróżnić następujące fragmenty:

Promotor, czyli miejsce inicjacji transkrypcji wprowadzonej w obręb kontroli ekspresji genu. Obecność silnego promotora, wydajnie wiążącego polimerazę RNA powoduje, że wprowadzony odcinek DNA ulega silnej transkrypcji i na matrycy mRNA powstają w komórkach określone produkty białkowe.

Gen terapeutyczny jest to wprowadzona metodami rekombinacji sekwencja nukleotydów kodująca określony, zaplanowany produkt (białko lub dany rodzaj RNA, oligonukleotyd), który pełni właściwą funkcję leczniczą, w tym pełniący funkcję np. antysensownej nici regulującej ekspresję wybranych genów.

MCS (*Multiple Cloning Site*) – miejsce wielokrotnego klonowania, jest to miejsce wbudowywania genu terapeutycznego w strukturę wektora. Odcinek zawierający sekwencje rozpoznawane przez kilkanaście, a przynajmniej jeden z enzymów restrykcyjnych umożliwiających wklonowanie danego genu w wektorową cząsteczkę DNA.

Sygnal poliadenylacji (poliA) jest to sygnał „stop” dla polimerazy RNA, miejsce terminacji transkrypcji. Odcinek niezbędny do „zatrzymania” ekspresji transgenu w komórce w obrębie sekwencji, która zostanie wbudowana w strukturę wektora.

Poliadenylacja mRNA spełnia wiele funkcji – jest niezbędna do właściwego przebiegu translacji, chroni mRNA przed degradacją i daje możliwość regulacji ekspresji genu. Postuluje się też jej możliwe znaczenie w eksporcie mRNA z jądra do cytoplazmy. Poliadenylacja RNA to proces rozpowszechniony we wszystkich królestwach świata ożywionego. Zjawisko to jest związane z metabolizmem RNA w różnych systemach biologicznych. Funkcja poliadenylacji może być odmienna, w zależności od grupy organizmów czy nawet przedziału komórkowego, w którym proces ten zachodzi. Synteza ogonów poli(A) na końcach 3' w jądrze i cytoplazmie eukariontów prowadzi do zwiększenia stabilności transkryptów. W przypadku prokariotów, chloroplastów oraz mitochondriów roślinnych poliadenylowane RNA są natomiast kierowane na ścieżkę egzonukleolitycznej degradacji.

Gen markerowy, gen umożliwiający selekcję transfekowanych komórek, koduje zazwyczaj charakterystyczne białko posiadające określoną aktywność enzymatyczną lub posiadające unikalną cechę, np. fluorescencji, jak w przypadku białka GFP. Gen markerowy często jest również genem selekcyjnym, koduje „oporność” na działanie wybranych czynników selekcyjnych, np. antybiotyków; jedynie komórki transfekowane wektorem, posiadające wspomniany gen selekcyjny, mają możliwość przeżycia w obecności czynnika selekcyjnego. Zapewnia to równocześnie oczekiwany przez nas wzrost tylko tych komórek, które posiadają wprowadzoną wraz z wektorem obcą informację genetyczną.

Geny reporterowe, najczęściej stosowane w procesach transfekcji komórek eukariotycznych, to:

Gen *lacZ*, wchodzący w skład operonu laktozowego *E. coli*. Koduje on β -galaktozydazę, tetrameryczny enzym hydrolizujący laktozę (β -galaktozyd) do galaktozy i glukozy.

Gen kodujący GFP (*Green Fluorescent Protein*), czyli białko fluoryzujące w zakresie barwy zielonej. Białko to jest izolowane z organizmów meduz morskich. Najwyższe wzbudzenie luminescencji GFP występuje przy $\lambda=395$ nm lub $\lambda=475$ nm, emisja światła następuje przy $\lambda=508$ nm. Obecnie dostępnych jest wiele mutantów tego białka.

Gen kodujący lucyferazę (*luc*). Lucyferaza katalizuje reakcję, wykorzystując D-lucyferinę i ATP w obecności tlenu i jonów Mg^{2+} , której rezultatem jest emisja światła. Detekcja ekspresji genu lucyferazy może być przeprowadzona z użyciem luminometru. Dużym ograniczeniem stosowania takiego genu są jego wymogi w stosunku do obecności określonego promotora, jak i duża wielkość genu, znacznie ograniczająca pojemność wektora.

Gen zawierający informację o acetylotransferazie chloramfenikolu (CAT), która katalizuje przejście grupy acetylowej z AcetyloCoA na chloramfenikol. Enzymu tego nie odnaleziono w komórkach eukariotycznych.

Gen wydzielniczej fosfatazy alkalicznej (SEAP). W tym przypadku białkowy produkt jest wydzielany przez transfekowane komórki do medium hodowlanego.

Gen kodujący β -glukuronidazę (GUS), enzym przekształcający β -glukuroniany. Jako gen markerowy stosowany jest przy transfekcji komórek ssaków i roślin.

Gen kodujący ludzki hormon wzrostu (HGH)

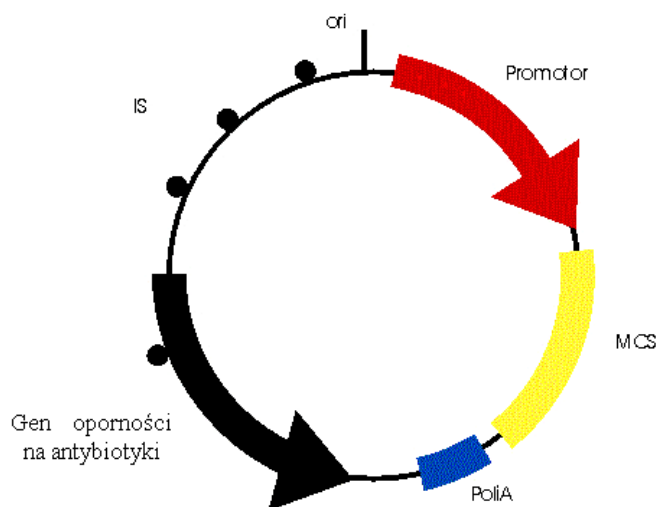
Geny reporterowe ułatwiają w dużej mierze normalizację efektywności transfekcji. Mogą być także wykorzystane do standaryzacji metod transfekcji. W przypadku komórek eukariotycznych dodatkowo stosowane są geny kodujące:

- fosfotransferazę neomycyny (*neo*),
- fosfotransferazę higromycyny-B (*hph*),
- fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową (*hgpRT*),
- dehydrogenazę histydynolu (*hisD*).

Wspomniane geny dodatkowo ułatwiają selekcję transfektantów i namnażanie tylko tych komórek, które zostały zmodyfikowane genetycznie poprzez wprowadzenie wektora molekularnego.

Obecnie dostępne komercyjnie wektory molekularne, poza wcześniej opisanymi, posiadają jeszcze wiele innych dodatkowych elementów ułatwiających bądź to klonowanie, (np. tzw. wektory TA z charakterystycznymi końcami zawierającymi nukleotydy pochodne tyminy i adeniny, ułatwiające klonowanie produktów PCR, często zawierających na swych końcach dodatkowe nukleotydy adeninowe), bądź ułatwiają ekspresję transgenu w komórce (dodatek fragmentów intronów itp.). Włączenie w strukturę wektora również sekwencji targetowych – liderowych, sygnałowych, kierujących produkt ekspresji do konkretnego miejsca w komórce: mitochondrium, ER, cytoplazma itp., w istotny sposób nie tylko ułatwia klonowanie, lecz umożliwia także nakierowanie transgenu do wybranej komórki lub organellum komórkowego. Konstruowanie wektorów również uwzględnia umieszczenie w ich strukturze różnego rodzaju sekwencji wzmacniających lub modulujących odpowiedź immunologiczną – IS; dotyczy to szczególnie tych wektorów, które wprowadzane są do organizmów w celu regulacji ekspresji wybranych genów i nie powinny być eliminowane z ustroju wskutek rozpoznania w tymże organizmie obcej informacji genetycznej.

Schemat podstawowej budowy wektora molekularnego przedstawiono na poniższym rysunku (ryc. 4).



Ryc. 4. Budowa wektora ekspresyjnego. Skróty oznaczają odpowiednio: ori – miejsce inicjacji replikacji wektora, MCS – miejsce wklonowania genu terapeutycznego, poliA – sygnał poliadenyacji (sygnał stop), IS – sekwencje immunomodulujące.

W nomenklaturze laboratoryjnej obowiązują terminy typu: wektor rekombinowany – wektor zawierający wbudowany obcy gen. Wektor „pusty” to wektor bez wbudowanego genu leczniczego. Istnieją również tzw. wektory wahadłowe; to takie, które mają zdolność transferu materiału genetycznego do komórek prokariotycznych i eukariotycznych. Mogą one przenosić DNA z komórek prokariotycznych (gdzie wektory te się namnażają), do komórek eukariotycznych, w których ulegają ekspresji.

Stosowanie wektorów w terapii genowej i inżynierii genetycznej niesie ze sobą pewne ryzyko, stąd wybierając do badań określony wektor, należy pamiętać o możliwości pojawienia się następujących niepożądanych efektów ubocznych.

- Wektory retrowirusowe, wbudowując transgen do genomu komórek docelowych mogą uszkodzić gen znajdujący się w miejscu insercji wektora do genomu transfekowanych komórek gospodarza. Jest to tzw. insercyjna metageneza, która może zakończyć się śmiercią lub rozregulowaniem funkcji transfekowanych komórek.
- Stosowanie wektorów retrowirusowych lub wektorów opartych na adenowirusach może doprowadzić do pojawienia się w organizmie wirusa typu dzikiego w wyniku rekombinacji genetycznej. Dotyczy to w dużym stopniu obecności endogennych retrowirusów i transfekcji komórek wektorami molekularnymi pochodzenia retrowirusowego.
- Istnieje potencjalne niebezpieczeństwo przedostania się nowych odmian wirusa do środowiska po stosowaniu wektorów wirusowych. Rekombinanty mogą mieć zdolność autonomicznej replikacji lub egzystować w środowisku jako wirusy defektywne (wymagają koinfekcji odpowiedniego wirusa dzikiego).
- Podanie wirusa wektorowego do organizmu może spowodować wystąpienie objawów ubocznych, typu: gorączka, dreszcze, powiększenie wątroby, zmiana obrazu krwi, w istotny sposób zmniejszając komfort życia pacjenta.

Wymienione problemy związane z zastosowaniem wektorów molekularnych, zwłaszcza wirusowych, na szczęście stanowią jednak coraz mniejszy problem, a nowe generacje dostępnych cząsteczek wektorowych cechują się coraz wyższym wskaźnikiem w indeksie bezpieczeństwa dla pacjenta – organizmu.

Jak powyżej wspomniano, wektory stosowane w inżynierii genetycznej i w terapii genowej dzieli się na dwie podstawowe kategorie: wirusowe i niewirusowe. Wektorami niewirusowymi są głównie nagie cząsteczki DNA konstruowane na bazie naturalnie występujących w przyrodzie cząsteczek plazmidowych i bakteriofagowych, w tym kosmidów.

1. Wektory wirusowe

Wirusy to „twory organiczne”, których genom zamknięty jest w otoczce białkowej lub białkowo-lipidowej; zdolne są do namnażania jedynie w żywych organizmach właściwych.

Wektory wirusowe to replikacyjnie wadliwe wirusy, których wirusowa sekwencja kodująca została całkowicie lub częściowo usunięta na rzecz wprowadzonego genu terapeutycznego. Ich główną zaletą jest wysoka wydajność w dostarczaniu genów. Do głównych wad należą toksyczność i potencjalne niebezpieczeństwo replikacji kompetentnego wirusa. Lista wirusów stosowanych jako przenośniki genów jest bardzo długa, obejmuje ona wirusy DNA i RNA, przy czym najczęściej w publikowanych procedurach laboratoryjnych wykorzystywane są retrowirusy, adenowirusy oraz wirusy zależne od adenowirusów.

Retrowirusy

Retrowirusy – są to eukariotyczne RNA wirusy z rodziny *Retroviridae*, których genom stanowi RNA. Wirusy te po wnikięciu do komórek eukariotycznych używają własnych enzymów (odwrotna transkryptaza), przepisując swoją informację genetyczną na DNA, a w tej postaci wbudowują się do genomu gospodarza.

Insercja do genomu komórki gospodarza prowadzi do trwałej ekspresji wprowadzonego genu (także u „potomstwa” zmodyfikowanej komórki). Retrowirusy infekują komórki ulegające podziałom.

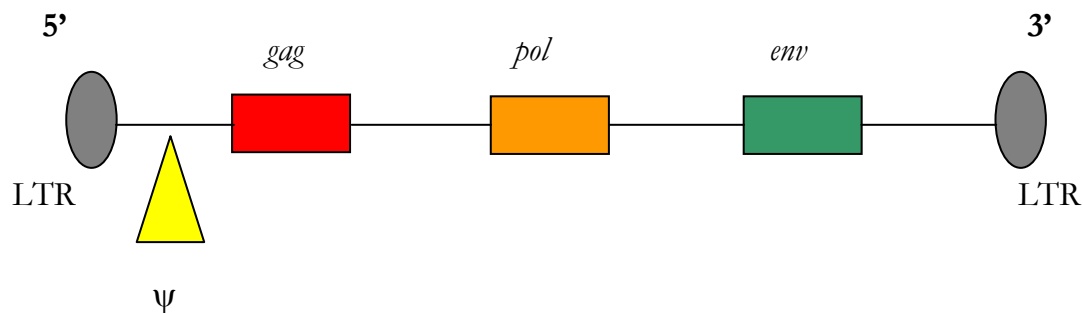
Wyjątkiem od tej reguły są lentiwirusy, np. wirus HIV, mogące integrować się także w komórkach dzielących się. W ciągu ostatnich lat pojawiły się doniesienia o możliwości infekowania przez wirusy niektórych typów komórek znajdujących się w okresie postmitotycznym. Integracja do genomu gospodarza nie może mieć przypadkowego charakteru, gdyż powstanie mutacji insercyjnej wiąże się z niebezpieczeństwem transformacji nowotworowej. Wbudowanie się retrowirusa do genomu nie jest zupełnie przypadkowe. Zależy od takich czynników, jak:

- sekwencja nukleotydowa wektora,
- stan metylacji dinukleotydów typu CpG,
- odległość od nukleosomów,
- autonomiczna transkrypcja chromatyny.

W genomie retrowirusa typu dzikiego można wyróżnić następujące regiony:

- LTR (*long terminal repeats*) – regiony niekodujące, odpowiedzialne za integrację i regulację transkrypcji,
- *gag* – region kodujący białka rdzenne wirusa,
- *pol* – region kodujący enzymy wirusowe – odwrotną transkryptazę, integrazę, proteazę,
- *env* – region kodujący glikoproteiny otoczki wirusowej,

- Ψ (psi) – sygnał enkapsydacji, czyli wbudowania namnożonego w komórkach genomu wirusa przez równoległe zsyntetyzowane białka otoczki. Schemat budowy genomu retrowirusa przedstawiono na rycinie (ryc. 5).



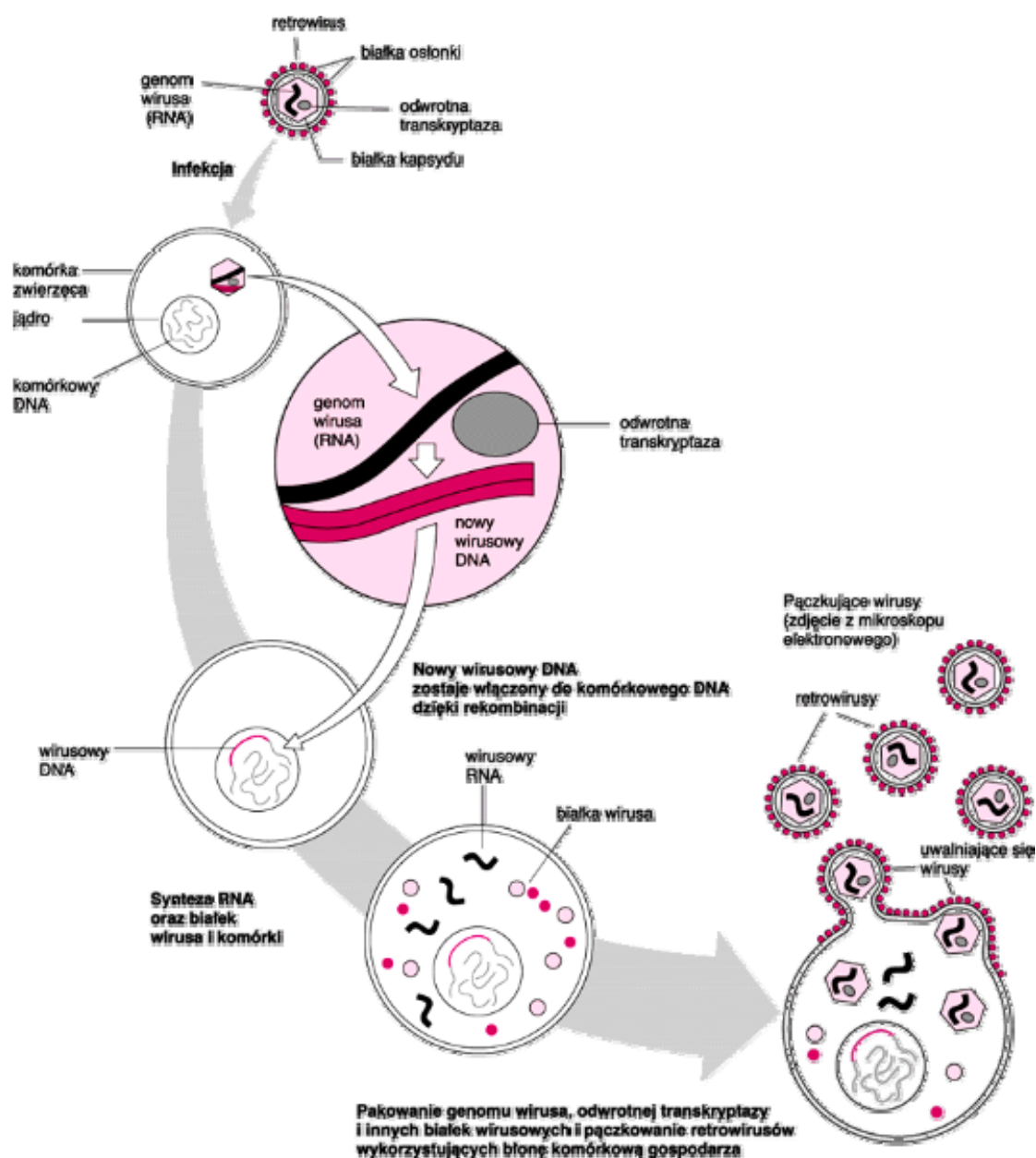
Ryc. 5. Schemat budowy genomu retrowirusa. Objasnienia skrótów podano powyzej.

Stosuje się różne zabezpieczenia mające na celu ochronę komórki – organizmu, do którego wprowadzane są wektory retrowirusowe, przed ewentualnym powstaniem dzikiego zakaźnego wirusa. Jedną z dróg ochronnych jest konstrukcja specjalnych komórek pakujących i produkujących wektory retrowirusowe.

Przygotowanie komórki pakującej polega na wprowadzeniu do niej defektywnego retrowirusa, to znaczy pozbawionego pewnych niezbędnych dla jego replikacji fragmentów genomu, głównie sekwencji odpowiedzialnej za pakowanie dojrzałych cząsteczek wirusa.

Do komórki pakującej można wprowadzić utworzony technikami inżynierii genetycznej wektor retrowirusowy, z którego usunięto enzymami restrykcyjnymi geny strukturalne wirusa, a na ich miejsce wprowadzono gen terapeutyczny. W genomie takiej komórki obecny jest jedynie prowirus i gen terapeutyczny.

Dzięki takiej konstrukcji glikoproteiny otoczkowe wirusa oplaszczają RNA genu leczniczego i możliwe jest uwolnienie wektora wirusowego. W genomie takiego wektora obecny jest gen *pol*, brak natomiast genów strukturalnych wirusa, co ma na celu niedopuszczenie do jego dalszej replikacji.



Ryc. 6. Schemat powstania i działania wektorów retrowirusowych.

Dodatkowe modyfikacje zabezpieczające to punktowe mutacje w obrębie sekwencji powtórzonych odpowiedzialnych za integrację z genomem – LTR lub konstruowanie wektorów samobójczych (*suicide vectors*), charakteryzujących się delecją fragmentu określonego promotora znajdującego się w 3'-LTR.

Istnieją różne typy retrowirusów:

- wirusy ekotropowe – infekują tylko komórki myszy,
- wirusy ksenotropowe – infekują wiele gatunków komórek ssaków z wyjątkiem komórek myszy,
- wirusy amfotropowe – zdolne do infekowania komórek myszy i komórek innych ssaków.

W retrowirusowe wektory wbudować można DNA o długości nie większej niż 9–10 kpz. Wektory retrowirusowe należą do najczęściej stosowanych w terapii genowej, co wynika z wielu ich zalet. Największą z nich jest zdolność do stabilnej i prawie 100% transdukcji komórek docelowych, umożliwiającej długotrwałą ekspresję terapeutyczną materiału genetycznego.

Adenowirusy

Adenowirusy to grupa wirusów, których genom stanowi dwuniciowy kwas dezoksyrybonukleinowy (dsDNA). W odróżnieniu od retrowirusów infekują one zarówno komórki dzielące się, jak i komórki nieulegające podziałom (neurony, kardiomiocyty), co znacznie zwiększa zakres komórek podatnych na działanie terapii genowej. Ponadto adenowirusy są pojemniejsze w porównaniu z retrowirusami, mogą pomieścić do około 7,5 kpz nowej informacji genetycznej.

Adenowirusy infekujące komórki nie integrują z genomem gospodarza, ale pozostają w postaci pozachromosomalnych episomów, które łatwo mogą ulec inaktywacji, na przykład w czasie podziału komórki. Eliminuje to z jednej strony niebezpieczeństwo mutacji insercyjnej, z drugiej jednak wpływa na krótkotrwałość efektu terapii.

Wadą wektorów adenowirusowych jest ich immunogenność, a także zdolność do indukcji odpowiedzi cytotoksycznej wobec komórek transdukowanych. Nie udokumentowano dotychczas działania nowotworowego omawianych wektorów.

Wektory adenowirusowe charakteryzują się wysoką stabilnością i możliwością uzyskania ich w bardzo wysokim mianie. Niezwykle ważną zaletą wektorów jest łatwość konstruowania ich z komponentów plazmidowych.

W budowie genomu adenowirusa można wyróżnić następujące regiony:

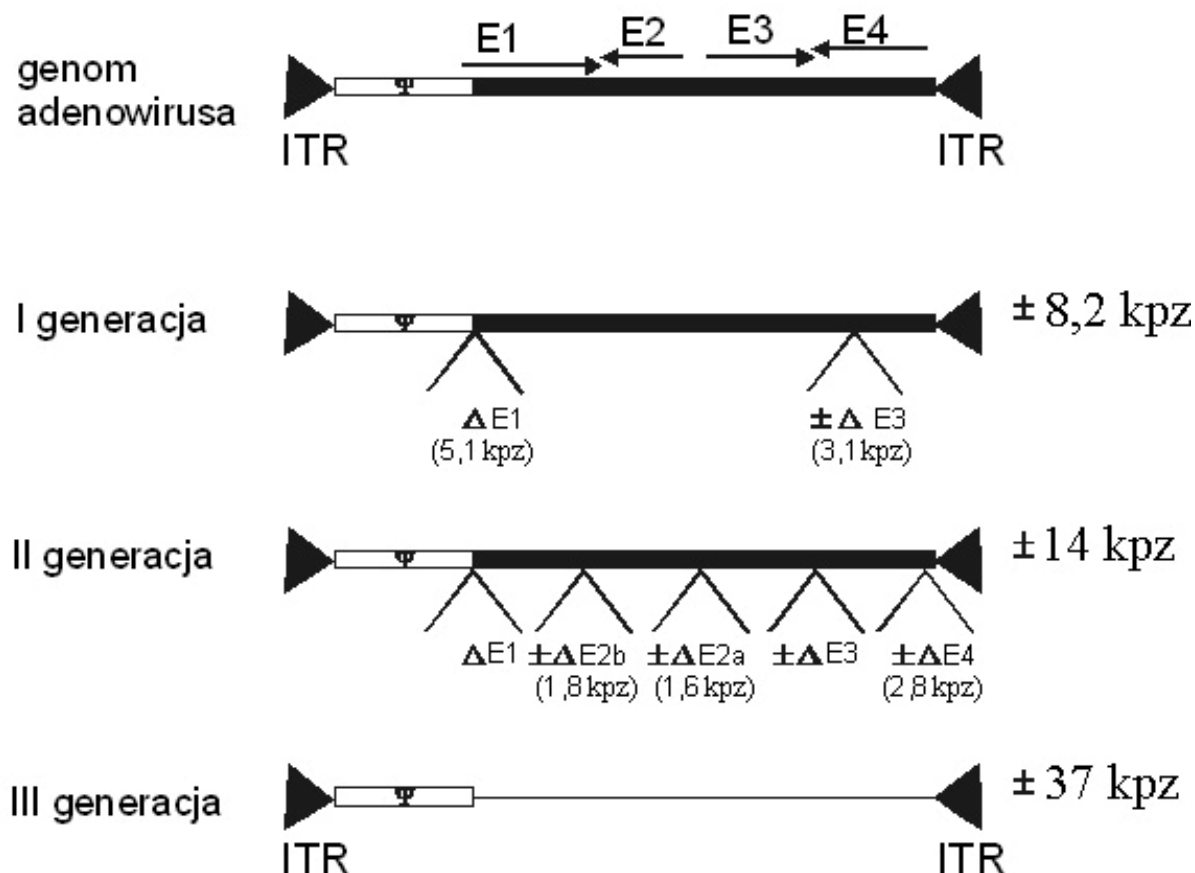
- ITR (*inverted terminal repeats*) – odwrotnie powtórzone sekwencje końcowe,
- E1 (*early gene region*) – region kodujący produkty niezbędne w procesie replikacji,
- E2, E4 – regiony kodujące białka wirusowe: E2a – białko łączące DNA,
- E2b – wirusowa polimeraza DNA,
- E3 – region kodujący produkty neutralizujące mechanizmy obronne gospodarza, nie są one niezbędne do procesu replikacji.

Wektory adenowirusowe **pierwszej generacji** wywoływały znaczną odpowiedź immunologiczną *in vivo*, spowodowaną głównie syntezą białek wirusowych. W celu eliminacji tego problemu genom omawianych wektorów został pozbawiony sekwencji E1 i E3, dodatkowo umożliwiło to zwiększenie wielkości wstawek transgenów i przyjmowanie insertów o długości do 8,2 kpz.

Wektory **drugiej generacji** wykazują delecję regionów: E1, E2b, E2a, E3, E4. Dało to możliwość wprowadzenia insertu o długości do 14 kpz, przy jednocześnie mniejszej ekspresji białek wirusowych.

Wektory **trzeciej generacji** charakteryzują się zachowaniem sekwencji niezbędnych do replikacji DNA i upakowania wirusa. Pozostałe sekwencje wirusowe uległy delecji, stąd wektor ten charakteryzuje się największą pojemnością upakowania wynoszącą około 37 kpz.

Wszystkie rodzaje omawianych wektorów charakteryzują się delecją fragmentu E1, umożliwiającą replikację.



Ryc. 7. Budowa genomu adenowirusa i wektorów adenowirusowych. Wielkość DNA przedstawiono w tysiącach par zasad (kpz).

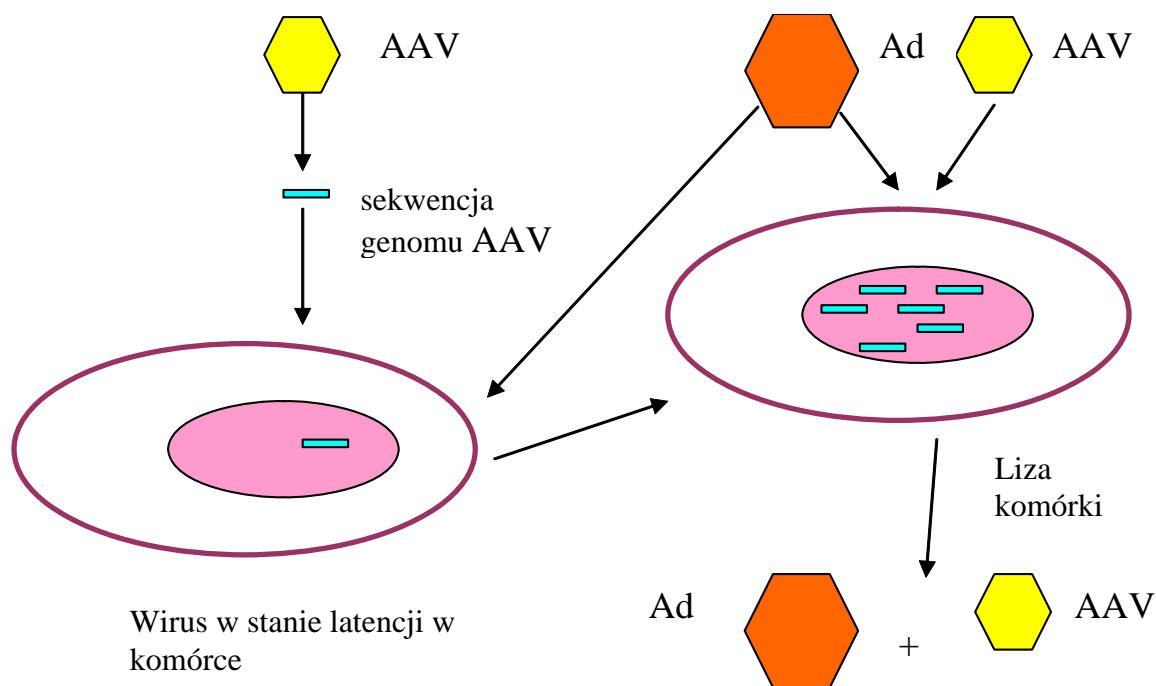
Wektory adenowirusowe mogą być z powodzeniem stosowane w terapii chorób, w zwalczeniu których długotrwała ekspresja nie jest wymagana, a reakcje immunologiczne nie mają większego znaczenia. Należy podkreślić, że naturalnie wektory wirusowe wykazują tropizm do komórek epitelialnych układu oddechowego, komórek mięśniowych i nerwowych, co predysponuje te wektory do terapii chorób „zlokalizowanych” w obrębie właśnie tych narządów – tkanek.

Adeno – associated viruses (AAV)

Zainteresowanie tą grupą wirusów wynikało z ich względnego bezpieczeństwa i specyficznej biologii. Są to wirusy, których genom stanowi jednoniciowy DNA (ssDNA), należą one do grupy *Dependovirus* z rodziny *Parvoviridae*.

AAV posiadają rzadko spotykaną biologię. Zakażają komórki dzielące się i niedzielące, co zwiększa pulę komórek docelowych. Po zainfekowaniu komórki AAV dosyntetyzowują na bazie ssDNA drugą nić DNA i jako dsDNA wbudowują się do genomu gospodarza. Do pełnej replikacji AAV wymagają jednak koinfekcji wirusa pomocniczego (zazwyczaj adenowirusa lub wirusa *Herpes*).

W przypadku nieobecności wirusa pomocniczego genom AAV integruje do genomu infekowanej komórki i przechodzi w stan latencji, czyli taki, w którym mimo obecności DNA w genomie nie dochodzi do produkcji wirusa, komórka przeżywa. Gdy jednak do takiej komórki wniknie np.: adenowirus, następuje wyłączenie stanu latencji AAV i rozpoczyna się efektywna produkcja wirusa oraz wektora.



Ryc. 8. Działanie wirusa AAV.

Można wyróżnić dwa typy AAV:

- typ dziki AAV (*wild – type*) wtAAV, wyróżnia się w nim regiony ITR, Rep (koduje nie-strukturalne białka), Cap (koduje białka strukturalne), pA (sygnał poliadenylacji),
- typ zrekombinowany – w zrekombinowanej formie sekwencja kodująca białko Rep musiała ulec znacznemu skróceniu ze względu na toksyczny charakter białka Rep w stosunku do komórek gospodarza. Gen Cap także został usunięty z wektora, przyczyniając przy tym 96% pojemności pakującej wirusa dla genu terapeutycznego i elementów regulujących jego ekspresję.

AAV integruje się w specyficznym miejscu genomu, w obrębie 19 chromosomu człowieka. Za miejsce integracji odpowiedzialne są prawdopodobnie sekwencje ITR oraz produkty genu Rep: Rep 78 i Rep 68. Podkreśla się również rolę endonukleaz oraz helikaz AAV w wyborze miejsca integracji. Wśród zalet AAV wyróżnić można:

- potencjalnie ciągłą ekspresję genu terapeutycznego,
- brak chorobotwórczości w związku z brakiem patogenności ze strony AAV,
- stabilność wektorów,
- odporność wirionów na rozpuszczalniki, detergenty, skrajne temperatury i graniczne pH,
- minimalne prawdopodobieństwo mutacji insercyjnej.

Do głównych wad wektorów AAV należą:

- niska pojemność dla wprowadzanego genu do 4,7 kpz,
- powszechność występowania przeciwciał przeciwko typowi dzikiemu AAV,
- trudność w uzyskaniu wysokiego miana wektora.

Inne wirusy stosowane jako wektory molekularne

Obecnie do konstrukcji wektorów wirusowych wykorzystuje się wiele innych wirusów, o których nie wspomniano wcześniej. Są to wirusy charakteryzujące się niejednokrotnie bardzo dużą zjadliwością, stąd bezpośrednie wykorzystanie ich form dzikich w inżynierii genetycznej, biologii molekularnej budziło wiele wątpliwości, gdyż wiązało się z dużym ryzykiem chorobotwórczości. Dopiero utworzenie odpowiednich, atenuowanych rekombinantów umożliwiło projektowanie i konstrukcję nowych wektorów wirusowych. Do wirusów wykorzystywanych w celu uzyskania wektorów wirusowych zalicza się:

Wirus SV40 – *Simian Virus 40*. Należy do rodziny *Papoviridae*, jest stosunkowo długo wykorzystywany jako wektor stosowany w terapii genowej. Jego genom stanowi kolistą, dwuniciową cząsteczkę DNA. W genomie wirusa zakodowana jest informacja dotycząca dwóch tzw. białek wczesnych (mały i duży antygen T) oraz trzech tzw. białek późnych (VP1; VP2; VP3), tworzących kapsyd wirusa. Cykl wirusa w komórkach niepermiemywnych (komórki gryzoni lub człowieka) zatrzymany zostaje po transkrypcji genów wczesnych, a DNA wirusa ulega integracji z genomem gospodarza, prowadząc do powstania stabilnie transformowanej linii komórkowej. Czasem jednak wektory, będące pochodnymi wirusa SV40, występują w cytoplazmie komórki jako odrębne plazmidy, pozwalając na otrzymanie przejściowej ekspresji transgenów.

Vaccinia Virus – wirus ospy. Należy do rodziny *Poxviridae*, obejmującej jedne z największych wirusów. Replikacja wirusów tej rodziny odbywa się w cytoplazmie zainfekowanych komórek. Ich genom zbudowany jest z dwuniciowej, liniowej cząsteczki DNA. Wirusowa polimeraza RNA rozpoznaje tylko własne transkrypcyjne sekwencje regulacyjne, różne od eukariotycznych czy prokariotycznych, dzięki czemu ekspresja genów gospodarza nie jest zakłócana. Taka biologia wirusa wymaga przy konstrukcji wektora natywnych lub syntetycznych promotorów wirusa w celu uzyskania ekspresji wprowadzonych genów. Z wirusów ospy próbuje się przygotować szczepionki m.in. przeciw nowotworom, w których wirus służyłby jako wektor przenoszący geny kodujące odpowiednie substancje terapeutyczne. Istotną przeszkodą w stosowaniu tego typu wektorów jest to, iż spora część populacji posiada w swoich organizmach przeciwciała skierowane przeciwko wirusowi ospy wietrznej; wprowadzenie zatem tego wektora do organizmu może szybko ulegać eliminacji, a efekt terapeutyczny może być niezauważalny.

Atenuowane alfawirusy. Odzjadliwione genomy alfawirusów wykorzystywane są jako wektory wirusowe. Alfawirusy należą do rodziny *Togaviridae*, do której należą między innymi takie wirusy, jak: *Sinbis Virus (SIN)*, *Semliki Forest virus (SFV)* oraz *EEV (Equine Encephalitis Virus)* szczep Wenezuelan, które wykorzystywane są do konstrukcji wektorów wirusowych. Genomy tej grupy wirusów stanowi jednoniciowy (+) RNA o długości do 12 kpz. Alfawirusy dzięki posiadanym właściwościom mogą znaleźć zastosowanie w terapii genowej, szczepionkach genetycznych.

Główne zalety wektorów skonstruowanych na bazie alfawirusów, to:

- przejściowa, wysoka ekspresja transgenu, pojawiająca się stosunkowo szybko (do kilku godzin) po przeprowadzonej transfekcji,
- możliwość tranfekcji szerokiej gamy komórek i tkanek,
- zdolność transfekcji komórek dzielących się i komórek będących w stanie postmitotycznym,
- zdolność do indukcji odpowiedzi immunologicznej i infekcji komórek prezentujących antygen (APC), dzięki czemu stanowią one cenny system immunostymulatorów.

Cenną zaletą wirusów EEV jest to, iż większość organizmów ludzkich i zwierzęcych nie wykazuje w stosunku do nich odpowiedzi immunologicznej. Zmniejsza się dzięki temu prawdopodobieństwo wystąpienia odpowiedzi immunologicznej w stosunku do całego wprowadzonego wektora.

HSV (*Herpes Simplex Virus*) – wirus opryszczki. Należy do grupy herpetowirusów, których genom stanowi dwuniciowa cząsteczka DNA o długości do 15 kbp. Cechami przemawiającymi za wykorzystaniem HSV do produkcji wektorów ekspresyjnych są:

- zdolność do transferu genów zarówno do komórek w stanie podziału, jak i do komórek w stanie postmitotycznym,
- stosunkowo duża pojemność dla wprowadzanego genu.

Wirusy *Herpes* mogą zakażać różnego rodzaju tkanki u prawie wszystkich gatunków zwierząt.

HPV (*Human Papilloma Virus*). Wirion tego wirusa nie posiada osłonki i jest zbudowany z dsDNA. Po zainfekowaniu komórki synteza i dojrzewanie wirusa ma miejsce w jądrze komórkowym, do którego przenikają białka strukturalne. Wirusy potomne są uwalniane przez rozpad zakażonych komórek. W celu uzyskania przejściowej ekspresji transgenu utworzono wektor HPV nicintegrujący z genomem gospodarza.

Influenza Virus – wirus grypy. Genom tego wirusa stanowi jednoniciowy (-)RNA. Właściwy mRNA wirusa jest komplementarny do jego genomu. Genom wirusów grypy w przeciwieństwie do retrowirusów, w żadnej fazie rozwoju nie występuje w komórce w postaci komplementarnej kopii DNA. Zakaźność tego wirusa można zmniejszyć lub całkowicie znieść poprzez działanie formaldehydu, promieni nadfioletowych i gamma.

VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) – wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej. Jest to wirus należący do rodziny *Rhabdoviridae*, obejmującej wirusy zwierzęce i roślinne przenoszone często przez stawonogi. Genom VSV stanowi tzw. nić antysensowna, mRNA wirusa jest komplementarny do jego genomu. Enzym prowadzący syntezę mRNA jest wnoszony wraz z rdzeniem wirusowym. VSV posiada osłonkę lipidową, przedostaje się do komórek w wyniku fuzji z błoną komórkową.

EBV – wirus Epsteina-Barra. Wirus ten należy do herpetowirusów, a jego genom stanowi liniowa dwuniciowa cząsteczka DNA. Wektory oparte na budowie EBV są zdolne do autonomicznej replikacji i nie wykazują tendencji do integracji z genomem zakażonej komórki. Plazmidy EBV są wykorzystywane do terapii komórek nowotworowych, ograniczeniem ich stosowania są duże rozmiary wektorów.

Pracownie biotechnologii molekularnej systematycznie opracowują nowe wektory molekularne – zarówno wirusowe, jak i niewirusowe. Poza dostępnością wielu nośników materiału genetycznego kolejnym problemem, z jakim boryka się badacz laboratorium

inżynierii genetycznej jest opracowanie właściwej i skutecznej metody transferu wektorów do komórek, zwłaszcza komórek eukariotycznych. Problematykę transferu materiału genetycznego do komórek bakteryjnych przedstawiono w rozdziale poświęconym transformacji bakterii.

2. Metody wprowadzania genów do komórek eukariotycznych

Obecnie istnieje wiele metod transfekcji genów terapeutycznych do komórek. Pojęcie transfekcji obejmuje destabilizację błony komórkowej, umożliwiającą wniknięcie danej makrocząsteczki do komórki. Klasyfikację metod transfekcji można przeprowadzić na podstawie wielu wytycznych. Najczęściej mówi się o technikach transfekcji komórek metodami fizykochemicznymi bądź biologicznymi – wirusowymi.

Metody fizyczne

- Bezpośrednia iniekcja do komórek. Technika często wykorzystywana do wprowadzania genów do komórek rozrodczych lub zygot, w celu uzyskania zwierząt transgenicznych.
- *Gene gun* (transfekcja balistyczna). Metoda wykorzystuje złote lub wolframowe mikrokuleczki, o średnicy około 1 μm , na powierzchni których znajduje się tysiące cząsteczek DNA. Powstanie takiego układu jest możliwe dzięki istnieniu silnych oddziaływań pomiędzy ujemnie naładowanym DNA a dodatnią powierzchnią mikrokuleczek. *Gene gun* wykorzystująca balistyczne siły do pokonania barier błonowych komórki, może być również wspomagana polem elektrycznym. Wysokonapięciowe wyładowania pomagają mikrokuleczkom w osiągnięciu dużej szybkości, umożliwiając jednocześnie efektywną penetrację komórki docelowej *in vivo* lub *in vitro*.
- Elektroporacja. Jest to technika polegająca na poddaniu komórek lub tkanek działaniu impulsów pochodzących z silnego, generowanego pola elektrycznego. Impulsy elektryczne powodują pewnego rodzaju strukturalne przegrupowania w błonie komórkowej, co prowadzi do powstania przejściowych, odwracalnych mikroporów w błonie, umożliwiających przenikanie makrocząsteczek, np.: DNA, jonów do wnętrza komórki. Elektroporacja jest jedną z częściej stosowanych technik transfekcji komórek hodowanych *in vitro* lub tkanek – narządów eksponowanych operacyjnie. Technika wymaga jednak przeprowadzenia optymalizacji w stosunku do każdego rodzaju komórek. Krytyczne parametry to: napięcie, częstotliwość impulsów, czas trwania impulsów. Warunkiem prawidłowego przebiegu procesu elektroporacji jest osiągnięcie równowagi między warunkami pozwalającymi na efektywną ekspresję transgeny oraz takimi, które powodują śmierć komórki. Zbyt silne impulsy elektryczne mogą doprowadzić do nieodwracalnych zmian w komórkach i aktywacji apoptozy.
- Immunoporacja. W omawianej technice opłaszczą się specjalne kuleczki specyficznymi przeciwciałami, które mogą się wiązać ze swoistymi antygenami powierzchniowymi. Następnie kuleczki takie są mechanicznie odciągane od komórek, co powoduje powstanie przejściowych porów w błonie komórkowej, umożliwiając tym samym wnikanie makromolekuł do wnętrza komórek. Immunoporacja budzi duże nadzieje na wybiórcze transfekowanie tylko docelowych komórek (zależnie od właściwości immunologicznych komórek).
- Transfekcja przy użyciu ultradźwięków. Omawiana metoda sprowadza się do traktowania komórek ultradźwiękami w obecności „nagiego” DNA, co prowadzi do zmiany

przepuszczalności błony zewnętrznej i przeniknięcia materiału genetycznego do wnętrza komórki.

Metody chemiczne

- DEAE – dekstran. Metoda polega na wytworzeniu kompleksów między ujemnie naładowanym kwasem nukleinowym, polimerem węglowodanowym (dekstran), posiadającym dodatnie grupy dietyloaminoetylowe. Powstałe kompleksy są pobierane przez komórki na drodze endocytozy, transfekcja ma z reguły charakter przejściowy, wynikający z episomalnego funkcjonowania w komórce wprowadzonego transgenu.
- Precypitaty fosforowo-wapniowe. Technika opiera się na tworzeniu kompleksów między DNA a fosforanami wapnia. Jest ona polecana przy transfekcji komórek rosnących adherentnie, gdyż dodane do podłoża kompleksy opadają siłami grawitacji na komórki, opłaszczając je. Proces transfekcji można przyspieszyć, dodając do środowiska reakcji glicerol lub DMSO (dimetylosulfotlenek). Kompleksy są pobierane przez komórki na drodze fagocytozy lub endocytozy. Transfekcja przy użyciu precypitatów fosforanu wapnia może prowadzić do uzyskania stabilnej lub przejściowej ekspresji transgenu. Wprowadzono wiele środków zwiększających wydajność transfekcji tą metodą, między innymi traktowanie komórek, poza wspomnianym już działaniem na nie glicerolu, traktowanie ich chlorochiną (inhibitor wewnątrzkomórkowej degradacji DNA w lizosomach) lub maślanem sodu. Metoda transfekcji precypitatomii wapniowo-fosforanowymi z DNA jest stosunkowo tania w porównaniu z innymi metodami, jest natomiast bardziej czasochłonna, natomiast toksyczność metody dla komórek często uniemożliwia jej stosowanie, zwłaszcza w odniesieniu do komórek endotelialnych i innych pierwotnych linii komórkowych.
- Lipofekcja. Metoda ta charakteryzuje się dużą wydajnością (do 90% ilości wprowadzonego obcego genu). Wektory liposomowe przenikają do cytoplazmy poprzez endocytozę lub fuzję błon komórkowych. Całkowity mechanizm transportu DNA z liposomów do wnętrza komórki nie został jeszcze w pełni poznany, wiadomo jednak, iż wydajność transfekcji jest uzależniona od wielkości ładunku na powierzchni lipopleksu, stosunku DNA do lipidów, rodzaju komórek i typu użytego wektora (liposomy kationowe, polikationowe).

Metody fizykochemiczne

- Transfekcja fotochemiczna. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu światłoczułych komponentów zlokalizowanych w błonach endosomów i lizosomów. Pod wpływem odpowiedniej wiązki światła struktura błon ulega uszkodzeniu, czemu towarzyszy uwolnienie genu terapeutycznego do cytozolu. Transfekcja fotochemiczna charakteryzuje się nie tylko dużą precyzją i specyficznością w dostarczaniu materiału genetycznego, ale także stosunkowo wysoką efektywnością transfekcji – około 50%.

Z innych stosowanych metod transfekcji komórek warto wspomnieć jeszcze o wprowadzaniu genów do wybranej grupy komórek za pośrednictwem odpowiednich receptorów. W technice tej sprzęga się gen wprowadzony w strukturę najczęściej plazmidu łączącego z białkowym ligandem receptora za pośrednictwem poli-L lizyny.

W procedurach laboratoryjnych powszechnie stosowaną, stosunkowo szybką i prostą metodą transferu materiału genetycznego do komórek jest głównie metoda oparta na

lipotransferze, czyli wykorzystaniu liposomów jako nośników – wektorów wprowadzających obcy materiał genetyczny do danych komórek. Lipofekcja uzależniona jest od obecności liposomów, których sposób otrzymywania oraz budowa chemiczna są różnorodne. Dotychczas opisano wiele różnych metod otrzymywania liposomów, należą do nich między innymi:

- mechanizm wytrząsania w obecności fosfolipidu oraz buforu o odpowiednim pH,
- metoda odparowywania z tak zwanym odwróceniem faz,
- chelatowanie w obecności jonów wapnia i EDTA.

Liposomy są to wektory, które dzięki swej lipofilności łatwo wnikają do komórek, transportując w ten sposób do wewnątrzkomórkowej przestrzeni egzogeny DNA. Mechanizm działania tych wektorów nie został dokładnie poznany. Uważa się, że materiał genetyczny zawarty w konwencjonalnych liposomach wnika do komórki w wyniku endocytozy i lokalizuje się głównie w endosomach i lizosomach, gdzie może ulegać degradacji przez obecne tam enzymy lizosomalne. Konstrukcja nowych liposomów ma na celu poprawę siły oddziaływania omawianych wektorów zarówno z DNA czy RNA, jak i z powierzchnią komórek. Poszukiwane liposomy nowej generacji, w celu zwiększenia efektywności transfekcji, powinny także omijać tak zwane przedziały endosomalne komórek. W rezultacie prowadzonych badań skonstruowano – wykorzystując dodatkowo naładowane lipidy – liposomy kationowe, zwane lipopleksami.

Kationowe liposomy powstają na skutek interakcji między lipidami, niosącymi na hydrofilowym końcu ładunek dodatni, a kwasami nukleinowymi obdarzonymi ładunkiem ujemnym. W lipopleksach wyróżnić można trzy podstawowe komponenty: lipid kationowy, lipid dodatkowy (neutralny), plazmidowy DNA.

Typowy kationowy lipid składa się z: dodatnio naładowanej grupy głównej, hydrofobowego fragmentu „zakotwiczonego” oraz tzw. linkera – łącznika, łączącego wcześniej wspomniane komponenty. Wszystkie trzy składniki pełnią określoną rolę w procesie transfekcji. Przykładowo – chemiczna i strukturalna budowa grupy głównej decyduje o interakcji z DNA oraz o zdolności przyłączania i wychwytywania przez określone komórki; rodzaj zastosowanego łącznika determinuje stabilność i zdolność do biodegradacji lipidu, a jego długość wpływa na dostępność grup aminowych do fosforanowych grup kwasu nukleinowego; lipid zakotwiczący wpływa na porządek w upakowaniu lipidów.

Lipid pomocniczy (dodatkowy) ma ładunek neutralny. Jest on odpowiedzialny między innymi za stabilizację cząstek liposomowych przy jednoczesnym działaniu destabilizującym w stosunku do błony endosomalnej, ułatwiając tym samym „ucieczkę” lipopleksów z endosomów. Materiał genetyczny sprzężony z takimi liposomami wnika do cytoplazmy, jądra komórkowego, nie podlegając jednocześnie destrukcyjnemu wpływowi enzymów lizosomalnych. Lipidom pomocniczym przypisuje się także zdolność do destabilizacji błony komórkowej i ułatwienie oddzielenia plazmidowego DNA od lipidu kationowego. Najczęściej stosowane lipidy neutralne to DOPE (dioleilofosfatydyloetanolamina) oraz cholesterol. Większość lipidów kationowych wymaga obecności lipidu pomocniczego, niektóre jednak lipopleksy wykazują znaczną aktywność transfekcji nawet przy braku lipidu neutralnego. Taka obserwacja sugeruje, że mechanizmy dostarczania genu do komórki za pośrednictwem lipopleksu różnią się od siebie i w dużej mierze zależą od chemicznych właściwości lipidu kationowego.

Obecnie – w celu zwiększenia efektywności transfekcji – bada się szczegółowo poszczególne składniki lipopleksów. Okazało się, że nie tylko własności fizykochemiczne typu: stosunek lipid/DNA, średnica lipopleksu, działanie lipidu pomocniczego, wpływają na efektywność transferu. Dużą rolę w omawianym procesie przypisuje się budowie strukturalnej lipidów, np. ostateczna liczba kationowych grup aminowych (w grupie głównej lipidu) wpływa na transfer. Wraz ze wzrostem liczby grup aminowych rośnie aktywność lipidu, a tłumaczy się to większą kondensacją DNA i w efekcie większą pojemnością upakowania lipopleksu. Okazało się jednak, iż ta prosta zależność jest spełniana do momentu osiągnięcia przez grupę główną „górnego limitu dodatnich grup aminowych”. Aktywność lipopleksu nie zwiększa się w miarę dodawania grup aminowych, gdy ich łączna liczba przekroczy trzy. Sugeruje to, iż zbyt duża liczba grup dodatnich czyni kompleks bardziej rozpuszczalnym w wodzie, zmniejszając zarazem jego stabilność, zwiększając natomiast toksyczność. W bardzo dużym stopniu efektywność transferu jest również uwarunkowana położeniem polarnych grup kationowych względem alifatycznego łańcucha wodorowęglowego (część hydrofobowa). Najlepszą efektywność transfekcji uzyskuje się, gdy jako łącznika użyje się połączeń eterowych, a część niepolarną lipidu stanowiąc będą łańcuchy węglowe kwasu oleinowego. Długość łańcucha wodorowęglowego ma duże znaczenie w aktywności lipopleksu. Powszechnie uważa się, że krótsze łańcuchy podnoszą efektywność kompleksu. Czasem stosuje się pochodne cholesterolowe zamiast łańcucha alifatycznego, przy czym zamiana dicholesterolu na cholesterol wiąże się ze wzrostem aktywności transfekcyjnej.

Najczęściej wykorzystywane lipidy kationowe to:

- DOTMA: chlorek N-[1-(2,3-dioleilooksy)-propylo]-N,N,N-trimetyloamonu (lipid monokationowy),
- DOTAP: metylosiarczan N-[1-(2,3-dioleilooksy)-propylo]-N,N,N-trimetyloamonu (lipid monokationowy),
- DMRIE: bromek 1,2-dimirystyloksypropylo-3-dimetylohydroksyetyloamonu (lipid monokationowy),
- DDAB: bromek dimetylodioktadecyloamonowy (lipid monokationowy),
- DOSPER: 1,3-dioleilooksy-2-(6-karboksyspermylo)-propylamid (lipid dwukationowy),
- DOGS: spermino-5-karboksyglicylodioktadecyloamid (lipid trójkationowy),
- DOSPA: trifluorooctan 2,3-dioleilooksy-N-[2-(sperminokarboksyamido)-etylo]-N,N-dimetylo-1-propanoaminy (lipid polikationowy),
- DC-cholesterol: 3 β -[N-(N',N'-dimetyloaminoetano)-carbamoilo]-cholesterol (lipid monokationowy).

Najstarszą grupę lipidów kationowych tworzą lipidy monokationowe. Niestety, są one dosyć toksyczne dla większości typów komórek, co sprawia, że ich wydajne zastosowanie ograniczone jest do stosunkowo nielicznej grupy linii komórkowych. Prowadząc lipofekcję w hodowlach komórkowych *in vitro* należy także pamiętać o inhibitorowym wpływie na jej wydajność lipidów oraz białek surowicy stosowanej jako suplement w mediach hodowlanych. Z tego powodu sam etap transfekcji przeprowadza się w warunkach środowiska hodowlanego wolnego od surowicy, w tzw. *serum-free* mediach hodowlanych. Zabieg ten chroni przed rozpadem kompleksów liposomowych z DNA, jednocześnie jednak zwiększa stres, na jaki narażone są komórki w czasie procesu transfekcji.

Młodsza klasę stanowią lipidy polikationowe. Ich toksyczność jest ogólnie niższa w porównaniu z lipidami monokationowymi. Liposomy polikationowe (*Polycation liposomes*), są to liposomy modyfikowane przez cetylowaną polietylenoiminę. W przeciwieństwie do większości liposomów nie wymagają one jako komponentów fosfatydyloetanolaminy lub cholesterolu. Wykazują zdolność dostarczania swojej zawartości do komórki w wyniku endocytozy, charakteryzują się wysoką efektywnością i niską toksycznością. Ich dużą zaletą, w porównaniu z konwencjonalnymi liposomami kationowymi, jest aktywność w obecności surowicy, co umożliwia ich zastosowanie w terapii *in vivo*.

Głównym czynnikiem determinującym poziom ekspresji transgenu jest rodzaj transfekowanej linii komórkowej. Lipofekcja jest ogólnie metodą zalecaną dla większości typów komórek i linii komórkowych (nie jest zalecana jedynie dla hodowli komórek rosnących w zawiesinie ze względu na trudności proceduralne i wysoki koszt procesu; trudności w utrzymaniu homogenności zawiesiny komórek poddawanych lipofekcji są kolejną przeszkodą w stosowaniu tej metody do transferu DNA do tego typu komórek). Należy jednak pamiętać, iż wrażliwość komórek na toksyczne działanie stosowanych w liposomach lipidów jest bardzo różnorodna. Lipofekcja, jako metoda transferu DNA, z wyboru polecana jest w przypadkach, gdy inne metody transfekcji (głównie metoda precypitacji) nie przynoszą zakładanych rezultatów – dotyczy to głównie transfekcji prowadzonej na hodowlach pierwotnych lub hodowlach komórek o wysokim stopniu zróżnicowania, a także sytuacji, gdy wprowadzane do komórek cząsteczki DNA są bardzo duże.

W przypadku podaży *in vivo* możliwe są następujące drogi podawania lipopleksów:

- dożylnie (odbiorcami są komórki prowadzące efektywną endocytozę – makrofagi wolne i osiadłe wątroby, szpiku kostnego oraz śledziony),
- dootrzewnowo,
- dotchawiczo w postaci aerozolu.

W wyborze drogi podania lipopleksu bierze się pod uwagę: strukturę lipidu kationowego; stosunek ładunku +/- między wektorem a DNA; rozmiar liposomu.

Obecnie rynek biotechnologiczny oferuje wiele dostępnych komercyjnie gotowych systemów do transfekcji komórkowych, jak np. Lipofectamine Reagent™ i jego odmiany, np. Oligofectamine; wykorzystywane systemy transfekcji oparte są zarówno na nośnikach liposomowych, jak i coraz częściej na systemach polimerowych, jak np. Transfectam[®], czy inne. System polimerowych nośników materiału genetycznego często cechuje się niższą toksycznością dla komórek, a przez to wyższą wydajnością transfekcji i poziomem ekspresji wprowadzanego transgenu.

Polimery

Niektóre kationowe polimery mają zdolność kompleksowania DNA, tworząc charakterystyczne polipleksy. DNA umieszczone na takim nośniku znacznie łatwiej ulega transferowi do komórki eukariotycznej. Rodzaj utworzonego polipleksu zależy w dużej mierze od typu tworzącego go polimeru. Ze względu na posiadany ładunek można podzielić polimery na: naładowane dodatnio, ujemnie i obojętne. Możliwy jest także podział ze względu na strukturę użytego polimeru, np.: poli (L-lizyna) ma strukturę liniową, polietylenoamina – rozgałęzioną, dendrymery – sferyczną.

Jednym z coraz częściej wykorzystywanych polimerów są **dendrymery poliamidoaminowe**. Dendrymery, podobnie jak wektory niewirusowe, wywołują kondensację DNA, która jest możliwa dzięki interakcji między dodatnio naładowanymi grupami aminowymi na powierzchni dendrymeru, a grupami fosforanowymi DNA posiadającymi ujemny ładunek. Dzięki temu, w porównaniu z powszechnie wykorzystywanymi polimerami, np.: poliaminami lub polilizynami, dendrymery wykazują większą siłę oddziaływania jonowego. Tak utworzone polipleksy cechuje duża stabilność i dobra rozpuszczalność, co sprawia, że kwas nukleinowy wprowadzony do komórki nie ulega degradacji pod wpływem działania endosomów oraz wewnątrzkomórkowych nukleaz. Dowiedziono, że owinięcia DNA wokół cząsteczki dendrymeru czynią go odpornym na działanie restrykcyjne endonukleazy i DNazy I. Zauważono również, że na wielkość ekspresji transgenu wprowadzonego z pośrednictwem polipleksu wpływa rodzaj związku stanowiącego rdzeń dendrymeru (amoniak lub etylenodiamina), jak również stosunek ilościowy dendrymeru do DNA. Nadmiar dendrymeru w stosunku do DNA ułatwia wiązanie lipopleksu z fosfolipidami błon komórkowych, co sprzyja z kolei zjawisku endocytozy.

Niekontrolowane interakcje wektorów ze środowiskiem *in vivo* stanowiły poważne ograniczenie ich zastosowania. W celu zmniejszenia tych nieprawidłowości naukowcy zaprojektowali, zsyntetyzowali i zastosowali nowoczesne **kopolimery**. Ten rodzaj kompleksu w przeciwieństwie do pozostałych – charakteryzuje się wysoką stabilnością, małymi rozmiarami i dobrymi zabezpieczeniami przed działaniem komplementu, opsonizacją oraz agregacją. W przypadku omawianych nośników dodatni ładunek polipleksu, odpowiedzialny w dużej mierze za interakcje ze składnikami środowiska *in vivo*, został pokryty przez ujemnie naładowany „płaszcz” peptydowy, zawierający glikol polietylenowy (PEG). To właśnie ten anionowy kopolimer, przymocowany do wcześniej stosowanych wektorów, nadaje im pożądaną stabilność, co wpływa na wzrost efektywności transfekcji zarówno w komórkach rosnących adherentnie, jak i w zawiesinie.

Innymi przykładami polimerów biokompatybilnych wykorzystywanych do tworzenia polipleksów są polimery laktydowe, a konkretnie polilaktydo-ko-glikolowe (PLGA) i polimery laktamowe zbudowane z poli(DL-laktydo-ko-glikolidów).

Kompleksy liposomowo-polimerowe

Kompleksy liposomowo-polimerowe, tak zwane lipopleksy (LPD) to rodzaj wektorów zbudowanych z liposomów, polimerów i DNA. Najczęściej do ich syntezy wykorzystuje się kationy liposomowe i niektóre kationowe polimery, np.: polilizynę, protaminę. Dowiedziono, że inkorporacja polilizyny do lipopleksu znacznie zwiększa kondensację DNA, przy jednoczesnym wzroście ochrony przed agregacją lub niepożądanym działaniem nukleaz. Lipopleksy dzielić można ze względu na posiadany ładunek na kationowe, tzw. LPD I i anionowe, tzw. LPD II.

Dobór odpowiedniej metody transferu zależy od wielu czynników. Transfer może być prowadzony zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*; w tym ostatnim przypadku efektywność transferu oraz wcześniejszy dobór metody transferu zależą między innymi od:

- typu hodowli (komórki rosnące adherentnie czy rosnące w zawiesinie),
- rodzaju linii komórkowej poddawanej modyfikacji genetycznej,

- wyboru metody detekcji spodziewanej ekspresji transgenu,
- zakładanej wydajności transfekcji i ekspresji.

W zależności od oczekiwanego efektu, transfekcję można przeprowadzać w sposób prowadzący do uzyskania czasowej, przejściowej ekspresji transgenu (zwykle osiągana jest wówczas ekspresja na szacunkowo wysokim poziomie) lub trwałej ekspresji transgenu związanej z integracją wprowadzonego materiału genetycznego z chromosomowym DNA komórki gospodarza i utworzeniem stabilnej linii komórkowej. W tym wypadku wydajność transfekcji jest zwykle znacznie niższa, a ekspresja transgenu zachodzi na niższym poziomie. Każdy z wymienionych systemów może być wykorzystywany w większości laboratoriów, natomiast jego specyfika, rodzaj prowadzonych badań najczęściej jest czynnikiem determinującym wybór jednej lub równocześnie korzystanie z wielu omówionych w przedstawionym rozdziale metod. Kolejne rozdziały, opisujące między innymi problematykę transgenezy, jeszcze raz wprowadzą czytelnika w problematykę transferu materiału genetycznego do komórek i przedstawiają zalety oraz wady danych metod w konkretnych projektach badawczych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] *Bednarek I., Czajka M., Wilczok T.*: Efficiency of lipofection of adherent cells is limited by apoptosis. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2002; 40 (2): 133–134. – [2] *Felgner P.L.*: Particulate systems and polymers for in vitro and in vivo delivery of polynucleotides. *Adv. Drug. Delivery. Rev.* 1990; 5: 163–187. – [3] *Felgner P.L., Ringold G.*: Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 1989; 337: 387–388. – [4] *Gao X., Huang L.*: Cationic liposomes and polymers for gene transfer. *Liposome Res.* 1993; 3: 17–30. – [5] *Jordan M., Schallhorn A., Wurm F.W.*: Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic. Acids. Res.* 1996; 24: 596–601. – [6] „Methods of tissue engineering.” Editors: Atala A., Lanza R.P., Academic Press, USA 2002. – [7] *Sambrook J., Russell D.W.*: Molecular cloning. A laboratory manual. Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001. – [8] *Strauss W.M.*: Transfection of mammalian cells by lipofection. *Methods Mol. Biol.* 1996; 54: 307–327. – [9] *Thompson C.D., Frazier-Jessen M.R., Rawat R.* et al.: Evaluation of methods for transient transfection of a murine macrophage cell line, RAW 264.7. *BioTechniques* 1999; 27: 824–832. – [10] *Tseng W.C., Haselton F.R., Giorgio T.D.*: Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurement of plasmid delivery and transgene expression. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 25641–25647. – [11] *Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T.* et al.: Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 18997–19007.

IV. Transgeneza – zagadnienia ogólne

Tomasz Loch

Mianem transgenezy określa się działania mające na celu uzyskanie organizmu trwale zmodyfikowanego genetycznie. Odkąd w 1980 roku po raz pierwszy stworzono organizm transgeniczny, stosowanie takich modeli eksperymentalnych stało się bardzo powszechne i niezwykle pomocne w naukach podstawowych. Ta metoda badawcza pozwala na wprowadzenie obcych, dodatkowych lub zmodyfikowanych genów, a także usunięcie całości bądź części natywnego genu (*knock-out*). Dzięki temu uzyskuje się możliwość badania wpływu nadekspresji, modyfikacji lub absencji określonego genu na procesy biochemiczne, rozwój embrionalny organizmu, procesy nowotworzenia, jednostki chorobowe oraz wiele innych. Pozwala to na poznanie znaczenia określonego genu dla badanego zjawiska lub organizmu jako całości. Coraz częściej wiedza ta jest wykorzystywana praktycznie, a transgeniczne rośliny i zwierzęta znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach.

Proces tworzenia organizmu transgenicznego jest złożony i wykorzystuje techniki biologii molekularnej, hodowli komórkowych oraz inżynierii embrionalnej. Ogólnie rzecz biorąc, na pierwszym etapie przygotowywana jest konstrukcja genowa (klonowanie molekularne), której funkcjonalność jest najczęściej sprawdzana w hodowlach komórkowych. Techniki hodowlane są też użyteczne we wprowadzaniu wspomnianych fragmentów DNA do komórek zarodkowych (ES *embryonic stem cells*). Manipulacje na wczesnych zarodkach lub zygotach umożliwiają wprowadzenie do nich zmodyfikowanych genetycznie komórek ES lub iniekcji obcego DNA. Tak zmodyfikowane zarodki wprowadza się do jajowodu zastępczych matek, a po urodzeniu najczęściej otrzymuje się genetyczne mieszańce (chimery), które w wyniku dalszych krzyżówek dają potomstwo transgeniczne i dzikie.

1. Konstrukcje genowe stosowane w transgenezie

Budowa i zawartość konstrukcji genowej do transgenezy zależy w głównym stopniu od celu badawczego. Konstrukcje genowe mające na celu wywołanie określonego genu będą się różniły od tych, których celem jest wywołanie jego nadekspresji. Jeszcze inaczej będą zbudowane takie, które mają wnieść indukowalną ekspresję lub zastąpić natywny gen genem homologicznym lub reporterowym. Wektory stosowane w transgenezie są pod wieloma względami podobne do zwykłych wektorów ekspresyjnych. Tzw. szkielet wektora stanowią fragmenty niezbędne dla replikacji wektora w hodowli bakteryjnej, geny oporności na antybiotyki, miejsce wielokrotnego klonowania (polilinker), promotor oraz sekwencja kodująca poliA. Do takiego wektora zwykle wprowadzana jest sekwencja określonego genu poddawanego analizie. Sprawa jest tutaj o tyle skomplikowana, że geny eukariotyczne najczęściej posiadają introny i w związku z tym mogą zajmować pokaźne obszary genomu. Przykładem może być gen dystrofiny, który zajmuje obszar o długości ponad 2500 tys. par zasad. Natomiast klonowanie długich fragmentów DNA oraz wprowadzanie dużych konstrukcji genowych do komórek często napotyka techniczne trudności.

Z tego powodu najczęściej stosuje się tylko samą sekwencję kodującą genu (cDNA), którą uzyskuje się w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji. I tak np. długość sekwencji kodującej wspomnianą dystrofinę wynosi ok. 14 tys. par zasad. Pozbycie się sekwencji intronowej nie zawsze jednak wychodzi na dobre. Niejednokrotnie introny zawierają w sobie elementy regulacyjne, których wyeliminowanie może obniżyć wydajność ekspresji tworzonej konstrukcji genowej. Dlatego też często w trakcie klonowania konstrukcji genowej wprowadza się krótkie sekwencje intronowe, które mogą pochodzić nawet od niespokrewnionych gatunków i innych genów.

Jeszcze bardziej istotne elementy regulacyjne są zlokalizowane w regionie 5' genów i również mogą rozciągać się na obszarze tysięcy par zasad. Zwykle prowadzi się analizę funkcjonalności promotora oraz sekwencji go poprzedzających w celu określenia, jaki minimalny fragment tego elementu jest niezbędny do uzyskania wydajnej ekspresji i taki skrócony fragment klonuje się powyżej cDNA genu. Często natywne elementy regulacyjne badanego genu zastępuje się różnorodnymi silnymi promotorami pochodzenia wirusowego (np. promotor CMV, RSV lub SV40), czy też tkankowo specyficznymi (np. promotor α MHC – łańcucha ciężkiego α miozyny sercowej, promotor albuminy – specyficzny dla wątroby) lub konstytutywnymi (np. promotor β -aktyny, promotor PGK – kinazy fosfoglicerynianowej) promotorami eukariotycznymi.

Niejednokrotnie detekcja produktu badanego genu jest trudna i pracochłonna. Pomocne w takich sytuacjach są sekwencje kodujące tzw. białka reporterowe. Istnieje wiele różnych genów reporterowych, z których największą popularnością cieszą się białko zielonej fluorescencji (kodowane przez gen *GFP* wyizolowany z meduzy), β -galaktozydaza (bakteryjny gen *lacZ*) oraz lucyferaza (gen wyizolowany z świetlika). Świecenie GFP można zaobserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym, tkanki zawierające β -galaktozydazę wybarwiają się na niebiesko po dodaniu do nich odpowiednich substratów, a enzymatyczna reakcja katalizowana przez lucyferazę powoduje emisję światła wykrywaną w luminometrze. Obecność jednego z tych białek w organizmie transgenicznym pozwala na łatwe, szybkie i ilościowe oszacowanie aktywności wprowadzanego transgeny. Dlatego niezależnie od rodzaju transgenezy, częstym elementem konstrukcji genowej jest kasetta zawierająca gen reporterowy. Sposoby jej umiejscowienia w wektorze mogą być różne. Może ona posiadać swój własny promotor sterujący jej ekspresją, ale częściej stosowany i bardziej pożyteczny jest układ, kiedy korzysta ona z tego samego promotora, co badany gen.

W związku z tym, że mRNA u organizmów eukariotycznych jest monocistronowy (na jednej cząsteczce mRNA zapisana jest informacja pochodząca z jednego genu) wydajność translacji kolejnego genu (położonego poniżej genu badanego) jest bardzo niska. W uzyskiwaniu dwucistronowego mRNA pomocne jest umieszczanie pomiędzy wspomnianymi genami specyficznej sekwencji pochodzenia wirusowego IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) – wewnętrzne sekwencje przyłączania rybosomów. IRES powoduje, że mimo sygnału terminacji translacji należącego do genu zlokalizowanego powyżej, następuje ponowne wiązanie rybosomów do mRNA oraz rozpoczęcie translacji genu położonego poniżej. W efekcie z jednego transkryptu uzyskuje się dwa białka.

Odmienna strategia polega na tworzeniu pojedynczego białka fuzyjnego będącego efektem połączenia białka badanego z białkiem reporterowym. Klonowanie takich konstrukcji genowych wymaga dużej precyzji, gdyż po ostatniej ramce odczytu pierwszego

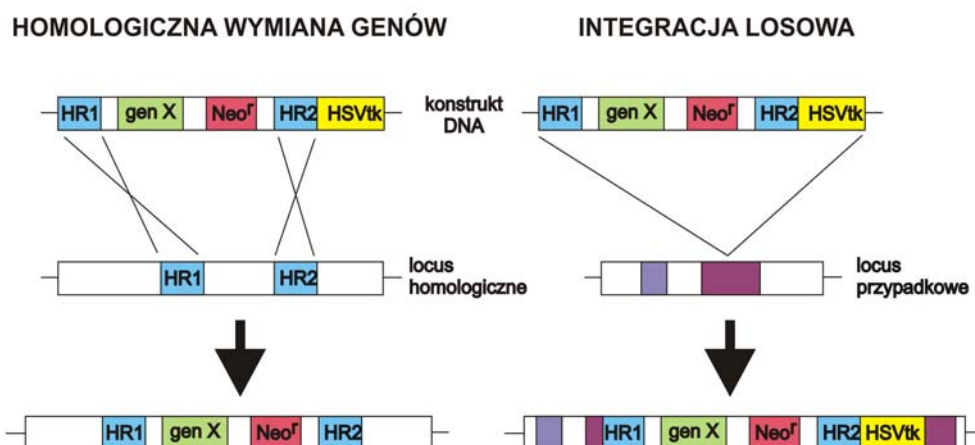
białka musi następować pierwsza ramka drugiego białka, tak aby proces translacji nie zaburzył właściwej sekwencji aminokwasów w białku. Konstruowane są zarówno białka fuzyjne przy udziale końca aminowego, jak i karboksylowego badanego białka. W konstrukcjach tego typu należy mieć na uwadze ewentualny wpływ dokonanej fuzji na ostateczną funkcję badanego białka.

Niewątpliwie mniejszą ingerencją w strukturę i funkcję jest tworzenie fuzji badanego białka z tzw. peptydami powinowactwa (*epitope tags*). Najbardziej popularne to His-tag i Myc-tag, które są krótkimi peptydami zbudowanymi odpowiednio z łańcucha histydynowego lub kilku powtórzeń motywu peptydowego pochodzącego od białka Myc. Obecność tych elementów ułatwia detekcję lub oczyszczanie badanego białka za pomocą łatwo dostępnych przeciwciał. Fuzje tych elementów mogą wykorzystywać koniec N-, C- lub – rzadziej – środek badanego białka.

Różnego rodzaju dodatkowe elementy muszą być wprowadzone do wektora odpowiednio do każdego rodzaju transgenезy. Tworzenie zwierząt z przypadkowym miejscem integracji transgenu poprzez mikroiniekcję DNA do przedjądra zygoty można przeprowadzić, stosując opisane wyżej elementy. Należy przy tym pamiętać, że przed właściwą iniekcją należy się najpierw pozbyć sekwencji samego wektora użytego w klonowaniu DNA. Pozostawienie tych sekwencji może znacznie obniżyć ekspresję wprowadzanej konstrukcji genowej na skutek metylacji sekwencji prokariotycznych (większa zawartość dwunukleotydu CpG). Tak więc, w trakcie projektowania tego typu konstrukcji genowej należy rozplanować takie ułożenie miejsc restrykcyjnych, aby przy użyciu jednego lub dwóch enzymów możliwe było wycięcie fragmentu, który ma być użyty do transgenезy.

Dwa rodzaje elementów są niezbędne do uzyskiwania zwierząt transgeniczných poprzez modyfikację komórek ES: geny selekcyjne oraz sekwencje homologiczne do sekwencji otaczających zmieniany gen. Geny selekcyjne pozwalają odróżnić komórki ES, które w wyniku transfekcji przyjęły obcy DNA od tych, które go nie pobrały. W rzeczywistości selekcję prowadzi się przez okres około 10 dni i w związku z tym procedurę tę przeżywają tylko te komórki, które przyjęły konstrukcję genową i wbudowały ją do swojego genomu.

Wyróżnia się zasadniczo dwa rodzaje selekcji: pozytywną i negatywną. Genami stosowanymi najczęściej w selekcji pozytywnej są *neo^r*, *hyg^r*, *pur^r* warunkujące odpowiednio oporność komórek na antybiotyki G418, hygromycynę i puromycynę. Z kolei dzięki selekcji negatywnej możliwe jest wyeliminowanie z hodowli tych komórek ES, które wbudowały konstrukcję genową w niewłaściwe miejsce (czyli losowo, nie w wyniku rekombinacji homologicznej). Wykorzystuje się tutaj najczęściej wirusową kinazę tymidynową (HSVtk), która przekształca gancyklowir w toksyczny dla komórek analog tymidyny (endogenna kinaza nie ma takiego działania). Wspomniany gen selekcyjny umieszcza się na jednym lub obydwu końcach konstrukcji genowej poza odcinkami homologicznymi w ten sposób, że w wyniku rekombinacji homologicznej kasetę selekcji negatywnej ulega odrzuceniu. Komórki, w których integracja zaszła w sposób losowy (tj. poza locus, które ma ulec modyfikacji) posiadają aktywną kinazę HSVtk i giną w obecności czynnika selekcyjnego (*ryc. 9*).



Ryc. 9. Rekombinacja homologiczna powoduje zastąpienie natywnego locus przez sekwencje zawarte pomiędzy regionami homologicznymi (HR1 i HR2). Następuje jednocześnie utrata kasety selekcji negatywnej (HSVtk) połączona z brakiem wrażliwości komórek na gancyklowir. W wyniku integracji losowej przerywana jest ciągłość pewnego locus chromosomalnego, a konstrukcja genowa integruje razem z HSVtk – powstają komórki wrażliwe na gancyklowir.

Zasadniczymi elementami, dzięki którym możliwa jest modyfikacja określonego locus w wyniku rekombinacji homologicznej w komórkach ES są dwa odcinki sekwencji homologicznych. Są one homologiczne do sekwencji otaczających dany gen i muszą zawierać izogeniczny DNA, co oznacza, że użyte do konstruowania wektora sekwencje muszą pochodzić od tego samego szczepu zwierząt, z których pochodzą komórki ES (a więc muszą być identyczne genetycznie). Odcinki homologiczne otaczają zatem zawarte pomiędzy nimi geny, które mają być wprowadzone do genomu zwierzęcia. W zależności od tego, do jakiego fragmentu locus zostaną zaprojektowane odcinki homologii oraz co się między nimi znajdzie, uzyskane efekty mogą być skrajnie różne.

Do inaktywacji genu wystarczy umieścić tylko gen selekcji pozytywnej pomiędzy odcinkami sekwencji homologicznych, zaprojektowanymi tak, że w wyniku integracji spowodują usunięcie ważnego fragmentu danego genu (*knock-out*). Do uzyskania efektu celowanej insercji można zastosować takie sekwencje homologiczne, które wprowadzając pewne elementy dodatkowe nie uszkodzą struktury natywnego genu (*knock-in*). Nie ma ścisłych reguł opisujących długości tych sekwencji, jednakże zalecane jest stosowanie fragmentów o minimalnej długości 1,5 kbp na jednym końcu oraz minimum 5 kbp na drugim. W przypadku tego rodzaju transgenezy nie jest konieczne pozbywanie się sekwencji samego wektora. Podobnie jak kasetę selekcji negatywnej, zostanie ona odrzucona w trakcie rekombinacji homologicznej. Jednak DNA musi być podany do komórek ES w formie liniowej, co wiąże się oczywiście z zaprojektowaniem unikalnego miejsca restrykcyjnego w konstrukcji genowej. Miejsce to musi znajdować się poza sekwencjami homologicznymi oraz poza fragmentem, który one otaczają.

Czystość preparatu DNA użytego do mikroiniekcji lub transfekcji komórek ES jest krytyczna z punktu widzenia powodzenia całej procedury. Zanieczyszczenia endotoksynami bakteryjnymi i odczynnikami organicznymi mogą znacząco wpływać na żywotność embrionów i komórek oraz wydajność integracji wprowadzanej konstrukcji genowej.

Procedury oczyszczania DNA do transgenezy wykorzystują metodę wirowania w gradiencie chlorku cezu, dializę lub specjalistyczne zestawy do izolacji i oczyszczania.

Plazmidy bakteryjne są najczęściej stosowanymi wektorami. Pozwalają one na klonowanie fragmentów o długości ok. 25 tys. par zasad. Jeśli zachodzi konieczność wprowadzenia sekwencji o większych rozmiarach, stosuje się sztuczne chromosomy: bakteryjne BAC (*bacterial artificial chromosome*) i drożdżowe YAC (*yeast artificial chromosome*). Metoda ta pozwala na klonowanie fragmentów o długościach kilkuset tysięcy par zasad i jest przydatna dla dużych genów oraz wtedy, gdy nie wiadomo, jaki odcinek promotora i sekwencji go poprzedzających jest konieczny do uzyskania ekspresji. Tak duże struktury wprowadza się do komórek ssaczych poprzez fuzję komórek drożdży i komórek ES, transfer do ES za pomocą liposomów lub mikroiniekcję do zygoty. Podobnie jak plazmidowy DNA, sztuczne chromosomy muszą być zlinearyzowane przed użyciem do mikroiniekcji. Oczyszczanie sztucznych chromosomów wymaga użycia elektroforezy pulsowej. Z dużym rozmiarem cząsteczek YAC i BAC wiąże się, niestety, problem ich dużej podatności na mechaniczną fragmentację w trakcie wykonywanych procedur.

2. Techniki otrzymywania zwierząt transgenicznych

Sposób, w jaki wprowadzimy obcy DNA do genomu jest zdeterminowany przede wszystkim przez rodzaj posiadanej konstrukcji genowej, cel eksperymentu i gatunek zwierzęcia. Wszystkie aspekty transgenizacji są ze sobą ściśle powiązane, a wybór jednego z nich pociąga za sobą konieczność stosowania określonych procedur. Do zasadniczych metod tworzenia zwierząt transgenicznych zalicza się:

- mikroiniekcję DNA do przedjądrza zygoty,
- modyfikację komórek zarodkowych (ES),
- transfer wirusowy,
- klonowanie somatyczne,
- włączanie i wyłączanie genów.

Mikroiniekcja DNA

Wprowadzenie egzogenego DNA do zygoty przeprowadza się przed połączeniem się przedjądrza żeńskiego i męskiego. W celu uzyskania owulacji indukowanej oraz zdobycia znacznej liczby zygot (superowulacja), samice poddaje się stymulacji hormonalnej gonadotropinami przed dniem planowanego skrzyżowania z samcem. Po określonym czasie zapłodnione komórki jajowe wypłukuje się z jajowodów, oczyszcza i używając szklanej mikropipety sterowanej za pośrednictwem mikromanipulatora wprowadza się do nich roztwór DNA zawierający około 50–1000 kopii transgenu. Na tym etapie procedury widoczne są dwa przedjądrza i którekolwiek z nich może zostać użyte do mikroiniekcji, aczkolwiek częściej stosuje się większe przedjądrze męskie. Nie bez znaczenia jest też to, że przedjądrze męskie charakteryzuje się większą aktywnością transkrypcyjną od żeńskiego dzięki większemu stopniowi dekondensacji chromatyny. Na skutek iniekcji przedjądrze męskie ulega powiększeniu. Istotna dla powodzenia procedury jest również faza cyklu komórkowego zygoty. Okazuje się, że najłatwiej uzyskuje się efekt integracji obcego DNA w czasie fazy S cyklu komórkowego, kiedy ma miejsce synteza DNA. Replikacja DNA jest podejmowana tuż po uformowaniu się przedjądrzy, a ulega zakończeniu przed ich fuzją.

Świeżo uformowane przedjądrze męskie jest oddalone od żeńskiego i znajduje się pod błoną komórkową, co jest oznaką wczesnej fazy S. W późnej fazie S przedjądrza są już większe i położone bliżej siebie. Kryteria morfologiczne, o których wspomniano pozwalają ocenić przydatność zygot do procedury mikroiniekcji. Integracja transgenu może mieć miejsce również w trakcie drugiego cyklu replikacji DNA, jednak w konsekwencji tego zdarzenia może powstać zwierzę, którego część komórek będzie posiadała transgen, a część nie (chimera). Jeśli transgen nie zostanie przekazany do komórek prapłciowych, wyprowadzenie linii transgenicznej nie będzie możliwe. Nastrzyknięte zygoty są najczęściej hodowane *in vitro* do stadium 2- lub 4-komórkowego i następnie przenoszone do matek zastępczych, których cykl płciowy synchronizuje się tak, aby możliwe było zagnieżdzenie się wprowadzanych zarodków. Matki zastępcze uzyskuje się poprzez łączenie samic z samcami poddanymi wasektomii. Samą procedurę mikroiniekcji przeżywa około 50–60% zygot, a transfer do jajowodów – 30%. Z urodzonego potomstwa około 15% osobników posiada zintegrowany transgen. Z tego część tylko wykazuje jego ekspresję, dając w efekcie końcowym wydajność metody rzędu 4%.

Mechanizm molekularny integracji obcego DNA do genomu gospodarza jest jeszcze słabo poznany. Prawdopodobnie najważniejszą rolę odgrywają w nim procesy naprawy DNA. Transgen jest wbudowywany w sposób losowy, nie dając możliwości wyboru miejsca jego integracji. Nie jest możliwe także kontrolowanie liczby kopii transgenu, która się wbuduje do genomu. Zazwyczaj transgen integruje do danego miejsca w formie wielokrotnych kopii wprowadzanego odcinka DNA. Mówi się wtedy o tandemach, które mogą być proste (gdy orientacja ich jest identyczna) lub odwrócone (gdy orientacje są przeciwne). Sekwencje tandemowe powstają jeszcze przed momentem integracji na skutek łączenia końców lub rekombinacji homologicznej pomiędzy cząsteczkami transgenu. Najczęściej DNA włącza się w jednym lub kilku miejscach chromosomu. Uważa się, że preferowanym miejscem integracji są regiony niestabilne chromosomów. Zauważono również krótkie (3 pz) odcinki homologii pomiędzy końcami transgenu i DNA gospodarza. W wyniku procesu integracji może dojść do powstania delecji w genomie zygoty oraz krótkich delecji w miejscach połączeń pomiędzy poszczególnymi kopiami transgenu w tandemie. W związku z ewentualnością uszkodzenia istotnych sekwencji w genomie gospodarza do badań najczęściej używane są zwierzęta heterozygotyczne. Dla potrzeb komercyjnych heterozygoty nie są jednak stosowane.

Udany proces integracji transgenu nie gwarantuje jeszcze uzyskania efektu fenotypowego właściwego dla wprowadzanych sekwencji. Wyniki doświadczeń na różnych gatunkach zwierząt dowodzą, że ponad połowa uzyskanych zwierząt transgenicznych nie wykazuje ekspresji transgenu. Efekt ten jest spowodowany najczęściej wbudowaniem konstrukcji genowej do obszaru chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie (heterochromatyna). Nawet sąsiedztwo obszaru nieaktywnego może hamować ekspresję transgenu. Znany jest także efekt mozaikowości ekspresji w pobliżu heterochromatyny (*position effect variation*), wpływający na geny wbudowane na pograniczu obszarów nieaktywnej chromatyny. Objawia się on niestabilną ekspresją transgenu zależną od okresowej ekspansji heterochromatyny. Próbuje się temu zapobiec poprzez stosowanie izolatorów chromosomowych lub regionów połączenia DNA z macierzą jądrową (MAR, *matrix associated region*), otaczając nimi geny zawarte w konstrukcie DNA. Dzięki obecności tych elementów wprowadzane geny tworzą minidomenę, której aktywność jest niezależna od otaczającej ją chromatyny. Innym problemem wynikającym z obecności wielu kopii transgenu jest ich

inaktywacja na skutek postępującej z pokolenia na pokolenie metylacji. Wiadomo, że obecność sekwencji tandemowych sprzyja metylacji DNA. Stosowanie izolatorów chromosomowych jest pomocne również w tym wypadku. Można temu także zapobiec przez pozostawienie tylko jednej kopii transgeny. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu fagowych lub drożdżowych rekombinaz (Cre i FLP) rozpoznających specyficzne sekwencje (zasady działania rekombinaz Cre i FLP opisano dalej). Wprowadzenie tych sekwencji do stworzonej konstrukcji genowej oraz iniekcja aktywnych rekombinaz do zygoty poddanej mikroiniekcji pozwala uzyskać wspomniany efekt.

Mikroiniekcja DNA do przedjądrza zygoty jest najczęstszą metodą transgenezy. Można ją stosować u wielu gatunków zwierząt, uwzględniając przy tym różnice w ich cyklach rozrodczych.

Modyfikacja komórek zarodkowych (ES)

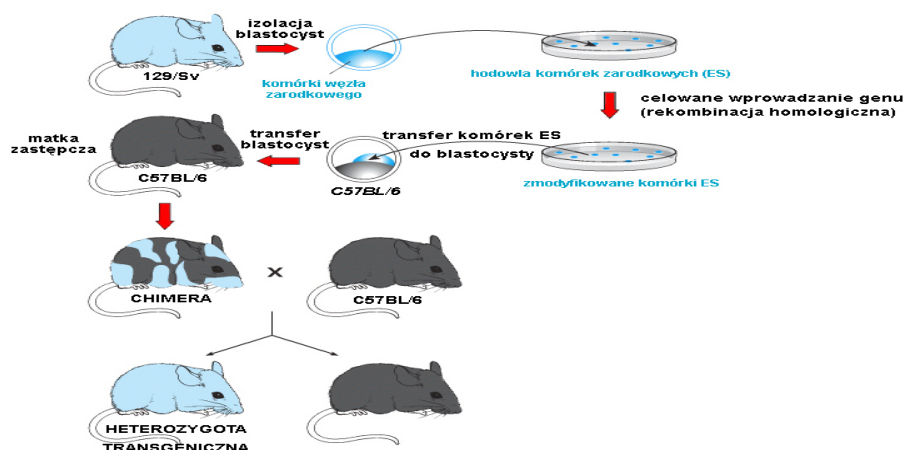
Uzyskiwanie zwierząt transgenicznych poprzez modyfikację embrionalnych komórek zarodkowych jest ograniczone do tych gatunków, u których opracowano metodę hodowli komórek ES, które nie tracą zdolności do zasiedlania linii komórek prapłciowych. Zasadniczo jest to obecnie wykonalne tylko u myszy. Komórki ES pozyskuje się z węzła zarodkowego blastocysty, a następnie hoduje w warunkach *in vitro* w taki sposób, aby nie dopuścić do ich różnicowania oraz utraty pluripotencji (zdolności do różnicowania się w tkanki dowolnego listka zarodkowego). Hodowla komórek ES wymaga utrzymania pewnego reżimu, co znajduje późnie odzwierciedlenie w dalszych etapach transgenezy. Najbardziej istotnymi czynnikami utrzymującymi te komórki w stanie niezróżnicowanym są: hodowla na warstwie komórek odżywczych (są nimi płodowe fibroblasty myszy, niezdolne do podziałów na skutek podania cytostatyku), pożywka zawierająca wysokie stężenie surowicy z dodatkiem czynnika przeciwbiałaczkowego (LIF, *leukaemia inhibitory factor*) oraz umiejętne pasażowanie niedopuszczające do przerostu hodowli. Coraz częściej optymalizuje się skład pożywki hodowlanej, tak aby zbędne było stosowanie komórek odżywczych. Po uzyskaniu dostatecznej liczby komórek ES wprowadzana jest do nich konstrukcja genowa za pomocą jednej z powszechnych metod transfekcji (elektroporacja, lipofekcja, precypitacja fosforanu wapnia). W czasie kilkunastu godzin od momentu wprowadzenia egzogenego DNA zachodzi proces integracji. Po tym czasie do pożywki hodowlanej dodawany jest czynnik selekcyjny, umożliwiający eliminację tych komórek, które nie przyjęły konstrukcji genowej warunkującej m.in. oporność na dany czynnik. Jeśli stworzona konstrukcja genowa będzie zawierała również gen selekcji negatywnej, pożywka będzie wzbogacona o jeszcze jeden czynnik selekcyjny. Po około 10 dniach selekcji w hodowli pozostaną tylko komórki, które wbudowały transgen do swojego genomu. Na tym etapie komórki tworzą nieduże, ale makroskopowo widoczne kolonie (każda wywodzi się od pojedynczej komórki). Każdą kolonię przenosi się do osobnego naczynia hodowlanego, uzyskując tym samym odrębne klony. Część z nich będzie posiadała transgen wbudowany losowo, a część w tym locus, do którego zostały wcześniej zaprojektowane odcinki sekwencji homologicznych. Przy zastosowaniu selekcji negatywnej udział tych ostatnich komórek będzie większy. Otrzymane klony poddaje się procedurze genotypowania w celu identyfikacji tych, w których transgen został wbudowany do oczekiwanego locus (dzięki rekombinacji homologicznej, *ryc. 9*). Klony komórek, które spełniają założone kryteria są namnażane i przy użyciu mikropipety sterowanej mikromanipulatorem

wprowadzane do jamy blastocysty, która po krótkiej regeneracji jest przenoszona do jajowodów matki zastępczej. W praktyce najczęściej stosuje się blastocysty pochodzące od zwierząt o odmiennym ubarwieniu (np. komórki ES myszy szczepu 129/Sv – agouti, a blastocysty od C57BL/6 – czarne), dzięki czemu łatwiej jest oszacować poziom chimerizmu na podstawie mieszanego ubarwienia sierści. Wprowadzane komórki ES w różnym stopniu mogą uczestniczyć w rozwoju embrionalnym zarodków (trzeba pamiętać, że użyta blastocysta też posiada swoje komórki węzła zarodkowego), a co za tym idzie, niekoniecznie muszą dać początek linii komórek płciowych, dzięki którym możliwe jest wyprowadzenie linii transgenicznej. Dlatego z pierwszego uzyskanego miotu wybierane są zwierzęta o największym poziomie chimerizmu i krzyżowane dalej z określonym szczepem. Część potomstwa chimer jest heterozygotyczna (ubarwienie jednolite, np. agouti) i dopiero dalsze krzyżowanie heterozygot może doprowadzić do uzyskania zwierząt homozygotycznych (z całkowicie zmienionym locus na obydwu chromosomach homologicznych) (*ryc. 10*).

Transgen może ulec integracji w wyniku rekombinacji homologicznej na dwa sposoby. Są one uzależnione od tego, w jaki sposób zostaną zaprojektowane odcinki sekwencji homologicznych w konstrukcji genowej. Jeśli będą to fragmenty o orientacji identycznej z orientacją sekwencji docelowej, nastąpi zastąpienie części chromosomalnego DNA (homologiczna wymiana genów). W konsekwencji chromosom może ulec wydłużeniu lub skróceniu o długość odcinka zawartego pomiędzy regionami homologicznymi użytej konstrukcji genowej. Jest to najczęściej stosowany mechanizm transgenezy. Jeśli odcinki sekwencji homologicznych w konstrukcji będą miały orientację odwróconą w stosunku do natywnego locus, nastąpi insercja transgenu oraz związane z tym wydłużenie chromosomu. Wydajność procesu integracji jest wprost proporcjonalna do długości regionu homologii w DNA konstrukcji genowej. Zwiększenie długości tych regionów zwykle powoduje wzrost częstości rekombinacji homologicznej.

Stosowanie omawianej metody transgenezy pozwala z dużym prawdopodobieństwem oszacować aktywność wprowadzanej konstrukcji genowej. Wprowadzanie transgenu do znanego i zbadanego locus pozwala najczęściej oczekiwać zadowolającej ekspresji. Możliwe jest również pilotażowe testowanie zachowania wprowadzonej konstrukcji genowej na poziomie otrzymanych klonów embrionalnych komórek zarodkowych. Co więcej, można komórki ES poddać procesowi różnicowania *in vitro* w dowolny rodzaj tkanki i analizować aktywność transgenu w kontekście tkankowo specyficznego programu genetycznego.

Należy jednak pamiętać, że efekt działania transgenu (jak również wielu genów natywnych) może być różny w zależności od tzw. tła genetycznego, rozumianego jako połączony wpływ wszystkich genów organizmu na efekt fenotypowy aktywności badanego genu. Innymi słowy, ten sam gen w jednym szczepie myszy może wpływać na jej fizjologię inaczej niż w innym. Wynika to z drobnych, ale czasem istotnych różnic w sekwencji DNA. Z tego powodu uzyskane linie transgeniczne najczęściej krzyżuje się wstecznie przez kilka pokoleń do uzyskania jednolitego tła genetycznego. Powszechnie stosuje się do tego celu standardowy szczep C57BL/6.



Ryc. 10. Uzyskiwanie myszy transgenicznych poprzez modyfikację zarodkowych komórek macierzystych (ES). Pomiedzy wprowadzeniem transgeny i transferem komórek ES do blastocysty przeprowadza się proces selekcji, a przeżywające klony komórkowe poddaje genotypowaniu. Zwierzęta powstające w kolejnych krzyżówkach też są genotypowane.

Transfer wirusowy

Główną zaletą tworzenia zwierząt transgenicznych przez infekcje wirusowe jest duża wydajność metody (osiąga się do 80% potomstwa z transgenem) oraz dowolność wykorzystywanego materiału. Stosuje się zarówno infekcje zarodków, jak i komórek ES. Wadą tej metody jest ograniczona wielkość transgeny, który może być wprowadzony do wektora wirusowego oraz częste, zwłaszcza w odniesieniu do retrowirusów, wyciszanie ich ekspresji. Osłabienie ekspresji genów retrowirusowych wynika z metylacji sekwencji wirusowych oraz otaczających je odcinków DNA gospodarza. Ponadto czynniki działające w układzie *trans*, wiążąc się do wirusowych promotorów w długich powtórzeniach końcowych (LTR, *long terminal repeats*) dodatkowo obniżają aktywność transgeny. Dotychczas metoda oparta na retrowirusach była rzadko stosowana. Obecnie wiąże się duże nadzieje z zastosowaniem lentiwirusów (należących również do rodziny *Retroviridae*), których ekspresja nie ulega wyciszaniu. Wielkość ich genomu wynosi ok. 8 kbp i podobnie transgen musi być odpowiednio mniejszy. Udało się tą metodą wprowadzić do genomu świni gen reporterowy *GFP* i uzyskać jego ekspresję we wszystkich tkankach u 12% transfekowanych zarodków.

Metoda ta wymaga przygotowania konstrukcji retrowirusowej oraz posiadania specjalnej linii komórek pakujących. Konstrukcję retrowirusową przygotowuje się w ten sposób, że eliminuje się wirusowe geny *gag*, *pol* i *env*, a na ich miejsce wklonowuje się badany gen. Taka konstrukcja genomu jest wprowadzana do komórek pakujących, które zapewniają syntezę elementów strukturalnych wirusa oraz składanie jego cząstek, które będą posiadały materiał genetyczny w formie RNA, a także zapas enzymów koniecznych do odwrotnej transkrypcji oraz integracji w komórkach gospodarza (odpowiednio: odwrotna transkryptaza i integraza). Zebrane z hodowli komórkowej wirusy można użyć do infekowania zygot lub komórek ES. Materiał genetyczny wirusa integruje do genomu gospodarza w sposób losowy w kilku miejscach, jest dziedziczny i nie powoduje powstawania nowych cząsteczek wirusa (brak genów kodujących elementy osłonki).

Klonowanie somatyczne

Klonowanie somatyczne polega na wprowadzeniu do enukleowanego (pozbawionego jądra) oocytu jądra komórki somatycznej, a więc diploidalnej. Uzyskuje się tym samym organizm genetycznie identyczny z dawcą materiału genetycznego. Materiał genetyczny można pozyskać zarówno ze zmodyfikowanych genetycznie, jak i niezmienionych komórek. W tym pierwszym przypadku może to być teoretycznie dowolna linia komórkowa, jak również komórki zarodkowe. Tym samym istnieje tutaj możliwość wyboru rodzaju transgenezy: losowej z określoną liczbą kopii transgeny lub celowanej do określonego locus chromosomalnego. Modyfikacja genetyczna może być zatem przeprowadzona *in vitro* w dowolny z opisanych wcześniej sposobów, wykorzystując zalety selekcji oraz genotypowania przed podjęciem kolejnych kroków. Jądro komórki-dawcy musi być w odpowiedni sposób przygotowane do transplantacji. Dla powodzenia procedury istotna jest faza cyklu komórkowego, w którym się znajduje. Najlepsze efekty umożliwia zastosowanie komórki w fazie spoczynku – G_1/G_0 (wprowadzenie jąder w fazie S cyklu może doprowadzić do poważnych uszkodzeń chromosomów). Osiąga się to poprzez głodzenie hodowli komórkowej (hodowla w pożywce z obniżonym stężeniem lub bez surowicy). Tak przygotowane jądra mogą w odpowiedni sposób zostać przeprogramowane przez czynniki regulacyjne zawarte w oocycie. Dzięki temu powstanie totipotencjalna komórka, a z niej całkowicie transgeniczny organizm. Od strony metodycznej technika transplantacji jąder komórkowych polega na mikrochirurgicznym usunięciu chromosomów oocytu, umieszczeniu komórki somatycznej pod osłonką przejrzystą oocytu oraz połączeniu obydwu komórek w procesie elektrofuzji. Podawane w tym czasie impulsy prądu stałego powodują jednocześnie aktywację oocytu do dalszych podziałów. Po osiągnięciu stadium moruli lub blastocysty w warunkach *in vitro* zarodki są przenoszone do matek zastępczych.

Zaletami metody jest możliwość wyboru płci zwierzęcia rodzącego się w pierwszym miocie (przez wybór komórki-dawcy), możliwość wyboru tła genetycznego (np. wysokomleczne krowy), możliwość sprawdzenia ekspresji transgeny w warunkach hodowli komórkowej, przydatność dla wielu gatunków zwierząt gospodarskich oraz gwarancja, że wszystkie zwierzęta w miocie są transgeniczne. Wadą tej metody jest jej mała wydajność (1 – 5% rekonstruowanych zarodków rozwija się i daje potomstwo). Prace nad poprawieniem efektywności tej metody u wielu gatunków trwają. Lepsze zrozumienie procesu przeprogramowywania jąder somatycznych oraz opracowanie metod uzyskiwania oocytów z komórek ES będą owocowały upowszechnieniem tej metody.

Włączanie i wyłączenie genów

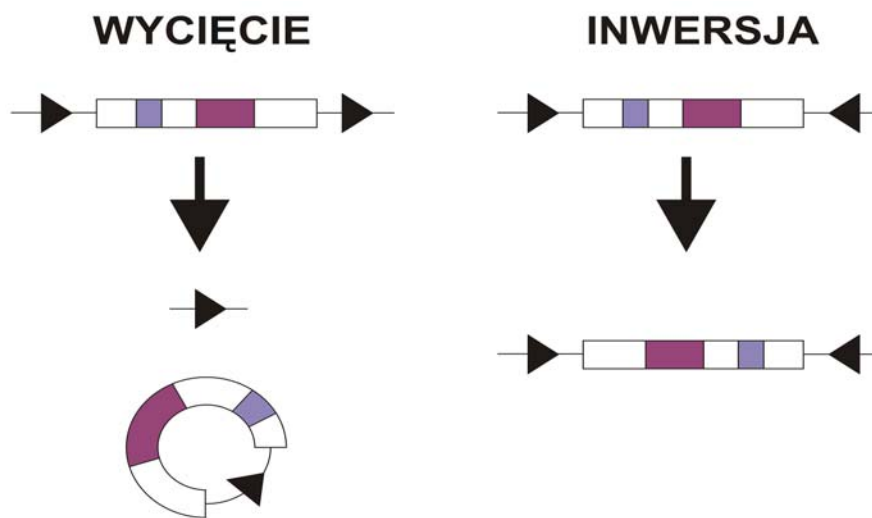
Opisane metody transgenezy prowadzą do trwałej modyfikacji zwierząt. W konsekwencji zwierzę przez całe życie posiada wyłączony, zmodyfikowany lub dodany gen. Niejednokrotnie brak aktywności pewnego genu lub nadekspresja innego może prowadzić do umierania potomstwa jeszcze na etapie rozwoju embrionalnego, uniemożliwiając badania na organizmach dojrzałych. Z tego powodu adaptowano ze świata owadów, bakterii, fagów i drożdży wiele systemów regulowanej ekspresji pomocnych w sterowaniu aktywnością genów ssaczy.

3. Systemy warunkowej ekspresji genów

Systemy te opierają się na zlokalizowanej rekombinacji pomiędzy dwiema identycznymi sekwencjami nukleotydów w DNA. Najczęściej stosowane są Cre/loxP i FLP/FRT, które niejednokrotnie wykorzystuje się jednocześnie w tym samym konstrukcie DNA. Cre to rekombinaza występująca u bakteriofaga P1, rozpoznająca specyficzną sekwencję o długości 34 pz (loxP). Sekwencja ta jest zbudowana z dwóch odwróconych powtórzeń 13-nukleotydowej sekwencji przedzielonych centralną sekwencją o długości 8 pz. Orientacja tej ostatniej określa kierunek całej sekwencji loxP. Jeśli w dowolnej sekwencji DNA zostaną umieszczone dwa lub więcej miejsca loxP, rekombinaza Cre rozpozna je i doprowadzi do rekombinacji pomiędzy nimi. Efekt rekombinacji może być różny w zależności od tego, jaki kierunek będą posiadały sekwencje loxP. Jeśli ich kierunek będzie jednakowy, w wyniku rekombinacji fragment DNA leżący pomiędzy tymi miejscami loxP zostanie usunięty i pozostanie tylko jedno miejsce loxP. Jeśli orientacja dwóch sekwencji loxP będzie przeciwna, rekombinaza Cre doprowadzi do odwrócenia (inwersji) fragmentu DNA leżącego pomiędzy nimi, pozostawiając wyjściową liczbę miejsc loxP (*ryc. 11*).

System FLP/FRT jest zasadniczo eukariotycznym homologiem systemu Cre/loxP opisanym u drożdży. Jego zasada działania jest identyczna, jednakże rekombinaza FLP rozpoznaje swoiste sekwencje FRT o długości 34 pz. Mimo dużych podobieństw zastosowanie obydwu systemów jednocześnie w jednej konstrukcji genowej nie powoduje efektu reaktywności krzyżowej, co daje ogromne możliwości manipulacji transgenem. Łatwo sobie wyobrazić, że umieszczenie dwóch sekwencji loxP np. w sąsiadujących intronach może doprowadzić do usunięcia eksonu, co spowoduje unieczynnienie genu. Oczywiście, niezbędne do tego celu jest wprowadzenie do komórek aktywnego enzymu Cre lub plazmidu kodującego tą rekombinazę. W tym momencie pojawiają się różne możliwości: manipulacje na poziomie komórkowym w warunkach *in vitro* jeszcze przed uzyskaniem zwierząt transgenicznych lub krzyżowanie już dorosłych zwierząt ze szczepem myszy transgenicznych posiadających Cre w określonych tkankach (częściowy *knock-out*), w całym organizmie (*knock-out*) lub mających ekspresję Cre indukowaną przez podawanie induktora (*knock-out* „na żądanie”). Często stosuje się w konstrukcjach genowych kasety selekcyjne oflankowane sekwencjami FRT, po to, aby po etapie selekcji komórek ES wyeliminować gen selekcyjny z transgenu. Ma to ogromne znaczenie, gdyż niejednokrotnie silny promotor genu selekcyjnego może zaburzać ekspresję badanego genu.

W ciągu ostatnich lat naukowcy zdążyli stworzyć wiele różnorodnych linii zwierząt transgenicznych posiadających ekspresję rekombinaz Cre i FLP w różnych tkankach, aktywowanych w różnych okresach życia lub indukowanych za pomocą różnorodnych bodźców. Stwarza to ogromne możliwości manipulowania wprowadzonymi do zwierzęcia transgenami.

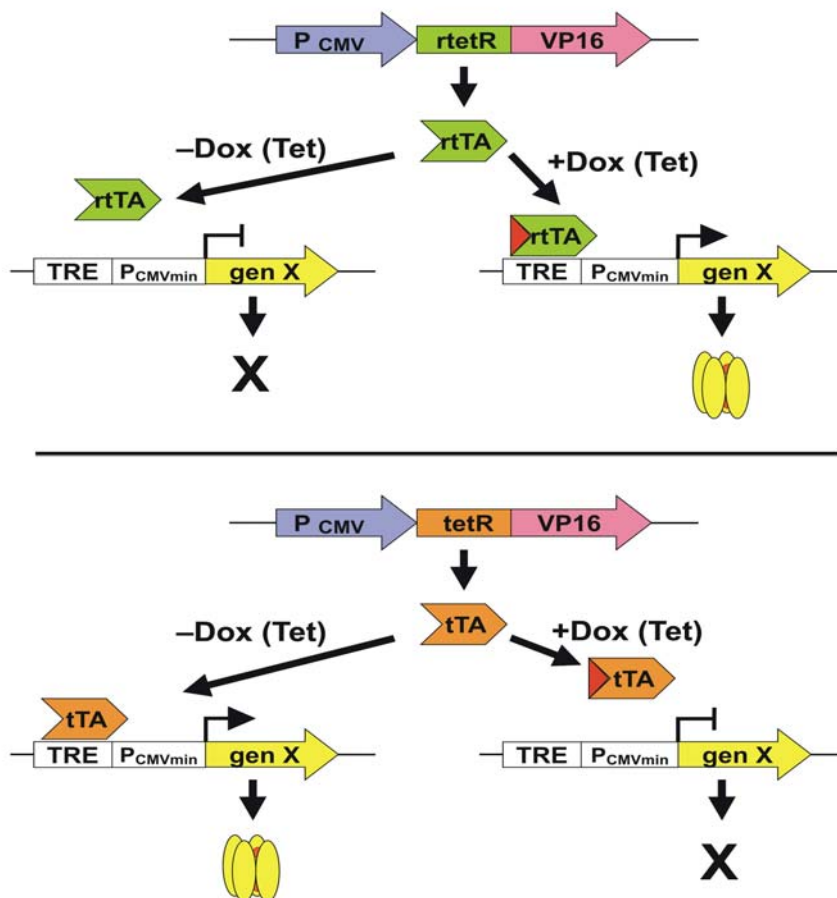


Ryc. 11. Różne efekty działania rekombinazy Cre. Miejsca loxP oznaczono czarnymi grotami strzałek, których kierunek oznacza orientację sekwencji loxP.

4. Systemy indukowalnej ekspresji genów

System tetracyklinowy

Wywodzący się z *Escherichia coli* system regulacyjny składa się z dwóch elementów. Jednym z nich jest operator tetracyklinowy (tetO) kierujący aktywnością minimalnego promotora CMV, który kontroluje transkrypcję badanego genu. Drugim elementem jest receptor tetracyklinowy (kodowany przez osobny gen), który przyłączając się do operatora indukuje ekspresję badanego genu. Receptor występuje w dwóch postaciach: jako transaktywator tetracyklinowy (tTA), który pod wpływem tetracykliny odłącza się od operatora, hamując ekspresję oraz jako odwrotny transaktywator tetracyklinowy (rtTA), który dopiero po związaniu antybiotyku wiąże się do operatora i aktywuje transkrypcję (ryc. 12). Tym sposobem badany gen może być włączany i wyłączany niejako „na żądanie” poprzez podawanie zwierzęciu antybiotyku. Zamiast tetracykliny stosuje się obecnie doksycyklinę, która ma dłuższy okres półtrwania i działa efektywniej nawet przy niższych, nietoksycznych stężeniach. Wygenerowano pokaźną liczbę zwierząt posiadających w swoim genomie różne receptory tetracyklinowe pod kontrolą różnych promotorów mniej lub bardziej tkankowo specyficznych. Podobnie jak dla zwierząt posiadających geny Cre i FLP, można wykorzystywać istniejące linie transgeniczne z receptorem tetracyklinowym do uzyskania nowych zwierząt posiadających indukowalną w dowolny sposób ekspresję badanego genu. Co ciekawe, wykorzystuje się już obecnie system tetracyklinowy do załączania ekspresji rekombinazy Cre.



Ryc. 12. Schemat działania systemu tetracyklinowego. W wersji Tet-ON odwrotny transaktywator tetracyklinowy ($rtTA$) wiąże tetracyklinowy element regulacyjny (TRE), zbudowany z siedmiu tandemowych powtórzeń sekwencji tetO, jedynie w obecności doxycykliny (Dox, czerwony trójkąt). Tym samym aktywuje transkrypcję badanego genu X. W wersji Tet-OFF transaktywator tetracyklinowy (tTA) wiąże element TRE, aktywując ekspresję genu X. Dodanie doxycykliny (lub tetracykliny) powoduje odłączenie receptora tetracyklinowego od promotora i hamowanie transkrypcji. P_{CMV} – promotor wirusa CMV, P_{CMVmin} – minimalny promotor wirusa CMV, VP16 – domena aktywacji wirusa HSV.

System Gal4

Pochodzący od drożdży system regulacyjny opiera się na oddziaływaniu transaktywatora Gal4, który aktywuje ekspresję po przyłączeniu się do sekwencji regulacyjnych zwanych UAS (*upstream activating sequence*). Induktorem w warunkach naturalnych u drożdży jest galaktoza. System ten zmodyfikowano przez połączenie domeny wiążącej DNA białka Gal4 z domeną aktywacji VP16 wirusa HSV oraz domeną wiążącą ligand receptora progesteronu (system GLVP). Podobnie zmodyfikowano ten system, stosując receptor estrogenowy. W stanie nieaktywnym GLVP pozostaje w cytoplazmie związane z białkami HSP. Dodanie syntetycznego sterydu RU486 uwalnia białka HSP i powoduje translokację GLVP do jądra, gdzie wiąże on sekwencje UAS, aktywując transkrypcję badanego genu. Omawiany system ma ograniczone zastosowanie w transgenezie ze względu na konieczność podawania hormonów: RU486 ze względu na właściwości abortyjne oraz estrogenów z powodu wywoływanych efektów pleiotropowych.

System ekdyzonowy

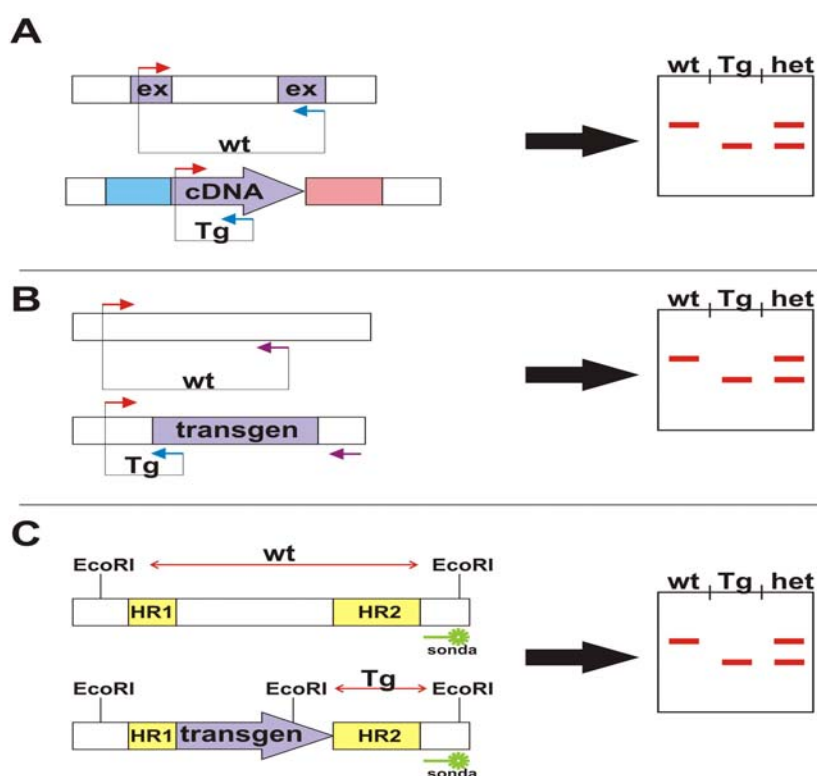
W systemie tym zmieniono owadzi receptor hormonu sterydowego – ekdyzonu, wprowadzając do niego domenę aktywacji VP16. Aby receptor ten przyłączał się do sekwencji docelowej w DNA pod wpływem podawanego analogu ekdyzonu, konieczna jest jego heterodimeryzacja z homologiem ssaczego receptora retinoidowego (RXR). Sekwencja DNA, do której wiąże się taki kompleks, też została odpowiednio zmodyfikowana. Ze względu na udział receptora retinoidowego w tym układzie regulacyjnym istnieje niebezpieczeństwo wystąpienia efektów pleiotropowych w komórkach ssaków.

5. Genotypowanie zwierząt transgeniczných

Utrzymanie i poszerzenie hodowli zwierząt transgeniczných wymaga stałego nadzoru nad dziedziczeniem wprowadzonego transgenu. W zależności od celu badań oraz rodzaju transgenezy, konieczne może być użycie zwierząt posiadających pojedynczą kopię transgenu w chromosomie (heterozygotycznych) lub dwie jego kopie (homozygotycznych). Już na etapie projektowania konstrukcji genowych należy przyjąć odpowiednią strategię genotypowania, aby odróżnić odmienne genetycznie zwierzęta. Metoda określająca zygotyczność musi charakteryzować się prostotą, jednoznacznością i niezawodnością. Ważne jest też, aby była niedroga i mało czasochłonna. Teoretycznie można zastosować do tego celu wiele metod, jednakże zwykła reakcja PCR oraz hybrydyzacja Southerna wydają się najodpowiedniejsze, toteż są stosowane najczęściej.

Dość prosta, aczkolwiek nie zawsze odpowiednia, metoda określania zygotyczności wykorzystuje różnice długości uzyskiwanych produktów reakcji PCR. Stosując startery zaprojektowane do różnych eksonów genu można odróżnić produkty amplifikacji DNA i cDNA. Metoda ta jest jednak ograniczona do takiego rodzaju transgenezy, w której wprowadza się do zwierzęcia cDNA genu występującego w danym gatunku. Przeszkodą dla tej metody może być też duża liczba kopii transgenu wbudowanego losowo. Zwykle, oprócz badanego genu (właściwego gatunkowi lub obcego), w konstrukcjach genowych zawarte są także sekwencje kodujące białko reporterowe i kasety selekcyjne. Wykorzystując te specyficzne dla genomu gospodarza sekwencje, można wykonać prostą reakcję wykrywającą dany gen, co określi jedynie, czy jest transgen, czy go nie ma (co może generować artefakty i nie określi zygotyczności). Jednak w sytuacji, kiedy znana jest kolejność nukleotydów w sekwencji flankującej dany transgen, możliwe jest zaprojektowanie reakcji PCR z jednym starterem wspólnym komplementarnym do regionu flankującego oraz dwoma starterami różnicującymi. Jeden ze starterów różnicujących powinien łączyć się do sekwencji genu reporterowego (lub innego rzadko spotykanego), a drugi – do sekwencji flankującej transgen z drugiej strony. W takiej reakcji zawsze powstanie jeden lub dwa produkty informujące o zygotyczności dawcy DNA (*ryc. 13*).

Z powodu swojej czułości, a czasem niespecyficzności, genotypowanie przy użyciu reakcji PCR może prowadzić do powstawania artefaktów (głównie fałszywie pozytywnych wyników).

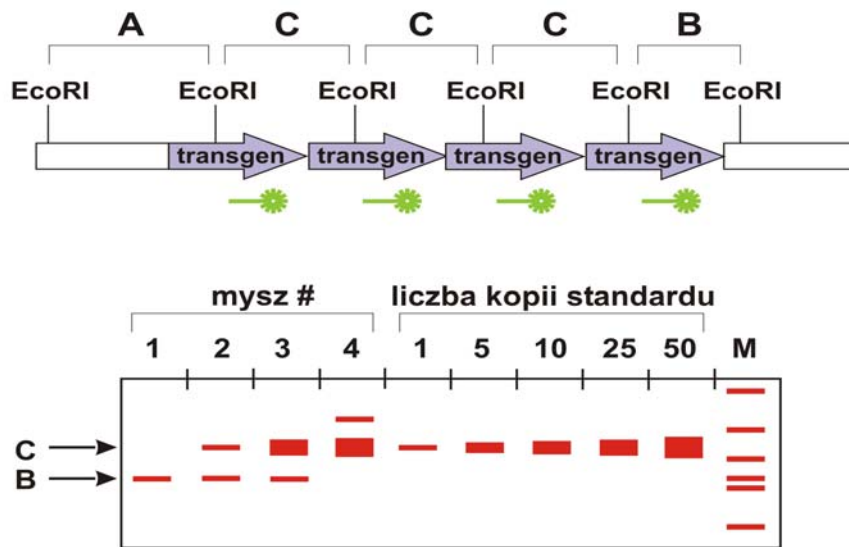


Ryc. 13. Strategie genotypowania zwierząt transgenicznych. W prawej części ryciny przedstawiono schematycznie wyniki elektroforez określających genotyp przykładowych osobników. A – najprostsza metoda genotypowania za pomocą reakcji PCR wykorzystuje startery do różnych eksonów genu. Artefakty mogą powstać na skutek np. częściowej utraty konstrukcji genowej w trakcie integracji. Skuteczna w połączeniu z innymi metodami. B – dobra metoda oparta na reakcji PCR pod warunkiem, że znane jest miejsce integracji, a transgen posiada wyjątkową sekwencję. W przypadku stosowania techniki homologicznej wymiany genów, długość regionu homologicznego może uniemożliwić stosowanie PCR. Wady jak wyżej, konieczność stosowania trzech starterów w jednej reakcji. C – metoda wykorzystująca technikę hybrydyzacji Southerna. Najbardziej wiarygodna, ale pod warunkiem, że sonda hybryduje do regionu, który nie bierze udziału w rekombinacji homologicznej (musi wiązać się do regionu powyżej HR1 lub poniżej HR2). Stosowanie sondy komplementarnej do transgeny nie gwarantuje pewnych wyników. Objasnienie skrótów: ex – ekson, EcoRI – sekwencja rozpoznawana przez enzym restrykcyjny EcoRI, het – osobnik transgeniczny (heterozygotyczny), HR1 i HR2 – regiony homologii, Tg – osobnik transgeniczny (homozygotyczny), wt – osobnik niezmienny genetycznie (typ dziki).

Bardziej pracochłonna, kosztowna i często związana z użyciem izotopów promieniotwórczych technika hybrydyzacji Southerna pozwala precyzyjniej określić sposób integracji transgeny. Jej wyniki są wiarygodne i wolne od fałszywie dodatnich artefaktów. Przy jej zastosowaniu można stwierdzić, czy doszło do homologicznej wymiany genów na drodze rekombinacji. Warunkiem jest tutaj stosowanie sondy zaprojektowanej do sekwencji flankujących zmieniane locus oraz użycie takich enzymów restrykcyjnych, które wygenerują fragmenty restrykcyjne o różnych długościach dla natywnego i zmienionego locus. Odróżnienie heterozygot, homozygot i niezmiennych osobników nie stwarza żadnych problemów (ryc. 13).

W odniesieniu do losowej integracji, hybrydyzacja Southerna jest pomocna w określeniu liczby kopii zintegrowanego transgeny oraz liczby miejsc jego integracji w genomie. Podstawą jest tutaj zastosowanie sondy komplementarnej do transgeny i użycie odpo-

wiedniego enzymu restrykcyjnego. Może to być enzym nieposiadający swojego miejsca w transgenie lub taki, który przecina go tylko raz. Nie wiadomo przy tym, jakich fragmentów należy się spodziewać w wyniku hybrydyzacji. Jednak ich liczba i intensywność może udzielić odpowiedzi na postawione pytanie. Zwykle na tym samym żelu rozdzielana jest seria próbek zawierających czyste DNA transgenu w różnej liczbie kopii i na podstawie intensywności sygnału oceniana jest liczba kopii transgenu w genomie zwierzęcia (ryc. 14).



Ryc. 14. Losowa integracja transgenu – identyfikacja liczby kopii i miejsc integracji techniką hybrydyzacji Southerna. Transgeny najczęściej tworzą tandemy, których ilość można ocenić, porównując intensywność naniesionych na żel rozcińczeń standardu (konstrukcja genu użyta w transgenezie) z intensywnością fragmentów DNA poszczególnych zwierząt. W tym przypadku fragmenty restrykcyjne C będą posiadały długość równą wielkości transgenu. Intensywność fragmentu C u myszy 3 i 4 sugeruje obecność 25–30 kopii transgenu, u myszy nr 2 – około dwóch kopii. Mysz nr 1 będzie posiadała tylko jedną kopię transgenu. Ponadto myszy 1–3 posiadają jedno wspólne miejsce integracji, a mysz nr 4 – posiada transgen wbudowany do innego locus. Zastosowanie sondy komplementarnej do regionu leżącego powyżej miejsca EcoRI w transgenie pozwoliłoby wykryć fragmenty A i C. Objasnienie skrótów: EcoRI – sekwencja rozpoznawana przez enzym restrykcyjny EcoRI; A, B i C – fragmenty restrykcyjne powstające w wyniku działania enzymu EcoRI (długości hipotetycznych fragmentów: $A > C > B$).

Precyzyjne zidentyfikowanie miejsca losowej integracji w chromosomie jest możliwe dzięki technice wędrówki po chromosomie (*chromosome walking*). W obecnych czasach, dzięki znajomości i powszechnej dostępności sekwencji nukleotydowej DNA większości istotnych gatunków, poznanie tylko fragmentu sekwencji flankującej transgen pozwala określić jego lokalizację.

6. Zastosowanie organizmów transgenicznych

Organizmy transgeniczne wykorzystywane są w naukach podstawowych na ogromną skalę. Pozwalają lepiej poznać funkcje genów w układzie *in vivo*, weryfikując niejednokrotnie wyniki eksperymentów prowadzonych w hodowlach komórkowych. Często stosowaną techniką badawczą jest wyłączenie lub wywoływanie nadekspresji określonego genu, co może ułatwić zrozumienie jego działania. Z kolei zastąpienie badanego

genem reporterowym lub dołączenie reportera umożliwia precyzyjne poznanie mechanizmów regulujących jego ekspresję.

Zwierzęta transgeniczne są szczególnie pożyteczne dla medycyny. Dzięki licznym modelom eksperymentalnym poznano molekularne podłoże wielu procesów biologicznych w embriologii, neurologii, kardiologii, immunologii, onkologii i innych dziedzinach.

Modele zwierzęce znajdują także zastosowanie w testowaniu skuteczności różnych terapii. Beggah i wsp., korzystając z tetracyklinowego systemu regulowanej ekspresji, stworzyli myszy model odwracalnego włóknienia serca i kardiomiopatii przerostowej. Sterując ekspresją receptorów mineralokortykoidowych (dla których ligandem jest aldosteron), wskazali je jako nowy cel terapeutyczny. Z kolei Malleret i wsp., wykorzystując ten sam system do indukowalnej ekspresji inhibitora kalcyneuryny wykazali hamujące działanie kalcyneuryny na procesy uczenia się i pamięci.

Wiele zwierząt transgenicznych funkcjonuje jako bioreaktory. Substancje produkowane w tkankach zwierzęcych mogą być powszechnie wykorzystywane, szczególnie w lecznictwie, jak np. rekombinowana ludzka antytrombina III, produkowana w mleku kozim, czy podobnie wydzielany do mleka transgenicznej owcy imieniem Tracy ludzki inhibitor proteazy – $\alpha 1$ -antytrypsyna, która pomaga w leczeniu rozedmy płuc.

Innym zastosowaniem zwierząt transgenicznych jest produkcja organów zwierzęcych do ksenotransplantacji. Najbardziej zaawansowane są badania nad świniami, których modyfikacje genetyczne mają na celu ograniczenie problemu odrzucania przeszczepu w organizmie człowieka.

Tymczasem powszechnie wykorzystuje się organizmy transgeniczne do produkcji wielu narzędzi stosowanych w biotechnologii (przeciwciała, białka, enzymy).

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bishop J.: Ssaki transgeniczne. PWN, Warszawa 2001. – [2] Bockamp E., Maringer M., Spangenberg C. et al.: Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol. Genomics*. 2002; 11: 115–132. – [3] Capecchi M.R.: Generating mice with targeted mutations. *Nat. Med.* 2001; 7: 1086–1090. – [4] Clark J., Whitelaw B.: A future for transgenic livestock. *Nat. Rev. Genet.* 2003; 4: 825–833. – [5] Goldman I.L., Kadulin S.G., Razin S.V.: Transgenic animals in medicine: integration and expression of foreign genes, theoretical and applied aspects. *Med. Sci. Monit.* 2004; 10: RA274–85. – [6] Hodges C.A., Stive S.L.: Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 1: 81. – [7] Konopka W.: Zwierzęta transgeniczne w neurobiologii. Konferencja „Nowe metody w neurobiologii” 15 grudnia 2004; 21–26. – [8] Lewandoski M.: Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 2: 743–755. – [9] Metzger D., Feil R.: Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999; 10: 470–476. – [10] Stricklett P.K., Nelson R.D., Koban D.E.: The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: F651–657. – [11] Strachan T., Read A.P.: *Human Molecular Genetics 2*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford 1999. – [12] Van Craenenbroeck K., Vanboenacker P., Leysen J.E. et al.: Evaluation of the tetracycline – and ecdysone – inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 14: 968–976.

V. Poszukiwanie roślin transgenicznych jako proces specyficznej reorganizacji materiału genetycznego

Sabina Gałka

Transformacja genetyczna to proces przenoszenia transgenów – obcych, specjalnie skonstruowanych fragmentów DNA (genów) do genomu biorcy i ich stabilna integracja z tym genomem. Po regeneracji z komórek mogą powstać transformanty (transgeniczne rośliny) o nowych lub ulepszonych cechach.

Pierwsze udane doświadczenia z transformacją petuni i tytoniu w 1983 roku zapoczątkowały intensywny rozwój technik modyfikacji roślin, które zastosowano dla wielu gatunków, np. roślin rolniczych: bawełny, kukurydzy, pszenicy, ryżu; roślin warzywniczych: grochu, marchwi, pomidora; roślin sadowniczych: jabłoni, maliny, śliwy, winorośli; roślin ozdobnych: róży, tulipana; roślin leczniczych: naparstnicy, barwinka, nawrotu i wielu innych.

Transformacja roślin obejmuje następujące etapy:

- izolację genu, który ma być użyty do modyfikacji,
- przygotowanie konstrukcji genowej składającej się z:
 - genu kodującego określone białko, które ma być wprowadzone,
 - dwóch genów regulatorowych – promotora i terminatora,
 - genu markerowego – umożliwiającego selekcję,
 - genu reporterowego – umożliwiającego wizualizację wprowadzonego transgenu,
 - wektora zawierającego dwie sekwencje graniczne regionu T-DNA z plazmidu Ti.
- wprowadzenie konstrukcji genowej do komórki roślinnej (metody wektorowe lub bezwektorowe),
- regenerację transgenicznych roślin w kulturach *in vitro*,
- identyfikację transgenizacji za pomocą genów reporterowych, markerowych oraz kodujących,
- ocenę stabilności transformacji w kolejnych pokoleniach.

Izolacja genu, który ma być użyty do modyfikacji przebiega w kilku etapach, które obejmują wyodrębnienie, sklonowanie i następnie scharakteryzowanie określonego fragmentu DNA. Na tym etapie transformacji wykorzystuje się wiadomości uzyskane z badań nad genomiką strukturalną (położenie genu w genomie), ekspresyjną (budowa i funkcja genu), funkcjonalną (funkcja genu).

Wyodrębniono dwie strategie izolacji: pozycyjną (klonowanie pozycyjne) oraz funkcjonalną (klonowanie funkcjonalne). Źródłem genu mogą być biblioteki genowe lub izolacja może przebiegać bezpośrednio z genomu.

Geny regulatorowe – promotor i terminator

Sekwencje regulacyjne, takie jak promotor i terminator, są niezbędne do funkcjonowania genu. Promotor poprzedzający gen strukturalny jest odpowiedzialny za inicjację transkrypcji. Terminator odpowiada natomiast za ukończenie transkrypcji. Promotory mogą mieć działanie nieswoiste (konstytutywne), tkankowo swoiste (tkankowo-specyficzne) lub mogą być indukowane chemicznie. Do tych pierwszych, konstytutywnych, uczeni zaliczają początkowo wykorzystywane promotory genów pochodzących z regionu T plazmidu Ti, takie jak: promotor oktopinowy (*ocs* – syntaza oktopiny), nopalinowy (*nos* – syntaza nopaliny), promotor genu *35S* (wirus mozaiki kalafiora). Badania wykazały zwiększenie poziomu ekspresji kontrolowanego genu w porównaniu z formą dziką promotora na skutek duplikacji całej sekwencji promotora lub wielokrotnego powtórzenia sekwencji dystalnej w promotorze. Do promotorów tkankowo-specyficznych, które mają zdolność sterowania tkankowo swoistą ekspresją genów zalicza się promotor genu α -amylazy, swoisty dla warstwy aleuronowej, promotor gluteniny oraz β -hordeiny swoisty dla bielma, promotor genu patatyny swoisty dla bulw *Solanum tuberosum*. Promotory aktywowane chemicznie mają ogromną wartość użytkową, zwłaszcza gdy obcy gen ma ulegać ekspresji w określonym czasie i miejscu lub gdy produkt obcego genu wpływa na wzrost i rozwój rośliny. Przykładem takiego promotora jest promotor *Lac* z *E. coli* indukowany IPTG, czy promotor *PR-1a* aktywowany atakiem patogenu. Zastosowanie innych promotorów stwarza możliwość regulacji ekspresji genu za pomocą tetracykliny, jonów miedzi, etanolu.

Geny markerowe

Konstrukcja genowa przygotowana do transformacji zawiera również geny markerowe, dzięki którym możliwa jest późniejsza selekcja transformowanych komórek na pożywkach selekcyjnych. Najczęściej stosuje się geny warunkujące oporność na herbicydy i antybiotyki, np. gen *npt II* oporności na kanamycynę i neomycynę. Z *E. coli* wykorzystuje się gen *hpt aph IV* warunkujący oporność na higromycynę. Gen *aro A* z *Salmonella typhimurium* kodujący syntazę 5-endopirogronosziki-3-fosforanową powoduje oporność na jeden z najpopularniejszych herbicydów – glifosfat. Komórki, w których doszło do integracji i ekspresji tych genów przeżywają na pożywkach zawierających odpowiedni antybiotyk lub herbicyd, ponieważ są zdolne do wytworzenia enzymów inaktywujących te substancje.

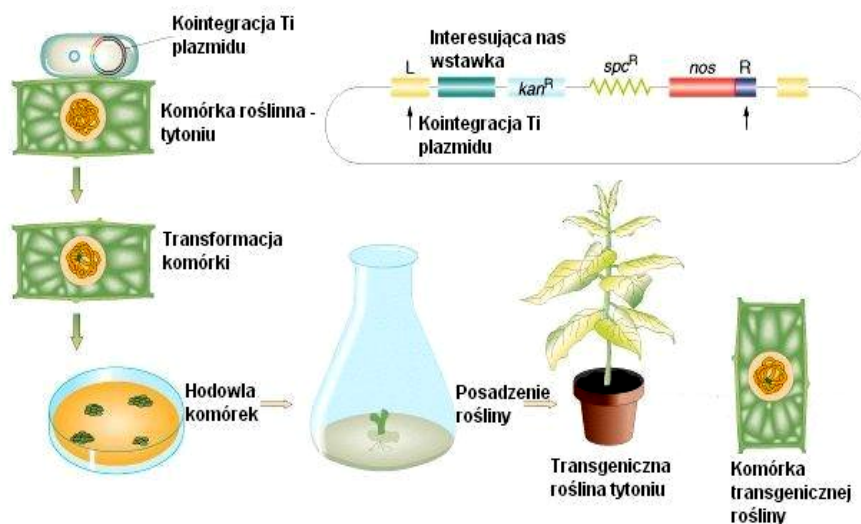
Geny reporterowe

Umieszczenie w konstrukcji genowej genu reporterowego umożliwia wczesne wykrycie komórek transgenicznych. Aktywność, ekspresja genów reporterowych, świadcząca o włączeniu i funkcjonowaniu wprowadzonych genów, wykrywana jest metodami histochemicznymi, spektrofotometrycznymi lub fluorymetrycznymi. Najczęściej stosuje się gen *gus* kodujący β -glukuronidazę, rozkładającą X-Gluc, w wyniku czego transgeniczne komórki barwią się na brązowo. Innymi genami reporterowymi mogą być: gen *luc* kodujący lucyferazę pochodzący z *Photinus pyralis*, gen *bar* kodujący acetylotransferazę fosfinotrycyny pochodzący z *Streptomyces hygrosopicus* lub gen β -gal kodujący β -galaktozydazę z *Escherichia coli* (3).

Przygotowanie wektora

Do przygotowania wektorów wykorzystano zmodyfikowane plazmidy pochodzące z bakterii z rodzaju *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* i *A. rhizogenes*), które zdolne są w warunkach naturalnych do przekazywania komórce roślinnej fragmentu własnego plazmidu.

U *Agrobacterium tumefaciens* występuje plazmid Ti (*tumor inducing*), który powoduje u zakażonych roślin powstawanie tumorowatych narośli. Natomiast plazmid Ri (*roots inducing*) u *Agrobacterium rhizogenes* indukuje wytwarzanie dużej masy drobnych korzeni. Z punktu widzenia przydatności do transformacji najważniejszymi odcinkami plazmidów jest fragment T-DNA (*transferred DNA*) o długości około 23 kbp oraz rejon wirulencji VIR (*virulence region for infection*) o długości 30–40 kbp. Odcinek T-DNA zawiera geny odpowiedzialne za syntezę opin oraz biosyntezę regulatorów wzrostu: cytokinin, auksyn. Na obu końcach tego odcinka leżą krótkie, składające się z około 24–25 par zasad sekwencje, których obecność jest niezbędna do integracji T-DNA z genomem rośliny. W rejonie VIR znajdują się dwadzieścia cztery geny wirulencji, które uczestniczą w wycinaniu fragmentu T-DNA znajdującego się między sekwencjami granicznymi, jego przenoszeniu i integracji do genomu infekowanej komórki roślinnej. Powyższe naturalne właściwości plazmidu Ti pozwoliły wykorzystać go do wprowadzania obcych genów do roślin po modyfikacji, polegającej na usunięciu onkogenów z odcinka T-DNA, uzyskując w ten sposób „rozbrojone” szczepy bakterii. W miejsce usuniętych fragmentów można wprowadzić interesujące nas geny. Schemat uzyskiwania roślin transgenicznych na bazie plazmidu Ti przedstawia rycina 15.



Ryc. 15. Schemat transgenezy roślin z wykorzystaniem jako nośnika genów plazmidu Ti.

Obecnie do transformacji roślin stosuje się dwa typy wektorów pochodnych Ti: kointegracyjne i binarne. Pierwsze z nich powstają w wyniku rekombinacji między wektorem pośrednim namnażanym w *E. coli* a wektorem pomocniczym pochodzącym z *Agrobacterium*. Częściej stosuje się wektory binarne, w których występuje system dwóch plazmidów uzupełniających się wzajemnie. Z jednego plazmidu przy użyciu enzymów restrykcyjnych usuwa się region VIR oraz modyfikuje odcinek T-DNA w ten sposób, że prawa i lewa

sekwencja graniczna pozostaje nienaruszona, a usuwa się geny znajdujące się między nimi. W to miejsce zostaje wbudowany gen kodujący wraz z promotorem i terminatorem oraz geny markerowe i reporterowe. Z drugiego pomocniczego plazmidu usuwa się T-DNA, ale pozostawia się sekwencję VIR, która uczestniczy w przeniesieniu transgeny do genomu rośliny. Wektory binarne umieszcza się w superwirulentnych szczepach bakterii, poprzez które wprowadza się konstrukcje genowe do komórki roślinnej.

Metody wektorowego wprowadzania konstrukcji genowej do komórki roślinnej

W uzyskiwaniu roślin transgeniczných wykorzystano naturalną zdolność gram-ujemnych bakterii glebowych z rodzaju *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* i *A. rhizogenes*) do infekowania roślin w miejscu zranień i przekazywania fragmentu własnego plazmidu, który ulega integracji z genomem komórki roślinnej.

Transformacja roślin może przebiegać w dwóch typach kultur.

Kultura *in vitro* polega na wprowadzeniu inokulum do eksplantatów rosnących w kulturze *in vitro*.

Procedura przebiega następująco:

- kokultura – inokulacja eksplantatów w roztworze bakterii z wprowadzoną konstrukcją genową,
- wstępne pozbycie się nadmiaru bakterii przez wypłukanie eksplantatów w wodzie lub pożywce,
- przeniesienie eksplantatów na pożywkę regeneracyjną zawierającą dodatkowo antybiotyki w celu eliminacji bakterii,
- umieszczenie eksplantatów na podłożu z czynnikiem selekcyjnym odpowiednim dla genu markerowego w transgenie,
- regeneracja roślin.

Kultura *in vivo* polega na wprowadzeniu inokulum do części roślin, w których zachodzą intensywne podziały mitotyczne lub mejotyczne. Procedura polega na umieszczeniu w inokulum pędów kwiatostanowych roślin rosnących w doniczkach. Czynność tę przeprowadza się przy podciśnieniu około 0,05 bara, przez kilkanaście minut. Po wytworzeniu nasion, zbiera się je i wysiewa sterylnie na odpowiednie podłoże selekcyjne. Wprowadzenie transgeny można także przeprowadzić przez moczenie nasion w kulturze bakterii.

Efektywność transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium* mierzy się najczęściej liczbą pędów zregenerowanych w warunkach selekcyjnych i po potwierdzonej metodami molekularnymi integracji transgeny w stosunku do liczby inokulowanych eksplantatów lub udziałem eksplantatów, z których zregenerowano co najmniej jedną roślinę transgeniczną.

Efektywność transformacji zależy od:

- gatunku rośliny,
- odmiany lub linii będącej dawcą tkanki,
- rodzaju transformowanej tkanki,
- szczepu bakteryjnego,
- metody transformacji, składu i pH pożywek, temperatury,
- wzajemnej interakcji między eksplantatem a określonym szczepem bakteryjnym.

Proces transformacji można wspomagać różnymi sposobami, np. poprzez ranienie tkanki czy dodawanie do pożywki octanu syryngonu, który aktywuje geny wirulencji u bakterii.

Efektywność transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium* roślin dwuliściennych wynosi zwykle od kilku do kilkunastu roślin ze 100 eksplantatów, w wypadku roślin jednoliściennych jest na ogół mniejsza.

Zalety wektorowej metody transformacji:

- metoda naturalna, najstarsza, najczęściej wykorzystywana,
- ochrona transgenów,
- duża wydajność wynikająca z wysokiej częstości integracji fragmentu T z genomem roślinnym (głównie roślin dwuliściennych),
- możliwość jednoczesnego wprowadzania kilku szczepów bakterii zawierających różne geny.

Główną **wadą** wektorowej metody transformacji jest jej mała skuteczność dla roślin jednoliściennych. Najczęstszą przyczyną niepowodzeń jest brak syntezy induktorów, co może umożliwiać integrację fragmentu T z genomem roślinnym. Innym powodem może być synteza specyficznych substancji będących odpowiedzią tkanki na obecność *Agrobacterium*, np. zaobserwowano syntezę związku DIMBOA (kwas 2,4-dihydroksy-7-metoksybenzoesowy) u kukurydzy, a u rodzaju *Euphorbia* pochodnych diterpenów, które wpływały hamująco na wzrost bakterii. Problemy z otrzymaniem efektywności transformacji u roślin jednoliściennych zostały częściowo rozwiązane poprzez dobór odpowiednich czynników, takich jak: genotyp biorcy, odpowiednia procedura, szczep bakteryjny – zawierający plazmidy Ti ze zmutowanymi genami *virG* prowadzącymi do konstytutywnej ekspresji innych genów *vir* lub wielokrotne kopie tego genu.

Metody bezwektorowego wprowadzenia konstrukcji genowej do komórki roślinnej

Metody bezwektorowe (bezpośrednie, DGT – *direct gene transfer*) polegają na chemicznym lub fizycznym wprowadzaniu transgenów, przygotowanych w formie liniowych lub kolistych plazmidów.

Do **najczęściej** stosowanych metod bezwektorowych w transformacji roślin zalicza się:

1. Transformację protoplastów.

Elektroporacja

Za pomocą krótkotrwałych, wysokonapięciowych impulsów elektrycznych następuje wytwarzanie się porów w błonie komórkowej, przez które wnika do protoplastów DNA. Do elektroporacji niezbędne jest przygotowanie plazmidu w formie linearnej, wyizolowanie protoplastów zdolnych do regeneracji oraz posiadanie aparatu – generatora mikroimpulsów. Wydajność transformacji tej metody wynosi około 2–8%.

Metoda chemiczna za pomocą glikolu polietylenowego (PEG)

W tej metodzie inkubuje się protoplasty roślin z plazmidowym liniowym DNA wraz z nośnikowym DNA w obecności związku (PEG) powodującego obniżenie napięcia powierzchniowego błony komórkowej. Efektywność tej metody dla ryżu i kukurydzy wyno-

siła odpowiednio nawet 44 i 54%, a zależała między innymi od czasu inkubacji, stężenia PEG, obecności jonów magnezu oraz nośnikowego DNA.

Zalety transformacji protoplastów:

- możliwość uzyskania dużej liczby protoplastów,
- kolonie komórkowe otrzymane w wyniku ich podziałów są klonami,
- mniejszy chimeryzm w regenerowanych roślinach,
- możliwość transformacji DNA plastydowego.

Wady transformacji protoplastów:

- złożoność procedury,
- problemy z regeneracją roślin, szczególnie jednoliściennych.

2. Transfer z użyciem sił balistycznych – mikrowstrzeliwanie.

Mikrowstrzeliwanie jest metodą opracowaną w 1987 roku przez Kleina i wsp. Za pomocą tzw. pistoletu genowego, (*gene gun*), napędzanego rozprężającym się helem, azotem lub powietrzem następuje wstrzelenie do komórek mikronośników – cząstek metali (wolfram, złoto) opłaszczonych DNA. Mikronośniki przenikają przez ściany, błony komórkowe i wewnętrzne membrany, docierając do jądra komórkowego, gdzie wprowadzony DNA losowo łączy się z genomem rośliny. Efektywność tej metody wynosi 1–10%. Mała wydajność metody wynika z niskiej przeżywalności komórek wywołanej uszkodzeniami mechanicznymi i szokiem akustycznym. Dodatkowo czynnikiem niekorzystnym jest pojawianie się także uszkodzeń chromosomów. Często mikronośniki penetrują komórkę zbyt płytko, nie trafiają do jądra, ale zatrzymują się w wakuoli czy w cytoplazmie; uniemożliwia to proces integracji z genomowym DNA, a przez to nie dochodzi do uzyskania stałej transfekcji komórek. Należy również pamiętać, że konstrukcja genowa nie jest niczym chroniona i może zostać uszkodzona, zdegradowana głównie przez enzymy komórkowe, DNazy. Ogromną zaletą mikrowstrzeliwania jest natomiast możliwość transformacji dowolnego typu tkanki, również roślin jednoliściennych, u których wykorzystanie *Agrobacterium* może być wykorzystane w ograniczonym zakresie.

Rzadziej stosowanymi metodami bezwektorowego wprowadzania DNA są:

1. Makroiniekcja i mikroiniekcja.

Pierwsza z nich polega na wstrzykiwaniu wodnego roztworu zawierającego konstrukcję genową w przestrzeń otaczającą rozwijający się kwiatostan w stadium przedmeiotycznym. Przykładem udanej iniekcji jest transformacja plazmidem (z genem oporności na kanamycynę) żyta zwyczajnego (*Secale cereale*). Inne próby na innych roślinach nie potwierdziły jednak skuteczności wprowadzania DNA do komórek roślinnych i obecnie metoda ta raczej nie jest stosowana.

Mikroiniekcja polega na wprowadzaniu DNA za pomocą mikromanipulatora bezpośrednio do jądra komórkowego. Przykładem zastosowania tej metody jest transformacja protoplastów tytoniu i lucerny, która dała około 15–25% transformantów. Metoda ta jest jednak bardzo skomplikowana i pracochłonna, dlatego nie jest często stosowana.

2. Elektroforeza niedojrzałych zarodków

W tym przypadku wykorzystuje się do transferu pole elektryczne. W żelu agarowym zawieszają się konstrukcje genowe oraz fragmenty tkanek roślinnych; pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego następuje migracja i wnikanie plazmidowego DNA do wnętrza „zakotwiczonych” w żelu komórek. Zaletą tej metody jest możliwość stosowania do transformacji dużych fragmentów tkanek. Wadą natomiast jest duża śmiertelność komórek spowodowana stosowanym wysokim napięciem elektrycznym, niezbędnym do przeprowadzenia elektromigracji i elektrotransferu transgenów.

3. Wytrząsanie zawiesiny komórek z włóknami szklanymi, igielkami węgliku krzemu.

W 1994 roku Thompson i wsp. przedstawili metodę transformacji kukurydzy polegającą na wytrząsaniu zawiesiny komórek z igielkami węgliku krzemu (SiC) z dodatkiem plazmidowego DNA. Ostre włókna powodują perforacje ściany i błony komórkowej komórki, umożliwiając w ten sposób wejście DNA do jej wnętrza. Zamiast SiC stosowane są także włókna szklane. Metoda jest prosta i tania, daje dobre efekty na poziomie wydajności około 6,7–27%.

4. Wprowadzanie DNA zamkniętego w liposomach.

Liposomy zbudowane są z takich samych składników lipidowych jednak błony biologiczne, a ich cechą charakterystyczną jest spontaniczne tworzenie pęcherzyków, w których można zamykać różne roztwory. W transformacji wykorzystywane są do zamykania kwasów nukleinowych. Liposomy łączą się z protoplastami komórek, wprowadzając do środka komórek odpowiedni DNA, zamknięty uprzednio w kapsułach liposomowych.

5. Transformacja organelli komórkowych za pomocą metod bezwektorowych.

Metoda ta dotyczy transformacji protoplastów z użyciem PEG-u, mikrowstrzeliwania DNA do eksplantatów z liści oraz bezpośrednio do ziaren pyłku roślin. Specjalna konstrukcja użyta do transformacji organelli musi zawierać gen ulegający ekspresji w plastydach oraz sekwencje umożliwiające specyficzną miejscową integrację.

Regeneracja transgenicznych roślin przebiega w kulturach *in vitro* odpowiednich dla danego typu eksplantatu.

Identyfikacja transgeniczności

Geny reporterowe identyfikuje się za pomocą metod histochemicznych, spektrofotometrycznych i fluorymetrycznych. Do wykrywania genów markerowych i kodujących używa się standardowych analiz kwasów nukleinowych (PCR, analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych, hybrydyzacja z sondą) lub produktów białkowych (immunodekacja, elektroforeza jedno- lub dwukierunkowa).

Dalsze prace polegają na sprawdzeniu stabilności transformacji w kolejnych pokoleniach roślin rozmnażanych płciowo. Wprowadzony obcy gen może mieć różną ekspresję i segregację w różnych fazach rozwoju lub w różnych pokoleniach. Ustalono, że bardziej stabilne transformanty powstają wówczas, gdy do genomu przyłączają się tylko pojedyncze kopie wprowadzanych transgenów.

Celem transformacji roślin jest uzyskanie takich egzemplarzy, które będą charakteryzowały się pożądanymi przez badaczy cechami, a zatem:

- rośliny odporne na biotyczne czynniki stresowe (wirusy, bakterie, owady, nicienie),
- rośliny odporne na abiotyczne czynniki stresowe (metale ciężkie, zasolenie, niedobór wody, obniżona temperatura, herbicydy),
- rośliny wytwarzające przeciwciała, szczepionki, witaminy, mikroelementy, metabolity wtórne,
- rośliny o zmodyfikowanych cechach użytkowych (przedłużenie trwałości, zwiększenie zawartości suchej masy, usunięcie niepożądanych składników, np. kofeiny).

PIŚMIENNICTWO

[1] *Klein M.*: Transformowanie roślin. [w:] Michalik B.: Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Wydawnictwo Drukrol s.c. Kraków 1996, 139–158. – [2] *Rakoczy-Trojanowska M.*: Wprowadzanie genów do roślin. [w:] Malepszy S.: Biotechnologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004, 233–246. – [3] *Stefaniak B.*: Rośliny transgeniczne. [w:] Woźny A., Przybył K.: Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II. Komórki in vitro, Wydawnictwo Naukowe, Poznań 2004, 121–142. – [4] *Szopa J., Łukasiewicz M.*: [w:] Tworzenie konstrukcji genowych [w:] Malepszy S.: Biotechnologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004, 209–232.

VI. RNA jako regulator ekspresji genów. Potranskrypcyjne wyciszanie genów techniką interferencji RNA

Ilona Bednarek

System regulacji ekspresji genów jest niezbędnym elementem prawidłowego funkcjonowania komórek i całych organizmów. Do chwili obecnej zależności pomiędzy poszczególnymi elementami regulacyjnymi ciągle są poznawane i coraz to nowe składowe systemów regulatorowych są odkrywane oraz opisywane w kolejnych doniesieniach naukowych. Opracowanie odpowiedniego, funkcjonalnego systemu regulującego ekspresję dowolnych genów w wybranym kierunku daje potencjalną możliwość manipulacji podstawowymi procesami życiowymi komórek, co z kolei stać się może ważnym narzędziem wykorzystywanym zarówno w celach badawczych, jak i terapeutycznych. W przypadku procesów nowotworzenia rozpoznano wiele szlaków aktywacji genów, gdzie często na skutek zaburzenia równowagi pomiędzy poziomem ekspresji poszczególnych genów dochodzi do rozwoju procesu chorobowego. Jeżeli można sprecyzować, który z genów ulega w danym przypadku nieprawidłowej nadekspresji, istnieje wówczas prawdopodobieństwo, iż opierając się na odpowiednim systemie regulacyjnym, wyłączenie lub zmniejszenie tej nadekspresji powinno doprowadzić do osiągnięcia stanu prawidłowego w komórce/organizmie.

Spośród poznanych i wprowadzonych – nie tylko do badań, lecz także do terapii – czynników umożliwiających regulację ekspresji genów zaliczyć można rybozomy, deoksyrybozomy, oligonukleotydy antysensowne, sekwencje oligonukleotydowe tworzące formy tripleksów z DNA oraz oligonukleotydy pełniące funkcje aptamerów – czynników wpływających hamująco na wybrane białka komórek. Każdy z tych czynników pełni swoje funkcje regulacyjne poprzez hamowanie ekspresji genów lub na skutek uniemożliwienia przebiegu procesu transkrypcji bądź translacji; można zatem zaliczyć je do elementów wyciszających ekspresję wybranych genów. O tym, jaki gen ulega wyciszeniu decyduje odpowiednie powinowactwo – komplementarność względem sekwencji nukleotydowej genu podlegającego regulacji i czynnika regulatorowego.

Ostatnio szeroko badanym i coraz powszechniej wykorzystywanym systemem celowanego wyciszania ekspresji genów jest mechanizm interferencji RNA (*RNA interference; RNAi*).

Pierwsze doniesienia o możliwości wyciszania genów przy udziale RNA pojawiły się w połowie lat dziewięćdziesiątych. Guo i Kemphus udowodnili, że wprowadzając do organizmu nicienia *Caenorhabditis elegans* mieszaninę sensownego i antysensownego RNA, można otrzymać wyciszenie odpowiedniego genu, względem którego wprowadzali komplementarny sensowny i antysensowny RNA. W 1998 roku Fire i współpracownicy uzasadnili, że za proces wyciszania genów w *Caenorhabditis elegans* odpowiedzialny jest dwuniciowy RNA. Od tego momentu, w celu pełniejszego opisanie eksperymentalnego wykorzystania RNA do inhibicji ekspresji, nowo odkrytą metodę zaczęto określać mianem interferencji RNA – *RNA interference (RNAi)*. Mechanizm RNAi zaobserwowano w organi-

zmach roślin, niektórych bezkręgowców i kręgowców. Wkrótce dowiedziono, że jest to ewolucyjnie konserwatywny mechanizm obecny od dawna w świecie zwierzęcym i roślinnym.

Naturalna rola mechanizmu RNAi polega na ochronie genomu komórek przed ruchomymi elementami genetycznymi, takimi jak transpozony, czy nośnikami obcej informacji genetycznej, np. przed wirusami. Molekuły dwuniciowego RNA zaangażowane w mechanizm RNAi prawdopodobnie odpowiedzialne są także za metylację wybranych sekwencji promotorowych w DNA, przez co hamują transkrypcję wybranych genów.

Przypuszcza się, że w tym przypadku celem metylacji jest inhibicja ekspansji retrowirusów zintegrowanych z genomem zainfekowanej komórki. Prowadząc badania na komórkach drożdży udowodniono, że mutanty pozbawione komponentów niezbędnych do istnienia zjawiska RNAi traciły zdolność do metylacji chromatyny i supresji transpozonów w genomie. Na tej podstawie można wnioskować o istnieniu wpływu mechanizmu RNAi na strukturę chromatyny w jądrze komórkowym, a jak powszechnie wiadomo, struktura chromatyny pozostaje w bezpośrednim związku z ekspresją materiału genetycznego.

Zjawisko RNAi uaktywnia się w momencie wprowadzenia do komórki dwuniciowych cząsteczek kwasu rybonukleinowego. Cały mechanizm inicjuje enzym komórkowy należący do rodziny RNazy III. Enzym ten specyficznie tnie wprowadzoną do komórki, długą, dwuniciową cząsteczkę RNA (pochodzenia egzo- lub endogennego) na krótkie, długości rzędu 21–23 nukleotydów dsRNA (dsRNA, *double stranded RNA*). Powstałe krótkie oligonukleotydy, tak zwane siRNA (siRNA, *short interfering RNA*), posiadają po 2–3 niesparowane nukleotydy na każdym końcu 3' (tworzące tzw. lepkie końce), grupę fosforanową na końcach 5' oraz grupę hydroksylową na końcach 3'. Jedna z nici siRNA, antysensowna, posiada sekwencję nukleotydów komplementarną do sekwencji mRNA wybranego odcinka docelowego genu. Taka budowa powstałych krótkich, interferujących oligonukleotydów RNA (siRNA), jest niezbędna do prawidłowego przebiegu etapu „wykonawczego” całego procesu wyciszania ekspresji genów techniką RNAi.

Enzym katalizujący reakcję „cięcia” długiego „pierwotnego” dsRNA należy pod względem swojej budowy do III klasy enzymów RNazy III. Rodzina enzymów III klasy, nazwana DICER, jest ewolucyjnie konserwatywna i można ją znaleźć u wielu organizmów w świecie roślinnym oraz zwierzęcym. DICER składa się z N-końcowej domeny helikazowej, zależnej od ATP, domeny PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*), podwójnej domeny RNazy III i domeny przyłączającej dsRNA (dsRBD). Enzymy RNazy III działają jako dimery, stąd DICER dzięki posiadanym dwóm domenom RNazy III może katalizować jednorazowo przerwanie wiązań fosfodiesterowych kwasu nukleinowego w czterech miejscach, tworząc w ten sposób siRNA o typowej charakterystyce. Dotychczas odkryte enzymy RNazy III nie wymagały do swojego funkcjonowania energii czerpanej z hydrolizy ATP, może więc zastanawiać obecność domeny ATP-zależnej w strukturze DICER. Niemniej jednak domena helikazowa sugerować może konieczność chwilowego rozdzielania nici dsRNA tuż przed przecięciem dwuniciowego RNA, a tu obecność ATP jest czynnikiem niezbędnym do przeprowadzenia reakcji. Alternatywnie ATP może regulować przyłączenie się DICER do dsRNA lub modulować aktywność domeny katalitycznej. Nykänen i współpracownicy jednoznacznie wskazują na udział energii pochodzącej z rozpadu ATP w procesie generowania krótkich siRNA.

Różnice w długościach powstających w małych interferujących RNA (21–25 nukleotydów) u różnych organizmów mogą wynikać z typowych dla danego gatunku zmian w domenach katalitycznych enzymu DICER. W przypadku ludzkich komórek, niestety, nie jest możliwe zainicjowanie zjawiska RNAi przez wprowadzenie do środowiska wewnątrzkomórkowego długołańcuchowego dsRNA. Przeszkodą jest tu indukcja niespecyficznego odpowiedzi interferonowej. Odpowiedź interferonowa jest mechanizmem obronnym komórek, uruchamianym między innymi podczas infekcji wirusowych. W odpowiedzi interferonowej wprowadzony obcy materiał genetyczny aktywuje kinazę białkową zależną od dsRNA (PKR, *dsRNA-dependent Protein Kinase*) oraz 2',5'-oligoA syntetazę (2',5'-AS).

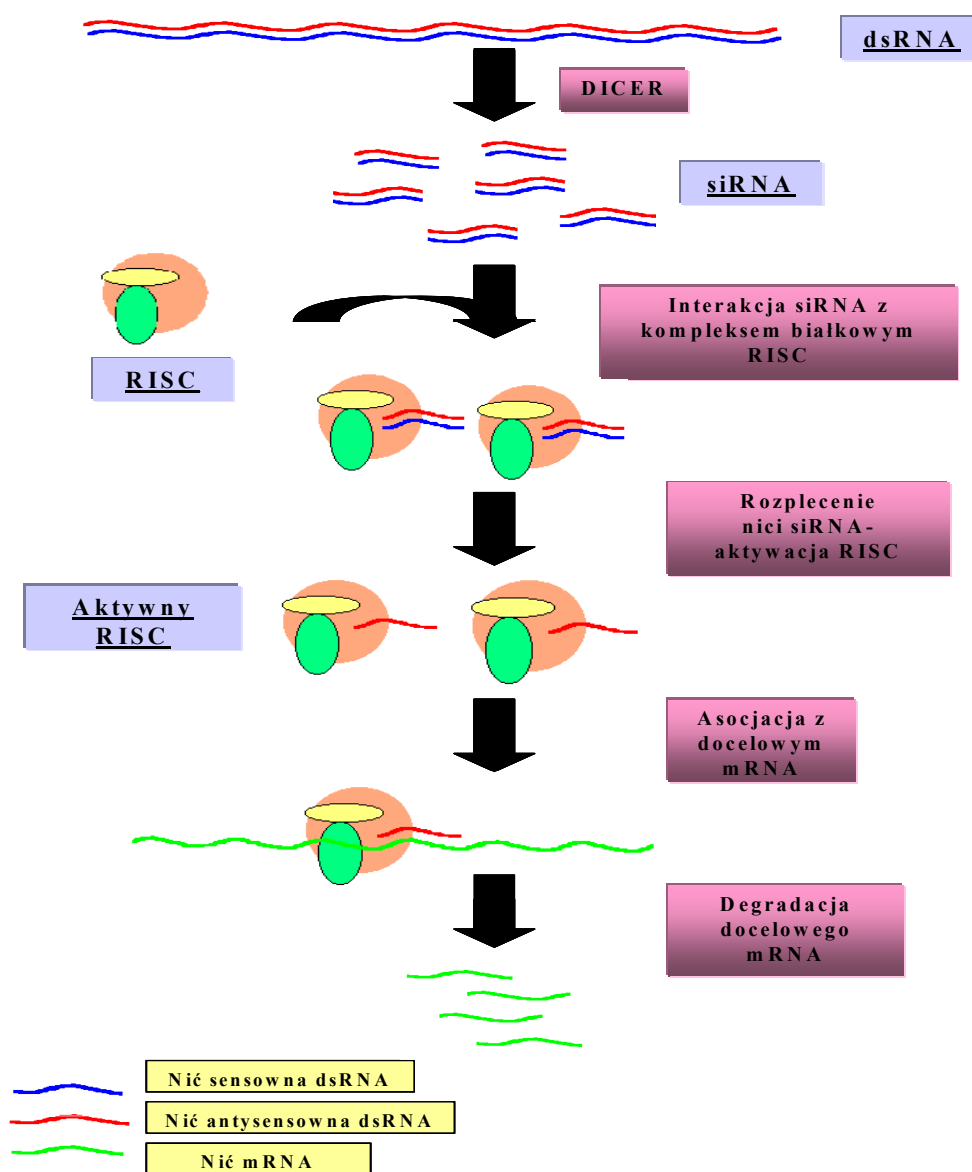
Aktywna forma PKR powoduje zahamowanie translacji poprzez fosforylację malej podjednostki eukariotycznego czynnika inicjacji translacji eIF2 α , a zaaktywowana 2',5'-AS katalizuje proces degradacji mRNA za pośrednictwem rybonukleazy L. Zainicjowana inhibicja ekspresji genów ma charakter niespecyficzny i nie zależy od sekwencji wprowadzonego długoniciowego dsRNA, natomiast częstym jej następstwem jest szybka śmierć komórki (zarówno w wyniku apoptozy, jak i rezultacie procesów nieapoptotycznych). Ścieżka interferonowa nie została stwierdzona w nieodróżnionych komórkach embrionalnych, jak też w komórkach nowotworowych wywodzących się z komórek embrionalnych. Ta ostatnia informacja jest wysoce istotna dla uczonych zajmujących się problemem nowotworów wywodzących się z tego typu komórek. Kittler i Buchholz w swoich badaniach stwierdzili, że minimalna długość dsRNA, która indukuje śmierć komórki w następstwie odpowiedzi interferonowej dla komórek ssaków wynosi 30 par zasad. Przeszkodę niespecyficznego odpowiedzi interferonowej ostatecznie pokonano, wprowadzając do komórek gotowe, laboratoryjnie syntetyzowane 21–22 nukleotydowe siRNA.

Etap wykonawczy – efektorowy interferencji RNA, obejmujący degradację mRNA, zachodzi w cytoplazmie, w przeciwieństwie do etapu inicjującego, który może mieć miejsce w jądrze komórkowym. Hipotezę o przebiegu etapu efektorowego w cytoplazmie zdają się potwierdzać badania z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych wprowadzonych do siRNA, które wykazały, że w 48 godzin po transfekcji oligonukleotydy znajdowały się w pobliżu błony jądrowej po stronie cytoplazmy. Istnieją założenia, że siRNAs znajdują się w cytoplazmie w pobliżu porów błony jądrowej i odgrywają rolę, tzw. „skanerów” transkryptów wydostających się z jądra komórkowego, dzięki czemu mogą kontrolować większość mRNA wchodzących do cytoplazmy.

Powstałe siRNAs przyłączają się do wielobiałkowego kompleksu enzymatycznego, określanego jako RISC (*RISC, RNA – induced silencing complex*), który następnie ulega aktywacji. Przejście RISC ze stanu latencji do stanu aktywnego odbywa się poprzez rozdział nici kwasów nukleinowych siRNA. Jednoniciowe siRNAs przyłączone do RISC występują w roli przewodnika i naprowadzają kompleks na homologiczny mRNA. Nie wiadomo dokładnie, jaki enzym jest odpowiedzialny za proces rozdziału nici siRNA, podejrzewa się tu udział helikazy. Proces rozdziału nici RNA zależy od energii dostarczonej z hydrolizy ATP. Należy podkreślić, iż rozpoznawanie sekwencji docelowej mRNA przez naprowadzającą nić siRNA jest wysoce specyficzne, wystarczy niezgodność 1–2 nukleotydów pomiędzy mRNA a jednoniciowym RNA naprowadzającym, by zapobiec dopasowaniu się RISC do danego fragmentu mRNA i tym samym uniemożliwić jego degradację. Uważa się, że antysensowna nić siRNA naprowadza kompleks enzymatyczny na docelowy tran-

skrypt, stąd w przypadku nici sensownej siRNA 2 lub 3 niesparowane nukleotydy na końcu 3' nie muszą być komplementarne do degradowanego mRNA.

Po znalezieniu komplementarnej sekwencji docelowej następuje hybrydyzacja RISC do mRNA i kompleks enzymatyczny przecina hybrydę: siRNA/mRNA w miejscu znajdującym się w środku (w odległości około 10–12 nukleotydów od końca 3') rozpoznanej 21-nukleotydowej sekwencji. Enzym odpowiedzialny za przecięcie obu nici nie został dokładnie poznany, wiadomo jednak, że musi on posiadać właściwości endonukleazy. Etapy mechanizmu RNAi można ująć następująco: najpierw dsRNA jest przecinany sekwencyjnie, w odstępach około 21 nukleotydów od strony obu końców dsRNA, a następnie docelowy mRNA ulega przecięciu z tą samą częstotliwością, ale w miejscu nacięcia przesuniętym o około 10 nukleotydów. Mechanizm RNAi został schematycznie przedstawiony na rycinie 16.



Ryc. 16. Schemat mechanizmu wyciszania genu oparty na zjawisku interferencji RNA.

Bardzo istotnym „fenomenem” zjawiska RNAi jest możliwość jego rozprzestrzeniania się na komórki sąsiednie i potomne. Mechanizm tego procesu sugeruje jednoznacznie konieczność obecności w komórce enzymu amplifikującego efekt wyciszania. Podejrzewa się, że rolę tę pełni polimeraza RNA zależna od RNA. W czasie podziału komórek siRNA jest zlokalizowane dokładnie w centralnym regionie komórki, co sugeruje, że jest przekazywany obu komórkom potomnym. Niestety, w przypadku ssaków efekty wywołane RNAi mają charakter przejściowy, a okres jego utrzymywania się zależy od liczby wprowadzonych do komórek cząstek siRNA oraz częstości podziału komórek. Okres utrzymywania się efektu RNAi w komórkach ssaków jest równy pięciu czasom podwojenia liczby komórek (*five doubling times*). Wskazuje to raczej na brak obecności mechanizmu amplifikującego w komórkach ssaków. Potwierdzenie takiej hipotezy może być to, że za ledwie kilka molekuł potrzeba do indukcji RNAi w *Caenorhabditis elegans*, podczas gdy w ludzkich komórkach potrzebna jest znacznie większa liczba wprowadzonego siRNA do uzyskania tego samego efektu wyciszenia.

Mechanizm RNAi jest uznawany za jeden ze składowych mechanizmów ogółu procesów potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów (PTGS, *post-transcriptional gene silencing*). W potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, oprócz siRNA, biorą udział również inne cząstki kwasu rybonukleinowego. Przykładem mogą być miRNA (miRNA, *microRNA*) – krótkie cząsteczki RNA o długości około 22 nukleotydów, które podobnie jak siRNA, są ewolucyjnie konserwatywne i występują w świecie roślin i zwierząt. Cząsteczki miRNA w odróżnieniu od siRNA są jednoniciowe. Inhibicja ekspresji genu przy udziale miRNA odbywa się prawdopodobnie poprzez tworzenie hybryd miRNA/mRNA, co uniemożliwia prawidłowy przebieg procesu translacji docelowych transkryptów. W tym przypadku nie obserwuje się degradacji mRNA, parametry, takie jak stabilność mRNA, poziom poliadenylacji czy inicjacja translacji pozostają niezmiennione. Zarówno siRNA, jak i miRNA powstają w komórce na skutek działania enzymu DICER na terenie cytoplazmy. Szlak powstawania miRNA jest jednak charakterystyczny: prekursor miRNA (pri-miRNA oraz pre-miRNA) dojrzewają na terenie jądra komórkowego, następnie pre-miRNA przedostają się do cytoplazmy, przyjmując strukturę przestrzenną typu „spinki do włosów” (*hairpin*). W cytoplazmie nukleaza DICER przecina je, produkując cząstki miRNA.

Jak wcześniej wspomniano, w przypadku komórek ludzkich, w celu wyciszenia genu za pomocą RNAi konieczne jest wprowadzenie do komórek gotowych oligonukleotydów w formie siRNA. Wymaga to wcześniejszego zaprojektowania przez badacza odpowiednich sekwencji siRNA. Dobór i kryteria, jakimi należy się kierować projektując siRNA opisano w kolejnym rozdziale. Przede wszystkim należy precyzyjnie dobrać sekwencję docelową z uwzględnieniem struktury drugorzędowej docelowego mRNA i wykluczeniem obecności w genomie komórki drugiej identycznej sekwencji nukleotydów. Laboratoryjna synteza cząstek siRNA jest metodą kosztowną, tym bardziej, że często konieczne jest kilkakrotne projektowanie oligonukleotydów dla jednego docelowego transkryptu. Alternatywną i niewątpliwie tańszą metodą jest enzymatyczny proces preparowania cząstek siRNA poprzez kontrolowaną inkubację w warunkach *in vitro* długoniciowego dsRNA z oczyszczoną RNazą III, wyizolowaną z *Escherichia coli* lub też z oczyszczoną formą enzymu DICER. Powstałe w wyniku inkubacji produkty, określane często mianem esiRNA (esiRNA, *endoribonuclease – prepared short interfering RNA*) są mieszaniną cząsteczek RNA przyłączających się w wielu miejscach docelowego fragmentu mRNA, co znacznie zwięk-

sza szansę powodzenia eksperymentu. Inną metodą pozwalającą na otrzymanie względnie trwałej ekspresji, a tym samym wysokiej produkcji siRNA w komórce, jest projektowanie odpowiednich plazmidowych lub wirusowych wektorów ekspresyjnych. Wektory te są zbudowane z DNA i zawierają wbudowane sekwencje oligoDNA odpowiadające sekwencjom obu nici siRNA. Poszczególne sekwencje oligoDNA znajdują się pod kontrolą określonych, odrębnych promotorów, dzięki czemu ekspresja obu nici siRNA może przebiegać niezależnie. Bardziej wydajna i korzystna okazała się tutaj ekspresja siRNA pod postacią struktury „krótkiej spinki do włosów” (shRNA, *short hairpin RNA*). Gdy shRNA ulegnie ekspresji w komórce, jest rozpoznawana przez DICER i pocięta w celu otrzymania funkcjonalnego siRNA. Zaletą shRNA jest to, iż w czasie generowania wektora DNA niezbędny jest tylko jeden etap ligacji, czyli włączania sekwencji DNA odpowiadającej sekwencji shRNA, do struktury wektora.

Wektory wirusowe (zbudowane na bazie retrowirusów czy lentiwirusów), mając zdolność infekowania komórek dzielących się i nieulegających podziałom niewątpliwie zwiększają pulę komórek docelowych, w których można inicjować zjawisko stałej interferencji RNA kierowanej ekspresją wektora molekularnego. Wektory lentiwirusowe mogą uczestniczyć w inicjacji procesu RNAi w komórkach macierzystych i w transgenicznym modelach zwierząt. Wektory adenowirusowe są również stosowane jako nośniki dla odpowiednich cząsteczek. Z wektorami wirusowymi i plazmidowymi wiąże się duże nadzieje na wzrost specyficzności terapii względem komórek docelowych, gdyż wybór odpowiedniego, tkankowo-specyficznego promotora umożliwi ekspresję wektora tylko w wybranych komórkach.

Istotną rolę w wydajności RNAi ma również dobór metody transferu do wybranych komórek siRNAs lub wektorów kodujących siRNA. Obecnie najczęstszą metodą transfekcji jest metoda chemiczna z udziałem czynników lipofilowych. Alternatywną techniką wprowadzania siRNA do komórek jest elektroporacja, jednakże ze względu na wysoką śmiertelność transfekowanych komórek stosuje się ją rzadziej.

RNA interference jest narzędziem o wielu możliwościach, dzięki czemu znajduje szerokie zastosowanie w nauce i medycynie. Odkrycie RNAi umożliwiło tzw. funkcjonalną analizę genomu wielu organizmów, a także lepsze poznanie funkcji niektórych genów w komórkach bakteryjnych czy roślinnych. Opierając się na technice RNAi bada się funkcje genów biorących udział w procesie transformacji nowotworowej komórek. Są wśród nich geny kodujące białka uczestniczące w procesie apoptozy, w regulacji cyklu komórkowego, transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego, czy wreszcie geny kodujące białka supresorowe. RNAi rozpatrywany jest jako metoda przydatna do poszukiwania specyficznych terapeutyków. Wiele współczesnych laboratoriów posługuje się wykorzystaniem RNAi w kontroli przebiegu infekcji wirusowej. Wykazano zdolność RNAi do inhibicji infekcji wirusem HIV, polio oraz wirusami zapalenia wątroby typu B i C. RNAi daje również szansę na leczenie wielu chorób związanych z zaburzeniami genetycznymi i neurodegeneracyjnymi.

Odkrycie naturalnego mechanizmu regulatorowego, jakim jest interferencja RNA, oraz jego kierunkowe wykorzystanie stworzyło wiele możliwości terapeutycznych, których dalszy rozwój będzie znajdował swoje odzwierciedlenie w doniesieniach naukowych, badaniach przedklinicznych i klinicznych, dając ostatecznie szansę na szybki postęp w naukach przyrodniczych i medycznych, w tzw. *Life Sciences*.

PIŚMIENNICTWO

- [1] *Allshire R.*: Molecular biology. RNAi and heterochromatin a hushed-up affair. *Science* 2002; 297 (5588): 1818–1819. – [2] *Aravin A.A., Naumova N.M., Tulin A.V.* et al.: Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr. Biol.* 2001; 11 (13): 1017–1027. – [3] *Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M.* et al.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363–366. – [4] *Buchholz F.*: RNA – Interference i Mammalian Cells. *Euro. Biotech. News.* 2005; 4: 39–42. – [5] *Caplen N.J., Parrish S., Imani F.* et al.: Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9742–9747. – [6] *Dudley N.R., Labbe J.C., Goldstein B.*: Using RNA interference to identify genes required for RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 4191–4196. – [7] *Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W.* et al.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494–498. – [8] *Fire A., Xu S., Montgomery M.K.* et al.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806–811. – [9] *Grosshans H., Slack F.J.*: Micro-RNAs: small is plentiful. *J. Cell. Biol.* 2002; 156 (1): 17–21. –
- [10] *Kawasaki H., Suyama E., Iyo M.* et al.: siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic. Acid. Res.* 2003; 31 (3): 981–987. – [11] *Kiermer V., Rusk N.*: Focus on RNA interference. *Nature Methods* 2006; (3) 9: 669–719. – [12] *Kim V.N.*: RNA interference in Functional Genomics and Medicine. *J. Korean. Med. Sci.* 2003; 18: 309–318. – [13] *Kiss T.*: Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J* 2001; 20 (14): 3617–3622. – [14] *Kittler R., Buchholz F.*: RNA interference: gene silencing in the fast lane. *Semin. Cancer. Biol.* 2003; 13: 259–265. – [15] *Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J.* et al.: Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000; 19: 5194–5201. – [16] *Nykänen A., Haley B., Zamore P.D.*: ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell* 2001; 107 (3): 309–321. – [17] *Waterhouse P.M., Wang M.B., Lough T.*: Gene silencing as an adaptive defense against viruses, *Nature* 2001; 411: 834–842. – [18] *Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A.* et al.: RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA an 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* 2000; 101: 25–33.

VII. Zasady projektowania cząsteczek RNAi oraz tworzenie sekwencji typu *consensus*

Grzegorz Machnik, Ilona Bednarek

Zjawisko interferencji RNA (*RNA interference, RNAi*) jest jednym z mechanizmów postranskrypcyjnego wyciszania genów (*PTGS – Post Transcriptional Gene Silencing*). Interferencja RNA polega na tym, że dwuniciowe cząsteczki RNA (*dsRNA*) wywołują efekt wyciszenia tych genów, które są ściśle homologiczne w stosunku do obu nici *dsRNA*. Zasadniczą cechą *RNAi* jest wysoka specyficzność, co predysponuje ten proces do zastosowania go w modulacji ekspresji genów.

Możliwe jest bezpośrednie wprowadzenie do komórek krótkich syntetycznych cząsteczek *siRNA*, komplementarnych do sekwencji wyciszanego genu, co ułatwia uzyskanie skutecznej inhibicji ekspresji genu bez wywoływania reakcji ze strony układu odpornościowego. Obecnie technika *RNAi* jest powszechnie wykorzystywana w badaniach, a dzięki swojej wysokiej specyficzności działania stanowi bardzo użyteczne narzędzie do analiz funkcji wybranych genów. Od chwili odkrycia mechanizmu *RNAi* wprowadzono wiele udoskonaleń, m.in. wspomniane już bezpośrednie wprowadzanie do komórek syntetyzowanych w warunkach laboratoryjnych *siRNA*. Alternatywnie, krótkie *siRNA* mogą powstawać bezpośrednio w komórkach jako produkt ekspresji wektora pozostającego pod odpowiednim promotorem, głównie promotorem genu kodującego eukariotyczną polimerazę III RNA. Takie rozwiązanie (synteza *siRNA* bezpośrednio w komórkach) znacznie przedłuża czas trwania inhibicji wywołanej obecnością aktywnych cząsteczek interferujących RNA. Wprowadzenie do komórek gotowych syntetycznych *siRNA*, choć jest prostsze technicznie, umożliwia skuteczne działanie, czyli skuteczne wyciszenie ekspresji wybranego genu, tylko przez 7–10 dni, tj. tylko przez kilka kolejnych podziałów komórkowych, po których *siRNA* ulegają nierównomiernemu rozdzieleniu między nowo powstające komórki. Wprowadzenie do komórek wektorów, które stanowią maszynię stabilnie produkującą w komórce interferencyjne molekuly RNA, potencjalnie jest lepszym – skuteczniejszym narzędziem w wyciszaniu ekspresji wybranych genów. Niezależnie od wprowadzanych modyfikacji, krytycznym punktem mechanizmu jest właściwe zaprojektowanie cząsteczek *siRNA*, których zadaniem jest rozpoznanie docelowej sekwencji mRNA w komórce. Projektując sekwencje *siRNA*, komplementarne do badanego genu, należy brać pod uwagę wiele wskazówek, które zostały opublikowane na podstawie dotychczasowych doświadczeń w tej dziedzinie. Uważa się jednak, że mimo stosowania przedstawionych reguł, siła inhibicji uzyskanej w doświadczeniu jest niejednokrotnie dziełem przypadku. Sugeruje to konieczność dokładniejszego poznania istoty mechanizmu *RNAi*, by móc precyzyjnie dobrać optymalny fragment mRNA. Zanim to jednak nastąpi, zaleca się zawsze projektowanie kilku różnych *siRNA* dla każdego z badanych genów. Poniżej przedstawiono warunki, jakie należy wziąć pod uwagę przy wyborze optymalnych *siRNA*.

Należy poszukiwać miejsc docelowych dla siRNA w obrębie sekwencji kodujących genu (*cds: coding sequences*); docelowy region powinien znajdować się ok. 50–100 nukleotydów poniżej kodonu START dla danego genu (*downstream*).

Uważa się, że regiony w pobliżu kodonu startowego są na ogół mniej efektywne przy wyciszaniu ekspresji. Ma to prawdopodobnie związek ze znajdującymi się tam miejscami przyłączania białek regulatorowych. Białka te mogą blokować dostęp kompleksu RISC do mRNA.

Alternatywnie – można dokonać wyboru docelowej sekwencji w regionie 3' nieulegającym translacji (3'UTR: *untranslated region*) w badanym genie.

W docelowym miejscu należy poszukiwać regionu o długości 23 nukleotydów, o sekwencji zapisanej w postaci schemtu: 5'-AA(N19)TT, gdzie N oznacza dowolny nukleotyd. Wybrany region powinien zawierać najlepiej około 50% par GC, (choć w badaniach funkcjonowały też siRNA o zawartości par GC rzędu 30–70%). Należy unikać sekwencji szczególnie bogatych w guaninę, ponieważ mają one wówczas tendencję do tworzenia niekorzystnych struktur wyższego rzędu. Jeżeli nie można odnaleźć fragmentu 5'-AA(N19)TT, należy odszukać motyw 5'-AA(N21) lub 5'-NA(N21).

Po wybraniu motywu w docelowej sekwencji genu należy na tej podstawie syntetyzować cząsteczki siRNA o sekwencjach:

- a) sensowne siRNA: 5'-(N19)TT;
- b) antysensowne siRNA: 5'-(N'19)TT, gdzie N'19 oznacza sekwencję odwróconą i komplementarną w stosunku do N19. T oznacza 2'-dezoksytymidynę. Przykładowe sekwencje siRNA przedstawiono na rycinie 17.

W przypadku użycia wektora ekspresyjnego w celu syntezy siRNA bezpośrednio w komórkach, obowiązują dodatkowe reguły wyboru sekwencji docelowych i projektowania cząsteczek siRNA. Zależą one również od użytego systemu ekspresji (wektora), a szczegółowe wskazówki są wówczas podane przez producenta.

Ostatnim etapem projektowania jest porównanie sekwencji siRNA z danymi zawartymi w bazach danych. Ma to na celu wykluczenie możliwości hybrydyzacji siRNA w innych miejscach genomu, czyli uniemożliwienie niespecyficznego wyciszania ekspresji genów. Należy szczególnie prześledzić bazę danych sekwencji ulegających ekspresji (*EST*) oraz mRNA dla badanego organizmu.

Obecnie, poza możliwością samodzielnego zaprojektowania sekwencji siRNA zgodnie ze wskazówkami zamieszczonymi w niniejszym rozdziale oraz publikowanymi w wielu pracach badawczych, istnieje możliwość użycia specjalnie do tego celu przygotowanych programów komputerowych, opracowujących sekwencje siRNA na podstawie odpowiednio dopracowanych algorytmów. Ogólnodostępnych jest wiele stron internetowych, które pozwalają na optymalne zaprojektowanie siRNA, a jedynym wymogiem jest podanie sekwencji genu, który ma ulec wyciszeniu. Spośród dostępnych rozwiązań, zdaniem autorów niniejszego podręcznika, godnym polecenia jest program SIRNA, będący częścią pakietu EMBOSS – darmowego oprogramowania udostępnianego przez wiele instytucji, również w formie strony internetowej. Odnośniki do tych stron dostępne są pod adresem: <http://emboss.sourceforge.net/servers/#portals/>

```

region docelowy (cDNA): 5' AACTGGACTTCCAGAAGAACATC
siRNA sensowny:          5' CUGGACUCCAGAAGAACA dTdT
siRNA antysensowny:     5' UGUUCUUCUGGAAGUCCAG dTdT

```

```

siRNA sensowny:          5'      CUGGACUCCAGAAGAACA dTdT 3'
                          ::::::::::::::::::::
siRNA antysensowny:     3' dTdTGACCUGAAGGUCUUCUUGU 5'

```

Ryc. 17. Fragment sekwencji genu laminyA/C oraz sekwencje siRNA dobrane w celu wyciszenia jego ekspresji; dTdT oznacza dwie cząsteczki 2'-dezoksytymidyny na końcach 3' każdej z nici; na podstawie El-bashir i wsp. 2001.

Projektowanie sekwencji konsensusowych

Niejednokrotnie zdarza się, że dla określonego genu, który ma być poddany modyfikacjom genetycznym lub na przykład ma zostać wyciszony na drodze interferencji RNA, istnieje w molekularnej bazie danych wiele różniących się między sobą publikowanych wariantów sekwencji. Szczególny przypadek stanowią sekwencje kodujące białka wirusów, zwłaszcza białka antygenów powierzchniowych, które ze względu na dużą zmienność genetyczną mogą znacząco różnić się od siebie. Ponieważ podstawowym warunkiem skutecznego działania RNAi jest 100% zgodności pomiędzy siRNA a sekwencją genu, należy w ten sposób dobrać docelowy region, aby był on identyczny, stały we wszystkich znanych, opublikowanych wariantach analizowanego genu. W tym celu zaleca się przeanalizowanie genetycznych baz danych i wybranie za pomocą odpowiednich programów komputerowych tzw. sekwencji konsensusowych danego genu, czyli wybranie odcinków stałych, identycznych dla poszczególnych wariantów genu. Możliwe jest skorzystanie z powszechnie znanego programu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), stanowiącego element ogólnodostępnej bazy danych GenBank. Opcjonalnie również skorzystać można ze wspomnianego wcześniej pakietu oprogramowania EMBOSS i wykorzystać jeden z załączonych tam programów do porównywania sekwencji nukleotydowych (np. WATER, NEEDLE, MATCHER, STRETCHER itp.). Programy te umożliwiają porównanie między sobą dwóch dowolnych sekwencji nukleotydowych i wybranie fragmentów wspólnych, identycznych, w obrębie których można rozpocząć projektowanie miejsc docelowych dla siRNA. Kolejny program EMMA, (z wymienionego pakietu EMBOSS), pozwala porównać jednocześnie wiele sekwencji. Na rycinie 18 odwzorowano przykład odnalezienia sekwencji konsensusowej dla różnych wariantów genu *pol* genomu endogennych retrowirusów świni (*PERV: Porcine Endogenous Retrovirus*).

	SEKWENCJA KONSENSUSOWA			SEKWENCJA ZMIENNA		
	490	500	510	520	530	540
Consensus	GTTTGGCAAAGCAAGTTCCCCCACAGGTTATTCAACTGAAGGCCAGTGCTACACCAGTnT					
AF038599	A.....	C.....	G.....
polAF038600	A.....	C.....	G.....
AY570980	A.....	C.....	G.....
A66552	A.....
A66553	A.....
PERY17013	A.....
AF038601	A.....
PEN279057	G.....	A.....
AY056035	A.....
PEN293657	A.....
PEN133818	A.....
PEN133816	A.....
PEN133817	A.....
AX052635	A.....	C.....	G.....
AX052634	A.....	C.....	G.....
PEN293656	G.....	G.....
PEN279056	A.....	G.....	G.....
AF435967	T.....	C.....	CTG.....GC
AF435966	G.....	G.....

Ryc. 18. Porównanie różnych wariantów genu i wybór sekwencji konsensusowej. Na górze przedstawiono dopracowaną sekwencję stałą dla znanych izolatów wirusa kolejno wymienionych od AF038599 do AF435966. Kropkami zaznaczono nukleotydy identyczne z sekwencją *consensus*. Nukleotydy zmienne w poszczególnych pozycjach genu dla odpowiednich izolatów zaznaczono literami typu: A, G, T, C, zgodnie z jednoliterowym kodem zasad azotowych w nukleotydach.

PIŚMIENNICTWO

[1] *Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W.* et al.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001, 411: 494–498. – [2] *Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T.*: RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001, 15: 188–200. – [3] *Hannon G.J.*: RNA interference. *Nature* 2002, 418: 244–251. – [4] *Rice P., Longden I., Bleasby A.*: EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 2000, 16(6): 276–277. – [5] *Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R.* et al.: Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 1999, 13: 3191–3197.

VIII. Ilościowa ocena aktywności transkrypcyjnej genów i ich kopijności oparta na technice Real Time™ PCR

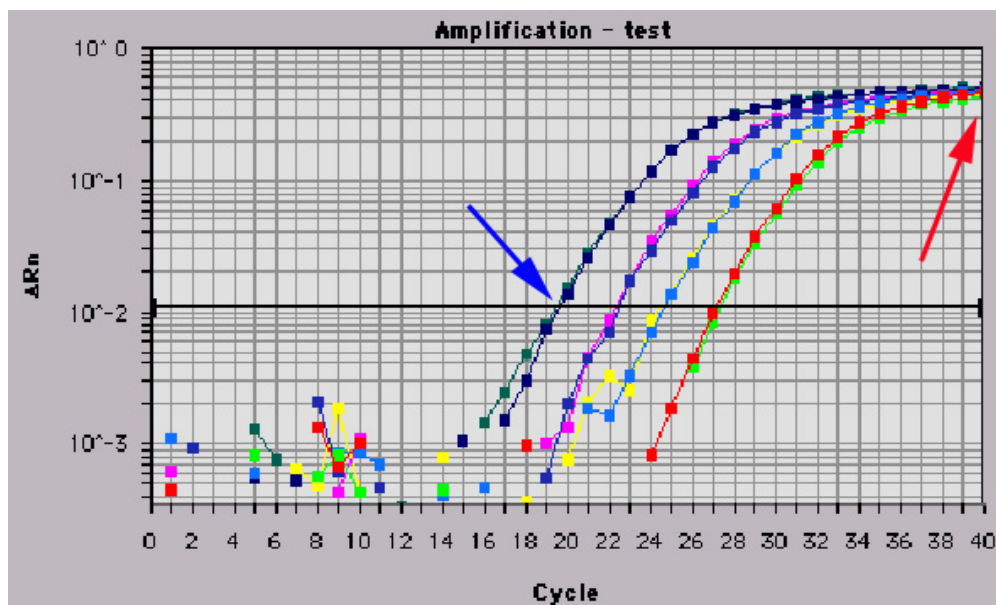
Grzegorz Machnik, Ilona Bednarek

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (*Real Time™* lub *Quantitative PCR*, w skrócie QPCR) jest metodą, która pozwala na ilościową ocenę ekspresji genów. Technikę QPCR można wykorzystać m.in. do potwierdzenia wyników analiz mikromacierzy oligonukleotydowych, wstępnie wskazujących na zróżnicowaną ekspresję różnych genów w danej jednostce chorobowej. Poza laboratoriami badawczymi, reakcję ilościową QPCR stosuje się w analityce. Tutaj pozwala ona określić w próbkach klinicznych liczbę analizowanych cząsteczek DNA (lub RNA), np. liczbę cząsteczek wirusa. W ten sposób można monitorować terapię, określając jej efektywność, i to zarówno w odniesieniu do terapii chorób zakaźnych, jak i chorób genetycznie uwarunkowanych, czy wreszcie chorób nowotworowych. Do wykonania ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy niezbędne jest zastosowanie amplifikatora (termocyklera) z wbudowanym systemem odczytu fluorescencji. Tego typu urządzenie nie tylko przeprowadza reakcję PCR (jak konwencjonalny amplifikator), lecz także prowadzi jednocześnie odczyt przyrastającej fluorescencji po każdym kolejnym cyklu PCR. Fluorescencyjnie znakowane są startery reakcji – primery oraz sondy stosowane w pierwotnej wersji Real Time PCR™. Fluorescencja pochodzić może również z odpowiednich znaczników fluorescencyjnych, np. SYBR Green, wbudowujących się w syntetyzowane cząsteczki produktów PCR.

Podstawową zasadą ilościowej oceny ekspresji genów jest założenie, że im większa jest wyjściowa liczba cząsteczek badanego DNA w mieszaninie reakcyjnej, tym mniejsza liczba cykli reakcji PCR jest niezbędna do uzyskania określonej ilości amplifikowanego produktu.

Wyjściowa ilość badanej matrycy może być wyrażona jako ułamkowy numer cyklu (C_T), niezbędny do osiągnięcia poziomu amplifikacji aktualnego dla badanego momentu. Inaczej mówiąc, wartość C_T dla danej próbki jest numerem cyklu, w którym siła fluorescencji przekracza poziom tła. Na rycinie 19 niebieska strzałka wskazuje punkt C_T dla próbki oznaczonej kolorem granatowym (z osi OX na rysunku wynika, że C_T wynosi ok. 20). Wykreślenie zależności C_T od logarytmu dziesiętnego wyjściowej, znanej liczby kopii DNA w szeregu próbek, daje linię prostą – krzywą standardową. W związku z tym – określenie wyjściowej liczby kopii genu w badanej próbce polega na naniesieniu uzyskanego wyniku (C_T dla badanej próbki) na krzywą standardową i odczytaniu odpowiadającej mu wyjściowej liczby kopii DNA. W reakcji PCR w czasie rzeczywistym pomiar liczby cząsteczek DNA następuje w fazie logarytmicznej PCR. Ma to duże znaczenie, ponieważ na tym etapie przebieg reakcji nie jest limitowany przez żaden ze składników mieszaniny reakcyjnej, stąd niewielkie wahania w ilości reagentów (na skutek np. niedokładności w pipetowaniu) nie mają znaczącego wpływu na czułość i powtarzalność wyniku – w przeciwieństwie do metod, których podstawą jest pomiar końcowej ilości produktu PCR. Rycina 19 obrazuje istotę pomiaru fluorescencji w fazie logarytmicznej PCR. Należy

zwrócić uwagę, że pomiar ilości produktu na końcu reakcji (prawa strona rysunku, oznaczone czerwoną strzałką) dalby zupełnie odmienne wyniki, wykazujące jednakową ilość produktu.



Ryc. 19. Wynik analizy reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym przeprowadzonej z użyciem detektora sekwencji ABI-PRISM 7700 (Perkin Elmer). Objasnienia w tekście.

Jak wynika z powyższych rozważań, aby móc wykreślić krzywą standardową, w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, oprócz badanych próbek należy użyć także tzw. standardów (czyli wzorców), tj. próbek zawierających znaną, ściśle określoną liczbę kopii DNA. Takie postępowanie, poza oszacowaniem wyjściowej zawartości matrycy, umożliwia dodatkowo kontrolę przebiegu procesu i wykluczenie tzw. próbek fałszywie ujemnych, tj. takich, w których brak produktu wynika z nieprawidłowego przebiegu amplifikacji, a nie z braku badanego DNA w próbce. Dodatkowo, użycie wzorców pozwala na wyeliminowanie różnic między próbkami wynikających z niedokładności pipetowania. Wyróżnia się dwa zasadnicze typy standardów:

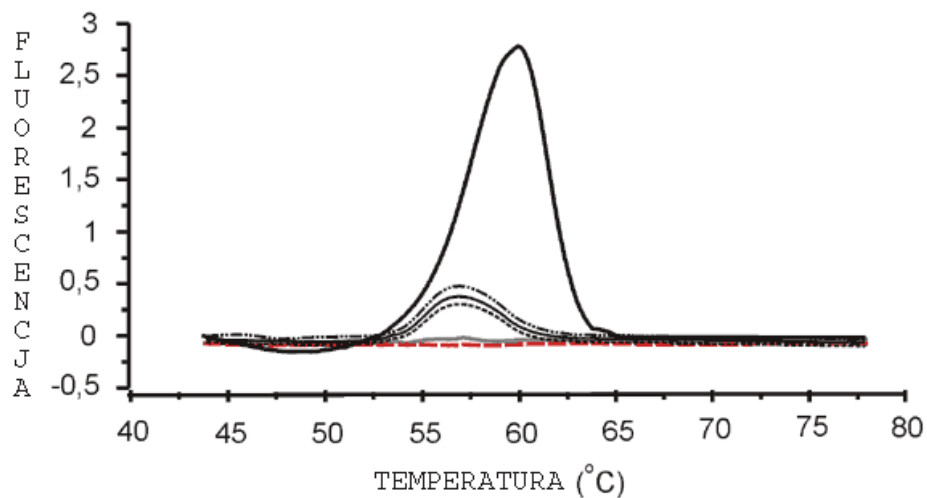
Standardy wewnętrzne – są to: sekwencje kontrolne (zazwyczaj stosuje się geny metabolizmu podstawowego lub odpowiadające im mRNA), które są zawsze obecne wśród genów w badanym ekstrakcie DNA (lub RNA). Jednocześnie ta sama próbka zawiera sekwencję badanego genu. Zasada ilościowej oceny liczby kopii badanego genu polega na porównaniu ilości produktu amplifikacji genu wzorcowego z ilością produktu amplifikacji genu badanego. Wzorce wewnętrzne funkcjonują prawidłowo tylko wówczas, gdy spełnionych jest wiele warunków, m.in.: pomiar dokonywany jest w fazie logarymicznej PCR, sekwencja standardowa i badana są powielane z tą samą wydajnością oraz występują w badanej próbce w podobnej ilości. Podstawowym założeniem jest to, że geny metabolizmu podstawowego ulegają stałej ekspresji we wszystkich komórkach danego organizmu i mogą stanowić odniesienie do badanych genów. Niestety, amplifikowany produkt badanego genu różni się prawie zawsze od sekwencji standardu pod względem rozmiaru, kompozycji nukleotydów oraz liczby kopii DNA. Nie ma ponadto gwarancji, że geny metabolizmu podstawowego, używane jako wzorce, występują na niezmiennie sta-

lym poziomie we wszystkich badanych próbkach. Udowodniono, że poziom ekspresji tych genów może się różnić w poszczególnych tkankach oraz między liniami komórkowymi.

Standardy zewnętrzne, stanowią odmiennie rozwiązanie. Są to cząsteczki DNA lub RNA dodawane w znanej ilości do reakcji QPCR. Ponieważ zarówno standardy, jak i sekwencja docelowa są obecne w tej samej mieszaninie reakcyjnej i powielane przez te same startery, eliminowane są błędy dotyczące wzorców wewnętrznych. Ocena ilościowa jest dokonywana na podstawie pomiaru liczby produktów – wyniku amplifikacji sekwencji standardowej i badanego genu.

Technika QPCR opiera się na pomiarze fluorescencji, który odbywa się po każdym kolejnym cyklu reakcji QPCR. Oczywiście, taki pomiar ma sens tylko wówczas, gdy emisja barwnika fluorescencyjnego (fluorochromu) jest powiązana z powstającym produktem amplifikacji. Wykorzystuje się kilka rozwiązań pozwalających na dołączenie barwnika do powielanego fragmentu DNA. Najstarszym z nich, lecz nadal z powodzeniem i powszechnie stosowanym rozwiązaniem, są fluorochromy interkalujące dwuniciowe DNA. Przykładem jest stosowany do elektroforezy DNA bromek etydyny oraz barwnik SYBR Green I (*Molecular Probes*). Ich działanie polega na emisji fluorescencji po wnikięciu w dwuniciową cząsteczkę DNA (niezwiązany barwnik nie wykazuje emisji). Teoretycznie, wzrost fluorescencji wynika z powielanej w każdym cyklu liczby cząstek badanego genu. W QPCR powszechnie stosowany jest SYBR-Green I, ze względu na dogodną długość fal wzbudzenia i emisji (max wzb. 497 nm/max em. 520 nm) oraz wysoką czułość (80 pg ds DNA). Podstawową zaletą barwników interkalujących jest ich uniwersalność – mogą być stosowane w badaniach dowolnej sekwencji DNA. Niestety, obecność niespecyficznego produktu reakcji QPCR, lub/i dimerów starterów znacznie zawyża wynik analiz. Badanie jest więc wiarygodne tylko wówczas, gdy są optymalnie dobrane warunki PCR; szczególnie gdy powstaje wyłącznie właściwy produkt amplifikacji. Intensywność fluorescencji SYBR Green I zależy od długości dwuniciowego fragmentu DNA – ta sama liczba cząsteczek dłuższych amplimerów daje silniejszy sygnał niż krótszych, co oznacza, że do QPCR należy dobierać amplimery o podobnej długości. Z powyższych względów analiza z użyciem SYBR-Green I powinna podlegać dodatkowej kontroli. Jednym ze sposobów jest przeprowadzenie elektroforezy żelowej produktów QPCR i potwierdzenie obecności wyłącznie specyficznego produktu. Inną możliwością jest ustalenie przez termocykler tzw. krzywej topnienia dla danego produktu amplifikacji.

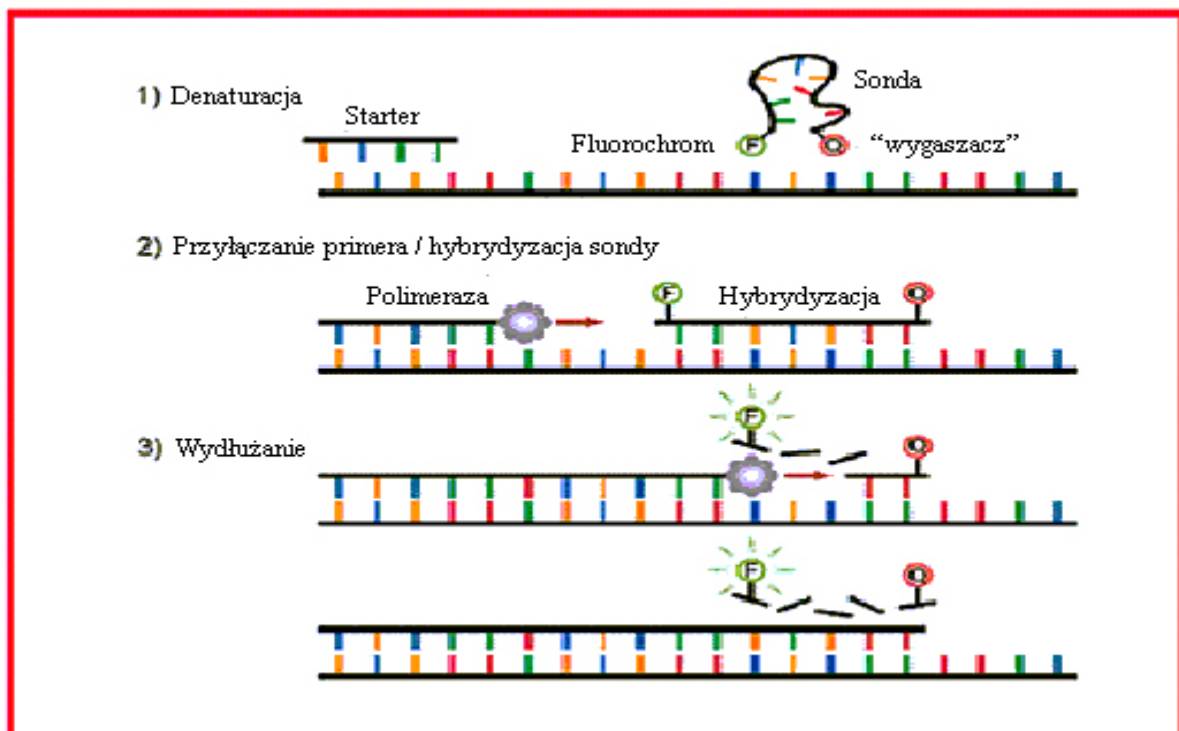
Zasada jest następująca: dwuniciowy produkt PCR o określonej długości i składzie zasad azotowych ulega dysocjacji na pojedyncze nici w ściśle określonej temperaturze (jest to tzw. temperatura topnienia, *melting temperature*). Jak wspomniano, SYBR-Green wykazuje fluorescencję wyłącznie po wnikięciu wewnątrz dwuniciowych cząsteczek DNA, tak więc dysocjacja DNA na pojedyncze nici skutkuje nagłym spadkiem fluorescencji przy osiągnięciu temperatury topnienia. Wykreślenie tej zależności (ściślej – pochodnej spadku fluorescencji, patrz *ryc. 20*) pokazuje, że określony amplimer wykazuje pojedynczy pik na wykresie, natomiast pojawienie się większej liczby pików świadczy o obecności produktów niespecyficznego i kwestionuje wiarygodność QPCR.



Ryc. 20. Wykres krzywej topnienia dla produktu QPCR. Zmodyfikowano wg Maekinen i wsp. 2001.

Inne rozwiązanie polega na dołączeniu barwnika fluorescencyjnego (fluorochromu) do sondy molekularnej – komplementarnej do badanego genu. Stosuje się kilka rodzajów sond molekularnych (sondy hydrolizujące typu TaqMan, sondy hybrydujące, sondy typu Molecular Beacon – tzw. molekularne latarnie, sondy typu Scorpion-primer), różniących się budową, mechanizmem emisji sygnału a co za tym idzie – specyficznością działania.

Mechanizm działania sondy hydrolizującej przedstawia rycina 21.



Ryc. 21. Emisja fluorescencji w reakcji ilościowej PCR z zastosowaniem znakowanych sond molekularnych. Zmodyfikowano wg TaKaRa Corp., Japonia.

Sonda molekularna hydrolizująca posiada na końcu 3' dołączony wygaszacz fluorescencji, na końcu 5' – barwnik. W tym stanie nie ma emisji fluorescencji. Podczas reakcji sonda hybryduje do docelowego fragmentu genu (pomiędzy miejscami hybrydyzacji dla obu starterów).

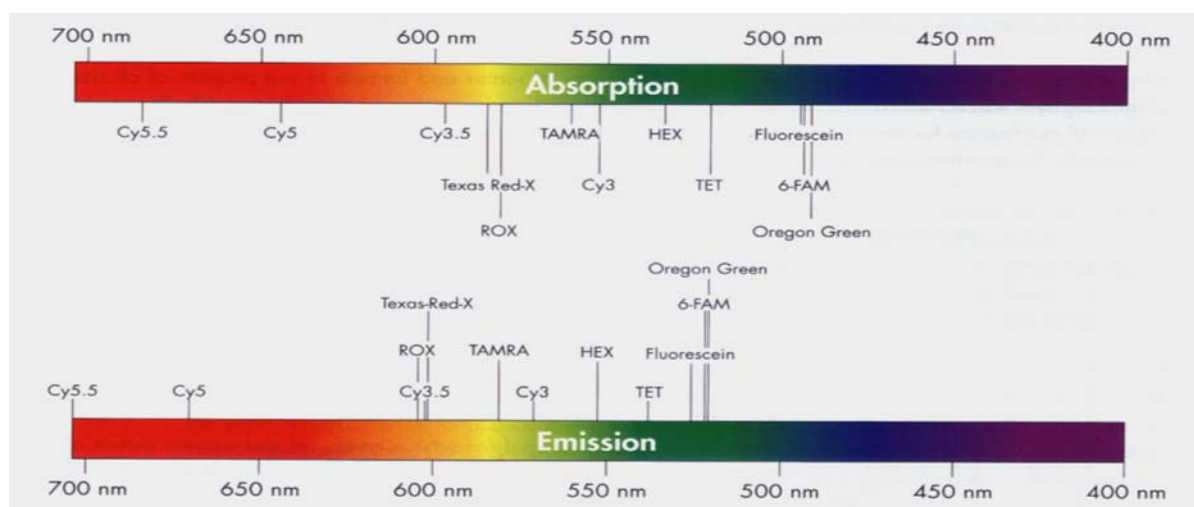
Powielanie genu przez polimerazę DNA prowadzi do hydrolizy napotkanej sondy, z której uwolniony zostaje wygaszacz oraz barwnik wykazujący obecnie fluorescencję – odczytywaną przez aparat. Dokładny opis pozostałych rodzajów sond stosowanych w QPCR można odnaleźć w specjalistycznych materiałach.

Nadrzędną przewagą sond molekularnych w stosunku do barwników jest ich specyficzność do analizowanej sekwencji, co eliminuje niebezpieczeństwo uzyskania zawyżonych wyników. Wadą jest konieczność doboru odpowiedniej sondy dla każdego analizowanego genu. Podstawowe wady i zalety obu systemów znakowania produktów w reakcji QPCR zestawiono w tabeli I.

Tabela I. Wady i zalety systemów znakowania produktów w reakcji QPCR

SYBR-GREEN	Sondy molekularne
<i>Zalety</i>	<i>Zalety</i>
Niższe koszty	Wysoka specyficzność
Łatwy do zastosowania	Brak fluorescencji przez inne produkty i/lub dimery starterów
Uniwersalny dla wszystkich potencjalnych sekwencji	Możliwość prowadzenia reakcji multipleksowej (za pomocą różnych fluorochromów)
Brak konieczności projektowania sondy molekularnej	
Nie działa inhibująco na PCR	
Ewentualne mutacje w DNA (zmiennosc genu) nie mają wpływu na czulość metody	
<i>Wady</i>	<i>Wady</i>
Nie można w 100% potwierdzić specyficzności	Sondy są specyficzne tylko dla danej sekwencji
Produkty niespecyficzne i/lub dimery starterów znacznie zawyżają wynik	Istnienie mutacji (zmiennosci genu) może wpływać na czulość metody
Sila fluorescencji zależy od dlugosci amplimeru	Koniecznosc projektowania sondy
Potencjalne dzialanie mutagenne	

Obecnie dostępnych komercyjnie jest wiele znaczników fluorescencyjnych wykorzystywanych do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy; różnią się one między sobą budową chemiczną, a w związku z tym posiadają różne parametry typu widma emisyjne, w tym maksima wzbudzenia i maksima emisji. Na rycinie 22 przedstawiono skróconą charakterystykę spektralną stosowanych w QPCR znaczników fluorescencyjnych.



Ryc. 22. Charakterystyka spektralna fluorochromów stosowanych w reakcji QPCR. Maksima emisji i absorpcji dla komercyjnie dostępnych fluorochromów (na podstawie Molecular Probes).

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System, Instrukcja obsługi. Applied Biosystems, 2000.
 – [2] *Maekinen J., Viljanen M.K., Mertsola J.* et al.: Rapid identification of *Bordetella pertussis* pertactin gene variants using LightCycler Real-time polymerase chain reaction combined with melting curve analysis and gel electrophoresis. *Emerg Infect Dis* 2001, 7(6): 952–958. – [3] Molecular Probes®. Katalog produktów dla biologii molekularnej, Invitrogen Corp., 2004. – [4] *Sambrook J., Russell D.W.*: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001.