

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 22 1995

Suplement nr 6

Postępy Biologii Komórki

Redaktor Ryszard Słomski

POSTĘPY BADAŃ DNA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI (*Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Maciej KAWALEC (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (*Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (*Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (*Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (*Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni

HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,

Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,

Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel. 340 344, fax 340470.

© Copyright by Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 4,5. Ark. druk. 3,25. Oddano do składu w październiku 1995 r. Podpisano do druku w październiku 1995 r. Druk ukończono w listopadzie 1995 r.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA ROŚLIN

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF PLANTS

Marzanna DENIZIAK, Jan BARCISZEWSKI

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Streszczenie: Opracowanie metod detekcji naturalnie występujących polimorfizmów sekwencji DNA zrewolucjonizowało badania z zakresu genetyki i hodowli roślin. Polimorfizmy identyfikuje się najczęściej metodą RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Oznaczenia genetyczne na bazie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) są proste do przeprowadzenia, lecz zaprojektowanie specyficznych primerów wymaga wcześniejszego poznania badanej sekwencji. Od kilku lat rozwija się zastosowanie nowej analizy genetycznej – RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) – polegającej na amplifikacji genomowego DNA z wykorzystaniem w charakterze primerów krótkich oligonukleotydów o arbitralnie określonej sekwencji. Technika RAPD pozwala uniknąć szeregu ograniczeń metody RFLP. Znalazła szerokie zastosowanie w mapowaniu genetycznym, taksonomii molekularnej i genetyce populacyjnej. Markery RAPD służą również mapowaniu cech o znaczeniu agronomicznym.

Słowa kluczowe: markery DNA, powielanie DNA starterami o dowolnej sekwencji (RAPD), polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), mapowanie genetyczne.

Abstract The development of detection of naturally occurring DNA sequence polymorphisms has revolutionized plant genetics and breeding. Such polymorphisms are most commonly generated by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Genetic assays based on the polymerase chain reaction (PCR) are simple to perform, but target DNA sequence information is required to design specific primers. Recently a new method have been described – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – based on the amplification of genomic DNA with short primers (decamers) of arbitrary sequence. This assay avoids many of the technical limitations of RFLP. RAPD is widely used in genetic mapping, molecular taxonomy and population genetics. RAPDs are also suited for use in mapping of agronomically important traits.

Key words: DNA markers, random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), genetic mapping.

1. WSTĘP

Jednym z ostatnich ważnych osiągnięć w poznaniu struktury i organizacji genomów roślinnych jest odkrycie i wykorzystanie molekularnych systemów markerowych. Pozwalają one na rozwiązanie wielu problemów pojawiających się w trakcie badań opartych na klasycznych testach fenotypowych. Ponieważ efektywność analizy genetycznej bazującej na fenotypie jest funkcją dziedziczności cechy, czynniki takie jak: wpływ środowiska, dziedziczenie multigenowe i ilościowe, lub częściowa czy też całkowita dominacja często zakłócają ekspresję badanego genu [15]. Należy pamiętać, że liczba markerów fenotypowych oznaczanych w pojedynczej krzyżówce jest ograniczona, więc wykrywane sprzężenia dotyczą tylko małej frakcji genomu [20]. Zastosowanie markerów molekularnych zasadniczo eliminuje te trudności poprzez bezpośrednie wykrywanie dziedziczenia różnic w strukturze alleli na poziomie sekwencji DNA.

Markery genetyczne tworzy się w toku oznaczeń, które można podzielić na dwie główne kategorie:

1) oznaczenia bazujące na użyciu enzymów restrykcyjnych (RFLP – ang. *restriction fragment length polymorphism*),

2) oznaczenia bazujące na amplifikacji DNA (m.in. *RAPD – random amplified polymorphic DNA*, *AP-PCR – arbitrarily primed PCR*, *SSR – simple sequence repeat*, *DAF – DNA amplification fingerprinting*, *CAPS – cleaved amplified polymorphic sequence*) [1, 3, 5, 6, 9–11, 18].

Badania prowadzone przy wykorzystaniu tego typu analizy umożliwiły zebranie wielu nowych informacji dotyczących struktury i organizacji genomów wielu roślin uprawnych, w szczególności zaś kukurydzy, pszenicy i pomidora, a to z racji ich ogromnego udziału w światowej produkcji żywności. Diagnostykę DNA wykorzystuje się obecnie w wielu roślinnych programach hodowlanych (ang. *molecular breeding*) [7, 10, 16].

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) jest najczęściej stosowaną techniką mającą na celu konstrukcję map genetycznych oraz mapowanie ważnych cech agronomicznych u roślin o znaczeniu gospodarczym [7, 16]. Polimorfizm DNA można wykazać poprzez trawienie endonukleazą restrykcyjną oraz wizualizację fragmentów po hybrydyzacji metodą Southerna (tab. 1). O atrakcyjności markerów RFLP decyduje fakt, iż są one markerami kodominującymi, co umożliwia odróżnienie heterozygot od homozygot, dając możliwość detekcji alleli polimorficznych. Markery RFLP można również wykorzystać do detekcji polimorfizmów specyficznych dla danego locus w toku badań odrębnych gatunków, dzięki czemu opisano zależności występujące u traw (ryż, pszenica, kukurydza) i u roślin strączkowych (soja, fasola, groch), ujawniając analogię budowy genomów charakterystyczną dla tych gatunków [7, 10]. Ilość materiału niezbędna dla analizy jest relatywnie duża (5–10 µg), lecz ten sam filtr zawierający fragmenty DNA może być hybrydyzowany z sondą wielokrotnie przez okres kilku lat, czyniąc tę technologię bardzo praktyczną. Co więcej, materiał odpowiadający setkom osobników może być hybrydyzowany równocześnie, co umożliwia tworzenie map RFLP o wysokim nasyceniu [10]. Wydaje się, że technika

TABELA 1. Porównanie właściwości RFLP i RAPD [10, 11, 16, 17]

	RFLP	RAPD
Podstawa oznaczenia	Trawienie endonukleazą restrykcyjną i hybrydyzacja	Amplifikacja z użyciem primerów o arbitralnie zadanej sekwencji
Typ polimorfizmu	Mutacje punktowe, insercje, delecje	Mutacje punktowe, insercje, delecje
Poziom polimorfizmu	Średni	Średni
Częstość występowania markerów w obrębie genomu	Wysoka	Bardzo wysoka
Dystrybucja	W obrębie całego genomu	W obrębie całego genomu
Czy wykrywa warianty alleli?	Tak	Nie
Liczba loci podlegających detekcji	1–3	1–10
Dziedziczenie markerów	Markery kodominujące	Markery dominujące
Część genomu podlegająca badaniom	Regiony kodujące	Cały genom
Wykrywalne we wszystkich tkankach?	Tak	Tak
Typ sondy	Gatunkowo-specyficzny genomowy DNA o małej ilości kopii lub klony cDNA	Oligonukleotydy (najczęściej dziewięcio- lub dziesięciomery)
Wymagana jakość badanego DNA	Relatywnie czysty	Surowy ekstrakt (nieoczyszczony)
Wymagana jest znajomość sekwencji badanego DNA?	Nie	Nie
Detekcja z wykorzystaniem radioaktywności	Tak/nie	Nie
Trudności techniczne	Umiarkowane	Niewielkie
Wiarygodność	Wysoka	Umiarkowana/wysoka (okazjo-

RFLP jest relatywnie pracochłonna, a stosowanie radioaktywnych sond hybrydyzacyjnych stanowi pewną niedogodność w pracy wielu laboratoriów. Ponadto problemy logistyczne związane z dokumentacją i dystrybucją dużych ilości klonów spowodowały rozpowszechnianie sond RFLP [10]. Alternatywę dla metody RFLP stanowią techniki bazujące na selektywnej amplifikacji (powielaniu) segmentów DNA. Są to analizy stosunkowo proste, ale ich ograniczone zastosowanie wynika z konieczności poprzedniego poznania sekwencji badanego DNA [17]. Ominięcie tych niedogodności

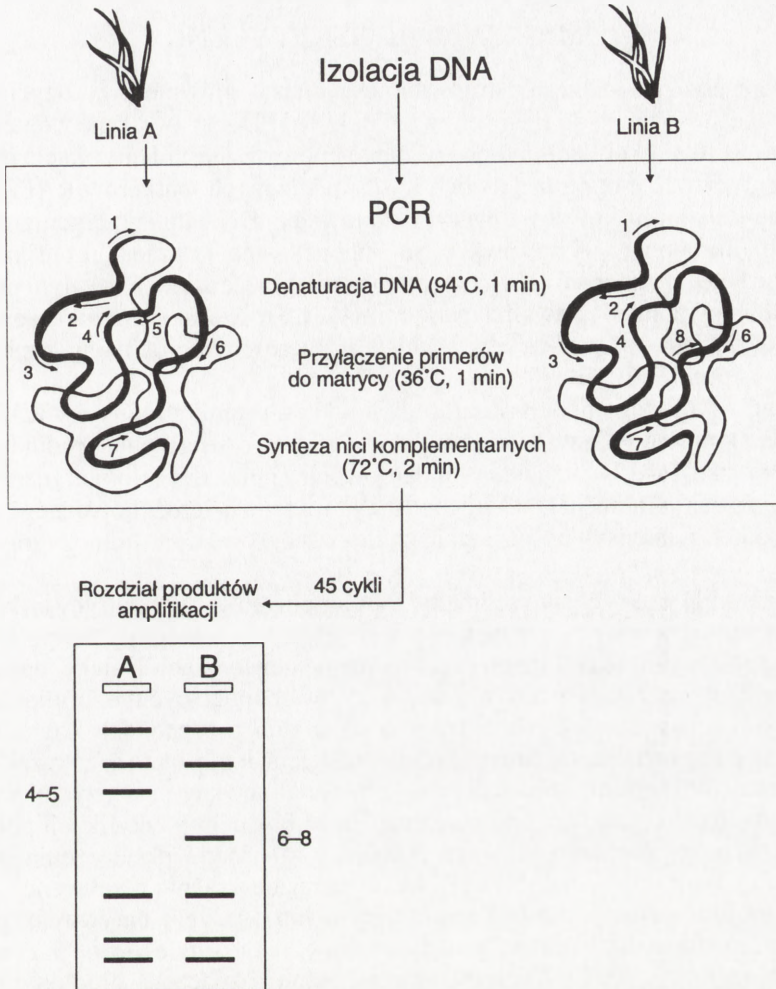
umożliwia technologia powielania DNA z wykorzystaniem dowolnych starterów (ang. *RAPD – random amplified polymorphic DNA*).

2. AMPLIFIKACJA DNA Z UŻYCIEM DEKAMERÓW O ARBITRALNEJ SEKWENCJI (RAPD)

Podstawą techniki RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA*) jest amplifikacja (powielanie) DNA bez znajomości sekwencji matrycy. Powielanie DNA metodą RAPD jest prowadzone w warunkach podobnych do tych, w jakich przeprowadza się łańcuchową reakcją polimerazy (PCR), z wykorzystaniem matrycy w postaci genomowego DNA oraz pojedynczych primerów (starterów) oligonukleotydomowych – najczęściej 10-merów – o arbitralnej sekwencji [12, 15, 17]. Przewiduje się, że dla większości roślin primery o długości 9–10 nukleotydów będą generowały 2–10 produktów amplifikacji (tab. 1). Primery mogą mieć dowolną sekwencję, o zawartości co najmniej 50% GC i bez wewnętrznych odwrotnych powtórzeń [16].

Większość genomów (od bakteryjnego po ludzki) zawiera wystarczającą ilość miejsc hybrydyzacji krótkiego primera pod warunkiem, że część z nich będzie się znajdować w orientacji odwróconej, a odległość między tymi miejscami nie będzie większa niż kilka tysięcy par zasad [11]. W związku z tym amplifikacji przy pomocy termostabilnej polimerazy podlega kilka segmentów DNA rozproszonych w obrębie całego genomu. Polimorfizm DNA jest wynikiem zarówno zmian sekwencji w miejscu przyłączania primera, zapobiegających stabilnej hybrydyzacji (mutacje punktowe), jak też zmian długości matrycy, zapobiegających skutecznej amplifikacji (insercje, delecje) [12]. Analiza produktów rozdziału na żelu agarozowym pokazuje najczęściej brak jednego lub kilku prążków, albo też pojawienie się nowych produktów (rys. 1). Tego typu polimorfizm jest specyficzny dla poszczególnych gatunków, odmian bądź linii wsobnych i ulega dziedziczeniu podobnie jak markery dominujące (wizualizacji podlega tylko jeden allel znajdujący się w danym locus) [11, 17]. Każdy amplifikowany produkt (prążek) jest rezultatem hybrydyzacji primera do matrycy w obrębie dwóch miejsc przyłączania primera. Typowa reakcja amplifikacji z pięcioma głównymi produktami rozdziału “skanuje” (przeszukuje, analizuje) ok. 100 nukleotydów matrycy, natomiast pojedynczy prążek RFLP otrzymany w wyniku analizy Southern blot z użyciem enzymu restrykcyjnego rozpoznającego 6 zasad “skanuje” tylko 12 (6 + 6) nukleotydów. Wydaje się, że polimorfizm DNA łatwiej zidentyfikować przy pomocy markerów RAPD, w porównaniu z sondami RFLP. Ten fakt czyni markery RAPD szczególnie cennymi dla badań gatunków mniej polimorficznych, np. soi czy pomidora [19]. Niekiedy podczas analizy RAPD mogą się pojawić problemy z uzyskaniem powtarzalności. Zależą one głównie od stężenia DNA oraz od warunków reakcji (profilu termicznego podczas amplifikacji).

Generowanie markerów RAPD



Rys. 1. Amplifikacja przypadkowych sekwencji z wykorzystaniem pojedynczych, krótkich primerów (10-merów) [16]. Hipotetyczne miejsca przyłączenia primerów w obrębie niewielkiego regionu genomu zaznaczono ponumerowanymi strzałkami. Tylko primery w pozycjach 4 i 5 w przypadku linii rodzicielskiej A, oraz 6 i 8 (linia B) znajdują się we właściwej orientacji i odległości umożliwiającej amplifikację produktu w kolejnych cyklach reakcji. Zniszczenie miejsca nr 5 w DNA linii B mogło nastąpić w wyniku rearanżacji chromosomu. Powstało natomiast nowe miejsce przyłączenia primerów (nr 8), w oddzielnym locus, co umożliwiło amplifikację jeszcze jednego, nowego produktu. Porównanie produktów reakcji (rozdzielanie elektroforetyczne) wykazało, iż linia B utraciła produkt generowany wskutek przyłączenia primerów w miejscach 4 i 5, zaś wśród produktów amplifikowanych na matrycy A nie zaobserwowano generowanego wskutek przyłączenia primerów w miejscach 6 i 8. Inne obserwowane produkty amplifikacji są tej samej wielkości, jeśli loci obydwu linii rodzicielskich są te same (mają tę samą strukturę i lokalizację). Dalszym etapem tego typu badań jest analiza segregacji ustalająca, czy loci analizowane w toku RAPD segregują niezależnie, czy też są sprzężone (kosegregują)

3. WYKORZYSTANIE SYSTEMÓW MARKEROWYCH

3.1. MAPOWANIE GENETYCZNE

Mapy genetyczne roślin konstruowano dotychczas głównie przy użyciu RFLP. Ograniczone stosowanie do tych celów techniki RAPD jest związane z charakterem markerów. Są to markery dominujące i dlatego konieczna jest identyfikacja regionów heterozygotycznych za pomocą dwóch ściśle sprzężonych markerów RAPD, z których każdy jest amplifikowany z matrycy stanowiącej DNA innego organizmu rodzicielskiego (komponenty krzyżówki). Są one używane łącznie; amplifikacja obu diagnozuje heterozygotyczny region genomu z marginesem błędu równym procentowi rekombinacji pomiędzy dwoma markerami [17]. Stosowanie par markerów RAPD wymaga używania dwa razy większej ilości primerów w porównaniu z markerami kodominującymi (RFLP).

Alternatywą dla tego podejścia może być wykorzystanie produktów RAPD jako sond do detekcji RFLP. Jest również możliwe ilościowe oznaczenie produktu (intensywności prążka) RAPD z użyciem standardowych technik densytometrycznych przy założeniu, że dany fragment DNA pochodzący z regionu heterozygotycznego stanowi połowę produktu (intensywności prążka) pochodzącego z regionu homozygotycznego [17].

Marker RAPD wykryty jako segment DNA amplifikowany z matrycy tylko jednego organizmu rodzicielskiego w krzyżówce genetycznej, segregujący w potomstwie, zostaje przypisany do określonego locus na mapie genetycznej. Należy jednak mieć na uwadze, iż marker mapowany w jednej krzyżówce może być niepolimorficzny w innej (gdy skrzyżowano innych rodziców). W takich przypadkach konieczne jest znalezienie polimorfizmu w danym locus z użyciem innej metody. Prążek RAPD amplifikowany z DNA obu rodziców może być analizowany przy użyciu enzymów restrykcyjnych, zarówno przed jak i po amplifikacji, w celu identyfikacji polimorfizmu miejsca restrykcyjnego leżącego pomiędzy miejscami przyłączenia primera. Różnice w strukturze drugorzędowej DNA, wynikające z różnic w sekwencji, można wykazać na gradientowym żelu denaturującym lub na żelu natywnym, poprzez analizę polimorfizmu konformacji pojedynczej nici (ang. *single-stranded conformation polymorphism – SSCP*). Alternatywnie, wcześniej oznaczony produkt może być użyty jako sonda w celu detekcji RFLP lub może być sekwencjonowany w celu oznaczenia polimorfizmu sekwencji [17].

W ciągu ostatniego roku zmapowano wiele loci zarówno cech jakościowych (głównie odporności na choroby), jak i ilościowych u różnych gatunków roślin, szczególnie uprawnych. Analiza prostych i złożonych cech genetycznych wymaga podobnego zestawu kryteriów selekcyjnych dla właściwego wyboru technologii markerów DNA.

3.1.1. Mapowanie cech jakościowych

Proste cechy genetyczne, które są dziedziczone jakościowo, są zwykle mapowane w segregujących populacjach reprezentujących 200 różnych gamet. Identyfikowane

w ten sposób polimorfizmy występują w obrębie całego genomu w odległości około 20 cM [7]. Aby możliwa była analiza kilkuset markerów w populacji segregującej, wybrana metoda musi być dostatecznie łatwa do przeprowadzenia. Dla prostych cech genetycznych ich rodzicielskie źródło jest zwykle znane, co pozwala na wydajne wykorzystanie sprzężonych z tą cechą markerów dominujących. Inaczej mówiąc, markery dominujące amplifikowane jako sprzężone z cechą rodzica - dawcy (donora), zarówno w populacji F₂ jak i w krzyżówce wstecznej, są tak samo wydajne jak markery kodominujące. Dla bardziej złożonych cech genetycznych faza sprzężenia nie zawsze jest znana. W tym przypadku markery kodominujące mają przewagę, ponieważ dostarczają informacji o sprzężeniach dotyczących segregujących regionów genomowych pochodzących od obydwójga rodziców. Możliwe jest również wykorzystanie markerów dominujących, stosując dwa razy większą liczbę markerów sprzężonych z cechą każdego z rodziców.

3.1.2. Mapowanie cech ilościowych

Istotne wyzwanie dla oznaczeń wykorzystujących markery molekularne stanowi analiza cech ilościowych. Mapowanie cech multigenowych lub ilościowych wymaga badania dużych populacji w celu uzyskania wystarczającego rozkładu statystycznego. Zmienność cech ilościowych ma charakter ciągły, wynikający z nakładania się skokowej zmienności mutacyjnej i modyfikacyjnych wpływów środowiska. Analiza molekularna tego typu zmienności opiera się na założeniu, iż pojedyncze osobniki, wchodzące w skład badanej populacji, wykazujące skrajne wartości fenotypowe dla mierzonej cechy, różnią się potencjalnie w największej liczbie loci kontrolujących tę cechę. Genotypy tych osobników są uważane za najbardziej informatywne (wniosek taki opiera się na przypuszczeniu, iż allele te są wysoce zasocjowane) [16]. Szybką identyfikację markerów sprzężonych z loci kontrolującymi cechy ilościowe można przeprowadzić metodą RAPD, analizując mieszaniny zawierające DNA osobników o skrajnych fenotypach.

Poprawność tego podejścia zwiększa zastosowanie tzw. rekombinowanych linii wsobnych (ang. *recombinant inbred lines* – *RILs*) [16, 17]. Szczególnie przydatne do tych celów są rodziny podwójnie haploidalne, ponieważ w ich przypadku nie występują efekty związane z dominacją, a dane na temat sprzężenia mogą być otrzymane bezpośrednio. Takie rodziny mogą być reprodukowane na szeroką skalę, a to ułatwia podział totalnej zmienności fenotypowej na komponenty dziedziczne i niedziedziczne. To podejście, zwane "mapowaniem zlokalizowanym" (ang. *localized mapping*) jest już używane do mapowania cech jakościowych w *RILs Arabidopsis thaliana* [13].

3.2. IDENTYFIKACJA MARKERÓW ZNAJDUJĄCYCH SIĘ W NIEWIELKIEJ ODLEGŁOŚCI OD BADANEGO LOCUS

Analizy zróżnicowania genetycznego przeprowadzane metodą RAPD umożliwiają szybkie oznaczenie tysięcy loci rozproszonych w obrębie genomu. Należy jednak określić, które z markerów leżą najbliżej badanego genu. Do tego celu można wykorzystać dwie strategie, obie polegające na analizie populacji niemal jednorod-

nych genetycznie, z wyjątkiem regionów bezpośrednio sąsiadujących z genem docelowym.

Pierwsza strategia wykorzystuje linie prawie izogeniczne (ang. *near-isogenic lines* – *NILs*) [4, 14, 16, 17]. Są one generowane w procesie powtarzających się krzyżówek wstecznych z selekcją w kierunku pożądanej cechy charakterystycznej w każdym cyklu krzyżowania. Tę procedurę wykorzystuje się do produkcji genotypów, które są istotnie identyczne we wszystkich loci genowych z wyjątkiem regionu otaczającego gen podlegający selekcji. Tworzenie takich linii może trwać lata, często jednak wiele z nich powstaje jako produkt uboczny rutynowych hodowli. Duże prawdopodobieństwo, iż każdy wykryty polimorfizm będzie się znajdował w niewielkiej odległości od badanego genu, dostarcza skutecznych środków do identyfikacji markerów sprzężonych z interesującymi cechami.

Drugie podejście – częściej stosowane – polega na tzw. masowej analizie segregacji (ang. *Bulked Segregant Analysis* – *BSA*), opisanej przez Michelmore i wsp. [8]. Opiera się ono na podobnych przesłankach, a wykorzystuje mieszaniny DNA pochodzące z homozygotycznych osobników F₂.

Masowa analiza segregacji może być przeprowadzona techniką RFLP bądź RAPD. W populacji segregującej ekspresja badanej cechy stanowi kryterium podziału osobników na dwie grupy. Grupy te będą się różniły w loci sprzężonym z cechą, lecz regiony niesprężone będą segregowały przypadkowo. Materiał genetyczny (DNA) każdej z grup jest gromadzony oddzielnie (łączony) – i dwie tak powstałe pule DNA są testowane ze względu na polimorfizmy RAPD lub RFLP. Markery polimorficzne interpretuje się jako sprzężone z cechą badaną.

Powyższa strategia umożliwiła zmapowanie metodą RAPD genu odporności na białą rdzę pęcherzykową sosny (*Pinus lambertiana* Dougl.), wywoływaną przez *Cronartium ribicola* Fish. [2]. Drzewa leśne są trudnym obiektem analiz genetycznych, głównie z powodu długiego czasu trwania jednego pokolenia, barier krzyżowania oraz braku informacji na temat sprzężenia genetycznego. Jednak prawdopodobnie największą przeszkodą w mapowaniu i klonowaniu genów jest wielkość genomu sosny. U *P. lambertiana* przekracza ona 40-krotnie wielkość genomu pomidora. W badaniach wykorzystano megagametofit – haploidalną tkankę nasienia, produkt mejozy stanowiący maceczny udział w zarodku. Wykorzystanie megagametofitu stworzyło możliwość bezpośredniej analizy dziedziczenia loci genetycznych bez używania krzyżówek kontrolnych, które są kosztowne i często niemożliwe do wykonania. Segregacja heterozygotycznego loci w tkance haploidalnej przy pomocy RAPD jest zdefiniowana przez obecność produktu amplifikacji lub jego brak w stosunku 1:1, w ten sposób znacznie upraszczając analizę danych. W badaniach, poza krzyżówką kontrolną, gdzie osobnik żeński był heterozygotą (Rr), zaś męski – homozygotą recesywną (rr), wykorzystano nasiona czterech drzew dziko rosnących. Potomstwo uzyskane z nasion analizowano ze względu na odporność (inokulacja), po czym każdą z rodzin podzielono na dwie grupy: wrażliwą i odporną, a następnie poddano analizie BSA, wykorzystując do tego celu 800 dekanukleotydów. Zidentyfikowano 10 loci sprzężonych z genem odporności na *C. ribicola*. Sześć spośród tych markerów znajdowało się w obrębie 5 cM odległości od genu, w tym jeden z nich –

w odległości 0,9 cM. Te i inne markery otrzymane z zastosowaniem powyższego podejścia mogą umożliwić klonowanie tego ważnego genu na bazie mapy. Metoda BSA jest stosowana dla szeregu cech dziedziczonych w sposób prosty, czyniąc wyprowadzanie NILs lub konstrukcję map niekoniecznym warunkiem identyfikacji sprzężeń markerów DNA z badanymi cechami. Technika ta może być wykorzystywana w badaniach każdego rozmnażającego się płciowo organizmu, gdzie segregujące populacje są używane do konstruowania genetycznych map sprzężeń. Podejście to jest szczególnie atrakcyjne dla analiz regionów chromosomowych, w obrębie których występuje niewiele markerów (centromery, końce grup sprzężeń), lecz dostęp do nich powinien być zdefiniowany przez markery flankujące. Co więcej, różne pule DNA mogą być sporządzone z tej samej populacji segregującej [16].

Obie wyżej opisane strategie, użyte w zestawieniu z wysokowydajną technologią markerową, pozwalają na testowanie tysięcy loci i na selektywną identyfikację tych związanych z badanym genem. Co więcej, może to być osiągnięte bez posiadania mapy genetycznej gatunku. Skuteczność NILs i BSA została dowiedziona w przypadku wielu gatunków roślin, a ostatnio podejścia te były również wykorzystywane w genetycznych badaniach ssaków [14].

3.3. IDENTYFIKACJA HYBRYDÓW SOMATYCZNYCH

Nowe możliwości, związane z zastosowaniem markerów genetycznych, pojawiły się również w programach hybrydyzacji somatycznej [16]. W drodze fuzji protoplastów pozwala ona na transfer potencjalnie użytecznych cech pomiędzy nie krzyżującymi się (niekompatybilnymi) płciowo gatunkami roślin. Głównym ograniczeniem dla wydajniejszej eksploatacji tej metody jest brak odpowiednich sposobów jednoznacznej identyfikacji hybrydów jądrowych. W tym celu stosuje się obecnie kilka metod:

- łączenie protoplastów etiolowanych z protoplastami mezofilu zielonych liści i manualną izolację heterokariontów,
- genetyczną komplementację mutantów auksotroficznych,
- fuzję różnych linii opornych na antybiotyki i/lub herbicydy (otrzymanych uprzednio w wyniku transformacji roślin).

Przy braku systemu selekcji prowadzi się obserwacje żywotności hybrydu, oznaczenia izozymów i białek oraz RFLP. Metody te są stosunkowo czasochłonne i kosztowne. Ostatnio metodą RAPD przetestowano szereg dziesięciomerów w celu wyodrębnienia tych zdolnych do generowania dominujących polimorficznych produktów amplifikacji z każdego z rodziców podlegających fuzji. Domniemane hybrydy między- i wewnątrzspecyficzne były analizowane z wykorzystaniem wyselekcjonowanych primerów, co pozwoliło na jednoznaczną identyfikację heterokariontów na podstawie ich profili molekularnych, które reprezentują kombinację profili genotypów donorowych. Przez identyfikację hybrydów somatycznych we wczesnym stadium procesu regeneracji technologia RAPD może stworzyć znaczący wkład do zwiększenia wydajności programów hybrydyzacji somatycznej [16].

3.4. TAKSONOMIA MOLEKULARNA

Przy zastosowaniu amplifikacji metodą RAPD możliwe jest wykrycie zmian pojedynczych nukleotydów w miejscu przyłączania primera. Wynika z tego, że markery RAPD powinny być wysoce użyteczne dla analiz filogenetycznych blisko spokrewnionych osobników, ale mniej użyteczne w przypadku gatunków genetycznie odległych. Przykładem takich badań może być analiza dziesięciu różnych gatunków z rodzaju *Glycine* [17]. Jej celem była identyfikacja cech wewnątrz- i międzygatunkowych. Przy użyciu pięciu primerów RAPD zidentyfikowano 61 różnych cech charakterystycznych, z czego 17 okazało się być cechami międzygatunkowymi, zaś 44 występowały tylko w obrębie poszczególnych gatunków. Analiza RAPD pozwoliła zidentyfikować zarówno poszczególne gatunki, jak i różne izolaty tych samych gatunków. W wyniku hybrydyzacji z odpowiednią sondą stwierdzono tożsamość cech 1 i 2 oraz potencjalną błędną klasyfikację cechy 3 w przypadku *G. tabaccina* i *G. tomentella*. Wobec tego dokonano hybrydyzacyjnego sprawdzenia prawidłowości klasyfikacji dla dziesięciu różnych cech – spośród nich tylko jedna mogłaby być potencjalnie błędnie przyporządkowana (na podstawie analizy rozdziału na żelu). Ten szczególny błąd mógłby być ominięty przez rozdział na dłuższym żelu analitycznym.

3.5. GENETYKA POPULACYJNA

Markery DNA są wykorzystywane do mierzenia podobieństwa pomiędzy pojedynczymi osobnikami w obrębie populacji naturalnych bądź sztucznych (otrzymanych w wyniku hodowli), wchodzących w skład gatunku [17]. W trakcie porównywania relatywnych wydajności markerów RAPD i RFLP bierze się pod uwagę fakt, iż zastosowanie pojedynczego primera RAPD zwykle prowadzi do amplifikacji kilku niezależnych loci genetycznych, nie umożliwia natomiast identyfikacji obecności kilku alleli. Sondy RFLP wykorzystuje się do detekcji tylko jednego lub niewielkiej liczby loci o komplementarnej sekwencji nukleotydowej, lecz mogą być one użyte do wykrywania obecności alleli wielokrotnych w każdym locus (dzięki odchyleniom w wielkości fragmentów RFLP). W ten sposób np. u kukurydzy rozróżniono 8 alleli w pojedynczym locus, podczas gdy u soi większość sond RFLP nie wykrywała więcej niż 2 allele w każdym z dwu homologicznych loci [17]. Stąd wniosek, że użycie sond RFLP jest wskazane w toku badań nad populacjami tak różnorodnymi genetycznie, jak populacje kukurydzy, natomiast markery RAPD byłyby odpowiednie do analizy populacji bardziej jednolitych (wsobnych), takich jak w przypadku soi.

4. PERSPEKTYWY

Zarówno genetycy, jak i hodowcy roślin, coraz częściej sięgają po techniki umożliwiające szybką identyfikację polimorfizmów na poziomie sekwencji DNA. Wydajne ich zastosowanie będzie jednak zależało od rozwoju tanich i szybkich technologii, które zautomatyzują oznaczenia genetyczne na wzór diagnostyki klinicznej [7, 10].

Istotne znaczenie ma również odpowiednie wykorzystanie technologii komputerowej, służącej gromadzeniu i udostępnianiu złożonych danych w przystępnej formie. Mimo znacznego postępu dokonanego w tych dziedzinach wiele jest jeszcze do zrobienia. Technologie markerowe są wykorzystywane w strategiach klonowania na bazie mapy. Tradycyjnie, markery DNA są używane jako miejsca startu dla "chromosome walks". Możliwość tworzenia map genetycznych i fizycznych o wysokiej gęstości ściśle skupionych regionów doprowadziła do rozwoju strategii "chromosome landing" [14], w której markery molekularne są używane w celu jednoznacznej identyfikacji dużych klonów DNA zawierających ciekawe geny. Takie strategie klonowania pozycyjnego opierają się na dwóch przesłankach:

- możliwości identyfikacji dużej liczby markerów polimorficznych dla badanych regionów genomu,
- możliwości przyporządkowania tych markerów bardzo krótkim odległościom genetycznym.

Technologia RAPD umożliwia wydajne generowanie polimorfizmów. Masowa analiza segregacji (BSA), gdzie markery są identyfikowane jako będące w sprzężonej nierównowadze z badaną cechą, dostarcza środków do kierowania takich markerów do ściśle określonych regionów genomu. Wydajne mapowanie dużych populacji umożliwiły strategie opierające się na grupowaniu populacji zrekombinowanych (RILs) i analizowaniu ich w partiach. Pewne geny sklonowano z wykorzystaniem strategii izolacji pozycyjnej. Rozwój tych nowych strategii powinien pozwolić na zwiększenie liczby genów klonowanych w ten sposób w ciągu najbliższych lat. Ostatnio wiele osiągnięto w kwestii zrozumienia struktury i organizacji genomów roślinnych przez odkrycie i wykorzystanie molekularnych form polimorfizmów. Kluczem do przyszłego postępu jest opracowanie odpowiedniej technologii służącej wykorzystaniu tej zmienności w szerszym spektrum organizmów. RAPD to klasa markerów genetycznych, które w przyszłości będą istotne w programach obejmujących profilowanie DNA, genetykę populacyjną, mapowanie genetyczne, systematykę molekularną oraz selekcję w przypadku uprawy roślin i hodowli zwierząt. O tak szerokim zastosowaniu zdecydować będzie prostota podejścia, umożliwiająca jego wykorzystanie w stosunkowo skromnie wyposażonych laboratoriach, eliminacja używania radioizotopów oraz potencjalna łatwość wymiany informacji i współpracy między placówkami badawczymi.

LITERATURA

- [1]CAETANO-ANNOLES G. MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Mol Biol* 1994; **25**: 1011–1026.
- [2]DEVEY M, DELFINO-MIX A, KINLOCH Jr. BB, NEALE DB. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2066–2070.

- [3] GIOVANNI JJ, WING RA, GANAL MW, TANKSLEY SD. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Res* 1994; **19**: 6553–6558.
- [4] HALEY SD, AFANADOR LK, MIKLAS PN, STAVELY JR, KELLY JD. Heterogenous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. *Theor Appl Genet* 1994; **88**: 337–342.
- [5] JARVIS P, LISTER C, SZABO V, DEAN C. Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1994; **24**: 685–687.
- [6] KONIECZNY A, AUSUBEL FM. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 1993; **4**: 403–410.
- [7] MAZUR BJ, TINGEY SV. Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. *Current Opinion in Biotechnology* 1995; **6**: 175–182.
- [8] MICHELMORE RW, PARAN I, KESSELI RV. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 9828–9832.
- [9] PRABHU RR, GRESSHOFF PM. Inheritance of polymorphic markers generated by DNA amplification fingerprinting and their use as genetic markers in soybean. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 105–116.
- [10] RAFALSKI AJ, TINGEY SV. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* 1993; **9**: 275–280.
- [11] RAFALSKI AJ, TINGEY SV, WILLIAMS JGK. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. [w] Gelvin S.B., Schilperoort R.A. [red.] *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1992; **1**: 4–7.
- [12] RAFALSKI A J, TINGEY SV, WILLIAMS JGK. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information* 1991; **3**: 645–648.
- [13] REITER RS, FELDMAN KA, WILLIAMS JGK, RAFALSKI JA, TINGEY SV, SCOLNIK PA. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1477–1481.
- [14] TANKSLEY SD, GANAL MW, MARTIN GB. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet* 1995; **11**: 63–68.
- [15] TINGEY SV, RAFALSKI AJ, HANAFEY MK. Genetic Analysis with RAPD markers. [w] Coruzzi G., Puigdomenech P. [red.] *Plant Molecular Biology*, NATO ASI Series, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1994; **H 81**: 60–64.
- [16] WAUGH R, POWELL W. Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH* 1992; **10**: 186–191.
- [17] WILLIAMS JGK, HANAFEY MK, RAFALSKI AJ, TINGEY SV. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Methods in Enzymology* 1993; **218**: 704–740.
- [18] WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI AJ, TINGEY SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 6531–6535.
- [19] WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, RAFALSKI AJ, TINGEY SV. Genetic Analysis with RAPD Markers. [w] *More gene manipulations in fungi*. Academic Press, Inc. 1991: 60–64.
- [20] WILLIAMS JGK, REITER RS, YOUNG RM, SCOLNIK P. Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 2697–2702.

KATALITYCZNE RNA JAKO POTENCJALNE CZYNNIKI TERAPEUTYCZNE

CATALYTIC RNAS AS POTENTIAL THERAPEUTIC AGENTS

Maciej SZYMAŃSKI, Jan BARCISZEWSKI

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Streszczenie: Kwasy rybonukleinowe oprócz swojej podstawowej funkcji kodowania i odczytywania informacji genetycznej mogą również pełnić rolę biokatalizatorów (enzymów). Najczęstszą aktywnością takich RNA (rybozymów) jest hydroliza wiązania fosfodwuestrowego w kwasach rybonukleinowych. Dla rybozymów wirusowych typu *hammerhead*, hydroliza zachodzi po charakterystycznej sekwencji GUC, natomiast RNA rybonukleazy P hydrolizuje substraty o strukturze podobnej do tRNA. RNA wykazujące aktywność nukleolityczną mogą zostać wykorzystane jako czynniki w terapii genowej. Dotychczasowe, wstępne badania *in vivo* wykazały możliwość zastosowania rybozymów w leczeniu chorób wywoływanych przez RNA wirusy (AIDS) czy chorób nowotworowych.

Słowa kluczowe: rybozimy, katalityczne RNA, terapia genowa

Summary: Besides their primary function in encoding and decoding of genetic information, ribonucleic acids can serve as biocatalysts (enzymes). Most of such RNAs (ribozymes) catalyse the hydrolysis of phosphodiester linkages in ribonucleic acids. In viral hammerhead ribozymes the cleavage site is located downstream to the GUC sequence, whereas ribonuclease P RNA hydrolyses substrates with structures resembling tRNA. The catalytic activities of RNAs can be used in gene therapy. Studies on action of the ribozymes *in vivo* indicate that they may prove to be efficient agents in therapy of viral diseases (AIDS) or cancer.

Keywords: ribozymes, catalytic RNA, gene therapy

1. KATALIZA RNA – WPROWADZENIE

Do początku lat osiemdziesiątych panowało powszechne przekonanie, że kierunek przepływu informacji genetycznej, a co za tym idzie funkcje poszczególnych makro-

cząsteczek biologicznych są zgodne z centralnym dogmatem biologii molekularnej. Zakładał on, że kwasy nukleinowe są jedynie nośnikami informacji (DNA, mRNA) oraz częściowo pełnią funkcje strukturalne (rybosomalne RNA), a wszystkie właściwości katalityczne należą do białek. W latach osiemdziesiątych stwierdzono, że niektóre reakcje zachodzące w komórce są całkowicie zależne od RNA, który pełni w nich funkcję katalizatora – enzymu. Dla opisu tego procesu zaproponowano nowy termin: rybozym (rybo-enzym). Pierwszym przykładem reakcji katalizowanej przez RNA była rybonukleaza P (RNaza P) z *Escherichia coli* [1]. Enzym ten jest odpowiedzialny za dojrzewanie pierwotnych transkryptów genów tRNA, mających dodatkowe sekwencje przy końcu 5'. W wyniku reakcji katalizowanej przez RNazę P odcinany jest 5'-końcowy fragment pierwotnego transkryptu i tym samym generowany jest prawidłowy koniec 5' dojrzałego tRNA. W skład enzymu wchodzi dwie podjednostki: podjednostka RNA (u *E. coli* zwana M1 RNA) odpowiedzialna za aktywność katalityczną oraz podjednostka białkowa, pełniąca funkcję stabilizującą. Dla aktywności enzymu *in vivo* niezbędna jest obecność obydwu składników, podczas gdy w warunkach *in vitro* można uzyskać pełną aktywność katalityczną izolowanej podjednostki RNA. RNaza P jest enzymem występującym powszechnie w całym świecie organicznym [1]. Jest to jednocześnie jedyny, naturalnie występujący rybozym wykazujący podstawową cechę charakteryzującą enzymy białkowe – możliwość wielokrotnego katalizowania reakcji.

Drugą klasę rybozymów stanowią samowycinające się introny grupy I, występujące przede wszystkim w pierwotnych transkryptach rybosomalnych RNA i tRNA. Reakcja katalizowana przez tę klasę cząsteczek polega na dokonaniu wewnątrzcząsteczkowego przecięcia łańcucha RNA w miejscu połączenia egzon-intron, a następnie ligacji egzonów. Najlepiej poznanym przedstawicielem tej klasy RNA jest intron prekursorowego rybosomalnego RNA z *Tetrahymena thermophila* [4]. W przeciwieństwie do rybonukleazy P dla aktywności tego rybozymu nie jest wymagana obecność żadnego białka. Jedynym niezbędnym kofaktorem tej reakcji jest nukleotyd guaninowy, który po związaniu w odpowiednim miejscu w strukturze intronu inicjuje reakcję transestryfikacji [4]. Intronów grupy I nie można nazwać prawdziwymi enzymami. Każdy z nich katalizuje tylko jedną reakcję, i ich aktywność katalityczna kończy się w momencie samowycięcia z prekursorowego RNA. Introny grupy I stanowią więc pewne domeny RNA wykazujące właściwości katalityczne.

Inną grupę rybozymów stanowią rybozomy wirusowe i wiroidowe typu *hammerhead* i *hairpin*. Podobnie jak w przypadku intronów grupy I rybozomy te w swoim naturalnym otoczeniu stanowią pewne domeny genomu wirusowego, odpowiedzialne za autohydrolizę cząsteczki RNA [29]. Są one odpowiedzialne za fragmentację dimerycznych produktów replikacji genomu wirusowego do pojedynczych jednostek genomowego RNA. W tym przypadku fragment RNA, ulegający hydrolizie pełni rolę substratu, natomiast domena pełniąca funkcje katalityczne jest odpowiednikiem enzymu. Podobnie jak w przypadku intronów grupy I, każdy naturalnie występujący rybozym wirusowy katalizuje tylko jedną reakcję. W przypadku naturalnych rybozymów *hammerhead* i *hairpin* substrat i enzym są fragmentami jednej cząsteczki RNA.

Istnieje jednakże możliwość ich rozdzielenia i stworzenia dwuskładnikowego rybozymu [12].

2. KWASY RYBONUKLEINOWE O AKTYWNOŚCIACH NUKLEOLITYCZNYCH

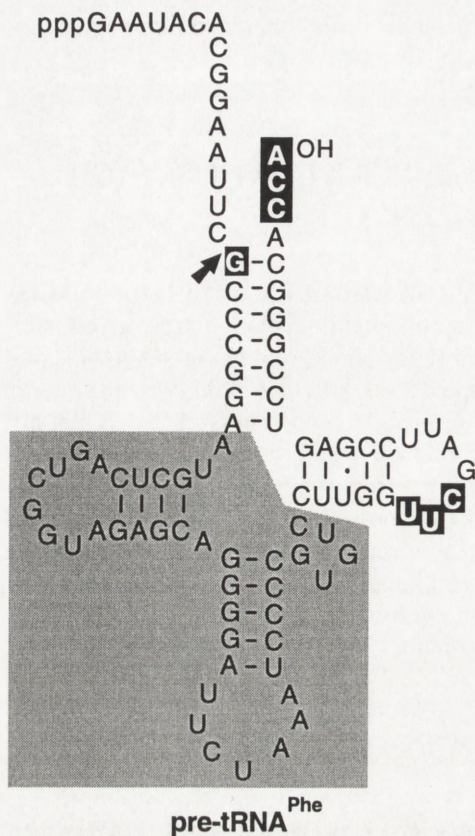
Stwierdzenie aktywności hydrolitycznych RNA stało się impulsem do poszukiwania możliwości ukierunkowania jej na pewne unikalne miejsca w określonych, substratowych cząsteczkach RNA. Rybozymy rozpoznające określone sekwencje lub struktury RNA mogłyby zostać wykorzystane do selektywnej inaktywacji (poprzez hydrolizę) konkretnych, docelowych RNA. Głównym motorem tych badań jest poszukiwanie skutecznych metod zwalczania chorób wywoływanych przez wirusy, których materiałem genetycznym jest RNA (np. retrowirusy).

Dostarczenie do zainfekowanych komórek rybozymów zdolnych do specyficznego rozpoznania i niszczenia genomowego RNA wirusowego stanowiłoby szansę na zatrzymanie jego namnażania [2,8]. Głównymi kandydatami mogącymi znaleźć zastosowanie w takiej rybozymowej terapii genowej są dwa typy katalitycznych RNA: rybonukleaza P oraz rybozymy typu *hammerhead*.

2.1 RYBONUKLEAZA P

Naturalnymi substratami dla rybonukleazy P są pierwotne transkrypty genów tRNA, zawierające przedłużenie przy końcu 5'. Substratami dla RNazy P są transkrypty różnych genów tRNA, które nie wykazują wysokiego podobieństwa sekwencji nukleotydowej. Z drugiej strony wiadomo, że wszystkie tRNA charakteryzują się podobną strukturą przestrzenną, która jest decydującym czynnikiem w oddziaływaniu z rybonukleazą P. Najlepiej poznanym enzymem tej grupy jest RNaza P z *E. coli*. Badania wymagań strukturalnych, jakim powinien odpowiadać substrat, wykazały, że dla rozpoznania tRNA przez bakteryjną rybonukleazę P konieczne są ramiona akceptorowe i rybotymidyny [17]. Ponadto dla pełnej aktywności katalitycznej RNazy P konieczna jest jednak obecność w substracie pewnych stałych elementów, charakterystycznych dla tRNA. Są to sekwencja CCA przy końcu 3' oraz sekwencja UUC w pętli rybotymidyny (rys.1).

Intensywne badania prowadzone są również nad ludzką RNazą P. Ilość informacji o tym enzymie jest znacznie mniejsza niż w przypadku RNazy P z bakterii. Wiadomo jednak, że w przeciwieństwie do enzymu z bakterii składnik RNA *in vitro* nie wykazuje aktywności enzymatycznej bez podjednostki białkowej. Enzym ten wykazuje również znacznie wyższe wymagania w stosunku do substratu. Dla pełnej aktywności enzymu wymagana jest niemal cała cząsteczka tRNA. Nie obserwowano

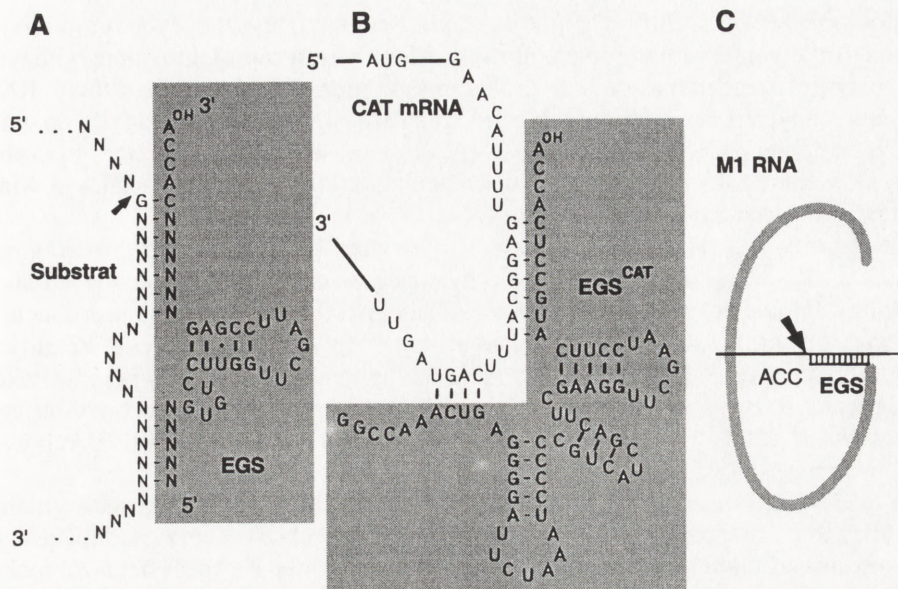


Rys. 1. Elementy struktury tRNA istotne dla rozpoznania przez bakteryjną rybonukleazę P. Fragment cząsteczki, który może zostać usunięty bez wpływu na aktywność enzymu jest zacieniowany. Nukleotydy szczególnie ważne dla oddziaływania z RNazą P przedstawiono na czarnym tle

znacznego obniżenia aktywności enzymu po usunięciu z substratu ramienia i pętli dwuhydrourydyny lub ramienia i pętli antykodonu [31].

Stosunkowo niewielkie wymagania strukturalne, jakie musi spełniać substrat dla RNazy P oraz jej powszechne występowanie we wszystkich komórkach tak prokariotycznych, jak i eukariotycznych sprawiają, że enzym ten stanowi potencjalnie dobry punkt wyjścia dla stworzenia układu, pozwalającego na specyficzne kontrolowanie (inhibicję) ekspresji wybranych genów. Badania *in vitro* wykazały, że zarówno rybonukleaza P z *E. coli*, jak i enzym ludzki rozpoznają i specyficznie hydrolizują hybrydowe substraty (rys. 2). Jeden z elementów tego typu substratu stanowi cząsteczka docelowego RNA (może to być dowolny RNA) natomiast druga cząsteczka (EGS – ang. *external guide sequence*) zawiera elementy charakterystyczne dla tRNA i wymagane dla rozpoznania przez enzym [10]. Po związaniu EGS z komplementarnym odcinkiem docelowego RNA powstaje kompleks o strukturze przypominającej naturalny substrat, co zapewnia specyficzną hydrolizę wiązania fosfodwuestrowego. Warunkiem hydrolizy docelowego RNA *in vivo* w tym przypadku

jest obecność w komórce cząsteczek EGS. Wykorzystując to podejście udało się uzyskać inhibicję ekspresji genu acetylotransfazy chloramfenikolu (CAT) w kulturach komórek raka płuc, przez transfekcję plazmidem zawierającym gen kodujący EGS^{CAT} (rys. 2) [32]. Inna możliwość wykorzystania katalitycznych właściwości RNA rybonukleazy P polega na użyciu hybrydowego rybozemu złożonego z RNA RNazy P *E. coli* (M1 RNA), do którego przy końcu 3' dołączona jest krótka sekwencja EGS specyficznie rozpoznająca substratowy RNA [3]. Substrat hydrolizowany przez M1 RNA tworzy się poprzez związanie EGS z komplementarnym fragmentem docelowej cząsteczki RNA (rys. 2). Strategia ta została z powodzeniem wykorzystana dla inhibicji ekspresji kinazy tymidynowej (TK) wirusa HSV-1 w komórkach HeLa [16]. Komórki, w których uzyskano ekspresję M1GS (hybrydowa cząsteczka M1 RNA z EGS), w porównaniu z komórkami kontrolnymi wykazywały znacznie niższy



Rys. 2. Strategie wykorzystania rybonukleazy P *in vivo*. Miejsca hydrolizy RNA zaznaczone są strzałkami. (A) Hybrydowy substrat dla RNazy P z *E. coli*. N-N oznacza sparowane nukleotydy, EGS – cząsteczka kierująca enzym do właściwego miejsca hydrolizy w substracie. (B) Hybrydowy substrat dla ludzkiej RNazy P złożony z mRNA kodującego acetylotransferazę chloramfenikolu i odpowiedniej cząsteczki EGS^{CAT}. (C) Schemat działania M1GS.

Do M1 RNA z *E. coli* dołączony jest fragment komplementarny do docelowego mRNA

(do 80%) poziom zarówno mRNA kodującego TK, jak i samego białka [16]. Jak już wspomniano, katalityczna aktywność M1 RNA (bez udziału podjednostki białkowej) *in vitro* wysokiego (do 60 mM) stężenia jonów Mg^{2+} [1], które nie występuje w komórce. *In vivo* funkcje stabilizacji aktywnej struktury RNA pełni białko. Wydaje się, że aktywność bakteryjnego RNA rybonukleazy P w komórkach eukariotycznych, uwarunkowana jest stabilizującym działaniem białek komórkowych. Możliwe że funkcję tę spełnia białkowy składnik ludzkiej rybonukleazy P.

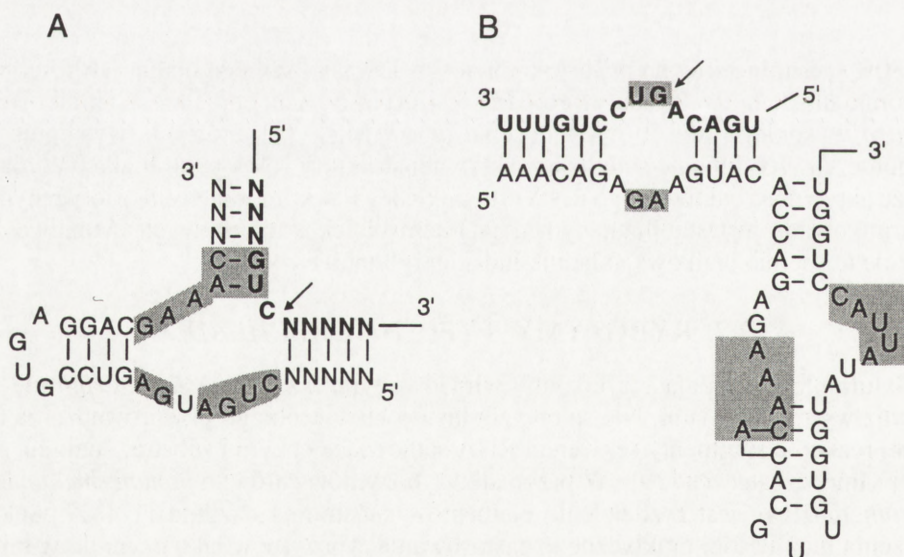
2.2. RYBOZYMY TYPU *HAMMERHEAD*

Naturalnie występujące rybozomy wirusowe typu *hammerhead* i *hairpin* nie są prawdziwymi enzymami. Nie są one zdolne do wielokrotnego przeprowadzania tej samej reakcji a fragmenty sekwencji RNA stanowiące enzym i substrat znajdują się w tej samej cząsteczce [29]. W przypadku rybozymów zarówno *hammerhead*, jak i *hairpin* możliwe jest rozdzielenie elementów substratu i enzymu [12]. Z punktu widzenia możliwości praktycznego zastosowania rybozymów jako czynników inhibujących ekspresję genów najbardziej obiecujące, ze względu na wielkość (i koszty chemicznej syntezy), wydają się być rybozomy typu *hammerhead*. Rozpoznanie substratu przez rybozym zachodzi w drodze hybrydyzacji komplementarnych frag-

mentów sekwencji RNA (rys. 3). Dla aktywności enzymatycznej rybozomu nie jest istotna struktura pierwszorzędowa substratu. Możliwe jest zaprojektowanie rybozomu specyficznie rozpoznającego i hydrolizującego niemal każdy substratowy RNA. Badania różnych substratów dla rybozomu typu *hammerhead* doprowadziły do wniosku, że najlepiej hydrolizowane są te RNA, które po stronie 5' od miejsca hydrolizy mają sekwencję GUC [12]. Z punktu widzenia statystyki sekwencja taka powinna występować praktycznie w każdym mRNA.

Za katalityczną aktywność rybozomu odpowiedzialny jest centralny fragment cząsteczki RNA, łączący odcinki hybrydujące z substratem. Mechanizm reakcji hydrolizy nie jest dokładnie poznany, lecz dla jej przebiegu niezbędna jest obecność jonów magnezu. Właściwe przestrzenne ułożenie substratu oraz rdzenia katalitycznego rybozomu umożliwią związanie kationów magnezowych, które pełnią funkcję katalityczną. Uzyskana ostatnio struktura krystaliczna kompleksu rybozomu typu *hammerhead* z substratem pozwoli na pełne zrozumienie stereochemicznych warunkowań reakcji hydrolizy [21,24].

W warunkach *in vivo* podstawowym problemem jest zapewnienie maksymalnej specyficznego rozpoznania docelowego RNA przez rybozym, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiego poziomu aktywności katalitycznej. Za specyficznosc reakcji odpowiedzialne są fragmenty rybozomu komplementarne do cząsteczki substratu. Ich długość musi być tak dobrana, aby zminimalizowana była możliwość hybrydacji z innym fragmentem RNA. Z drugiej jednak strony długość komplementarnych odcinków wpływa na szybkość reakcji katalizowanej przez rybozym, gdyż czynnikiem



Rys. 3. Rybozomy pochodzenia wirusowego. Miejsca hydrolizy zaznaczono strzałkami. Nukleotydy stałe, odpowiedzialne za właściwą strukturę kompleksu rybozym-substrat są zaciemnione. (A) Rybozym typu *hammerhead*. (B) Rybozym typu *hairpin*

ograniczającym jest szybkość uwalniania produktu. Silne wiązanie substratu przez większą ilość par zasad powoduje obniżenie szybkości dysocjacji kompleksu rybozym–produkt i, tym samym, zwolnienie reakcji [26].

Liczne eksperymenty *in vitro* potwierdzają możliwość wykorzystania rybozymów typu *hammerhead* do specyficznej inaktywacji mRNA w komórce. W badaniach nad komórkami nowotworowymi wykazującymi fenotyp oporności wielolekowej (MDR – *multidrug resistance*) zastosowano transfekcję wektorami ekspresyjnymi, zawierającymi geny kodujące rybozomy *hammerhead* skierowane przeciwko mRNA dla onkogenu *c-fos* i genu *mdr-1*, warunkującego oporność wielolekową. Indukcja transkrypcji rybozomu dla *c-fos*, w komórkach wykazujących fenotyp MDR powodowała obniżenie ekspresji nie tylko tego genu, ale również *mdr-1*, *c-jun* i *p53*. [23]. Jednocześnie w komórkach tych przywrócona została wrażliwość na chemiczne czynniki terapeutyczne składające się na fenotyp MDR. Podobny efekt obserwowany był w przypadku komórek, w których ekspresji ulegał rybozym dla *mdr-1* [23].

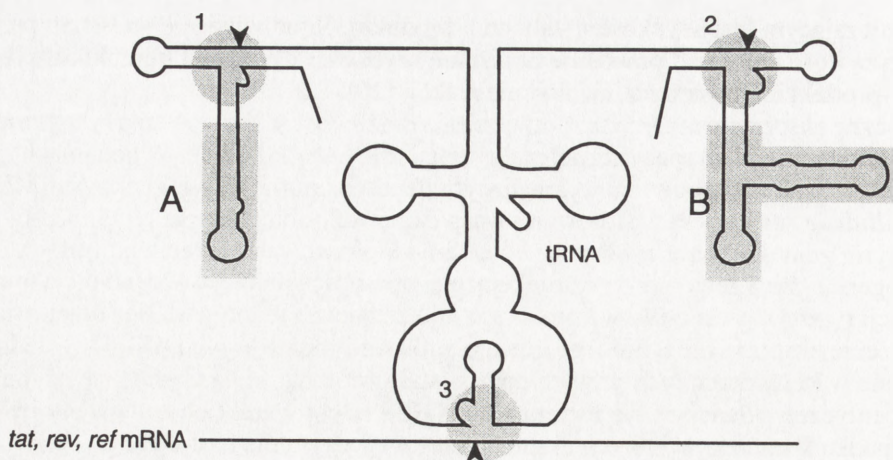
Interesującym przykładem zastosowania ekspresji katalitycznych RNA jako czynników antywirusowych jest wielofunkcyjny wektor ekspresyjny zawierający gen, którego transkrypt, poza rybozymbem skierowanym przeciwko genowi *tat* HIV-1, zawiera dwa odcinki rozpoznawane przez białka wirusowe Tat i Rev [11]. W wyniku wewnątrzcząsteczkowej katalizy przez rybozomy *hammerhead*, dochodzi do rozdzielania pierwotnego transkryptu na trzy cząsteczki RNA, z których dwie pełnią rolę kompetytorów dla RNA wirusowego, wiążąc białka Tat i Rev. Trzecia cząsteczka zawiera, wbudowany w pętlę antykodonu tRNA, rybozym rozpoznający i hydrolizujący mRNA *tat* (rys. 4) [34].

W mniejszym stopniu prowadzone są badania nad wykorzystaniem rybozymów typu *hairpin*, lecz i one okazały się być efektywnymi czynnikami obniżającymi ekspresję genów *in vivo* [15].

3. NOWE WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNE RNA I MOŻLIWOŚCI ICH WYKORZYSTANIA

Zainteresowanie badaniami nad RNA doprowadziło pod koniec lat osiemdziesiątych do opracowania metody, określanej terminem *genetyka in vitro*, pozwalającej na analizowanie w bardzo krótkim czasie dużych, złożonych populacji cząsteczek RNA [14]. Jednym z kierunków badań, prowadzonych przy wykorzystaniu tej techniki jest poszukiwanie RNA o nowych właściwościach, a w odniesieniu do rybozymów o nowych aktywnościach katalitycznych.

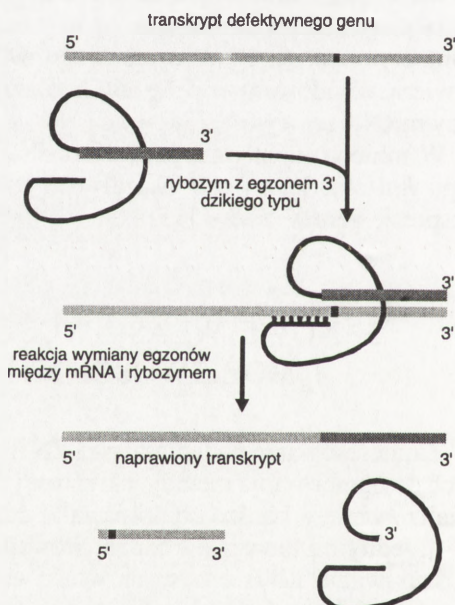
Z perspektywy zastosowania RNA jako narzędzi terapii genowej interesującą propozycją jest wykorzystanie odpowiednio zmienionego intronu grupy I z *Tetrahymena thermophila* do “naprawy” defektów genetycznych. Strategia ta polega na wykorzystaniu zdolności tego rybozymbu do katalizowania reakcji wymiany segmentów RNA (ang. *trans-splicing*). W reakcji tej rybozym jest donorem 3'-końcowego fragmentu RNA, który podlega przeniesieniu na cząsteczkę docelową. W wyniku tej



Rys. 4. Trzyskładnikowy transkrypt antywirusowy skierowany przeciwko HIV-1. Trzy rybozomy typu *hammerhead* zacięniowane są okręgami. Rybozomy 1 i 2 odpowiedzialne są za fragmentację pierwotnego transkryptu. Miejsca hydrolizy RNA przez rybozomy zaznaczono strzałkami. Zacięniowane regiony A i B wiążą, odpowiednio, białka Tat i Rev

reakcji powstaje RNA, mający pierwotny fragment 5'-końcowy i nowy (dostarczony przez rybozym) odcinek 3'-końcowy (rys. 5) [5,27]. Rybozomy tego typu mogłyby zostać wykorzystane do naprawy defektywnych genów odpowiedzialnych np. za choroby genetyczne. Dotychczasowe badania *in vivo*, prowadzone na komórkach bakteryjnych wykazały, że wykorzystanie tej strategii pozwala na odzyskanie aktywności inaktywowanych przez mutacje genów [27].

Innym możliwym zastosowaniem RNA w terapii jest ich wykorzystanie w zwalczaniu chorób autoimmunologicznych. Zastosowanie technik genetyki *in vitro* pozwoliło na selekcję cząsteczek RNA wykazujących wysokie powinowactwo do przeciwciał monoklonalnych dla autoantygenowego epitopu ludzkiego receptora insulinowego [7]. Utworzenie kompleksu RNA do przeciwciała uniemożliwia oddziaływanie z receptorem, co sugeruje, że miejsce wią-



Rys. 5. Strategia terapii genowej z wykorzystaniem rybozymów skonstruowanych w oparciu o intron grupy I *Tetrahymena thermophila*. Produkt zmutowanego genu naprawiany jest w drodze wymiany uszkodzonego fragmentu od końca 3' z rybozymem, który katalizuje tę reakcję

zania leży blisko, lub jest identyczne z miejscem wiązania antygeny. Fakt ten sugeruje, że cząsteczka RNA może przyjmować konformację, która upodabnia ją strukturalnie do białka [7].

4. OGRANICZENIA I PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA RYBOZYMÓW W TERAPII

Zanim katalityczne RNA będą mogły być wykorzystywane jako narzędzia badawcze czy też jako czynniki terapeutyczne *in vivo*, konieczne jest znalezienie rozwiązań wielu problemów, jak:

1. **Transport** – należy znaleźć sposoby dostarczania syntetycznych rybozymów lub kodujących je genów do odpowiednich komórek.

2. **Lokalizacja** – należy zapewnić odpowiednią lokalizację rybozymu w komórce docelowej, aby możliwy był kontakt z substratem.

3. **Stabilność** – w przypadku syntetycznych rybozymów niezbędne jest zwiększenie ich odporności na działanie enzymów nukleolitycznych.

4. **Regulacja ekspresji** – transkrypcja genów kodujących katalityczne RNA powinna być zoptymalizowana.

5. **Wpływ komponentów komórkowych** – skuteczne wykorzystanie rybozymów wymaga wiedzy na temat wpływu białek komórkowych na ich aktywność.

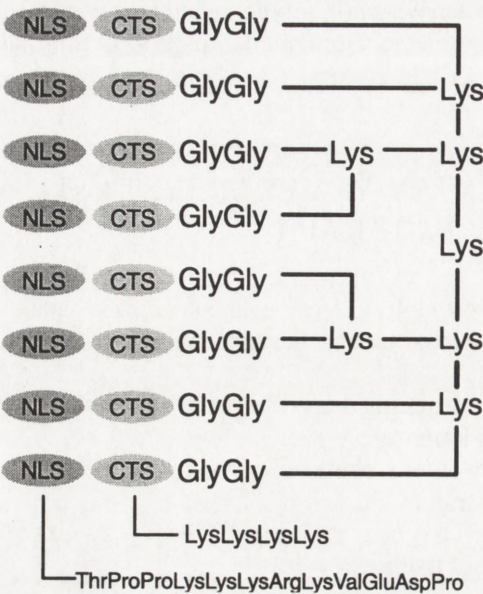
Poniżej przedstawione są propozycje niektórych z rozwiązań przedstawionych problemów.

4.1. PROBLEM TRANSPORTU I EKSPRESJI

Główną przeszkodą w zastosowaniach katalitycznych RNA *in vivo* jest dostarczenie ich do właściwych komórek. Bez znalezienia skutecznych rozwiązań tego problemu nie jest możliwe wykorzystanie rybozymów jako czynników terapeutycznych. Jest to oczywiście problem ogólny odnoszący się do wszystkich leków, a nie tylko do RNA.

Powszechnie wykorzystywaną strategią, w odniesieniu do syntetycznych rybozymów, jest opłaszczanie cząsteczek RNA lipidami kationowymi, które – poza ekranowaniem jego ujemnego ładunku – ułatwiają fuzję z błoną komórkową. [9]. Rozważane są możliwości wykorzystania cząsteczek nośnikowych w postaci peptydów lub przeciwciał, które mogłyby specyficznie kierować RNA do odpowiednich receptorów komórkowych [8].

Obiecującą technologią wydaje się być zastosowanie liposomów, w których wnętrzu zamknięte byłyby cząsteczki rybozymów. Jeżeli uda się zapewnić bezpośrednio dostarczenie RNA do cytoplazmy z pominięciem endosomów, strategia ta może stanowić podstawę farmakologicznego wykorzystania katalitycznych RNA. Innym, możliwym do zastosowania, nośnikiem katalitycznych RNA są rozgałęzione, syntetyczne peptydy – loligomery (rys. 6) [25]. Cząsteczki te mogą zostać wyposażone w



Rys. 6. Schemat budowy cząsteczki l oligomeru. Elementy oznaczone jako CTS i NLS warunkują, odpowiednio, transport cytoplazmatyczny i lokalizację w jądrze. Elementy te mogą być stosowane w różnych zestawieniach, w zależności od miejsca przeznaczenia

peptydy sygnałne kierujące je do odpowiednich kompartmentów w komórce, rozwiązując jednocześnie problem lokalizacji egzogennych rybozymów. Badania nad pobieraniem przez komórki l oligomerów oraz ich wewnątrzkomórkowym transportem potwierdziły przydatność tej klasy syntetycznych makrocząsteczek jako kierowanych nośników komórkowych [25]

Alternatywą dla syntetycznych egzogennych rybozymów jest ekspresja genów kodujących te RNA w komórkach docelowych. Podstawowym argumentem przemawiającym za takim podejściem jest obniżenie kosztów. Synteza RNA w ilościach niezbędnych dla wykorzystania ich jako środków farmakologicznych jest niezwykle kosztowna. Przy założeniu, że musiałyby być one podawane przez dłuższy okres, koszty byłyby ogromne. Jednorazowe wprowadzenie do komórek docelowych DNA zawierającego gen kodujący rybozym w dużym stopniu rozwiązuje ten problem. W chwili obecnej istnieje kilka

typów wektorów, skonstruowanych przy użyciu wirusów (retrowirusów, adenowirusa), które mogłyby być wykorzystane dla dostarczania genów do komórek [18,33]. Opracowywanie nowych wektorów, przenoszących geny kodujące rybozimy, prowadzone jest również pod kątem optymalizacji ekspresji. Działanie rybozymu w komórce ma polegać przede wszystkim na obniżaniu poziomu docelowego mRNA i w efekcie redukowaniu ekspresji białka. Poziom każdego RNA w komórce zależy od dwóch czynników: tempa syntezy i rozpadu. Ekspresja genów kodujących rybozimy powinna zatem być zoptymalizowana dla każdego indywidualnego przypadku [22].

4.2. PROBLEM LOKALIZACJI W KOMÓRCIE

In vitro, rybozimy i ich substraty mają możliwość swobodnej dyfuzji a szybkość reakcji zależy od szybkości tworzenia kompleksu rybozym-substrat i rozpadu kompleksu rybozym-produkt (wartość stałych asocjacji i dysocjacji). Odmienne wygląda sytuacja w komórce, gdzie RNA nie są równomiernie rozmieszczone w całej objętości, lecz raczej kierowane są do pewnych, specyficznych regionów. Taka kompartmentacja RNA, szczególnie zaznaczona w przypadku wirusów, może wpływać na zmniejszenie

szenie dostępności docelowych RNA dla rybozymów. W badaniach *in vivo*, stwierdzono, że wyposażenie genu kodującego rybozym w sekwencję stanowiącą sygnał dla mechanizmu pakowania wirusowego RNA do kapsydów wpływało na ok 90% obniżenie miana infekcyjnych wirusów, natomiast nie miało wpływu na translację mRNA w cytoplazmie [28]. Zastosowanie takiej strategii pozwala na zmniejszenie szans niespecyficznego degradacji komórkowych RNA.

4.3. PROBLEM STABILNOŚCI RNA

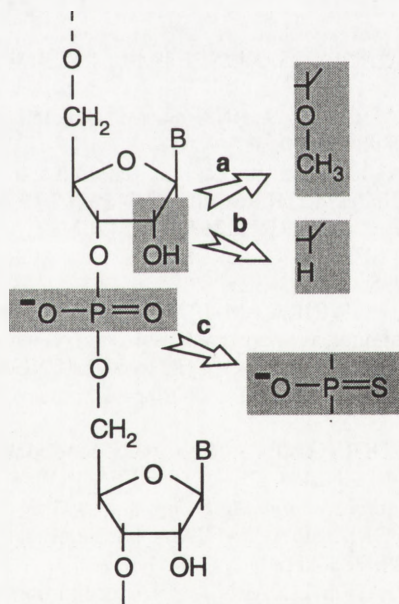
W przypadku dostarczania egzogenego RNA do komórek docelowych podstawowym problemem jest zapewnienie ich podwyższonej stabilności. Można to uzyskać poprzez modyfikację zwiększającą ich odporność na działanie enzymów nukleolitycznych. Ważne jest, aby tak zmodyfikowane RNA nadal charakteryzowały się wysoką aktywnością katalityczną. Strategia ta możliwa jest do zastosowania jedynie w odniesieniu do małych rybozymów (*hammerhead* i *hairpin*), które mogą być w całości syntetyzowane chemicznie.

Badania nad wpływem modyfikacji RNA na aktywność rybozymów wykazały, że mogą one występować w obrębie sekwencji odpowiedzialnych za rozpoznanie substratu. Istnieją jednak pewne, określone pozycje w rdzeniu katalitycznym, w których nie jest możliwe wprowadzenie żadnej zmiany, ani zasady ani szkieletu fosfocukrowego, bez drastycznego obniżenia aktywności enzymatycznej. Obecnie dostępna technologia chemicznej syntezy RNA pozwala na uzyskiwanie cząsteczek chimerycznych, w których część nukleotydów jest modyfikowana.

Modyfikacje, jakie z powodzeniem zastosowano w chemicznie syntetyzowanych rybozymach, zestawione na rysunku 7, obejmują:

- wymianę reszty cukrowej z rybozy na 2'-dezoksyrybozę (DNA) [20,26]
- modyfikację grupy 2'-OH rybozy (2'-O-metylo-ryboza) [13],
- zastąpienie reszty fosforanowej w łańcuchu fosfocukrowym przez tiofosforan [6,13,26].

Wprowadzenie wyżej wymienionych modyfikacji, o ile nie dotyczą one nukleotydów zaangażowanych w katalizę, nie wpływa na aktywność rybozymów. Inną możliwością zwiększenia stabilności rybozymów jest zastosowanie peptydowych kwasów nukleinowych (PNA – ang. *peptide nucleic*



Rys.7. Elementy RNA modyfikowane w celu zwiększenia odporności na działanie enzymów nukleolitycznych: (a) zastąpienie rybozy przez 2'-O-metylowaną pochodną; (b) 2'-dezoksyryboza (DNA); (c) modyfikacja wiązania fosfordwustrowego przez tiofosforanową pochodną

acids). Są to, podobnie jak kwasy nukleinowe, polimery zawierające zasady azotowe, jednak szkielet ich nie jest zbudowany z cukrów połączonych wiązaniami fosfodwustrowymi, ale z 2-aminoetylo glicyny, której cząsteczki połączone są wiązaniami peptydowymi [19].

4.4. UDZIAŁ BIAŁEK KOMÓRKOWYCH

Stosunkowo niewiele wiadomo na temat udziału i wpływu białek komórkowych na aktywność katalityczną RNA *in vivo*. Jak już wspomniano wyżej przy omawianiu działania hybrydowej cząsteczki RNA RNazy *P. E. coli* z EGS w komórkach ludzkich, białka komórkowe mogą działać stymulująco na działanie rybozemu przez osłanianie przed działaniem nukleaz lub zapewnienie odpowiedniego kontekstu strukturalnego.

Badania *in vitro* wykazały, że białko nukleokapsydu (NC, p7) wirusa HIV-1 w wyraźny sposób (10–20-krotnie) zwiększa efektywność reakcji katalizowanej przez rybozym typu *hammerhead* [30]. Szczegółowa analiza kinetyki reakcji w obecności białka NC sugeruje, że stymulacja ta jest związana z przyspieszeniem etapu ograniczającego szybkość reakcji, czyli uwalniania produktu. Jest to związane z aktywnością białka NC, którego rola polega na katalizowaniu procesu asocjacji i dysocjacji jednoniciowych odcinków kwasów nukleinowych. Jak dotychczas nie ma danych, czy analogiczna stymulacja ma miejsce *in vivo*.

LITERATURA

- [1] ALTMAN S, KIRSEBOM L, TALBOT S. Recent studies of ribonuclease P. *FASEB J* 1993; **7**: 7–14.
- [2] ALTMAN S. RNA enzyme-directed gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10898–10900.
- [3] ALTMAN S. RNase P in Research and Therapy. *Biotechnology* 1995; **13**: 327–329.
- [4] CECH TR, HERSCHLAG D, PICCIRILLI JA, PYLE AM. RNA catalysis by group I ribozyme. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17479–17482.
- [5] CECH TR. Group I Introns: New Molecular Mechanism for mRNA Repair. *Biotechnology* 1995; **13**: 323–326.
- [6] CHOWRIRA BM, BURKE JM. Extensive phosphorothioate substitution yields highly active and nuclease-resistant hairpin ribozymes. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 2835–2840.
- [7] DOUDNA JA, CECH TR, SULLENGER BA. Selection of an RNA molecule that mimics a major autoantigenic epitope of human insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2355–2359.
- [8] EDGINGTON S. Ribozymes: Stop Making Sense. *Biotechnology* 1992; **10**: 256–262.
- [9] FELGNER J, BENNET F, FELGNER P. Cationic lipid-mediated delivery of polynucleotides. *Methods: Comp Meth Enzymol* 1993; **5**: 67–75.
- [10] FORSTER AC, ALTMAN S. External Guide Sequences for an RNA Enzyme. *Science* 1990; **249**: 783–786.
- [11] GAIT MJ, KARN J. RNA recognition by the human immunodeficiency virus Tat and Rev proteins. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 255–259.
- [12] HASELOFF J, GERLACH WL. Simple RNA enzymes with a new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 1988; **334**: 585–591.

- [13] HEIDENREICH O, BENSELER F, FAHRENHOLZ A, ECKSTEIN F. High Activity and Stability of Hammerhead Ribozymes Containing 2'-Modified Pyrimidine Nucleosides and Phosphorothioates. *J Biol Chem* 1994; **269**: 2131–2138.
- [14] JOYCE GF. *In vitro* evolution of nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol* 1994; **4**: 331–336.
- [15] KIKUCHI Y, SASAKI N. Site-specific cleavage of natural mRNA sequences by newly designed hairpin catalytic RNAs. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 6751–6755.
- [16] LIU F, ALTMAN S. Inhibition of viral gene expression by the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Genes and Development* 1995; **9**: 471–480.
- [17] McCLAIN WH, GUERRIER-TAKADA C, ALTMAN S. Model substrates for an RNA enzyme. *Science* 1987; **238**: 527–530
- [18] MORGAN RA, ANDERSON WF. Human gene therapy. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**: 191–217.
- [19] NIELSEN PE, EGHOLM M, BUCHARDT O. Peptide Nucleic Acid (PNA). A DNA Mimic with a Peptide Backbone. *Bioconjugate Chem* 1994; **5**: 3–7.
- [20] PERREAULT J-P, WU T, COUSINEAU B, OGILVIE KK, CEDERGREN R. Mixed deoxy-ribo- and ribo- oligonucleotides with catalytic activity. *Nature* 1990; **344**: 565–567.
- [21] PLEY HW, FLAHERTY KM, McKAY DB. Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 1994; **372**: 68–74.
- [22] ROSSI JJ. Making ribozymes work in cells. *Curr Biology* 1994; **4**: 469–471.
- [23] SCANLON KJ, ISHIDA H, KASHANI-SABET M. Ribozyme-mediated reversal of multidrug resistant phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11123–11127.
- [24] SCOTT WG, FINCH JT, KLUG A. The Crystal Structure of an All-RNA Hammerhead Ribozyme: A Proposed Mechanism for RNA Catalytic Cleavage. *Cell* 1995; **81**: 991–1002.
- [25] SHELDON K, LIU D, FERGUSON J, GARIEPY J. Lolligomers: Design of de novo peptide-based intracellular vehicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2056–2060.
- [26] SHIMAYAMA T, NISHIKAWA F, NISHIKAWA S, TAIRA K. Nuclease-resistant chimeric ribozymes containing deoxyribonucleotides and phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 2605–2611.
- [27] SULLENGER BA, CECH TR. Ribozyme-mediated repair of defective mRNA by targeted trans-splicing. *Nature* 1994; **371**: 619–622
- [28] SULLENGER BA, CECH TR. Tethering Ribozymes to a Retroviral Packaging Signal for Destruction of Viral RNA. *Science* 1993; **262**: 1566–1569
- [29] SYMONS RH. Ribozymes. *Curr Opin Struct Biol* 1994; **4**: 322–330.
- [30] TSUCHIHASHI Z, KHOSLA D, HERSCHLAG D. Protein Enhancement of Hammerhead Ribozyme Catalysis. *Science* 1993; **262**: 99–102.
- [31] YUAN Y, ALTMAN S. Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme. *EMBO J* 1995; **14**: 159–168.
- [32] YUAN Y, HWANG E, ALTMAN S. Targeted cleavage of mRNA by human RNase P. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8006–8010.
- [33] YU M, OJWANG J, YAMADA O, HAMPEL A, RAPPAPORT J, LOONEY D, WONG-STAL F. A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6340–6344.
- [34] YUYAMA N, OHKAWA J, KOGUMA T, SHIRAI M, TAIRA K. A multifunctional expression vector for an anti-HIV-1 ribozyme that produces 5'- and 3'-trimmed trans-acting ribozyme, targeted against HIV-1 RNA, and cis-acting ribozymes that are designed to bind and thereby sequester trans-activator proteins such as Tat and Rev. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 5060–5067.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA CHORÓB GENETYCZNYCH

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF GENETIC DISEASES

Ryszard SŁOMSKI^{1,2,3}, Jolanta KWIATKOWSKA²

¹Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań,

²Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej, Poznań;

³Laboratorium Genetyki Molekularnej, Poznań

Streszczenie: Technologia rekombinacji DNA umożliwiła podjęcie badań nad chorobami genetycznymi bezpośrednio w miejscach mutacji, a także ocenę ekspresji zmutowanej informacji genetycznej na poziomie RNA i białek. Bezpośrednie zastosowanie technologii rekombinacji DNA w genetyce człowieka umożliwiło dokładną diagnostykę chorób genetycznych, przy czym postęp jest wręcz dramatyczny. Genetyka molekularna stanowi obecnie podstawowe narzędzie nowoczesnej patologii.

Słowa kluczowe: Diagnostyka DNA, mutacje, polimorfizm DNA, wykrywanie nosicielstwa

Summary: Recombinant DNA technology has made possible study of genetic disease at the level of primary lesion and the *in vitro* expression of normal and mutant genetic information at the level of RNA and protein. The most immediate practical application of recombinant DNA technology in human genetics is in the sphere of improved disease diagnosis where advances are truly dramatic. Molecular genetics is now an indispensable tool of modern pathology.

Key words: DNA diagnostics, mutations, DNA polymorphism, detection of carriers

1. WSTĘP

Pierwsze badania diagnostyczne z zastosowaniem analizy DNA zostały przeprowadzone w 1978 roku przez Kana i Dozy'ego [16] i niezależnie przez Orkina i wsp.

[24]. Kan i Dozy w swoich badaniach zastosowali analizę restrykcyjną DNA do wykrycia mutacji w 6 kodonie β globiny (tranzycji A \rightarrow T) prowadzącej do wystąpienia anemii sierpowatej oraz jako sondę molekularną fragment genu β globiny człowieka. Okazało się, że tą metodą, zwaną obecnie analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), można było rozróżnić nie tylko osoby chore od zdrowych, lecz również wykryć heterozygoty (nosicieli choroby). Z kolei Orkin do wykrycia tej samej mutacji zastosował hybrydyzację z dwoma syntetycznymi sondami oligonukleotydowymi umożliwiającymi rozróżnienie alleli prawidłowych od zmutowanych. Ta technika diagnostyczna została określona jako ASO (ang. *allele specific oligonucleotide*) i podobnie jak technika RFLP umożliwia wykrywanie nosicielstwa choroby. Zarówno Kan i Dozy, jak i Orkin i wsp. stosowali w swych badaniach sondy molekularne znakowane ^{32}P . W badaniach zachodziło zatem wzmocnienie sygnału sondy molekularnej poprzez zastosowanie radioizotopu do wykrywania charakterystycznych prążków hybrydyzacyjnych, z tym, że badanie RFLP miało zdecydowanie większą czułość, gdyż do sondy molekularnej wbudować można było więcej ^{32}P - αNTP niż w przypadku badania ASO, w którym najczęściej znakowany był koniec 5' oligomeru ^{32}P - γNTP , a wprowadzenie większej liczby znakowanych nukleotydów do sondy oligonukleotydowej (najczęściej 19-nukleotydowej) prowadziło do jej szybkiej radiolizy. Nic zatem dziwnego, że badanie typu RFLP uległo w latach osiemdziesiątych rozpowszechnieniu i dominowało nad badaniami ASO. Rynek badań diagnostycznych ograniczony był jednak głównie do chorób genetycznych. Przed wprowadzeniem badań molekularnych diagnostyka chorób genetycznych opierała się na cytogenetyce, a w przypadku chorób metabolicznych polegała głównie na oznaczaniu aktywności enzymów, których niedobór warunkował te choroby. Obecnie diagnostyka molekularna obejmuje poza genetyką człowieka, coraz to nowe dziedziny, takie jak: immunologia, onkologia, medycyna sądowa, choroby krążenia, wykrywanie patogenów (tab. 1).

Intensywne wdrażanie technologii badań DNA w diagnostyce molekularnej rozpoczęło się po wprowadzenia metody amplifikacji DNA *in vitro* przez Saiki i wsp. w 1985 roku [29]. Uzyskali oni ponad 200.000-krotną amplifikację fragmentu genu β globiny stosując parę starterów (primerów) komplementarnych do fragmentu tego genu i flankujących region amplifikacji oraz fragment Klenowa polimerazy z *Escherichia coli*. Zaledwie rok później Mullis [22] wprowadził do amplifikacji DNA termostabilną polimerazę Taq i opracował reakcję łańcuchową polimerazy (PCR). Technika PCR jest bez wątpienia jedną z najważniejszych technik biologii molekularnej i umożliwiła gwałtowny rozwój diagnostyki molekularnej ostatnich 10 lat. Duże firmy farmaceutyczne o ugruntowanej pozycji na rynku diagnostycznym bardzo szybko zauważyły potencjał tej techniki i zaczęły stopniowo wprowadzać na rynek zestawy diagnostyczne do badań DNA. Można zadać pytanie, czy amplifikacja sekwencji, bo z nią mamy do czynienia w technice PCR, powtórzy rewolucję kliniczną, która nastąpiła po wprowadzeniu przeciwciał monoklonalnych. Wszyscy potencjali diagnostyczni zwrócili się w kierunku chorób zakaźnych, natomiast zainteresowania chorobami genetycznymi przesunęły się na dalszy plan. Krok ten uczyniono głównie dlatego, aby wykazać znaczenie kliniczne wyników badań DNA, oszacować koszty

TABELA 1. Analiza DNA w diagnostyce molekularnej chorób genetycznych na tle innych zastosowań badań DNA

1. Badania bezpośrednio dotyczące człowieka	
Choroby infekcyjne	Wirusy Bakterie Pasożyty
Genetyka	Wady wrodzone Predyspozycje Prognozowanie
Choroby nowotworowe	Diagnostyka Monitorowanie Prognozowanie Predyspozycja
Identyfikacja	Badanie ojcostwa Kryminalistyka Transplantologia
2. Badania pośrednio związane z człowiekiem	
	Produkcja żywności Choroby zwierząt Biotechnologia
3. Badania naukowe	

analizy chorób zakaźnych, a dopiero w drugim etapie przesunąć zainteresowania w kierunku badań nowotworów i chorób genetycznych. Zakłada się, że około 300 mln dolarów w skali roku przeznaczonych jest właśnie na ten cel. Pierwszy etap wdrożenia badań DNA do analizy chorób zakaźnych poświęcony jest głównie opracowaniu testów molekularnych dla badań AIDS, chlamydii, wirusowego zapalenia wątroby i gruźlicy.

Doskonałym przykładem postępu diagnostyki molekularnej jest analiza genu DMD. Jest on największym opisanym dotąd genem, którego wielkość w badaniach przeprowadzanych za pomocą techniki elektroforezy w zmiennym polu określono na 2,5 mln par zasad (2,5 Mbp), co stanowi ponad 1% DNA chromosomu X, 0,1% genomu człowieka. Jest zatem ponad 12 razy większy od olbrzymiego genu kodującego czynnik VIII krzepnięcia krwi. Liczba eksonów genu DMD wynosi 78, a cDNA dystro-

finy (białka kodowanego przez gen DMD) złożony jest z 13 973 nukleotydów. Jeszcze osiem lat temu jedynym molekularnym osiągnięciem było zmapowanie genu w prążku Xp21. Od 1987 r. nastąpił przełom w badaniach genu DMD. W ciągu roku wyizolowano gen, poznano strukturę cDNA i opisano produkt białkowy [14,18,19,21]. Obecnie gen DMD należy już do dobrze poznanych genów człowieka. W ciągu pięciu lat od poznania sekwencji cDNA możliwa jest kompleksowa analiza mutacji genu DMD.

2. RODZAJE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ

Opracowane w minionej dekadzie metody badań DNA owocują obecnie coraz szerszym wprowadzaniem analiz DNA do badań diagnostycznych. Można przyjąć, że lata dziewięćdziesiąte przejdą do historii jako okres rozpowszechnienia diagnostyki molekularnej. Badania DNA dołączyły w ten sposób do zaakceptowanych technik diagnostycznych, które do tej pory polegały głównie na reakcjach immunochemicznych antygeny z przeciwciałem. W tabeli 2 przedstawiono rozwój analitycznych technik diagnostycznych na tle najważniejszych wydarzeń w badaniach DNA.

TABELA 2. Rozwój badań diagnostycznych na tle ważniejszych osiągnięć w badaniach DNA

Test diagnostyczny		Badania molekularne DNA
Precypitacja białek	1945	
	1953	Struktura DNA
Test aglutynacji	1965	
	1968	Enzymy restrykcyjne
RIA	1970	
	1972	Klonowanie DNA
	1975	Transfer Southerna
	1977	Izolacja genu człowieka
	1977	Sekwencjonowanie DNA
	1978	RFLP
ELISA	1983	
	1985	PCR
DNA	1990	

Przede wszystkim zauważyć można znaczne opóźnienie w powszechnym wdrożeniu analizy DNA w porównaniu do innych technik, np. techniki ELISA, którą prawie natychmiast wdrożono w badaniach rutynowych. Opóźnienie wynika nie tyle z kosztów wykonywania analiz DNA, chociaż i te odgrywają ważną rolę, lecz przede wszystkim z silnej pozycji testów immunochemicznych na rynku diagnostycznym. Udział badań DNA na rynku diagnostycznym w 1994 roku nie przekroczył jeszcze 10% [20].

We współczesnej diagnostyce molekularnej wyróżnić można pięć zasadniczych grup badań:

- 1) polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (RFLP),
- 2) z zastosowaniem oligomerów komplementarnych dla allelu (ASO),
- 3) wykrywania rearanzacji,
- 4) wykrywania delecji,
- 5) wykrywania mutacji punktowych.

W diagnostyce molekularnej bardzo często zachodzi konieczność dobrania techniki badawczych tak, aby zmieścić się w określonym przedziale czasu. Dla wykrywania patogenów i diagnostyki preimplantacyjnej limit czasu wynosi zaledwie kilka godzin, w diagnostyce prenatalnej kilka dni, a w poradnictwie genetycznym i medycynie sądowej kilka tygodni.

3. TRANSFER SOUTHERNA W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ

Historycznie najwcześniejsze jest badanie typu RFLP z grupy pośrednich analiz genu. W tym przypadku wykonuje się testy rodzinne obejmujące rodzeństwo i rodziców chorego. Nie jest tu określany defekt genu, lecz jedynie jego dziedziczenie zawierające mutację. Najczęściej genomowy DNA (5–10 µg) badanej rodziny trawiony jest enzymem restrykcyjnym, a następnie wykonywana jest analiza za pomocą

transferu Southerna. Unieruchomiony na filtrze DNA jest poddawany hybrydyzacji z radioaktywną sondą znakowaną ^{32}P NTP(α) przy udziale polimerazy DNA. Coraz częściej znakowanie sond molekularnych radioizotopami fosforu (^{32}P i ^{33}P) zastępowane jest znakowaniem nukleotydami zawierającymi ligandy, które na etapie detekcji rozpoznawane są swoistymi przeciwciałami. W opinii autorów największe zastosowanie znajdują sondy biotynylowane, w których wykrycie ligandu przebiega z zastosowaniem reakcji immunochemicznych i kolorymetrii, jak również sondy, dla których końcowym etapem detekcji jest chemiluminescencja. Ostatnio największy postęp nastąpił w detekcji przeprowadzanej za pomocą metody chemiluminescencyjnej. Dla wielu sond osiągnięto tu czułość uzyskiwaną dla sond radioaktywnych, tzn. ilość genomowego DNA w badaniach nie przekracza kilku μg .

Diagnostyka molekularna oparta na badaniach typu RFLP jest jak dotychczas najczęściej stosowana. Wprawdzie nie identyfikuje mutacji w DNA, lecz umożliwia rozróżnienie zmutowanych alleli. Analiza typu RFLP jest szczególnie cenna w poradnictwie genetycznym, w diagnostyce prenatalnej i preinplantacyjnej, ze względu na ograniczenia czasowe, które (np. w przypadku diagnostyki preimplantacyjnej) sprowadzają się jedynie do 24 godzin. Diagnostyka prenatalna pozostawia więcej czasu na wykonanie badań. Jednakże dla licznej grupy chorób genetycznych określenie mutacji w krótkim czasie badania jest niemożliwe i dlatego jest tu najczęściej stosowane badanie typu RFLP.

Nową, oryginalną propozycją amplifikacji sygnału na cele diagnostyczne jest tzw. bDNA (ang. *branched DNA*) zaproponowany przez firmę Chiron. W systemie tym zachodzą dwie reakcje hybrydyzacji do detekcji DNA i amplifikacji sygnału. W pierwszej reakcji sonda molekularna hybryduje z komplementarną sekwencją matrycy. Sonda molekularna najczęściej związana jest ze stałym podłożem, np. ścianką mikropłytki. Druga sonda molekularna wiąże wychwyconą przez pierwszą sondę matrycę z amplifikującym sygnał DNA, którym jest syntetyczny DNA silnie rozgałęziony, o długości ok. 1000 pz. – bDNA. Rozgałęziony DNA jest zsyntetyzowany w ten sposób, że zawiera tysiące chemiluminescencyjnych ligandów, które wykrywane są przez chemiluminescencję digoksyetanu [20]. W metodzie bDNA nie wymagane jest oczyszczenie próbek. Według zapewnień firmy metoda bDNA może wykryć już 60 cząsteczek danej matrycy w 1 ml.

4. TECHNIKA AMPLIFIKACJI DNA W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ

W badaniach typu RFLP obok metody transferu Southerna można zastosować reakcję łańcuchową polimerazy (PCR). Diagnostyka molekularna oparta o PCR rozwija się bardzo dynamicznie i dla wielu chorób zastępuje *Southern blotting*.

Metoda PCR została wprowadzona w połowie lat osiemdziesiątych przez firmę Cetus i dokonała przełomu w badaniach molekularnych. Technika PCR stosuje termofilną polimerazę DNA (polimerazę Taq) do uzyskania amplifikacji odcinka

DNA między parami starterów (primerów). Reakcja przebiega przy nadmiarze primerów, które hybrydują z matrycą w 60–65°C, natomiast wydłużanie primerów przebiega w 72°C. Matryca DNA, jak i powstające amplikony (produkty PCR) są cyklicznie denaturowane przez ogrzewanie w 94°C. Reakcja przebiegająca w ten sposób wymaga specjalistycznego sprzętu – amplifikatorów (termocyklerów). Każdy cykl trwa ok. 3 min i powstające amplikony służą jako matryce w następnych cyklach reakcji prowadząc do logarytmicznego przyrostu ilości produktów.

Metoda PCR w krótkim czasie dała początek kilku innym metodom, wariantom PCR umożliwiającym amplifikację nie tylko poznanych fragmentów DNA, lecz również fragmentów, co do których brakuje jeszcze informacji o sekwencji. Przykładem może być wariant PCR, tzw. odwrócona PCR (ang. *inverted PCR*), w której badany fragment DNA łączy się z fragmentem znanym lub wklonowanym w wektor, a startery są specyficzne dla znanego odcinka DNA [31]. Innym wariantem jest wewnętrzny PCR (ang. *nested PCR*), w którym korzysta się z dwóch par starterów, przy czym druga para umieszczona jest wewnątrz w stosunku do pierwszej pary [13]. Przez amplifikację z pierwszą parą starterów, w której zalecane jest, aby amplifikowano duże fragmenty (1000–2000 pz), a następnie przez drugą amplifikację znacznie mniejszych fragmentów, uzyskać można podwyższenie specyficzności reakcji przy jednoczesnym wyeliminowaniu fragmentów niespecyficznych.

Matrycą w reakcji PCR może być również RNA, a enzymem stosowanym w tej sytuacji jest odwrotna transkryptaza z *Haemophilus*. Ostatnio dokonywane są próby koamplifikacji nieznannej matrycy jednocześnie z matrycą o znanym stężeniu, co umożliwić ma uzyskanie wyników ilościowych. Jest to rozwinięcie jednego z najważniejszych wariantów PCR, tzw. multipleks PCR, w którym przy zastosowaniu kilku par starterów można jednocześnie przeprowadzać amplifikację kilku regionów jednego genu lub wykrywać określone mutacje kilku genów [5,6]. Tego typu postępowanie stosowane jest powszechnie w wykrywaniu delecji genu DMD (dystrofia mięśniowa Duchenne'a) lub mutacji punktowych w CFTR (mukowiscydoza). Uzyskać można nawet 13 amplikonów, jednak z przyczyn praktycznych wskazane jest, aby ich liczba wahała się między 5 a 7, bo ułatwia to dobranie warunków PCR, jak i rozdziały amplikonów w żelach analitycznych [2,23]. Teoretycznie wariantów PCR można by przygotować znacznie więcej, jednak w praktyce, szczególnie ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się rozwojowi metod ograniczających zanieczyszczenie reakcji, a różnego rodzaju warianty podstawowej reakcji PCR znalazły się na drugim planie. Jak dotąd największy postęp w zwalczaniu zanieczyszczeń towarzyszących metodzie PCR w badaniach klinicznych odnotowała firma Roche, która przy wykonywaniu testów diagnostycznych w mieszaninie reakcyjnej w miejsce TTP wprowadziła UTP. Umożliwiła to działanie na matrycowy DNA N-glikozyłaza uracylową celem usunięcia ewentualnych amplikonów zanieczyszczających matrycowy DNA, przy czym N-glikozyłaza uracylowa działa wyłącznie na DNA zawierający uracyl i może być po działaniu na taki DNA łatwo zinktywowana poprzez ogrzewanie we wstępnym, denaturującym etapie PCR. Ta ciekawa technologia pochodzi z licencji firmy Life Technologies i określona została jako AmpErase.

Badanie diagnostyczne z zastosowaniem PCR sprowadza się często do uzyskania fragmentu DNA, w którym występuje polimorfizm, a następnie do trawienia fragmentu enzymem restrykcyjnym specyficznym dla miejsca wykazującego polimorfizm. Polimorfizm DNA wykrywany za pomocą PCR wykorzystuje się, np. do ustalenia nosicielstwa zmutowanego genu w rodzinach z ryzykiem wystąpienia częstych chorób genetycznych: mukowiscydozy czy dystrofii mięśniowej. W przypadku dystrofii mięśniowej warunkowanej delecjami genu DMD można do celów diagnostycznych wykorzystać naturalny polimorfizm genu DMD, wykrywany poprzez trawienie produktów PCR enzymami restrykcyjnymi XmnI, BamHI lub TaqI [27]. Dystrofia mięśniowa jest sprzężona z płcią i występuje najczęściej u chłopców. Zarówno chorzy, jak i ich ojcowie, są hemizygotami, dlatego występuje u nich tylko jeden allel, natomiast w przypadku wystąpienia polimorfizmu DNA u matki i sióstr chorego możliwe jest ustalenie nosicielstwa zmutowanego genu.

Najważniejszym zastosowaniem PCR w diagnostyce jest wykorzystanie tej techniki do uzyskania zwiększonej ilości DNA przed jego dalszą analizą. Po uzyskaniu fragmentu genu możliwe jest dalsze jego badanie za pomocą metody RFLP, a uzyskany wynik podobny jest jak w przypadku zastosowania metody transferu Southerna. Technika PCR zastępuje często metodę transferu Southerna, ponieważ jest znacznie mniej czasochłonna. Już w 1988 r. Williams i wsp. [32] przeprowadzili pełną diagnostykę jednej z najczęstszych chorób genetycznych – mukowiscydozę, byłoby niemożliwe bez zastosowania techniki PCR. Obecnie PCR-RFLP stosowany jest dla wielu chorób genetycznych m.in. wspomnianej już mukowiscydozy, fenyloketonurii, niedoboru α 1-antytrypsyny, anemii sierpowatej, hemofilii, dystrofii mięśniowych, zespołu łamliwego chromosomu X (FraX).

Tak jak wspomniano PCR-RFLP może być stosowana do bezpośredniego identyfikowania mutacji lub określania nosicielstwa. W przypadku określania nosicielstwa okres jednego tygodnia, niezbędny do wykonania badania metodą transferu Southerna, ulega skróceniu do kilku godzin przy zastosowaniu PCR. PCR-RFLP można zastosować również w badaniach, w których sztucznie wprowadza się miejsce restrykcyjne w celu zidentyfikowania mutacji. Ten rodzaj RFLP może być wykonany wyłącznie w połączeniu z reakcją PCR.

Ukazały się ponadto doniesienia o wykrywaniu delecji i mutacji punktowych poprzez analizę mRNA limfocytów krwi obwodowej, z wykorzystaniem zjawiska nieuprawnionej transkrypcji (ang. *illegitimate transcription*), wykazanej po raz pierwszy przez Chelly'ego i wsp. [7]. W tej metodzie materiałem wyjściowym jest całkowity RNA limfocytów. Na matrycy RNA przeprowadza się syntezę cDNA stosując primery specyficzne dla genu, a następnie dwie reakcje PCR z wewnętrznymi primerami (ang. *nested-PCR*). Ukazało się już kilka doniesień o zastosowaniu tej metody nie tylko do analizy patologicznych transkryptów, lecz również do ustalania nosicielstwa [3,25]. Szczególnie cenne jest bezpośrednie ustalanie nosicielstwa, gdyż próby jego ustalenia za pomocą metod: hybrydyzacji z subklonami cDNA, PCR lub analizy sprzężeń nie dają w wielu przypadkach osób z rodzin z ryzykiem informatywnych wyników [26,28]. Metoda PCR należy bez wątpienia do najważniejszych technik

amplifikacji DNA *in vitro* i wykorzystywana jest w 70% laboratoriów diagnostycznych, lecz uzyskała również konkurenta w postaci reakcji LCR (ang. *ligase chain reaction*), która z powodu unikatowych właściwości stała się bardzo atrakcyjna dla badań diagnostycznych. W metodzie LCR stosowane są startery o długości 50–60 nukleotydów i termofilna ligaza. Startery przygotowane są w ten sposób, aby hybrydowały z matrycą pozostawiając jedynie jeden wolny nukleotyd między nimi. Jedynie startery, które hybrydowały z matrycą, ulegają ligacji. Po ligacji i denaturacji przebiegających cyklicznie podobnie jak w PCR powstające fragmenty DNA służą jako matryca w kolejnych cyklach amplifikacji [1,4]. Podobnie jak w PCR reakcja LCR charakteryzuje się logarytmicznym przyrostem ilości produktów. Okazało się, że modyfikacje podstawowych wersji metody LCR mogą znaleźć natychmiastowe zastosowanie w diagnostyce i jednocześnie stanowić punkt wyjścia do automatyzacji diagnostyki. Dla testów klinicznych obydwie startery mogą być przygotowane w ten sposób, że do ich końców 5' przyłączone są ligandy zakotwiczące i ligandy detekcyjne, co w rezultacie prowadzi do tego, że jedynie startery, które uległy ligacji mogą być zidentyfikowane dzięki jednoczesnemu zakotwiczeniu i detekcji.

Amplifikacja sekwencji RNA jest często szybsza i wydajniejsza niż amplifikacja DNA, lecz występują tu ograniczenia – przede wszystkim konieczność dobrego oczyszczenia badanej matrycy, jak i jej zabezpieczenia przed działaniem nukleaz. Technika określona jako NASBA (ang. *nucleic acid sequence based amplification*) stosuje 3 enzymy do amplifikacji pojedynczoniowych RNA lub dwuniciowych DNA. Reakcja przebiega w warunkach izotermicznych, a najczęściej stosowanymi enzymami są: odwrotna transkryptaza AMV-RT, polimeraza RNA T7 i RNaza H [9,17]. Reakcję opracowano do wykrywania wirusów DNA, lecz obecnie jej amplifikacja została rozszerzona o wykrywanie wirusów RNA, retrowirusów, wykrywanie żywych patogenów i monitorowanie proliferacji komórek nowotworowych. Technika NASBA okazała się tak samo czuła jak PCR przy wykrywaniu wirusa HIV-1. Jak już zaznaczono NASBA jest reakcją izotermiczną, a więc nie korzysta się dla jej wykonania z amplifikatora.

5. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA A WYKRYWALNOŚĆ MUTACJI

Wiele ośrodków preferuje wykonanie badań za pomocą jednej z dwóch wspomnianych już metod, tj. transferu Southerna lub PCR. Obydwie metody są porównywalne i mogą być zamiennie stosowane. W badaniach wykonanych ostatnio przez autorów pracy zaobserwowano rozbieżność między tymi metodami, sięgającą kilku procent, nie mającą jednak wpływu na wynik diagnostyczny. Przy omawianiu wykrywalności mutacji można przedstawić diagnostykę molekularną dwóch dużych genów człowieka: DMD i CFTR. Istotną różnicą dla obydwu genów jest to, że u podłoża dystrofii mięśniowych leżą delecje genu DMD, natomiast mukowiscydoza wywołwana jest mutacjami punktowymi genu CFTR. Tak jak zaznaczono, gen DMD jest największym genem, stąd niemożliwa jest analiza całego genu. Okazuje się, że analiza genu w 20 regionach umożliwia wykrycie blisko 100% wszystkich delecji. Własne doświadcze-

nia z zastosowaniem reakcji PCR i 19 par primerów potwierdzają te doniesienia. Przy wykrywalności delekcji zbliżonej do 100% autorzy pracy włączyli do badań jeszcze jeden region genu DMD (ekson 46). Nie zwiększyło to wykrywalności delekcji, lecz umożliwiło dokładne poznanie rozmiarów delekcji u 52% chorych, a co za tym idzie określenie ewentualnego przesunięcia ramki odczytu. Za szerokim zastosowaniem reakcji PCR przemawia krótki czas potrzebny do zbadania 20 najbardziej podatnych na mutacje eksonów, zaprzestanie pracy z izotopami, a także znaczne obniżenie kosztów badań diagnostycznych.

W odróżnieniu od delekcji stanowiących najczęstszą formę mutacji występującą u około 65% chorych duplikacje genu DMD występują jedynie u niewielkiej grupy chorych. Precyzyjne badanie odsetka pacjentów, u których występują duplikacje nie jest obecnie możliwe ze względu na brak metody analitycznej, umożliwiającej rozróżnienie prawidłowych fragmentów genu od części, która uległa duplikacji. W doniesieniach literaturowych oceniano duplikacje poprzez pomiar intensywności prążków hybrydizacyjnych, co do których istniało założenie, że uległy one duplikacji w porównaniu z prążkami kontrolnymi. Badania te mają jednak bardzo przybliżony charakter, a ostateczne określenie duplikacji jedynie na podstawie intensywności prążka hybrydizacyjnego jest bardzo dyskusyjne. Badania te, oparte głównie na metodzie transferu Southerna są trudne do przeprowadzenia ze względu na racochłonny dobór warunków hybrydizacji. Również stosując reakcję PCR-multiplex wykrycie duplikacji jest praktycznie niemożliwe. Różna intensywność poszczególnych produktów PCR obserwowana po rozdiale elektroforetycznym jest często wynikiem zróżnicowanej wydajności syntezy poszczególnych fragmentów genu. Istnieją wprawdzie doniesienia o pomiarach intensywności fluoryzujących produktów PCR w urządzeniach wykorzystujących w tym celu czytniki laserowe, jednak metodę tę trudno zweryfikować i porównać z innymi. Z przykładu tego wynika, że skuteczność diagnostyki molekularnej przy wykrywaniu mutacji zależy od dostępności metody analitycznej, jak również od częstości występowania mutacji w danym genie.

Innym przykładem jest badanie genu CFTR, którego mutacje warunkują wystąpienie mukowiscydozy. Do końca 1994 roku opisano ponad 400 mutacji tego genu o bardzo zróżnicowanej częstości występowania. Najczęstszą mutacją genu CFTR jest mutacja oznaczona symbolem $\Delta F508$, która w populacji europejskiej występuje z częstością około 70%. Częstość kilku innych mutacji (G551D, R553X, G542X, 1717-1G-A, S549R) szacuje się na 1–3%, natomiast pozostałe występują bardzo rzadko. W diagnostyce molekularnej objęcie analizą wszystkich poznanych mutacji w genie CFTR byłoby niemożliwe. Okazuje się jednak, że wykonanie badań dla sześciu najczęstszych mutacji zwiększa wykrywalność do 85–90%, w zależności od badanej populacji. Dla kilku populacji, np. duńskiej lub Żydów askenazyjskich, gdzie heterogenność mutacji jest mała, wykrywalność przekracza 95%. W badaniach mukowiscydozy u rodzin obciążonych ryzykiem jej występowania szansa wykrycia defektu genu CFTR wzrasta prawie do 100%, ponieważ analiza mutacji może być uzupełniona o badania sprzężeń polimorficznych markerów [8,11,12].

W tabeli 3 przedstawiono możliwości prowadzenia diagnostyki molekularnej z zastosowaniem wzmocnienia sygnału lub amplifikacji wybranych sekwencji DNA.

TABELA 3. Diagnostyka molekularna z zastosowaniem wzmocnienia sygnału detekcji lub amplifikacji wybranych sekwencji DNA

Rodzaj analizy	Wzmacnianie sygnału	Amplifikacja sekwencji		
		PCR	LCR	NASBA
Analiza pośrednia	RFLP Minisatelity	RFLP Minisatelity Mikrosatelity		
Wykrywanie mutacji	RFLP	SSCP DSCP HD SSCP+HD DG MCC PTT		RNaza A
Charakterystyka mutacji	RFLP ASO bDNA	PCR RFLP ASO ASA Sekwencja	LCR	RNaza A

Matériau wyjściowym w diagnostyce molekularnej może być DNA lub RNA izolowany bezpośrednio po pobraniu krwi lub tkanki lub DNA izolowany z materiału przechowywanego, przesyłanego drogą pocztową lub utrwalonego. Jedynie w pierwszym przypadku możliwe jest uzyskanie zarówno wysokocząsteczkowego DNA jak i RNA. Zarówno RNA i DNA mogą być stosowane w diagnostyce molekularnej w formie wyjściowej lub po amplifikacji *in vitro*. Zauważyć można, że obecna diagnostyka molekularna przebiega głównie poprzez amplifikację DNA metodą PCR. Metoda PCR stanowi metodę wyjściową dla większości analiz molekularnych.

ASA	Amplifikacja określonych alleli z zastosowaniem starterów rozpoznających allel dziki i allele zmutowane
ASO	Hybrydyzacja oligomerów specyficznych dla allelu z badanym DNA. Oligomery łączą się wybiórczo z allelem dzikim lub zmutowanym
DG	Metoda analityczna polegająca na obserwacji denaturacji dwuniciowego DNA we wzrastającym gradiencie czynnika denaturującego (mocznika lub temperatury) podczas rozdzielania elektroforetycznego w żelach poliakrylamidowych
HD	Metoda analizy mutacji poprzez obserwację heterodupleksów DNA:DNA między zmutowanym DNA a DNA typu dzikiego. Niesparowania heterodupleksów opóźniają migrację w żelach poliakrylamidowych
LCR	Reakcja łańcuchowa ligazy może wykryć DNA (lub patogen). Umożliwia identyfikację mutacji poprzez dobranie starterów dla miejsca zmutowanego
MCC	Metoda chemiczna, wykrywanie mutacji polega na działaniu czterotlenku osmu, hydroksyloaminy i piperydiny w miejscach niesparowań heterodupleksów DNA:DNA. Heterodupleks ulega fragmentacji, a powstałe fragmenty wykrywane są w badaniu elektroforetycznym
Mikrosatelity	Powtórzenia 1–6
Minisatelity	7–100-nukleotydowe powtórzenia

- RFLP** Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA. Może być stosowana do wykrywania polimorfizmu DNA i analizy sprzężeń lub poprzez zastosowanie enzymu restrykcyjnego dla miejsca mutacji do wykrywania mutacji
- RNaza A** Działanie RNazą A na hybrydy RNA:DNA i hydroliza RNA w miejscu niesparowania hybrydu. Może służyć do wykrywania mutacji lub charakterystyki mutacji
- SSCP** Metoda analizy polegająca na wykrywaniu polimorfizmu konformacji pojedynczoniciowych fragmentów DNA. Mutacje punktowe i mikrodelecje mogą prowadzić do zmiany migracji pojedynczych nici DNA w warunkach natywnych po uprzedniej denaturacji
- SSCP+HD** Połączenie SSCP i HD, umożliwia jednoczesną obserwację zmian konformacji pojedynczoniciowych DNA i heterodupleksów powstających w wyniku hybrydyzacji DNA typu dzikiego z badanym DNA

6. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA A UJEDNOLICENIE BADAŃ

W ostatnim czasie coraz więcej pracowni skupionych wokół instytutów badawczych lub laboratoriów prywatnych przystępuje do diagnostyki molekularnej. Użytkiwane wyniki służyć mają często do doboru terapii, mają potwierdzić lub wykluczyć nosicielstwo choroby oraz zidentyfikować uszkodzony gen. Wzrost zainteresowań badaniami molekularnymi wiąże się przede wszystkim z możliwością uzyskania wyników na podstawie reakcji PCR. W naszym kraju nie ma systemu atestacji i standaryzacji badań molekularnych. Dla przykładu w krajach Europy Zachodniej powstały instytucje nadzorujące w ciągły sposób jakość wykonywanych badań. Szczególnie wyraźnie zauważyć można działanie atestacyjne w badaniach z zakresu medycyny sądowej i kryminalistyki nadzorowane w Europie przez EDNAP, a w Niemczech przez GDNAP. Powstaje w ten sposób sieć laboratoriów wykonujących badania na najwyższym poziomie. W Polsce atestacja tego rodzaju, aczkolwiek zapoczątkowana, nie rozwija się i spotyka z ogólną niechęcią. Podobnie w laboratoriach diagnostycznych zajmujących się badaniem chorób genetycznych tworzone są grupy robocze. Przykładem może być mukowiscydoza (CFTR), dla której utworzono międzynarodowe konsorcjum standaryzujące wykrywanie mutacji i oznaczanie nosicielstwa.

7. PERSPEKTYWY ROZWOJU DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ

Współczesna diagnostyka wielu chorób powinna uwzględniać wyniki badań klinicznych, biochemicznych i molekularnych. W wielu krajach wykonuje się już rutynowo badania molekularne. W naszym kraju rutynowe badania molekularne wykonywane są zaledwie w kilku placówkach. Materiałem do badań molekularnych

może być genomowy DNA wyizolowany z krwi obwodowej, z fibroblastów lub kosmków łożyska. Podstawową metodą badawczą zmian strukturalnych genu był do niedawna transfer i hybrydyzacja wg Southerna. Obecnie reakcja PCR zrewolucjonizowała diagnostykę wielu chorób, umożliwiając znacznie szybsze przeprowadzenie analizy i uzyskanie wyniku bez konieczności stosowania radioizotopów. W najbliższej przyszłości oczekiwać można dalszego postępu badań DNA i rozszerzania wyników dla potrzeb diagnostyki molekularnej. Autorzy zakładają, że postęp obejmował będzie zarówno dobór materiału badawczego, jak i zwiększenie czułości metod oraz automatyzację procedur analitycznych. Zapotrzebowanie na nowe testy diagnostyczne jest ogromne i w krajach zachodnich dla wielu chorób genetycznych, nowotworowych i wykrywania patogenów wykonywane są one już rutynowo. Szczególnie w przypadkach zakażeń, metody amplifikacji sekwencji umożliwiają wykrycie patogenu w czasie zdecydowanie krótszym niż hodowle. W obawie przed ewentualnymi konsekwencjami wynikającymi z opóźnienia terapii poprzez oczekiwanie na wynik hodowli (nieraz 3 tygodnie) szpitale wdrażają testy molekularne. Zgodność wyników takich testów uzyskanych metodami amplifikacji DNA z wynikami hodowli, dla których przyjmuje się 100%, jest bardzo wysoka – powyżej 99% [20].

W etapie wstępnym przygotowania materiału do badań występuje opóźnienie metodyczne i sprzętowe w stosunku do samej strategii badań DNA, która poprzez sekwencjonowanie umożliwia wykrycie zmian pojedynczych nukleotydów w DNA. Etap przygotowania DNA do badań jest jednak najważniejszy, gdyż rzutuje na pozostałe etapy wykonywania analizy. Dla przykładu obecność inhibitorów enzymów w preparatach DNA uniemożliwia jego badanie lub powoduje powstanie artefaktów. Jest to szczególnie niebezpieczne przy stosowaniu badań opartych wyłącznie na enzymatycznej amplifikacji DNA *in vitro*. Może dochodzić tu do wybiórczej amplifikacji niektórych alleli. Z kolei postęp w samych badaniach DNA jest ogromny i możliwe jest badanie bardzo małych ilości DNA, nawet z pojedynczych komórek. W przypadkach materiału przeznaczonego do badań medyczno-sądowych częstym zjawiskiem jest zdegradowanie DNA. Badania DNA mogą dać wtedy wynik fałszywie negatywny, dlatego wszelkie badania DNA poprzez jego amplifikację powinny przebiegać w obecności kontroli doświadczenia.

Zwiększenie czułości metod obejmować będzie coraz szersze wprowadzanie chemiluminiscencji i kolorymetrii do wykrywania DNA, co w przyszłości zaowocować ma zautomatyzowaniem badania DNA na poziomie rozdzielu elektroforetycznego i detekcji wyniku. Trwają również poszukiwania nowych, optymalnych markerów do badań DNA, które charakteryzowałyby się wielkością w zakresie 100–500 pz i wykazywałyby duży polimorfizm wielkości oraz wysoki stopień heterozygotyczności, a jednocześnie niewielką częstość mutacji.

Badania DNA mogą być obecnie prowadzone retrospektywnie. Spektakularnym doniesieniem było np. wykazanie transwersji A→T w kodonie 227 genu p53 u zmarłego w 1978 r. wiceprezydenta USA H.H. Humphreya. Mutacja prowadziła do zmiany powstawania mRNA – uaktywnienia kryptycznego miejsca splicingu w eksonie 7 genu p53. W wyniku mutacji białko p53 pozbawione było kilku aminokwa-

sów. Cytowane badania wykonano na materiale pobranym w 1967 r, przed wykryciem nowotworu [10,15].

Rozwój informatyki umożliwił przygotowanie specjalistycznych baz danych. Jednak z tym zagadnieniem bardzo silnie wiąże się standaryzacja badań wykonywanych przez różne placówki czy kraje. Problem ten napewno nie ulegnie rozwiązaniu w najbliższej przyszłości, gdyż metody biologii molekularnej, a w szczególności PCR, uwarunkowane są wieloma parametrami i ich standaryzacja nie jest obecnie możliwa. Nie ma również jasności, jakie organizacje powinny czuwać nad poprawnością wykonywania badań diagnostycznych przy użyciu testów molekularnych.

LITERATURA

- [1] BACKMAN KC, CARRINO JJ, BOND SB, LAFFLER TG. European Patent Application No. EP 0 439 183 A2. 1991
- [2] BEGGS AH, KOENIG M, BOYCE FM, KUNKEL LM. Detection of 98 % of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; **86**: 45–48.
- [3] BERG LP, WIELAND K, MILLAR DS, SCHLOESSER M, WAGNER M, KAKKAR VV, REISS J, COOPER DN. Detection of a novel point mutation causing haemophilia A by PCR/direct sequencing of ectopically transcribed Factor VIII mRNA. *Hum Genet* 1990; **85**: 655–658
- [4] BOND SB, CARRINO JJ, HAMPL H, HANLEY K, RINEHARDT LA, LAFFLER TWJ Monzenego (wyd): Papillomavirus in Human Pathology. Recent Progress in Epidermoid Precancers. Serono Symposia Publications 1990; **78**: 425–433.
- [5] CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, CASKEY CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. [w] Innis M, Gelfand D, Sninski J, White T, (eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 1990: 272–281.
- [6] CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, NGUYEN PN, CASKEY CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 11141–11156.
- [7] CHELLY J, CONCORDET JP, KAPLAN JC, KAHN A. Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2617–2621.
- [8] CHU C-S, TRAPNELL BC, MURTAGH JR JJ, MOSS J, DALEMANS W, JALLAT S, MERCENIER A, PAVIRANI A, LECOCQ J-P, CUTTING GR, GUGGINO WB, CRYSTAL R. Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal epithelium. *EMBO J* 1991; **10**: 1355–1363.
- [9] COMPTON J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991; **350**: 91–92.
- [10] CULLITON BJ. Hubert Humphreys bladder cancer. *Nature* 1994; **369**: 13.
- [11] CUTTING GR, KASH LM, ROSENSTEIN BJ, ZIELENSKI J, TSUIL-C, ANTONARAKIS SE, KAZAZIAN HH. Two patients with cystic fibrosis, nonsense mutations in each cystic fibrosis gene, and mild pulmonary disease. *Nature* 1990; **346**: 366–369.
- [12] Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 1990; **47**: 354–359.
- [13] GIBBS RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem* 1990; **62**: 1202–1214.
- [14] HOFFMAN EP, FISCHBECK KH, BROWN RH, JOHNSON M, MEDORI R, LOIKE JD, HARRIS JB, WATERSON R, BROOKE M, SPECHT L, KUPSKY W, CHAMBERLAIN J, CASKEYCT, SHAPIRO F, KUNKEL LM. *N Engl J Med* 1988; **318**: 1363–1368.

- [15] HRUBAN R, van der RIET H, EROZAN YS, SIDRANSKY D. Molecular biology and the early detection of carcinoma of the bladder – the case of Hubert H. Humphrey. *N Engl J Med* 1994; **330**: 1276–1278.
- [16] KAN YW, DOZY AM. Antenatal diagnosis of sickle cell anemia by DNA analysis of amniotic fluid cells. *Lancet* 1978; **2**: 910–912.
- [17] KIEVITS T, van GEMEN B, van STRIJP D, SCHUKKINK R, DIRICKS M, ADRIANSE H, MALEK L, SOOKNANAN R, LENS P. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Meth* 1991; **35**: 273–286.
- [18] KOENIG M, HOFFMAN EP, BERTELSON CJ, MONACO AP, FEENER C, KUNKEL LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; **50**: 509–517.
- [19] KOENIG M, MONACO AP, KUNKEL LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rodshaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; **53**: 219–228
- [20] Materiały Konferencji Nucleic Acid-Based Technology, Amsterdam, 7-9.11.1994
- [21] MONACO AP, BERTELSON CJ, LIECHTIGALLATI S, MOSER H, KUNKEL LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; **2**: 90–95.
- [22] MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**: 335–350
- [23] NIEMANN-SEYDE S, SŁOMSKI R, RININSLAND F, ELLERMEYER U, KWIATKOWSKA J, REISS J. Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Genet* 1992; **90**: 65–70.
- [24] ORKIN SH, ALTER BP, ALTAY C. Direct detection of common mutations with synthetic DNA probes. *N Engl J Med* 1978; **299**: 166–172.
- [25] SŁOMSKI R, SCHLOESSER M, BERG L-P, WAGNER M, KAKKAR VV, COOPER DN, REISS J. Omission of exon 12 in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene transcripts. *Hum Genet* 1992; **89**: 615–619
- [26] ROBERTS RG, BARBY TFM, MANNERS E, BOBROW M, BENTLEY DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 298–310
- [27] ROBERTS RG, COLE CG, HART KA, BOBROW M, BENTLEY DR. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucl Acids Res* 1989; **17**: 811.
- [28] ROBERTS RG, PASSOS-BUENO MR, BOBROW M, VAINZOF M, SATZ M. Point mutation in a Becker muscular dystrophy patient. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 75–77.
- [29] SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350–1354.
- [30] SCHLOESSER M, SŁOMSKI R, WAGNER M, BERG LP, KAKKAR VV, COOPER DN, REISS J. Characterization of pathological dystrophin transcripts from the lymphocytes of a muscular dystrophy carrier. *Mol Biol Med* 1990; **7**: 519–523.
- [31] Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 81–86.
- [32] WILLIAMS C, WILLIAMSON R, COUELLE C, LOEFFLER F, SMITH J, IVINSON A. Same-day, first-trimester antenatal diagnosis for for cystic fibrosis by gene amplification. *Lancet* 1988; **ii**: 102–103.

Adres autorów: Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

WYKORZYSTANIE TECHNOLOGII TRANSFERU GENU W CELACH TERAPEUTYCZNYCH*

GENE TRANSFER TECHNOLOGY IN HUMAN THERAPY

Jerzy NOWAK

Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Streszczenie: Możliwości technologii transferu genu są tak duże, że obecnie trudno jest przewidzieć potencjalne zastosowania w medycynie. Koncepcja terapii genowej w zasadniczy sposób różni się od dotychczas stosowanych form leczenia. Uzyskanie poprawy klinicznej dzięki wprowadzeniu do komórek terapeutycznego genu stwarza nadzieje na przyczynowe leczenie chorób uwarunkowanych jednogenuowo. Pomimo prób leczenia transferem genu wielu chorób nowotworowych uzyskiwane wyniki dalekie są od zadowalających. Na obecnym etapie rozwoju nie można jeszcze rozbudzać nadziei na cudowne wyleczenie dzięki terapii genowej. Przełomem w terapii genowej może być zastosowanie wektorów swoiście rozpoznających komórki docelowe i mające zdolność do selektywnego ich penetrowania w warunkach *in vivo*.

Słowa kluczowe: transfer genu, terapia genowa, choroby genetyczne, nowotwory, AIDS

Summary: Gene transfer technology is a novel approach for the treatment of genetic and other diseases. Genetic disorders can be treated by this new method by replacement of defective or missing gene function by gene insertion. It is a great hope that gene transfer technology approaches will develop and become effective treatment also for cancer and for AIDS. There is still too early to promise terminally-ill patients any miracle cure with gene therapy. There are still some problems with long-term maintenance of transfected or transduced cells as well as with stable high-level expression of the transferred genes. It is a hope that significant improvements of gene transfer techniques over the next few years may result in very precise human gene targeting and thus effective treatment of many human disorders.

Key words: gene transfer, gene therapy, genetic disease, cancer, AIDS.

Szybki rozwój biologii molekularnej przyczynił się w znacznym stopniu do poznania genetycznych podstaw wielu chorób oraz do wypracowania nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych. Badania molekularne pozwoliły na lepsze zrozu-

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN nr 4S 402 96 06p04.

mienie patomechanizmu występowania wrodzonych chorób metabolicznych, nowotworów, AIDS i schorzeń autoimmunizacyjnych. Dzięki wprowadzeniu precyzyjnych testów diagnostycznych możliwe jest wczesne wykrywanie wielu chorób, również w ramach diagnostyki prenatalnej, przedimplantacyjnej, a ostatnio nawet przedzapłodnieniowej. Nowoczesne techniki molekularne są wykorzystywane nie tylko do diagnostyki chorób, ale również do wykrywania nosicieli patologicznych genów oraz podatności na niektóre choroby nowotworowe.

WYKORZYSTANIE TECHNIK REKOMBINACYJNYCH

Logicznym następstwem poznania molekularnych podstaw etiopatogenezy chorób były próby zastosowania technik rekombinacyjnych dla celów leczniczych. W pierwszym etapie wykorzystano metody biologii molekularnej do produkcji różnego rodzaju leków i szczepionek. Klasycznymi przykładami są: rekombinacyjna insulina, interleukina 2, czynniki krzepnięcia i szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. Możliwość wprowadzenia do komórek funkcjonalnego genu w miejsce brakującego lub zmutowanego dała początek bardzo szybko rozwijającej się terapii genowej. Transfer genu do komórek chorego może doprowadzić do korekty wrodzonego błędu metabolizmu lub może spowodować nabycie całkowicie nowych własności przez daną komórkę. Na przykład transfer genu czynnika (antygeny) immunostymulującego do komórek nowotworowych może sprawić, że zmodyfikowane komórki będą działały jako rodzaj szczepionki przeciwnowotworowej. Wydaje się, że transfer genu będzie mógł być wykorzystany nie tylko w leczeniu, ale również w zapobieganiu wrodzonym chorobom genetycznym, nowotworom, chorobom infekcyjnym i autoimmunizacyjnym.

Pierwszym krokiem do wykorzystania technologii transferu genu w celach terapeutycznych jest identyfikacja genu i poznanie jego funkcjonowania w warunkach prawidłowych i patologicznych. Identyfikacja genu odpowiedzialnego za określoną chorobę pozwala na zastosowanie jego wykrywania do diagnostyki samej choroby lub nosicielstwa w przypadku cech recesywnych. Znajomość struktury genu stwarza możliwość uzupełnienia niedoboru jego produkcji drogą syntezy w warunkach *in vitro*. Inną możliwością produkcji rekombinacyjnych leków jest wprowadzenie określonych genów do komórek organizmu zwierzęcego lub roślinnego. Najlepszym rozwiązaniem jest transfer genów do zapłodnionych komórek jajowych u ssaków. Uzyskane transgeniczne zwierzęta zawierają obcy gen we wszystkich komórkach organizmu. Jeżeli wprowadzony gen koduje np. czynnik krzepnięcia i jest wydzielany do mleka, to po oczyszczeniu uzyskujemy gotowy produkt pochodzenia "ludzkiego". W ten sposób uzyskano czynniki krzepnięcia VIII i IX, erytropoetynę i alfa-1-antytrypsynę. Oprócz uzyskiwania nowych środków leczniczych przy pomocy metod biologii molekularnej możliwa jest również molekularna modyfikacja istniejących już czynników biologicznych. Dobrym przykładem jest czynnik martwicy guza (*tumor necrosis factor TNF*). W normalnych warunkach TNF jest produkowany miejscowo

przez limfocyty T w odpowiedzi na proces zapalny lub nowotworowy. Lecznicze zastosowanie TNF jest ograniczone jego wysoką toksycznością. Zmiana pojedynczej reszty aminokwasowej w sekwencji TNF zwiększa zdolność do wiązania się z komórkami oraz znacząco obniża toksyczność TNF nie zmieniając jego właściwości przeciwnowotworowych [22].

TERAPIA GENOWA KOMÓREK SOMATYCZNYCH I ROZRODCZYCH

W badaniach na zwierzętach technologia transferu genu może być wykorzystana do modyfikacji komórek somatycznych i rozrodczych. Aktualnie ze względów technologicznych i etycznych jedyną akceptowaną formą modyfikacji genetycznej komórek człowieka jest somatyczna terapia genowa. Wszelkie wprowadzanie materiału genetycznego do komórek rozrodczych jest możliwe wyłącznie w przypadku komórek zwierząt.

TRANSFER GENU DO KOMÓREK

Wprowadzanie DNA do komórek w celu uzyskania integracji z genomowym DNA i ekspresji określonego genu jest stosowane od przeszło 20 lat. Z metod fizycznych i biologicznych najbardziej przydatne w terapii genowej okazały się techniki bazujące głównie na wektorach retrowirusowych i pochodnych adenowirusów. Idealną techniką mogłaby być homologiczna rekombinacja, dzięki której można precyzyjnie wymienić gen zmutowany na prawidłowy. Jednakże niezwykle niska wydajność homologicznej rekombinacji nie pozwala na jej zastosowanie w terapii genowej.

TERAPIA *EX VIVO* I *IN VIVO*

Teoretycznie technologia transferu genu może być wykorzystana w w terapii genowej komórek somatycznych i rozrodczych, w tzw. wzmocnieniu genetycznym oraz niechlubnej historycznie genetycznej eugenicie. Transfer genu może być wykorzystany do suplementacji słabo funkcjonującego genu, do zastąpienia genu zmutowanego prawidłowym oraz do modyfikacji genu. Aktualnie stosowana technologia transferu pozwala na losowe wprowadzenie do genomu określonej wielkości odcinka DNA. Techniki ukierunkowanego wprowadzenia genów, tzw. *gene targeting*, ze względu na małą wydajność i ograniczenia techniczne nie znajdują jeszcze zastosowania w terapii genowej człowieka.

Zapobieganie i leczenie chorób poprzez transfer genów obejmuje wzmocnienie słabej funkcji, rekonstytucji brakującej czynności lub supresji niepożądanego aktywności. Transfer genu w celach terapeutycznych może być wykonany w warunkach *in vitro* lub *in vivo*. Dokonywanie transferu genu do pobranych od chorego komórek lub tkanek jest określane mianem terapii genowej *ex vivo*. Pobrane komórki najczęściej są hodowane *in vitro*; po wprowadzeniu terapeutycznego genu dokonuje się autologicznej transplantacji genetycznie zmienionych komórek lub tkanek.

Innym podejściem metodycznym jest tzw. terapia *in vivo* polegająca na wprowadzaniu leczniczych genów bezpośrednio do wybranej tkanki. To podejście metodyczne dotychczas sporadycznie stosowane w terapii genowej u ludzi wydaje się być przyszłościowym rozwiązaniem wprowadzania *in vivo* terapeutycznych genów do zmienionych chorobowo komórek i tkanek.

REGULACJA EKSPRESJI TRANS-GENÓW

Znajomość mechanizmów regulacji ekspresji genów ma kluczowe znaczenie w powodzeniu różnych form terapii genowej. W przypadku pierwszej klinicznej próby leczenia transferem genu deaminazy adenozyminy (ADA) ciężkiego złożonego niedoboru odporności, problem regulacji ekspresji miał znaczenie drugorzędne z uwagi na ciągłość produkcji ADA oraz bardzo szeroki zakres stężeń ADA u zdrowych ludzi. W wielu innych schorzeniach, takich jak np. cukrzyca, głównym ograniczeniem jest trudność w uzyskaniu fizjologicznej regulacji poziomu insuliny po zastosowaniu transferu genu.

WYBÓR OPTYMALNEJ KOMÓRKI DOCELOWEJ W TERAPII GENOWEJ

W zależności od choroby stosowane są różne komórki, do których wprowadzane są terapeutyczne geny. W terapii genowej chorób dziedzicznych optymalnymi komórkami docelowymi są takie, które posiadają zdolność do samoodnawiania, jak np. fibroblasty lub krwiotwórcze komórki macierzyste. Transfer genu do komórki samoodnawiającej się, która wykazuje defekt genetyczny, umożliwia wyleczenie choroby genetycznej teoretycznie już po jednokrotnym wprowadzeniu prawidłowego genu. Koniecznym warunkiem jest uzyskanie stabilnej integracji wprowadzonego genu z genomem gospodarzem. Osiągnięcie efektu terapeutycznego w chorobach nowotworowych wiąże się z całkowitym zniszczeniem komórek nowotworowych. Transferu genów *ex vivo* lub *in vivo* dokonuje się bądź do samych komórek nowotworowych lub limfocytów, fibroblastów lub innych komórek mogących bezpośrednio lub pośrednio hamować rozwój nowotworów. Z kolei w chorobach zakaźnych, głównie w AIDS, limfocyty jako atakowane przez wirusa HIV są głównym celem transferu genów

mającym za zadanie ochronę przed zakażeniem lub hamowanie rozwoju wirusa HIV.

UWARUNKOWANIA ZASTOSOWANIA TERAPII GENOWEJ

W wielu krajach prowadzenie prac doświadczalnych oraz klinicznych z zakresu transferu genu jest obwarowane licznymi przepisami. Terapia genowa musi być poprzedzona doświadczeniami *in vitro* oraz na zwierzętach laboratoryjnych. Konieczne jest uzyskanie odpowiednich wektorów, wykazanie efektywnego transferu genów i ekspresji w komórkach docelowych, zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Efekt terapeutyczny musi być wykazany na zwierzętach laboratoryjnych. Opracowany protokół terapii genowej musi zawierać dokładną procedurę przygotowania i podawania genetycznie zmienionych komórek. Niezbędne jest monitorowanie chorych leczonych transferem genu. Należy zawsze ocenić możliwość wystąpienia objawów ubocznych i powikłań.

PIERWSZA TERAPIA GENOWA

Pierwsze kliniczne zastosowanie transferu genu zostało zapoczątkowane 14 września 1990 roku w celu terapii ciężkiego złożonego niedoboru odporności (*severe combined immunodeficiency* – SCID), uwarunkowanego brakiem deaminazy adenyzy (ADA) [2]. Ta ciężka choroba została wybrana do pierwszej terapii genowej ze względu na wcześniejsze sklonowanie genu ADA, dokładną znajomość funkcjonowania ADA, a przede wszystkim ze względu na brak precyzyjnej regulacji ekspresji genu ADA w warunkach fizjologicznych. W przypadku enzymu ADA różnice w stężeniu (aktywności) w zakresie 50-krotności nie powodują w warunkach fizjologicznych objawów ubocznych. Ponadto w badaniach na zwierzętach uzyskano wydajną transdukcję i stabilną ekspresję genu ADA w limfocytach krwi obwodowej. Transfer genu ADA przywracał prawidłową funkcję limfocytów w warunkach *in vitro*. Z kolei konwencjonalne leczenie dzieci obarczonych ciężkim złożonym niedoborem odporności nie przynosiło zadowalających wyników. Pierwszy transfer genu ADA wykonany u 4-letniej dziewczynki z ciężkim złożonym niedoborem odporności spowodował korektę wielu parametrów odpowiedzi immunologicznej [5]. Z uwagi na dokonanie transferu genu do limfocytów, czyli komórek nie posiadających zdolności do samoodnawiania, zabieg transferu genu ADA był powtarzany co 1–2 miesiące, w wyniku czego uzyskano pełną normalizację wskaźników immunologicznych, łącznie ze zdolnością do produkcji przeciwciał po podaniu szczepionki przeciwgrypowej. Aktualnie w kilku ośrodkach na świecie zapoczątkowano próby transferu genu ADA do krwiotwórczych komórek macierzystych (CD34⁺) [3]. Istnieje

duża szansa, że w przypadku udanego transferu genu ADA do komórek macierzystych ciężka choroba genetyczna, jaką jest SCID, zostanie całkowicie wyleczona.

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA TRANSFERU GENU W LECZENIU CHOROÓB JEDNOGENOWYCH

Badania zmierzające do terapeutycznego transferu genu początkowo koncentrowały się głównie na chorobach dziedzicznych dotyczących układu krwiotwórczego. Całość procedury zmierzającej do uzyskania wprowadzenia i ekspresji określonego genu najłatwiej można wykonać w przypadku komórek krwi obwodowej lub szpiku kostnego. Teoretycznie w większości jednogenowych chorób można zastosować próby transferu genu w celu przywrócenia brakującej funkcji. W chorobach metabolicznych, w przeciwieństwie do np. hemoglobinopatii, precyzyjna kontrola regulacji ekspresji genu nie zawsze jest konieczna. Istotnym problemem w chorobach metabolicznych jest wprowadzenie genu, który funkcjonowałby w sposób zapewniający ustąpienie objawów klinicznych przy fizjologicznej regulacji wytworzonego produktu genu. Obecnie podejmowane są próby stosowania terapii genowej w jednogenowych schorzeniach, takich jak: choroba Gauchera, przewlekła choroba ziarniniakowa, beta-talasemia, hemofilie (niedobór czynnika VIII lub IX) [7]. Prowadzone są również próby transferu genu dla receptora LDL u chorych z rodzinną hipercholesterolemią [24]. Przeprowadzono również pierwsze próby transferu genu CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) w mukowiscydozie [4,16].

TERAPIA GENOWA CHOROÓB UWARUNKOWANYCH WIELOCZYNNIKOWO

Leczenie i zapobieganie chorobom układu krążenia poprzez transfer genów byłoby ze wszech miar pożądane z uwagi na bardzo duże zagrożenie społeczne tymi chorobami. Jedną z koncepcji zakłada modyfikację genetyczną komórek śródbłonkowych naczyń krwionośnych w celu zapobiegania zmianom o charakterze miażdżycowym [23]. W przypadku rozwiniętej choroby niedokrwiennej i wystąpienia zawału serca modyfikacje genetyczne mogłyby służyć szybkiej rewaskularyzacji uszkodzonego mięśnia sercowego. Z transferem genu do komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych wiązane są nadzieje na zapobieganie występowaniu zmian miażdżycowych w naczyniach mózgowych, mięśniach sercowego i innych.

Inne możliwości wykorzystania transferu genu do zapobiegania i leczenia chorób wieloczynnikowych są schorzenia reumatyczne. Zapobieganie powstawaniu zmian zapalnych i zwyrodnieniowych w kościach i stawach poprzez genetyczną modyfikację komórek wyznacza dalsze kierunki badawcze o dużych implikacjach praktycznych [1].

Perspektywicznie dużym zainteresowaniem winny się cieszyć badania zmierzające do korekty zaburzeń występujących w ośrodkowym układzie nerwowym. Wydaje się, że wraz z pojawieniem się nowych wektorów służących do transferu genu pojawią się możliwości korekty klinicznych zaburzeń występujących w chorobie Parkinsona, Alzheimerera, czy stwardnieniu rozsianym [9]. Istotą jest znalezienie wektorów o wysokim neurotropizmie. Inną możliwością jest transplantacja do ośrodkowego układu nerwowego zmodyfikowanych *in vitro* komórek nerwowych produkujących brakujące enzymy, jak np. hydroksylazy tyrozyny w chorobie Parkinsona [25]. Atrakcyjną perspektywą są modyfikacje genetyczne komórek nerwowych prowadzące do odnowy zniszczonej tkanki nerwowej w stwardnieniu rozsianym, czy chorobie Alzheimerera.

Olbrzymie możliwości stwarza zastosowanie terapii genowej w schorzeniach endokrynologicznych [20]. W miarę poznawania molekularnych podstaw patogenezy zaburzeń układu dokrewnego będzie możliwa korekta występujących nieprawidłowości w sensie kompensacji produkcji określonych hormonów, ogólnoustrojowej ich regulacji. Ciekawym przykładem są próby uaktywnienia ekspresji genów erytropoetyny w fibroblastach. Indukcja syntezy erytropoetyny przez fibroblasty, uzyskana już u myszy, stwarza realne szanse na wykorzystanie w przyszłości tego podejścia metodycznego w leczeniu przewlekłej niedokrwistości u ludzi.

LECZENIE AIDS TRANSFEREM GENU

Aktualnie rozwijane są dwie zasadnicze strategie terapii genowej AIDS. Pierwsza określana mianem wewnątrzkomórkowej immunizacji zmierza do wytworzenia "odporności" komórki na zakażenie wirusem HIV w sensie zmiany tropizmu komórkowego, zahamowania replikacji wirusa i ograniczenie infekcji HIV w zakażonym organizmie. Druga strategia polega na wzmocnieniu odporności przeciwwirusowej poprzez użycie genetycznie modyfikowanych komórek wykazujących ekspresję produktów wirusa HIV w celu indukcji specyficznej odporności [8].

TERAPIA GENOWA CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Problematyka terapii genowej nowotworów została przedstawiona w jednym z poprzednich numerów Postępów Biologii Komórki [26]. Główne strategie terapii genowej chorób nowotworowych obejmują modyfikację genetyczną zmierzającą do zwiększenia immunogenności komórek nowotworowych, potencjalizacji; miejscowych i układowych mechanizmów odporności swoistych i nieswoistych [18,19,21]. Główny kierunek prób klinicznych jest skoncentrowany na transferze genów różnych cytokin [14,15] i ich receptorów [10] do komórek nowotworowych lub limfocytów oraz transferze do komórek nowotworowych genów kodujących antygeny zgodności

tkankowej lub swoiste antygeny nowotworowe. Druga strategia coraz szerzej stosowana w próbach klinicznych dotyczy wprowadzania genów, których produkty aktywują leki [13]. Są to tzw. geny samobójcy, których głównym przedstawicielem jest gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki pospolitej, którego produkt zmienia nietoksyczny gancyklowir w lek cytotoksyczny dla komórek nowotworowych [12]. Dalsze strategie o potencjalnie dużym zastosowaniu praktycznym, to transfer genów prowadzący do zahamowania ekspresji onkogenów, do zastępowania zmutowanych genów przeciwnowotworowych genami prawidłowymi [6] oraz stosowanie technologii antysensu [17,27] i tripleksu [11]. Elementem krytycznym w terapii genowej nowotworów jest transfer terapeutycznego genu do wszystkich komórek nowotworowych. Aktualnie stosowane technologie niestety nie spełniają tego warunku. Stosowane wektory z trudem mogą przekraczać bariery śródbłonna naczyń krwionośnych, a dotarcie do słabo unaczynionej tkanki nowotworowej jest w zasadzie niemożliwe. Wydaje się, że w najbliższej przyszłości pewną skutecznością będą mogły wykazać się produkty genów działające miejscowo bez konieczności transferu terapeutycznego genu do wszystkich komórek. W przyszłości terapia genua chorób nowotworowych powinna zmierzać w kierunku leczenia przyczynowego, tzn. korekty mutacji i ekspresji onkogenów i genów przeciwnowotworowych, których zaburzenia prowadzą do rozwoju choroby nowotworowej.

OBJAWY UBOCZNE

Tak jak w przypadku stosowania różnych form leczenia, również w terapii genowej należy się liczyć z występowaniem objawów ubocznych. Ogólne objawy uboczne, takie jak: gorączka, dreszcze, zmiana obrazu krwi, powiększenie wątroby, wysypka, mogą być związane z rodzajem podanego wektora, jego dawką, jak również z wielkością i modulacją ekspresji wprowadzonego genu. Ze względu na losową integrację wektora retrowirusowego do genomu komórki gospodarza może dojść do wyłączenia prawidłowo funkcjonującego genu lub aktywacji komórkowych onkogenów. Potencjalnym ubocznym objawem może być indukcja odpowiedzi immunologicznej przeciwko białku syntetyzowanemu przez nowo wprowadzony gen. Trudno obecnie przewidzieć następstwa braku regulacji produkcji białka kodowanego przez wprowadzony gen.

ASPEKTY ETYCZNE TECHNOLOGII TRANSFERU GENU

Aktualnie w zasadzie akceptowane jest wykorzystanie metod inżynierii genetycznej do produkcji leków i szczepionek, jak np. insuliny, hormonu wzrostu, czynników krzepnięcia oraz szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby. Kwestie etyczne rodzi zastosowanie całkowicie nowej technologii wprowadzającej zmiany w materiale genetycznym człowieka. Należy zdać sobie sprawę z dużej zbieżności pomiędzy leczeniem przeszczepami szpiku i terapią genową. W przypadku przeszczepu szpiku do organizmu wprowadzane są obce komórki z prawidłowym genem, w

terapii genowej tylko prawidłowy gen. Stosowane obecnie próby kliniczne terapii genowej komórek somatycznych, nie wpływają na geny przekazywane potomstwu. Nie można wykluczyć, że w przyszłości, po opracowaniu bardziej precyzyjnej technologii transferu genu, będzie możliwe wprowadzanie prawidłowych genów w miejsce zmutowanych do komórek rozrodczych człowieka. Doświadczenia takie są już wykonywane na zwierzętach. Jednakże z uwagi na ciągle jeszcze mało doskonałą technikę pierwsze próby terapii genowej komórek rozrodczych człowieka z pewnością nie zostaną przeprowadzone w obecnym stuleciu. W przyszłości nie można wykluczyć prób wykorzystania technologii transferu genu do poprawiania urody, wzrostu włosów, siły mięśniowej itp. Obecnie tego typu dyskusja rodzi szereg dylematów natury etycznej.

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie technologii transferu genu do celów terapeutycznych dopiero zaczyna się rozwijać. Można przypuszczać, że w najbliższych latach zamierzenia badawcze i kliniczne będą koncentrowały się głównie na próbach leczenia chorób nowotworowych i to zarówno w terapii zaawansowanej choroby, jak i w profilaktyce rozwoju nowotworów. Należy podkreślić, że na obecnym etapie rozwoju technologii transferu genu, nie można chorym z nowotworami stwarzać nadziei na cudowne wyleczenie. Wydaje się, że zasadniczy postęp w terapii genowej nastąpi dopiero po wyraźnym przełomie technologicznym, którym mogą być techniki umożliwiające precyzyjną integrację terapeutycznego genu we wszystkich komórkach docelowych w warunkach *in vivo*. Na podstawie olbrzymiego zainteresowania badaniami transferu genu należy sądzić, że na zasadniczy przełom terapii genowej nie przyjdzie nam czekać zbyt długo.

LITERATURA

- [1] BANDARA G, ROBBINS PD, GEORGESCU HI, MUELLER GM, GLORIOSO JC, EVANS CH. Gene transfer to synoviocytes: prospects for gene treatment of arthritis. *DNA Cell Biol* 1992; **11**: 227–231.
- [2] BLAESE RM, CULVER KW, and ANDERSON WF. The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther* 1990, **1**: 331–362.
- [3] BLAESE RM, CULVER KW, ANDERSON WF, NIENHUIS A, DUNBAR C, CHANG L, MULLEN C, CARTER C, LEITMAN S. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34⁺ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 521–527
- [4] CRYSTAL RG. Gene therapy strategies for pulmonary disease. *Am J Med* 1992; **92**: 44S–52S.
- [5] CULVER KW, MORGAN RA, OSBORNE WRA, LEE RT, LENSCHOW D, ABLE C, CORNETTA K, ANDERSON WF, and BLAESE RM. In vivo expression and survival of gene-modified Rhesus T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 1991, **3**: 399–410.

- [6] FRIEDMANN T. Gene therapy of cancer through restoration of tumor-suppressor functions? *Cancer* 1992, **70** (6 suppl): 1810–1817.
- [7] GERRARD AJ, HUDSON DL, BROWNLEE GG, WATT FM. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nature Genet* 1993; **3**: 180–183.
- [8] GILBOA E, SMITH C. Gene therapy for infectious diseases: the AIDS model. *TIG* 1994; **10**: 139–144.
- [9] JIAO S, GUREVICH V, WOLFF JA. Long-term correction of rat model of Parkinson's disease by gene therapy. *Nature* 1993; **362**: 450–453.
- [10] MACKIEWICZ A, GÓRNY A, LACIAK M, MALICKI J, MURAWA P, NOWAK J, WIZNEROWICZ M, HAWLEY RG, HEINRICH PC, ROSE-JOHN S. Gene therapy of human melanoma. Immunization of patients with autologous tumor cells admixed with allogeneic melanoma cells secreting interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 805–811.
- [11] MOFFAT AS. Triplex DNA finally comes of age. *Science* 1991; **252**: 1374–1375.
- [12] MOOLTEN FL, WELS JM. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 297–300.
- [13] OLDFIELD EH, CULVER KW, RAM Z, BLAESE RM. A clinical protocol: gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 39–69.
- [14] OSANTO S, BROUWENSTYN N, VAESSEN N, FIGDOR CG, MELIEF CJM, SCHRIER PI. Immunization with interleukin-2 transfected melanoma cells: A phase I–II study in patients with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 323–330.
- [15] PLAUTZ GE, YANG ZY, WU BY, GAO X, HUANG L, NABEL GJ. Immunotherapy of malignancy by *in vivo* gene transfer into tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4645–4649.
- [16] RICH DP, ANDERSON MP, GREGORY RJ, CHENG SH, PAUL S, JEFFERSON DM, McCANN JD, KLINGER KW, SMITH AE, WELCH MJ. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990; **347**: 358–363.
- [17] RIORDAN ML, MARTIN JC. Oligonucleotide-based therapeutics. *Nature* 1991; **350**: 442–443.
- [18] ROSENBERG SA, KASIOLO A, ANDERSON WF. TNF/TIL human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther* 1990; **1**: 443–462.
- [19] ROSENBERG SA, ANDERSON WF, BLAESE RM. Immunization of cancer patients using autologous cancer cells modified by insertion of the gene for interleukin 2. *Hum Gene Ther* 1992; **3**: 57–73.
- [20] SANDBURG B. Mice produce EPO in gene therapy trial. *Bioworld Today* 1994; **8** (9): 1–2.
- [21] TOWNSEND SE, and ALLISON JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993; **259**: 368–370.
- [22] VAN OSTADE X, VANDENABEELE P, EVERAERDT B, LOETSCHER H, GENTZ R, BROCKHAUS M, LESSLAUER W, TAVERNIER J, BROUCKAERT P, FIERS W. Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature* 1993; **361**: 266–269.
- [23] WILSON JM, BIRINYI LK, SALOMON RN, LIBBY P, GALLOW AD, MULLIGAN RC. Implantation of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cells. *Science* 1989; **244**: 1344–1346.
- [24] WILSON JM, GROSSMAN MA, RAPER SE, BAKER JR, NEWTON RS, THOENE JG. *Ex vivo* gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther* 1992; **3**: 179–222.
- [25] WOLFF JA, FISHER LJ, XU L, JINNAH HA, LANGLAIS PJ, IUVONE PM, O'MALLEY KL, ROSENBERG MB, SHIMOHAMA S, FRIEDMANN T, GAGE FH. Grafting fibroblasts genetically modified to produce L-dopa in a rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 9011–9014.

- [26] ZAGOŹDŹON R, GOŁĄB J. Terapia genowa w leczeniu nowotworów. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 409–429.
- [27] ZHANG Y., MUKHOPADHYAY T, DONENHOWER LA, GEORGES RN, ROTH JA. Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into Human lung Cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 451–460.

Adres autora: ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

KOMUNIKAT

VI Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki

po raz kolejny odbędzie się w dniach 12–14 września 1996 r. w Lublinie.

Program naukowy Konferencji stwarza możliwość prezentacji najnowszych osiągnięć teoretycznych i doświadczalnych z zakresu biologii komórki w ramach 10 niżej wymienionych sekcji tematycznych:

- Błony biologiczne
- Patologia komórki
- Starzenie się i śmierć komórek
- Biologia rozwoju
- Ruch i cytoszkielet– Komunikacja międzykomórkowa
- Komórka a środowisko
- Współczesne metody w biologii komórki
- Morfologiczna analiza ilościowa
- Varia.

Przewiduje się 40-minutowe wykłady (po 3 w każdej sekcji) oraz prezentacje prac w formie plakatów – w ramach poszczególnych sekcji.

Zgłoszenie chęci uczestnictwa w Konferencji powinno nastąpić przed 31 stycznia 1996 roku (z podaniem tytułu zgłaszanej pracy, trzech słów kluczowych oraz sugestią sekcji tematycznej).

Obrady Konferencji będą prowadzone w języku polskim.

Wszelkich informacji związanych z Konferencją udziela

dr hab. K. Trębacz

Zakład Biofizyki Instytutu Biologii UMCS

20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

Fax: (81) 375102, tel. 375080

E-mail: TREBACZ BIOTOP. UMCS. LUBLIN. PL

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).
2. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).
3. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNİLICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.]Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzonymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być aktualnymi współpracownikami ani pracownikami instytucji, w której pracuje autor. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,
tabel i rycin.

tak

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została wysłana do innej redakcji.

tak nie

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.

tak

Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM

tak nie

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-

tak

Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.

tak nie

kowane są zamieszczone w tekście artykułu

tak

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępie Biologii Komórki" przechodzi na własność reda-

tak

kcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

tak
podpis

TREŚĆ

DENIZIAK M., BARCISZEWSKI J.: Diagnostyka molekularna roślin	1
SZYMAŃSKI M., BARCISZEWSKI J.: Katalityczne RNA jako potencjalne czynniki terapeutyczne	13
SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J.: Diagnostyka molekularna chorób genetycznych	27
NOWAK J.: Wykorzystanie technologii transferu genu w celach terapeutycznych	41
Komunikat	52

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1996

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1996 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 2 suplementy) na rok 1996:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 40 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1996 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 20 US dollars.

Indeks 369705