

P2435

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 21 1994

Suplement nr 3

Postępy Biologii Komórki

Redaktor Zdzisław ŻAK

BIOTECHNOLOGIA

wybrane zagadnienia
z inżynierii komórkowej,
genetycznej i białkowej

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, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

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*

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1995

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1995 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, 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 1995:

- dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł,
- a dla odbiorców indywidualnych 160 000 zł.

W 1993 r. zostały wydane dwa suplementy:

1. A. Klein – Peptydowe czynniki wzrostowe,
2. H. Gabryś (red.) – Postęp w badaniach ruchów komórek

W 1994 r. ukaże się oprócz niniejszego suplement nr 4 na temat procesów somatycznej embriogenezy u roślin.

Cena pojedynczego suplementu 60 000 zł (płatne na konto Fundacji), dla prenumeratorów bezpłatnie.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

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

Price per year 40 dollars USA.

Ark. wyd. 15,4. Ark. druk. 12,5 Oddano do składu w lipcu 1994 r. Podpisano do druku w październiku 1994 r. Druk ukończono w listopadzie 1994 r.

WSTĘP

Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego Uniwersytetu Jagiellońskiego zbliża się do obchodów 25-lecia istnienia. Nowe ćwierćwiecze Instytut rozpocznie otwarciem kierunku studiów biotechnologii. Tradycyjne XXIII Seminarium IBM UJ odbyło się w Zakopanem, w dn. 28 lutego do 5 marca 1994 r. i było poświęcone wybranym zagadnieniom z biotechnologii oraz dyskusji na temat uniwersyteckich studiów tego kierunku. Tematyka naukowa obejmowała zagadnienia genetyki i inżynierii genetycznej, inżynierii komórki i tkanki oraz inne zagadnienia biotechnologiczne. W spotkaniu uczestniczyło 60 osób i wygłoszono 57 referatów, w tym do druku przygotowano 16 artykułów oraz sprawozdanie z dyskusji na temat uniwersyteckich studiów biotechnologicznych.

Od 1970 r. artykuły opracowywane przez uczestników poszczególnych Sympozjów IBM UJ były publikowane w Zeszytach Naukowych Uniwersytetu Jagiellońskiego serii Biologia Molekularna. Po raz drugi materiały Seminarium IBM UJ ukażą się w osobnym suplemencie „Postępów Biologii Komórki”. Ponadto przypominamy, że drugi zeszyt tomu 21 rozpoczyna się artykułami opracowanymi przez profesorów Andrzeja Legockiego i Wojciecha J. Steca na tematy związane ze znaczeniem biotechnologii dla przyszłości naszego kraju. Publikowane artykuły stanowią treść odczytów wygłoszonych przez autorów na spotkaniu, które zorganizowała w gmachu Senatu RP Pani prof. dr hab. Zofia Kuratowska w dn. 27 listopada 1993 r. Opracowania te są dobrym wprowadzeniem do niniejszej edycji. Polska Sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN udzieliła pomocy finansowej w organizacji XXIII Seminarium IBM UJ oraz w wydaniu niniejszego Suplementu. Na ręce Dyrektora Sieci Pana Prof. dr hab. Macieja Nałęczka składamy serdeczne podziękowania. Dziękujemy również za bezpłatne zrecenzowanie artykułów profesorom: Zofii Porwit-Bóbr, Adamowi Dubinowi, Jerzemu Kawiakowi, Andrzejowi Kleinowi, Włodzimierzowi Korohodzie, Zygmunutowi Wasylewskiemu i doktorom: Hannie Rokicie i Magdalenie Kosz-Vnenchak.

Za Komitet Organizacyjny XXIII Seminarium IBM UJ

Zdzisław Żak





Uczestnicy XXIII Seminarium IBM UJ; w pierwszym rzędzie od lewej strony: J. Sroka, E. Marewicz, M. Kosz-Vnenchak, Z. Blicharska, M. Drwięga, A. Szuster, H. Gabryś, M. Bojko, A. Kasza, A. Łączka, A. Waloszek; w drugim rzędzie: P. Kaszycki, W. Jędrzejczak, T. Chojnacki, A. Ptak, K. Bryl, K. Strzałka, M. Kujawski, A. Osyczka, A. Sabat, W. Blicharski, A. Chojnacki, M. Zaręba, I. Ślesak, A. Bober, D. Frąckowiak, A. Duszyński, Z. Walter, E. Bartnik, Z. Porwit-Bóbr, J. Tomecki, A. Dubin, B. Klein.

MOLEKULARNA CYTOGENETYKA – DIAGNOSTYKA ZMIENNYCH SEKWENCJI DNA SONDAMI MINISATELITARNYMI

MOLECULAR CYTOGENETICS – DIAGNOSTIC OF VARIABLE
TANDEM REPEATS OF DNA USING MINISATELLITE PROBES

Zofia PORWIT-BÓBR

Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana
Zurzyckiego, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Cytologiczna analiza aberracji chromosomowych oraz diagnostyka polimorfizmu DNA jest możliwa dzięki sondom molekularnym i innym produktom biotechnologicznym. Numeryczne mapowanie chromosomów ma znaczenie w wykrywaniu polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych i anatomii patologicznej DNA. Pojawienie się powtórzeń sekwencji nukleotydowych "wyższego rzędu" prowadzi do powstania nowej struktury domeny loci kodujących chromosomu. W postępowaniu diagnostycznym klasy satelitarnego DNA wykrywa się przy pomocy specyficznych dla chromosomu sond, a sekwencje sond przygotowuje się metodą PCR z genomu pacjenta.

Słowa kluczowe: PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, polimorfizm DNA, powtórzenia sekwencji nukleotydowych, specyficzne superstruktury loci kodujących, techniki molekularne.

Summary. Cytogenetic analysis of chromosome aberrations and diagnostics of DNA polymorphism is possible using molecular probes and other commercial biotechnological products. Numerical chromosome mapping is important for determination of restriction fragments length polymorphism and pathological anatomy of DNA. The appearance of "higher order sequence repeats" is connected with a new superstructure of domain in coding loci of a chromosome. In diagnostic procedure classes of satellite DNA are detected by chromosome specific probes, and the new pattern for probes can be easily prepared in PCR from the genome of patients.

Key words: PCR – polymerase chain reaction, DNA polymorphism, sequence repeats, locus specific superstructures, molecular technique.

Wykaz skrótów: PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy, RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*) – polimorfizm długości fragmentów restrykcyj-

nych, GC – guanina cytozyna, THE-LTR (ang. *transposon-like human element-long terminal repeat*) – element podobny do transpozonu, długie terminalne powtórzenie.

WSTĘP

Przedmiotem badań cytogenetyki molekularnej jest wykrywanie zmian w organizacji sekwencji nukleotydowych w DNA chromosomów, połączone z kariologiczną analizą, np. wykrywaniem chromosomowych translokacji. Rozwój badań oraz zastosowań cytogenetycznych w systematyce molekularnej organizmów, w filogenezie, w mapowaniu genomów i poszczególnych chromosomów przyczynił się do postępu diagnostyki eksperymentalnej i klinicznej [8,10,15]. Hybrydyzacje kwasów nukleinowych i inne rutynowe badania są ułatwione dzięki komercyjnym sondom molekularnym i uzyskane informacje z zakresu analizy polimorfizmu i mutacji w określonych miejscach DNA są zbierane w bankach danych. W praktycznym postępowaniu nazwanym diagnostyką DNA poszczególnych chromosomów określa się miejsca zmian aberracji i rearanżacji. Występujące miejsca zmian w DNA obrazują numeryczne mapy chromosomowe w różnych chorobach (tzw. anatomia patologiczna chromosomów), np. w nowotworach, w chorobach immunologicznych, w hematologicznych, w neurologicznych, w kardiologicznych i innych.

W onkologii markerami diagnostycznymi nowotworów są zmiany chromosomowe naniesione na poszczególne mapy, np. translokacje oraz rearanżacje w DNA, wykrywane mutacje i polimorfizm długości chromosomowych fragmentów restrykcyjnych – RFLP (*restriction fragment length polymorphism*).

Zmienny DNA, nazywany satelitarnym pochodzi z retropozycji, tzn. przepisania transkryptów RNA (t-RNA) na DNA, w wyniku działania odwrotnej transkryptazy i następnie włączenia skopiowanego DNA do genomu. Skopiowane transkrypty i obecność endogennych retrosekwencji oraz motywów retropozycji sprzyja dalszym zmianom insercyjnym oraz rekombinacjom genetycznym, w miejscach niskiej homologii par zasad. Miejsca powtarzanych motywów retropozycji okazały się szczególnie podatne na dalsze zmiany insercyjne lub delecyjne oraz rekombinacje genetyczne o niskiej homologii DNA. Tworzą się liczne kopie powtórzeń tandemowych sekwencji, zwane TR-DNA (*tandemly repetitive DNA*) oraz bloki sekwencji hyperzmiennych (HVR), o różnej liczbie powtórzeń (VNTR – *variable number tandem repeats*) [12].

MORFOLOGIA CHROMOSOMÓW I TRANSLOKACJE

Preparaty cytologiczne chromosomów przygotowuje się według metod umożliwiających odpowiednie spłaszczenie i rozciągnięcie materiału na szkiełkach mikroskopowych, przez np. zgniatanie (*squash*) lub rozpryskanie (*splash*).

Chromosomy można rozróżnić na podstawie morfologii, wymiarów, pozycji centromeru i wtórnych przewężeń [19]. Wzorce prążków odzwierciedlają różnicę w

organizacji sekwencji nukleotydów np. regionów bogatych w GC lub AT (prążki G), a także sekwencji powtarzanych np. prążki C (heterochromatyna). Różne specjalne postępowanie stosuje się przed wybarwieniem. Prążki Q i G nie wymagają dodatkowych ekstrakcji chromosomów w przeciwieństwie do prążków C. Wykrycie charakterystycznych miejsc zawierających powtórzenia DNA ma szczególne znaczenie. Ostatnio stosuje się metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Pozycja centromeru w chromosomach jest określona jako indeks centromerowy, tj. stosunek długości ramienia krótkiego chromosomu do długości całego chromosomu.

Główne rodzaje rearanzacji chromosomowych polegają na złamaniach i połączeniach, tj. translokacjach Robertsona, inwersjach pericentrycznych oraz inwersjach paracentrycznych. U naczelnych w ewolucji przemieszczeniu uległy duże bloki sekwencji w translokacjach Robertsona [13]. Obecnie w diagnostyce numerycznej prenatalnej i nowotworowej używa się sond pochodzących z takich dużych bloków przemieszczeń w chromosomach.

TABELA 1. Określenie morfologii na podstawie indeksu centromerowego

Morfologia	Indeks	Pozycja prążków
Metacentryczna (M)	$m = 0,39 - 0,50$	centromeryczna – c
Submetacentryczna (SM)	$sm = 0,26 - 0,38$	pericentryczna – pc
Subtelocentryczna (ST)	$st = 0,13 - 0,25$	interstitialna – i
		wtórnie przewężona – sc
Telocentryczna (T)	$t = 0,00 - 0,2$	telometryczna – t

Numeryczną diagnostykę chromosomową prowadzi się w celu wykrycia największych bloków sekwencji alfa-satelitarnych (np. w chromosomach 13 i 21). Ewolucja alfa-satelitarnego DNA centromerowego w populacjach ludzkich doprowadziła do utworzenia specyficznych subgarniturów powtarzanych monomerów (171 par zasad) w poszczególnych chromosomach w liczbie "n". Niektóre grupy tych sekwencji są konserwatywne i mogą mieć znaczenie funkcjonalne [20].

Aż 10% ludzkich chromosomów składa się z różnych centromerowych powtórzeń o określonym szyku.

SUPERSTRUKTURY BLOKÓW SEKWENCJI TANDEMOWO POWTÓRZONYCH

Powtórzenia sekwencyjne wyższego rzędu (*higher order repeats units*) powstały w wyniku mutacji, nierównych krzyżówek, w amplifikacjach oraz stanowią setki i tysiące kopii o zmiennej długości jednostkowych powtórzeń par zasad: $N = 171$ par zasad [7]. W ten sposób nowe kopie prowadzą do utworzenia nowych domen. Sondy DNA nazwane alfoidalnymi są specyficzne chromosomowo i służą do badań aberracji chromosomowych. Łatwo je przygotować w PCR z DNA z komórki pacjenta. Pra-

ktyczne znaczenie polimorfizmu alfa-satelitarnego DNA opisano w przypadku fragmentów restrykcyjnych BamHI oraz Taq w centrum badań polimorfizmu rodzinnego (CEPH *family*). Łatwość powielania kopii w PCR pochodzących z genomowego wzorca regionu DNA polega na tym, że używa się świeżej lub zamrożonej tkanki, a ostatnio nawet preparatów utrwalonych na szkiełkach (tzw. diagnostyka ze szkiełek). Przyjęto, że klasy satelitarnego DNA: minisatelity i mikrosatelity są superstrukturami specyficznych loci domen kodujących [21]. Chociaż w latach 1980–1993 poznano znaczenie powtórzeń sekwencji DNA w genomach i przeprowadzono ich klasyfikację, jednak dopiero w trzech ostatnich latach przyjęto nazwy dla regionów szczególnie zmiennych.

Poszukiwanie homologii w kariotypach różnych gatunków doprowadziło do poznania prototypowych rodzin sekwencyjnych powtózonego DNA. W genomie ludzkim kolekcja prototypowych rodzin obejmuje oprócz rozproszonych długich terminalnych powtórzeń endogennych retrowirusów, powtórzenia alfoidalne, towarzyszące telomerom i inne. [13]. Przeprowadzono również badania składu genomu, tj. izochorów, długich segmentów przekraczających 300 kb, najbogatszych, mniej bogatych lub ubogich w GC [1].

Początkowo wprowadzono podział retrotranspozonów u ludzi na wirusowe i niewirusowe oraz podobne do elementów transpozycyjnych THE-LTR [6]. Rozproszone sekwencje *Alu* i *L1* okazały się również bardzo użyteczne w analizie genomowej, ze względu na częste występowanie [18].

Nazwa RETROIDY wg EMBO (*European Molecular Biology Organization*) została przyjęta dla grup długich i krótkich elementów genetycznych. W grupie długich 6,4 kb, rozproszonych elementów genetycznych *LINE* (*L1*) i *Kpn* (50 tys.–100 tys. kopii na końcu 3' i 4000–20 000 kopii na 5') występuje możliwość transkrypcji. W grupie krótkich rozproszonych elementów DNA – *SINE* opisano prototypowe *Alu*, *THE-LTR/MSTII*, centromerowe, telomerowe i minisatelitowe. *THE* (*transposon-like human elements*) i *THE-LTR* (*long terminal repeats*) mają 10 tys. kopii. *MstII* jest podrodziną *HVR* w chromosomach 5 i 7 [6].

W sekwencjach alfa-satelitarnych występujących w regionie centromerowym znajduje się pewna liczba funkcjonalnych domen, z których każda ma setki tysięcy par zasad. Sekwencje te są konserwatywne w grupach II i III oraz IV. Bloki heterochromatynowe mogą występować w chromosomach 1,9,15,16 i Y [20]. Sekwencje konserwatywne w grupach II i III mogą mieć znaczenie funkcjonalne. Zidentyfikowano sekwencje telomerowe (TTAGGG)_n, które tworzą niezwykle struktury, powstałe raczej przypadkowo w wyniku amplifikacji w punktach fuzji chromosomów [1,2,3,9].

Sekwencje *Alu* 3–9 pb w kopiach 300 tys.–900 tys. występują w każdym DNA. 1 Mb DNA zawiera kilkaset kopii. *Alu* jest rodziną dominującą. Domeny *Alu* występują na końcach krótkich, bezpośrednich powtórzeń [16]. Elementy wolne pochodzą z 7S RNA. Sekwencje konsensusowe są gromadzone w Banku Genów.

WYBRANE TECHNIKI BADAŃ STRUKTURY CHROMOSOMÓW I TANDEMOWYCH POWTÓRZEŃ

Najnowsze badania molekularne obejmują nowe podejście genetyczne:

1. Określenie morfologii struktur chromosomów, położenie centromeru, prążków G, C, Q, translokacji, badanie markerów.

2. Analizy mutacji allelicznych i punktowych, techniką *multilocus fingerprinting*, hybrydyzacje chromosomowe *in situ*. Swoiste chromosomowo sondy komercyjne są stosowane do wykrywania charakterystycznych sekwencji w regionach zmiennych. Takie sekwencje występują z częstością $[GA(T/C)A]^n$ 1/1000/gametę/populację. Różne sekwencje zmienne można wykrywać metodą FISH dzięki różnym barwnikom fluorescencyjnym.

3. Wykrywanie RFLP po otrzymaniu fragmentów restrykcyjnych, rozdziały elektroforetyczne w żelu – PFGE (*pulse field gel electrophoresis*), sortowanie, klonowanie w wektorach (np. YAC), sekwencjonowanie DNA i PCR, tj. reakcji umożliwiającej enzymatyczną amplifikację DNA bez użycia konwencjonalnego klonowania [4,5,6].

4. Mapowanie numeryczne chromosomów – badanie położenia i szyku bloków sekwencji satelitarnych oraz określenie długości heterochromatynowych powtórzeń tandemowych [8].

PODSUMOWANIE

Zbierane w bibliotekach genomowych sekwencje są wymieniane między pracownikami i umożliwiającą również automatyzację badań [10,11].

SPIS LITERATURY

- [1] AISSANIB, D'ONOFRIO G, MOUCHIROUD D, GARDINER K, AUTIER CH, BERNARDI G. The Compositional Properties of Human Genes. *J Mol Evol* 1991; **32**: 493–503.
- [2] COOPER KF, FISHER RB, TYLER-SMITH Ch. Structure of the Sequences Adjacent to the Centromeric Alphoid Satellite DNA Array on the Human Y Chromosome. *J Mol Biol* 1993; **230**: 787–799.
- [3] COOPER KF, FISHER RB, TYLER-SMITH Ch. The major centromeric array of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome is non-palindromic. *Human Molecular Genetics* 1993; **2**: 1267–1270.
- [4] COSSMAN J. Approaching the Molecular Genetic Era of Diagnostic Pathology. [w] *Molecular Genetics in Cancer Diagnosis*. Cossman J. [red.] Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, Amsterdam, London 1990: 1–5.
- [5] DUNHAM I, LENGAUER CH, CREMER T, FEATHERSTONE T. Rapid generation of chromosome-specific alphoid DNA probes using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1992; **88**: 457–462.

- [6] FIELDS CA, GRADY DL, MOYZIS RK. The Human THE-LTR(O) and *Mst*II Interspersed Repeats Are Subfamilies of a Single Widely Distributed Highly Variable Repeat Family. *Genomics* 1992; **13**: 431–436.
- [7] GE Y, WAGNER MJ, SICILIANO M, WELLS DE. Sequence, Higher Order Repeat Structure, and Long-Range Organization of Alpha Satellite DNA Specific to Human Chromosome 8. *Genomics* 1992; **13**: 585–593.
- [8] GOODROW TL, PRAHALADA SR, STORER RD, MANAM SV, LEANDER KR, KRAYNAK AR, van ZWIETEN MJ, NICHOLS WW, BRADLEY MO. Polymerase Chain Reaction/Sequencing Analysis of *ras* Mutations in Paraffin-Embedded Tissues as Compared with 3T3 Transfection and Polymerase Chain Reaction/Sequencing of Frozen Tumor Deoxyribonucleic Acids. *Laboratory Investigation* 1992; **66**: 504–511.
- [9] GRADY DL, RATLIFF RL, ROBINSON DL, MCCANLIES EC, MEYNE J, MOYZIS RK. Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1695–1699.
- [10] GREEN ED. Physical Mapping of Human Chromosomes: Generation of Chromosome-Specific Sequence-Tagged Sites. *Meth Mol Genet* 1993; **1**: 192–210.
- [11] HATTORI M, TOYODA A, ICHIKAWA H, ITO T, OHGUSU H, OISHI N, KANO T, KUHARA S, OHKI M, SAKAKI Y. Sequence-Tagged *NotI* Sites of Human Chromosome 21: Sequence Analysis and Mapping. *Genomics* 1993; **17**: 39–44.
- [12] HARDING RM, BOYCE AJ, CLEGG JB. The Evolution of Tandemly Repetitive DNA: Recombination Rules. *Genetics* 1992; **132**: 847–859.
- [13] JURKA J, WALICHIEWICZ J, MILOSAVLJEVIC A. Prototypic Sequences for Human Repetitive DNA. *J Mol Evol* 1992; **35**: 286–291.
- [14] MARCAIS B, CHARLIEU JP, ALLAIN B, BRUN E, BELLIS M, ROIZES G. On the Mode of Evolution of Alpha Satellite DNA in Human Populations. *J Mol Evol* 1991; **33**: 42–48.
- [15] MURAKAMI Y, SUZUKI Y, KISHIMOTO Y, HIROHASHI S, HAYASHI K, SEKIYA T. Detection of DNA Aberrations in Human Cancers by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction Products. *Tohoku. J Exp Med* 1992; **168**: 247–255.
- [16] QUENTIN Y. Fusion of a free left Alu monomer and a free right Alu monomer at the origin of the Alu family in the primate genomes. *Nucleic Acids Research* 1992; **20**: 487–493.
- [17] QUENTIN Y. Origin of the Alu family: a family of Alu-like monomers gave birth to the left and the right arms of the Alu elements. *Nucleic Acids Research* 1992; **20**: 3397–3401.
- [18] SAINZ J, PEVNY L, WU Y, CANTOR CHR, SMITH CL. Distribution of interspersed repeats (*Alu* and *Kpn*) on *Not I* restriction fragments of human chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1080–1084.
- [19] SESSIONS SK. Chromosomes: Molecular cytogenetics.[w] Molecular Systematics. Hillis D.M., Moritz C. [red.] Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc. Publ. 1990: 156–177.
- [20] TAGARRO I, FERANADEZ-PERALTA AMA, GONZALEZ-AGUILERA JJ. Distribution of satellite DNA fractions within major heterochromatic regions of human chromosomes as revealed by *PleI* and *TfII* digestion. *Cytogenet Cell Genet* 1992; **60**: 102–106.
- [21] VOGT P. Code domains in tandem repetitive DNA sequence structures. *Chromosoma* 1992; **101**: 585–589.

Zofia Porwit-Bóbr

Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej
im. Jana Zurzyckiego, Uniwersytet Jagielloński
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

ZASTOSOWANIE FLUORESCENCYJNEJ HYBRYDYZACJI *IN SITU* W CYTOGENETYCE MOLEKULARNEJ

APPLICATION OF FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION IN MOLECULAR CYTOGENETIC

Rafał WIŚNIEWSKI

Zakład Mikrobiologii i Immunologii Instytutu Biologii Molekularnej
im. Jana Zurzyckiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie. Koncepcja wykorzystania sond znakowanych fluorescencyjnie nie jest nowa, pochodzi z końca lat siedemdziesiątych. Ciągła optymalizacja parametrów, rozwój technik wykrywania i przetwarzania obrazu spowodowały, że obecnie fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* jest powszechnie wykorzystywanym narzędziem w badaniach cytogenetycznych od wybarwienia chromosomów po mapowanie genów.

Słowa kluczowe: fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, diagnozowanie, mutacje chromosomowe, komórki interfazowe.

Summary. Conception of fluorescent probe application is not quite new, but starts since the late seventies. The progress in the parameters optimization, detection and image processing cause the Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH) is commonly used tool in cytogenetics studies: from chromosome painting to gene mapping.

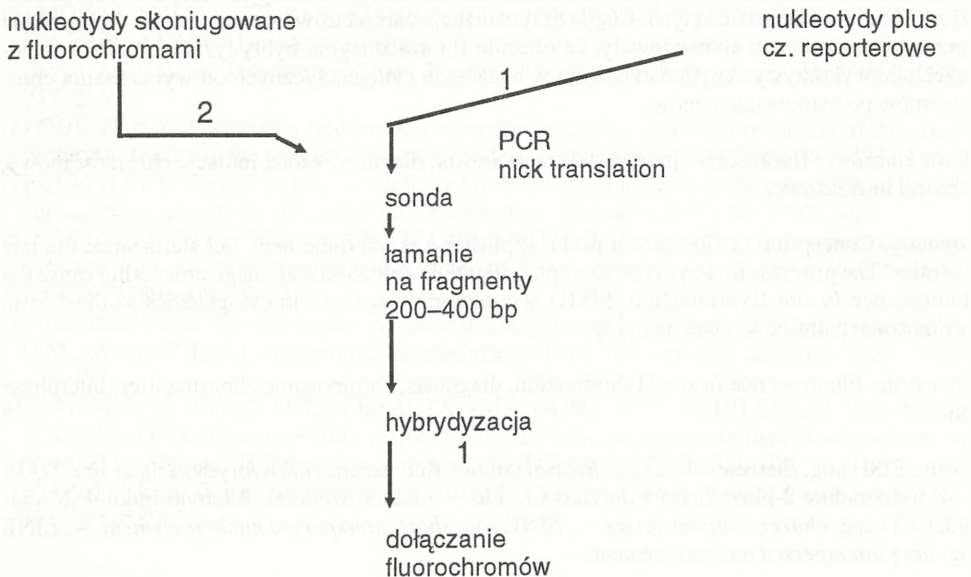
Key words: Fluorescence *In situ* Hybridization, diagnosis, chromosome abnormalities, interphase cell.

Skróty: FISH ang. *fluorescence in situ hybridization* – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindole-dihydrochloride – dichlorowodorek-2-fenylindol-4',6'-diamid, CCD ang. *charge coupled device* – , SINE ang. *short interspersed nuclear element* – , LINE ang. *long interspersed nuclear element*. –

WSTĘP

Metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, nazywana także FISH (od skrótu angielskiej nazwy *Fluorescence In Situ Hybridization*) jest metodą, której koncepcja pojawiła się pod koniec lat siedemdziesiątych. W zasadzie nazwa FISH jest stosowana do badań *in situ* na metafazowym lub interfazowym DNA, ew. wewnątrzkomórkowym RNA i nie odnosi się do innych typów hybrydyzacji z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych. Dzięki swym zaletom FISH stała się wygodnym narzędziem w badaniach cytogenetycznych na poziomie molekularnym.

Metoda ta jest prostą modyfikacją tradycyjnej radioizotopowej hybrydyzacji *in situ* na chromosomach, z tym że zamiast sond znakowanych radioizotopowo wykorzystuje się w niej sondy wyznakowane fluorescencyjnie. Istnieją dwa podstawowe podejścia przy tworzeniu takich sond (rys. 1). Stosuje się nukleotydy sprzężone z fluorochromami, albo nukleotydy sprzężone z innymi cząsteczkami reporterowymi, takimi jak: biotyna, dinitrofenyl czy digoksygenina. W tym drugim przypadku dopiero po hybrydyzacji dodaje się sprzężone z przeciwciałami lub awidyną fluorochromy. Podejście to znajduje obecnie wśród badaczy dużo większe uznanie. DNA chromosomowy lub pochodzący z jądra interfazowego dla kontrastu jest dodatkowo wybarwiany przy użyciu barwników fluorescencyjnych wiążących się z chromatyną, takich jak DAPI



cząsteczki reporterowe: biotyna, digoksygenina, dinitrofenyl

Rys. 1. Znakowanie fluorescencyjne nukleotydów w sondach

czy jodek propydydy. Obraz może być bezpośrednio oglądany pod mikroskopem lub jeżeli zachodzi taka potrzeba, zbierany przy użyciu kamer CCD i ew. opracowywany komputerowo [23].

ZASTOSOWANIA

Możliwości zastosowania tej metody w badaniach cytogenetycznych są olbrzymie i obejmują praktycznie całą cytogenetykę molekularną od wybarwienia prążków chromosomowych G i R po diagnozowanie różnego rodzaju uszkodzeń genetycznych.

WYBARWIANIE CHROMOSOMÓW

W przypadku wybarwienia chromosomów wykorzystuje się naturalną dystrybucję sekwencji powtarzalnych typu SINE i LINE w genomach ssaków [22,24]. Hybrydując sondy będące sekwencjami powtarzalnymi typu SINE i LINE z genomu myszy lub człowieka z całym chromosomami otrzymujemy odpowiednio prążki R i G, ale z pewnymi ograniczeniami. Okazuje się, że niektóre klonowe sekwencje powtarzalne nie dają charakterystycznych prążków. Dotyczy to np. klonu B1 (mysia sekwencja typu Alu) oraz sekwencji ludzkich LINE [24].

DIAGNOZOWANIE CHOROÓB GENETYCZNYCH

Przy próbach wykrywania aneuploidalności wykorzystuje się jako sondy sekwencje związane z regionami chromosomów, odpowiedzialnymi za dane schorzenia lub sekwencje specyficzne chromosomowo, np. sondy centromerowe, pozwalające uchwycić występowanie trisomii lub monosomii podczas badania zarówno płytek metafazowych, jak i jąder interfazowych [4,9,11]. Standardowym przykładem jest wykorzystywanie FISH do wykrywania trisomii chromosomu 21, a konkretnie fragmentu chromosomu, w którym znajdują się sekwencje odpowiedzialne za występowanie Zespołu Downa. Stosowanie jako sondy odpowiednio dobranych sekwencji pozwala na uwidocznienie trzech kopii tego regionu także w jądrze interfazowym [7].

Fakt możliwości wykrywania dzięki tej metodzie zmian powstałych w DNA i chromosomach, w testach, w których wykorzystuje się materiał genetyczny zawarty w jądrach interfazowych, doprowadził do postępu w diagnozowaniu chorób genetycznych we wczesnych okresach rozwoju prenatalnego. Opracowano metody, w których szybko, bo w ciągu najwyżej dwóch dni, przy wykorzystaniu komórek zawierających jądra znajdujące się w interfazie, wykrywano takie nieprawidłowości chromosomowe, jak: trisomie chromosomów nr 12, 18, 21, mozaikowość w różnych kombinacjach (np. komórki z trisomią chromosomu 18 i komórki normalne) lub mutacje dotyczące liczby chromosomów płciowych [3,7,9,20]. Możliwe jest także wykorzystywanie metody do ustalania płci nienarodzonego dziecka. Cześć zmian,

opisywanych dzięki FISH we wczesnych okresach ciąży, byłaby nie do wykrycia przy zastosowaniu konwencjonalnych metod, a świadomość ich występowania może mieć wpływ na zdrowie matki oraz decyzję co do dalszego losu płodu.

Metodę tę wykorzystano także do diagnozowania uszkodzeń w komórkach płciowych, zarówno plemnikach jak i komórkach jajowych [12,19]. W pierwszym przypadku początkowo wydawało się, że FISH może nie dawać prawdziwego obrazu częstości występowania uszkodzeń. Dopiero nowsze badania pokazały, że zarówno efektywność samej hybrydyzacji, jak i częstość występowania mutacji czy dodatkowych kopii w chromosomach mogą zależeć od czasu przechowywania zamrożonych plemników [12].

DIAGNOZOWANIE CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Hybrydyzacja *in situ* w technice fluorescencyjnej nie jest metodą odpowiednią do wykrywania mutacji punktowych, można ją natomiast wykorzystywać do badań nad zmianami ilościowymi (amplifikacja genu, jego delecja oraz duplikacja), zmianami w liczbie chromosomów lub zmianami dotyczącymi miejsca występowania genu (translokacje, inwersje) [1,5,8,10]. Porównanie wykrywalności zmian genetycznych na przykładzie raka prostaty przy pomocy analizy płytek metafazowych oraz FISH wykazuje znaczne rozbieżności w wynikach uzyskanych tymi metodami. W większości przypadków skuteczność FISH w wykrywaniu mutacji chromosomowych była nieporównywalnie większa, co wskazuje na daleko większy zakres zmian chromosomowych związanych z tym typem nowotworu, niż do tej pory przypuszczano.

Interesującym przykładem zastosowania metody FISH w diagnozowaniu nowotworów jest wykrywanie u człowieka fuzji onkogenów *abl* i *bcr* w jądrach interfazowych. Fuzja taka jest charakterystyczna dla przewlekłej białaczki szpikowej. W badaniu zastosowano jądra interfazowe i dwie sondy znakowane różnymi fluorochromami. Po złożeniu obrazów i wtórnym ich kolorowaniu można wyraźnie zobaczyć miejsca, gdzie normalnie znajdują się oba geny, i obszar, w którym doszło do fuzji [18].

Metodę FISH zastosowano także np. do scharakteryzowania zmian genetycznych w *fibrosarcoma* występującym u dzieci w różnych okresach życia. Podejrzewano, że schorzenie to jest związane z występowaniem różnej liczby kopii chromosomów 8, 11, 17 i 20 (głównie ich brakiem). Udało się ustalić, że faktycznie do drugiego roku życia *fibrosarcoma* związana jest w większości przypadków z brakiem jednej kopii chromosomu 8, 11, 17 lub 20 (w różnych kombinacjach); dodatkowe kopie chromosomów 17 i 20 pojawiają się u dzieci pięcioletnich; natomiast brak jest nieprawidłowości w liczbie chromosomów w przypadku pacjentów w wieku od 7 do 17 lat .

MAPOWANIE GENÓW

Przy mapowaniu genów określa się albo odległość od jakiegoś znanego genu, albo położenie względem prążka lub określonego punktu na chromosomie (centromer lub

telomer), lub kolejność położenia genów względem siebie [13,23,24]. W drugim przypadku stosuje się kombinacje FISH i tradycyjnego barwienia metodą Giemsy lub tzw. barwienia replikacyjnego, w którym komórki w określonym momencie cyklu komórkowego traktowane są tymidyną lub BrdU [13]. W ostatnim przypadku należy pamiętać o ograniczeniach wynikających z rozdzielczości metody, choć z drugiej strony odpowiednia modyfikacja (np. DIRVISH FISH) pozwala na uzyskanie zadowalających efektów [17].

WADY I ZALETY METODY FISH

Bezpieczeństwo pracy

Korzystając w metodzie znakowania izotopowego z pierwiastków promieniotwórczych istnieje konieczność zachowania ścisłego reżimu zarówno podczas samego znakowania, jak i po, w trakcie pozbywania się odpadków promieniotwórczych. Natura znaczników fluorescencyjnych likwiduje zagrożenia dla zdrowia badacza.

"Długowieczność" sond

W przypadku znakowania radioizotopowego występuje ograniczenie czasowe wynikające z rozpadu pierwiastka promieniotwórczego. Czasy te albo są stosunkowo krótkie (np. w przypadku izotopu fosforu P^{32} czas połowicznego rozpadu wynosi 14,2 dnia), albo pierwiastek mimo długiego czasu połowicznego rozpadu nie nadaje się do wszystkiego typu badań (izotop siarki S^{35} – czas połowicznego rozpadu 87,2 dnia). W przypadku znakowania fluorescencyjnego istnieje możliwość znacznego odizolowania w czasie znakowania sond nukleotydami z cząsteczkami reporterowymi i procesu hybrydyzacji z następującym po nim dołączaniem barwników fluorescencyjnych. Podając za firmami biotechnologicznymi można przyjąć, że sondę można przechowywać nawet przez półtora roku.

Możliwość interpretacji wyników wprost

Stosując metodę FISH otrzymuje się wynik bezpośredni, nie wymagający w większości przypadków dodatkowej analizy. Wyjątek stanowią tu badania dotyczące kolejności oraz odległości sond (genów) na stosunkowo małych odcinkach DNA. Ograniczenia te wynikają z parametrów rozdzielczości i czułości metody oraz samej metodyki, która może stwarzać różne warunki do interpretacji wyników.

Stosunkowo dobra rozdzielczość metody

Rozdzielczość metody zależy przede wszystkim od dwóch czynników. Od stopnia kondensacji chromatyny oraz podejścia metodycznego.

Jeżeli wykorzystuje się do badań chromosomy metafazowe, to rozdzielczość FISH wynosi ok. 3 Mb [23]. Przy zastosowaniu dwóch sond, każdej znakowanej innym fluorochromem oraz chromosomów prometafazowych, istnieje możliwość określenia porządku sond, gdy są one oddalone od siebie 600 do 800 kb [24]. Trzeba jednak w tym wypadku pamiętać o uwarunkowaniach wynikających ze struktury trzeciorzędo-

Cząsteczki reporterowe:

Biotyna
Digoksygenina
Dinitrofenyl

Barwniki:

rodamina
Cascade blue
fluoresceina

Sondy:

1. Rodamina
2. Cascade blue
3. Fluoresceina
4. Rodamina + Cascade blue
5. Fluoresceina + rodamina
6. Fluoresceina + Cascade blue
7. Rodamina + Cascade blue + fluoresceina

Rys. 2. Kombinacja trzech barwników fluorescencyjnych w metodzie z równoczesną hybrydyzacją z siedmiu różnych sond

wej kwasów nukleinowych, mogących wpływać na uzyskany obraz. Chodzi tu głównie o to, że sposób zwijania się DNA w chromosomie może wpływać znacząco na uzyskiwany obraz, jeżeli sondy położone są zbyt blisko siebie.

W jądrach interfazowych standardowo uzyskuje się rozdzielczość od 50 do 100 kb. W przypadku modyfikacji metody FISH rozdzielczość może wzrosnąć. Przykładem jest metoda nazwana przez autorów DIRVISH FISH, w której DNA jest dodatkowo rozciągane na szkiełkach podstawowych. W tej metodzie wykazano odrębność dwóch sekwencji, gdy były one oddalone od siebie (jak wykazała analiza restrykcyjna) o ok. 6,8 kb (odległość tę ustalono poprzez analizę fragmentów restrykcyjnych) [17].

Możliwość stosowania więcej niż jednego typu sondy na raz

Stosując dwa barwniki fluorescencyjne do wyznakowania dwóch sond można po opracowaniu komputerowym otrzymać obraz, na którym dwoma różnymi kolorami uwidocznione są dwie różne sekwencje [11,28]. Istnieje możliwość zmodyfikowania podejścia i użycia dwóch barwników fluorescencyjnych do znakowania trzech sond. Podobnie przy zastosowaniu trzech różnych barwników fluorescencyjnych i trzech cząsteczek reporterowych istnieje możliwość wyznakowania do siedmiu sond różnego typu. Po zebraniu obrazów mikroskopowych i komputerowym opracowaniu przy pomocy odpowiedniego programu komputerowego (np. GeneJoin) uzyskuje się siedem różnych sygnałów, które mogą być wykorzystywane np. przy tworzeniu bibliotek chromosomowo-specyficznych opartych na sekwencjach centromerowych, lub innych sekwencji charakterystycznych dla chromosomów, badaniach nad dystrybucją DNA w jądrach interfazowych i w mapowaniu genów [18].

Często zbyt mała czułość metody

Przyjmuje się, że czułość metody FISH jest obecnie niższa lub porównywalna z uzyskiwaną w tradycyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondami znakowanymi radioizotopowo [23]. Jednak w pewnego typu badaniach (np. badania ilościowe dotyczące transkrypcji), w których potrzebna jest wysoka czułość i selektywność metody, stosując

zmodyfikowaną hybrydyzację *in situ* z sondami znakowanymi izotopowo można uchwycić zmiany będące poza zakresem czułości osiągalnym dla FISH.

Z drugiej strony problem czułości może wynikać raczej z ograniczeń sprzętowych i metodycznych, co w związku z ciągłym rozwojem sprzętu mikroskopowego oraz oprogramowania naukowego rokuje szybkie przełamanie tej bariery.

Wydajność hybrydyzacji w FISH mieści się z reguły w zakresie od 70 do 80% badanych płytek [5,20]. Stanowi to pewne ograniczenie szczególnie w badaniach ilościowych (jeżeli dotyczą one zmian np. w obrębie jednego typu próbki, wynik może ulec zafalszowaniu) oraz stawia wymóg każdorazowego sprawdzania tego parametru.

Wymagania sprzętowe

O ile wykorzystuje się FISH do wyznakowania sekwencji powtarzalnych do detekcji sygnału, wystarcza zwykły mikroskop fluorescencyjny [23]. Jeżeli chcemy uwidocznić sekwencje krótkie lub unikalne, istnieje potrzeba zastosowania dodatkowego wspomaganie obrazu np. przy użyciu urządzeń typu CCD. Sytuacja komplikuje się jeszcze bardziej, gdy przy znakowaniu sond korzystano z więcej niż jednego typu fluorochromu. Wzrastają wymagania względem mikroskopu, zachodzi potrzeba stosowania więcej niż jednego źródła światła (np. poprzez zestaw filtrów); potrzebny jest komputer do kontroli kamery typu CCD, zbierania poszczególnych obrazów, ich wyświetlenia i przechowywania oraz odpowiedni program komputerowy [2]. Podnosi to znacznie koszty stosowania metody.

KIERUNKI ROZWOJU FISH

Obecnie obserwuje się dwa kierunki rozwoju FISH. Pierwszy to wysiłki zmierzające do poprawienia podstawowych parametrów (czułości i rozdzielczości), drugi to próby praktycznego zastosowania metody (np. w diagnostyce klinicznej) i związane z tym prace nad skróceniem czasu oczekiwania na wynik oraz wysiłki zmierzające w kierunku automatyzacji otrzymywanych wyników, wreszcie poprawianie "starych" danych uzyskiwanych przy wykorzystaniu tradycyjnych już dziś metod i wreszcie rozszerzenie możliwości metody poprzez wprowadzanie nowych modyfikacji

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAR-AM I, MOR O, YEGER H, SHILOH Y, AVIVI L. Detection of Amplified DNA Sequences in Human Tumor Cell Lines by Fluorescence *in situ* Hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1992; 4: 314–320.
- [2] BALLARD SG, WARD DC. Fluorescence *in situ* Hybridization Using Digital Imaging Microscopy. *J Hist Cytochem* 1993; 41(12): 1755–1759.

- [3] CACHEUX V, MILESI-FLUET C, TACHDJIAN G, DRUART L, BRUCH JF, HSI BL, UZAN S, NESSMANN C. Detection of 47,XXX trophoblast fetal cells in maternal blood by fluorescence *in situ* hybridization after using immunomagnetic lymphocyte depletion and flow cytometry sorting. *Fetal Diagn Ther* 1992; **7(3-4)**: 190–194.
- [4] CAJULIS RS, FRIAS-HIDVEGI D. Detection of numerical chromosomal abnormalities in malignant cells on body fluids by fluorescence *in situ* hybridization of interphase cell nuclei with chromosome-specific probes. *Diagn Cytopathol* 1992; **8(6)**: 627–631.
- [5] CELEDA D, BETTAG U, CREMER C. A simplified combination of DNA probe preparation and fluorescence *in situ* hybridization. *Z-Naturforsch-C* 1992; **47(9-10)**: 739–747.
- [6] FUKUYAMA R, SHIMIZU N. Detection of variation in the ribosomal RNA gene clusters by a modified fluorescence *in situ* hybridization method. *Jpn J Hum Genet* 1992; **37(2)**: 139–143.
- [7] GANSHIRTAHLERT D, BORJESSONSTOLL R, BURSZYK M, DOHR A, GARITSEN HSP, HELMER E, MINY P, VELASCO M, WALDE C, PATTERSON D, TENG N, BHAT NM, BIEBER MM, HOLZGREVE W. Detection of Fetal Trisomy-21 and Trisomy-18 from Maternal Blood Using Triple Gradient and Magnetic Sorting. *Am J Reprod Immunol* 1993; **30**: 2–3.
- [8] GEBHART E, TRAUTMANN U, REICHARD S, LIEHR T. Chromosomal Heterogeneity of Aneuploid Leukemic Cell Population Detected by Conventional Karyotyping and by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). *Anticancer Research* 1993; **5C**: 1857–1862.
- [9] HARRISON KJ, BARRETT IJ, LOXMAN BL, KUCHINKA BD, KALOUSEK DK. Detection of Placental Mosaicism in trisomy 18 Conception Using Interphase Cytogenetic Analysis.
- [10] INAZAWA J, ABE T. [Applications of FISH to chromosome analysis in hematological malignancies]. *Nippon Rinsho* 1992; **50(6)**: 1298–1303.
- [11] LEBO RV, LYNCH ED, WIEGANT J, MOORE K, TROUNSTINE M, van der PLOEG M. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization and pulsed field electrophoresis dissect CMT1B gene region. *Hum Genet* 1991; **88**: 13–20.
- [12] MARTIN RH, CHAN K, KO E, RADEMAKER AW. Detection of Aneuploidy in Human Sperm by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) - Different Frequencies in Fresh and Stored Sperm Nuclei. *Cytog & Cell Genetics* 1994; **65**: 1–2.
- [13] MATSUDA Y, HARADA YN, NATSUME-SAKAI S, LEE K, SHIOMI T, CHAPMAN-VM. Location of the mouse complement factor H gene (cfh) by FISH analysis and replication R-banding. *Cytogenet Cell Genet* 1992; **61(4)**: 282–285.
- [14] MOORE L, TITENKOHOLLAND N, SMITH MT. Use of Fluorescence *in situ* Hybridization to Detect Chromosome-Specific Changes in Exfoliated Human Bladder and Oral Mucosa Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1993; **22(3)**: 130–137.
- [15] MORIM, ISHIKAZA K, SERIKAVA T, YAMADA Y. Localization of rat insulin I gene (INS1) to chromosome 1q55 by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genetics* 1992; **59**: 31–33.
- [16] MUKHERJEE AB, MURTY VV, CHAGANTI RS. Detection of cell-cycle stage by fluorescence *in situ* hybridization: its application in human interphase cytogenetics. *Cytogenet-Cell-Genet* 1992; **61(2)**: 91–94.
- [17] PARRA I, WINDLE B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nature Genetics* 1993; **5**: 17–21.
- [18] RIED T, BALDINI A, RAND TC, WARD DC. Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 1388–1392.
- [19] RODRIGUEZ E, MATHEW S, MUKHERJEE AB, REUTER VE, BOSL GJ. Analysis of chromosome 12 aneuploidy in interphase cells from human male germ cell tumors by fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 1992; **5(1)**: 21–29

- [20] SCHOFIELD DE, FLETCHER JA. Trisomy 12 in pediatric granulosa-stromal cell tumors. Demonstration by a modified method of fluorescence *in situ* hybridization on paraffin-embedded material. *Am J Pathol* 1992; **141**(6): 1265–1269.
- [21] SCHOFIELD DE, FLETTCHER JA, GRIER HE, YUNIS EJ. Fibrosarcoma in Infants and Children – Application of New Techniques. *Am J Pathol* 1994; **18**: 14–24.
- [22] TAKABASHIE, KOYAMA K, HITOMI A, NAKAMURA Y. A High-Resolution Cytogenic Map of Human Chromosome-12-Localization of 195 New Cosmid Markers by Direct R-Banding Fluorescence *in situ* Hybridization. *Hum Genet* 1994; **4**: 405–409.
- [23] TRASK B. Fluorescence *in situ* hybridization: application in cytogenetic and gene mapping. *Technical Focus* 1991; **7**: 149–154.
- [24] WARD D, LICHTER P, BOYLE A, BALDINI A, MENNIGER J, BALLARD SG. Gene Mapping by Fluorescent *in situ* Hybridization and Digital Imaging Microscopy. Etiology of Human Disease at the DNA Level 1991: 291–303.
- [25] YU J, TONG S, YANG-FENG T, KAO FT. Construction and characterization of a region-specific microdissection library from human chromosome 2q35-q37. *Genomics* 1992; **14**(3): 769–774.

Rafał Wiśniewski

Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej
im. Jana Zurzyckiego Uniwersytetu Jagiellońskiego
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

SZTUCZNY CHROMOSOM DROŹDŹOWY: BUDOWA I ZASTOSOWANIE

YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOME: STRUCTURE AND APPLICATION

AGNIESZKA SĘKOWSKA

Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana
Zurzyckiego UJ w Krakowie

Streszczenie. Jednym z powszechniej stosowanych narzędzi biologii molekularnej ostatnich lat stał się sztuczny chromosom drożdżowy (YAC). Pozwala on na klonowanie bardzo dużych fragmentów DNA w postaci dodatkowego chromosomu w drożdżach. Możliwość wstawiania fragmentów obcego DNA wielkości rzędu 500 tys. pz lub większych znacznie ogranicza liczbę klonów niezbędnych do całkowitego pokrycia genomu. Otrzymane klony w dużym stopniu ułatwiają analizę sekwencji nukleotydowych, a co za tym idzie przyspieszają fizyczne mapowanie całych genomów. W związku z dużą zdolnością do klonowania YAC jest uważany za pomost łączący cytogenetykę i analizę molekularną.

Słowa kluczowe: sztuczny chromosom drożdżowy, klonowanie genów, biblioteki genowe.

Summary. Last years the yeast artificial chromosome (YAC) has become one of the most commonly used tools in molecular biology. It allows cloning of large pieces of DNA in the form of extra chromosomes in the yeast. This capacity to accept foreign DNA inserts at least an order of magnitude larger than those obtainable in cosmids, i.e. 500 kb, thus drastically reducing the total number of clones required to provide coverage of complex genomes. YACs greatly facilitate the analysis of genomic sequences over long distances and, thus, physical mapping of complex genomes. Because of their large cloning capacity they serve as a bridge between cytogenetic and molecular levels of resolution.

Key words: yeast artificial chromosome, genes cloning, genomic libraries.

Wykaz skrótów: FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*) – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy, pz – pary zasad,

TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu, YAC (ang. *yeast artificial chromosome*) – sztuczny chromosom drożdżowy

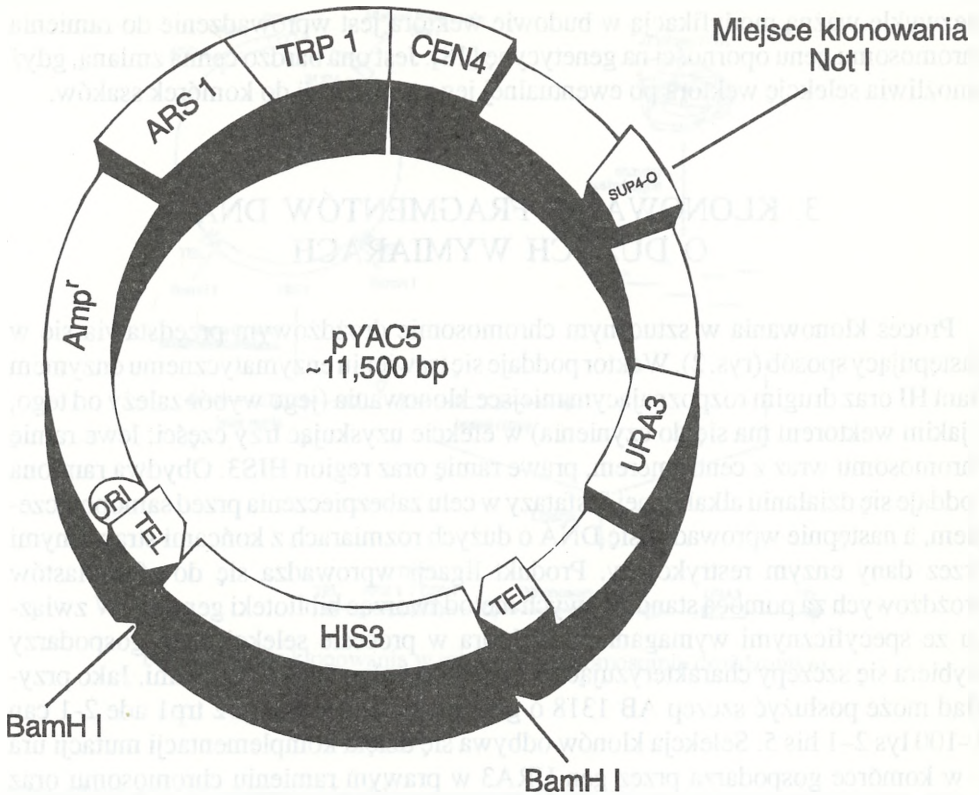
1. WPROWADZENIE

Klonowanie fragmentów DNA jest jedną z podstawowych metod stosowanych w biologii molekularnej. Standardowe techniki klonowania w wektorach plazmidowych, kosmidowych czy bakteriofagach ograniczone są jednak do fragmentów nie większych niż 50 tys. pz., podczas gdy wiele zagadnień genetyki eukariontów wymaga analizy setek tysięcy, a nawet milionów pz. Spowodowane jest to wielkością poszczególnych genów czy też dostępnością markerów zlokalizowanych z daleka od badanych genów. Również globalna analiza całych genomów, takich jak np. ludzki, wymaga analizy milionów pz. Inną poważną wadą klonowania w bakteriach jest fakt, że pewne klasy sekwencji obecnych w eukariontach jak sekwencje palindromowe czy powtórzenia tandemowe nie są reprezentowane w bibliotekach z *E. coli* [1].

Pomocnym w przezwyciężeniu tych ograniczeń okazało się skonstruowanie na początku lat osiemdziesiątych sztucznego chromosomu drożdżowego (pYAC). Umożliwia on klonowanie fragmentów DNA wielkości setek tysięcy pz, obecność zaś sekwencji palindromowych i powtórzeń tandemowych w genomie drożdżowym wskazuje na możliwość ich badania za pośrednictwem sztucznego chromosomu.

2. BUDOWA SZTUCZNEGO CHROMOSOMU DROŹDŻOWEGO

Jako sztuczny chromosom wektor zawiera trzy niezbędne elementy stanowiące o jego strukturze chromosomowej. Są to: centromer, jako miejsce przyczepu mikrotubul w procesach podziałów komórkowych, początek replikacji (ORI) oraz sekwencje telomerowe chroniące integralność całego chromosomu oraz zabezpieczające terminalnie usytuowane geny. Jeden z wektorów pYAC5 został skonstruowany na bazie plazmidu pBR 322 poprzez stopniowe usuwanie jednych, a wprowadzanie innych fragmentów [3]. Z niezbędnych fragmentów pBR 322 pozostawiono początek replikacji (ORI) oraz gen oporności na ampicylinę, co umożliwia klonowanie tego wektora w bakteriach (wektory pYAC należą do klasy wektorów wahadłowych). Z pozostałych elementów wektora należących już do systemu eukariotycznego należy wymienić miejsce klonowania znajdujące się w drożdżowym genie SUP4-o, będącym ochre-supresyjnym allelem dla tyrozynowego t-RNA. Miejsce to jest rozpoznawane przez enzym Not I należący do klasy endonukleaz rzadkotnących. Następne, niezwykle istotne dla wektora geny to TRP1 i URA3 warunkujące syntezę tryptofanu i uracylu.



Rys. 1. Schemat wektora pYAC5

W związku z tym na gospodarzy dla wektora wybiera się drożdże będące mutantami auktotroficznymi pod względem syntezy tych związków. Kolejne elementy wektora to: ARS-1 – czyli autonomicznie replikująca się sekwencja pełniąca funkcje początku replikacji, CEN4 – 3 sekwencja zapewniająca funkcje centromeru. Te dwa elementy są sekwencjami naturalnie graniczącymi z genem TRP1 w IV chromosomie drożdżowym. TEL – są to sekwencje telomerowe pochodzące z makronukleusowego, rybosomalnego DNA (rDNA) z *Tetrahymena*. Sekwencja HIS3 nie jest niezbędną w procesie klonowania, w wektorze cyrkularnym zaś rozgranicza dwie sekwencje telomerowe. Istnieją też inne wersje sztucznych chromosomów drożdżowych różniących się między sobą miejscami klonowania rozpoznawanymi przez inne enzymy restrykcyjne, np. pYAC4 ma miejsce klonowania rozpoznawane przez enzym EcoRI [3]. Innym przykładem jest wektor pYAC-RC skonstruowany na bazie wektora pYAC3. W miejscu klonowania SnaBI wprowadzono oligonukleotydy (tzw. *polilinker*) z miejscami rozpoznawanymi przez kilka endonukleaz rzadkotnących [13]. Inną

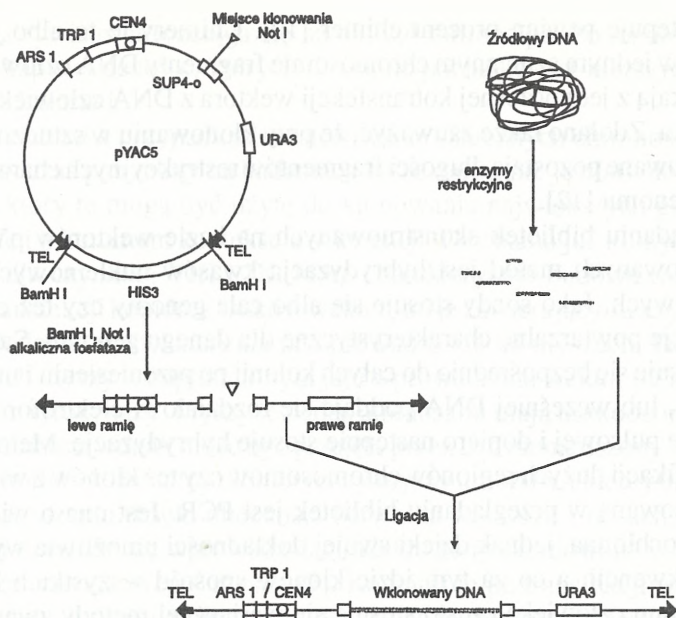
niezwykle ważną modyfikacją w budowie wektora jest wprowadzenie do ramienia chromosomu genu oporności na genetycyne [18]. Jest ona bardzo cenną zmianą, gdyż umożliwia selekcję wektora po ewentualnej jego transfekcji do komórek ssaków.

3. KLONOWANIE FRAGMENTÓW DNA O DUŻYCH WYMIARACH

Proces klonowania w sztucznym chromosomie drożdżowym przedstawia się w następujący sposób (rys. 2). Wektor poddaje się trawieniu enzymatycznemu enzymem Bam HI oraz drugim rozpoznającym miejsce klonowania (jego wybór zależy od tego, z jakim wektorem ma się do czynienia) w efekcie uzyskując trzy części: lewe ramię chromosomu wraz z centromerem, prawe ramię oraz region HIS3. Obydwa ramiona poddaje się działaniu alkalicznej fosfatazy w celu zabezpieczenia przed samopołączeniem, a następnie wprowadza się DNA o dużych rozmiarach z końcami strawionymi przez dany enzym restrykcyjny. Produkt ligacji wprowadza się do sferoplastów drożdżowych za pomocą standardowych metod tworząc biblioteki genowe. W związku ze specyficznymi wymaganiami wektora w procesie selekcji jako gospodarzy wybiera się szczepy charakteryzujące się pewnymi określonymi cechami. Jako przykład może posłużyć szczep AB 1318 o genotypie MATa ura 3-52 trp1 ade 2-1 can 1-100 lys 2-1 his 5. Selekcja klonów odbywa się dzięki komplementacji mutacji ura 3 w komórce gospodarza przez gen URA3 w prawym ramieniu chromosomu oraz komplementacji mutacji gospodarza trp1 przez gen TRP1 w lewym ramieniu chromosomu. Ostateczną selekcją jednak jest selekcja z wykorzystaniem blokującej ekspresji ochre-supresora SUP4-o, który ulega uszkodzeniu przez insercję wprowadzonego DNA w miejscu klonowania. Komórki gospodarza normalnie tworzą czerwone kolonie dzięki obecności genu ade 2-ochre, który powoduje nagromadzenie się czerwonego barwnika w komórce. Jeżeli supresor w wektorze pYAC ulega ekspresji w komórkach gospodarza (po transformacji), to tworzą się białe kolonie, jako wynik aktywności genu SUP4-o. Jeżeli jednak nastąpiło wklonowanie wprowadzanego DNA, to gen supresorowy ulega inaktywacji i tworzą się znów czerwone kolonie.

4. ZASTOSOWANIE SZTUCZNYCH CHROMOSOMÓW DROŹDŻOWYCH

Sztuczne chromosomy używa się przede wszystkim do konstrukcji bibliotek genowych, co związane jest z faktem, że można w nich klonować bardzo duże fragmenty DNA. Publikacje donoszą o sklonowaniu fragmentów wielkości 800 tys. pz (zawierających DNA kodujący 5SrRNA)[12] do miliona pz [8], przy czym nie jest wspom-



Rys. 2. Proces klonowania w sztucznym chromosomie drożdżowym

nana górna granica pojemności klonowanego DNA. Obecnie jest wiele doniesień na temat konstrukcji bibliotek genomu ludzkiego [4, 9, 10, 12, 14, 15, 19].

Dużym zainteresowaniem badaczy cieszy się chromosom X, a także chromosom 22 będący drugim najmniejszym chromosomem człowieka [19]. Chromosom 21 także jest bardzo intensywnie badany, a wynikiem tych badań jest utworzenie podbiblioteki wzbogaconej o ludzki chromosom 21 [15]. Jednak aby w pełni wykorzystać możliwości, jakie stwarza zastosowanie sztucznych chromosomów do tworzenia i badania bibliotek, ważne jest, aby były one dobrze zorganizowane i przeglądane. W wielu przypadkach użyteczne są biblioteki zawierające fragmenty z całego genomu, w innych jednak stosuje się biblioteki ograniczone do jednego tylko chromosomu czy nawet jego części. W przypadkach takich stosuje się hybrydy somatyczne zawierające np. DNA chomika z niewielkim fragmentem DNA ludzkiego. Podejście takie zastosowano przy tworzeniu biblioteki zawierającej odległą część długiego ramienia chromosomu X [12]. W tym ostatnim przypadku zauważono ciekawy fakt – przy badaniu klonów powstałych na bazie hybryd nie zaobserwowano tworzenia się chimer, czyli klonów zawierających zarówno ludzki, jak i obcy DNA. Byłaby to niezwykle ważna cecha świadcząca o tym, że sztuczne chromosomy wykazują tendencję do ligacji z pojedynczymi fragmentami restrykcyjnymi. Niestety nowsze doniesienia dotyczące także hybryd somatycznych chomik - ludzki chromosom X wykazują, że w badanych

klonach występuje pewien procent chimer [10]. Chimery te to albo jednocześnie występujące w jednym sztucznym chromosomie fragmenty DNA człowieka i chomika, lub wynikają z jednoczesnej kotransfekcji wektora z DNA człowieka i wektora z DNA chomika. Zdołano także zauważyć, że przy klonowaniu w sztucznych chromosomach zachowane pozostają długości fragmentów restrykcyjnych charakterystyczne dla danego genomu [12].

W przeglądaniu bibliotek skonstruowanych na bazie wektorów pYAC jedną z częściej stosowanych metod jest hybrydyzacja kwasów nukleinowych na filtrach nitrocelulozowych. Jako sondy stosuje się albo całe genomy czy też chromosomy, albo sekwencje powtarzalne charakterystyczne dla danego genomu. Samą hybrydyzację zaś stosuje się bezpośrednio do całych kolonii po przeniesieniu i unieruchomieniu na filtrze, lub wcześniej DNA poddaje się rozdziałowi elektroforetycznemu w elektroforezie pulsowej i dopiero następnie stosuje hybrydyzację. Metody te stosuje się do identyfikacji dużych regionów chromosomów czy też klonów z wielu loci. Inną techniką stosowaną w przeglądaniu bibliotek jest PCR. Jest ona o wiele droższa i bardziej pracochłonna, jednak dzięki swojej dokładności umożliwia wykrycie pojedynczych sekwencji, a co za tym idzie klonów spośród wszystkich innych. Przy badaniu genomu człowieka często stosuje się wariant tej metody zwany Alu-PCR, który znacznie zwiększa jej czułość [11]. Wariant ten ułatwia także zastosowanie analizy produktów reakcji PCR za pomocą techniki zwanej FISH, co wymaga uprzedniego wyznakowania biotyną [17]. Dzięki tworzeniu bibliotek i zastosowaniu powyższych metod możliwe jest dokładne poznanie budowy genów – ułożenie eksonów i intronów, a nawet sekwencji regulatorowych, jak to stało się w przypadku genu kodującego receptor dla TNF- β [4].

Jednak nie tylko ludzki genom jest przedmiotem zainteresowania badaczy. Skonstruowano już biblioteki genowe dla takich organizmów, jak: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* [5], *Arabidopsis thaliana* [2], *Beta vulgaris* [6], *Hordeum vulgare*, marchew, kukurydza czy pomidor [8]. Przy konstruowaniu bibliotek roślinnych występuje pewne ograniczenie. Otóż średni rozmiar insertu waha się w granicach 140–150 tys. pz, co jest o wiele mniejszą wartością niż ta uzyskiwana dla genomów ssaczy przy stosowaniu tych samych lub podobnych metod [6].

Prawdopodobnie różnice te wynikają z trudności w otrzymywaniu fragmentów roślinnego DNA o dużej wielkości związanych z obecnością ściany komórkowej czy dużymi rozmiarami samych komórek.

Możliwości, jakie stwarza badaczom sztuczny chromosom, nie ograniczają się tylko do tworzenia bibliotek genowych. Wiele funkcjonalnych jednostek genetycznych organizmów wyższych zajmuje duże obszary DNA, np. locus bithorax u *Drosophila melanogaster* biorący udział w regulacji rozwoju muszki rozciąga się na ok. 320 tys. pz [3]. Ostatnie oszacowania wielkości genu, który jest uszkodzony w dystrofii mięśniowej Duchenne'a, wskazują, że pojedyncze locus genowe, którego funkcja kodowania białka mogłaby być wypełniona przez odcinek DNA długości 15

tys. pz w rzeczywistości rozciąga się na ok. 2,4 miliona pz. Podobnie duże zasięgi mają także skupiska genowe, których dokładne poznanie jest niezwykle ważne dla genetyki molekularnej.

We wszystkich tych przypadkach zastosowanie sztucznych chromosomów wydatnie skróciłoby czas potrzebny na badania, a także ogromnie je ułatwiło. W szczególności zaś wektory te mogą być użyte do klonowania największych genów w kompletnej formie i naturalnym kontekście sekwencji. Uzyskano już klony z nienaruszonym genem dla czynnika VIII i IX, które charakteryzuje budowa rozproszona i z których po transfekcji komórek ssaków wektorami je zawierającymi uzyskano natywny enzym. Podobne doświadczenia przeprowadza się na myszach. Do przedjądrzy albinotycznych myszy w zapłodnionym jaju wprowadzono wektor pYAC ze sklonowanym genem tyrozyminy. Myszy te będąc albinosami mają uszkodzony ten właśnie gen, którego funkcja jednak może być przejęta przez gen nienaruszony wprowadzony sztucznie do komórek. Fenotyp albinotyczny myszy umożliwił identyfikację transgenu już przy urodzeniu dzięki obecności barwnika w skórze i oczach [16]. Równie dobre wyniki uzyskuje się wprowadzając ludzkie geny sklonowane w wektorach do komórek jądra zarodkowego myszy [7]. Komórki te po transfekcji wykazują zdolność do repopulacji organizmu myszy, włączając nawet komórki szlaku płciowego, wykazują ogromną stabilność, aktywność wprowadzonego genu zaś utrzymuje się przez wiele pokoleń.

Tak więc, jak widać z tego krótkiego przeglądu, sztuczne chromosomy drożdżowe skonstruowane początkowo w celu przebadania czynników sterujących zachowaniem się chromosomów podczas mitozy stwarzają nieograniczone możliwości badania całych genomów, a także, co niezwykle ważne w obecnej dobie silnego rozwoju biotechnologii, praktycznego wykorzystania produktów kodowanych przez geny.

LITERATURA

- [1] ANAND R, TYLER-SMITH C, VILLASANTE A. Construction of yeast artificial chromosome libraries with large inserts using fractionation by pulsed-field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 1989; **17**, 9.
- [2] BANCROFT J, DEAN C, SCHMIDT R, WESTPHAL L. PFGE - resolved RFLP analysis and long range restriction mapping of the DNA of *Arabidopsis thaliana* using whole YAC clones as probes. *Nucleic Acids Research*, 1992; **20**, **23**: 6201–6207.
- [3] BURKE DT, CARLE GF, OLSON MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 1987; **236**: 806–812.
- [4] DELOUKAS P, AIGNER L, KANIA M, van LOON APGM. Construction of yeast artificial chromosome (YAC) clone banks covering three genome equivalents and isolation of YACs containing the human gene encoding tumor necrosis factor receptor. *Gene* 1992; **110**: 189–195.
- [5] DUNFORD R, ROGNER UC. Construction of yeast artificial chromosomes containing barley DNA and the identification of clones carrying copies of the repeated element BIS-1. *Hereditas* 1991; **115**: 133–138.

- [6]. EYERS M, EDWARDS K, SCHUCH W. Construction and characterisation of yeast artificial chromosome library containing two haploid *Beta vulgaris* L. genome equivalents. *Gene* 1992; **121**: 195–201.
- [7]. JAKOBOVITS A, AUSTIN HA, GREEN LL, KLAPHOLZ S, MAYNARD-CURVIE CE, MOORE AL, VERGARA GJ. Germ-line transmission and expression of a human - derived yeast artificial chromosome. *Nature* 1993; **362**, 18 march.
- [8]. KLEINE M, GRANER A, HERRMANN RG, JUNG C, MICHALEK W. Construction of a barley (*Hordeum vulgare* L.) YAC library and isolation of a Hor1 - specific clone. *Mol Gen Genet* 1993; **240**: 265–272.
- [9]. LAIRMORE TC, DON S, HOWE JR, CHI D, CARLSON K, VEILE R, MISHRA SK, WELLS JR. SA, DONIS-KELLER H. A 1,5 - megabase yeast artificial chromosome config from human chromosome 10 q 11.2 connecting three genetic loci (RET, D10S94, and D10S102) closely linked to the MEN 2A locus. *Genetics* 1993 **90**: 492–496, January.
- [10]. LEE JT, MURGIA A, NUSSBAUM RL, OLIVOS JM, SOSNOSKI DM. Construction and characterisation of a yeast artificial chromosome library for Xpter - X q 27.3; a systematic determination of cocloving rate and X-chromosome representation. *Genomics* 1992; **12**: 526–533.
- [11]. LENGAUER C, CREMER T, GREEN ED. Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* 1992; **13**: 826–828.
- [12]. LITTLE RD, CARLE GF, PORTA G, SCHLESSINGER D, D'URSO M. Yeast artificial chromosomes with 200 to 800 kilobase inserts of human DNA containing HLA, V_k, SS and Xq24 - Xq28 sequences. *Genetics* 1989; **86**: 1598–1602, march
- [13]. MARCHUK D, COLLINS FS. pYAC-RC, a yeast artificial chromosome vector for cloning DNA with infrequently cutting restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research* 1988; **16**, 15.
- [14]. MONACO AP, LAVIN Z., LEHRACH H, MILLWOOD J, WALKER AP. A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne Muscular Dystrophy gene. *Genomics* 1992; **12**: 465–473.
- [15]. ROSS MT, NIŽETIĆ D, NGUYEN C, KNIGHTS C, VATCHERA R, BURDEN N, DOUGLAS C, ZEHEFNER G, WARD DC, BALDINI A, LEHRACH H. Selection of a human chromosome 21 enriched YAC sub-library using a chromosome - specific composite probe. *Nature Genetics* 1992; **1**, july.
- [16]. SCHEDL A, KELSEY G, MONTOLIN L, SCHÜTZ G. A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number - dependent expression in transgenic mice. *Nature* 1993; **362**, 18 march.
- [17]. SLIM R, BERNHEIM A, MACHAVOINE C. Assignments of 37 YAC clones to R-banded chromosomes by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1994; **65**: 104–107.
- [18]. SRIVASTAVA AK, SCHLESSINGER D. Vectors for inserting selectable markers in vector arms and human DNA inserts of yeast artificial chromosomes (YACs). *Gene* 1991; **103**: 53–59.
- [19]. XIE Y, HAU F, PEYRARD M, RUTTLEDGE MH, FRANSSON J, DE JONG P, COLLINS J, DUNKAN J, NORDENSKJÖLD M, DUMANSKI JP. Cloning of a novel, anonymous gene from a megabase-range YAC and cosmid config in the neurofibromatosis type 2/ meningioma region on human chromosome 22q12. *Human Molecular Genetics* 1993; **2**, **9**: 1361–1368.

Agnieszka Sękowska

Zakład Mikrobiologii i Immunologii IBM UJ,

Instytut Biologii Molekularnej UJ im. Jana Zurzyckiego

31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

WPLYW SUPERSKRĘCENIA CZĄSTECZKI DNA I JEGO REGULACJI PRZEZ WARUNKI ŚRODOWISKA NA EKSPRESJĘ BAKTERYJNYCH GENÓW

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL REGULATION OF DNA SUPERCOILING ON BACTERIAL GENE EXPRESSION

KINGA J. WÓJCIK

Zakład Mikrobiologii i Immunologii Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu
Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie. Ujemne superskręcenie nadaje bakteryjnemu DNA dynamiczny charakter. Wywiera ono wpływ na aktywność promotorów licznych genów przyczyniając się do obniżenia wydatku energetycznego niezbędnego do rozkręcenia podwójnej helisy DNA i/lub modulując topologię promotora i operatora, udostępniając je polimerazie RNA, białkom aktywującym i represjonującym. Poziom superskręcenia cząsteczki DNA kontrolowany przez gyrazę, wprowadzającą ujemne superskręty i topoizomerazę I, relaksującą DNA, zależy od warunków wzrostu bakterii, takich jak: pH, dostępność pożywienia, tlenu, stężenie soli, temperatura. Fluktuacje różnorodnych czynników środowiska regulują ekspresję genów kodujących białka spełniające ważne funkcje w komórce bakteryjnej, tj. białka stresowe i czynniki wirulencji. Stresowe warunki środowiska oddziałują na superskręcenie DNA prawdopodobnie poprzez zmianę stosunku ATP/ADP w komórce, od którego zależy aktywność gyrazy DNA.

Summary. DNA in bacterial cells is under negative superhelical tension. The level of negative supercoiling is controlled by DNA gyrase, the enzyme which introduces supercoils, and DNA topoisomerase I, which relaxes them. DNA supercoiling plays a role in regulation gene expression by influencing on transcription initiation of many bacterial promoters. Superhelical density of DNA changes in response to the various environmental stimuli such as pH, nutrition conditions, anaerobic conditions, osmolarity, temperature. The fluctuation of growth conditions regulates the induction of bacterial shock proteins. The growth condition may modulate the supercoiling by changes in the ratio of ATP/ADP, to which gyrase is sensitive.

1. WPROWADZENIE

Zarówno mikroorganizmy saprofityczne, jak i patogenne stykają się w swoim życiu z ekstremalnie różnymi środowiskami. Do czynników stresowych, które oddziałują na bakterie, należą zaburzenia temperatury, warunków osmotycznych, pH, dostępności tlenu i pożywienia. Podczas infekcji człowieka lub zwierzęcia bakterie patogenne napotykać np. środowiska o znacznie obniżonym pH, przy przejściu przez żołądek oraz podczas wzrostu wewnątrz komórek żywiciela, w fagosomach lub fagolizosomach. W celu utrzymania się przy życiu, co dla bakterii patogennych oznacza również zachowanie wirulencji, mikroorganizmy wykształciły liczne sposoby komunikowania się ze środowiskiem, odbierania dopływających informacji i szybkiej reakcji na aktualne warunki. Odpowiedź na czynniki środowiska wymaga często skoordynowanej ekspresji wspólnie regulowanych, licznych genów bakterii. Grupę genów włączoną w odpowiedź na dany bodziec nazywamy stymulonem. Stymulon może grupować wiele regulonów, z których każdy zawiera geny znajdujące się pod kontrolą tych samych czynników regulacyjnych. Regulon składa się z kolei z operonów, których geny są pod kontrolą tego samego promotora. Ostatnio opisano swoisty, globalny system regulujący odpowiedź bakterii na zmienne warunki środowiska, opierający się na modulacji topologii DNA [5].

2. SUPERSKRĘCENIE CZĄSTECZKI DNA

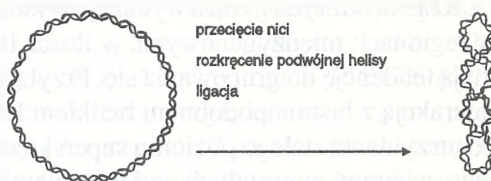
Natywny DNA występuje w komórce bakteryjnej w stanie superzwiniętym. Strukturę kolistej cząsteczki DNA można opisać za pomocą trzech zależnych od siebie wielkości. Liczba wzajemnych opleceń dwóch nici helisy – L , jest równa sumie liczby skrętów dwuniciowej helisy – T i liczby zwojów, czyli superskrętów dwuniciowej, skróconej już helisy DNA – W .

$$W = L - T$$

Kolista, prawoskrętna helisa DNA wyizolowana z komórki bakteryjnej ma mniejszą liczbę skrętów niż tej samej długości kolista cząsteczka zrelaksowana, z przeciętą jedną nicią lub cząsteczka linearna. Wywołuje to napięcie wewnątrz kolistej cząsteczki i wymusza przyjęcie konfiguracji ujemnego superskręcenia helisy DNA (rys. 1) [6]. Konfiguracja ta minimalizuje odstępstwo od stanu energetycznie optymalnego oraz ułatwia rozdzielanie nici podczas transkrypcji, transpozycji, replikacji i rekombinacji. Ujemne superskręcenie bakteryjnego DNA nadaje mu dynamiczny charakter. Pomaga w tworzeniu i stabilizacji alternatywnych struktur DNA [22]. Podstawową strukturą DNA jest prawoskrętna helisa B-DNA. Gdy uwodnienie cząsteczki DNA spadnie do 75% lub zmieni się siła jonowa, helisa przybiera konformację A. Taka zmiana występuje prawdopodobnie *in vivo* podczas hybrydyzacji DNA – RNA, w

regionie podlegającym transkrypcji oraz podczas sporulacji. W pewnych warunkach, cząsteczka DNA może także przybierać inne konformacje. Występuje np. jako lewoskrętna, dwuniciowa helisa tzw. Z-DNA, struktura krzyżowa, tripletowy DNA, czyli trójniciowa struktura, tworząca się w regionach bogatych w oligonukleotydy pirymidynowe, struktura poślizgowa, powstająca w regionach prostych powtórzeń lub w końcu tzw. węzłkowy DNA. Nukleoid komórki bakteryjnej występuje więc jako kompleks struktur, a energia superskręcenia

zużywana jest m.in. do tworzenia lokalnych wariantów struktur. Zmiany konformacyjne w cząsteczce DNA regulowane są *in vivo* i wpływają na biologiczną aktywność genów w danym regionie. Innymi zlokalizowanymi strukturami cząsteczki DNA, ważnymi dla organizacji i funkcjonowania bakteryjnego chromosomu są zagięcia i pętle. Energia superskręcenia nie jest wykorzystywana do ich tworzenia [22]. Zagięcia zdeterminowane są sekwencją nukleotydów. Duże pętle w DNA, wielkości kilkuset lub nawet kilku tysięcy bp mogą powstawać w wyniku zagięcia fragmentu DNA lub przy współdziałaniu białek regulacyjnych. Model pętli tłumaczy, w jaki sposób sekwencje odległe od danego genu mogą wpływać na regulację jego ekspresji. Superskręcenie cząsteczki DNA może oddziaływać na tworzenie się i stabilizację takich pętli nie ze względów energetycznych, ale poprzez wpływ na względną pozycję odległych od siebie sekwencji w helisie DNA, łączonych cząsteczkami białka oraz przez zmianę stopnia kondensacji DNA, wspomagając lub interferując z interakcją białek wbudowanych do odległych loci w cząsteczce DNA.



Rys. 1. Powstanie superskręconej cząsteczki DNA

3. REGULACJA SUPERSKRĘCENIA BAKTERYJNEGO DNA

Poziom ujemnego superskręcenia cząsteczki DNA kontrolowany jest przez topoiomerazę II, zwaną gyrazą DNA, wprowadzającą ujemne superskręty i topoiomerazę I, relaksującą DNA [7]. Gyraza, której podjednostki kodowane są przez niezwiązane geny *gyrA* i *gyrB*, w obecności ATP przecina obie nici DNA i wprowadza ujemny skręt helisy, natomiast w nieobecności ATP – może usuwać ujemne superskręcenie cząsteczki. Liczba cząsteczek topoiomeraz znajduje się w komórce pod kontrolą homeostatyczną [27]. Ich synteza związana jest ściśle z bieżącym poziomem superskręcenia DNA. Wzrost ujemnego superskręcenia aktywuje gen *topA* i hamuje ekspresję genów *gyrA* i *gyrB*. Gyraza łączy się z małą specyficznością z wieloma

sekwencjami w cząsteczce DNA, skoncentrowanymi wokół widełek replikacyjnych oraz położonymi poniżej aktywnych promotorów [6]. Opisano także sekwencje, m. in. REP, do których gyraza wykazuje wysokie powinowactwo. Występują one zawsze w regionach międzygenowych, w ilości 100–200 kopii na chromosom bakteryjny i mają tendencję do grupowania się. Przyłączanie się do nich gyrazy stymulowane jest interakcją z histonopodobnym białkiem HU [16]. Działanie topoizomeraz prowadzi do utrzymania stałego poziomu superskręcenia helisy DNA w komórce oraz korekcji jego zaburzeń, powstałych pod wpływem procesów transkrypcji, replikacji, translokacji itp. Przesunięcie kompleksu transkrypcyjnego wzdłuż cząsteczki DNA generuje ujemną presję superskręcenia za sobą i dodatnią, przed kompleksem [18]. Podobnie, podczas replikacji DNA, rozwijanie nici helisy może powodować powstanie dodatknych superskrętów w regionie cząsteczki DNA przed widełkami replikacyjnymi. Dodatnia presja superskręcenia wywierana na cząsteczkę mogłaby zakłócić zarówno proces transkrypcji, jak i replikacji. Zapobiega temu gyraza, wprowadzając ujemne superskręty, a topoizomeraza koryguje ich nadmiar w matrycy DNA po przejściu kompleksu transkrypcyjnego.

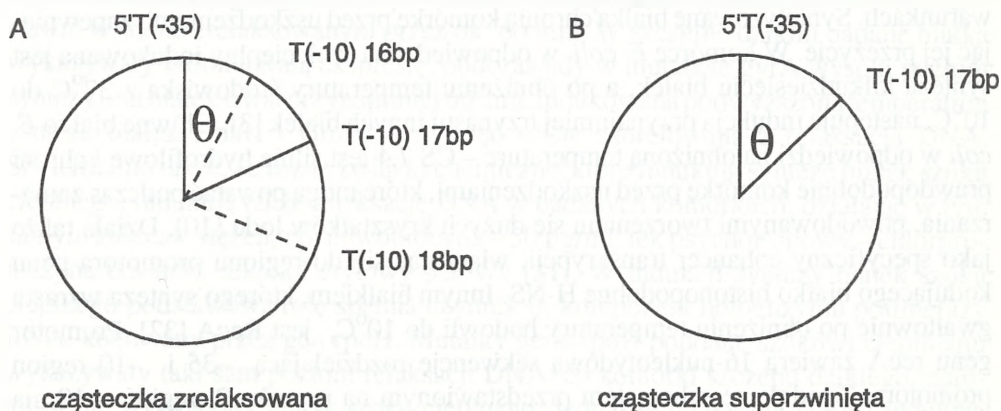
Topoizomerazy utrzymują superskręcenie cząsteczek DNA na poziomie zależnym od warunków wzrostu bakterii [6]. Zmiany warunków wzrostu powodujące zmiany stanu energetycznego w komórce prowadzą do ustalenia nowego poziomu superskręcenia DNA.

We wprowadzeniu ujemnych superskrętów pośrednio współdziała także czynnik terminacji transkrypcji Rho [1]. Innymi czynnikami wpływającymi na topologiczny stan DNA jest heterologiczna rodzina białek histonopodobnych, których sekwencje wykazują wysoki stopień homologii wśród bakteryjnych szczepów [8]. Należą do niej małe białka, w większości o charakterze zasadowym, występujące w komórce w dużej liczbie kopii, 20–120 tys, w postaci dimerów, tetramerów itp. Białka histonopodobne mają duże powinowactwo do DNA. Uczestniczą w organizacji bakteryjnego nukleoidu tworząc labilne struktury nukleosomopodobne, przez co wymuszają około połowy ujemnych superskrętów DNA chromosomu bakterii [16]. Współdziałają one także z lokalnym mechanizmem regulacyjnym.

4. WPŁYW SUPERSKRĘCENIA NA REGULACJĘ EKSPRESJI GENÓW

Poziom syntezy wielu białek jest silnie wrażliwy nawet na małe różnice w superskręceniu helisy DNA [30]. Wiele genów wykazuje maksymalną aktywność przy gęstości superskręcenia poniżej przeciętnej normy. Nieliczne białka syntetyzowane są z maksymalną wydajnością, gdy superskręcenie cząsteczki DNA znajduje się na poziomie stale występującym w komórce lub nieco podwyższonym. Ujemne super-

skręcenie DNA może oddziaływać na aktywność promotorów genów poprzez zmniejszenie energii niezbędnej do otwarcia podwójnej helisy DNA i/lub modulację sekwencji promotora i operatora udostępniając je polimerazie RNA, białkom aktywującym lub represjonującym [22, 30]. Promotory klasy σ^{70} genów pochodzących z komórki *E. coli* zawierają charakterystyczne sekwencje TATAAT w regionie – 10 i TTGACA w regionie – 35 (liczby wyrażają położenie sekwencji względem miejsca inicjacji transkrypcji) [4]. Sekwencje te rozdzielone są zwykle ok. 17 parami zasad i leżą po tej samej stronie skręconej helisy DNA. Podczas inicjacji transkrypcji polimeraza RNA prawdopodobnie wchodzi z nimi w specyficzny kontakt. Kąt skręcenia Θ między dwoma regionami może wpływać na interakcję polimerazy RNA z promotorem, a tym samym na poziom ekspresji genu [32]. Wielkość tego kąta zależy od rodzaju i liczby nukleotydów oddzielających sekwencje – 35 i – 10 promotora i od średniego poziomu skręcenia helisy DNA. Rysunek 2 schematycznie przedstawia wzajemną, względną orientację dwóch nukleotydów tymidynowych z końca 5' regionu – 35 i z końca 5' regionu – 10, w rzucie prostopadłym do osi helisy DNA. Charakterystyczne regiony promotora oddzielone są 17 bp, a kąt skręcenia między dwiema sąsiednimi zasadami zrelaksowanej cząsteczki wynosi średnio $34,5^\circ$ (rys. 2A). Zaznaczono także względne położenie nukleotydów tymidynowych z regionu – 10, gdy sekwencje – 35 i – 10 zrelaksowanej helisy rozdzielone są 16 i 18 bp. Wprowadzenie ujemnego superskręcenia cząsteczki DNA powoduje zmianę kąta skręcenia między rozpatrywanymi nukleotydami promotora (rys. 2B). Przy niskim poziomie superskręcenia cząsteczki DNA zwiększona jest ekspresja genów zawiera-



Rys. 2. Rzut promotora σ^{70} *E. coli* prostopadły do osi helisy DNA; zaznaczono względną orientację nukleotydów tymidynowych 5' końca regionów –35 i –10 promotora (wg [32]): A – cząsteczka DNA zrelaksowana, B – cząsteczka DNA superzwinęta, o gęstości 6,5% ujemnych superskrętołów

jących mniej niż 17 nukleotydów rozdzielających regiony promotora –35 i –10. Natomiast geny zawierające dłuższą niż 17 bp sekwencję rozdzielającą, ulegają maksymalnej ekspresji przy podwyższonym poziomie superskręcenia DNA. Geny z odstępem 17 bp w regionie promotora –10–35, nie są wrażliwe na zmiany superskręcenia. Zależność tą potwierdzono dla kilku genów, pochodzących ze szczepu *E. coli* [30].

Superskręcenie może także oddziaływać pośrednio na poziom syntezy białka, np. modulując ekspresję genów, których produkty wpływają na translację lub tempo degradacji białka.

5. WPŁYW ŚRODOWISKA NA ZMIANĘ SUPERSKRĘCENIA DNA

Aby posiadać użyteczną dla komórki funkcję regulacyjną, poziom superskręcenia DNA powinien reagować na czynniki środowiska. I rzeczywiście, wykazano zmiany w gęstości superskręcenia cząsteczek DNA pod wpływem zmian warunków wzrostu bakterii, ze względu na: dostępność pożywienia, tlenu, stężenie soli, pH itp. [6]. Zmianę poziomu ujemnego superskręcenia DNA w odpowiedzi na różnorodne bodźce środowiska przedstawiono w tabeli 1. Ekspresja genów kodujących białka, które grają kluczową rolę w komórce bakteryjnej regulowana jest przez fluktuacje różnych czynników środowiskowych [24]. Znanych jest przynajmniej 13 regulonów, indukowanych warunkami stresowymi, takimi jak: podwyższona temperatura, niska temperatura, oddziaływanie związków chemicznych, szok osmotyczny itp. [17, 33]. Geny kodujące białka stresowe ulegają gwałtownej ekspresji w niekorzystnych dla komórki warunkach. Syntetyzowane białka chronią komórkę przed uszkodzeniami, zapewniając jej przeżycie. W komórce *E. coli* w odpowiedzi na szok cieplny indukowana jest synteza kilkudziesięciu białek, a po obniżeniu temperatury środowiska z 37°C do 10°C, następuje indukcja przynajmniej trzynastu innych białek [3]. Główne białko *E. coli* w odpowiedzi na obniżoną temperaturę – CS 7,4 jest silnie hydrofilowe i chroni prawdopodobnie komórkę przed uszkodzeniami, które mogą powstać podczas zamrażania, powodowanymi tworzeniem się dużych kryształków lodu [10]. Działa także jako specyficzny enhancer transkrypcji, włączając się do regionu promotora genu kodującego białko histonopodobne H-NS. Innym białkiem, którego synteza wzrasta gwałtownie po obniżeniu temperatury hodowli do 10°C, jest RecA [32]. Promotor genu *recA* zawiera 16-nukleotydową sekwencję rozdzielającą –35 i –10 region promotora. Zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 2, region –10 ma tendencję do przesunięcia się od pozycji optymalnej w kierunku odwrotnym do ruchu wskazówek zegara. Warunki powodujące wzrost skręcenia helisy DNA stymuluje więc akcję promotora genu *recA*. Pomiar konformacji DNA potwierdziły, że liczba opleceń nici DNA zmienia się odwrotnie proporcjonalnie do zmian temperatury. Gen *recA* ulega także indukcji po zahamowaniu aktywności gyrazy DNA.

TABELA 1. Czynniki zmieniające superskręcenie cząsteczki DNA w komórkach bakterii wg [6]

Czynnik zaburzający	Wpływ na ujemne superskręcenie	Referencje
Transkrypcja	wzrost	[28]
Nagłe obniżenie temperatury	relaksacja	[14]
Nagłe podwyższenie temperatury	relaksacja	[21]
Sporulacja	wzrost	[23]
Kiełkowanie spor	relaksacja	[23]
Obniżenie pH	relaksacja	[15]
Szok osmotyczny	wzrost	[13,
Nagłe pojawienie się warunków beztlenowych	relaksacja,przemijająca	[12]
Warunki beztlenowe	wzrost	[12]
Przeniesienie do ubożego podłoża wzrostowego	relaksacja	[2]
Nagła poprawa warunków pokarmowych	relaksacja,przemijająca	[2]
Późna faza wzrostu	relaksacja	[23]
Dodanie chloroquine	wzrost	[9]

Ostatnio dowiedziono, że inhibitory gyrazy powodujące relaksację DNA indukują także syntezę białek szoku cieplnego, m.in. DnaK i GroEL [21]. Zbadano zależność syntezy tych białek od poziomu superskręcenia DNA w komórce. Dla monitorowania zmian w gęstości superskręcenia DNA zastosowano plazmid reporterowy pUC118. Traktowanie komórek dzikiego szczepu *E.coli* podwyższoną temperaturą prowadziło do krótkotrwałej relaksacji plazmidu pUC118. Gęstość superskręcenia plazmidu powracała do poziomu wyjściowego w ciągu 10 min. Natomiast w szczepie zawierającym zmutowany gen *gyrA*, po podniesieniu temperatury plazmidowy DNA pozostawał w stanie zrelaksowanym przez ok. 60 min. W szczepie dzikim badane białka wykazywały krótkotrwałą ekspresję, podczas gdy w mutancie *gyrA* wysoki poziom syntezy obu białek trwał przynajmniej 60 min. Indukowana podwyższoną temperaturą synteza białek DnaK i GroEL jest więc ściśle skorelowana z relaksacją DNA. Stwierdzono także, że różne związki chemiczne, które indukują syntezę białek szoku cieplnego, indukują także relaksację DNA w badanych komórkach, działając w tym samym zakresie stężeń, np. nowobiocyna – 50 µg/ml, lek psychotropowy – chlorpromazyna 0,3 mM, alkohol etylowy 5% v/v [21]. W indukcji syntezy białek szoku cieplnego podstawową rolę spełnia czynnik σ , komponent holoenzymu polimerazy RNA, kodowany przez gen *rpoH*. Mutanty genu *rpoH* poddane szokowi cieplnemu wykazywały taki sam poziom relaksacji DNA, co komórki szczepu dzikiego, natomiast nie wytwarzały białek szoku cieplnego. Jednakże relaksacja DNA i indukcja produkcji białek szoku cieplnego są ze sobą skorelowane, a stan rozluźnienia DNA wywołany np. działaniem temperatury może być jednym z warunków wstępnych do indukcji syntezy tych białek, chociaż nie niezbędnym. Produkcja białek szoku cieplnego może także podlegać indukcji pod wpływem innych czynników, bez zmiany

superskręcenia DNA w całej komórce, np. właściwość taką wykazują niektóre antybiotyki działające na rybosomy lub ekspresja w komórce zmutowanych białek.

Synteza licznych białek wirulencji zarówno w komórkach bakterii gramdodatnich, jak i gramujemnych jest również indukowana zmienionymi warunkami środowiska [11, 29].

6. TOPOLOGIA BAKTERYJNEGO CHROMOSOMU

Chromosomowy DNA występuje w komórce bakterii w postaci nukleoidu, struktury skondensowanej około tysiąckrotnie, skompleksowanej z licznymi białkami histonopodobnymi i zorganizowanej w superzwinięte domeny [16]. W chromosomie szczepu *E. coli* występuje 40 do 50 domen. Gęstość superskręcenia całej cząsteczki chromosomu równa jest 2,5 do 5 ujemnych superskrętów na tysiąc bp [20]. Pavitt i Higgins [26] spróbowali określić, czy poziom superskręcenia DNA jest jednakowy w całym chromosomie oraz czy czynniki środowiskowe wpływają kompleksowo, w równym stopniu na całą cząsteczkę chromosomu bakterii. Jeśli domeny chromosomu różniłyby się gęstością superskręcenia lub niejednakowo odpowiadały na stymulację czynnikami środowiskowymi, zmieniającymi topologię DNA, miałyby to duże znaczenie dla organizacji bakteryjnego genomu. Ekspresja poszczególnych genów łączyłaby się ściśle z ich miejscem położenia w chromosomie. Byłoby to także ważne podczas konstrukcji wektorów integracyjnych, włączanych do chromosomu.

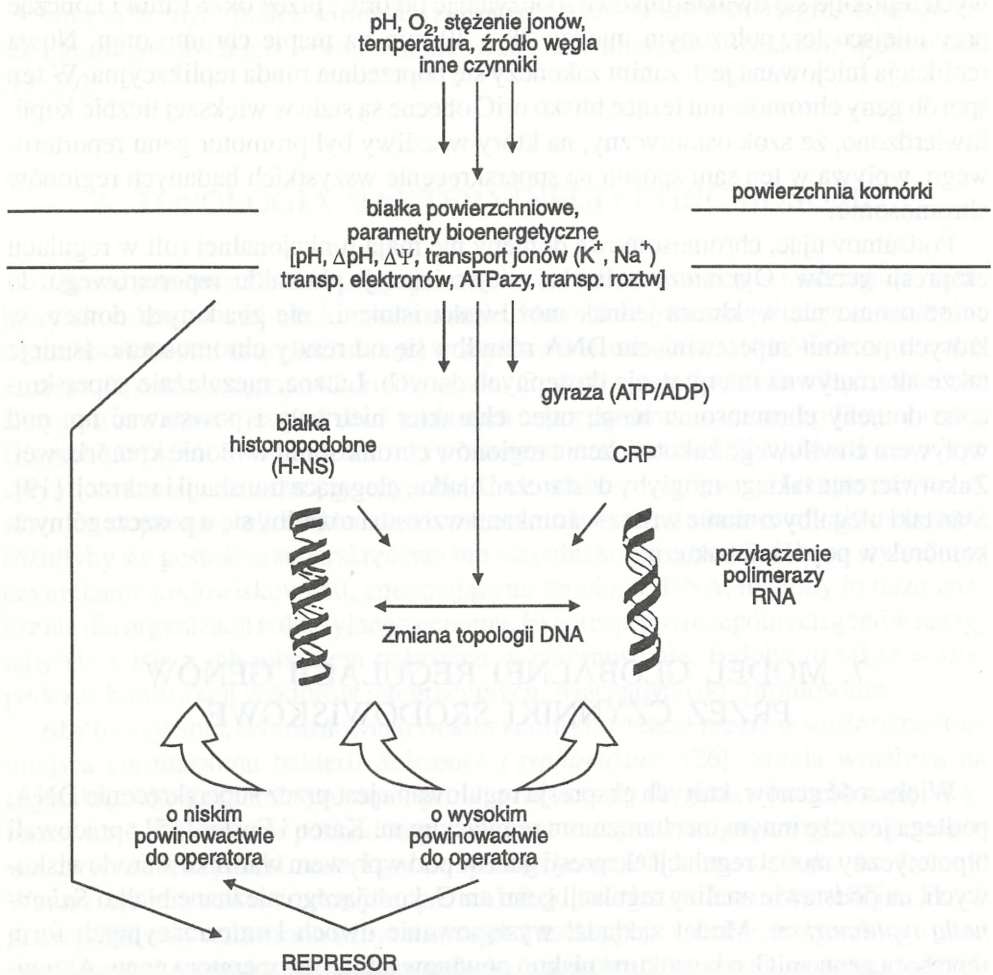
Aby to wyjaśnić, skonstruowano wektor zdolny do włączenia się w ściśle określone miejsca chromosomu bakterii *Salmonella typhimurium* [26]. Sonda wrażliwa na superskręcenie zawierała promotor proU, przyłączony do genu reporterowego lucyferazy luxAB. Promotor pochodzący z operonu transportu trójmetyloglicyny, reagował *in vivo* na czynniki zmieniające superskręcenie DNA, m.in. szok osmotyczny. Wzrost stężenia soli w środowisku prowadził do zwiększenia syntezy mRNA. Przed gen reporterowy wstawiono silny terminator transkrypcji, w celu zabezpieczenia genu przed innymi promotorami, które mogły być ulokowane w chromosomowym DNA powyżej sondy. Tak skonstruowaną sondę włączono do plazmidu integracyjnego λ dv. Plazmid ten miał początek replikacji faga λ , który może być blokowany przez represor cI, wrażliwy na podwyższoną temperaturę (represor ulega inaktywacji w 42°C). Plazmid λ dv replikował się autonomicznie podczas wzrostu komórki w temperaturze 30°C, natomiast po przeniesieniu szczepu do temperatury 42°C, plazmid mógł utrzymać się w komórkach tylko w stanie zintegrowanym z chromosomem bakterii. Integracja następowała w specyficznym miejscu, poprzez rekombinację fragmentu genu tetA włączonego do plazmidu z sekwencjami tet A transpozonu mTn10. Nie wykazano znaczących różnic w ekspresji genu reporterowego zintegrowanego z poszczególnymi domenami chromosomu. Wskazuje to, że domeny chromosomu mają podobny poziom superskręcenia DNA. Obserwowano jedynie stały efekt pozycyjny

– nieznacznie większą ekspresję genu reporterowego zintegrowanego w miejscu położonym bliżej początku replikacji chromosomu *oriC*. Chromosom bakterii jelitowych replikuje się dwukierunkowo, poczynając od *oriC*, przez ok. 81 min i kończąc przy miejscu *ter*, położonym między 28 a 30 min na mapie chromosomu. Nowa replikacja inicjowana jest, zanim zakończy się poprzednia runda replikacyjna. W ten sposób geny chromosomu leżące blisko *oriC* obecne są stale w większej liczbie kopii. Stwierdzono, że szok osmotyczny, na który wrażliwy był promotor genu reporterowego, wpływa w ten sam sposób na superskręcenie wszystkich badanych regionów chromosomu.

Podsumowując, chromosomowe domeny nie mają funkcjonalnej roli w regulacji ekspresji genów. Ograniczona liczba miejsc insercji plazmidu reporterowego do chromosomu nie wyklucza jednak możliwości istnienia nie zbadanych domen, w których poziom superzwinięcia DNA różniłby się od reszty chromosomu. Istnieje także alternatywna interpretacja dostępnych danych. Liczne, niezależnie superskręcone domeny chromosomu mogą mieć charakter nietrwały i powstawać np. pod wpływem chwilowego zakotwiczenia regionów chromosomu w błonie komórkowej. Zakotwiczenia takiego mogłyby dostarczać białka, ulegające translacji i sekrecji [19]. Stan taki ulegałby zmianie wraz z warunkami wzrostu i różniłby się u poszczególnych komórek w populacji bakterii.

7. MODEL GLOBALNEJ REGULACJI GENÓW PRZEZ CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE

Większość genów, których ekspresja regulowana jest przez superskręcenie DNA, podlega jeszcze innym mechanizmom regulacyjnym. Karen i Foster [15] opracowali hipotetyczny model regulacji ekspresji genów pod wpływem warunków środowiskowych, na podstawie analizy regulacji genu *aniG*, kodującego nieznane białko *Salmonella typhimurium*. Model zakładał występowanie dwóch konformacyjnych form represora genu *aniG*, o wysokim i niskim powinowactwie do operatora genu. Aktywność represora ulegała zmianie pod wpływem działania czynników środowiskowych, w tym przypadku mannozy i niskiego pH. Podczas nieobecności mannozy i przy podwyższonym pH represor miał wysokie powinowactwo do operatora. Łączył się z nim i hamował ekspresję *aniG* we wszystkich stanach superskręcenia DNA. Represor indukowany przez mannozę i niskie pH środowiska przyjmował konformację małego powinowactwa do operatora. Sygnał zmiany konformacji może być przekazany przez białko sensorowe, związane z błoną komórkową. Represor o niskim powinowactwie wbudowuje się słabiej do rozluźnionych pod wpływem czynników środowiskowych sekwencji promotora genu *aniG*. Pozwala to na zwiększoną ekspresję genu. Jednakże, w warunkach beztlenowych i przy wysokiej sile jonowej, poziom ujemnego super-



Rys. 3. Model regulacji ekspresji genów przez czynniki środowiskowe: $\Delta \Psi$ – potencjał błony

skręcenia jest zmieniony i wzrasta powinowactwo operatora do represora nawet, gdy znajduje się on w stanie niskiego powinowactwa do operatora. W modelu tym można także uwzględnić wpływ cAMP-CRP i regulacyjną rolę histonopodobnego białka H-NS, przyłączającego się do DNA w sąsiedztwie genu *aniG* [25, 31]. Białko to np. poprzez zagięcie DNA zmienia topologię operatora i ułatwia interakcję represor – operator tak, że represor wiąże się z operatorem nawet przy niższych wartościach pH.

Zaprezentowany model może także służyć wyjaśnieniu działania czynników środowiskowych na ekspresję innych białek.

Pozostaje jeszcze do wytłumaczenia sposób, w jaki zmiany środowiska zewnętrznego mogą być przenoszone na topologię DNA. Zależna od ATP gyraza DNA ma podstawową rolę w utrzymaniu ujemnego superskręcenia helisy DNA. W dodatku, jej aktywność zależy od stosunku poziomów ATP do ADP. Niedawno wykazano, że stresowe warunki środowiska, które oddziałują na superskręcenie DNA, wpływają także na stosunek ATP/ADP [12]. W komórce *E. coli* poddanej szokowi solnemu wzrasta zarówno superskręcenie DNA, jak i stosunek ATP/ADP [13]. Podobnie w przypadku wzrostu bakterii w warunkach beztlenowych, czynniki te są ze sobą skorelowane [12]. Tak więc ogólny środowiskowy "sensor" dla aniG lub innego loci wrażliwego na superskręcenie DNA może być składnikiem systemu generującego energię, związanego ze ścianą komórkową bakterii.

LITERATURA

- [1] ARNOLD GF, TESSMAN I. Regulation of DNA superhelicity by rpoB mutations that suppress defective Rho-mediated transcription termination in *E. coli*. *J Bacteriol* 1988; **170**: 4266–4271.
- [2] BALKE V, GRALLA J. Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *E. coli*. *J Bacteriol* 1987; **169**: 4499–4506.
- [3] CHUANG S-E, DANIELS DL, BLATTNER FR. Global regulation of gene expression in *E. coli*. *J Bacteriol* 1993; **175**: 2026–2036.
- [4] DOI RH. Regulation of gene expression. [w] *Modern Microbial Genetics*. Wiley-Liss, Inc. 1991: 15–39.
- [5] DORMAN ChJ. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect Immun* 1991; **59**: 745–749.
- [6] DRLICA K. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* 1992; **6**: 425–433.
- [7] DRLICA K, PRUSS GJ, BURGER RM, FRANCO RJ HSIEH L-S, BERGER BA. Roles of DNA topoisomerases in bacterial chromosome structure and function. [w] *The bacterial chromosome*. Drlca K, Riley M [red] ASM Press Washington DC 1990: 195–204.
- [8] DRLICA K, ROUVIERE-YANIV J. Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol Rev* 1987; **51**: 301–319.
- [9] ESPOSITO F, SINDEN R. Supercoiling in prokaryotic and eukaryotic DNA: changes in response to topological perturbation of plasmids in *E. coli* and SV40 *in vitro*, in nuclei, and in CV-1 cells. *Nucl Acids Res* 1987; **15**: 5105–5123.
- [10] GOLDSTEIN J, POLLIT NS, INOUE M. Major cold shock protein of *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 283–287.
- [11] GROSS R. Signal transduction and virulence regulation in human and animal pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 1993; **104**: 301–326.
- [12] HSIEH L-S, BURGER RM, DRLICA K. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] changes associated with a transition to anaerobic growth. *J Mol Biol* 1991; **219**: 443–450.
- [13] HSIEH L-S, ROUVIERE-YANIV J, DRLICA K. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]: changes associated with salt shock. *J Bacteriol* 1991; **173**: 3914–3917.
- [14] JONES PG, CASHEL M, GLASER G, NEIDHARDT FC. Function of relaxed-like state following temperature down-shift in *E. coli*. *J Bacteriol* 1992; **174**: 3903–3914.
- [15] KAREM K, FOSTER JW. The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1993; **10**: 75–86.

- [16] KRAWIEC S, RILEY M. Organization of bacterial chromosome. *Microbiol Rev* 1990; **54**: 502–539.
- [17] LINDQUIST S, CRAIG EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; **22**: 631–677.
- [18] LIU LF, WANG JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987; **84**: 7024–7027.
- [19] LYNCH AS, WANG JC. Anchoring of DNA to the bacteria cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polipeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol* 1993; **175**: 1645–1655.
- [20] MILLER WG, SIMONS RW. Chromosomal supercoiling in *E.coli*. *Mol Microbiol* 1993; **10**: 675–684.
- [21] MIZUSHIMA T, NATORI S, SEKIMIZU K. Relaxation of supercoiled DNA associated with induction of heat shock proteins in *E. coli*. *Mol Gen Genet* 1993; **238**: 1–5.
- [22] MURCHIE AIH, BOWATER R, ABDUL-ela F, LILLEY DMJ. Helix opening transitions in supercoiled DNA. *Biochem Biophys Acta* 1992; **1131**: 1–15.
- [23] NICHOLSON W, SETLOW P. Dramatic increase in negative superhelicity of plasmid DNA in the forespore compartment of sporulating cells of *B. subtilis*. *J Bacteriol* 1990; **172**: 7–14.
- [24] OLSON ER. Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol Microbiol* 1993; **8**: 5–14.
- [25] OWEN-HUGHES T, PAVITT GD, SANTOS DS, SIDEBOTHAM J, HULTON CSJ, HINTON JCD, HIGGINS CF. Interaction of H-NS with curved DNA influences DNA topology and gene expression. *Cell* 1992; **71**: 255–265.
- [26] PAVITT GD, HIGGINS ChF. Chromosomal domains of supercoiling in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1993; **10**: 685–696.
- [27] PRUSS GJ, DRLICA K. DNA supercoiling and procaryotic transcription. *Cell* 1989; **56**: 521–523.
- [28] RAHMOUNI AR, WELLS RD. Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling *in vivo*. *J Mol Biol* 1992; **223**: 131–144.
- [29] SHEEHAN BJ, FOSTER TJ, DORMAN ChJ, PARK S, STEWART GSAB. Osmotic and growth-phase dependent regulation of the eta gene of *S. aureus*: a role for DNA supercoiling. *Mol Gen Genet* 1992; **232**: 49–57.
- [30] STECK TR, FRANCO RJ, WANG J-Y, DRLICA K. Topoisomerase mutations affect the relative abundance of many *E. coli* proteins. *Mol Microbiol* 1993; **10**: 473–481.
- [31] UEGUCHI Ch, MIZUNO T. The *E. coli* nucleotid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor. *EMBO J* 1993; **12**: 1039–1046.
- [32] WANG J-Y, SYVANEN M. DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol Microbiol* 1992; **6**: 1861–1866.
- [33] WILLIMSKY G, BANG H, FISCHER G, MARAHIEL A. Characterisation of cspB, a *B. subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J Bacteriol* 1992; **174**: 6326–6335.

Kinga J. Wójcik

Zakład Mikrobiologii i Immunologii Instytutu Biologii Molekularnej UJ
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

EKSPRESJA GENÓW W KOMÓRKACH OKREŚLANA CYTOMETRIĄ PRZEPLYWOWĄ*

EXPRESSION OF GENES IN CELLS

J. KAWIAK, G. HOSER

Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
Warszawa

Streszczenie. Ekspresja białek i mRNA w komórkach może być badana cytometrią przepływową w licznych komórkach określonego rodzaju. W wykrywaniu określonych białek są pomocne przeciwciała monoklonalne. Nawet nieliczne kopie mRNA można wykrywać przez odwrotną transkrypcję, amplifikację metodą PCR *in situ* i hybrydyzację *in situ* cDNA ze znakowaną sondą. W postępowaniu takim komórkę traktuje się jak próbkę do reakcji chemicznej, co pozwala uniknąć niektórych błędów metodycznych. Metody te mogą mieć znaczenie w rozwiązywaniu problemów biologicznych, biotechnologicznych oraz w diagnostyce medycznej.

Summary. The flow cytometry may be used to assay expression of proteins and mRNA in cells. For visualisation of defined proteins labeled, specific monoclonal antibodies are applied. Even few mRNA copies may be found by reverse transcription, *in situ* PCR amplification and visualisation of cDNA by *in situ* hybridisation with a labeled probe. The cell is treated as a test tube for chemical reactions, and this may be helpful to overcome some technical problems. This methods may find application in solving of some biological problems, in biotechnology as well as in medical diagnostics.

WSTĘP

Przyjmijmy, że ekspresję jakiegoś genu możemy ocenić stwierdzeniem obecności w komórce produktów białkowych bądź mRNA tego genu. Cytometria przepływowa

*Praca była finansowana z grantu 1992/1993 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

jest jednym ze sposobów dobrze nadających się do takich badań. Tą metodą można ilościowo ocenić w pojedynczych komórkach oraz ich populacjach:

- zawartość określonych białek bądź łańcuchów polipeptydowych używając do tego celu przeciwciał monoklonalnych (MoAb),
- obecność określonych informacyjnych RNA (mRNA).

Metoda może być pomocą w rozwiązywaniu wielu problemów biologicznych i biotechnologicznych.

PODSTAWY CYTOMETRII PRZEPIYWOWEJ

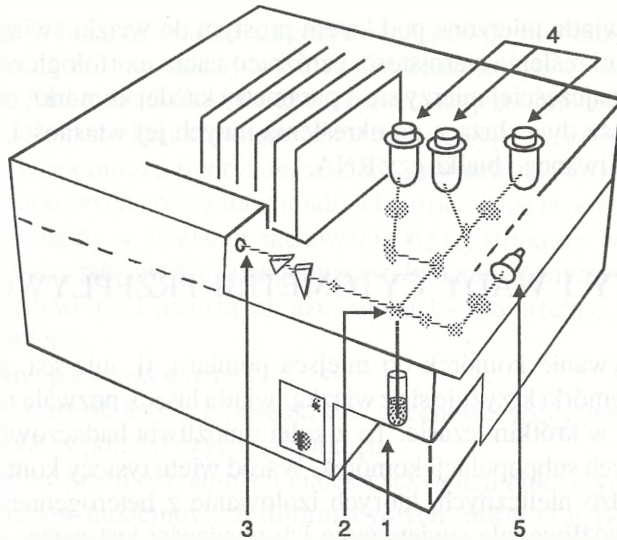
W mikroskopie oglądamy komórki przyłączone do podłoża, np. do szkiełka. Cytometrem przepływowym bada się komórki płynące w strumieniu cieczy. Taki układ jest bardzo wygodny w przypadku ilościowych pomiarów wielu komórek, które kolejno dopływają do miejsca, gdzie jest wykonywany pomiar kilku parametrów w każdej z nich. Stąd jest możliwy pomiar wielu tysięcy komórek w krótkim czasie, np. 30 000 komórek w ciągu 1 minuty.

Rozwój cytometrii przepływowej był możliwy dzięki osiągnięciom w wielu dziedzinach:

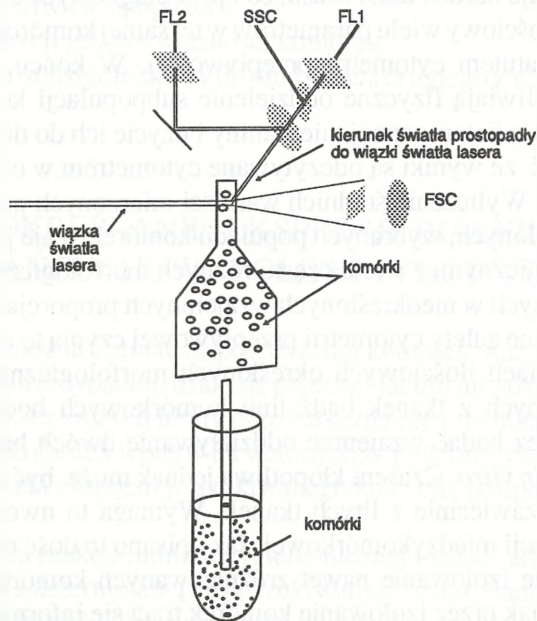
- konstrukcji sprawnych komputerów, którymi można szybko zapisywać, a w późniejszym terminie odczytywać i analizować wyniki,
- produkcji i dostępności odpowiednich przeciwciał monoklonalnych służących do określania epitopów białek,
- konstrukcji urządzeń i produkcji odczynników służących do amplifikacji i badań kwasów nukleinowych.

Uproszczony schemat budowy cytometru przepływowego przedstawiono na rysunkach 1 i 2. Zawiesina komórek jest wciągana do cytometru, a strumień cieczy z płynącymi komórkami tak jest formowany, aby pojedyncze komórki płynęły jedna za drugą. Ten wąski strumień napotyka po drodze prostopadle biegnącą wiązkę monochromatycznego światła lasera, która może pobudzać fluorescencję fluorochromu użytego do oznakowania w komórce określonej substancji. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do zawartości oznakowanej substancji, jest miarą jej zawartości w komórce. Można równocześnie mierzyć dwa albo trzy fluorochromy w tej samej komórce, jeżeli emitują one światło fluorescencji o różnych długościach fali. To pozwala na zmierzenie zawartości 2 lub 3 różnych substancji w każdej komórce.

Bezpośrednie oglądanie komórek w cytometrze nie jest możliwe, ale musimy mieć sposób na odróżnienie komórek od innych cząstek, np. fragmentów obumarłych komórek, oraz na rozpoznanie różnych morfologicznie komórek. Służą temu pomiary rozproszenia światła lasera przez badaną komórkę. Rozproszenie światła mierzone w osi wiązki światła (FSC – *forward scatter*) jest proporcjonalne do wielkości komórki,



Rys. 1. Schemat budowy cytometru przepływowego: 1 – probówka z zawiesiną komórek, 2 – miejsce pomiaru komórek; tutaj strumień komórek krzyżuje wiązkę światła lasera (patrz rys. 2), 3 – wiązka światła lasera, $\lambda = 488 \text{ nm}$, 4,5 – fotopowielczce



Rys.2. Okolice pomiaru komórek w cytometrze: FSC – pomiar rozproszenia światła w osi wiązki lasera, SSC – pomiar rozproszenia światła pod kątem prostym do wiązki lasera, FL1 i FL2 – pomiary intensywności fluorescencji (IF) dla fluorochromu 1 i 2

a rozproszenie światła mierzone pod kątem prostym do wiązki światła (SSC – *side scatter*) służy do określenia ziarnistości i zróżnicowania morfologicznego komórki.

Łącznie więc najczęściej mierzy się 4 parametry każdej komórki, dwa określające jej morfologię oraz dwa służące do określenia innych jej własności, takich np. jak zawartość poszukiwanego białka czy RNA.

ZALETY I WADY CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

Kolejne dopływanie komórek do miejsca pomiaru, tj. miejsca, gdzie strumień cieczy niosący komórki krzyżuje się z wiązką światła lasera, pozwala na pomiar wielu tysięcy komórek w krótkim czasie. To z kolei umożliwia badaczowi wyróżnienie i porównanie dużych subpopulacji komórek. Wśród wielu tysięcy komórek można też poszukiwać bardzo nielicznych, których izolowanie z heterogennej populacji jest praktycznie niemożliwe, ale stwierdzenie ich obecności jest ważną informacją dla badacza bądź lekarza. Na przykład cytometrią przeplywową można ocenić liczbę komórek macierzystych hemopoetycznych we wzbogaconych w te komórki próbkach. Zawiesina tych komórek może być użyta w przeszczepie zamiast pełnego szpiku podczas leczenia białaczek [5] bądź w terapii genowej [18]. Podobna ocena pod mikroskopem zajmuje bardzo dużo czasu, co np. w diagnostyce często jest trudne do przyjęcia. Pomiar ilościowy wielu parametrów w tej samej komórce w bardzo krótkim czasie jest dużym atutem cytometrii przeplywowej. W końcu, pewne cytometry przeplywowe umożliwiają fizyczne oddzielenie subpopulacji komórek, czyli tzw. sortowanie komórek z heterogennej mieszaniny i użycie ich do dalszych badań.

Warto podkreślić, że wyniki są odczytywane cytometrem w odniesieniu do pojedynczych komórek. Wyliczenie średnich wartości mierzonych parametrów jest wykonywane dla określonych, wybranych populacji komórek, a nie jak ma to miejsce w oznaczaniu biochemicznym, z wielu często różnych morfologicznie i fizjologicznie komórek pozostających w nieokreślonych wzajemnych proporcjach.

Wyżej wymienione zalety cytometrii przeplywowej czynią tę metodę szczególnie przydatną w badaniach ilościowych określonych morfologicznie i biochemicznie komórek otrzymanych z tkanek bądź linii komórkowych hodowanych *in vitro*. Metodą tą można też badać wzajemne oddziaływanie dwóch bądź trzech różnych rodzajów komórek *in vitro*. Czasem kłopotliwa jednak może być konieczność otrzymania komórek w zawieszynie z litych tkanek. Wymaga to uwolnienia komórek z otoczenia, z substancji międzykomórkowej. Jak opisano to dość dawno [14], właściwie przeprowadzone izolowanie nawet zróżnicowanych komórek nie zmienia ich funkcji *in vivo*. Jednak przez izolowanie komórek traci się informację o wzajemnym ułożeniu komórek w tkance, co może mieć znaczenie w interpretowaniu wzajemnych oddziaływań między nimi.

Inną niedogodnością cytometrii przepływowej jest pomiar fluorescencji, który dotyczy całej komórki, najczęściej bez uwzględnienia miejsc gromadzenia się wewnątrz komórek fluoryzujących sond. Zwykle badanie jest ograniczone do powierzchni komórki bądź do struktur wewnątrz komórki i na jej powierzchni. Jeżeli jednak z innych badań wiadomo, że fluoryzująca sonda gromadzi się tylko w określonych strukturach komórkowych np. w mitochondriach, to oczywiście pomiar cytometryczny może być przydatny w zbadaniu zachowania się tej struktury w dużej populacji komórek. Tak więc jak zwykle, uzupełniające badania różnymi technikami, np. cytometrią przepływową i analizą obrazu, mogą być konieczne dla rozwiązania określonego problemu.

Cytometrią przepływową można [12]:

- mierzyć zawartość DNA i poszukiwać obecności specyficznych sekwencji nukleotydów DNA w pojedynczych komórkach,
- poszukiwać ekspresji określonych białek i sekwencji nukleotydowych RNA, w tym również kwasów nukleinowych informacyjnych (mRNA) w pojedynczych komórkach,
- obserwować aktywację niektórych komórek,
- mierzyć długość trwania faz cyklu mitotycznego komórek,
- badać transport wielu substancji do komórek i z komórek,
- wyznaczać procent komórek żywych i martwych oraz opisywać mechanizmy śmierci komórki (martwica, apoptoza),
- badać wiele innych jeszcze własności komórek.

Obecny artykuł został ograniczony do omówienia drugiego z wymienionych wyżej problemów.

OKREŚLANIE EKSPRESJI BIAŁEK (ŁAŃCUCHÓW POLIPEPTYDOWYCH)

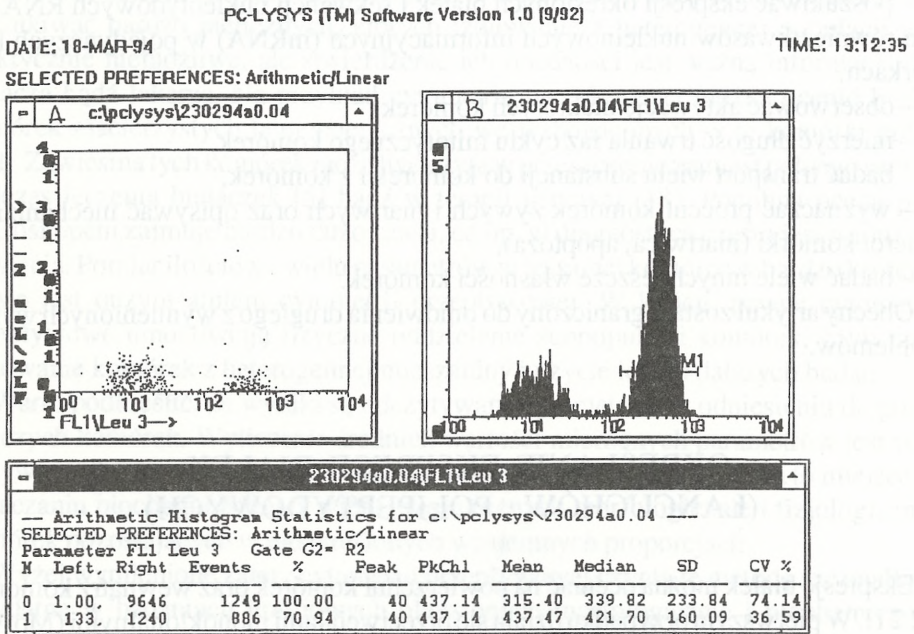
Ekspresję białek można oceniać na powierzchni komórek oraz wewnątrz komórek [12,21]. W pierwszym przypadku działa się przeciwciałami monoklonalnymi (MoAb) na żywe komórki, przez których błony plazmatyczne nie przenikają te odczynniki, a w drugim używa się komórek wpraw utrwalonych z "podziurawioną" plazmalemą.

Metoda wykrywania ekspresji poszukiwanego łańcucha polipeptydowego polega na:

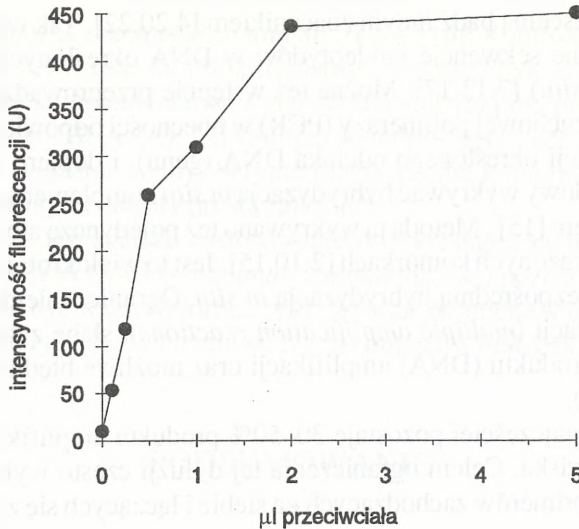
- przeprowadzeniu reakcji immunocytochemicznej (jedno- albo dwuetapowej) z MoAb wiążącym się z determinantą na poszukiwanym białku (łańcuchu polipeptydowym); przeciwciało bądź białko służące do jego wykrycia, np. awidyna, musi być sprzężone z fluorochromem, aby można potem określić jego zawartość w komórce,

– wprowadzeniu do cytometru wyznakowanych komórek i zapisaniu w pamięci komputera wyniku pomiarów wspomnianych 4 parametrów dla każdej komórki. Pomiar prowadzi się dla tylu komórek, aby potem wyliczenia statystyczne były rzetelne.

Przykład określenia ekspresji kompleksu CD3 na powierzchni limfocytów T przy użyciu przeciwciała monoklonalnego anti-CD3 może pomóc w zrozumieniu postępowania (rys. 3). Funkcje limfocytów T zależą od obecności na ich powierzchni receptorów wiążących antygen, określanych skrótem TCR (ang. *T cell receptor*). TCR jest kompleksem łańcuchów polipeptydowych, w których skład wchodzi dwa wiążące antygen ($T\alpha\beta$) oraz pięć niezmiennych łańcuchów oznaczanych jako CD3. Te ostatnie łańcuchy oznacza się greckimi literami $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ (są 2 łańcuchy ζ w każdym



Rys. 3. Wynik pomiaru intensywności fluorescencji (IF) komórek wiążących przeciwciało anti-CD3-FITC; każdy punkt na wykresie A oznacza komórkę, a jego położenie na osi x (FL1) – IF fluoresceiny (FITC), którą było znakowane przeciwciało; na wykresie B przedstawiono histogram, w którym na osi x jest IF w jednostkach umownych (U) i na skali logarymicznej od 1 do 9646, a na osi y jest liczba komórek każdej mierzonej wartości IF; w tabelce wydrukowanej poniżej wykresów można odczytać, że w szczycie oznaczonym M1 w histogramie jest 886 komórek, ich IF jest w zakresie od 133–1240 U, średnia wartość IF dla komórek oznakowanych wynosi 437 ± 160 ; komórki wyznakowane związały różną liczbę cząsteczek przeciwciała, mają więc różną liczbę łańcuchów ϵ -CD3 na powierzchni; użyte przeciwciało było w stężeniu, które wyisca wszystkie determinanty na komórkach; grupa komórek na wykresie i na histogramie leżąca po stronie lewej to te, które nie związały przeciwciała, mają one mniejszą fluorescencję (autofluorescencja) i są wyraźnie oddzielone od komórek oznakowanych przeciwciałem



Rys. 4. Przykład miareczkowania przeciwciała anti-CD3: do równej objętości krwi (równej liczby leukocytów krwi) dodano różną objętość roztworu przeciwciała anti-CD3 (oś x), na osi y są średnie wartości IF w jednostkach umownych

kompleksie). Przeciwciała anti-CD3 wiąże się z jednym z łańcuchów niezmiennych CD3, łańcuchem epsilon [6] jest więc swoistym odczynnikiem, który pozwala badać ekspresję produktu określonego genu. Na powierzchni innych niż limfocyty T komórek nie ma tego białka, więc możemy stwierdzić, że badamy tylko limfocyty T. Różne limfocyty T mają różną liczbę cząsteczek tego białka na swojej powierzchni, co po związaniu z determinantą na CD3 przeciwciała sprzężonego z fluorochromem, np. fluoresceiną, pozwala zmierzyć (w jednostkach umownych) zawartość CD3 w każdej komórce. Pomiaru te dla większej liczby limfocytów T dają możliwość wyliczenia średniej zawartości CD3/komórkę T, standardowego odchylenia tej wartości i innych wartości statystycznych. Warunkiem jest użycie przeciwciała w stężeniu wysycającym wszystkie determinanty CD3 na badanych komórkach. Ten ostatni warunek wymaga wcześniejszego miareczkowania przeciwciała. Przykład takiego miareczkowania jest przedstawiony na rysunku 4.

OKREŚLANIE SEKWENCJI NUKLEOTYDOWYCH DNA I RNA *IN SITU*

Cytometrem można wykazać w jądrze komórkowym obecność poszukiwanych sekwencji nukleotydowych DNA używając do tego celu komplementarnej sondy

znakowanej fluoresceiną bądź innym znacznikiem [4,20,22]. Tak wykrywano wielokrotnie powtarzalne sekwencje nukleotydów w DNA określonych chromosomów (hybrydyzacja *in situ*) [7,13,17]. Można też wstępnie przeprowadzić wewnątrz komórki reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR) w obecności odpowiednich par primerów dla amplifikacji określonego odcinka DNA (genu), i dopiero tak "powielony" odcinek nukleotydowy wykrywać hybrydyzacją *in situ* komplementarną sondą sprzężoną ze znacznikiem [15]. Metodą tą wykrywano też pojedyncze albo nieliczne kopie DNA wirusa w zakażonych komórkach [2,10,15]. Jest to wielokrotnie czulsza metoda w porównaniu z bezpośrednią hybrydyzacją *in situ*. Ograniczeniem są: reakcje wielokrotnej amplifikacji (*multiple amplification reactions*), słabe zatrzymywanie wewnątrz komórki produktu (DNA) amplifikacji oraz możliwe błędne odczytanie primera (*mispriming*).

W komórkach najczęściej pozostaje 30–50% produktu amplifikacji, a reszta dyfunduje do środowiska. Celem ograniczenia tej dyfuzji często wykorzystuje się do syntezy kilka par primerów zachodzących na siebie i łączących się ze sobą sekwencje nukleotydowych.

Odmianą tej techniki jest metoda *PRimed IN Situ labeling* (PRINS). W tym postępowaniu nieznakowane primery są wykorzystywane do syntezy *in situ* przez polimerazę znakowanego DNA używając znakowanych trifosfonukleotydów jako substratów. W pomysł autorów tej techniki jest wykorzystanie dużych możliwości dyskryminujących oligonukleotydowych primerów, a równocześnie otrzymanie silnego sygnału cząsteczek znacznika, np. fluorescencji.

W podobnym układzie wykorzystywano cytometrię przepływową do wykrywania w populacjach komórek licznych kopii RNA, np. mRNA α -aktyny [19] oraz rRNA [3]. Również tę technikę próbuje się użyć do wykrywania nielicznych kopii mRNA określonego rodzaju [9]. Postępowanie w tym przypadku jest następujące [8]:

- mRNA jest przepisywane wewnątrz komórek na cDNA przy wykorzystaniu odwrotnej transkryptazy.
- To cDNA jest amplifikowane reakcją *in situ* PCR.
- Produkty amplifikacji są wykrywane specyficzną sondą nukleotydową znakowaną np. fluoresceiną.

Ponieważ cała procedura przebiega wewnątrz komórki, którą traktuje się jak probówkę do reakcji chemicznej, możliwość zanieczyszczenia próbki obcymi kwasami nukleotydowymi jest mniejsza niż w procedurach przewidujących ekstrakcję kwasów nukleinowych.

W ludzkich białaczkowych komórkach linii K562 [1] wykrywano obecność genu fuzji *bcr-abl* [8]. Komórki linii K562 noszą chromosom Philadelphia z obecnym w nim genem fuzji *bcr-abl*, który powstał przez translokację między protoonkogenem *abl* na chromosomie 9, a genem *bcr* na chromosomie 22 [11]. Wykorzystano hybrydyzację *in situ* ze znakowaną fluoresceiną sondą po uprzedniej amplifikacji genu *bcr-abl* metodą *in situ* PCR. Podobnym sposobem wykrywano prowirusa HIV-1 w

zakażonych nim ludzkich komórkach linii 8E5/LAV [16]. Kontrolę stanowiły niezakażone leukocyty krwi. Inną kontrolą (dodatnią i ujemną) było użycie znakowanej fluoresceiną sondy komplementarnej i niekomplementarnej dla produktu DNA wewnątrzkomórkowego HLA-DQ. Morfologia komórek była zachowana i nie było niespecyficznego wiązania sondy. Seryjne rozcieńczenia komórek zakażonych komórkami niezakażonymi dawały prostą zależność.

Metoda ta może też znaleźć zastosowanie do określania nielicznych komórek białaczkowych we krwi (MRD – *minimal residual disease*) pozostałych po leczeniu u chorego. Może to być ważną informacją dla lekarza, pomocną w ustaleniu dalszego postępowania z chorym, który chwilowo nie ma objawów białaczki.

PODSUMOWANIE

Cytometria przepływowa jest metodą użyteczną w badaniu komórek w powiązaniu z innymi technikami. Metoda, wprawdzie najczęściej ograniczona do badania pojedynczych komórek w zawiesinie, pozwala na ilościowe pomiary kilku parametrów w każdej z nich i to w bardzo krótkim czasie. Wieloparametrowe badania pojedynczych komórek stwarzają nowe możliwości, w tym również w badaniu ekspresji genów pod wpływem różnych czynników działających na określone komórki.

BIBLIOGRAFIA

- [1] ANDERSSON LC, NILSSON K, GAHMBERG CG. K562 – A human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer* 1979; **23**: 143–147.
- [2] BAGASRA O, HAUPTMAN SP, LISCHNER HW, SACHS M, POMERANTZ RJ. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction. *New Engl J Med* 1992; **326**: 1385–1391.
- [3] BAUMAN JGJ, BENTVELZEN P. Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent *in situ* hybridization. *Cytometry* 1988; **9**: 517–524.
- [4] BAUMAN JGJ, PINKEL D, TRASK BJ, van der PLOEG M. Flow cytometric measurement of specific DNA and RNA sequences. w: *Flow Cytogenetics* ed. J.W.Gray, Acad Press, London, N.York, Toronto 1989, 275–301.
- [5] BERENSON RJ. Transplantation of CD34 positive hematopoietic precursors: clinical rationale. *Transplant Proc* 1992; **24**: 3032–3034.
- [6] CLEVERS H, DUNLAP S, TERHORST C. The transmembrane orientation of the epsilon chain of the TcR/CD3 complex. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 705–710.
- [7] van DEKKEN H, ARKESTEIJN GJ, VISSER JW, BAUMAN JG. Flow cytometric quantification of human chromosome specific repetitive DNA sequences by single and bicolor fluorescent *in situ* hybridization to lymphocyte interphase nuclei. *Cytometry* 1990; **11**: 153–164.
- [8] EMBLETON MJ, GOROCHOV G, JONES PT, WINTER G. In-cell PCR from mRNA: amplifying and linking the rearranged immunoglobulin heavy and light chain V-genes within single cells. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 3831–3837.

- [9] EMBRETSON J, ZUPANIC M, BENEKE J, TILL M, WOLINSKY S, RIBAS JL, BURKE A, HAASE AT. Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and *in situ* hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 357–361.
- [10] HAASE AT, RETZEL EF, STASKUS KA. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4971–4975.
- [11] HEISTERKAMP N, STAM K, GROFFEN J. Structural organization of *bcr* gene and its role in the Ph' translocation. *Nature* 1985; **315**: 758–761.
- [12] KAWIAK J, SKIERSKI J. Cytometria przepływowa w badaniach komórek i niektóre jej zastosowania lekarskie. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 239–254.
- [13] KOCH JE, KOLVRAA S, PETERSEN KB, GREGERSEN N, BOLUND L. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* 1989; **98**: 259–265.
- [14] MOSKALEWSKI S, KAWIAK J. Cartilage formation after homotransplantation of isolated chondrocytes. *Transplantation* 1965; **3**: 737–747.
- [15] NUOVO GJ, MACCONNELL P, FORDE A, DELVENNE P. Detection of human papilloma-virus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *Amer J Pathology* 1991; **139**: 847–854.
- [16] PATTERSON BK, TILL M, OTTO P, GOOLSBY C, FURTADO MR, MCBRIDE LJ, WOLINSKY SM. Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR-driven *in situ* hybridization and flow cytometry. *Science* 1993; **260**: 976–979.
- [17] PINKEL D, LANDEGENT J, COLLINS C, FUSCOE J, SEGRAVES R, LUCAS J, GRAY J. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci* 1988; **85**: 9138–9142.
- [18] THOMPSON L. Stem-cell gene therapy moves toward approval. *Science* 1992; **255**: 1072.
- [19] TIMM EA, STEWART CC. Fluorescent *in situ* hybridization en suspension (FISHES) using digoxigenin-labeled probes and flow cytometry. *BioTechniques* 1992; **12**: 363–367.
- [20] TRASK B, van den ENGH G, LANDEGENT J, JANSEN in de WAL J, van der PLOEG M. Detection of DNA sequences in nuclei in suspension by *in situ* hybridization and dual beam flow cytometry. *Science* 1985; **230**: 1401–1403.
- [21] WALDMANN TA. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 1991; **252**: 1657–1662.
- [22] Van der PLOEG M. Hybridocytochemistry – state of the art. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 349–363.

J. Kawiak, G. Hoser

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Zakład Cytologii Klinicznej
01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99,

**MIOZYNY *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* –
PRZYKŁAD BADANIA FUNKCJI BIAŁKA
METODĄ UKIERUNKOWANEJ MUTAGENEZY**

**MYOSINS IN *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*.
STUDIES OF PROTEIN FUNCTIONS
WITH THE METHOD OF SITE-DIRECTED MUTAGENESIS**

Małgorzata PIERZCHALSKA

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.

Streszczenie: *Dictyostelium discoideum* to jeden z modeli wykorzystywanych w badaniach ruchu komórek eukariotycznych. Metoda zwana ukierunkowaną mutagenezą umożliwia wprowadzanie wybranej mutacji w dowolne miejsce w obrębie sekwencji kodującej białko, a następnie badanie funkcji i aktywności zrekombinowanego białka *in vivo* i *in vitro*. Przedstawiono prace dotyczące wykorzystania metod ukierunkowanej mutagenezy do badania miozyny w komórkach *Dictyostelium*. Starano się pokazać, jaki wpływ miały te wyniki na poglądy dotyczące roli miozyny w komórce.

Summary: *Dictyostelium discoideum* provides an excellent system to study cell movement using techniques of molecular genetics. The methods of site-directed mutagenesis allow an introduction of a chosen mutation into a coding sequence of the gene and consecutive studies of the effect of the mutation on a protein function both *in vivo* and *in vitro*. The papers concerning site-directed mutagenesis of myosins in *Dictyostelium discoideum* are presented. The question how these results have influenced the recent views on the role of myosin in motility is also discussed.

Zjawiska ruchowe w komórkach eukariotycznych obejmują:

- 1) aktywne poruszanie się komórek po podłożu czyli ruch ameboidalny,
- 2) zmiany kształtu komórek,
- 3) ruchy wewnątrzkomórkowe polegające na przemieszczaniu organelli i przepływie cytoplazmy [30].

Molekularne podstawy ruchów są od dawna przedmiotem zainteresowania biologów ze względu na znaczenie ruchu komórek w tak ważnych procesach, jak organogeneza i embriogeneza, zabliznianie ran i przerzuty komórek nowotworowych.

Białka tworzące aparat ruchu komórek eukariotycznych są składnikami cytoszkieletu (aktyna, tubulina) lub należą do silników molekularnych (ang. *molecular motors*) (miozyna, kinezyna, dyneina, cytodyneina). Silniki molekularne zwane też białkami kroczącymi (ang. *walking proteins*) z biochemicznego punktu widzenia są ATP-azami aktywowanymi pod wpływem kontaktu ze składnikami cytoszkieletu (miozyna aktywowana jest przez filamenty aktynowe, a cytodyneina i kinezyna przez mikrotubule) [23]. Do przemieszczania się składników komórki dochodzi w wyniku oddziaływania między silnikami molekularnymi a filamentami [33]. Silniki molekularne pełnią więc kluczową rolę w procesie zamiany energii wiązań chemicznych w energię kinetyczną ruchu komórki lub jej składników. Prowadzone obecnie badania mają na celu jakościowy i ilościowy opis procesów mechanochemicznych, a także stworzenie spójnego modelu ruchu komórek eukariotycznych.

Pierwszym odkrytym białkiem o charakterze silnika molekularnego była miozyna mięśni [30]. Skurcz mięśni następuje w wyniku przesuwania się filamentów grubych względem filamentów cienkich. Powszechnie akceptowana teoria skurczu mięśni wyjaśnia to zjawisko przez cykliczne łączenie się aktyny (głównego składnika filamentów cienkich) z miozyną (głównym składnikiem filamentów grubych). Hydroliza związanego z miozyną ATP i uwalnianie produktów tej reakcji powoduje zmianę położenia główki miozyny w stosunku do filamentu aktynowego [29].

MIOZYNY KOMÓREK NIEMIĘŚNIOWYCH

W latach 70 i 80 wykazano obecność białek z nadrodziny miozyn, bardzo podobnych do miozyny mięśni, we wszystkich komórkach eukariotycznych: w komórkach pierwotniaków, drożdży, w komórkach roślinnych i w niemięśniowych komórkach zwierząt wyższych. W komórkach niemięśniowych nazywa się je miozynami II lub miozynami konwencjonalnymi [1, 30]. Miozyna mięśni i miozyna II to heksamery zbudowane z dwóch łańcuchów ciężkich i czterech łańcuchów lekkich. Łańcuch ciężki o masie ok. 200 kDa tworzy na swym N końcu strukturę globularną – "główkę" mającą aktywność ATP-azy. W obrębie główki znajdują się miejsca wiązania aktyny oraz miejsca przyłączania łańcuchów lekkich. C końce dwóch łańcuchów ciężkich tworzą "ogonek" miozyny o długości 140 nm i strukturze superhelisy. Miozyna II z komórek niemięśniowych polimeryzuje *in vitro* tworząc filamenty. *In vivo* miozyna II tworzy przejściowo oligomery w określonych miejscach cytoplazmy. W obrębie łańcuchów lekkich regulatorowych i łańcuchów ciężkich wykryto miejsca fosforylacji katalizowanej przez zależne od kompleksu kalmodulina-wapń kinazy łańcuchów lekkich [12] oraz przez kinazy łańcuchów ciężkich [27].

Fosforylacja wpływa zarówno na proces tworzenia filamentów miozynowych, jak i na aktywność ATP-azową miozyny II *in vitro*. Znaczenie procesu fosforylacji dla regulacji funkcji miozyny w komórce nie jest jednak jasne [33]. Metodami cytoimmunofluorescencji i mikroskopii elektronowej lokalizuje się miozynę II w obrębie bruzdy podziałowej tworzącej się podczas cytokinezy, w obrębie włókienek naprężeniowych (ang. *stress fibres*) oraz pod błoną komórkową w strefie tylnej poruszających się komórek [1, 36, 37, 38].

Ostatnie lata przyniosły odkrycie miozyn zaliczanych do tak zwanych miozyn niekonwencjonalnych. Nazwa ta obejmuje obecnie wszystkie odkryte białka z nadrodziny miozyn nie wykazujące wysokiej homologii z miozyną II i miozyną mięśni [3]. Do miozyn niekonwencjonalnych należą miozyny I, których łańcuchy ciężkie nie tworzą dimerów. W obrębie cząsteczki występuje więc tylko jedna główka i jedno miejsce mające aktywność ATP-azową zależną od aktyny. C końce miozyn I mają dodatkowe miejsce wiązania filamentów aktynowych lub miejsca łączące się z błoną komórkową [3, 14].

Trzy z obecnie scharakteryzowanych miozyn niekonwencjonalnych nie wykazują podobieństwa ani do miozyn I, ani do miozyn II (miozyna V izolowana z mózgu kręgowców [34, 35], produkty genów *MYO2* drożdży [3] i *dilute* myszy [22]). Łańcuchy ciężkie białek należących do tej grupy tworzą dimery, ale nie tworzą filamentów, gdyż ich "ogonki" zakończone są podjednostką globularną o nieznanej funkcji [3].

Dzisiejszy stan wiedzy nie pozwala na jednoznaczną odpowiedź na pytania: jaka jest rola poszczególnych białek z nadrodziny miozyn w różnych formach ruchów komórek niemięśniowych i w jaki sposób komórka reguluje ich aktywność w określonym miejscu w cytoplazmie. Próbę znalezienia na nie odpowiedzi stanowią doświadczenia przeprowadzone w ostatnich latach z wykorzystaniem metod współczesnej biologii molekularnej na myksamebach *Dictyostelium discoideum*.

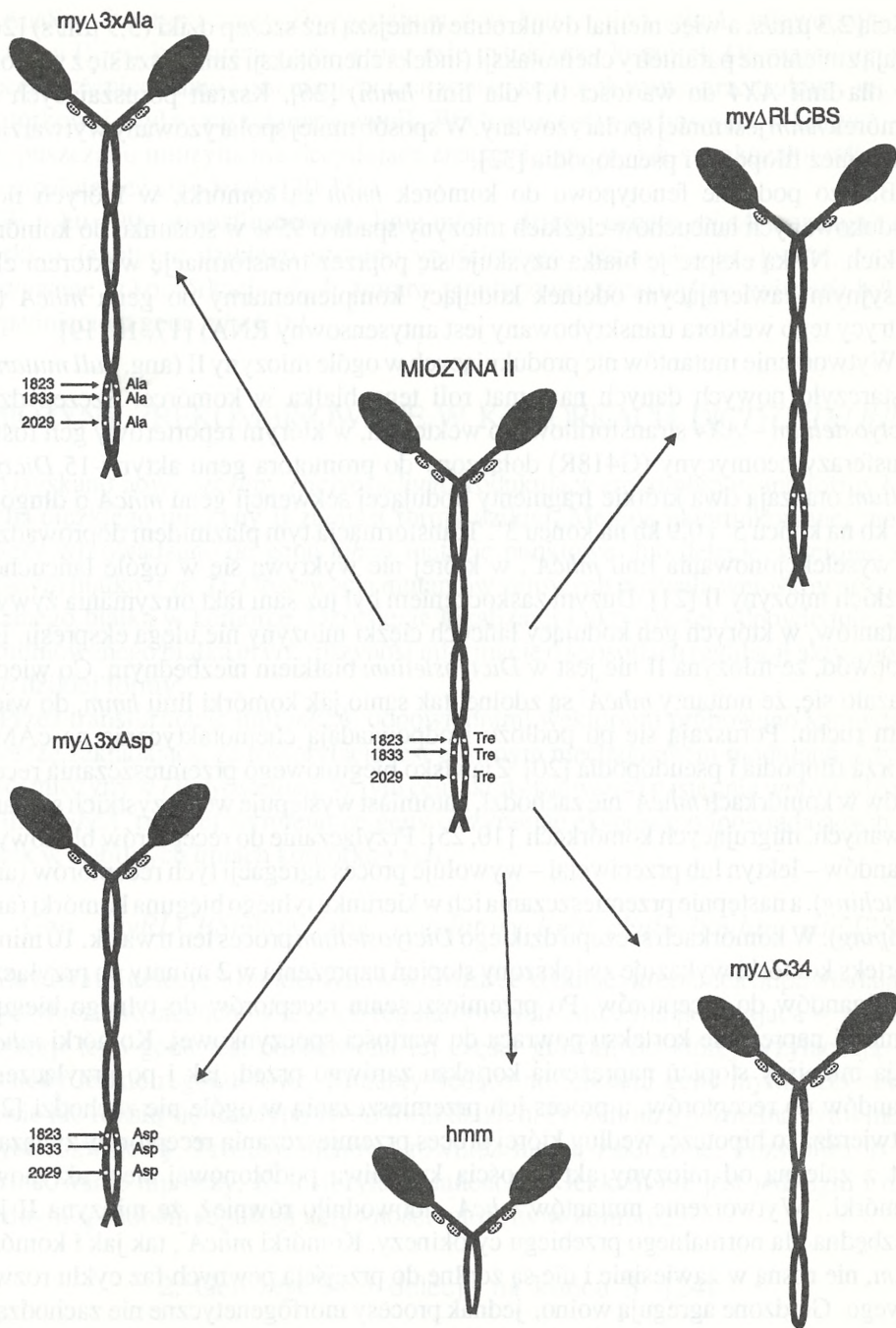
DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM

Dictyostelium discoideum – gatunek należący do śluzowców komórkowych (*Acrasiales*) jest jednym z modelowych organizmów w badaniu mechanizmu ruchu ameboidalnego oraz mechanizmów rozwoju i komunikacji międzykomórkowej. Gatunek ten charakteryzuje ciekawy i łatwy do odtworzenia w hodowli cykl rozwojowy. Amebowe formy *Dictyostelium* żyją na powierzchni gleby i odżywiają się fagocytując drożdże i bakterie. W optymalnych warunkach dzielą się raz na kilka godzin. Kiedy zasoby pokarmowe wyczerpują się podziały komórkowe zostają zahamowane. Niektóre ameby zaczynają, w warunkach głodzenia, produkować i wydzielać na zewnątrz cAMP – czynnik indukujący chemotaktyczne ruchy innych ameb tego gatunku i pobudzający je również do produkcji cAMP. Skutkiem wydzielania cAMP i wywo-

łanej przez ten czynnik chemotaksji jest agregacja ok. 100 000 ameb prowadząca do powstania wielokomórkowej, zdolnej do ruchu, struktury o charakterze pseudoplazmodium. Komórki wewnątrz pseudoplazmodium różnicują się i po ok. 30 h wytwarzają liczne ciała owocujące, w których produkowane są, zdolne do przeżycia trudnych warunków, spory [15]. *Dictyostelium* jest atrakcyjnym organizmem modelowym w biologii molekularnej, gdyż jego genom jest stosunkowo prosty – tylko ok. 10 razy większy od genomu bakterii i 100 razy mniejszy od genomu człowieka. Wolnożyjąca amebowa forma jest haploidalna, co prowadzi do natychmiastowego przejawiania się wprowadzanych mutacji. Wektory, którymi transformuje się *Dictyostelium*, ulegają homologicznej rekombinacji z dużą częstością w stosunku do nie-homologicznej integracji z chromosomem gospodarza [20,21,30,33]. Podobieństwo ameb *Dictyostelium* pod względem różnych form aktywności ruchowej do komórek zwierząt wyższych jest przyczyną, dla której gatunek ten jest chętnie wykorzystywany w badaniach mechanizmu ruchu i organizacji cytoszkieletu [5].

MIOZYNA II W *DICTYOSTELIUM* – MUTANTY ZEROWE

W genomie *Dictyostelium* występuje pojedyncza, nie zawierająca intronów, kopia genu kodującego łańcuch ciężki miozyny II. Gen ten, nazwany *mhcA*, ma długość 6,3 kb. Sklonowany został w roku 1985 przez grupę kierowaną przez Jamesa Spudicha i Artura de Lozanno [7]. W roku 1987 ci sami badacze stransformowali dziki szczep *Dictyostelium* plazmidem zawierającym gen *mhcA* z delecją 2.7 kb na końcu 3'. Ekspresja tego skróconego genu w otrzymanej linii komórek *Dictyostelium*, nazwanej *hmm* (od ang. *heavy meromyosin*) prowadzi do produkcji białka o masie 140 kDa będącego odpowiednikiem uzyskiwanej w drożdże proteolizy tzw. meromiozyny ciężkiej. Meromiozyna ciężka nie tworzy filamentów *in vitro*, gdyż pozbawiona jest większej części "ogonka" [6]. Komórki linii *hmm* wykazują jednak wiele form aktywności ruchowej. Poruszają się po podłożu i odpowiadają chemotaktycznie na cykliczne AMP [32,26]. Najważniejszą zmianą fenotypową obserwowaną w komórkach *hmm* jest ich niezdolność do wzrostu w zawieszynie. W czasie cytokinezy nie tworzy się bruzda podziałowa i komórki nie dzielą się. Kariokineza nie jest zakłócona, powstają komórki wielojądrzaste, które w końcu ulegają rozpadowi. W komórkach przyczepionych do podłoża podział jest możliwy, choć okres podwojenia zwiększa się do kilkunastu godzin. Komórki tak hodowane zachowują zdolność do podziałów dzięki skomplikowanemu mechanizmowi odrywania kawałków cytoplazmy z jądrem od wielojądrzastych migrujących ameb (ang. *traction-mediated cytofission*) [10]. Komórki *hmm* nie przechodzą pełnego cyklu komórkowego (komórki agregują, tworzą wielokomórkowe pseudoplazmodium, ale nie tworzą ciał owocujących), chociaż ekspresja genów odpowiadających za przebieg cyklu rozwojowego nie jest zaburzona [26]. Komórki *hmm* w stałym gradiencie cAMP migrują wolniej (z pręd-



Rys. 1. Modele cząsteczek miozyny produkowanych przez mutanty *Dictyostelium discoideum*

kością 2,3 $\mu\text{m/s}$, a więc niemal dwukrotnie mniejszą niż szczep dziki (5,9 $\mu\text{m/s}$) [26] i mają zmienione parametry chemotaksji (indeks chemotaksji zmniejsza się z wartości 0,5 dla linii *AX4* do wartości 0,1 dla linii *hmm*) [26]. Kształt poruszających się komórek *hmm* jest mniej spolaryzowany. W sposób mniej spolaryzowany wytwarzane są również filopodia i pseudopodia [32].

Bardzo podobne fenotypowo do komórek *hmm* są komórki, w których ilość produkowanych łańcuchów ciężkich miozyny spada o 95% w stosunku do komórek dzikich. Niską ekspresję białka uzyskuje się poprzez transformację wektorem ekspresyjnym zawierającym odcinek kodujący komplementarny do genu *mhcA* (na matrycy tego wektora transkrybowany jest antysensowny RNA) [17, 18, 19].

Wytworzenie mutantów nie produkujących w ogóle miozyny II (ang. *null mutants*) dostarczyło nowych danych na temat roli tego białka w komórce. Szczep dziki *Dictyostelium* – *AX4* transformowano wektorem, w którym reporterowy gen fosfotransferazy neomycyny (G418R) dołączony do promotora genu aktyny-15 *Dictyostelium* otaczają dwa krótkie fragmenty kodującej sekwencji genu *mhcA* o długości 0,7 kb na końcu 5' i 0,9 kb na końcu 3'. Transformacja tym plazmidem doprowadziła do wyselekcjonowania linii *mhcA*⁻, w której nie wykrywa się w ogóle łańcuchów ciężkich miozyny II [21]. Dużym zaskoczeniem był już sam fakt otrzymania żywych mutantów, w których gen kodujący łańcuch ciężki miozyny nie ulega ekspresji. Był to dowód, że miozyna II nie jest w *Dictyostelium* białkiem niezbędnym. Co więcej, okazało się, że mutanty *mhcA*⁻ są zdolne, tak samo jak komórki linii *hmm*, do wielu form ruchu. Poruszają się po podłożu i odpowiadają chemotaktycznie na cAMP, tworzą filopodia i pseudopodia [20]. Zjawisko biegunowego przemieszczania receptorów w komórkach *mhcA*⁻ nie zachodzi, natomiast występuje we wszystkich spolaryzowanych, migrujących komórkach [10, 25]. Przyłączanie do receptorów błonowych ligandów – lektyn lub przeciwciał – wywołuje proces agregacji tych receptorów (ang. *patching*), a następnie przemieszczania ich w kierunku tylnego bieguna komórki (ang. *capping*). W komórkach szczepu dzikiego *Dictyostelium* proces ten trwa ok. 10 minut. Korteks komórki wykazuje zwiększony stopień naprężenia w 2 minuty po przyłączeniu ligandów do receptorów. Po przemieszczeniu receptorów do tylnego bieguna komórki naprężenie korteksu powraca do wartości spoczynkowej. Komórki *mhcA*⁻ mają mniejszy stopień naprężenia korteksu zarówno przed, jak i po przyłączeniu ligandów do receptorów, a proces ich przemieszczania w ogóle nie zachodzi [25]. Potwierdza to hipotezę, według której proces przemieszczania receptorów związany jest z zależną od miozyny aktywnością kurczliwą podbłonowej sieci aktynowej komórki. Wytworzenie mutantów *mhcA*⁻ udowodniło również, że miozyna II jest niezbędna dla normalnego przebiegu cytokinezy. Komórki *mhcA*⁻, tak jak i komórki *hmm*, nie rosną w zawieszynie i nie są zdolne do przejścia pewnych faz cyklu rozwojowego. Głodzone agregują wolno, jednak procesy morfogenetyczne nie zachodzą w agregacie normalnie, nie tworzą się więc ciała owocujące i spory [20].

Analiza fenotypu ameb *Dictyostelium* linii *hmm* i linii *mhcA⁻* udowodniła, że miozyna II jest konieczna tylko w procesie cytokinezy komórek *Dictyostelium* i w procesie różnicowania i orientacji przestrzennej komórek wewnątrz struktury wielokomórkowej. Był to zaskakujący wynik. Wiele procesów ruchowych, w których, jak przypuszczano miozyna ma decydujące znaczenie, może, jak się okazało, odbywać się zupełnie bez jej udziału [20,33].

W roku 1990 transformowano linię *mhcA⁻* dzikim genem *mhcA* uzyskując komórki o fenotypie dzikiego szczepu wyjściowego. Stanowiło to dowód, że obserwowane w komórkach *mhcA⁻* zmiany fenotypowe rzeczywiście związane były z wypadnięciem genu *mhcA* [8].

MIOZYNY ZREKOMBINOWANE W KOMÓRKACH *DICTYOSTELIUM*

Uzyskano nowe szczepy *Dictyostelium* produkujące zrekombinowane formy łańcucha ciężkiego miozyny II zamiast formy dzikiej. Metodą ukierunkowanej mutagenyzy wprowadzono do genu *mhcA* mutacje punktowe lub delecje w rejonie kodującym białko (rys. 1). Obserwacja mutantów zerowych pozwala wnioskować o roli badanego białka w komórce. Określenie lokalizacji i aktywności odpowiednio zrekombinowanego białka *in vivo* przynosi informacje o sposobach regulacji aktywności jego dzikiej formy.

Przez transformację linii *mhcA⁻* odpowiednimi wektorami próbowano sprawdzać hipotezę zakładającą, że fosforylacja jest głównym mechanizmem modulacji aktywności miozyny w *Dictyostelium*. W tym celu skonstruowano i następnie wprowadzono do linii *mhcA⁻* poniżej wymienione geny otrzymując ekspresję odpowiadających im białek w stabilnych liniach komórkowych.

1. Gen *myRLCBSmhcA* (ang. *regulatory light chain binding site*)[28]

Zawiera on delecje 30 nukleotydów w obszarze kodującym odcinek odpowiadający za przyłączanie łańcuchów lekkich regulatorowych. Miozyna powstająca w wyniku ekspresji tego genu jest pozbawiona tej części główki, do której przyłączają się łańcuchy lekkie regulatorowe. Mutanty będące nosicielami genu *myRLCBS mhcA* prawie nie różnią się fenotypowo od form dzikich. Przechodzą normalną cytokinezę i cykl rozwojowy. Procesy ruchowe również nie są zakłócone. Pozwoliło to na sformułowanie hipotezy, że fosforylacja łańcuchów lekkich nie jest jedynym i niezbędnym sposobem regulacji aktywności miozyny w komórce.

2. Gen *myC34* z delecją na końcu 3' [24]

W wyniku transkrypcji tego genu ekspresji ulega białko skrócone o peptyd o masie 34 kDa na końcu C. Pozostały ogonek zawiera w tym przypadku część odpowiedzialną za tworzenie filamentów miozynowych, nie zawiera natomiast fragmentu, w którego

obrębie znajdują się 2 reszty treoninowe fosforylowane przez kinazę łańcucha ciężkiego miozyny. Fosforylacja przez kinazę łańcucha ciężkiego miozyny ma wpływ na proces wytwarzania krótkich filamentów w cytoplazmie. Komórki produkujące tak zmienioną miozynę nie są wciąż zdolne do wzrostu w zawieszynie (cytokinezy), przechodzą za to normalny cykl rozwojowy [24].

3. Gen *my3XAla* i gen *my3XAsp* [9]

W przypadku tych dwóch genów zastosowano inną strategię badania miejsc fosforylacji. W białku *my3XAla* podstawiono trzy reszty treoninowe, które są potencjalnymi miejscami fosforylacji, alaninami. Miozyna produkowana przez szczep *my3XAla* nie może więc być fosforylowana w obrębie łańcuchów ciężkich. W białku *my3XAsp* te same reszty treoninowe podstawiono resztami kwasu asparaginowego. Białko *my3XAsp*, jak potwierdzają testy *in vitro*, zachowuje się jak fosforylowana miozyna (ma podobny rozkład ładunku w cząsteczce).

Porównywano fenotyp komórek *my3XAla* i *my3XAsp*. Komórki linii *my3XAla* są fenotypowo podobne do szczepu dzikiego, natomiast komórki *my3XAsp* podobne są do mutantów zerowych (niezdolne do cytokinezy w zawieszynie, przejścia cyklu komórkowego i biegunowego przemieszczania receptorów). Stwierdzono, że białko *my3XAla* występuje w formie ściśle związanej z cytoszkieletem (nie ulega ekstrakcji Tritonem X-100). Natomiast białko *my3XAsp* występuje głównie w formie niezwiązanej z F-aktyną. Dane te potwierdzają, że białko *my3XAla* zachowuje się w komórce tak jak zdolna do tworzenia filamentów, defosforylowana miozyna, a białko *my3XAsp* jak fosforylowana, niezdolna do interakcji z aktyną miozyna. Mutanty *my3XAla* nie mogą jednak regulować rozpadu filamentów miozynowych w korteksie, co jest prawdopodobnie przyczyną ich wolniejszego od komórek szczepu dzikiego wzrostu (zarówno w zawieszynie, jak i przyczepionych do podłoża)[9].

4. Gen *myRLCBS/3XAla*

Komórki, w których gen ten ulega ekspresji, są zdolne do wzrostu w zawieszynie, ale nie do produkcji ciał owocujących. Różnią się więc i od mutantów *my3XAla* i od mutantów *myRLCBS*.

Przedstawione wyżej wyniki potwierdziły, że procesy fosforylacji i defosforylacji łańcuchów ciężkich odgrywają kluczową rolę w kontroli aktywności skurczowej w komórce przez lokalizację miejsc tworzenia i rozpadu filamentów miozynowych w cytoplazmie.

Genetyczny dowód na ograniczoną rolę miozyny II w zjawiskach ruchowych wywołał duże zainteresowanie badniami nad rolą, którą pełnią w zjawiskach ruchowych, miozyny niekonwencjonalne. W genomie *Dictyostelium* występuje co najmniej 9 genów kodujących różne miozyny niekonwencjonalne. Wytworzono jak dotąd mutanty *Dictyostelium* pozbawione jednego z genów kodujących miozyny I (miozynę IB) [31]. Mutanty pozbawione tego genu nie mają upośledzonych procesów

cytokinezy i morfogenezy. Natomiast współczynnik chemotaksji i prędkość migracji tych komórek w kierunku większego stężenia cAMP są mniejsze niż w komórkach szczepu dzikiego [31]. Można wnioskować więc, że poszczególne geny dla miozyny I kodują białka o różnej, ściśle określonej funkcji. W najbliższym czasie badanie mutantów, w których unieczynniono równocześnie kilka genów dla miozyny I i miozyny II, pozwoli zapewne na jeszcze dokładniejszą odpowiedź, jaka jest rola poszczególnych silników molekularnych w skomplikowanej maszynerii wprawiającej w ruch migrującą komórkę [33].

Autorzy doświadczeń prowadzonych metodami ukierunkowanej mutagenety podkreślają jednak, że analiza fenotypu mutantów daje dowody jedynie pośrednie. W komórkach mutantów zerowych białko, którego brakuje, może być zastępowane innym o podobnej funkcji. Tak więc obserwacja, że dany proces zachodzi w mutantach zerowych nie jest jeszcze dowodem, że badane białko nie jest w ten proces zaangażowane w komórkach szczepu dzikiego. Na przykład mutanty zerowe *Dictyostelium* nie produkujące niektórych białek wiążących aktynę (np. seweryny [2]) w ogóle nie wykazują zmian fenotypowych w stosunku do szczepu dzikiego lub różnią się od nich tak niewiele, że zmiany te można wykryć tylko przy użyciu ilościowej komputerowej analizy prędkości i zmian kształtu komórek (np. ABP-120 [4]). Jak się ostatnio okazało, fragmenty promotora aktyny 15 *Dictyostelium* używane rutynowo w wektorach, którymi transformuje się te ameby, zdolne są do prowadzenia transkrypcji w obu kierunkach [16]. Prowadzić to może do pojawiania się niezamierzonych, ale ważnych transkryptów (np. antysensowego RNA) i wpływać na fenotyp transformowanych komórek. Wnioski z przedstawionych w tej pracy badań, z pewnością bardzo istotnych dla badaczy mechanizmów ruchu, muszą być więc formułowane z krytycyzmem i ostrożnością.

LITERATURA:

- [1] ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. The cytoskeleton [w] *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition. New York, London: Garland Publishing, Inc. 1989: 613–628.
- [2] ANDRE E, BRINK G, GERISH G, ISENBURG A, NOEGEL M, SCHLEICHER JE, SEGALL E, WALLRAFF E. A *Dictyostelium* mutant deficient in severin an F-actin fragmenting protein shows normal motility and chemotaxis. *J Cell Biol*. 1989; **11**: 303–307.
- [3] CHENEY RE, MOOSAKER MS. Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 27–35.
- [4] COX D, CONDEELIS D, WESSELS D, SOLL D, KERN H, KNECHT DA. Targeted disruption of the ABP-120 gene leads to cells with altered motility. *J Cell Biol* 1992; **116**: 943–955.
- [5] DE LOZANNE A. Gene targeting and cell motility. *Cell Mot Cytoskel* 1989; **14**: 62–68.
- [6] DE LOZANNE A, SPUDICH JA. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 1987; 1086–1091.

- [7] DE LOZANNE A, LEWIS M, SPUDICH A, LEINWALD LD. Cloning and characterization of a nonmuscle myosin heavy chain cDNA. *Proc Natl Acad Sci* 1985; **82**: 6807–6810.
- [8] EGELHOFF TT, MANSTEIN DJ, SPUDICH JA. Complementation of myosin null mutants in *Dictyostelium discoideum* by direct functional selection. *Dev Biol* 1990; **137**: 359–367.
- [9] EGELHOFF TT, LEE RJ, SPUDICH JA. *Dictyostelium* myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin filament assembly and localization in vivo. *Cell* 1993; **75**: 363–371.
- [10] FUKUI Y, DE LOZANNE A, SPUDICH JA. Structure and function of the cytoskeleton of *Dictyostelium* myosin-defective mutant. *J Cell Biol* 1990; **110**: 367–378.
- [11] GRĘBECKI A. Ruchy lateralnej podbłonowej sieci aktynowej w komórkach ruchliwych. *Post Biol Kom* 1993; 20 (suplement 2): 97–112.
- [12] GRIFFITH LM, DOWNS SM, SPUDICH JA. Myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase from *Dictyostelium*: Effects of reversible phosphorylation on myosin structure and function. *J Cell Biol* 1987; **104**: 1309–1323.
- [13] JAY P, ELSON EL. Surface particle transport mechanism independent of myosin II in *Dictyostelium*. *Nature* 1992; **356**: 438–440.
- [14] JUNG G, SAXE III CL, KIMMEL AR, HAMMER JA. *Dictyostelium discoideum* contains a gene encoding a myosin I heavy chain. *Proc Natl Acad USA* 1989; **86**: 6186–6190.
- [15] KESSIN RH, VAN LOOKEREN CAMPAGNE MM. The development of social amoeba. *American Scientist* 1992; **80**: 556–565
- [16] KNECHT D, KERN H, SCHERCZINGER C. Bidirectional transcription from actin promoters in *Dictyostelium*. *Biochem Biophys Acta* 1993; **1216**: 105–109.
- [17] KNECHT DA, LOOMIS WF. Developmental consequences of lack of myosin heavy chain in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 1988; **128**: 178–184.
- [18] KNECHT D, LOOMIS WF. Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* 1987; 1081–1086.
- [19] KNECHT D. Application of antisense RNA to the study of cytoskeleton: background, principles, and summary of results obtained with myosin heavy chain. *Cell Mot Cytoskel* 1989; **14**: 92–102.
- [20] MANSTEIN JD, RUPPEL KM, KUBELAK L, SPUDICH JA. Manipulation and expression of molecular motors in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Biol Supplement* 1991; **14**: 63–65.
- [21] MANSTEIN JD, TITUS AM, DE LOZANNE A, SPUDICH JA. Gene replacement in *Dictyostelium*: generation of myosin null mutants. *EMBO J* 1989; **8**: 923–932.
- [22] MERCER JA, SEPERACK PK, STROBEL MC, COPELAND NG, JENKINS NA. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* 1991; **349**: 709–712.
- [23] MCINTOSH RJ, PORTER ME. Enzymes for microtubule-dependent motility. *J Biol Chem* 1989; **264**: 1–5.
- [24] O'HALLORAN JT, SPUDICH JA. Genetically engineered truncated myosin in *Dictyostelium*: the carboxyl terminal regulatory domain is not required for the developmental cycle. *Proc Natl Acad* 1990; **87**: 8110–8114.
- [25] PASTERNAK C, SPUDICH JA, ELSON EL. Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional myosin. *Nature* 1989; **341**: 549–551.
- [26] PETERS JM, KNECHT DA, LOOMIS WF, VAN HAASTERT PJM. Signal transduction, chemotaxis, and cell aggregation in *Dictyostelium discoideum* cells without myosin heavy chain. *Dev Biol* 1988; **128**: 158–163.
- [27] RAVID S, SPUDICH JA. Myosin heavy chain kinase from developed *Dictyostelium* cells: purification and characterization. *J Biol Chem* 1989; **264**: 15144–15150.
- [28] UYEDA TQE, SPUDICH JA. A functional recombinant myosin-II lacking a regulatory light chain binding site. *Science* 1993; **262**: 1876–1870.
- [29] TREYER IP. Molecular motors. Coming soon – the movie. *Nature* 1993; **364**: 101–103.
- [30] WARRICK HM, SPUDICH JA. Myosin structure and function in cell motility. *Ann Rev Cell Biol* 1987; **3**: 379–421.

- [31] WESSELS D, MURRAY J, JUNG G, HAMMER JA III, SOLL DR. Myosin IB mutants of *Dictyostelium* exhibit abnormalities in motility. *Cell Motil Cytoskel* 1991; **20**: 301–315.
- [32] WESSELS D, SOLL DR, KNECHT DA, LOOMIS WF, DE LOZANNE A, SPUDICH Cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium* amebae lacking myosin heavy chain. *Dev Biol* 1988; **128**: 178–184.
- [33] WILLSON AK, POLLENZ RS, CHISHOLM RL, DE LANEROLLE P. The role of myosin I and myosin II in cell motility. *Can Met Rev* 1992; **11**: 79–91.
- [34] WOLENSKI JS, CHENEY RE, FORSCHER P, MOOSEKER MS. In vitro motilities of the unconventional myosins, brush border myosin-V exhibit assay-dependent differences in velocity. *J Experi Zool* 1993; **267**: 33–39.
- [35] WOLENSKI JS, ESPREAFICO EM, FORSCHER P, LARSON RE, MOOSEKER MS. Brain myosin-V is two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 1993; **75**: 13–23.
- [36] YUMURA S, FUKUI Y. Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in *Dictyostelium*. *Nature* 1985; **314**: 194–196.
- [37] YUMURA S, KITANISHI-YUMURA T. Fluorescence-mediated visualization of actin and myosin filaments in the corticle membrane-cytoskeleton complex of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Struc Function* 1990; **15**: 355–364.
- [38] YUMURA S, KITANISHI-YUMURA T. Immunoelectron microscopic studies of the ultrastructure of myosin filaments in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Struc Function* 1990; **15**: 343–354.

M. Pierzchalska

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej UJ
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

MASOWE HODOWLE KOMÓREK LUDZKICH I ZWIERZĘCYCH W BIOTECHNOLOGII

LARGE-SCALE CULTURES OF ANIMAL AND HUMAN CELLS IN BIOTECHNOLOGY

Justyna DRUKAŁA, Jolanta SROKA

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego UJ,
Kraków

Streszczenie. Hodowle na dużą skalę komórek ludzkich i zwierzęcych prowadzone są głównie w celu uzyskania substancji biologicznie czynnych, takich jak szczepionki przeciwwirusowe, przeciwciała monoklonalne, czynniki wzrostowe, enzymy metaboliczne, immunomodulatory. W biotechnologii stosowane są hodowle komórek w zawieszynie i hodowle komórek zdolnych do wzrostu tylko po przyczepieniu do podłoża stałego. Udoskonalenie technik mających na celu zwiększenie dostępnej powierzchni do przyczepiania się komórek przyczepno-zależnych (hodowle na mikro-nośnikach, w złożach włóknistych, w bioreaktorach typu "hollow fibers"), związane jest z zalecanym po roku 1990 stosowaniem do celów terapeutycznych wyłącznie produktów prawidłowych komórek.

Summary. Large-scale cultures of animal and human cells are carried on for obtaining the biologically active substances as antiviral vaccines, monoclonal antibodies, growth factors, metabolic enzymes, and immunomodulators. Cell cultures in the suspension and cultures of anchorage-dependent cells are used in biotechnology. The necessity of using only products of normal cells in medicine have led to the improvement of the techniques aiming at increasing of the accessible surface for anchorage-dependent cells (culture on microcarriers, in fibrous ledges and in bioreactors "hollow fibers").

Hodowle tkankowe znane są od ponad stu lat. Początkowo nie miały one praktycznych zastosowań, jednak zdawano sobie sprawę, że przetrzymywanie wyizolowanych komórek poza organizmem może być przydatne w badaniach procesów i zjawisk zachodzących w żywych organizmach. Liczne badania zmierzały w kierunku zastąpienia naturalnych środowisk, w których przetrzymywano wypreparowane tkanki, pożywkami o znanym i powtarzalnym składzie. Opracowano wiele takich poży-

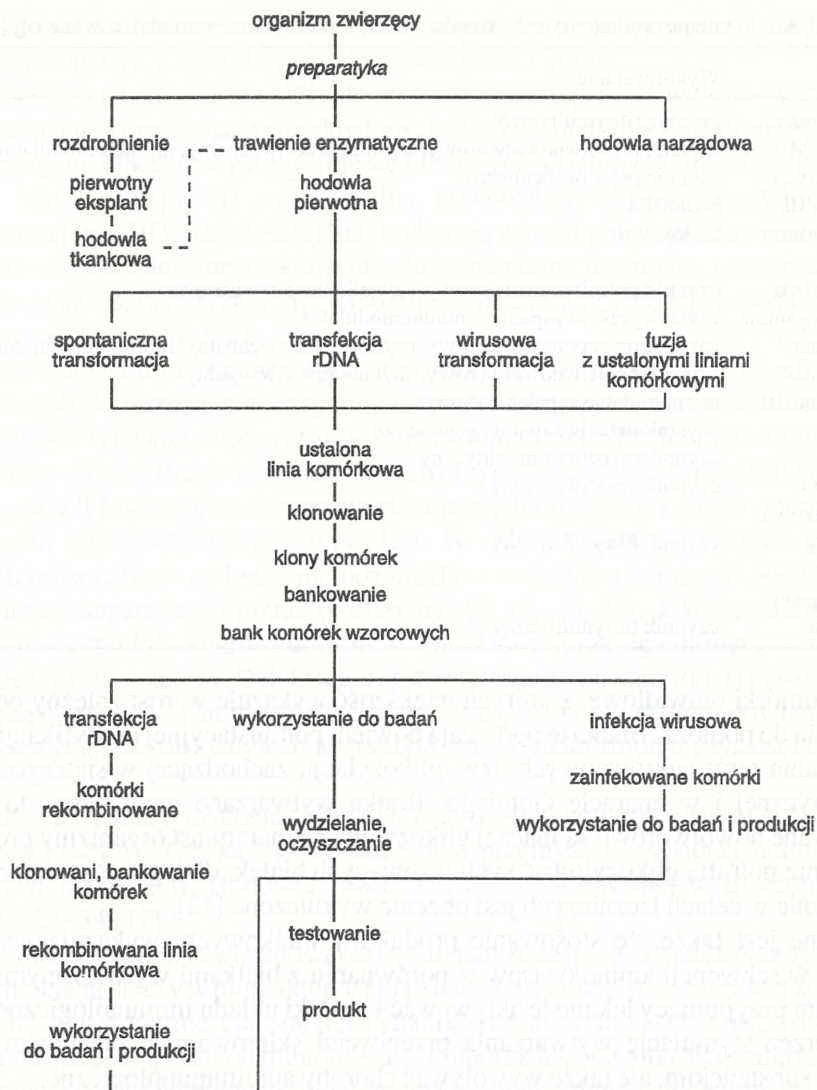
wek, w tym pożywki zdefiniowane bez surowicy, co uczyniło hodowlę jedną z podstawowych metod, wykorzystywanych w badaniach biologii komórki.

Hodowle pierwotne uzyskiwane są albo z małych fragmentów tkanek zwierzęcych, tzw. eksplantów, z których komórki wywędrowują, dzielą się mitotycznie i podejmują wzrost, albo poprzez mechaniczne lub enzymatyczne rozproszenie tkanki na pojedyncze komórki. Hodowle te utrzymywane są przez okres kilku pokoleń komórek bez pasażowania. Wzrost komórek jest kontynuowany aż do utworzenia pojedynczej warstwy na dostępnej powierzchni nośnika, po czym następuje zależne od gęstości zahamowanie wzrostu. W wyniku spontanicznej transformacji, transformacji wirusami lub czynnikami chemicznymi komórki mogą utracić tę właściwość i stają się zdolne do wzrostu w zawieszynie. Po pierwszym przeniesieniu komórek do innego naczynia, czyli po pierwszym pasażu otrzymuje się hodowlę wtórne, które w prawidłowo dobranych warunkach utrzymywane są przez okres 40–70 pasażów. Linie komórkową uznaje się za ustaloną, jeśli utrzymuje się ją nadal w hodowli po conajmniej 70 pasażach. Często są to transformowane linie komórek aneuploidalnych (rys. 1) [8, 23, 41].

Uzyskanie linii komórkowych, zdefiniowanie i uproszczenie pożywek oraz opanowanie technik hodowli komórek *in vitro* przyczyniło się do wzrostu zainteresowania tymi hodowlami dla wykorzystania ich do celów biotechnologicznych. Związane to było m.in. z gwałtownym wzrostem zapotrzebowania na produkowane przez komórki zwierzęce i ludzkie substancje biologicznie czynne, takie jak: czynniki wzrostowe, szczepionki przeciwwirusowe, przeciwciała monoklonalne, enzymy metaboliczne i inne.

Współcześnie prowadzone na szeroką skalę hodowle komórek ludzkich i zwierzęcych zapoczątkowano ponad 20 lat temu w badaniach Capsticka i Telliga na komórkach chomika (BHK), związanych z poszukiwaniem szczepionki przeciwko chorobie pyska i racic atakującej bydło i owce [2]. Badania te zakończyły się sukcesem, a produkcja szczepionek przez hodowanie na dużą skalę komórek w bioreaktorach została stosunkowo dobrze opanowana. Jako przykłady można przytoczyć szczepionki przeciwko chorobie Heinego-Medina, odrze, ospie, grypie, żółtej febrze, różyczce, śwince, wścieklicznie [2, 14, 30, 41].

Wzbogacenie się biotechnologii o komórki heterokariotyczne i transfekowane zrekombinowanym DNA rozszerzyło możliwości wykorzystania masowych hodowli komórek zwierzęcych. Liczne produkty tych komórek znalazły zastosowanie w medycynie w celach terapeutycznych (tab. 1). Insulina była jednym z pierwszych białek wyprodukowanych na dużą skalę i wykorzystywanym w leczeniu cukrzycy. Stosowane są interferon β i interferon γ w leczeniu nowotworów, erytropoetyna w leczeniu anemii, tkankowy aktywator plazminogenu w terapii takich chorób, jak zawał serca i zator płuc. Czynniki VIII krzepnięcia krwi jest najdłuższym zsyntetyzowanym białkiem na matrycy zrekombinowanego DNA, stosowanym w leczeniu hemofilii [3, 4, 5, 41].



Rys. 1. Izolacja i hodowla komórek zwierzęcych dla celów biotechnologicznych

Wykorzystanie komórek heterokariotycznych umożliwiło produkcję przeciwciał monoklonalnych stosowanych do oczyszczania i identyfikowania białek produkowanych i wydzielanych przez komórki, w diagnostyce do wykrywania chorób zakaźnych, tkanek nekrotycznych, nowotworów, w terapii do neutralizacji endotoksyn, do supresji immunologicznej po transplantacji organów [22, 23, 35, 45].

Istotne jest, aby produkty te wykazywały farmakologiczną aktywność i nie dawały efektów ubocznych w terapii. Możliwe jest to jedynie wtedy, gdy wydzielane są one

TABELA 1. Wybrane produkty komórek ssaków i ich wykorzystanie (zmodyfikowane wg [41])

Produkt	Wykorzystanie
Antytrombina	czynnik fibrynolityczny
GM-CSF, M-CSF	czynnik przeciwnowotworowy, czynnik przeciwzapalny, immunomodulator
Erytropoetyna	czynnik przeciwanemiczny
Czynnik VIII	hemofilia
Ludzki hormon wzrostu	karłowatość
Interferon beta	czynnik przeciwnowotworowy, czynnik przeciwwirusowy
Interferon gamma	czynnik przeciwzapalny, immunomodulator
Interleukina-1	czynnik przeciwnowotworowy, czynnik przeciwzapalny, immunomodulator
Interleukina-3	czynnik przeciwnowotworowy, czynnik przeciwzapalny
Interleukina-10	reumatoidalne zapalenie stawów
PDGF	czynnik przeciwzapalny, gojenie ran
Białko C	czynnik przeciwtrombolityczny
Dysmutaza ponadtlenkowa	czynnik przeciwzapalny
Tkankowy aktywator plazminogenu	czynnik fibrynolityczny
Urokinaza	czynnik fibrynolityczny

przez komórki prawidłowe, z których większość wykazuje wzrost zależny od przyczepienia do podłoża. Białka te podlegają bowiem potranslacyjnej modyfikacji dobudowywania reszt cukrowcowych, tzw. glikozylacji, zachodzącej w siateczce endoplazmatycznej i w aparacie Golgiego. Białka wytwarzane przez komórki transformowane nowotworowo są inaczej glikozylowane, natomiast organizmy prokariotyczne nie potrafią glikozyłować syntetyzowanych białek, dlatego stosowanie ich w medycynie w celach leczniczych jest obecnie wykluczone [42].

Istotne jest także, że stosowanie produktów białkowych, wykazujących duże różnice w sekwencji aminokwasów w porównaniu z białkami wytwarzanymi przez organizm przyjmujący lek może aktywować komórki układu immunologicznego nie tylko przez stymulację wytwarzania przeciwciał skierowanych przeciwko podawanym substancjom, ale także wywoływać choroby autoimmunologiczne.

Większość produktów syntetyzowanych na matrycy zrekombinowanego DNA podawanych w terapii jest identyczna pod względem budowy z natywnym produktem. Jednak np. w przypadku podawania królikom ludzkiej erytropoetyny, ludzkie białko wywołuje wytwarzanie przeciwciał i reakcję krzyżową z endogenną króliczą erytropoetyną. Doniesienia takie muszą być brane pod uwagę, gdy planowane jest genetyczne modyfikowanie białek ludzkiego pochodzenia dla celów terapeutycznych [43].

Na potrzeby biotechnologii wykorzystuje się dwa rodzaje hodowli:

a) hodowle komórek rosnących w zawiesinie (komórki nowotworowe, komórki limfoidalne),

b) hodowle komórek zdolnych do wzrostu jedynie po przyłączeniu do podłoża stałego (fibroblasty, komórki epitelialne, mięśniowe i inne).

Ze względu na nieopłacalność hodowli pierwotnych spowodowaną koniecznością stosowania dużej liczby naczyń hodowlanych, dąży się do pracy z ustalonymi liniami komórkowymi. Obecnie wykorzystuje się kilkanaście ustalonych linii komórkowych ssaków (tab. 2). Najbardziej uniwersalną, powszechnie stosowaną ustaloną linią komórkową jest CHO. Komórki tej linii wykazują wysoki potencjał wzrostowy, dużą odporność na mechaniczne uszkodzenia, dużą tolerancję na zmiany ciśnienia osmotycznego oraz charakteryzują się wysokim stopniem amplifikacji i ekspresji zre-kombinowanych genów [42].

Znaczna liczba linii komórkowych stosowanych w biotechnologii do roku 1990 nie wymagała do wzrostu przyłączenia do podłoża i mogła rosnąć w formie zawiesiny. Hodowle tych komórek są prowadzone podobnie do hodowli mikroorganizmów przemysłowych, stąd też łatwiejsze jest w ich przypadku powiększanie skali hodowli.

Do hodowli komórek w zawiesinie stosuje się bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym lub mechanicznym (rys. 3A). W celu uzyskania wysokich gęstości komórek prowadzi się hodowle metodą ciągłą w systemach będących połączeniem bioreaktora z separatorem (układ perfuzyjny) [2, 17, 23, 36]. Jako separatory wykorzystuje się moduły mikro- i ultrafiltracyjne, które są szeregiem membran z tworzyw sztucznych i celulozy. Dzięki temu systemowi zarówno komórki, jak i substancje wielkocząsteczkowe są utrzymywane przez cały czas w układzie hodowlanym, co zwiększa wydajność otrzymywania produktów o wysokim stopniu czystości i obniża koszty produkcji.

Budowa i zasady działania bioreaktorów do hodowli zawiesinowych zostały opisane w pracy W. Grajka "Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych. II. Hodowle zawiesinowe" opublikowanej w *Biotechnologii* 2(21)'93: 22–34 [17].

Komórki w hodowli zawiesinowej są często narażone na stres mechaniczny wywołany turbulencją cieczy w bioreaktorze [11], dlatego wprowadzono hodowle komórek uwięzionych w strukturze ciał stałych o charakterze mikrokapilar lub usieciowanych biopolimerów. Jedną z metod immobilizacji komórek jest ich mikrokapsułkowanie w polimerach np. alginianowych, żelatynowych, agarozowych, w polimerze winylowym (rys. 2) [1, 12, 20, 34, 35, 40]. Komórki zawieszają się w sterylnym roztworze np. alginianu sodowego i zawiesinę wprowadza się do rozpylacza. Następnie zawiesinę rozpyla się do buforu zawierającego CaCl_2 . W wyniku kontaktu alginianu sodowego z jonami wapnia następuje natychmiastowa żelifikacja alginianu. Komórki zostają uwięzione w mikrokapsułkach o średnicy 0,5–2 mm. Mikrokapsułki wprowadza się do typowego bioreaktora (rys. 3B). Optymalne warunki do wymiany substancji odżywczych i gazów są związane ze stopniem porowatości ścian mikrokapsułek. Istotne jest zatem użycie odpowiedniego stężenia alginianu sodowego (0,8%) [35].

TABELA 2. Wybrane ustalone linie komórkowe ssaków wykorzystywane w biotechnologii i ich pochodzenie (zmodyfikowane wg [42])

Linia komórkowa	Pochodzenie
L	mysia tkanka łączna
HeLa	ludzki rak szyjki macicy
PK	nerka świni
CHO	jajnik chomika chińskiego
MDBK	nerka bydła
MDLK	nerka psa
VERO	nerka małpy
CRFK	nerka kota
BHK	nerka chomika syryjskiego
MRC	ludzkie płuco
Balb/3T3	mysia tkanka łączna

W mikrokapsułkach hoduje się głównie komórki heterokariotyczne wykorzystywane do produkcji przeciwciał monoklonalnych. Komórki w takiej hodowli osiągają gęstość do 10^8 komórek/ml, czyli ponad stukrotnie wyższą niż w klasycznej hodowli zawieszinowej.

W niektórych krajach od 1990 r. można stosować w medycynie jedynie produkty komórek prawidłowych wykazujących wzrost zależny od przyłączenia do podłoża stałego. Jak wcześniej wspomniano, jest to związane z odmiennymi szlakami obróbki potranslacyjnej białek w komórkach prawidłowych i nowotworowych [42]. Spowodowało to,

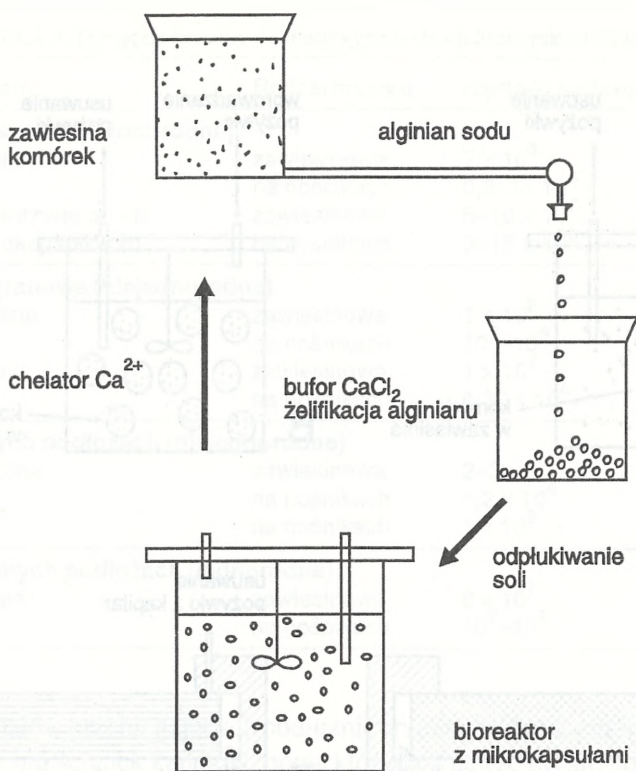
że zaczęto udoskonalać techniki hodowli komórek prawidłowych, których wzrost jest ograniczony przede wszystkim przez obszar dostępnej powierzchni naczynia hodowlanego. Pierwsze hodowle na szeroką skalę komórek, których wzrost zależy od przyłączenia do podłoża były prowadzone w obracanych butlach typu Winchester, których wewnętrzne ściany obrastały populacje komórek, a ich obrotowy ruch pozwalał na wymianę pożywki i tlenu. Hodowle w takich butlach były nieekonomiczne i wymagały dużych pomieszczeń.

Kolejnym udoskonaleniem było wprowadzenie mikronośników dla zwiększenia powierzchni osadzania komórek [4, 7, 10, 11, 15, 23, 24, 25, 28, 30, 31, 33, 39]. W takich warunkach zwiększony jest stosunek powierzchni zajmowanej przez komórki do objętości dostarczanej im pożywki [18]. Wysokie koszty środowiska hodowlanego, a szczególnie surowicy, którą tradycyjne pożywki muszą być uzupełniane, spowodowały, że ostatnio zastępuje się ją dodatkiem BSA, transferyny, insuliny lub BSA, EGF i innych czynników, co tylko w niewielkim stopniu obniża wydajność hodowli (ok. 10%) [9, 32, 45].

Nośniki stosowane w hodowli powinny spełniać następujące warunki:

- Średnica mikrokulek powinna wynosić 150–200 mikrometrów.
- Nośniki powinny posiadać niezbyt wysoką gęstość właściwą.
- Powierzchnia nośnika powinna być chemicznie obojętna.

Opisano wiele materiałów używanych do produkcji mikrokulek. Ważne jest, aby białka wydzielane przez komórki, tj. fibronektyna, laminina, kolagen, wykazywały wysokie powinowactwo do powierzchni nośnika. Najczęściej wykorzystuje się kulki dekstranowe, celulozowe, sefarozowe zmodyfikowane przez podstawienie dodatnio naładowanych grup N,N-etyloaminoetylenowych (DEAE), dzięki czemu możliwe



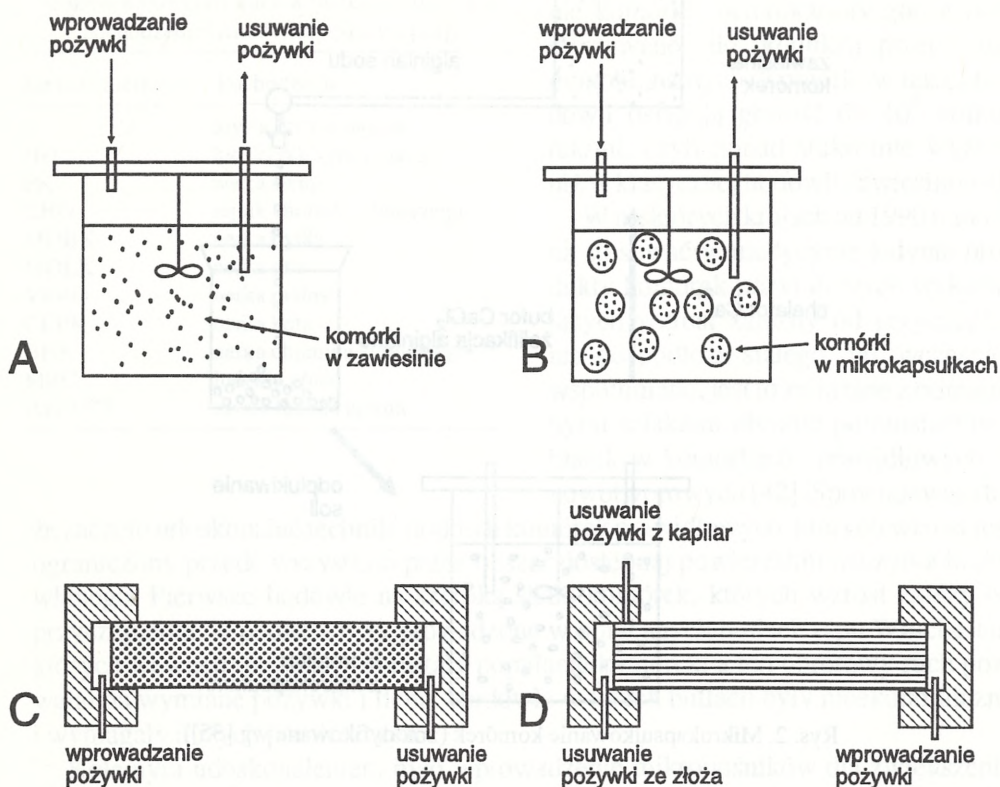
Rys. 2. Mikroksułowowanie komórek (zmodyfikowane wg [35])

jest uzyskanie wyższych gęstości komórek na nośniku [1, 18, 23, 33]. Stosowane są także kulki z tworzyw sztucznych [5].

Dobrymi materiałami do produkcji mikrokulek są także poliuretan, żelatyna Culti - Spher G, polistyren, poliakrylamid, charakteryzujące się makroporową strukturą wydajnie zwiększającą dostępną powierzchnię przyczepu komórek.

Opisano także wrażliwy na zmiany temperatury polimer (poli-N-izopropylakrylamid) pokryty kolagenem. Jego zaletą jest możliwość oddysocjowania komórek od podłoża przez obniżenie temperatury poniżej temperatury krytycznej: 32°C , w której polimer ten występuje w formie rozpuszczalnej w wodzie [37].

Kulki mikronośnika z zaadsorbowanymi na powierzchni komórkami wprowadza się do typowego bioreaktora z mieszaniem mechanicznym lub pneumatycznym [7, 10, 11, 23]. Optymalna szybkość mieszania w bioreaktorze nie powinna przekraczać 50 obr./min [2]. Przy zbyt wysokich obrotach mieszadła dochodzi do wymywania komórek z kulek mikronośnika oraz mechanicznego uszkodzenia komórek przez siły ścinające, natomiast przy niskich prędkościach obrotowych następuje sklejanie się kulek nośnika.



Rys. 3. Schematyczne diagramy bioreaktorów do hodowli komórek ssaków (zmodyfikowane wg [23]): [A] – bioreaktor z mieszaniem mechanicznym, [B] – bioreaktor z mieszaniem mechanicznym z komórkami w mikrokapsułkach, [C] – bioreaktor ze złożem ceramicznym, [D] – bioreaktor z wydrążonymi włóknami

Alternatywę do hodowli komórek przyczepionych do mikroonośnika stanowi hodowla w bioreaktorze typu mikrokapilar *hollow fibers* (rys. 3D) [18, 22, 23, 27]. Bioreaktor ten charakteryzuje się obecnością kapilar lub płaskich arkuszy, których ściany zbudowane są z porowatych materiałów przepuszczających selektywnie określone cząsteczki. Dzięki temu zachodzi wymiana składników odżywczych. Komórki przyczepiają się do zewnętrznej powierzchni mikrokapilar, podczas gdy w ich wnętrzu przepływa strumień natlenionej pożywki. Możliwość stosowania selektywnych membran pozwala na wybiórcze zagęszczanie metabolitów (przeciwciał, hormonów).

Do hodowli komórek, których wzrost jest zależny od przyczepienia do podłoża, stosuje się także bioreaktory wypełnione materiałem ceramicznym (rys. 3C) [23]. W bioreaktorze takim umieszczona jest cylindryczna, ceramiczna matryca z dużą liczbą

TABELA 3. Dostępne systemy do masowych hodowli komórek zwierzęcych

System hodowlany	Rodzaj hodowli	Gęstość hodowli [kom/ml]
Fermentatory (systemy jednorodne)		
Ruchomy zbiornik	zawieszinowa na nośnikach	7×10^6 $0,2-1 \times 10^6$
Zbiorniki napowietrzane <i>air-lift</i> (hodowle w mikrokapsułkach)	zawieszinowa na nośnikach	$5-10 \times 10^7$ $3-10 \times 10^6$
Systemy membranowe (niejednorodne)		
Wydrążone włókna	zawieszinowa na nośnikach	1×10^8 10^7-10^8
Płaskie membrany	zawieszinowa na nośnikach	1×10^7 $1,35 \times 10^6$
Systemy o stałych podłożach (niejednorodne)		
Podłoża ceramiczne	zawieszinowa na nośnikach	$2-3 \times 10^7$ $4,2 \times 10^6$
Kulki szklane	na nośnikach	1×10^6
Systemy o płynnych podłożach (jednorodne)		
Podłoża porowate	zawieszinowa na nośnikach	6×10^7 10^7-10^8

jednolitych kanałów przebiegających podłużnie przez cylinder. Komórki przyczepiają się do powierzchni ścianek kanałów, przez których wnętrze płynie pożywka.

Opis budowy bioreaktorów stosowanych do hodowli komórek przyczepno-zależnych został zamieszczony w pracy W. Grajka i D. Łukaszyńskiego "Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych. I. Hodowle komórek rosnących na nośnikach", opublikowanej w *Biotechnologii* 2(21)'93; 8-21[18].

Systemy dostępne do hodowli na szeroką skalę oraz uzyskiwane w nich zagęszczenie komórek na jednostkę objętości bioreaktora zostały zestawione w tabeli 3. Pojemności stosowanych bioreaktorów wahają się w granicach od 1 litra do 20000 litrów [26].

W hodowlach tradycyjnych gęstość uzyskanych komórek nie przekracza 10^6 komórek/ml. W specjalnych układach sprzyjających dużemu zagęszczeniu komórek można uzyskać namnożenie 10^7-10^8 komórek/ml.

Uzyskanie gęstości komórek zbliżonej do gęstości w tkankach zwierzęcych wynoszącej ok. 2×10^9 komórek/ml w hodowlach *in vitro* jest jeszcze nieosiągalne [8].

Powiększanie skali hodowli przez modyfikację systemów hodowlanych umożliwia uzyskiwanie wyższej wydajności produkcji substancji biologicznie czynnych.

Jednym z pozytywnych aspektów hodowli komórek zwierzęcych i ludzkich na dużą skalę jest uchronienie od śmierci milionów zwierząt, głównie myszy i szczurów, wykorzystywanych jako "naturalne bioreaktory" do produkcji m.in. przeciwciał monoklonalnych. W jamie otrzewnowej tych organizmów prowadzone były hodowle

komórek heteriokariotycznych. Do otrzymania 1 kg oczyszczonych przeciwciał konieczne jest pobranie wysięku z ok. 1 000 000 myszy. W terapii nowotworów jednemu pacjentowi podaje się ok. 300 mg przeciwciał rocznie. Przy założeniu, że tą metodą leczonych jest 10 000 osób zużywa się 3 kg białka pobranego z jamy otrzewnowej 3 mln myszy. Hodując komórki heteriokariotyczne w bioreaktorze o pojemności 10 000 litrów taką ilość przeciwciał monoklonalnych można uzyskać w ciągu 10 dni [2, 23]. Przykład ten ilustruje potrzebę udoskonalania technik hodowli na dużą skalę zwłaszcza w celu zwiększenia produktywności komórek wydzielających substancje biologicznie czynne, stosowane w celach terapeutycznych.

LITERATURA

- [1] ATLANTOV G, BRODVAROVA I, RASHKOV I. Synthesis of protein coated gelatin microspheres and their use as microcarriers for cell culture. Part I. Derivatization with native collagen. *J Biomater Sci Polym Ed* 1991; **2**: 81–89.
- [2] ARATHOON WR, BIRCH JR. Large-scale cell culture in biotechnology. *Science* 1986; **232**: 1390–1395.
- [3] AVGERINOS GC, DRAPEAU D, SOCOLOW JS, MAO JI, HSIAO K, BROEZE RJ. Spin filter perfusion system for high density cell culture: production of recombinant urinary type plasminogen activator in CHO cells. *Biotechnology* 1990; **8**: 54–58.
- [4] BING RJ, BINDER T, PATARICZA J, KIBIRA S, NARAYAN KS. The use of microcarriers beads in the production of endothelium-derived relaxing factor by freshly harvested endothelial cells. *Tissue Cell* 1991; **23**: 151–159.
- [5] BING RJ, DUDEK R, KAHLER J, NARAYAN KS, INGRAM M. Cytokine production from freshly harvested human mononuclear cells attached to plastic beads. *Tissue Cell* 1992; **24**: 203–209.
- [6] CHANG HN, FURUSAKI S. Membrane bioreactors: present and prospect. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1991; **44**: 27–64.
- [7] CHEN Z, CHEN Y, SHI Y, YIE X, YANG G. Microcarrier culture of fish cells and viruses in cell culture bioreactor. *Can J Microbiol* 1992; **38**: 222–225.
- [8] CHMIEL A. Hodowla komórek zwierzęcych *in vitro*. *Biotechnologia* 1993; **2**: 35–45.
- [9] CLARK J. Reducing the requirement for serum supplements in high yield microcarrier cell culture. *Cell Biol* 1983; **13**: 6–15.
- [10] CROUGHAN MS, HAMEL JP. Effect of microcarrier concentration in animal cell culture. *Biotech Bioeng* 1987; **32**: 975–982.
- [11] CROUGHAN MS, WANG DI. Hydrodynamic effect on animal cells in microcarrier bioreactors. *Biotechnology* 1991; **17**: 213–249.
- [12] DUPUY B, CADIC C, GIN H, BAQUEY C, DUFY B, DUCASSOU D. Microencapsulation of isolated pituitary cells by polyacrylamide microlatex coagulation on agarose beads. *Bio-materials* 1991; **12**: 493–496.
- [13] FAMILLETTI P, FREDERICKSJE. Techniques for mammalian cell immobilization. *Biotechnology* 1988; **4**: 41–44.
- [14] FERRARI M, LOSIO MN, GUALANDI GL, BUGNETTI M. Cultivation of foot- and mouth disease virus in BHK21 cells grown in culture system. *Microbiologica* 1990; **13**: 161–163.
- [15] FORESTELL SP, KALOGERAKIS N, BEHIE N, GERSON D. Development of the optimal conditions for microcarriers cultures. *Biotechnol Bioeng* 1992; **39**: 305–313.

- [16] GIKAS P, LIVINGSON AG. Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 1993; **42**: 1337–1351.
- [17] GRAJEK W. Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych. II. Hodowle zawieszinowe. *Biotechnologia* 1993; **2**: 22–34.
- [18] GRAJEK W, ŁUKASZYŃSKI D. Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych. I. Hodowle komórek rosnących na nośnikach. *Biotechnologia* 1993; **2**: 8–21.
- [19] GRIFFITHS B. Alternative strategies to the scale up of animal cells. *Ann NY Acad Sci* 1992; **665**: 364–370.
- [20] HALLE JP, BOURASSA S, LEBLOND FA, CHEVALIER S, BEAUDRY M, CHAPDELAIN A, COUSINEAU S, SAINTOGE J, YALE JF. Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly-L-lysine membranes. *Transplantation* 1993; **55**: 350–353.
- [21] HAWBOLDT KA, KALOGERAKIS N, BEHIE LA. A cellular automaton model for microcarriers cultures. *Biotechnol Bioeng* 1994; **43**: 90–100.
- [22] HOLTON OD, VICALVI JJ. Optimization of monoclonal antibody immobilization of hydrazide-preactivated hollow-fiber membrane. *Biotechniques* 1991; **11**: 662–667.
- [23] HU WS, DODGE TC. Cultivation of mammalian cells in bioreactors. *Biotech Progress* 1985; **1**(4): 209–215.
- [24] KARKARE SB, COLE ST, SACHDEV RK, SATYAGAL VN, WILLIAMS LR, FIESCHKO JC. Production of rat stem cell factor from BRL cells by microcarrier perfusion culture. *Ann NY Acad Sci* 1992; **665**: 371–379.
- [25] KASAI S, SAWA M, NISHIDA Y, ONODERA K, HIRAI S, YAMAMOTO T, MITO M. Cellulose microcarrier for high-density culture of hepatocytes. *Transplant Proc* 1992; **24**: 2933–2934.
- [26] KEARNS MJ. Integrated design for mammalian cell culture. *Biotechnology* 1990; **8**: 409–413.
- [27] KNIGHT P. Hollow fiber bioreactors for mammalian cell culture. *Biotechnology* 1989; **7**: 459–461.
- [28] KURIYAMA S, NAKANO T, YOSHIMURA N, OHUCHI T, MORITERA T, HONDA Y. Mass cultivation of human retinal pigment epithelial cells with microcarrier. *Ophthalmologica* 1992; **205**: 89–95.
- [29] LEE JS, KAIBARA M, IWAKI M, SASABE H, SUZUKI Y, KUSAKABE M. Selective adhesion and proliferation of cells ion-implanted polymer domains. *Biomaterials* 1993; **14**: 958–960.
- [30] MENDONCA RZ, IOSHIMOTO LM, MENDONCA RMZ, DE-FRANCO M, VALENTINI EJG, BECAK W, RAW I, PEREIRA CA. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarriers system. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; **26**: 1305–1317.
- [31] MERED B, ALBRECHT P, HOPPS HE. Cell growth optimization in microcarrier culture. *In Vitro* 1980; **16**: 859–865.
- [32] MIECH G, MYARA I, MANGEOT M, GAUTIR M, LEMMONIER A. The culture of human skin fibroblasts on microcarriers in the presence of serum substitute. *Biol Cell* 1990; **68**: 85–87.
- [33] REUVENY S, MIZRAHI A, KOTLER M, FREEMAN A. Factors effecting cell attachment, spreading, and growth on derivatized microcarriers: II. Introduction of hydrophobic elements. *Biotech Bioeng* 1983; **25**: 2969–2980.
- [34] SHIMI SM, HOPWOOD D, NEWMAN EL, CUSCHIERI A. Microencapsulation of human cells: its effects on growth of normal and tumour cells *in vitro*. *Br-J-Cancer* 1991; **63**: 675–680.
- [35] SINACORE MS, CRESWICK BC, BUEHLER R. Entrapment and growth of murine hybridoma cells in calcium alginate gel microbeads. *Biotechnology* 1989; **7**: 1275–1279.
- [36] SZATHMARY S, GRANDICS P. Bioreactor integration with downstream processing. *Biotechnology* 1990; **8**: 925.
- [37] TAKEZAWA T, MORI Y, YOSHIZATO K. Cell culture on a thermoresponsive polymer surface. *Biotechnology* 1990; **8**: 854–857.

- [38] VAN WEZEL AL. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers on homogenous culture. *Nature* 1967; **216**: 64–65.
- [39] VAN WEZEL AL. The large-scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture: improvement of microcarriers. *Dev Biol Stand* 1973; **37**: 143–147.
- [40] WAN LS, HENG PW, CHAN LW. Drug encapsulation in alginate microspheres by emulsification. *J Microencapsul* 1992; **9**: 309–316.
- [41] WERNER RG, NOE W. Mammalian cell cultures. Part I: Characterization, morphology and metabolism. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1993; **43**, **10**: 1134–1139.
- [42] WERNER RG, NOE W. Mammalian cell cultures. Part II: Genetic engineering, protein glycosylation, fermentation and process control. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1993; **43**, **11**: 1242–1249.
- [43] WERNER RG, NOE W. Mammalian cell cultures. Part III: Safety and future aspects. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1993; **43**, **12**: 1388–1390.
- [44] XIAO C, ZHANG Y, KONG W, WANG H. Pilot production of high-titer interferon and virus with a microcarrier suspension culture system. *Chin Med Sci J* 1992; **7**: 67–71.
- [45] ZHOU W, CAI S. Production of monoclonal antibody in hollow fiber culture system with serum-free medium. *Chin-J-Biotechnol* 1992; **8**: 41–49.

Justyna Drukała, Jolanta Sroka

*Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego UJ
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3*

HODOWLE SKÓRY W TRANSPLANTOLOGII I BIOTECHNOLOGII

SKIN CULTURES FOR TRANSPLANTOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Ewa MAREWICZ

Instytut Mikrobiologii Collegium Medicum UJ, Kraków

Streszczenie: Przedstawiono główne kierunki badań związanych z hodowlą naskórka i skóry ludzkiej. Opisano nowe metody stosowane w hodowli keratynocytów i skóry *in vitro* oraz wykorzystywanie takich hodowli do przeszczepów w przypadkach uszkodzeń i chorób skóry, a także możliwość zastępowania nimi zwierząt laboratoryjnych w rozmaitych testach biotechnologicznych.

Słowa kluczowe: hodowle organotypowe skóry, keratynocyty, przeszczepy.

Summary: The research concerning human epithelium and skin cultivation *in vitro* are discussed. New technics developed for keratinocytes and organotypic skin cultures are described. The efficiency of skin equivalents from cultures *in vitro* for the treatment of burn wounds and skin surgery as well as for testing toxic compounds is considered.

Key words: skin culture, keratinocytes, skin grafts.

I. WSTĘP

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił rozwój nowych technik hodowli *in vitro* komórek i organów zwierzęcych. Możliwość uzyskiwania masowych hodowli z niewielkich wycinków tkanek, postęp w poznaniu biologii wielu typów komórek, a także umiejętność modyfikowania ich zachowania się w hodowlach, doprowadziły do

wzrostu zainteresowania praktycznym wykorzystaniem tych osiągnięć w medycynie i biotechnologii.

Skóra, największy "narząd" (1,5 do 2 m²) organizmu człowieka zbudowana jest z wielowarstwowego nabłonka płaskiego, tzw. naskórka i skóry właściwej. Fibroblasty, komórki najliczniej występujące w skórze właściwej, produkują kolagen i elastynę, składniki macierzy międzykomórkowej. Inne typy komórek obecnych w skórze, tj. melanocyty, limfocyty T, makrofagi – tzw. komórki Langerhansa i neurowydzielnicze ciała Merkla, nie są bezpośrednio odpowiedzialne za budowę podstawowej struktury skóry (rys. 1).

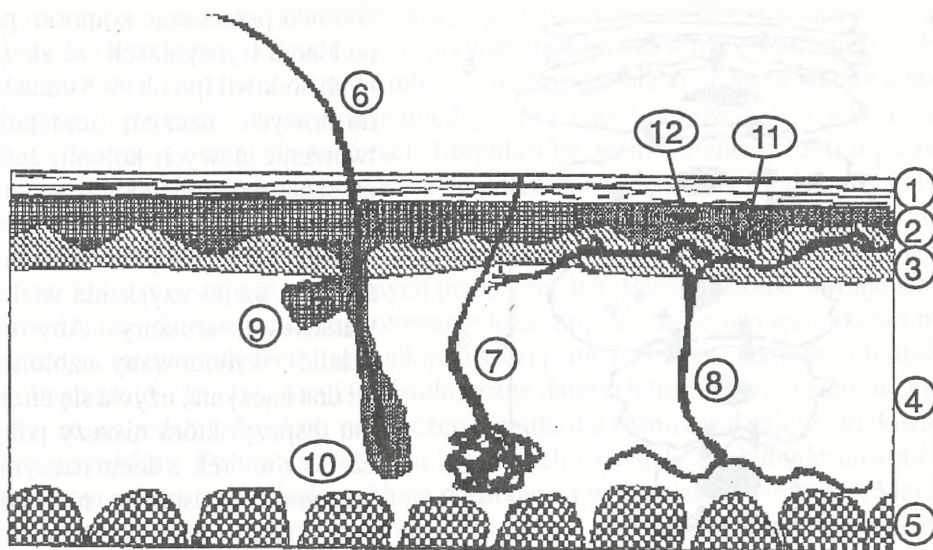
Komórki tkanki łącznej pochodzące ze zdrowej tkanki zazwyczaj łatwo dają się hodować *in vitro*. Spośród komórek nabłonkowych opracowano metody hodowli keratynocytów skóry, nabłonków dróg moczowych, gruczołu krokowego, jamy ustnej i pochwy oraz rogówki oka. Naskórek jest tkanką szczególnie dogodną do hodowli, ponieważ w ponad 90% składa się z jednego rodzaju komórek – keratynocytów (rys. 2). Keratynocyty w hodowli, w odpowiednich pożywkach, zachowują się stabilnie nie tracąc zdolności do proliferacji i różnicowania.

Możliwość hodowania *in vitro* komórek skóry sprawiła, że w ostatnich latach podjęto badania, które doprowadziły do wytwarzania substytutów (ekwiwalentów) naskórka i skóry. Używane są one do przeszczepów w przypadku rozległych ran oparzeniowych, gdy obszar (procent) uszkodzonej powierzchni skóry jest zbyt duży, aby możliwe było spontaniczne zagojenie się rany lub zastosowanie autoprzeszczepów z nieuszkodzonych części ciała. Również, gdy rana jest głęboka i zniszczony jest nie tylko naskórek, ale także mieszki włosowe i gruczoły potowe z keratynocytami zdolnymi do odtworzenia naskórka, konieczne jest dostarczenie nowych komórek [15, 48]. Skórę wyhodowaną *in vitro* wykorzystuje się także w innych przypadkach, np. patologicznych zmian skóry. Produkowanie *in vitro* ekwiwalentów skóry zbliżonych pod względem morfologicznym i czynnościowym do skóry pozwala na zastępowanie rozmaitych testów (np. dotyczących substancji żrących) wykonywanych dotychczas na zwierzętach laboratoryjnych testami na hodowanej *in vitro* skórze.

II. WYKORZYSTYWANIE HODOWLI NASKÓRKA W LECZENIU OPARZEŃ I CHOROÓB SKÓRY

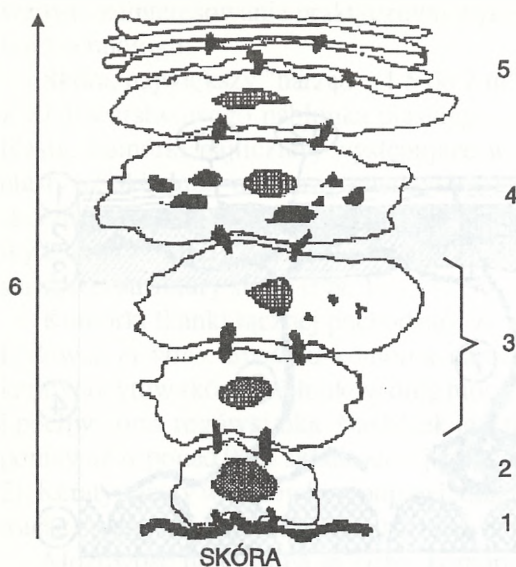
II.1. Metody hodowli *in vitro* ludzkich keratynocytów

Pionierem i inicjatorem wykorzystania hodowli komórek naskórka do przeszczepów był Howard Green z Harvard Medical School. W latach siedemdziesiątych opracował on metodę i warunki hodowli keratynocytów skóry myszy, którą później przystosowano do hodowli komórek ludzkiego naskórka [15, 18, 43]. Opiera się ona



Rys. 1. Schemat budowy skóry ludzkiej: 1 – warstwa zrogowaciała naskórka; 2 – warstwy żywych komórek naskórka; 3 – warstwa brodawkowata skóry właściwej; 4 – warstwa siateczkowata skóry właściwej; 5 – podskórna tkanka tłuszczowa; 6 – włos; 7 – gruczoł potowy; 8 – naczynia krwionośne; 9 – gruczoł łojowy; 10 – mieszek włosowy, 11 – melanocyt; 12 – komórka Langerhansa

na izolacji keratynocytów ze zdysocjowanej tkanki pacjenta (ok. 2 cm²), wydajnym namnożeniu ich *in vitro*, a następnie stworzeniu warunków sprzyjających ich prawidłowemu różnicowaniu i uwarstwieniu. Pobraną przez biopsję tkankę oddziela się skalpelem od tkanki podskórnej, tnie, a następnie trawi kilkakrotnie trypsyną. Uzyskaną zawiesinę komórek umieszcza się w pożywce (np. Dulbecco MEM) z dodatkiem 10–20% surowicy płodowej, hydrokortyzonem, toksyną przecinkowców cholery (dla pobudzenia wzrostu), naskórkowym czynnikiem wzrostowym (EGF) oraz mieszaniną innych czynników wzrostowych (insulino-podobnych czynników wzrostu – IGF). Dodaje się również w odpowiedniej (wystarczającej do pokrycia 1/3 powierzchni naczyniaka) ilości zawiesinę zabitych przez napromieniowanie UV fibroblastów mysich ustalonej linii komórkowej 3T3. Stanowią one tzw. *feeder-layer*, czyli warstwę odżywczą. Stwierdzono, że fibroblasty produkują czynniki pobudzające wzrost komórek naskórka i czynniki hamujące namnażanie się fibroblastów ludzkich zanieczyszczających materiał. Dalsze szczegółowe badania wykazały, że aktywność sprzyjająca wzrostowi keratynocytów związana jest z obecnością samych komórek fibroblastów (z powierzchnią ich błon plazmatycznych), a nie tylko z produktami wydzielanymi przez komórki. Aktywność taką wykazuje również utrwalona aldehydem glutarowym warstwa odżywcza fibroblastów, a nie wykazuje uwarunkowane medium z hodowli fibroblastów [43, 49]. Komórki 3T3 są później wypierane z hodowli przez namnażające się keratynocyty. W zależności od potrzeb można regulować wydajność



Rys. 2. Schemat budowy naskórka; morfologia poszczegól-nych warstw keratynocytów: 1 – błona pod-stawna; 2 – warstwa podstawna; 3 – warstwa kolczy-
sta; 4 – warstwa ziarnista; 5 – warstwa zrogowacia-
ła; 6 – strzałka wskazuje kierunek przesuwania się
warstw keratynocytów

hodowli przenosząc komórki, po poddaniu trypsynizacji, ze zlew-nych hodowli (po ok. 4–5 dniach) do nowych naczyń; następuje tworzenie nowych kolonii. Jeśli przeznaczeniem hodowli jest u-życie jej do przeszczepu, hodow-łę kontynuuje się przez kilkana-ście dni, aż do uzyskania wielo-warstwowej struktury. Aby od-dzielić wyhodowany nabłonek od dna naczynia, używa się enzy-
mu dispazy, która niszczy połą-
czenia komórek z dnem naczynia lub błoną podstawną, nie niszc-
ząc połączeń komórka-komórka (rys. 3). Pierwsze hodowle uzy-
skane przez Greena były niedo-
skonalemi kopiami naturalnego
naskórka. Miały nieregularną
strukturę, brak było warstwy zro-
gowaciej, ziarnistej, błony pod-
stawnej oraz były niezdolne do
syntezy niektórych keratyn. Mi-

mo to sprawdziły się one w próbach klinicznych. Zastosowane u poparzonych dzieci pozwoliły na odtworzenie skóry zniszczonej przez oparzenia obejmujące ok. 50% powierzchni ciała. Od czasu badań Greena metody hodowli naskórka uległy ulepsze-
niu i nadal są udoskonalane. Zostały opracowane specjalne pożywki dla keratynocy-
tów, jak np. MCDB 153 (KDM), Keratinocyte FSM. Możliwe są hodowle
keratynocytów bez warstwy odżywczej, którą w omawianym modelu stanowiły
fibroblasty linii 3T3 [33, 34].

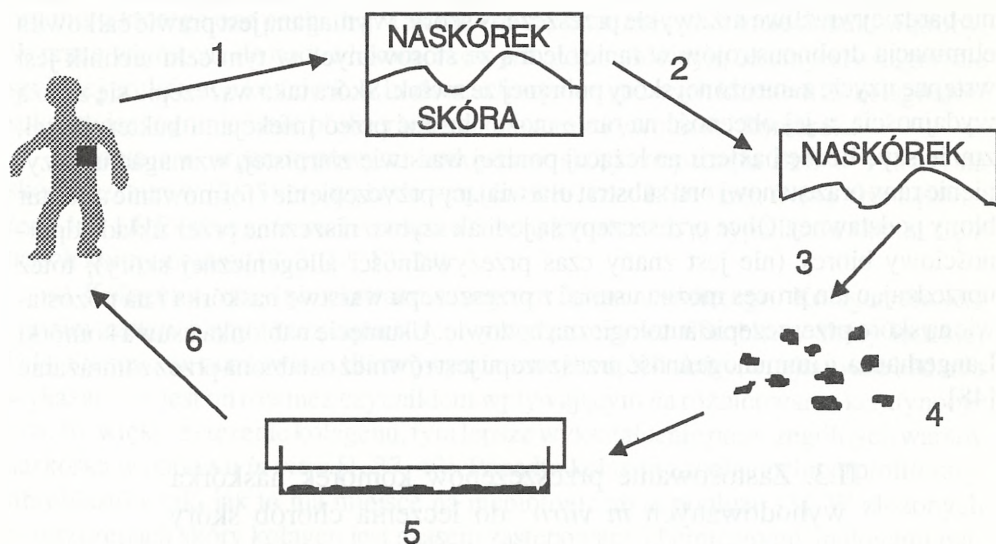
II.2. Rodzaje przeszczepów komórek naskórka

a) Hodowle komórek własnego nabłonka

Obecnie hodowle komórek autologicznego naskórka stosuje się do przeszczepów
w leczeniu ran oparzeniowych w wielu specjalistycznych klinikach w USA, Wielkiej
Brytanii i wielu krajach Europy [48].

Autologiczny, wyhodowany *in vitro* naskórek przenoszony jest na ranę jako 2–8
warstwowy płat przypięty do gazy (*petrolatum gauze*). Przeszczepy, które nie są
odrzucone, zapobiegają ściąganiu się rany i nie wykazują zwiększonej kruchłości.

Główną przyczyną nieprzyjmowania się tego typu przeszczepów jest nieprzyczepienie się keratynocytów do łoża rany. W przypadku stosowanych już wcześniej cienkich przeszczepów skóry (ok. 3 mm grubości: naskórek i nieco grubsza warstwa skóry właściwej) połączenie następuje pomiędzy skórą właściwą przeszczepu a skórą właściwą dna rany. Następuje penetracja fibroblastów, wzmocnienie przeszczepu kolagenami, a sam naskórek nie bierze w tym połączeniu udziału. Wyhodowany *in vitro* naskórek przylega bezpośrednio do dna rany, co umożliwia jego lepsze odżywianie, z drugiej jednak strony zmusza do wykształcenia innych struktur zakotwicających niż te, które powstają w klasycznych przeszczepach. Bardzo istotne wydaje się też odpowiednie chirurgiczne przygotowanie łoża rany: wczesne wycięcie tkanki martwiczej, czasowe pokrycie rany alloprzeszczepami i prawie całkowita eliminacja drobnoustrojów [5, 48]. Analizy histologiczne dalszych losów przeszczepów wykazały, że już jeden tydzień po przeszczepie epiderma różnicowała się w wielowarstwowy naskórek. Po następnych dwu tygodniach rozwijały się hemidesmosomalne połączenia skóry z naskórkiem, błoną podstawną i włókna zakotwiczące. Melanocyty, stanowiące 1–2% komórek przeniesionych z hodowli, zaczynały produkować nabłonkową melanicę po 6–8 tygodniach. Próbki biopsyjne pobrane po 4–5 latach od



Rys. 3. Izolacja i hodowla ludzkich keratynocytów wg metody H. Greena: 1 – pobranie przez biopsję wycinka zdrowej skóry; 2 – oddzielenie naskórka od skóry właściwej i tkanki podskórnej; 3 – trawienie enzymatyczne – trypsyna/EDTA; 4 – zawiesina pojedynczych komórek; 5 – hodowla keratynocytów; 6 – przeszczep wyhodowanego *in vitro* autologicznego nabłonka

przeszczepu wykazywały podobną do skóry architekturę, z odtworzonym unaczynieniem i wykształconymi w pełni warstwami: brodawkowatą i siatkowatą [15, 48].

b) Hodowle komórek allogenicznego nabłonka

Zastosowanie tego typu hodowli jest obecnie przedmiotem badań laboratoryjnych i klinicznych. Gdyby udało się osiągnąć trwałe przyjęcie przeszczepów allogenicznych możliwe byłoby stworzenie banku tkanek i można byłoby od razu pokrywać ranę gotowym już naskórkiem pomijając konieczność czasowego zabezpieczenia rany w czasie trzech tygodni oczekiwania, wymaganych dla uzyskania odpowiedniego wzrostu własnych komórek w hodowli. Pierwotnie sądzono, że hodowane *in vitro* keratynocyty mogą tracić powierzchniowe antygeny HLA-DR. Okazało się jednak, że antygeny te ponownie ulegają ekspresji w hodowli i badania mające na celu przetrwanie allogenicznych przeszczepów na ranie pełnej grubości zakończyły się niepowodzeniem [48].

c) Techniki łączone: użycie alloprzeszczepu skóry i wyhodowanego *in vitro* autogenicznego nabłonka

Powierzchnia rany oparzeniowej, na którą ma być przeniesiony przeszczep, jest zwykle silnie zanieczyszczona przez mikroorganizmy, a przeszczepy tkankowe są na nie bardziej wrażliwe niż zwykłe przeszczepy skóry. Wymagana jest prawie całkowita eliminacja drobnoustrojów w ranie. Jedną ze stosowanych w tym celu technik jest wstępne użycie zamrożonej skóry pobranej ze zwłok. Skóra taka wszczepia się z dużą wydajnością, a jej obecność na ranie może chronić przed infekcjami bakteryjnymi, zmniejszyć liczbę bakterii na leżącej poniżej warstwie ziarnistej, wzmacniać unaczynienie rany oraz stanowi ona substrat ułatwiający przyczepienie i formowanie struktur błony podstawnej. Obce przeszczepy są jednak szybko niszczone przez układ odpornościowy biorcy (nie jest znany czas przeżywalności allogenicznej skóry), toteż uprzedzając ten proces można usunąć z przeszczepu warstwę naskórka i na pozostawioną skórę przeszczepić autologiczną hodowlę. Usunięcie nabłonka usuwa komórki Langerhansa, a immunogenność przeszczepu jest również osłabiona przez zamrażanie [48].

II.3. Zastosowanie przeszczepów komórek naskórka wyhodowanych *in vitro* do leczenia chorób skóry

Hodowle naskórka oprócz wykorzystania do leczenia ran oparzeniowych znalazły zastosowanie w innych przypadkach leczenia chorób czy uszkodzeń skóry wymagających regeneracji naskórka. Wyhodowany *in vitro* naskórek stosowany jest przy odtwarzaniu naskórka po wycięciu bliznowców czy dużych blizn powodujących ograniczenia ruchu, w leczeniu przewlekłych owrzodzeń kończyn związanych z cukrzycą lub nieprawidłowym krążeniem u osób starszych, w leczeniu bielactwa,

wrodzonej wady zwanej olbrzymim, owłosionym znamieniem, w której nieprawidłowe melanocyty mogą ulegać złośliwym przemianom. Komórki śluzówki z dróg moczowych wykorzystuje się w leczeniu wrodzonych wad w budowie przełyka, komórki z jamy ustnej do regeneracji nabłonka ust [10, 15].

III. ORGANOTYPOWE HODOWLE SKÓRY

III.1. Metody hodowli skóry

Główną przyczyną niepowodzeń w stosowaniu przeszczepów naskórka jest nieprzyczepianie się transplantatu do łoża rany, związane najprawdopodobniej z pierwotnym brakiem skóry właściwej w przeszczepie. Podjęto zatem próby wyhodowania *in vitro* całej skóry. Są to hodowle organotypowe nowej generacji. Dawniej przez hodowle organotypowe rozumiano izolowanie określonych narządów lub ich fragmentów (kryterium ograniczającym była wielkość – powstawała martwica centralna itp.) i przetrzymywanie ich poza organizmem w określonych warunkach umożliwiających zachowanie niezmienionej budowy i funkcji. Obecnie możliwe jest odtwarzanie w warunkach *in vitro* modelu komórkowego, który wykazuje właściwości organu, z którego one pochodzą. Tak tworzy się sztuczne żyły i małe zraziki wątroby. W przeciwieństwie do hodowli komórkowych, gdzie głównym celem jest osiągnięcie szybkiej proliferacji komórek, w hodowlach organotypowych kluczem do osiągnięcia sukcesu jest ograniczanie proliferacji i zachowanie żywotności komórek.

Badania nad organotypowymi hodowlami skóry rozpoczęła Bell w 1981 r. na skórze szczurów [2]. Skóra wyhodowana *in vitro*, tzw. LSE (ang. *living skin equivalent*) lub LDE (*living dermal equivalent*) w najprostszych przypadkach składa się z trzech komponentów [2, 3, 12, 13, 29]:

a) **Kolagenu**, sterylnie ekstrahowanego ze ścięgna bydlęcego. Kolagen ten jest później zastępowany przez naturalny, wytwarzany przez fibroblasty skóry ludzkiej [11]. Stanowi on rusztowanie dla trójwymiarowej hodowli skóry, a najnowsze badania wykazały, że jest on również czynnikiem wpływającym na różnicowanie keratynocytów. Im większe stężenie kolagenu, tym lepsze wykształcenie poszczególnych warstw naskórka w hodowli *in vitro* [1, 37, 40]. Ponadto kolagen zapobiega hiperprolifracji fibroblastów tak, jak to ma miejsce na niebiologicznym podłożu [3]. W złożonych przeszczepach skóry kolagen jest czasem zastępowany chemicznymi analogami macierzy międzykomórkowej, np. kopolimerem kolagen – glikozaminoglikan czy też biodegradowującym się kwasem poliglikolowym [48, 50].

b) **Fibroblastów skóry ludzkiej**, które izoluje się z własnej skóry pacjenta lub, jeśli wyhodowany *in vitro* substytut skóry ma służyć jako model w badaniach laboratoryjnych, pochodzą one z płodowego lub noworodkowego napletka (dawcy badani są w kierunku czynników zakaźnych, rozmaitych patogenów, nienormalnego

kariotypu czy rakotwórczości). Tkanę trawi się trypsyną i kolagenazą, a następnie pasażuje w pożywkę Eagle'a w modyfikacji Dulbecco z 10–20% dodatkiem surowicy. Fibroblasty miesza się z kolagenem aż do utworzenia siatki kolagenowej w hodowli fibroblastów. Mieszanina ta stanowi substrat do hodowli keratynocytów.

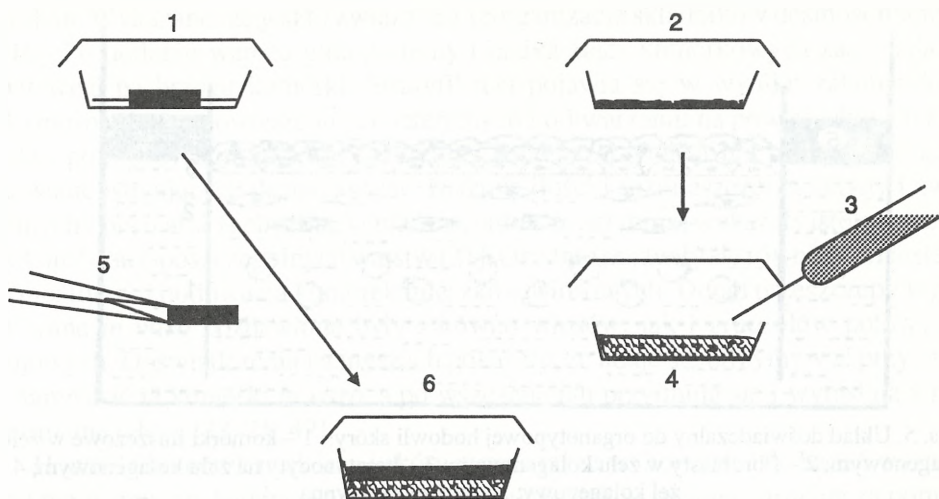
c) **Keratynocytów skóry**, które analogicznie jak fibroblasty, w zależności od przeznaczenia hodowli, mogą pochodzić od pacjenta lub z napletka. Hodowlę prowadzi się w MSBM (*minimal supplement basal medium*) lub w specjalnych pożywkach opracowanych i przeznaczonych do hodowli skóry. Keratynocyty wzrastają na substracie aż do osiągnięcia ciągłej warstwy (ok. 4 dni). Dalsza hodowla prowadzona jest na granicy faz pożywka-powietrze. Stwarza to lepsze odwzorowanie warunków panujących *in vivo*, a przez to lepsze uwarstwienie (obecność wykształconych warstw: bazalnej, suprabazalnej, kolczystej, ziarnistej i zrogowaciałej). Hodowle na granicy faz tzw. ALI (ang. *air-liquid interface*) wprowadzone zostały przez Thao w połowie lat osiemdziesiątych. W tych warunkach dochodzi do uzyskiwania trójwymiarowych, wielowarstwowych struktur, gdyż komórki dzielą się tylko z jednej strony struktury różnicując i dojrzewając w miarę przesuwania się ku powierzchni zewnętrznej. Czasem do złożonych przeszczepów wyhodowanych *in vitro* włączane są również preadipocyty i adipocyty (z kolagenem na błonie nitrocelulozowej) – jest to odpowiednik hipodermy [38] (rys. 4). Opracowano specjalne naczynia hodowlane umożliwiające prowadzenie organotypowych trójwymiarowych hodowli skóry. Jeden z takich prostych układów jest przedstawiony na rysunku 5. Zapewnia on łatwą wymianę pożywki oraz wzrost keratynocytów na granicy faz tkanka - atmosfera gazowa.

Skóra wyhodowana *in vitro* była poddawana szczegółowej analizie: badano jej ultrastrukturę, właściwości kinetyczne, biochemiczne i funkcjonalne. Stwierdzono, że podczas hodowli konstrukcja ta podlega stopniowemu przejściu od fenotypu "hodowlanego" do organotypowego, określonego przez zmiany zawartości keratyny, biosyntezę lipidów, organizację morfologiczną i funkcje. Czas przejścia do końcowej, funkcjonalnej charakterystyki może być zmieniany przez warunki hodowli [3, 11, 29].

Jak dotąd główne różnice LSE w stosunku do naturalnej, dojrzałej skóry ludzkiej, to:

pod względem biochemicznym: obecność pewnych typów keratyn (K6, K16) związanych ze stadiami hiperproliferacyjnymi nabłonka i keratyny K19 występującej w preparowanej sztucznie skórze, a nie występującej w naturalnej; wysoka zawartość lipidów oraz wyższa zawartość trójglicerydów związana z nienormalnymi przemianami lipidów (jako wynik obecności rozpuszczalnych w lipidach składników surowicy); obecność tenascyny w matryksie (w dojrzałej skórze ludzkiej występuje jedynie w tkance podskórnej) [11];

pod względem morfologicznym: nieciągła błona podstawna, nie w pełni wykształcona warstwa zrogowaciała;



Rys. 4. Etapy prowadzące do organotypowej hodowli skóry: 1 – pierwotna hodowla keratynocytów; 2 – pierwotna hodowla fibroblastów; 3 – kolagen; 4 – hodowla fibroblastów w kolagenie; 5 – przeniesienie komórek nabłonkowych na hodowlę fibroblastów w kolagenie; 6 – organotypowa hodowla skóry

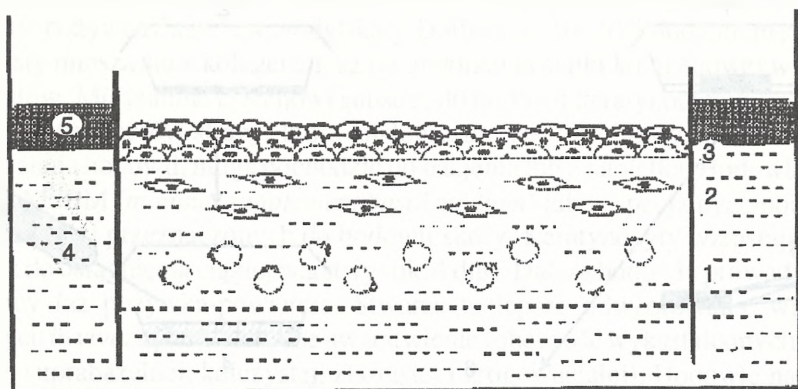
pod względem funkcjonalnym: większa i gwałtowniejsza przepuszczalność dla różnych związków (dla niektórych, jak np. testosteron, LSE symuluje mechanizmy występujące w naturalnej skórze), w tym prawie trzydziestokrotnie wyższa przepuszczalność dla wody niż rutynowo obserwowana dla skóry ludzkiej [9, 13].

Dane te wskazują, że podczas gdy zachowana jest prawidłowa morfologia i wiele składników pojawia się w odpowiednim miejscu i w odpowiedniej ilości, sztuczna skóra wciąż nie jest w pełni funkcjonalna. Dalsze modyfikacje środowiska fizycznego, kontrola wilgotności, a także zmiany dotyczące pożywki mogą doprowadzić w przyszłości do osiągnięcia pełnej funkcjonalności.

LSE wykazuje bardzo duże podobieństwo do świeżo gojącego się nabłonka i cienkich przeszczepów skóry. Sugeruje to, że obserwowane różnice nie są artefaktem, lecz są związane z naturalnym procesem regeneracji tkanki [3, 29, 31].

III.2. Zastosowanie LSE w transplantologii

W próbach klinicznych złożone przeszczepy skóry są atakowane przez bakterie i enzymy (główne zagrożenie to kolagenaza), niebezpieczne i trudne do wykrycia są także wewnątrzprzeszczepowe infekcje. W rezultacie całkowite przyjęcie ocenia się na 50% transplantacji. Dalsze badania idą w kierunku ulepszenia przylegania przeszczepu do rany, wrastania fibroblastów i przyczepiania się keratynocytów. Bada się także możliwość lokalnego stosowania czynników przeciwbakteryjnych [48].



Rys. 5. Układ doświadczalny do organotypowej hodowli skóry: 1 – komórki tłuszczowe w żelu kolagenowym; 2 – fibroblasty w żelu kolagenowym; 3 – keratynocyty na żelu kolagenowym; 4 – żel kolagenowy; 5 – pożywka płynna

IV. WYKORZYSTANIE HODOWLI NASKÓRKA I SKÓRY JAKO MODELI DO BADAŃ

Drugą bardzo ważną cechą hodowli komórkowych i organotypowych, także hodowli naskórka i skóry, jest możliwość wykorzystania ich jako modeli do najróżniejszych badań i testów. Dostarcza to nowych wiadomości i wskazówek o fizjologii skóry i w konsekwencji prowadzi do dalszego udoskonalania metod hodowli.

IV.1. Naskórek wyhodowany *in vitro*

Podjęto badania mające na celu wyjaśnienie, kiedy i jakie czynniki wpływają na różnicowanie i uwarstwianie się keratynocytów. Jest to ważne z punktu widzenia celu, który zamierza się osiągnąć: czy jak największą wydajność, czy też regularne, uwarstwione struktury przeznaczone do przeszczepów. Stwierdzono, że czynnikiem limitującym może być wielkość substratu, kiedy kontakt z substratem jest ograniczony, hamowana jest synteza DNA i stymulowana jest ekspresja inwolukryny (markera różnicowania ludzkich keratynocytów) [45, 51]. Również wielkość i kształt komórek mogą wpływać na proliferację i różnicowanie w warunkach, gdy powierzchnia substratu jest ograniczona (na błonie podstawnej lub plastiku), komórki większe mają mniejszy obszar powierzchni włączonej w adhezję komórka-substrat niż mniejsze komórki [43]. Zmniejszenie proporcji powierzchni błony włączonej w adhezję z substratem może prowadzić do zmniejszenia ilości receptorów i wymigrowywania z warstwy podstawnej. Z kolei uwarstwianie hodowli można regulować przez stężenie jonów wapniowych [17, 44]. W niskich (0,1 mM) stężeniach wapnia keratynocyty formują pojedynczą warstwę, w wyższych (1,2 mM) uwarstwiają się w ciągu 24

godzin. Wykazano, że jest to związane z reorganizacją składników desmosomalnych [46]. Po dodaniu wapnia glikoproteiny i białka łącz komórkowych zaczynają się pojawiać na brzegu komórki. Stratyfikacja pojawia się w wyniku załamania się desmosomów na powierzchniach lateralnych i odtwarzaniu na powierzchniach kontaktu pomiędzy komórkami bazalnymi i suprabazalnymi, a nie przez przeorganizowanie istniejących desmosomów. Badania ilości i rozmieszczenia aktyny i związanych z nią białek (gelsolina, winkulina, talina, α -aktylina) wykazały istotne różnice w komórkach poszczególnych warstw [21]. Ostatnio pojawiły się również doniesienia o możliwości hodowania komórek mieszków włosowych. Dotąd przeszczepy wyhodowane *in vitro* pozbawione były zarówno włosów, jak i gruczołów potowych i łojowych. Doświadczenia na myszach pokazały, że udaje się utrzymywać przy życiu i namnażać te komórki *in vitro*, a po wszczepieniu przyjmują się i wyrastają z nich normalne włosy [22, 25, 47].

Hodowle komórek naskórka i skóry można także wykorzystać do badań ważnych dla medycyny np. badania kanałów lateralnej dyfuzji w *stratum corneum* za pomocą żółcieni lucyferowej. Barwnik ten znaczy drogi metaboliczne dla ruchu w płaszczynie błony małych cząstek, w tym również o potencjalnej ważności, jak np. leki lub niektóre patogeny [23]. Można także badać mechanizmy adherencji drobnoustrojów mogących wywoływać zakażenia skóry i działanie leków na te drobnoustroje, a także testować nowe leki.

Prowadzenie kokultur komórek skóry również dostarcza istotnych informacji i wskazówek [4, 11, 39, 41]. Rany zamykane substytutami skóry były pierwotnie niepigmentowane. Okazuje się, że przez dodanie melanocytów do hodowli komórek przeszczepianej skóry osiągnięto normalną pigmentację po zagojeniu. Badania laboratoryjne potwierdziły, że nie zróżnicowane keratynocyty kontrolują wzrost, morfologię i ekspresję antygenów melanocytów podczas kontaktu komórka-komórka (melanoma może być w świetle tych badań wynikiem utraty kontaktu melanocytów z nie zróżnicowanymi keratynocytami) [4, 7, 41]. Zaobserwowano również, że keratynocyty wykazują ściśle uorganizowanie w kontakcie z komórkami tłuszczowymi podczas kokulturywacji z preadipocytami [26]. Model naskórka wyhodowanego *in vitro* może być też użyteczny do badania unaczyniania (np. rogówki oka). Opisano doświadczenia wskazujące, że formowanie kapilaropodobnych struktur przez komórki kapilar nabłonka jest zależne od obecności pozakomórkowej macierzy produkowanej przez keratynocyty [27]. Pewien wpływ ma również stopień wilgotności środowiska – w ranach pokrytych adhezywnym poliuretanem rozwój naczyń zachodził w bardziej uporządkowany sposób, a procent całkowitej powierzchni pokrytej przez naczynia był większy niż w ranach suchych, pokrytych suchą gazą i eksponowanych na powietrze [8].

IV.2. Skóra wyhodowana *in vitro*

Odpowiedź biologiczna 2 cm² LSE wykazuje liczne podobieństwa do naturalnej ludzkiej skóry. Można zatem testować różne czynniki chemiczne mogące powodować podrażnienia skóry lub rogówki oka i oceniać ich toksyczność przez badanie zależnego od dawki uwalniania prozapalnych mediatorów: prostaglandyny E2, prostacykliny, interleukiny 1 w porównaniu do znanych "podrażniaczy" jak np. SDS [12]. Można sprawdzać przepuszczalność i mechanizmy przezskórnej absorpcji dla różnych związków chemicznych: wody, kofeiny, hydrokortyzonu, estradiolu, testosteronu, kwasu benzooesowego. Można testować substancje stałe, nierozpuszczalne w wodzie, cieczce, emulsje i kremy miejscowo aplikowane na wyeksponowaną na powietrze powierzchnię. W większości przypadków organotypowe hodowle skóry są bardziej przepuszczalne niż naturalna, dojrzała skóra ludzka [3, 13, 16, 21].

Na tym modelu można porównywać proliferację i różnicowanie prawidłowych i nowotworowo zmienionych komórek, np. komórek linii karcinoma A431, a także wpływ różnych związków na te procesy [20, 30]. Bada się produkty wydzielane przez komórki, ekspresję genów w poszczególnych stadiach rozwoju i wiele różnych czynników [35, 36]. W niektórych krajach LSE zostały dopuszczone zamiast testów wykonywanych dotychczas na zwierzętach, np. w USA do określenia czasu "całkowitego zniszczenia tkanki", która to cecha decyduje o zaliczeniu substancji żrących do określonej grupy zagrożenia podczas transportu (test Corrositex firmy In Vitro International) [14].

LITERATURA

- [1] ASSOULINE M, CHEW SJ, THOMPSON HW, BEUERMAN R. Effect of growth factors on collagen lattice contraction by human keratinocytes. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: 1742–1755.
- [2] BELL E, EHRLICH HP, BUTTLE DJ, NAKATSUJI T. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 1981; **211**: 1052–1054.
- [3] BILBO PR, NOLTE CJM, OLESON MA, MASON VS, PARENTEAU NL. Skin in complex culture: the transition from "culture" phenotype to organotypic phenotype. *J Toxicol-Cut Ocular Toxicol* 1993; **12**: 183–196.
- [4] BOYCE ST, MEDERANO EE, ABDEL-MALEK Z, SUPP AP, DODICK JM, NORDLUND JJ, WARDEN GD. Pigmentation and inhibition of wound contraction by cultured skin substitutes with adult melanocytes after transplantation to athymic mice. *J Invest Dermatol* 1993; **100**: 360–365.
- [5] COMPTON CC, GILL JM, BRADFORD DA, REGAUER S, GALLICO GG, O'CONNOR NE. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. *Lab Invest* 1989; **60**: 600.
- [6] DICKSON FM, LAWRENCE JN, BENFORD DJ. Surfactant-induced cytotoxicity in cultures of human keratinocytes and a commercially available cell line (3T3). *Toxic in Vitro* 1993; **7**: 381–384.

- [7] DONATIEN P, SURLÉVE-BAZEILLE JE, THODY AJ, TAEB A. Growth and differentiation of normal human melanocytes in a TPA-free, cholera toxin-free, low-serum medium and influence of keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1993; **285**: 385–392.
- [8] DYSON M, YOUNG SR, HART J, LYNCH JA, LANG S. Comparison of the effects of moist and dry conditions on the process of angiogenesis during dermal repair. *J Invest Dermatol* 1992; **99**: 729–733.
- [9] ERNESTI AM, SWIDEREK M, GAY R. Absorption and metabolism of topically applied testosterone in an organotypic skin culture. *Skin Pharmacol* 1992; **5**: 146–153.
- [10] FALABELLA R, ESCOBAR C, BORRERO I. Transplantation of *in vitro*-cultured epidermis bearing melanocytes for repigmenting vitiligo. *Acad Dermatol* 1989; **21**: 257–264.
- [11] FLEISCHMAJER R, MacDONALD II ED, CONTARD P, PERLISH JS. Immunocytochemistry of a keratinocyte-fibroblast co-culture. Model for reconstruction of human skin. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 1359–1366.
- [12] GAY RJ, SWIDEREK M, NELSON D, STEPHENS TJ. The living dermal equivalent as an *in vitro* model for predicting ocular irritation. *J Toxicol - Cut Ocular Toxicol* 1992; **11**: 47–68.
- [13] GAY RJ, SWIDEREK M, NELSON D, ERNESTI A. The living skin equivalent as a model *in vitro* for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxic in Vitro* 1992; **6**: 303–315.
- [14] GIBB WW. Oszczędzić króliki i pieniądze. Zatwierdzony test ratuje życie królikom i przynosi korzyści finansowe. *Świat Nauki* 1993; **11**: 116–117.
- [15] GREEN H. Kultury komórkowe w medycynie. *Świat Nauki* 1992; **1**: 20–28.
- [16] GUEINICHE A, PONEC M. Use of human skin cell cultures for the estimation of potential skin irritants. *Toxic in Vitro* 1993; **7**: 15–24.
- [17] HEENEN M, De GRAEF CH, GALAND P. Kinetics of the calcium induced stratification of human keratinocytes *in vitro*. *Cell Prolif* 1992; **25**: 233–240.
- [18] JEDRZEJCZAK W. Przeszczepianie naskórka namnożonego *in vitro*. *Polski Tygodnik Lekarski* 1988; Nr 5: 63: 157–160.
- [19] KAUFMANN R, HAINZL A, STERRY W, ALBERTI S, KLEIN CE. *In vitro* targeting of integrin receptors in human skin xenografts by intravenously applied antibodies. *Arch Dermatol Res* 1994; **286**: 6–11.
- [20] KING I, MELLA SL, SARTORELLI AC. A sensitive method to quantify the terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Exp Cell Res* 1986; **167**: 252–256.
- [21] KUBLER MD, JORDAN PW, O'NEILL CH, WATT FM. Changes in the abundance and distribution of actin and associated proteins during terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 1991; **100**: 153–165.
- [22] LAVKER RM, MILLER S, WILSON C, COTSARELIS G, WEI ZG, YANG JS, SUN TT. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *J Invest Dermatol* 1993; **101** Suppl: 16S–26S.
- [23] MANSBRIDGE JN, KNAPP AM. Penetration of Lucifer yellow into human skin: a lateral diffusion channel in the *stratum corneum*. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 909–914.
- [24] MATOUŠKOVA E, VOGTOVA D, KÖNIGOVA R. A recombined skin composed of human keratinocytes cultured on cell-free pig epidermis. *Burns* 1993; **19**: 118–123.
- [25] MILLER SJ, SUN TT, LAVKER RM. Hair follicles, stem cells, and skin cancer. *J Invest Dermatol* 1993; **100** Suppl: 288S–294S.
- [26] MIYASHITA M, BABA S, SUZUKI H. Localized proliferative effect of preadipocytes on cultured human epidermal keratinocytes. *Acta Derm Venereol* 1992; **72**: 413–417.
- [27] NAKAYASU K, HAYASHI N, OKISAKA S, SATO N. Formation of capillary-like tubes by vascular endothelial cells cocultivated with keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: 3050–3057.
- [28] OLLERT MW, SÖHNCHEN R, KORTING HCH, OLLERT U, BRAUTIGAM S, BRAUTIGAM W. Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* 1993; **61**: 4560–4568.

- [29] PARENTEAU NL, BILBO PR, NOLTE CJM, MASON VS, ROSENBERG M. The organotypic cultures of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology* 1992; **9**: 163–171.
- [30] PONEC M, WEERHEIM A, KEMPENAAR J, BOONSTRA J. Proliferation and differentiation of human squamous carcinoma cell lines and normal keratinocytes: effects of epidermal growth factor, retinoids, and hydrocortisone. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988; **24**: 764–770.
- [31] REGNIER M, CARON D, REICHERT U, SCHAEFER H. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J Pharm Sci* 1993; **82**: 404–407.
- [32] RICE RH, STEINMANN KE, DE GRAFFENRIED LA, QIN Q, TAYLOR N, SCHLEGEL R. Elevation of cell cycle control proteins during spontaneous immortalization of human keratinocytes. *Mol Biol Cell* 1993; **4**: 185–194.
- [33] ROSDY M, PISANI A, ORTONNE JP. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br J Dermatol* 1993; **129**: 227–234.
- [34] ROSDY M. Reconstituted epidermis for testing. Prospekt of the Skinethic Laboratory (Nice - France) Cosmetics and toiletries Manufacture Worldwide 1993; 223–226.
- [35] SANQUER S, ELLER MS, GILCHREST BA. Retinoids and state of differentiation modulate CRABP II gene expression in a skin equivalent. *J Invest Dermatol* 1993; **100**: 148–153.
- [36] SCHAFER IA, KOVACH M, PRICE RL, FRATIANNI RB. Human keratinocytes cultured on collagen gels form an epidermis which synthesizes bullous pemphigoid antigens and 21 integrins and secretes laminin, type IV collagen, and heparan sulfate proteoglycan at the basal cell surface. *Exp Cell Res* 1991; **195**: 443–457.
- [37] SILVER FH, PINS G. Cell growth on collagen: a review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix. *J Long-Term Med Implants* 1992; **2**: 67–80.
- [38] SUGIHARA H, TODA S, MIYABARA S, KUSABA Y, MINAMI Y. Reconstitution of the skin in three-dimensional collagen gel matrix culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991; **27A**: 142–146.
- [39] TODD C, HEWITT SD, KEMPENAAR J, NOZ K, THODY AJ, PONEC M. Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: Effect of ultraviolet radiation. *Arch Dermatol Res* 1993; **285**: 455–459.
- [40] UEDA M, SHIMA T, EBATA K, KANEDA T. Effects of collagen concentration on epithelial differentiation: *in vitro* analysis with a mucosal tissue model. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1993; **13**: 127–133.
- [41] VALYI-NAGY IT, HIRKA G, JENSEN PJ, SHIH IM, JUHASZ I, HERLYN M. Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. *Lab Invest* 1993; **69**: 152–159.
- [42] WALEVI I, MARTIN E, JONAS D, MOHAMADZADEH M, MÜLLER-KLIESER W, KUNZ L, BHAKDI S. Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. *Infect Immun* 1993; **61**: 4972–4979.
- [43] WATT FM. Influence of cell shape and adhesiveness on stratification and terminal differentiation of human keratinocytes in culture. *J Cell Sci* 1987; Suppl **8**: 313–326.
- [44] WATT FM. Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. *J Cell Biol* 1984; **98**: 16–21.
- [45] WATT FM, JORDAN PW, O'NEILL CHH. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Cell Biol* 1988; **85**: 5576–5580.
- [46] WATT FM, MATTEY DL, GARROD DR. Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes. *J Cell Biol* 1984; **99**: 2211–2215.
- [47] WEINBERG WC, GOODMAN LV, GEORGE C, MORGAN DL, LEDBETTER S, YUSPA SH, LICHTI U. Reconstitution of hair follicle development *in vivo*: determination of follicle formation, hair growth, and hair quality by dermal cells. *J Invest Dermatol* 1993; **100**: 229–236.

- [48] WONG L, MUNSTER AM. New techniques in burn wound management. *Intraoperative Problems* 1993; **73**: 363–371.
- [49] YAEGER PC, STILES CHD, ROLLINS BJ. Human keratinocyte growth-promoting activity on the surface of fibroblasts. *J Cell Physiol* 1991; **149**: 110–116.
- [50] YANNAS IV, LEE E, ORGILL DP, SKRABUT EM, MURPHY GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Dev Biol* 1989; **86**: 933–937.
- [51] ZHOU Y, DZIAK E, OPAS M. Adhesiveness and proliferation of epithelial cells are differentially modulated by activation and inhibition of protein kinase C in a substratum-dependent manner. *J Cell Physiol* 1993, **155**: 14–26.

Ewa Marewicz

*Instytut Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego,
Kraków, ul. Czysła 18*

WPROWADZANIE CZĄSTECZEK DO KOMÓREK W DRODZE ODWRACALNEJ PERFORACJI BŁON

LOADING OF CELLS WITH MACROMOLECULES BY REVERSIBLE PERFORATION OF PLASMA MEMBRANE

Włodzimierz KOROHODA, Zbigniew MADEJA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: W artykule przedstawiono możliwości wprowadzania cząsteczek do komórek w drodze odwracalnej perforacji błon. Omówiono metody permeabilizacji błon w wyniku działania: szoku osmotycznego, wirusów, toksyn, substancji syntetycznych, ATP, mechanicznego uszkodzenia błony przez kulki szklane oraz odwracalną internalizację błon przez wywołane siarczanami zaokrąglenie się komórek.

Słowa kluczowe: wprowadzanie makrocząsteczek do komórek, perforacja błon, cytometria obrazowa.

Summary: In the paper are discussed methods of cell loading with macromolecules by reversible perforation of plasma membrane. Cells can be reversibly permeabilized by osmotic shock, viruses, toxins, synthetic substances and ATP. Reversible, mechanical injury of plasma membrane permits introducing macromolecules directly into cytoplasmic matrix whereas cell rounding stimulates fast, bulk endocytosis.

Key words: cell-loading technique, membrane perforation, image cytometry.

Integralność struktury i funkcji błony komórkowej jest warunkiem homeostazy komórkowej i zdolności komórek do regulacji metabolizmu. Wiele często stosowanych testów witalności komórek, takich jak: testy ekskluzji ujemnie naładowanych barwników (zieleń lizaminowa lub błękit trypanu względnie bromek etydyny), a także testów związanych z określaniem wyciekania z cytoplazmy enzymów (np. test z dwuocetanem fluoresceiny) w rzeczywistości sprowadza się do badania funkcji błon

komórkowych. Zniszczenie struktury błony na jej względnie dużym obszarze prowadzi do wyciekania z komórek nukleotydów, enzymów a nawet kwasów nukleinowych. Równocześnie zachodzi niekontrolowany napływ do komórki jonów, przede wszystkim wapniowych, co prowadzi do aktywacji kinaz białkowych i enzymów proteolitycznych, a w końcowym wyniku do lizy komórki. Zewnętrzne stężenie jonów wapniowych (ok. $2 \times 10^{-3} \text{M}$) jest zwykle ok. dziesięć tysięcy razy większe niż ich stężenie w cytoplazmie (ok. 10^{-7}M) [3, 20, 22].

Komórka zachowując integralność błony plazmatycznej broni się przed zbyt wielkimi zmianami w środowisku, mogącymi zakłócić jej funkcje. Obce makrocząsteczki, np. białka, wielocukry lub kwasy nukleinowe, jeśli wnikają do cytoplazmy w drodze endocytozy, pozostają w endosomach, oddzielone błoną od macierzy cytoplazmatycznej. Do macierzy wnikają dopiero produkty degradacji tych makrocząsteczek.

W biologii molekularnej, komórkowej i biotechnologii często spotykamy się z potrzebą wprowadzenia do macierzy cytoplazmatycznej komórki eukariotycznej cząsteczek związków, które do niej normalnie nie wnikają. W terapii genowej względnie w inżynierii komórkowej zachodzi potrzeba wprowadzenia do cytoplazmy fragmentów obcego DNA lub RNA i obcych dla komórki białek, pomijając procesy endocytozy. Również w wielu badaniach z zakresu biologii komórki wprowadza się do cytoplazmy białka znakowane fluorescencyjnie, fluorescencyjne wskaźniki stężenia jonów (np. wapniowych, magnezowych, potasowych, wodorowych), względnie fluorescencyjnie znakowane sondy dla mRNA określonych białek [8,9,10,14].

Opracowano wiele rozmaitych metod wprowadzania makrocząsteczek oraz barwników do macierzy cytoplazmy, często z pominięciem endocytozy. Do najczęściej stosowanych należą:

- a) mikroiniekcja za pomocą mikropipet [5,13];
- b) elektro- i ontoforeza i elektroporacja błon – wprowadzanie cząsteczek obdarzonych ładunkiem elektrycznym z wykorzystaniem prądu elektrycznego [7,8];
- c) wprowadzanie barwników, normalnie nie przenikających przez błony, w formie ich acylowych pochodnych; po odszczepieniu łańcuchów acylowych przez wewnątrzkomórkowe esterazy barwniki zostają uwięzione w cytoplazmie;
- d) wprowadzanie makrocząsteczek w kryształach pirofosforanów; po ich wnikięciu do komórki w drodze endocytozy błona endosomu zostaje zniszczona, gdy pod wpływem kwaśnego odczynu po połączeniu endosomów z lizosomami zostają rozpuszczone pirofosforany wapnia i lokalnie wzrasta stężenie jonów wapniowych, a makrocząsteczki wnikają do macierzy cytoplazmy (metoda ta została wykorzystana w badaniach onkogenów);
- e) pułapkowanie cząsteczek w cieniach erytrocytów lub w liposomach i fuzjowanie cieni lub liposomów z komórkami (metody te zostały opisane w artykule M. Michalik w tym tomie);
- f) odwracalna permeabilizacja i perforacja błon komórkowych.

Artykuł niniejszy jest poświęcony metodom wymienionym tutaj jako ostatnie, tzn. metodom związanym z kontrolowaną podczas doświadczenia perforacją błon komórkowych. Metody te są coraz częściej wykorzystywane w rozmaitych badaniach z zakresu biologii komórki, genetyki i biotechnologii. Odnaczają się prostotą, wymagają bardzo mało czasu i mogą być stosowane z powodzeniem do wprowadzania zarówno barwników i związków o masie od kilkuset do kilku tysięcy Da, jak i makrocząstek o masie od kilkudziesięciu do kilku tysięcy kDa równocześnie do dużej liczby komórek. Ich wadą była trudność określenia ilości substancji wprowadzonej do komórki oraz fakt, że rozmaite komórki tej samej populacji zostają obciążone w różnym stopniu badaną substancją. Ograniczenie to w znacznym stopniu straciło na znaczeniu w ostatnich kilku latach w wyniku wprowadzenia metod obrazowej cytometrii (ang. *image cytometry*) umożliwiającej określenie ilości substancji wprowadzonej do pojedynczych komórek, jeśli badana substancja jest wyznakowana fluorescencyjnie lub ma charakterystyczne maksima absorpcji światła w jego widzialnym zakresie.

I. PERMEABILIZACJA BŁON W DRODZE SZOKU OSMOTYCZNEGO

Wykorzystywanie szoku osmotycznego do wprowadzania do komórek substancji, które normalnie nie przenikają przez błony, należy do najstarszych metod permeabilizacji błon. Już w 1978 r w pracowni Pardee [4] wykazano, że komórki BHK 21/c13 można uczynić odwracalnie przepuszczalnymi dla nukleotydów i błękitu trypanu przez inkubację w hipertonicznym środowisku, w pożywce Eagle'a MEM (*minimal essential medium*) bez surowicy, zawierającej 4,2 g NaCl w 100 ml płynu (pięć razy więcej niż w normalnej pożywce). W tych warunkach po 40–50 min w 37°C ok. 95% komórek było zabarwionych błękitem trypanu. W komórkach tych zachowana była synteza DNA i RNA. W obecności hydroksymocznika następowało zahamowanie syntezy DNA, którą można było przywrócić dodając znakowanych trytem deoksynukleotydów. Także trifosforan arabinozydu cytozyny nie wnikał do komórek w kontrolnych warunkach, natomiast hamował syntezę DNA i zabijał komórki permeabilizowane. Komórki inkubowane w środowisku hipertonicznym po przeniesieniu do izotonicznego środowiska uszczelniały swe błony i były zdolne do podjęcia wzrostu.

Środowisko hipertoniczne wykorzystywano także do wprowadzania białek do komórek BHK 21, mysich fibroblastów i komórek mysiej erytroleukemii. Inkubując komórki w hipertonicznym płynie z glicerolem (1,2 M), a następnie w płynie z L-lizofosfatydylocholiną (75 µg/ml) można było wprowadzić do komórek peroksydazę z chrzanu (45 kDa), toksyny dyfterytu (21 kDa) i przeciwciała przeciwko

antygenom SV 40T. Wcześniejsza inkubacja komórek w hipertonicznym roztworze glicerolu wg Nomury i wsp. [19] chroniła komórki przed zniszczeniem podczas trwającej 10 minut inkubacji w obecności lizofosfatydylocholino i wprowadzanych do komórek białek. Około 20% komórek tak permeabilizowanych i zabarwionych błękitem trypanu okazywało się zdolnymi do podjęcia wzrostu po przeniesieniu do warunków kontrolnych.

II. PERFORACJA BŁON PRZEZ WIRUSY, TOKSYNY I SUBSTANCJE SYNTETYCZNE

Najczęściej stosowanym wirusem do perforacji błon jest wirus Sendai, wykorzystywany także do fuzjowania komórek. Stosowane są również niektóre paramyxowirusy, wirus choroby Newcastle, wirusy grypy. Spośród toksyn często stosowane są toksyny gronkowca złocistego, toksyny z *Entamoeba histolytica* wywołującej czerwonkę oraz toksyna wytwarzana przez pszczoły – melittina [1, 11,12,-17,18]. Z syntetycznych związków wykorzystuje się poli-L-lizynę, detergenty (np. Triton X 100), nystatynę (tę ostatnią tylko do komórek zwierzęcych zawierających w błonach związki sterolowe). Wymienione powyżej czynniki używane są zazwyczaj do wprowadzania do komórek barwników o masie poniżej 1 kDa w środowisku o niskim stężeniu jonów wapniowych (poniżej 10 μM). Przeniesienie komórek do płynów zawierających jony wapniowe w stężeniu 0,5–2 mM hamuje perforację błon i powoduje ich uszczelnienie [20].

III. PERMEABILIZACJA BŁON PRZEZ POZAKOMÓRKOWY ADENOZYNOTRIFOSFORAN (ATP)

Jednym z fizjologicznych czynników umożliwiających permeabilizację błon jest pozakomórkowy ATP⁴⁻ (2 mM) w środowisku zasadowym (pH 8–8,5) w temperaturze 37°C. W tych warunkach do cytoplazmy, np. makrofagów, wnikają fluorescencyjne barwniki, np. żółcień lucyferowa i Fura-2 (831 Da). Dziesięciominutowa inkubacja wystarcza do obładowania komórek wymienionymi barwnikami, a komórki te po przeniesieniu do pożywki kontrolnej zachowują pełną żywotność [15,21,26,27]. Jak donieśli Sit i wsp. [24,25], pozakomórkowy ATP może wywoływać odwracalne zaokrąglenie się ludzkich hepatocytów, czemu towarzyszą zmiany przepuszczalności błon plazmatycznych dla elektrolitów. Efekt ATP na kształt komórek okazał się zależny od kinazy białkowej C i mógł być hamowany przez staurosporynę.

IV. ODWRACALNA INTERNALIZACJA BŁON PRZEZ WYWOŁANE SIARCZANAMI ZAOKRĄGLANIE SIĘ KOMÓREK

W obecności jonów SO_4^{2-} następuje zaokrąglanie się komórek i odrywanie się ich od podłoża. Towarzyszy temu wzrost stężenia 1,2-diacylglicerolu (DAG) i 1,4,5-trifosforanu inozytoli (IP_3), wzrost aktywności kinazy białkowej C (PKC), wzrost pH cytoplazmy (alkalizacja) oraz gwałtowna internalizacja błon [2, 23]. Gwałtowna endocytoza prowadzi do internalizacji podczas kilku minut dużej ilości fluorescencyjnie znakowanych makromolekuł o masie 2 MDa i większej. Metoda ta, opracowana w latach dziewięćdziesiątych, wciąż jest udoskonalana i prawdopodobnie w połączeniu z pułapkowaniem makromolekuł w kryształach pirofosforanu wapnia będzie wykorzystywana do wprowadzania do macierzy cytoplazmatycznej dużych fragmentów DNA i dużych białek.

V. ODWRACALNA PERFORACJA BŁON PRZEZ MECHANICZNE USZKADZANIE

Podczas odrywania komórek od podłoża stałego, szkła lub plastyku zarówno za pomocą enzymów (trypsyny, pronazy lub kolagenazy), jak i mechanicznego odrywania gumą silikonową (tzw. ang. *rubber police-man*) z komórek wyciekają jony, aminokwasy i nukleotydy [6]. Zjawisko to wykorzystano do wprowadzania do komórek makromolekuł przez mechaniczne wywoływanie "ran" w błonach plazmatycznych komórek. McNeil i współpracownicy wykorzystali to zjawisko do wprowadzania makrocząsteczek do komórek podczas ich odrywania od podłoża gumą silikonową [16]. Później autorzy ci udoskonalili tę metodę i perforowali komórki nadal przyłączone do podłoża stałego wykorzystując kulki szklane, takie jakich używa się jako nośników do hodowli komórek prawidłowych w biotechnologii (por. art. J. Drukały i J. Sroki w tym tomie). Stosując kulki o średnicy 450 μm można było wprowadzać do komórek barwniki fluorescencyjne. Do określenia wydajności perforacji i wielkości porów w błonie wykorzystuje się znakowane fluorescencyjnie dekstrany o znanych masach cząsteczkowych. Stosując tę metodykę wykazano, że można było obładowywać komórki dekstranem o masie 150 kDa zachowując pełną żywotność komórek [16]. Autorzy tego krótkiego przeglądu stosują tę metodę do wprowadzania makromolekuł do komórek podczas ćwiczeń ze studentami, wykorzystując przy tym rozmaite komórki rosnące na podłożach stałych. Jak stwierdziliśmy, metoda ta pozwala na obładowanie komórek (nawet komórek nabłonkowych, do których trudno wprowadzać makromolekuły innymi metodami) aktywnie znakowaną fluorescencyjnie i różnymi barwnikami nie wnikającymi do komórek

w warunkach kontrolnych. Wadą tej metody, umożliwiającej szybkie obładowanie całych populacji komórek w hodowli badanymi makrocząsteczkami, była trudność określenia ilości substancji wprowadzanych do pojedynczych komórek i duże różnice w stopniu obładowania między poszczególnymi komórkami. Ograniczenie to stało się w ostatnich dwóch latach mało istotne, gdyż techniki obrazowej cytometrii umożliwiły równoczesne śledzenie wielu komórek i określanie w każdej z nich ilości wprowadzonej substancji względnie ilorazowe określenie badanych substancji fluorescencyjnymi wskaźnikami.

ZAKOŃCZENIE

Wymienione w tym artykule metody prawdopodobnie nigdy nie będą mogły zostać zastosowane w terapii *in vivo*, w przeciwieństwie do metod, w których wykorzystuje się fuzję z proteoliposomami do wprowadzania białek i kwasów nukleinowych do określonych komórek w organizmie (por. art. M. Michalik w tym tomie). Jednak ze względu na prostotę i bardzo dużą wydajność, metody odwracalnej perforacji błon mogą okazać się bardzo przydatne w badaniach podstawowych oraz w inżynierii komórkowej wykorzystywanej w biotechnologii. Ograniczenia tych metod, które spowodowały, że nie były one zbyt często wykorzystywane, tracą w ostatnich kilku latach na znaczeniu w wyniku wprowadzania obrazowej cytometrii.

LITERATURA

- [1] BASHFORD CL, ALDER GM, MENESTRINA G, MICKLEM KL, MURPHY JJ, PASTERNAK CA. Membrane damage by haemolytic viruses, toxins, complement and other cytotoxic agents: a common mechanism blocked by divalent cations. *J Biol Chem* 1986; **261**: 9300–9308.
- [2] BAY BH, SIT KH. Cell shape changes induced by sulphate in the Cloudman mouse melanoma cell line. *J Comp Path* 1993; **108**: 2009–213.
- [3] CARAFOLIE. The intracellular homeostasis of calcium: An overview. *Ann NY Acad Sci* 1988; **551**: 147–158.
- [4] CASTELLOT, JJ Jr, MILLER MR, PARDEE AB. Animal cells reversibly permeable to small molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 351–355.
- [5] CELIS JE. Microinjection of somatic cells with micropipettes: Comparison with other techniques. *Biochem J* 1984; **223**: 281–291.
- [6] DELHOTAL B, LEMONNIER F, COUTURIER M, LEMONNIER A. Influence of two cell harvesting methods on intracellular ATP and amino acid concentrations in human fibroblast cultures. *Biochimie* 1983; **65**: 121–125.
- [6] DEUTICKE B, LÜTKEMEIER P, POSER B. Influence of phloretin and alcohols on barrier defects in the erythrocyte membrane caused by oxidative injury and electroporation. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1067**: 111–122.
- [7] ELFERINK JGR, BOONEN GJC, KOSTER BMde. The role of calcium in neutrophil migration: The effect of calcium and calcium-antagonists in electroporated neutrophils. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; **182**: 864–869.

- [8] FECHHEIMER M, BOYLAN JF, PARKER S, SISKEN J, PATEL GL, ZIMMER SG. Transfection of mammalian cells with plasmic DNA by scrape-loading and sonication loading. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;
- [9] FECHHEIMER M, DENNY C, MURPHY RF, TAYLOR DL. Measurement of cytoplasmic pH in *Dictyostelium discoideum* by using a new method for introducing macromolecules into living cells. *Europ J Cell Biol* 1986; **40**: 242–247.
- [10] FORDA SR, GILLIES G, KELLY JS, MICKLEM KJ, PASTERNAK CA. Acute membrane responses to viral action. *Neurosci Lett* 1982; **29**: 237–242.
- [11] GOMPERTS BD, BALDWIN JM, MICKLEM KJ. Rat mast cells permeabilized with Sendai virus secrete histamine in response to Ca buffered in the micromolar range. *Biochem J* 1983; **210**: 737–745.
- [12] JOCKUSCH BM, FÜCHTBAUER A, WIEGAND Ch, HÖNER B. Probing the cytoskeleton by microinjection. In: Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton. JW Shay ed., Plenum Publ Corp New York, 1986, pp. 1–40.
- [13] JOCKUSCH BM, ZUREK B, ZAHN R, WESTMEYER A, FÜCHTBAUER A. Antibodies against vertebrate microfilament proteins in the analysis of cellular motility and adhesion. *J Cell Sci* 199; Suppl 14: 41–47.
- [14] KITAGAWA T. Protein synthesis in transformed 3T3 cells permeabilized by exogenous ATP. *J Cell Physiol* 1980; **322**: 337–351.
- [15] McNEIL PL, WARDER E. Glass beads load macromolecules into living cells. *J Cell Sci* 1987; **88**: 669–678.
- [16] MENESTRINA G. Ionic channels formed by *S. aureus* alpha toxin: voltage dependent inhibition by divalent and trivalent cations. *J Membr Biol* 1986; **90**: 177–190.
- [17] MORGAN BP, CAMPBELL AK. The recovery of human polymorphonuclear leucocytes from sublytic complement attack is mediated by changes in intracellular free calcium. *Biochem J* 1985; **231**: 205–208.
- [18] NOMURA S, KAMIYA T, OISHI M. A procedure to introduce protein molecules into living mammalian cells. *Exp Cell Res* 1986; **163**: 434–444.
- [19] PASTERNAK CA. Effect of pore formers on intracellular calcium. *Cell Calcium* 1986; **7**: 387–397.
- [20] ROZENGURT E, HEPPEL LA. Reciprocal control of membrane permeability of transformed cultures of mouse cell lines by external and internal ATP. *J Biol Chem* 1979; **254**: 708–714.
- [21] SIESJÓ BK. Calcium and cell death. *Magnesium* 1989; **8**: 223–237.
- [22] SIT KH, WONG KP. Sulphate induces very fast cell rounding and detachment. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1092**: 180–183.
- [23] SIT KH, BAY BH, WONG KP. Distinctive uptake of neutral red by mitotic cancer cells. *Biotechnic and Histochemistry* 1992; **67**: 196–201.
- [24] SIT KH, BAY BH, WONG KP. Extracellular ATP induces rapid cell rounding in cultured human Chang liver cells. *Japanese J Physiol* 1992; **42**: 355–362.
- [25] STEINBERG TH, NEWMAN AS, SWANSON JA, SILVERSTEIN SC. ATP⁴⁻ Permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8884–8888.
- [26] WEISMAN GA, DUNN SD, DE BK, KITAGAWA T, FRIEDBERG I. On the role of protein phosphorylation in the ATP-dependent permeabilization of transformed cells. *J Cell Physiol* 1984; **118**: 124–132.

Włodzimierz Korohoda, Zbigniew Madeja
Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej UJ
31-120 Kraków, Al. A. Mickiewicza 3

of the present study, we used a self-report measure of the Big Five personality traits (see below) to assess the personality characteristics of the participants.

The Big Five personality traits are a widely used model of personality that has been shown to be highly reliable and valid (see John & Srull, 1999). The Big Five traits are: extraversion, neuroticism, openness to experience, conscientiousness, and agreeableness.

Extraversion is characterized by a tendency to be outgoing, energetic, and assertive. Neuroticism is characterized by a tendency to be emotionally unstable and prone to negative emotions. Openness to experience is characterized by a tendency to be curious, imaginative, and open to new experiences. Conscientiousness is characterized by a tendency to be organized, responsible, and goal-oriented. Agreeableness is characterized by a tendency to be cooperative, trusting, and helpful.

The Big Five personality traits have been shown to be related to a wide range of psychological and behavioral outcomes (see John & Srull, 1999). For example, extraversion is related to positive affect and social success, neuroticism is related to negative affect and mental health problems, openness to experience is related to intellectual achievement and artistic interests, conscientiousness is related to academic achievement and job performance, and agreeableness is related to positive relationships and prosocial behavior.

In the present study, we used the Big Five Inventory (BFI; John, Srull, & O'Leary, 1994) to assess the Big Five personality traits. The BFI is a self-report measure consisting of 44 items that are rated on a 5-point scale from 1 (not at all) to 5 (very much).

The BFI has been shown to have high internal consistency and test-retest reliability (see John & Srull, 1999). The BFI also has been shown to be highly valid, with scores on the BFI being strongly related to scores on other measures of the Big Five personality traits (see John & Srull, 1999).

In the present study, we used the BFI to assess the Big Five personality traits of the participants. We found that the BFI scores were highly reliable and valid, and that they were strongly related to scores on other measures of the Big Five personality traits.

Overall, the Big Five personality traits are a widely used and well-validated model of personality. The Big Five traits are: extraversion, neuroticism, openness to experience, conscientiousness, and agreeableness. The Big Five personality traits have been shown to be related to a wide range of psychological and behavioral outcomes.

In the present study, we used the Big Five Inventory (BFI) to assess the Big Five personality traits. The BFI is a self-report measure consisting of 44 items that are rated on a 5-point scale from 1 (not at all) to 5 (very much). The BFI has been shown to have high internal consistency and test-retest reliability.

The BFI also has been shown to be highly valid, with scores on the BFI being strongly related to scores on other measures of the Big Five personality traits. In the present study, we found that the BFI scores were highly reliable and valid, and that they were strongly related to scores on other measures of the Big Five personality traits.

WPROWADZANIE MAKROcząSTECZEK DO KOMÓREK PRZEZ FUZJĘ Z LIPOSOMAMI I CIENIAMI ERYTROCYTÓW

INTRODUCTION OF MACROMOLECULES INTO CELLS BY ERYTHROCYTE GHOST MEDIATED FUSION AND LIPOSOME FUSION

Marta MICHALIK

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Przedstawiono metody wprowadzania makrocząstek do komórek, z minimalną degradacją tych cząstek w procesie endocytozy, przez fuzję komórek z cieniami erytrocytów i liposomami. Omówiono metody obładowywania cieni erytrocytów makrocząstkami oraz fuzję tych cieni z komórkami docelowymi. Opisano różne metody wytwarzania sztucznych pęcherzyków fosfolipidowych i pułapkowania w nich aktywnych biologicznie makrocząstek, a także metody wybiórczego wiązania liposomów z komórkami docelowymi, ich skutecznej fuzji z komórkami oraz uwalniania makrocząstek do cytoplazmy. Zaprezentowano zastosowanie obu metod wprowadzania makrocząstek przez fuzję do komórek w hodowlach *in vitro* i *in vivo* oraz perspektywy ich wykorzystania.

Słowa kluczowe: fuzja, cienie erytrocytów, liposomy, wprowadzanie makrocząstek.

Summary: Two methods of introduction of macromolecules into cells, without degradation of molecules by endocytosis, such as red blood cell ghost mediated fusion and liposome fusion were presented. The methods of trapping macromolecules in erythrocyte ghosts and their subsequent fusion with the target cells were discussed. Different methods of making artificial phospholipid vesicles and encapsulation of biologically active molecules as well as methods of preferential binding of liposomes to the target cell, their effective fusion and the liposome delivery of the aqueous contents of the vesicles to the cell cytoplasm have been described. The practical use and future prospects of both methods of fusion mediated delivery of macromolecules into cells *in vitro* and *in vivo* were discussed.

Key words: fusion, erythrocyte ghost, liposome, introduction of macromolecules.

I. WSTĘP

Badania z zakresu biologii molekularnej, biologii komórki i biotechnologii wymagają często wprowadzania makrocząsteczek do cytoplazmy komórek eukariotycznych z minimalną degradacją tych cząsteczek w procesie endocytozy. Dlatego w wielu pracowniach podjęto próby opracowania różnych metod skutecznego wprowadzania do komórek makrocząsteczek. W poprzedzającym artykule W. Korohoda i Z. Madeja przedstawili metody wprowadzania makrocząsteczek wykorzystujące odwracalną perforację błon komórkowych. W tym artykule omówione zostaną metody wykorzystujące fuzje komórek z cieniami erytrocytów i liposomami obciążonymi makrocząsteczkami.

II. WPROWADZANIE MAKROCZĄSTECZEK DO KOMÓREK PRZEZ FUZJE Z CIENIAMI ERYTROCYTÓW

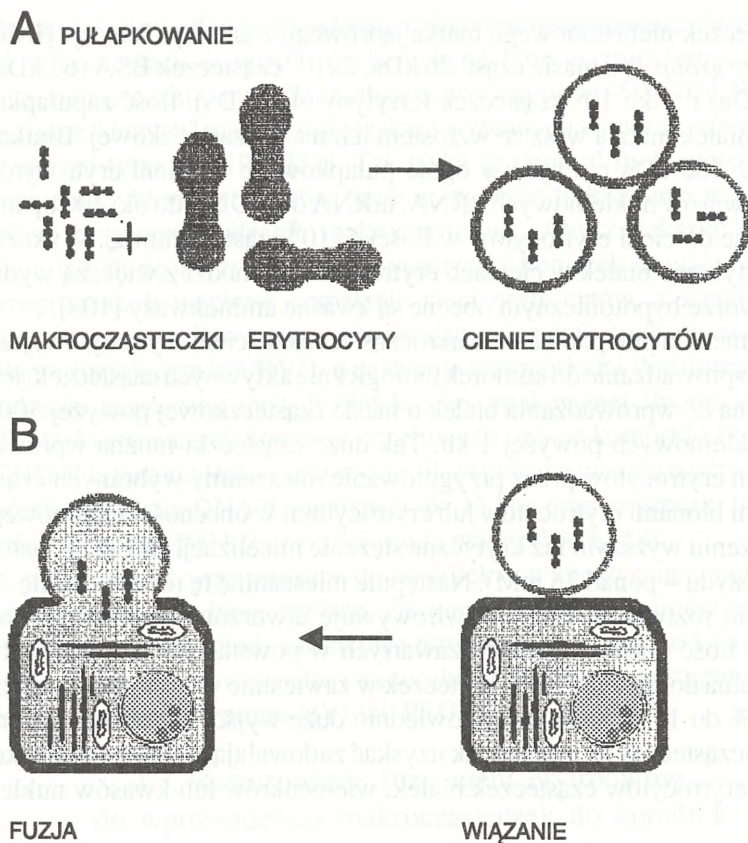
Metodę tę po raz pierwszy zastosował Furusawa i wsp. [25] do wprowadzenia zewnątrzkomórkowych białek (hemoglobiny) do pojedynczych komórek w hodowanej *in vitro* linii owodniowych fibroblastów ludzkich. Autorzy wykazali, że nie mające jąder ani cytoplazmy cienie ludzkich erytrocytów łatwo fuzują z fibroblastami w obecności wirusa Sendai (HVJ). Jak wykazano wcześniej, do cieni erytrocytów ssaków można stosunkowo łatwo wprowadzać cząsteczki różnych białek o masie cząsteczkowej do 180 kDa [46], co wskazuje, że cienie erytrocytów mogą być doskonałym narzędziem do wprowadzania do komórek zewnątrzkomórkowych substancji [25]. Od końca lat siedemdziesiątych zaczęto metodę tę wykorzystywać w wielu pracowniach do wprowadzania rozmaitych makrocząsteczek (białek, wielocukrów, DNA, RNA) do komórek docelowych zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych [7, 58, 71, 92, 108].

Metoda wprowadzania makrocząsteczek do komórek przez fuzje z cieniami erytrocytów obejmuje dwa zasadnicze kroki:

- 1) zamykanie makrocząsteczek we wnętrzu cieni erytrocytów [ang. *entrapping* – pułapkowanie];
- 2) fuzjowanie cieni erytrocytów, z zawartymi w ich wnętrzu makrocząsteczkami, z komórkami docelowymi (rys. 1).

II.1. Zamykanie makrocząsteczek we wnętrzu cieni erytrocytów

Zamykanie makrocząsteczek w cieniach erytrocytów (pułapkowanie) przeprowadza się umieszczając w roztworze hypotonicznym mieszaninę erytrocytów i makrocząsteczek, które mają być wprowadzone do komórek. Zachodzi wówczas hemoliza erytrocytów, w błonach erytrocytów tworzą się pory o średnicy 200–500 Å,



Rys. 1. Schemat wprowadzania makrocząsteczek do komórek za pośrednictwem cieni erytrocytów: A – zamykanie makrocząsteczek we wnętrzu cieni erytrocytów; B – wiązanie cieni erytrocytów z komórkami docelowymi, ich fuzja i uwolnienie makrocząsteczek do macierzy cytoplazmatycznej

hemoglobina jest uwalniana z komórek, a do cieni erytrocytów dyfundują makrocząsteczki obecne w roztworze. Przeniesienie mieszaniny cieni erytrocytów i makrocząsteczek do roztworu izotonicznego powoduje "zasklepienie" cieni erytrocytów z zawartymi w ich wnętrzu makrocząsteczkami [46, 56, 108]. Stężenie makrocząsteczek w cieniach erytrocytów jest wprost proporcjonalne do stężenia tych cząsteczek w roztworze hypotonicznym, przy czym mniejsze cząsteczki są łatwiej pułapkowane niż cząsteczki o większej masie cząsteczkowej. Yamaizumi i wsp. analizując wprowadzanie do cieni ludzkich erytrocytów cząsteczek białek o różnych masach cząsteczkowych wykazali, że cząsteczki ludzkiej immunoglobuliny G (IgG – 150 kDa), albuminy surowicy bydłowej (BSA – 67 kDa) i fragment A toksyny błonicy (20 kDa) były pułapkowane do cieni erytrocytów w stężeniu odpowiednio 33, 50 i 100% stężenia wyjściowego cząsteczek w roztworze [108]. Przy stężeniu zawiesiny

8×10^6 cząsteczek niehistonowego białka jądrowego z grasicy cielęcej (HMG1 –ang. *high mobility group 1*) o masie cząst. 26 kDa, 2×10^6 cząsteczek BSA (67 kDa), 8×10^5 IgG (150 kDa) i tylko 10^5 cząsteczek ferrytyny (450 kDa). Ilość zapałkowanych cząsteczek białek malała wraz ze wzrostem ich masy cząsteczkowej. Białka o masie większej niż 500 kDa nie były w ogóle pałkowane do cieni erytrocytów. Małe cząsteczki kwasów nukleinowych: tRNA, mRNA oraz DNA do ok. 400 bp mogły być wprowadzane do cieni erytrocytów w ilości 5×10^4 cząst./komórkę. Wykazano również, że zamykanie białek w cieniach erytrocytów zachodzi z większą wydajnością, gdy w roztworze hypotonicznym obecne są kwaśne aminokwasy [108].

Opisana metoda pałkowania makrocząsteczek do cieni erytrocytów, jakkolwiek umożliwia wprowadzanie do komórek biologicznie aktywnych cząsteczek, jest jednak mało wydajna do wprowadzania białek o masie cząsteczkowej powyżej 500 kDa lub kwasów nukleinowych powyżej 1 kb. Tak duże cząsteczki można wprowadzać do wnętrza błon erytrocytów przez przygotowanie mieszaniny wybranych cząsteczek z izolowanymi błonami erytrocytów lub erytrocytami w obecności niejonowego detergentu w stężeniu wyższym niż krytyczne stężenie micelizacji (np. przy zastosowaniu oktyloglukozydu – ponad 26 mM). Następnie mieszaninę tę rozcieńcza się 7-krotnie izotonicznym roztworem PBS i odwirowyduje utworzone pęcherzyki błon. W tej preparatyce ilość makrocząsteczek zawartych w powstałych pęcherzykach nie jest proporcjonalna do stężenia tych cząsteczek w zawiesinie wyjściowej i jest zazwyczaj niska, od 3% do 15%. Stosując odpowiednio duże wyjściowe stężenie wprowadzanych makrocząsteczek można jednak uzyskać zadowalające ilości zapałkowanych w cieniach erytrocytów cząsteczek białek, wielocukrów lub kwasów nukleinowych [108].

II.2. Fuzja cieni erytrocytów z komórkami

Fuzjowanie cieni erytrocytów z komórkami docelowymi wywoływano zazwyczaj HVJ (wirusem Sendai) w środowisku o pH 7,0–7,8 [25, 56, 108]. Wykazano, że aby maksymalnie ograniczyć zespalanie komórek docelowych między sobą i uzyskać wysoką skuteczność wprowadzania makrocząsteczek z cieni erytrocytów do komórek, należy tak dobrać stężenie cieni erytrocytów, aby było ono ponad 100 razy większe niż komórek docelowych. Stężenie HVJ (wirusa Sendai) powinno wynosić 500–1000 HAU/ml [56, 108]. W takich warunkach ponad 90% komórek różnego typu ulega fuzjowaniu z cieniami erytrocytów. Jedynie leukocyty nie fuzjują z cieniami erytrocytów w obecności wirusa Sendai, ale zespalanie tych komórek można wywołać glikolem polietylenowym (PEG) lub PEG w połączeniu z poliargininą lub lektyną [108]. Glikol polietylenowy najlepiej stosować w stężeniu ponad 25% [42]. Dobrymi czynnikami wywołującymi fuzje komórek różnych typów z cieniami erytrocytów *in vitro*, okazały się również inne wirusy np. wirus grypy, VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*), SFV (*Semliki Forest Virus*) [116].

W obecności wirusa Sendai lub glikolu polietylenowego można również fuzjować komórki w hodowlach *in vitro* z pęcherzykami błon erytrocytarnych, w których zamknięte są cząsteczki o masach cząsteczkowych powyżej 500 kDa. Pozwala to na wprowadzanie "dużych" makrocząsteczek do wybranych komórek, ale wydajność tej metody wynosi tylko ok. 10% [52]. Tak niska wydajność fuzji spowodowana jest "wypłukaniem" z błon erytrocytów lipidów, podczas traktowania ich niejonowym detergentem przy wprowadzaniu makrocząsteczek. Aby zwiększyć częstotliwość fuzjowania takich pęcherzyków erytrocytarnych i komórek docelowych Kaneda i wsp. przeprowadzili najpierw zespalanie cieni erytrocytów, z zapałkowanymi makrocząsteczkami, z liposomami zawierającymi gangliozydy w swych błonach (czynnikiem fuzującym był HVJ), a następnie z komórkami docelowymi. Uzyskali wprowadzenie cząsteczek dużych białek, np. znakowanej fluorescencyjnie IgM (FITC-IgM) do rozmaitych komórek docelowych (mysie komórki Ltk- i EAT, chomicze CHO-K1, ludzkie HeLa-S3) i wykazali, że opisaną metodą można wprowadzać do komórek cząsteczki DNA do wielkości ok. 15 kbp oraz cząsteczki białek o masie cząsteczkowej ponad 500 kDa z wydajnością prawie 100% [52].

DNA było również wprowadzane do komórek z wykorzystaniem cieni erytrocytów przy zastosowaniu innej metody. Zawiesina DNA była mieszana z cieniami erytrocytów lub erytrocytami, a następnie mrożona i rozmrażana. Utworzone cienie erytrocytów z zawartymi wewnątrz cząsteczkami DNA były następnie fuzjowane z komórkami w obecności wirusa HVJ lub PEG [47].

II.3. Zastosowanie fuzji cieni erytrocytów do wprowadzania makrocząsteczek do komórek

W drodze fuzji cieni erytrocytów z komórkami docelowymi różne makrocząsteczki (najczęściej białka) są wprowadzane do wielu typów komórek. Wprowadzanie do komórek odpowiednio znakowanych białek umożliwiło badanie funkcji i lokalizacji wielu wewnątrzkomórkowych składników komórki, stabilności białek wewnątrz komórki oraz wewnątrzkomórkowego mechanizmu transportu niektórych białek. Yamaizumi i wsp. wykorzystali tę metodę, aby wykazać wewnątrzkomórkową neutralizację aktywności enzymatycznej fragmentu A toksyny błonicy przez przeciwciała przeciwko temu fragmentowi A [108]. Doxsey i wsp. badali funkcje klatryny, wprowadzając do komórek CV-1, w drodze fuzji cieni erytrocytów z tymi komórkami, monoklonalne przeciwciała przeciw klatrynie. Wykazali, że białko to w komórkach CV-1 jest zaangażowane w procesie endocytozy, zarówno w endocytozie receptorowej jak i endocytozie fazy płynnej [16]. W pracowni T. Uchidy wykorzystywano wprowadzanie do komórek za pośrednictwem cieni erytrocytów białek jądrowych, takich jak neoplazmina lub niehistonowe chromosomowe białko z wątroby szczura względnie HMG1 z grasicy cielejcej do badania mechanizmu transportu tych białek. Wykazano, że wprowadzona do cytoplazmy komórek ssaków w hodowli *in vitro*

jądrowa neoplazmina z oocytów ropuchy afrykańskiej *Xenopus leavis* jest aktywnie transportowana do jąder tych komórek [107].

Najważniejsze zalety przedstawionej metody wprowadzania makrocząsteczek do komórek poprzez fuzje z cieniami erytrocytów to prosta metodyka nie wymagająca skomplikowanej aparatury, możliwość równoczesnego wprowadzania makrocząsteczek do wielu rodzajów komórek *in vitro* oraz łatwość ilościowych badań i standaryzacji jednostkowych porcji wprowadzanych makrocząsteczek.

III. WPROWADZANIE MAKROCZĄSTECZEK DO KOMÓREK PRZEZ FUZJE Z LIPOSOMAMI

Druga metoda, która umożliwia wprowadzanie makrocząsteczek do komórek za pośrednictwem fuzji, wykorzystuje sztuczne pęcherzyki fosfolipidowe, tzw. liposomy. Chociaż liposomy, zarówno jedno (ang. *small unilamellar vesicles* – SUV), jak i wielowarstwowe (ang. *multilamellar vesicles* – MLV), od dawna były wykorzystywane do badań struktury i funkcji błon plazmatycznych [73], nie umiano ich skutecznie wykorzystywać do pułapkowania makrocząsteczek. Dopiero wprowadzenie z końcem lat siedemdziesiątych metod wytwarzania dużych liposomów (ang. *large unilamellar vesicles* – LUV) o średnicy 0,2–4,0 μm , w których hydrofilowe wnętrze otoczone jest jedną błoną lipidową, dało możliwość wykorzystania ich do wprowadzania do komórek makrocząsteczek w biologicznie aktywnej formie, zarówno do komórek w hodowlach *in vitro*, jak i *in vivo* [14, 22, 23, 41, 69, 80].

Metoda wprowadzania do komórek makrocząsteczek za pośrednictwem liposomów wymaga:

- 1) skutecznego wprowadzenia makrocząsteczek (genów) do liposomów, tzw. pułapkowania makrocząsteczek, bez utraty ich aktywności biologicznej [ang. *encapsulation*],

- 2) wybiórczego związania liposomów z komórkami docelowymi,

- 3) zachodzącej z wysoką wydajnością fuzji liposomów z komórkami docelowymi i uwolnienia wprowadzanych makrocząsteczek do cytoplazmy komórki docelowej, a gdy wprowadzanymi makrocząsteczkami są geny:

- 4) dokładnej i efektywnej ekspresji wprowadzonej informacji genetycznej (rys. 2).

III.1. Wprowadzanie makrocząsteczek do liposomów – pułapkowanie

Opracowano kilka odmiennych metod wytwarzania liposomów i pułapkowania w nich makrocząsteczek, przede wszystkim genów, które mają być przenoszone do komórek:

- a) metoda dializy detergentu,

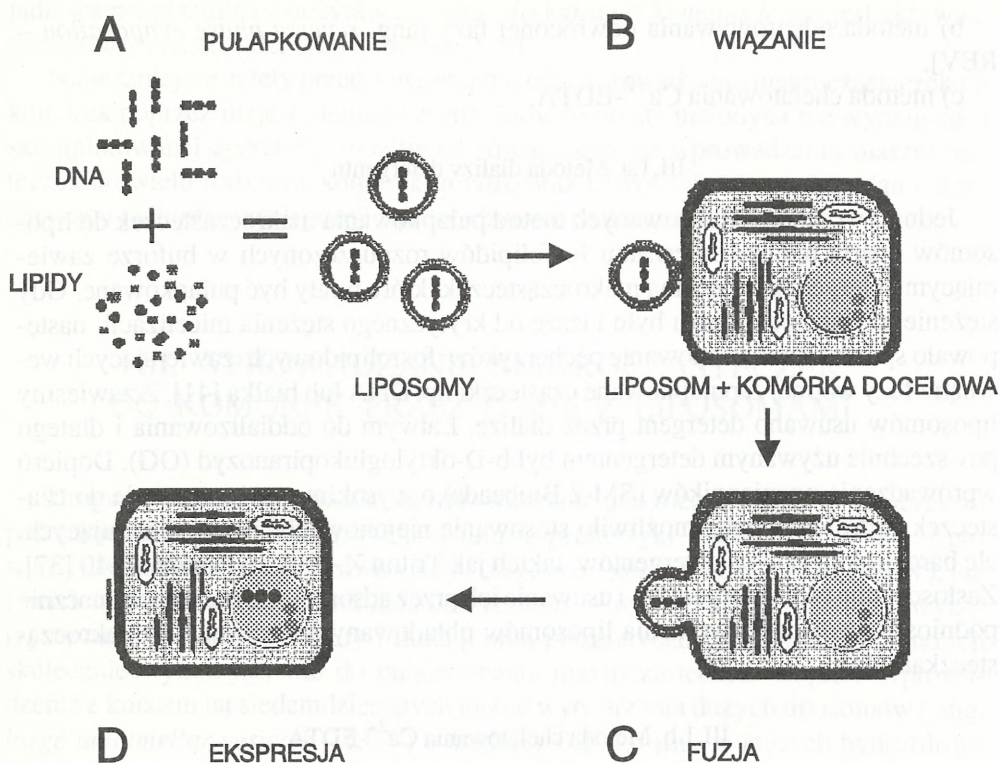
- b) metoda odparowywania odwróconej fazy [ang. *reverse phase evaporation – REV*],
- c) metoda chelatowania Ca^{2+} -EDTA.

III.1.a. Metoda dializy detergentu

Jedną z wcześniej opracowanych metod pułapkowania makrocząsteczek do liposomów oparta była na mieszaniu fosfolipidów rozpuszczonych w buforze zawierającym detergent z zawiesiną makrocząsteczek, które miały być pułapkowane. Gdy stężenie użytego detergentu było niższe od krytycznego stężenia micelizacji, następowało spontaniczne formowanie pęcherzyków fosfolipidowych zawierających wewnątrz fazy wodnej zapułpkowane cząsteczki np. DNA lub białka [41]. Z zawiesiny liposomów usuwano detergent przez dializę. Łatwym do oddializowania i dlatego powszechnie używanym detergentem był b-D-oktyloglukopiranozyd (OG). Dopiero wprowadzenie wymienników (SM-2 Biobeads) o wysokim powinowactwie do cząsteczek hydrofobowych umożliwiło stosowanie niejonowych, źle się dializujących, ale bardzo skutecznych detergentów, takich jak Triton X-100 czy Nonidet P-40 [37]. Zastosowanie tych detergentów i usuwanie ich przez adsorpcję na nośnikach znacznie podniosło wydajność tworzenia liposomów obciążonych związanymi makrocząsteczkami [66].

III.1.b. Metoda chelatowania Ca^{2+} -EDTA

Inną metodę pułapkowania makrocząsteczek opracował Papahadjopoulos i wsp. [82]. Autorzy ci zawiesinę cząsteczek fosfatydyloseryny (ujemnie naładowanych fosfolipidów) w wodnym roztworze NaCl poddawali działaniu ultradźwięków. Powstawały wówczas kuliste, małe pęcherzyki fosfolipidowe, o średnicy 200–500 Å. Po dodaniu jonów Ca^{2+} (w stężeniu 10 mM), w wyniku interakcji ujemnie naładowanych fosfolipidów z jonami Ca^{2+} tworzyły się owalne pęcherzyki z hydrofilowym wnętrzem otoczone jedną dwuwarstwową błoną lipidową, które ulegały agregacji i fuzji tworząc ze sferycznych pęcherzyków duże (200–1000 nm), wielowarstwowe struktury o cylindrycznym kształcie. Struktury te ulegały stopniowo zwijaniu w ślimakowate cylindry lipidowe. Dodanie stężonego roztworu EDTA (150 mM) do tych preparatów powodowało wytworzenie dużych, jednowarstwowych, zamkniętych liposomów (LUV), o średnicy 0,2–4,0 μm. Dodanie zawiesiny makrocząsteczek (DNA, RNA) do roztworu, w którym znajdowały się ślimakowate cylindry lipidowe pozwalało na wbudowywanie tych makrocząsteczek do wnętrza LUV [82]. Takie liposomy z zapułpkowanymi cząsteczkami DNA lub RNA wykazywały większą stabilność niż inne typy liposomów. Stabilność liposomów fosfatydyloserynowych można było jeszcze zwiększyć przez wprowadzenie do błon tych liposomów cholesterolu [22, 23]. Opisana metoda umożliwiła pułapkowanie cząsteczek DNA czy RNA bez utraty ich aktywności biologicznej, ale niestety wydajność jej wynosiła 1–10% [65, 83, 117]. Gould-Fogerite i Mannino wprowadzili modyfikację tej metody [30]. Badacze ci



Rys. 2. Schemat wprowadzania makrocząsteczek do komórek za pośrednictwem liposomów: A – wytwarzanie liposomów i pułapkowanie makrocząsteczek; B – wiązanie liposomów z komórkami docelowymi; C – fuzja liposomów z komórkami docelowymi i uwolnienie wprowadzanych makrocząsteczek do macierzy cytoplazmatycznej; D – skuteczna ekspresja wprowadzonego genu

precypitat wapniowo-fosfolipidowy i materiał, który miał być wprowadzany do utworzonych liposomów (DNA), umieszczali w woreczkach dializacyjnych, które rotowały przez 24 godziny wewnątrz pojemnika wypełnionego buforem z EDTA (10 mM). Stałe mieszanie zawiesiny i swobodny dostęp EDTA do mieszaniny dializowanej metodą rotacyjną pozwoliły na podniesienie wydajności pułapkowania makrocząsteczek do liposomów do ok. 40% [30].

III.1.c. Metoda odparowywania odwróconej fazy

Inną metodę przygotowania liposomów i pułapkowania w nich makrocząsteczek opracowali Szoka i wsp. [102]. Autorzy ci mieszaninę fosfolipidów rozpuszczonych w dużej objętości niepolarnego rozpuszczalnika organicznego (np. isopropyloter, dietyloeter) i zawiesiny makrocząsteczek (DNA) poddawali działaniu ultradźwięków. Następnie rozpuszczalnik organiczny usuwali przez odparowywanie w obrotowym

wyparniku, przy obniżonym ciśnieniu (700–750 mm Hg), w temperaturze 37°C. W tych warunkach powstawały duże, o średnicy 100–500 nm, jedno lub kilkuwarstwowe liposomy z zawartymi w nich cząsteczkami DNA. Zaletą opisanej metody jest możliwość wytwarzania liposomów z mieszaniny różnych fosfolipidów, a nie tylko fosfolipidów o ujemnym ładunku, oraz stosunkowo wysoka wydajność pułapkowania makrocząsteczek, która wynosiła 40–50% [24, 52, 102].

III.2. Wiązanie liposomów z komórkami docelowymi

Drugi etap wprowadzania makrocząsteczek do komórek przez fuzję komórek z liposomami polega na wiązaniu liposomów zawierających biologicznie aktywne makrocząsteczki z komórkami docelowymi. Badania prowadzone na różnych komórkach w hodowlach *in vitro* wykazały, że liposomy zbudowane wyłącznie z lipidów mogą łączyć się z błonami plazmatycznymi komórek docelowych dzięki interakcji fosfolipidów obu rodzajów błon. Wiązanie to jednak zachodzi z bardzo niską wydajnością. Ponadto liposomy wiążą się ze wszystkimi dostępnymi komórkami, nie odróżniając właściwych komórek docelowych [41, 66]. Liposomy wprowadzane *in vivo* poprzez iniekcję do organizmu są szybko usuwane z krwioobiegu przez makrofagi systemu retikuloendotelialnego (RES), co uniemożliwia skuteczne wprowadzanie zapuławkowanych makrocząsteczek do określonego typu komórek w tkance [21, 41]. Dlatego w wielu pracowniach podjęto próby zwiększenia specyficzności wiązania liposomów z błonami komórek docelowych przez:

- a) zmiany składu błon liposomów,
- b) wprowadzanie do błon liposomów cząsteczek, które specyficznie wiążą się z receptorami błon komórek docelowych,
- c) wytwarzanie proteoliposomów (wirosomów).

III.2.a. Zmiany składu błon liposomów

Wiązanie liposomów z błonami komórek docelowych można modyfikować poprzez zmiany składu fosfolipidowego błon liposomów. Wytwarzanie liposomów z fosfolipidów o ładunku dodatnim zwiększa wiązanie tych liposomów z anionową powierzchnią błon większości komórek [78]. Jakkolwiek nie wpływa to na specyficzność wiązania liposom – komórka docelowa, poprawia skuteczność wiązania liposomów z komórkami w hodowlach *in vitro* [18, 57, 64, 120]. Zwiększenie docelowości wprowadzania makrocząsteczek zawartych w liposomach można uzyskać przez wprowadzanie do błon liposomów specyficznych lipidów, które wybiórczo wiążą się z receptorami na błonach komórek. Na przykład hepatocyty i limfocyty śledzionowe mogą łatwo wiązać liposomy mające w dwuwarstwie lipidowej cząsteczki laktozyloceramidu [31].

II.2.b. Wprowadzanie do błon liposomów cząsteczek, które specyficznie wiążą się z receptorami błon komórek docelowych

Zwiększenie specyficzności wiązania liposomów z komórkami docelowymi można uzyskać przez wprowadzenie do błon liposomów odpowiednich przeciwciał mono- lub poliklonalnych [63, 91, 99, 110] lub białkowych ligandów dla powierzchniowych receptorów błon komórek docelowych [29, 32, 43, 50]. Przeciwciała (lub inne białka) mogą być wprowadzane do błon liposomów albo przez wiązanie ich na powierzchni błon już utworzonych liposomów [32], albo przez wbudowanie do błon liposomów podczas ich wytwarzania i pułapkowania makrocząsteczek [38].

Dla zwiększenia specyficzności wiązania liposomów z komórkami docelowymi stosowano także cząsteczki węglowodanów, które dołączano do dwuwarstwy lipidowej liposomów w postaci glikolipidów lub glikosfingolipidów [31, 75, 113]. Wykazano również, że wbudowanie glikolipidów lub polietyleno-glikolowych pochodnych fosfolipidów do błon liposomów powoduje *in vivo* znaczne zmniejszenie wyłapywania tych liposomów przez komórki systemu retikuloendotelialnego [1, 40] i zwiększa wiązanie liposomów z komórkami docelowymi (np. nowotworowymi) w organizmie [86, 118].

Wiązanie liposomów do określonego typu komórek docelowych można zwiększyć przez wprowadzenie do błon liposomów specyficznych ligandów, dla których receptory znajdują się na błonach komórek docelowych [15, 76]. Stavridis i in. użyli transferyny króliczej, aby zwiększyć specyficzność przenoszenia przez liposomy cząsteczek DNA do prekursorowych komórek erytroidalnych, które na błonie komórkowej mają receptory dla transferyny. Cząsteczki transferyny wiązano z błonami liposomów za pomocą DMSI (dimetylosuberimidu) przez wiązanie grup aminowych stearyloaminy z błon liposomów z grupami karboksylowymi transferyny [97]. Wprowadzenie specyficznych ligandów do błon liposomów wymaga czasem uprzedniej modyfikacji tych ligandów. Torchilin i wsp., aby wprowadzić do błon liposomów hydrofilową cząsteczkę α -chymotrypsyny, zwiększali hydrofobowość tego białka przez acylację grup aminowych. Takie zmodyfikowane białko po związaniu z błoną liposomów zachowywało swą aktywność enzymatyczną [76, 106].

III.2.c. Wytwarzanie proteoliposomów (wirosomów)

Znaczne zwiększenie specyficzności wiązania liposomów z komórkami docelowymi osiągnięto, gdy czysto lipidowe liposomy zastąpiono proteoliposomami [11, 41, 66, 108]. Białka izolowane z osłonek wirusów, zwykle glikoproteiny wirusów otoczkowych (wirusa Sendai lub wirusa grypy), które wykazują wysoką aktywność wiązania z błonami komórek zwierzęcych, wprowadzano do błon liposomów, zakotwicząc transmembranowe fragmenty cząsteczek o konformacji α -helisy tych białek w hydrofobowym obszarze dwuwarstwy lipidowej liposomów. Wirusowe białka można wbudowywać do błon liposomów podczas ich wytwarzania metodą dializy detergentu, REV albo chelatowania Ca^{2+} -EDTA. Otrzymane proteoliposomy (nazy-

wane zwykle wirosomami) nie tylko zwiększają specyficzność wiązania liposomów z komórkami docelowymi, ale znacznie zwiększają skuteczność przenoszenia zapułkowanych makrocząstek do komórek, gdyż związane z liposomami wirusowe glikoproteiny odgrywają istotną rolę jako czynnik fuzujący między błonami liposomów i komórek docelowych. Na przykład wirosomy (syntetyzowane metodą dializy detergentu z mieszaniny fosfolipidów, cholesterolu, glikoprotein osłonki wirusa HVJ) zawierające wewnątrz fragment A toksyny błonicy łatwo fuzowały z komórkami docelowymi wprowadzając makrocząsteczkę błonicy do komórek i wywołując śmierć ponad 98% komórek w hodowli *in vitro*. Natomiast syntetyzowane tą samą metodą czysto lipidowe liposomy wprowadzały fragment A toksyny błonicy i wywoływały śmierć zaledwie w 20% populacji komórek, przy użyciu 10-krotnie wyższego stężenia wprowadzanych makrocząstek [109].

III.3. Fuzja liposomów z komórkami docelowymi i wprowadzanie makrocząstek do komórek docelowych

Związanie liposomów z błonami komórek docelowych nie zapewnia jeszcze skutecznego wprowadzania do komórek, transportowanych przez liposomy makrocząstek. Większość małych liposomów (SUV) zaadsorbowanych na błonach komórkowych jest endocytowana przez komórki, ulega fuzji z lizosomami i degradacji przez enzymy lizosomowe. Duże liposomy (LUV) związane z błonami komórek docelowych nie są zwykle endocytowane przez te komórki, natomiast spontaniczne fuzje tych liposomów z komórkami zachodzą bardzo rzadko. Dlatego w wielu pracowniach podjęto próby opracowania metod wydajnego fuzjowania i skutecznego uwalniania makrocząstek do cytoplazmy komórek docelowych. Do stosowanych metod należą:

- a) wykorzystanie związków lizosomotropowych,
- b) stosowanie destabilizujących się liposomów,
- c) stosowanie kompleksów kationowo-lipidowych,
- d) wprowadzanie skutecznych czynników fuzujących.

III.3. a. Wykorzystanie związków lizosomotropowych

Małe liposomy zazwyczaj są endocytowane przez komórki, do których zostały związane. Aby przeciwdziałać trawieniu przez enzymy lizosomowe wprowadzonych do komórek makrocząstek, stosowano preinkubację komórek docelowych ze związkami lizosomotropowymi (np. chlorochina – chloroquine), które hamują aktywność enzymów lizosomowych, zwiększając w ten sposób efektywność fuzji [22, 34].

III.3. b. Stosowanie destabilizujących się liposomów

Zwiększenie skuteczności wprowadzania do komórek zapułkowanych w liposomach cząstek można uzyskać przez wytwarzanie liposomów, które zmieniają

swą stabilność wraz ze zmianą temperatury (liposomy temperaturo-wrażliwe) lub pH środowiska (liposomy pH-wrażliwe) względnie w obecności specyficznych enzymów [40, 41, 81, 120]. Destabilizujące się w zetknięciu z komórką docelową liposomy powodują uwolnienie zawartych w nich cząsteczek do środowiska bezpośrednio otaczającego komórkę, umożliwiając uwolnionej substancji oddziaływanie z błoną komórkową lub wnikanie do komórki docelowej. Liposomy temperaturo-wrażliwe wykorzystywane są do przenoszenia do określonych komórek *in vivo* różnych drobnocząsteczkowych leków, przede wszystkim leków antynowotworowych [44, 45, 81, 105], nie nadają się jednak do wprowadzania do komórek makrocząsteczek. Do przenoszenia makrocząsteczek do komórek docelowych wykorzystuje się natomiast pH-wrażliwe liposomy, które ulegają destabilizacji przy obniżeniu pH. Takie liposomy wytwarzane są zwykle z cząsteczek fosfatydyloetanolaminy i palmitylohomocysteiny, kwasu oleinowego lub diacylobursztynoglicerolu jako małe jednowarstwowe pęcherzyki (SUV), które spontanicznie fuzują z innymi lipidami w niskim pH. Małe pH-wrażliwe liposomy z zapuławkowanymi makrocząsteczkami po związaniu z błoną komórki docelowej są endocytowane i w kwaśnym pH endosomu uwalniają makrocząsteczki do cytoplazmy komórki. Wykorzystywane były do wprowadzania wielu leków, DNA, RNA, kalceiny, FITC dekstranu do różnych komórek *in vitro* i *in vivo* [9, 59, 61, 67, 114].

III.3.c. Stosowanie kompleksów kationowo-lipidowych

Do zwiększenia wydajności wprowadzania do komórek cząsteczek DNA zapuławkowanych w liposomach stosowano różne syntetyczne lipidy kationowe, takie jak lipofektyna (DOTMA) lub lipopoliamina [19, 60] oraz kationowe detergenty (np. czwartorzędowy detergent amonowy) [87]. Najczęściej używana jest lipofektyna, czyli mieszanina w stosunku 1:1 fosfatydyloetanolaminy i kationowego lipidu DOTMA (DOTMA = chlorek N-[-(2,3-dioleiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy). Związki te wprowadzone do błon liposomów (SUV) spontanicznie kompleksują z zawartymi w liposomach cząsteczkami DNA. Wykazano, że kompleksy lipofektyna-DNA mają wysokie powinowactwo do komórek i mogą wywoływać kierunkowe fuzje z błonami komórek w hodowlach, zwiększając uwalnianie DNA do komórek oraz jego ekspresję [5, 19]. Mechanizm wprowadzania zewnątrzkomórkowego DNA do komórek docelowych za pomocą kompleksów kationowo-lipidowych jest nieznan. Wiadomo, że zastosowanie lipofektyny powoduje wielokrotny (nawet stukrotny) wzrost efektywności wprowadzania DNA do komórek w porównaniu z innymi metodami [18, 19].

III.3.d. Wprowadzanie skutecznych czynników fuzyjnych

Duże liposomy związane z błonami komórek docelowych zwykle nie są endocytowane przez te komórki, a spontaniczne fuzje tych liposomów z komórkami zachodzą bardzo rzadko. Stąd konieczność wprowadzania czynnika fuzyjnego.

Najlepszymi czynnikami fuzującymi okazały się wirusy otoczkowe (*enveloped viruses*), które mogą ulegać fuzji z błonami komórkowymi w dwojaki sposób. Wirusy, takie jak SFV [34, 116], VSV [116], wirus grypy [17, 79], po związaniu z powierzchnią komórki są endocytowane i w kwaśnym środowisku pęcherzyka endocytotycznego otoczka wirusowa fuzjuje z błoną pęcherzyka. W przeciwieństwie do tych wirusów paramyksowirusy, takie jak HVJ (wirus Sendai), wiążą się z powierzchnią komórki, a następnie fuzują z błoną plazmatyczną komórki w obojętnym lub lekko zasadowym środowisku [104]. Za fuzję otoczki wirusa z błoną komórkową odpowiedzialne są "sterczące" glikoproteiny otoczki (ang. *spike glycoproteins*). Wprowadzenie tych białek do błon liposomów (stosowanie wirosomów) lub łączenie się wirusów otoczkowych z lipidowymi liposomami umożliwi fuzję liposomów z błonami komórek docelowych i wprowadzenie makrocząsteczek do cytoplazmy komórek. Jednym z białek o dobrze poznanej strukturze, które pośredniczy w fuzji błon, jest hemaglutynina wirusa grypy (HA) [115]. Białko to jest trimerym złożonym z trzech identycznych podjednostek, z których każda zawiera peptyd fuzujący mający wiele hydrofobowych aminokwasów. W każdym monomerze można wyróżnić globularną główkę i fibrylarny trzonek. W obojętnym pH peptyd fuzujący w każdym monomerze zlokalizowany jest w fibrylarnym trzonku w odległości ok. 30 Å od miejsca zakotwiczenia białka do otoczki wirusa. Miejsce wiązania receptorowego białka z błoną komórki znajduje się w każdym monomerze w globularnej głowce, ok. 100 Å od peptydu fuzującego. Po związaniu HA wbudowanej do błony liposomu z receptorem na błonie komórki docelowej następuje zmiana struktury tego białka. Peptydy fuzujące zostają odsłonięte i przesunięte w stronę domeny głowkowej, a równocześnie następuje oddysocjowanie od siebie połączonych dotąd globularnych główek. Następnie zachodzi agregacja kilku trimerów HA i wytworzenie między nimi otworu fuzującego (ang. *fusion pore*). Zaproponowano dwa modele otworów fuzujących. W pierwszym z nich trimery kilku cząsteczek HA otaczających utworzony otwór ustawione są pionowo między błoną liposomu a błoną komórki docelowej. Peptydy fuzujące wyścielają wewnątrz otworu fuzującego i wspomagają mieszanie lipidów obu błon [17, 115]. Drugi zaproponowany model zakłada, że uczestniczące w tworzeniu otworu cząsteczki HA nie są prostopadłe do błon, ale przechylone, a peptydy fuzujące łączą się zarówno z błoną liposomu, jak i błoną komórki docelowej, umożliwiając fuzję obu błon [98, 115]. Po fuzji błony liposomu z błoną komórki docelowej zawartość liposomów zostaje uwolniona do cytoplazmy komórki.

III.4. Wykorzystanie metody wprowadzania makrocząsteczek przez fuzję z liposomami

Jak wykazano w wielu pracowniach, metoda fuzji liposomów z komórkami umożliwia wprowadzanie aktywnych biologicznie makrocząsteczek do rozmaitych komórek zwierzęcych w hodowlach *in vitro* [5, 49, 59, 100], do protoplastów roślin wyższych i grzybów [8, 23, 74]. Jest ona obecnie szeroko stosowana do badań nad

TABELA 1. Wprowadzanie zewnątrzkomórkowych genów do komórek zwierzęcych *in vivo* za pośrednictwem liposomów

Wprowadzany gen	Metoda putapkowania do liposomu	Spółb wiązania z komórką docelową	Organizm docelowy	Komórki docelowe	Rezultat wprowadzenia genu	Lit.
T 7	REV	cząst. laktozylo-ceramidu	myszy Swiss	hepatocyty	34% DNA związane z mitochondriami	[12]
Preproinsulina I	REV		szczury Wistar	komórki wątroby	82% DNA – w komórkach Kupffera	[96]
Preproinsulina I	REV	cząst. laktozylo-ceramidu	szczury Wistar	komórki wątroby	14% DNA – w hepatocytach	[96]
CAT	dializa detergentu	przeciwciało anty-H-2k	myszy BALB/c		31% DNA – w komórkach Kupffera	[114]
Wirus polyoma	chelatowanie Ca ²⁺ - EDTA	glikoproteiny HVJ	dwudniowe myszy		50% DNA – w endotelium aktywność acetylotransferazy choloramfenikolu	[66]
DNA znakowane	dializa detergentu na wymienniczkach	transferyna	króliki	erytroblasty szpiku	guzy nowotworowe; w komórkach – białka T SV40	[97]
Gen ludzkiej insuliny	REV	gangliozydy	szczury	komórki wątroby	DNA w erytroblastach szpiku	[51]
SVT DNA	REV	glikoproteiny HVJ	szczury	komórki nerki	ludzka insulina w surowicy szczurzej	[104]
gen β -galaktozydazy <i>Escherichia coli</i>	REV	glikoproteiny HVJ	szczury	hepatocyty	aktywność β -galaktozydazy w hepatocytach	[53]

wewnątrzkomórkową aktywnością różnych makrocząsteczek: białek, wielocukrów, DNA, RNA [11, 36, 50, 93], do wprowadzania do rozmaitych komórek różnych enzymów, wirusów, czynników transkrypcyjnych lub efektorów allosterycznych [53, 55, 67, 69]. Najczęściej wykorzystywana jest do wprowadzania określonych genów do komórek docelowych i badania ekspresji wprowadzanych genów [18, 72, 85, 101, 103, 120]. Daje też możliwość równoczesnego wprowadzania do tych samych komórek docelowych cząsteczek białek i DNA [51, 53, 104]. Najważniejszą zaletą przedstawionej metody jest możliwość wprowadzania określonych makrocząsteczek do wybranych komórek docelowych *in vivo* [12, 39, 51, 75, 114]. Kilka przykładów skutecznego wprowadzania zewnątrzkomórkowych genów do określonych komórek *in vivo* poprzez fuzje tych komórek z liposomami obciążonymi cząsteczkami DNA przedstawiono w tabeli 1. Wyniki przedstawionych w tabeli prac oraz innych prac z ostatnich lat wskazują na możliwość wprowadzania zewnątrzkomórkowych genów do komórek *in vivo* i skutecznej ich ekspresji w tych komórkach, co daje szansę na zastosowanie liposomów do terapii genowej [101, 104].

Ostatnio wykazano, że liposomy umożliwiają wprowadzanie do komórek nowotworowych chemoterapeutyków (cytostatyków) o działaniu przeciwnowotworowym [28, 55, 90, 94, 111, 112, 121]. W wielu pracowniach za pomocą fuzji z liposomami wprowadzano do rozmaitych komórek *in vitro* oraz do różnych tkanek zwierzęcych *in vivo* antybiotyki (bleomycyna, daunorubicyna, doksorubicyna, mitomycyna) [4, 6, 20, 26, 84], antymetabolity (cytarabina, fluoropirymidyna, merkaptopuryna) [2, 10, 13, 33, 95], związki alkilujące (cisplatyna, chlormetina) [44, 54, 77], produkty pochodzenia roślinnego (winblastyna, paclitaxel) [70, 89, 118] oraz białka: asparaginaza [68], interferon [48, 119], interleukina-2 [3, 62] uzyskując bardzo dobre rezultaty w specyficzności przenoszenia danych związków i skuteczności ich działania na określone komórki. Badania te wskazują na użyteczność liposomów jako przenośników chemoterapeutyków do ludzkich tkanek nowotworowych *in vivo*. Metoda wprowadzania cząsteczek do komórek za pośrednictwem liposomów jest już sprawdzana w próbach klinicznych leczenia pacjentów z chorobą nowotworową [27, 55, 88].

LITERATURA

- [1] ALLEN TM, HANSEN C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1068**: 133–141.
- [2] ALLEN TM, MEHRA T, HANSEN C, CHIN YC. Stealth liposomes: an improved sustained release system for 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1992; **52**: 2431–2439.
- [3] ANDERSON PM, KATSANIS E, SENCER SF, HASZ O, OCHOA AC. Depot characteristics and biodistribution of interleukin-2 liposomes: importance of route of administration. *J Immunother* 1992; **12**: 19–31.

- [4] BALLY MB, NAYAR R, MASIN D, HOPE MJ, CULLIS PR, MAYER LD. Liposomes with entrapped doxorubicin extended blood residence times. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1023**: 133–139.
- [5] BEHR JP, DEMENEIX B, LOEFFLER JP, PEREZ-MUTUL J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:6982–6986.
- [6] BENNIS S, CHAPEY C, COUVREUR P, ROBERT J. Enhanced cytotoxicity of doxorubicin encapsulated in polyisohexylcyanoacrylate nanospheres against multidrug-resistant tumour cells in culture. *Eur J Cancer* 1994; **30A**:89–93.
- [7] BROWN DB, HANKS SK, MURPHY EC, RAO PN. Early initiation of DNA synthesis in G1-phase HeLa cells following fusion with red cell ghosts loaded with S-phase cell extracts. *Exp Cell Res* 1985; **156**:251–259.
- [8] CABOCHE M, LURQUIN PF. Liposomes as a carriers for the transfer and expression of nucleic acids into higher plant protoplasts. *Methods Enzymol.* 1987; **148**: 39–45.
- [9] COLLINS D, LITZINGER DC, HUANG L. Structural and functional comparisons of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacyl-succinylglycerols. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1025**: 234–242.
- [10] COMISKEY SJ, HEATH TD. Leakage and delivery of liposome-encapsulated methotrexate- γ -aspartate in a chemically defined medium. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1024**:307–317.
- [11] CROMMELIN DJA, GRIT M, TALSMA H, ZUIDAM NJ. Liposomes as carriers for drugs and antigens - approaches to preserve their long term stability. *Drug Develop Ind Pharm* 1994; **20**:547–556.
- [12] CUDD A, NICOLAU C. Interaction of intravenously injected liposomes with mouse liver mitochondria. A fluorescence and electron microscopy study. *Biochim Biophys Acta* 1986; **860**:201–214.
- [13] DANIEL PT, HOLZSCHUH J, MULLER CE, ROTH HJ, BERG PA. Inhibition of phytohemagglutinine-induced T lymphocyte proliferation by 6-(octadecyldithio)purine, a novel liposomal prodrug of 6-mercaptapurine. *Arch Toxicol* 1989; **13 (Suppl)**: 179–182.
- [14] DEAMER D, BANGHAM AD. Large volume liposomes by an ether vaporation method. *Biochim Biophys Acta* 1976; **443**: 629–634.
- [15] DIGIULIO A, DANDREA G, SALETTI MA, IMPAGNATIELLO A, DALESSANDRO AM, ORATORE A. The binding of human serum transferrin to its specific receptor reconstituted into liposomes. *Cell Signal* 1994; **6**: 83–90.
- [16] DOXSEY SJ, SAMBROOK J, HELENIUS A, WHITE J. An efficient method for introducing macromolecules into living cells. *J Cell Biol* 1985; **63**:492–504.
- [17] ELLENS H, BENTZ J, MASON D, ZHANG F, WHITE JM. Fusion of influenza hemagglutinin-expressing fibroblasts with glycoporphin-bearing liposomes: role of hemagglutinin surface density. *Biochemistry* 1990; **29**: 9697–9707.
- [18] FELGNER JH, KUMAR R, SRIDHAR CN, WHEELER CJ, TSAI YJ, BORDER R, RAMSEY P, MARTIN M, FELGNER PL. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 1994; **269**:2550–2561.
- [19] FELGNER PL, GADEK TR, HOLM M, ROMAN R, CHAN HW, WENZ M, NORTHROP JP, RINGOLD GM, DANIELSEN M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**:7413–7417.
- [20] FICHTNER I, ARNDT D, RESZKA R, GENS J. Pharmacokinetic behavior of [57 Co]bleomycin liposomes in mice: comparison with the unencapsulated substance. *Anti-Cancer Drugs* 1991; **2**: 555–563.
- [21] FIDLER IJ, KLEINERMAN ES. Clinical application of phospholipid liposomes containing macrophage activators for therapy of cancer metastasis. *Advanc Drug Deliv Rev* 1994; **13**:325–340.

- [22] FRALEY R, PAPAHAJDOPOULOS D. New generation liposomes: The engineering of an efficient vehicle for intracellular delivery of nucleic acids. *Trends Biochem Sci* 1981; **6**:77–80.
- [23] FRALEY R, PAPAHAJDOPOULOS D. Liposomes: The development of a new carrier system for introducing nucleic acids into plant and animal cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1982; **96**:171–191.
- [24] FRALEY R, SUBRAMANI S, BERG P, PAPAHAJDOPOULOS D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem* 1980; **255**:10431–10435.
- [25] FURUSAWA M, NISHIMURA T, YAMAIZUMI M, OKADA Y. Injection of foreign substances into single cells by cell fusion. *Nature* 1974; **249**:449–450.
- [26] GABIZON AA. Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res* 1992; **52**:891–896.
- [27] GABIZON A, CHISIN R, AMSELEM S, DRUCKMANN S, COHEN R. Pharmacokinetic and imaging studies in patients receiving a formulation of liposomes-associated adriamycin. *Brit J Cancer* 1991; **64**:1125–1132.
- [28] GABIZON A, PERETZ T, SULKES A, AMSELEM S, BEN-YOSEF R. Systemic administration of doxorubicin-containing liposomes in cancer patients: a phase I study. *Eur J Can Clin Oncol* 1989; **25**:1795–1803.
- [29] GHOSH P, BACHHAWAT BK. Grafting of different glycosides on the surface of liposomes and its effect on the tissue distribution of 125 I-labelled γ -globulin encapsulated in liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1980; **632**:562–572.
- [30] GOULD-FOGERITE S, MANNINO RJ. Rotary dialysis: its application to the preparation of large liposomes and large proteoliposomes (protein-lipid-vesicles) with high encapsulation efficiency and efficient reconstitution of membrane proteins. *Anal Biochem* 1985; **148**:15–25.
- [31] GROSSE E, KIEDA C, NICOLAU C. Flow cytofluorometric investigation of the uptake by hepatocytes and spleen cells of targeted and untargeted liposomes injected intravenously into mice. *Biochim Biophys Acta* 1984; **805**:354–361.
- [32] HEATH TD. Covalent attachment of proteins to liposomes. *Methods Enzymol* 1987; **149**:111–119.
- [33] HEGE KM, DALEKE DL, WALDMANN TA, MATTHAY KK. Comparison of anti-Tac and anti-transferrin receptor-conjugated liposomes for specific drug delivery to adult T-cell leukemia. *Blood* 1989; **74**: 2043–2052.
- [34] HELENIUS A, MARSH M, WHITE J. Inhibition of Semliki Forest Virus penetration by lysosomotropic weak bases. *J Gen Virol* 1982; **58**:47–61.
- [35] HELENIUS A, MCCASLIN DR, FRIES E, TANFORD C. Properties of detergents. *Methods Enzymol* 1979; **56**:734–749.
- [36] HO RJY, BURKE RL, MERIGAN TC. Disposition of antigen-presenting liposomes *in vivo*. Effect on presentation of Herpes Simplex Virus antigen rgD. *Vaccine* 1994; **12**:235–242.
- [37] HOLLOWAY PW. A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem* 1973; **53**:304–308.
- [38] HOLMBERG E, MARUYAMA K, LITZINGER DC, WRIGHT S, DAVIS M, KABALKA GW, KANNEL SJ, HUANG L. Highly efficient immunoliposomes prepared with a method which is compatible with various lipid compositions. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **165**:1272–1278.
- [39] HOU SM, YU HY. Comparison of absorption of aqueous lidocaine and liposome lidocaine following topical application on rabbit vessels. *J Orthopaed Res* 1994; **12**:294–297.
- [40] HUANG SK, STAUFFER PR, HONG KL, GUO JWH, PHILLIPS TL, HUANG A, PAPAHAJDOPOULOS D. Increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res* 1994; **54**:2186–2191.
- [41] HUG P, SLEIGHT RG. Liposomes for the transformation of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1097**:1–17.

- [42] HUI SW, ISAC T, BONI LT, SEN A. Action of polyethylene glycol on fusion of human erythrocyte membranes. *J Membrane Biol* 1985; **84**:137–146.
- [43] HUTCHINSON FJ, FRANCIS SF, LYLE IG, JONES MN. The characterisation of liposomes with covalently attached proteins. *Biochim Biophys Acta* 1989; **978**:17–24.
- [44] IGA K, HAMAGUCHI N, IGARI Y, OGAWA Y, TOGUCHI H, SHIMAMOTO T. Increased tumor cisplatin levels in heated tumors in mice after administration of thermosensitive, large unilamellar vesicles encapsulating cisplatin. *J Pharm Sci* 1991; **80**:522–525.
- [45] IGA K, OGAWA Y, TOGUCHI H. Heat-induced drug release rate and maximal targeting index of thermosensitive liposomes in tumor-bearing mice. *Pharm Res* 1992; **9**:658–662.
- [46] IHLER GM, GLEW RH, SCHNURE FW. Enzyme loading of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; **70**:2663–2666.
- [47] IINO T, FURUSAWA M, FURUSAWA I, OBINATA M. Transformation of L cells with virus thymidine kinase genes introduced by red cell-mediated microinjection. *Exp Cell Res* 1983; **148**:475–480.
- [48] ISHIHARA H, HARA T, ARAMAKI Y, TSUCHIYA S, HOSOI K. Preparation of asialofetuin-labeled liposomes with encapsulated human interferon-gamma and their uptake by isolated rat hepatocytes. *Pharm Res* 1990; **7**:542–546.
- [49] JARDILLIER JC, COLIN M, BOBICHON H, AKELI MG, DELVINCOURT C, MADOULET C. The multidrug resistance phenotype - morphological and biological features, excluding the efflux pump. *Bull Cancer* 1994; **81**:392–399.
- [50] KAMATA H, YAGISAWA H, TAKAHASHI S, HIRATA H. Amphiphilic peptides enhance the efficiency of liposome-mediated DNA transfection. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**:536–537.
- [51] KANEDA Y, IWAI K, UCHIDA T. Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. *J Biol Chem* 1989; **264**:12126–12129.
- [52] KANEDA Y, UCHIDA T, KIM J, ISHIURA M, OKADA Y. The improved efficient method for introducing macromolecules into cells using HVJ (Sendai Virus) liposomes with gangliosides. *Exp Cell Res* 1987; **173**:56–69.
- [53] KATO K, NAKANISHI M, KANEDA Y, UCHIDA T, OKADA Y. Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. Co-introduction of DNA and nuclear protein by a simplified liposome method. *J Biol Chem* 1991; **266**:3361–3364.
- [54] KHOKHAR AR, WRIGHT K, SIDDIK ZH, PEREZ-SOLER R. Organ distribution of tumor uptake of liposome entrapped cis-bis-neodecanoato trans-R,R-1,2-diaminocyclohexane platinum(II) administered intravenously and into the proper hepatic artery. *Cancer Chemother Pharmacol* 1988; **22**:223–227.
- [55] KIM S. Liposomes as carriers of cancer chemotherapy. Current status and future prospects. *Drugs* 1993; **46**:618–638.
- [56] LEE G, DELOHERY TM, RONAI Z, BRANDT-RAUF PW, PINCUS MR, MURPHY RB, WEINSTEIN IB. A comparison of techniques for introducing macromolecules into living cells. *Cytometry* 1993; **14**:265–270.
- [57] LAPPALAINEN K, URTTI A, JAASKELAINEN I, SYRJANEN K, SYRJANEN S. Cationic liposomes mediated delivery of antisense oligonucleotides targeted to HPV 16 E7 mRNA in CaSki cells. *Antivir Res* 1994; **23**:119–130.
- [58] LEE G, RONAI ZA, PINCUS MR, BRANDT-RAUF PW, MURPHY RB, DELOHERY TM, NISHIMURA S, YAMAIZUMI Z, WEINSTEIN IB. Identification of an intracellular protein which specifically interacts with photo-affinity labelled oncogenic p21 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:8678–8682.
- [59] LEGENDRE JY, SZOKA FC Jr. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm Res* 1992; **9**:1235–1242.
- [60] LEVENTIS R, SILVIUS JR. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1023**:124–132.

- [61] LIUD, HUANG L. pH-sensitive, plasma-stable liposomes with relatively prolonged residence in circulation. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1022**:348–354.
- [62] LOEFFLER CM, PLATT JL, ANDERSON PM, KATSANIS E, OCHOA JB. Antitumor effects of interleukin 2 liposomes and anti-CD3-stimulated T-cells against murine MCA-38 hepatic metastasis. *Cancer Res* 1991; **51**:2127–2132.
- [63] LOUGHREY H, BALLY MB, CULLIS PR. A non-covalent method of attaching antibodies to liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1987; **901**:157–160.
- [64] MAGEE WE, GOFF CW, SCHOKNECHT J, SMITH MD, CHERIAN K. The interaction of cationic liposomes containing entrapped horseradish peroxidase with cells in culture. *J Cell Biol* 1974; **63**:492–504.
- [65] MANNINO RJ, ALLEBACH ES, STROHL WA. Encapsulation of high molecular weight DNA in large unilamellar phospholipid vesicles. *FEBS Lett* 1979; **101**:229–232.
- [66] MANNINO RJ, GOULD-FOGERITE S. Liposome mediated gene transfer. *Bio Techniques* 1988; **6**:682–690.
- [67] MARTIN S, NIEDERMANN G, LEIPNER C, EICHMANN K, WELTZIEN HU. Intracellular processing of hapten-modified protein for MHC class I presentation: cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes. *Immunol Lett* 1993; **37**:97–102.
- [68] MARTINS MB, JORGE JC, CRUZ ME. Acylation of L-asparaginase with total retention of enzymatic activity. *Biochimie* 1990; **72**:671–675.
- [69] MAYER J, WHITCOMB L, COLLINS D. Efficient encapsulation of proteins within liposomes for slow release *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **199**:433–438.
- [70] MAYER LD, BALLY MB, LOUGHREY H, MASIND, CULLIS PR. Liposomal vincristine preparations which exhibit decreased drug toxicity and increased activity against murine L1210 and P388 tumors. *Cancer Res* 1990; **50**:575–579.
- [71] McELLIGOTT MA, DICE JF. Microinjection of cultured cells using red-cell-mediated fusion and osmotic lysis of pinosomes: a review of methods and applications. *Biosci Rep* 1984; **4**:451–466.
- [72] MIDDLETON PG, CAPLEN NJ, GAO X, HUANG L, GAYA H, GEDDES DM, ALTON EFWF. Nasal application of the cationic liposome DC-Chol-DOPE does not alter ion transport, lung function or bacterial growth. *Eur Resp J* 1994; **7**:442–445.
- [73] MOSSA G, ANNESINI MC, DI GIULIO A, DINI L, FINAZZI-AGRO A. Liposomes as bioreactors: transport phenomena in proteoliposomes. [w] Alan R. [red.] *Biological and Synthetic Membranes* 1989; 227–236.
- [74] NAGATA T. Interaction of plant protoplast and liposome. *Methods Enzymol* 1987; **148**:34–39.
- [75] NICOLAU C, SORIANO P, LePAPE A, LONDOS-GAGLIARDID, LEGRAND A, GROSSE E. Liposomes as carriers for gene transfer *in vivo*. *Biol Cell* 1983; **47**:121–130.
- [76] NIEDERMANN G, WEISSIG V, STERNBERG B, LASCH J. Carboxyacyl derivatives of cardiolipin as four-tailed hydrophobic anchors for the covalent coupling of hydrophilic proteins to liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1070**:401–408.
- [77] NISHIMURA Y, ONO K, HIRAOKA M, MASUNAGA S, JO S. Treatment of murine SCC VII tumors with localized hyperthermia and temperature-sensitive liposomes containing cis-platin. *Radiation Res* 1990; **122**:161–167.
- [78] NORRIE DH, PIETROWSKI RA, STEPHEN J. Screening the efficiency of intracytoplasmic delivery of materials to HeLa cells by liposomes. *Anal Biochem* 1982; **127**:276–281.
- [79] NUSSBAUM O, ROTT R, LOYTER A. Fusion of influenza virus particles with liposomes: requirement for cholesterol and virus receptors to allow fusion with and lysis of neutral but not of negatively charged liposomes. *J Gen Virol* 1992; **73**:2831–2837.
- [80] OLSON F, HUNT CA, SZOKA FC, VAIL WJ, PAPAHDJOPOULOS D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 1979; **557**:9–23.

- [81] ONO A, YAMAGUCHI M, HORIKOSHI I, SHINTANI T, UENO M. Calcein release from temperature-sensitive liposome with or without stirring. *Biol Pharmaceut Bull* 1994; **17**:166–168.
- [82] PAPAHAJDOPOULOS D, VAIL WJ, JACOBSON K, POSTE G. Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1975; **394**:483–491.
- [83] PAPAHAJDOPOULOS D, WILSON T, TABER R. Liposomes as vehicles for cellular incorporation of biologically active macromolecules. *In Vitro* 1980; **16**:49–54.
- [84] PAPAHAJDOPOULOS D, ALLEN TM, GABIZON A, MAYHEW E, MATTHAY K. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**:11460–11464.
- [85] PHILIP R, BRUNETTE E, KILINSKI L, MURUGESH D, MCNALLY MA, UCAR K, ROSENBLATT J, OKARMA TB, LEBKOWSKI JS. Efficient and sustained gene expression in primary T- lymphocytes and primary and cultured tumor cells mediated by adeno-associated virus plasmid DNA complexed to cationic liposomes. *Mol Cell Biol* 1994; **14**:2411–2418.
- [86] PHILLIPS NC, STEWARTPHILLIPS J, WANG P. Tumor cell binding and induction of endothelial cell tumoricidal activity *in vitro* by muramyl dipeptide is enhanced by liposomal encapsulation. *J Immunother* 1994; **15**:185–193.
- [87] PINNADUWAGE P, SCHMITT L, HUANG L. Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells. *Biochim Biophys Acta* 1989; **985**:33–37.
- [88] RAHMAN A, TREAT J, ROTH JK, POTKUL LA, ALVORD WG.. A phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of liposome-encapsulated doxorubicin. *J Clin Oncol* 1990; **8**:1093–1100.
- [89] RIONDEL J, JACROT M, FESSI H, PUISEUX F, POTIER P. Effects of free and liposome-encapsulated taxol on two brain tumors xenografted into nude mice. *In Vivo* 1992; **6**:23–27.
- [90] ROBERT J, GIANNIL. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surveys* 1993; **17**:219–252.
- [91] ROMBI G, COSSU F, MELIS G. MAb-labeled liposomes in breast cancer cell targeting. Therapeutics and diagnostic use of polyspecific artificial carriers. [w] Breast Cancer. Biology to Therapy. *Ann New York Acad Sci* 1993; **698**:429–435.
- [92] RONAI Z, WEINSTEIN IB: Identification of a UV-induced transacting protein that stimulates polyomavirus DNA replication. *J Virol* 1988; **62**:1057–1060.
- [93] SEIBICKE S, ZIMMERMANN HP, HAEFFNER EW. Fusion of lipid vesicles with ascites tumor cells and their lipid-depleted variants. Studies with radioactive- and fluorescent-labeled vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1988; **944**:487–496.
- [94] SHIN YS, PAIK EM, AHN YH, KIM BS, KIM YS. Anticancer effect of liposome incorporated with methotrexate and antibody against tumor specific surface antigen of rat hepatoma. *Yonsei Medical J* 1989; **30**:246–255.
- [95] SINGH M, GHOSE T, MEZEI M, BELITSKY P. Inhibition of human renal cancer by monoclonal antibody targeted methotrexate-containing liposomes in an ascites tumor model. *Cancer Lett* 1991; **56**:97–102.
- [96] SORIANO P, DIJKSTRA J, LEGRAND A, SPANJER H, LONDOS-GAGLIARDI D, ROERDINK F, SCHERPHOF G, NICOLAU C. Targeted and nontargeted liposomes for *in vivo* transfer to rat liver cells of plasmid containing the preproinsulin I gen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**:7128–7131.
- [97] STAVRIDIS JC, DELICONSTANTINOS G, PSALLIDOPOULOS MC, ARMENAKAS NA, HADJIMINAS DJ, HADJIMINAS J. Construction of transferrin-coated liposomes for *in vivo* transport of exogenous DNA to bone marrow erythroblasts in rabbits. *Exp Cell Res* 1986; **164**:568–572.
- [98] STEGMANN T, WHITE JM, HELENIUS A. Intermediates in influenza induced membrane fusion. *EMBO J* 1990; **9**:4231–4241.

- [99] SUNAMOTO J, SATO T, HIROTA M, FUKUSHIMA K, HIRATANI K, HARA K. A newly developed immunoliposome – an egg phosphatidylcholine liposome coated with pullulan bearing both a cholesterol moiety and an IgMs fragment. *Biochim Biophys Acta* 1987; **898**:323–330.
- [100] SZELEI J, DUDA E. Entrapment of high-molecular-mass DNA molecules in liposomes for the genetic transformation of animal cells. *Biochem J* 1989; **259**:549–553.
- [101] SZELEI J, VARADI L, MULLER F, ERDELYI F, ORBAN L, HORVATH L, DUDA E. Liposom-mediated gene transfer in fish embryos. *Transgenic Res* 1994; **3**:116–119.
- [102] SZOKA F Jr, PAPAHDJOPOULOS D. Procedure for the preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**:4194–4198.
- [103] TAKESHITA S, GAL D, LECLERC G, PICKERING JG, RIESSEN R, WEIR L, ISNER JM. Increased gene expression after liposome-mediated arterial gene transfer associated with intimal smooth muscle cell proliferation. *In vitro* and *in vivo* findings in a rabbit model of vascular injury. *J Clin Invest* 1994; **93**:652–661.
- [104] TOMITA N, HIGAKI J, KANEDA Y, OGIHARA T. Direct *in vivo* gene introduction into rat kidney. *Nippon Rinsho* 1992; **50**:2874–2878.
- [105] TOMITA T, WATANABE M, TAKAHASHI T, KUMAI K, TADAKUMA T, YASUDA T. Temperature-sensitive release of adriamycin, an amphiphilic antitumor agent, from dipalmitoylphosphatidylcholine-cholesterol liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1989; **978**:185–190.
- [106] TORCHILIN VP, OMEL'YANENKO VG, KLIBANOV AL, MIKHAILOV VI, GOL'DAN-SKII VI, SMIRNOV VN. Incorporation of hydrophilic protein modified with hydrophobic agent into liposome membrane. *Biochim Biophys Acta* 1980; **602**:511–521.
- [107] TSUNEOKA M, IMAMOTO NS, UCHIDA T. Monoclonal antibody against non-histone chromosomal protein high mobility group 1 co-migrates with high mobility group 1 into the nucleus. *J Biol Chem* 1986; **261**:1829–1834.
- [108] UCHIDA T. Introduction of macromolecules into mammalian cells by cell fusion. *Exp Cell Res* 1988; **178**:1–17.
- [109] UCHIDA T, KIM J, YAMAIZUMI M, MIYAKE Y, OKADA Y. Reconstitution of lipid vesicles associated with HVJ (Sendai virus) spikes: Purification and some properties of vesicles containing non-toxic fragment A of diphtheria toxin. *J Cell Biol* 1979; **80**:10–20.
- [110] UYAMA I, KUMAI K, YASUDA T, TAGAWA T, ISHIBIKI K, KITAJIMA M, TADAKUMA T. Improvement of therapeutic effect by using Fab' fragment in the treatment of carcinoembryonic antigen-positive human solid tumors with adriamycin-entrapped immunoliposomes. *Jpn J Cancer Res* 1994; **85**:434–440.
- [111] VAAGE J, BARBERAGUILLEM E, ABRA R, HUANG A, WORKING P. Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer* 1994; **73**:1478–1484.
- [112] VAAGE J, DONOVAN D, LOFTUS T, ABRA R, WORKING P, HUANG A. Chemoprevention and therapy of mouse mammary carcinomas with doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *Cancer* 1994; **73**:2366–2371.
- [113] VAINSTEIN A, RAZIN A, GRAESSMANN A, LOYTER A. Fusogenic reconstituted Sendai virus envelopes as a vehicle for introducing DNA into viable mammalian cells. *Methods Enzymol* 1983; **101**:492–512.
- [114] WANG CY, HUANG L. pH-sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**:7851–7855.
- [115] WHITE JM. Membrane fusion. *Science* 1992; **258**:917–924.
- [116] WHITE J, MATLIN K, HELENIUS A. Cell fusion by Semliki forest, influenza and vesicular stomatitis virus. *J Cell Biol* 1981; **89**:674–679.

- [117] WILSON T, PAPAHAADJOPOULOS D, TABER R. The introduction of poliovirus RNA into cells via lipid vesicles (liposomes). *Cell* 1979; **17**:77–84.
- [118] WOODLE MC, ALLEN TM, MAYHEW E, USTER PS. *In vivo* efficacy of vincristine entrapped in long-circulating liposomes. *Proc Amer Assoc Can Res* 1992; **33**:2672.
- [119] YAGIK, HAYASHI Y, ISHIDA N, OHBAYASHI M, OHISHI N, MIZUNO M, YOSHIDA J. Interferon-beta endogenously produced by intratumoral injection of cationic liposome-encapsulated gene. Cytocidal effect on glioma transplanted into nude mouse brain. *Biochem Mol Biol Int* 1994; **32**:167–171.
- [120] ZHOU XH, HUANG L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine. Characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1189**:195–203.
- [121] ZOU YY, LING YH, VAN NT, PRIEBE W, PEREZSOLER R. Antitumor activity of free and liposome-entrapped annamycin, a lipophilic anthracycline antibiotic with non-cross-resistance properties. *Cancer Res* 1994; **54**:1479–1484.

M. Michalik

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego

Uniwersytetu Jagiellońskiego

31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

HODOWLE ZWIERZĘCYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH JAKO ŹRÓDŁO PEPTYDOWYCH CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH

CULTURES OF TUMOR ANIMAL CELLS AS A SOURCE OF PEPTIDE GROWTH FACTORS

Andrzej KLEIN, Dobromiła CHEĆIÓWNA

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet
Jagielloński

Streszczenie: Peptydowe czynniki wzrostowe, rodzina hormonów pleiotropowych regulujących wzrost i różnicowanie komórek ssaków, są obecnie jednym z najbardziej poszukiwanych produktów biotechnologicznych. Uzyskiwane są najczęściej w drodze rekombinacji genów do komórek bakterii lub drożdży. Jednak nie wszystkie otrzymane tą metodą czynniki mogą być wykorzystane w praktyce, przede wszystkim ze względu na ich nieprawidłową obróbkę potranslacyjną. Alternatywą jest synteza rekombinowanych czynników wzrostowych przez komórki prawidłowe ssaków lub autokrynną produkcja tych peptydów przez zwierzęce lub ludzkie komórki nowotworowe.

Słowa kluczowe: biotechnologia czynników wzrostowych, komórki nowotworowe.

Summary: Peptide growth factors, the family of pleiotropic hormones engaged in the regulation of growth and differentiation of mammalian cells are the most important biotechnology products. The factors are commonly obtained by the recombinant DNA technology using bacterial or yeast cells. However, not all of the bacterial or yeast products may be utilized in practice, mainly considering its incorrect posttranslational maturation process. Alternative is the synthesis of recombinant growth factors by normal mammalian cells or autocrine production of these peptides by tumor animal or human cells.

Key words: biotechnology of growth factors, tumor cells.

Nazwa "czynniki wzrostowe" (ang. *growth factors*) obejmuje liczną grupę poli-peptydów inicjujących w komórkach docelowych swoistą odpowiedź hipertroficzną lub hiperplastyczną [1]. Grupa ta obejmuje dzisiaj ponad trzydzieści różnych zwią-

ków, całkowicie scharakteryzowanych chemicznie. Ze względu na podobieństwo strukturalne lub funkcjonalne wyróżnia się wiele rodzin czynników wzrostowych (tab. 1). Chociaż trudno podać precyzyjną i spójną wewnątrznie definicję dla tak licznej i niejednorodnej strukturalnie grupy związków, wyróżnić można przynajmniej trzy wspólne cechy charakterystyczne:

- plejotropowy (wielokierunkowy) efekt działania,
- konserwatywną ewolucyjnie strukturę,
- określoną sekwencję działania w warunkach fizjologicznych.

Każdy z czynników inicjuje zróżnicowaną, zależną od tkanki docelowej odpowiedź komórkową. TGF β na przykład jest stymulatorem wzrostu komórek mezenchymalnych, inhibitorem wzrostu większości komórek epitelialnych, stymulatorem różnicowania epitelialnych komórek oskrzeli, a inhibitorem różnicowania adipocytów i miocytów [2, 3]. Jedną z istotnych cech charakterystycznych dla peptydowych czynników wzrostowych jest ich niezwykle konserwatywna ewolucyjnie struktura pierwszorzędowa.

Przykładowo, różnice w sekwencji aminokwasowej IGF I dotychczas poznanych przedstawicieli ssaków nie przekraczają 6%, a struktura IGF I człowieka, krowy, świni i świnki morskiej jest identyczna [4]. Poznano wiele przykładów współdziałania czynników wzrostowych w fizjologicznej kontroli wzrostu i różnicowania komórek, ale chyba najlepszym jest udział czynników hematopoetycznych i interleukin w procesie dojrzewania komórek krwi [5]. Podstawowe wiadomości o czynnikach wzrostowych zostały opisane w monografii "Peptydowe czynniki wzrostowe" [6].

Odkrycie czynników wzrostowych i rozwój biochemii tej grupy związków są nierozdzielnie związane z ciągłym doskonaleniem technik hodowli komórek zwierzęcych i ludzkich. Historia hodowli komórek zwierzęcych *in vitro* liczy już ponad 100 lat. Opanowanie hodowli ustalonych linii komórkowych (1952), opracowanie pierwszych syntetycznych pożywek hodowlanych (1955), udane eksperymenty z hodowlą w płynach bezsurowiczych (1965) umożliwiły zastosowanie hodowli tych komórek w procesach biotechnologicznych. Opracowanie wydajnych metod hodowli oraz postęp w dziedzinie konstrukcji bioreaktorów znacznie ułatwiły ich wykorzystanie do produkcji wielu aktywnych biologicznie białek na skalę laboratoryjną i przemysłową [7,8]. Inspiracją dla ciągłego doskonalenia tej dziedziny biotechnologii jest ogromne zapotrzebowanie na szczepionki antywirusowe, przeciwciała, enzymy, hormony czy czynniki wzrostowe dla celów: badawczych, diagnostycznych i terapeutycznych.

Dobrym przykładem jest popyt na czynniki wzrostowe stosowane w terapii trudno gojących się ran i owrzodzeń, głównie w przypadku takich chorób, jak: reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca lub niedokrwienie. Analizy demograficzne wskazują, że stale rośnie populacja ludzi starych, szczególnie narażonych na chroniczne zaburzenia procesu gojenia ran. Częstotliwość owrzodzeń kończyn, jako wynik niewydolności krążenia, wzrasta, a wraz z nią wydłuża się czas pobytu w szpitalu. Wynikłe stąd

TABELA 1. Peptydowe czynniki wzrostowe

Nazwa w języku polskim	Stosowany skrót
Czynnik wzrostu nerwu	NGF
Epidermalny czynnik wzrostowy/transformujący czynnik wzrostowy typu α	EGF/TGF α
Płytkowe czynniki wzrostowe (AA, AB, BB)	PDGFs
Insulino-podobne czynniki wzrostowe	IGFs
Fibroblastyczne czynniki wzrostowe	FGFs
Czynnik wzrostu hepatocytów	HGF
Transformujące czynniki wzrostowe typu β	TGF β s
Czynnik wzrostowy komórek macierzystych	SCF
Czynniki stymulujące wzrost kolonii	CSFs
Erytropoetyna	Epo
Interleukiny	ILs
Czynniki martwicy nowotworu	TNFs

dotatkowe koszty leczenia w Europie i Stanach Zjednoczonych w 1990 r. Technology Management Group szacowało na ponad 400 milionów, a w 1995 r. na ponad miliard dolarów [9]. Nic więc dziwnego, że obecnie działa ponad 100 producentów czynników wzrostowych, z czego 1/3 testuje je klinicznie w procesach odnowy tkanek miękkich.

Czynniki wzrostowe były pierwotnie pozyskiwane na skalę preparatywną (także dla celów handlowych) prawie wyłącznie z homogenatów tkankowych, drogą żmudnej procedury oczyszczania. Ze względu na ogromną aktywność biologiczną czynników wzrostowych rzędu 10^{-12} – 10^{-13} mol/l i związaną z tym ograniczoną syntezę tych związków *in vivo*, uzyskanie miligramowych ilości z tkanek zwierzęcych i ludzkich jest niezwykle trudne i kosztowne. Dlatego obecnie głównym źródłem czynników wzrostowych są hodowle komórkowe, a procedura ich pozyskiwania opiera się na różnych metodach biotechnologicznych.

Czynniki wzrostowe podobnie jak inne biotechnologiczne produkty białkowe mogą być z grubsza zakwalifikowane do trzech kategorii:

- uzyskanych technologią rekombinowanego DNA,
- otrzymanych z hodowli komórek mieszańcowych (ang. *hybridoma*), które powstają w wyniku fuzji komórek homologicznych lub heterologicznych,
- izolowanych z hodowli ciągłych, ustalonych linii komórek prawidłowych lub transformowanych.

Wybór produkowanych obecnie rekombinantowych czynników wzrostowych na podstawie oferty handlowej firm Boehringer Mannheim GmbH i SIGMA przedstawiono w tabeli 2. Ceny uzyskiwanych tą drogą czynników wzrostowych oscylują w zakresie od kilku do kilkuset dolarów za 1 mg i są kilkakrotnie niższe od cen czynników izolowanych z tkanek. Najczęściej do celów biotechnologicznych wykorzystywane są komórki bakterii, przede wszystkim ze względu na stosunkowo niewielkie wymagania hodowlane i wyższą opłacalność procesu technologicznego. Niestety, wiele klonowanych białek zwierzęcych i ludzkich jest niewłaściwie obra-

TABELA 2. Czynniki wzrostowe produkowane w drodze rekombinacji genów

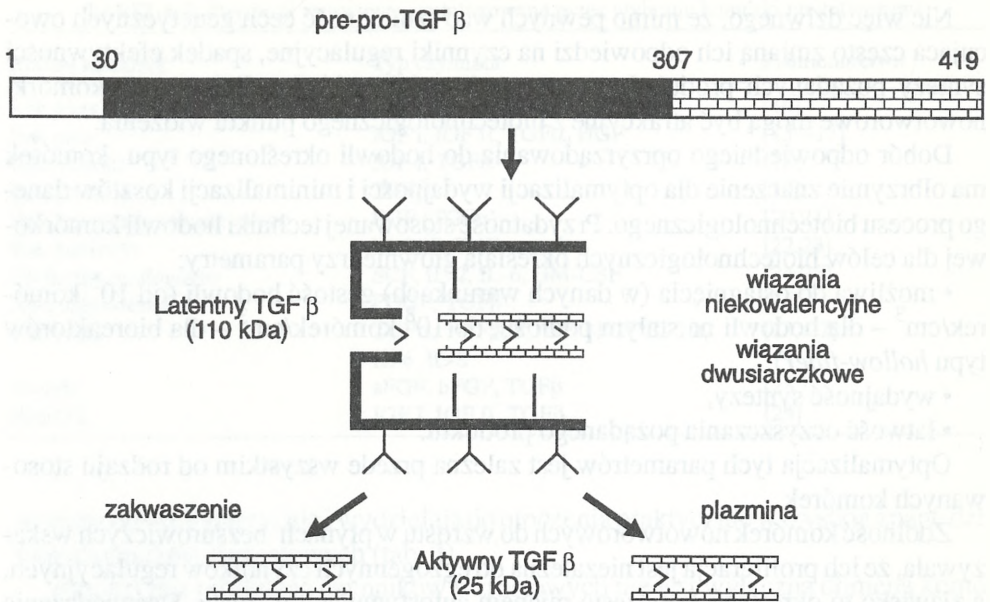
Rodzaj komórki transfekowanej	drożdżowa	zwierzęca
bakteryjna		
a i b FGF	IL-2	HGF
EGF	IL-3	TGF β
IGF I i II	IL-4	EPO
PDGF (AA, AB, BB)*	IL-5	PDGF
TGF α	M-CSF	IL-2
GM-CSF*	GM-CSF	
IL-1 α i β	TNF α	
IL-2*		
IL-3*		
IL-4*		
IL-5*		
IL-6*		
IL-7*		
TNF α i β *		

* – peptydy produkowane w formie nieglikozylowanej

biana przez komórki bakteryjne. Często aktywna forma tych białek wymaga specyficznych modyfikacji potranslacyjnych, które mogą wpływać na ich aktywność, okres półtrwania, immunogenność i zdolność docierania do właściwych tkanek docelowych. Stąd możliwości zastosowań diagnostycznych i terapeutycznych rekombinowanych czynników wzrostowych produkowanych przez bakterie są ograniczone głównie do najprostszych strukturalnie polipeptydów, takich jak: EGF/TGF α , FGFs czy IGFs.

Znacznie bliższe doskonałości są rekombinowane produkty drożdży, ale niektóre czynniki wzrostowe wymagają unikalnej modyfikacji potranslacyjnej, charakterystycznej tylko dla komórek ssaków. Przykładem może być TGF β , który w formie natywnej jest białkiem nieglikozylowanym, ale w organizmach zwierząt i ludzi występuje głównie w postaci nieaktywnego kompleksu glikoproteinowego.

Prekursor TGF β jest syntetyzowany jako pre-pro-białko zawierające hydrofobową sekwencję sygnałową i trzy potencjalne miejsca glikozylacji w obszarze sekwencji "pro". Po odszczepieniu sekwencji sygnałowej (hydroliza wiązania między Gly29 i Leu30) i translacji przez błony ziarnistej siateczki endoplazmatycznej następuje stopniowa glikozylacja probiałka, w której wyniku tworzone są trzy usialyowane łańcuchy węglowodanowe. Dopiero teraz następuje proteolityczne rozszczepienie pro-białka (390 aminokwasów) na C-kończącą sekwencję TGF β (112 aa) i N-kończącą sekwencję (278 aa) LAP (ang. *latency-associated peptide*), które łącznie tworzą nieaktywny kompleks o masie cząsteczkowej 110 kDa (rys.1) [10]. Ponieważ prawie wszystkie typy komórek ssaków mają receptory dla TGF β , nic dziwnego, że w warunkach fizjologicznych czynnik ten jest zawsze wydzielany w postaci nieaktywnego kompleksu. Wykazano bezspornie, że glikozylacja prekursora TGF β spełnia



Rys. 1. Schemat tworzenia nieaktywnego kompleksu LAP-TGFβ oraz niefizjologicznej (zakwaszenie do pH 2) i fizjologicznej (trawienie plazminą) aktywacji tego kompleksu

szereg istotnych funkcji biologicznych. Między innymi zabezpiecza czynnik przed zbyt szybką degradacją enzymatyczną ($T_{1/2}$ dla desialywanego kompleksu TGFβ-LAP wynosi 1–2 min i jest prawie 100-krotnie mniejszy od $T_{1/2}$ dla w pełni glikozylowanego kompleksu) oraz prawdopodobnie umożliwia prawidłową aktywację kompleksu (uwalnianie TGFβ) [11]. Nie ulega wątpliwości, że te właściwości odgrywają decydującą rolę w przydatności czynnika wzrostowego do ewentualnego zastosowania praktycznego, np. w terapii.

W technice laboratoryjnej wyróżnia się zazwyczaj: hodowle pierwotne, hodowle ustalonych linii komórek prawidłowych i hodowle komórek neoplastycznych (komórek nowotworowych lub ustalonych linii komórek transformowanych), różniące się wymogami środowiskowymi (skład pożywki, rodzaj podłoża hodowlanego) i zdolnością namnażania (szybkość proliferacji, przeżywalność w hodowli). Zalety hodowli większości komórek nowotworowych to:

- praktycznie nieograniczona zdolność do pasażowania (nawet setki pasaży),
- zdolność do wzrostu w płynach bezsurowiczych (a nawet bezbiałkowych), co znacznie ułatwia oczyszczanie produktów,
- zdolność do wzrostu niezależnego od przyczepienia do podłoża, umożliwiającą prowadzenie hodowli w zawiesinie,
- brak zależnego od gęstości zahamowania kontaktowego, wzrost wielowarstwowy i znaczne zagęszczenie komórek w danej objętości hodowlanej.

Nic więc dziwnego, że mimo pewnych wad (zmiennosc cech genetycznych owo-
cująca często zmianą ich odpowiedzi na czynniki regulacyjne, spadek efektywności
syntezy pożądaných produktów czy prawdopodobne błędy glikozylacji) komórki
nowotworowe mogą być atrakcyjne z biotechnologicznego punktu widzenia.

Dobór odpowiedniego oprzyrządowania do hodowli określonego typu komórek
ma olbrzymie znaczenie dla optymalizacji wydajności i minimalizacji kosztów dane-
go procesu biotechnologicznego. Przydatność stosowanej techniki hodowli komórko-
wej dla celów biotechnologicznych określają głównie trzy parametry:

- możliwa do osiągnięcia (w danych warunkach) gęstość hodowli (od 10^5 komór-
rek/cm³ – dla hodowli na stałym podłożu, do 10^8 komórek/cm³ – dla bioreaktorów
typu *hollow-fiber*),

- wydajność syntezy,
- łatwość oczyszczania pożądanego produktu.

Optymalizacja tych parametrów jest zależna przede wszystkim od rodzaju stoso-
wanych komórek.

Zdolność komórek nowotworowych do wzrostu w płynach bezsurowiczych wska-
zywała, że ich proliferacja jest niezależna od egzogennych czynników regulacyjnych,
a zjawisko to określane jest często mianem autostymulacji wzrostu. Doświadczenia
przeprowadzone na komórkach fibroblastów transformowanych wirusem mięsaka
myszy (MSV) pozwoliły DeLarco i Todaro [12] na sformułowanie hipotezy autokryn-
nej regulacji wzrostu komórkowego. Opierała się ona na założeniu, że niektóre
komórki nowotworowe syntetyzują i wydzielają do otoczenia czynniki wzrostowe,
na których działanie odpowiadają za pomocą swoistych dla tych czynników recepto-
rów błonowych. Produkcja własnych czynników wzrostowych prowadzi do uniezale-
żnienia się tych komórek nowotworowych od fizjologicznej kontroli proliferacji, a
w następstwie tego do nowotworowego wzrostu tkanki. Dobrym przykładem na
związane z procesem nowotworzenia uniezależnianie się komórek od egzogennej
kontroli wzrostu jest zmiana wymagań hodowlanych, następująca w trakcie progresji
ludzkiego czerniaka.

Kolejne stadia tego nowotworu charakteryzują się coraz mniejszym zapotrzebo-
waniem na egzogenne stymulatory wzrostu, a najbardziej złośliwa postać nowotworu
(czerniak przerzutowy) jest zupełnie od nich niezależna [13]. Równocześnie komórki
czerniaka przerzutowego syntetyzują i wydzielają do otoczenia siedem różnych
czynników wzrostowych (bFGF, TGF α , TGF β , PDGF, IL-1 α , IL-6, IL-8 i MGSK*),
które zapewniają im autonomię wzrostową. Większość komórek nowotworowych
czerniaka syntetyzuje i wydziela peptydy należące do znanych rodzin czynników
wzrostowych: komórek nerwowych (NGF), komórek somatycznych (EGF/TGF α ,
PDGF, IGFs, FGFs, HGF, TGF β) czy komórek krwi (czynniki hematopoetyczne,
interleukiny). Na podstawie doniesień z ostatnich 5 lat, można stwierdzić, że komórki

*słabo poznany czynnik wzrostowy komórek

TABELA 3. Czynniki wzrostowe syntetyzowane przez wybrane komórki nowotworowe

Rodzaj komórek	Typ czynnika	Piśmiennictwo
Rak piersi	IGF I, IGF II, PDGF, TGF β	[14]
Rak płuc	IGF I, IGF II, TGF α , HGF	[15--17]
Rak trzustki	IGF I, TGF α	[18]
Rak prostaty	TGF β	[19]
Rak przewodu pokarmowego	EGF (TGF α)	[20,21]
Rak jajników	M-CSF, TNF- α	[22,23]
Białaczka mieloidalna	SCF, IL-2, IL-6, GM-CSF	[24,25]
Neuroblastoma 2A	PDGF, TGF β	[26]
Czerniaki	TGF α , TGF β , PDGF, bFGF IL-1 α , IL-6, IL-8	[13, 27]
Glejaki	aFGF, bFGF, TGF β	[28]
Hep G2	IGF I, IGF II, TGF β	[29]

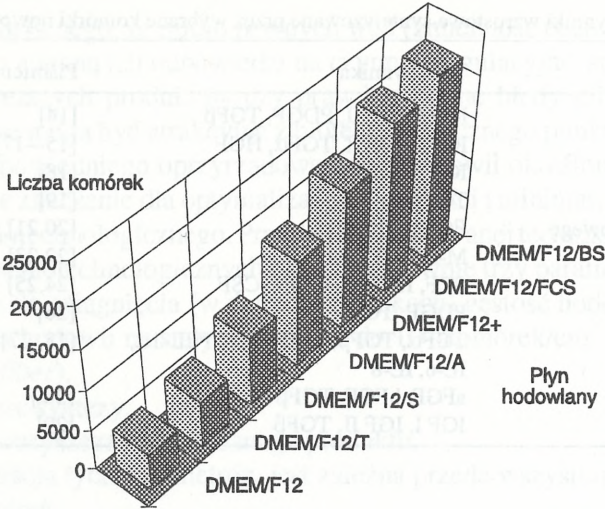
nowotworowe syntetyzują i wydzielają do otoczenia praktycznie wszystkie znane dziś typy czynników wzrostowych (tab. 3).

Autokrynną produkcją czynników wzrostowych nie jest wyłączną domeną komórek neoplastycznych, wiele prawidłowych komórek embrionalnych, a także komórki dojrzałe tkanek ulegających stałej odnowie, podlegają autokrynnnej regulacji wzrostu. Prowadzenie masowych hodowli tych komórek jest jednak znacznie trudniejsze i bardziej kosztowne od komórek nowotworowych. Mimo to stosowanie komórek nowotworowych do produkcji czynników wzrostowych jest obecnie bardzo ograniczone. Większość doniesień na ten temat to prace o syntezie czynników wzrostowych w ilościach wystarczających wyłącznie do ich charakterystyki biochemicznej, uzyskiwanych głównie z hodowli ustalonych linii komórek nowotworowych, prowadzonych na stałym podłożu [30–34].

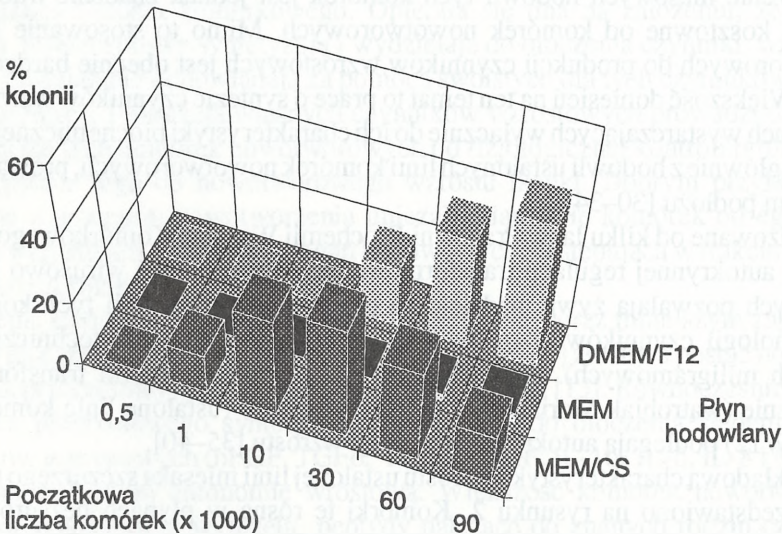
Realizowane od kilku lat w Pracowni Biochemii Wzrostu Komórkowego IBM UJ badania autokrynnnej regulacji transformowanych chemicznie i wirusowo komórek szczurzych pozwalają żywić nadzieję na użycie wybranych linii tych komórek w biotechnologii czynników wzrostowych, przynajmniej na skalę techniczną (tj. w ilościach miligramowych). Stwierdziliśmy, że zarówno komórki transformowane chemicznie (wątrobiak Morissa 7777), jak i wirusowo (ustalone linie komórek XC, GCA i W12) podlegają autokrynnnej regulacji wzrostu [35–40].

Przykładową charakterystykę wzrostu ustalonej linii mięsaka szczurzego (komórki XC) przedstawiono na rysunku 2. Komórki te rosną w płynach bezsurowiczych, zarówno na stałym jak i w półpłynnym podłożu. Co więcej przyrost liczby komórek czy liczby kolonii jest w tych warunkach proporcjonalny do początkowej liczby komórek. Fakt ten, jak i zbliżona do hodowli w obecności 5% surowicy dynamika wzrostu świadczą o całkowitej praktycznie autonomii wzrostowej, zapewnianej przez produkcję własnych czynników wzrostowych. Obserwowane w hodowlach o dużej gęstości załamanie wydajności tworzenia kolonii (rys. 2 b) jest prawdopodobnie

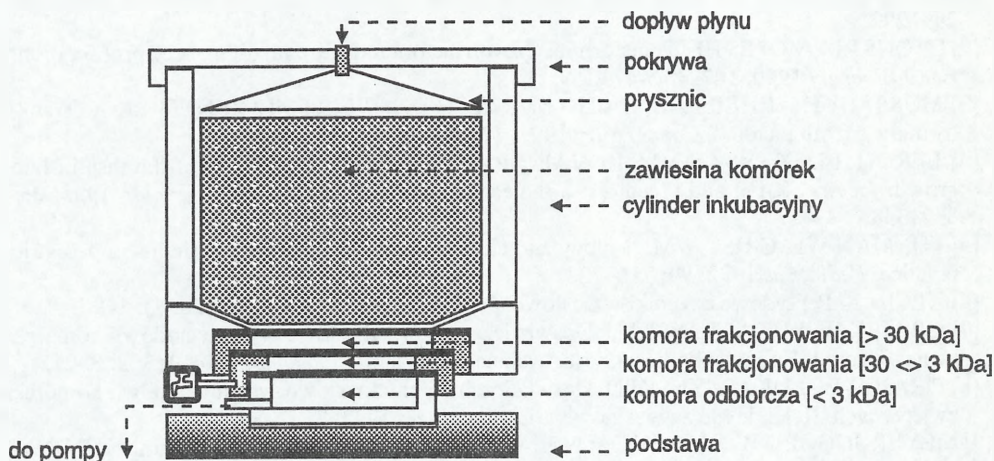
A



B



Rys. 2. Zależny (a) i niezależny (b) od przyczepienia do podłoża wzrost komórek XC; warunki doświadczenia: (a) – okres inkubacji 3 dni, początkowa liczba komórek 4×10^3 , (b) – okres inkubacji 10 dni, początkowa liczba komórek $0,5\text{--}90 \times 10^3$, MEM – podstawowy płyn Eagla, DMEM/F12 – płyn Eagla w modyfikacji Dulbecco/płyn HAMs F12 (1 : 1), DMEM/F12T, DMEM/F12S, DMEM/F12A, DMEM/F12+, DMEM/F12CS, DMEM/F12BS – odpowiednio płyn DMEM/F12 z dodatkiem: transferyny (5 μg), Na_2SO_3 (10 nM), albuminy (0,5 mg), transferyny+selenu+albuminy, surowicy cielęcej (5%) i surowicy bydlęcej (5%)



Rys. 3. Schemat minireaktora do hodowli zwierzęcych komórek nowotworowych w półpłynnym podłożu z wykorzystaniem wstępnego frakcjonowania płynu hodowlanego metodą ultrafiltracji przez błony firmy Amicon

wynikiem efektu cytotoksycznego szybko (w tych warunkach) metabolizujących komórek. Zaobserwowano, że płyn uwarunkowany komórek XC zawiera co najmniej dwa lub trzy różne czynniki wzrostowe o właściwościach zbliżonych do peptydów z rodzin: EGF/TGF α , IGFs i FGFs [41]. Możliwość uzyskania w stosunkowo krótkim czasie (10–12 dni) gęstych (10^7 – 10^8 komórek/ml) hodowli komórek XC, rosnących w półpłynnym agarze oraz możliwość stosowania względnie prostych (tanich) płynów hodowlanych są zachętą dla wykorzystania takiego układu do produkcji czynników wzrostowych. Duże prawdopodobieństwo uzyskania kilku czynników wzrostowych w wyniku jednej, wspólnej procedury oczyszczania jest dodatkowym atutem użycia tych komórek nowotworowych do celów biotechnologicznych. Obecnie prowadzone są prace konstrukcyjne nad minireaktorem ($V = 1,2$ l) przystosowanym do ciągłej hodowli komórek nowotworowych w półpłynnym podłożu, wyposażonym w układ wstępnego frakcjonowania składników płynu hodowlanego metodą diafiltracji (rys. 3). Doświadczalna weryfikacja założeń konstrukcyjnych i optymalizacja procesu technologicznego zadecydują o ewentualnym rozszerzeniu prac na skalę techniczną.

PIŚMIENNICTWO

- [1] JAMES R, BRADSHAW RA. Polypeptide growth factors. *Annu Rev Biochem* 1984; **53**: 259–292.
- [2] LYONS RM, MOSES HL. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* 1990; **187**: 467–473.
- [3] MOSSAGUE J, CHEIFEZ S, LAIHO M, RALPH DA, WEIS FMB, ZENTELLA A. Transforming growth factor- β . *Cancer Surv* 1992; **12**: 81–103.
- [4] LEROITH D, KAVSAN VM, KOVAL AP, ROBERTS CT. Phylogeny of the insulin-like growth factors (IGFs) and receptors: a molecular approach. *Molec Repr Develop* 1993; **35**: 332–338.
- [5] FURMAN WL, CRIST WM. Biology and clinical applications of hemopoietins in pediatric practice. *Pediatrics* 1992; **90**: 716–728.
- [6] KLEIN A. Peptydowe czynniki wzrostowe. *Post Biochem* 1993; **20** (suppl nr 1): 1–95.
- [7] GRAJEK W, ŁUKASZYŃSKI D. Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych. I. Hodowle komórek rosnących na nośnikach. *Biotechnologia* 1993; **2**: 8–21.
- [8] GRAJEK W, ŁUKASZYŃSKI D. Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych. II. Hodowle zawieszinowe. *Biotechnologia* 1993; **2**: 22–34.
- [9] MEYER-INGOLD W. Wound therapy: growth factors as agents to promote healing. *TIBTECH* 1993; **11**: 387–392.
- [10] LYONS RM, GENTRY LE, PURCHIO AF, MOSES HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1361–1367.
- [11] WAKEFIELD LM, WINOKUR TS, HOLLANDS RS, CHRISTOPHERSON K, LEVINSON AD, SPORN MB. Recombinant latent transforming growth factor- β 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor- β 1 and a different tissue distribution. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1976–1984.
- [12] DE LARCO JE, TODARO GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 4001–4005.
- [13] SHIH IM, HERLYN M. Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol* 1993; **100**: 1965–2035.
- [14] LIPPMAN ME, DICKSON RB. Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Progr Horm Res* 1989; **45**: 383–440.
- [15] JAUQUES G, HAVEMANN K. Insulin-like growth factors in lung cancer cell lines. [w] Molecular and cellular biology of insulin-like growth factors and their receptors. Plenum Publ Corp New York 1989; 247–260.
- [16] YAMAGUCHI K, IMANISHI KI, MARUNO K, MIYAKE Y, SHIMOSATO Y, ABE K. Lung cancer and autocrine growth factors. *CHEST* 1989; **96**: 29S–31S.
- [17] TSAO MS, ZHU H, GIAID A, VIALLET J, NAKAMURA T, PARK M. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an autocrine factor for human normal bronchial epithelial and lung carcinoma cells. *Cell Growth Different* 1993; **4**: 571–579.
- [18] OHMURA E, OKADA M, ONODA N, KAMIYA Y, MURAKAMI H, TSUSHIMA T, SHIZUME K. Insulin-like growth factor I and transforming growth factor α as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res* 1990; **50**: 103–107.
- [19] STEINER MS, BARRACK ER. Transforming growth factor- β 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro. *Molec Endocrinol* 1992; **6**: 15–25.
- [20] ITO R, KITADAI Y, KYO E, YOKOZAKI H, YASUI W, YAMASHITA U, NIKAI H, TAHARA E. Interleukin 1 α acts as an autocrine growth stimulator for human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1993; **53**: 4102–4106.

- [21] YOSHIDA K, KYO E, TSUJINO T, SANO T, NIIMOTO M, TAHARA E. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and their receptor genes in human gastric carcinomas; implication for autocrine growth. *Jpn J Cancer Res* 1990; **81**: 43–51.
- [22] RAMAKRISHNAN S, XU FJ, BRANDT SJ, NIEDEL JE, BAST RC jr, BROWN EL. Constitutive production of macrophage colony-stimulating factor by human ovarian and breast cancer cell lines. *J Clin Invest* 1989; **83**: 921–926.
- [23] WUS, BOYER CM, WHITAKER RS, BERCHUCK A, WIENER JR, WEINBERG JB, BAST RC Jr. Tumor necrosis factor α as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor α expression. *Cancer Res* 1993; **53**: 1939–1944.
- [24] PIETSCH T. Paracrine and autocrine growth mechanisms of human stem cell factor (c-kit ligand) in myeloid leukemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; **35**: 285–286.
- [25] PIERCE JH. Oncogenes, growth factors and hematopoietic cell transformation. *Biochem Biophys Acta* 1989; **989**: 179–208.
- [26] van den EIJNDEN-van RAAIJ AJM, KOORNNEEF I, van OOSTWAARD TMJ, FEYEN A, KRUIJER W, de LAAT SW, van ZOELLEN EJJ. Purification of a growth factor related to platelet-derived growth factor and a type β transforming growth factor secreted by mouse neuroblastoma cells. A general strategy for the purification of basic polypeptide growth factors. *Biochem J* 1989; **257**: 375–382.
- [27] SCHADENDORF D, MOLLER A, ALGERMISSEN B, WORM M, STICHERLING M, CZARNETZKI BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 1993; **151**: 2667–2675.
- [28] TAKAHASHI JA, MORI H, FUKUMOTO M, IGARASHI K, JAYE M, ODA Y, KIKUCHI H, HATANAKA M. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: determination of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5710–5714.
- [29] ZVIBEL I, HALAY E, REID LM. Heparin and hormonal regulation of mRNA synthesis and abundance of autocrine growth factors: relevance to clonal growth of tumors. *Molec Cell Biol* 1991; **11**: 108–116.
- [30] RUTKA JT, ROSENBLUM ML, STERN R, RALSTON HJ, DOUGHERTY D, GIBLIN J, DEARMOND S. Isolation and partial purification of growth factors with TGF-like activity from human malignant gliomas. *J Neurosurg* 1989; **71**: 875–883.
- [31] van ZOELLEN EJJ, WARD, van OOSTWAARD TMJ, NIEUWLAND R, van der BURG B, van den EIJNDEN, van RAAIJ AJM, MUMMERY CL, de LAAT SW. Identification and characterization of polypeptide growth factors secreted by murine embryonal carcinoma cells. *Develop Biol* 1989; **132**: 272–283.
- [32] van ZOELLEN EJJ, KOORNNEEF I, HOLHUIS JMC, WARD-van OOSTWAARD TMJ, FEIJEN A, de POORTER TL, MUMMERY CL, van BUUL-OFFERS SC. Production of insulin-like growth factors, platelet-derived growth factor, and transforming growth factors and their role in the density-dependent growth regulation of a differentiated embryonal carcinoma cell line. *Endocrinology* 1989; **124**: 2029–2041.
- [33] CAREY BM, DOOLEY M, WEEDLER, CLYNES M. Production of autostimulatory growth factors by the human carcinoma line, RPMI 2650. *In Vitro Cell Dev Biol* 1993; **29A**: 153–160.
- [34] ZHOU J, GAO G, CRABB JW, SERRERO G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10863–10869.
- [35] KLEIN A, KOSZ -VNENCHAK M, MADEJA Z, SZUSTER A. Anchorage-independent growth of RSV-transformed rat (GCA, W 12 and XC) cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1989; **27**: 11–18.
- [36] GUZIK K, KLEIN A. On the autocrine growth regulation of Morris hepatoma cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1989; **27**: 209–218.

- [37] MADEJA Z, KLEIN A. Growth properties of RSV-transformed rat sarcoma (XC) cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1990; **28**: 203–210.
- [38] GUZIK K, KLEIN A. Serum changes the response of cultured Morris hepatoma 7777 cells to autocrine growth factors. *Int J Cancer* 1990; **46**: 145–150.
- [39] GUZIK K, KLEIN A. Transforming growth factor- β 1 stimulates proliferation of Morris hepatoma cells in serum-free soft agar culture system supplemented with EGF and insulin. *Cancer Lett* 1990; **54**: 51–56.
- [40] KLEIN A, MADEJA Z, GUZIK K. 3H-thymidine incorporation method versus colony forming assay in the determination of anchorage-independent cell growth of rat sarcoma (XC) and Morris hepatoma 7777 (MH) cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1991; **29**: 75–80.
- [41] MADEJA Z, KLEIN A. Anchorage-dependent growth factor(s) produced by rat sarcoma (XC) cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1992; **30**: 97–102.

A. Klein, D. Chećiówna
Instytut Biologii Molekularnej UJ,
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3.

STRATEGIE IMMUNOTERAPII NOWOTWORÓW – IMPLIKACJE DLA KONSTRUKCJI SZCZEPIONEK PRZECIWNOWOTWOROWYCH

STRATEGIES OF TUMOR IMMUNOTHERAPY – IMPLICATIONS FOR CONSTRUCTION OF TUMOR VACCINES

JAROSŁAW TOMECKI

Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet
Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Komórki nowotworowe transplantowane syngenicznym myszom wywołują krótkotrwałą odpowiedź immunologiczną, niewystarczającą do odrzucenia nowotworu, która jednak może być wzmocniona przez odpowiednie szczepionki. Stosując adiuwanty, uzyskuje się modulację mechanizmów obronnych, prowadzących do bardziej skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Nowe techniki immunologiczne konstrukcji szczepionek przeciwnowotworowych napawają optymizmem. Jako szczepionki w adoptywnej terapii raka, początkowo zastosowano zmodyfikowane komórki nowotworowe lub limfocyty naciekające nowotwór, po dokonaniu transferu genów różnych cytokin. Odrzucanie nowotworu zależało jednak od poziomu wytwarzania cytokin przez genetycznie zmodyfikowane komórki, które powodowało parakrynną stymulację gospodarza.

Słowa kluczowe: immunoterapia, nowotwór, gen.

Summary. Syngeneic tumors transplanted into immunocompetent mice elicit a short-life anti-tumor immune response, insufficient to mediate tumor rejection. This immunity can be boosted by vaccination. The manipulation of the immune system in anti-tumor response may be more effective only in the adjuvant modality. New immunological techniques have combined to produce considerable optimism for the future of tumor vaccines. To cancer therapy were used also modified tumor cells as cancer vaccines. In initial studies gene transfer was used to introduce other genes to cultured tumor cells to generate gene-modified tumor cell vaccines and to tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cancer therapy. Tumor cells induced by gene transfer to secrete a number of different cytokines may be rejected by syngeneic host. Rejection of tumor depends on a high level of cytokine production by the gene modified cells which due to paracrine stimulation of host.

Key words: immunotherapy, tumor, gen.

WSTĘP

Osobnicza odpowiedź przeciwnowotworowa może być spowodowana przez antygeny nowotworowe, które są rozpoznawane jako obce przez system immunologiczny gospodarza. Muszą być spełnione jednak podstawowe dwa warunki:

po pierwsze – nowotwór musi posiadać nowe antygeny lub neo-epitopy nie występujące na normalnych komórkach;

po drugie – system obronny musi być odpowiednio aktywowany do odpowiedzi na te nowe antygeny [1,4,7,35,38,53].

Poszukiwanie szczepionki przeciwnowotworowej jest starą koncepcją i zarazem marzeniem lekarzy od czasu odkrycia odporności przeciwwzakaźnej. Jednak do właściwej konstrukcji takiej szczepionki niezbędna jest znajomość mechanizmów obróbki i prezentacji antygeny [9,10,36,42,48].

Już 40 lat temu zauważono, że myszy immunizowane zabitymi komórkami nowotworowymi mogły być chronione przed rozwojem niektórych transplantowanych nowotworów u syngenicznych zwierząt [32,34,36]. Chemicznie modyfikowane lub zakażone wirusem komórki nowotworowe [32,38] mogły również stanowić ochronę przed niezmodyfikowanymi komórkami nowotworowymi i w pewnych przypadkach stymulować odporność przeciwnowotworową. Jednak zabiegi te były skuteczne jako szczepionki tylko wtedy, gdy immunizację przeprowadzono na kilka dni przed transplantacją komórek nowotworowych syngenicznym zwierzętom. Komórki nowotworowe implantowane do syngenicznych biorców często wywoływały krótkotrwałą przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną nie prowadząc zazwyczaj do odrzucenia przeszczepu guza, lecz wywołując stan swoistej tolerancji immunologicznej. Sporadycznie dochodziło również do odrzucania przeszczepu guza. W późniejszej jednak fazie występowała jedynie tolerancja immunologiczna, a szczepienie było nieefektywne.

Wydaje się, że zasadniczo dwie strategie oparte na immunoterapii komórkowej mogą być wykorzystane w zwalczaniu raka: adoptywna immunoterapia, która dotyczy ekspansji reagujących z nowotworem limfocytów *in vitro* po ich reinfuzji do gospodarza [44]; alternatywna strategia dotyczy aktywnej immunoterapii [52], która przewiduje immunizację komórkami nowotworowymi w nadziei na powstanie nowej lub wzmożonej odpowiedzi immunologicznej przeciw antygenom nowotworowym, w której wyniku dochodzi do systemowej odpowiedzi przeciwko tkance nowotworowej [4,20,36].

Szczepionki przeciwnowotworowe przygotowano w rozmaity sposób, najczęściej jednak napromieniowywano komórki nowotworowe [34], a następnie podawano razem z adiuwantami, np. z BCG w celu wywołania silnej odpowiedzi immunologi-

cznej. Napromieniowane komórki nowotworowe mogą wyzwać ochronną odpowiedź immunologiczną, a także znana jest długa lista adiuwantów [2,3,26,27,28, 29,46,51,52], które mogą wzmacniać odpowiedź immunologiczną oddziałując na komórki systemu immunologicznego. Jednak powstająca odpowiedź jest relatywnie słaba i dlatego jest nieefektywna przeciw ustalonym nowotworom.

Inną formą stosowania aktywnej immunoterapii jest zastosowanie genetycznie zmodyfikowanych komórek nowotworowych. Nową generację genetycznie zmodyfikowanych komórek nowotworowych wykorzystanych do konstrukcji szczepionek przeciwnowotworowych uzyskano w drodze mutagenyzy prowadzącej do wytworzenia immunogennych wariantów komórek nowotworowych, które użyte do immunizacji mogłyby generować powstanie odpowiedzi odpornościowej przeciwko naturalnym, nieimmunogennym wariantom raka [41].

Do przygotowania bardziej skutecznych szczepionek przeciwnowotworowych wykorzystano transfer genów [5,11,12,22], zakażenie wirusem infekcyjnym [32], bądź mutagenezę [30].

Najnowsze techniki prowadzą do wywołania zmodyfikowanej odpowiedzi odpornościowej drogą inżynierii genetycznej komórek, powodując sekrecję cytokin przez komórki nowotworowe. Wymieniona strategia prowadzi do lokalnych zmian w środowisku immunologicznym nowotworu, co może prowadzić zarówno do wzmocnienia prezentacji antygenów nowotworowo-swoistych lub też do wzmocnienia procesu aktywacji limfocytów nowotworowo-swoistych.

Osiągnięcia, jakich dokonano w izolowaniu i oczyszczaniu węglowodanów i peptydów oraz antygenów nowotworowych, również znacznie poszerzyły możliwości konstruowania szczepionek przeciwnowotworowych prowadzących do wzrostu aktywności pomocniczych i cytotoksycznych limfocytów-T [27,46].

Zaledwie kilkanaście antygenów nowotworowych związanych jest z transformacją i kodowanych przez wirusy, większość antygenów to autoantygeny z ograniczoną redystrybucją na normalnych tkankach lub normalne zmutowane antygeny. Ponieważ u gospodarza nowotworu występuje częściowa lub całkowita tolerancja w stosunku do tych antygenów, główne zainteresowanie skupia się na pobudzeniu organizmu do wzrostu immunogenności antygenów nowotworowych. Stan taki można osiągnąć przez:

a) kowalentne wiązanie (koniugowanie) z immunogennymi białkami nośnikowymi dla indukcji aktywności pomocniczych limfocytów-T (Th) oraz efektywnej odpowiedzi przeciwciał,

b) ekspresję białek lub peptydów w wirusowych lub mykobakteryjnych wektorach użytych do indukcji limfocytów cytotoksycznych, komórek Th oraz przeciwciał [49],

c) użycie silnych adiuwantów immunologicznych zdolnych do pobudzenia wszystkich elementów układu odpornościowego [2,29,51,52].

Do przygotowania szczepionek przeciwnowotworowych używa się całych komórek [34,52], a także tworzy się szczepionki antyidiotypowe zawierające przeciwciała

monoklonalne (moAbs) ze zmiennych regionów podobnych do epitopów na komórkach nowotworowych [23,33,43]. Mogą to być komórki autologiczne odpowiednio dobrane lub zmodyfikowane pod względem genetycznym dla ekspresji cytokin oraz oczyszczone antygeny nowotworowe.

Poniżej przedstawione zostaną wybrane przykłady wymienionych strategii konstruowania szczepionek przeciwnowotworowych.

TABELA 1 Strategie stosowane w immunoterapii nowotworów (wg [48] zmodyfikowane)

Aktywna immunoterapia	1. Antygeny nowotworowe jako szczepionki 2. Anty-idiotypy
Adopcyjna immunoterapia	1. TIL, LAK* 2. TIL, LAK zmodyfikowane
Terapia genowa	1. Transfekcja genów cytokin do limfocytów 2. Transfekcja genów cytokin do komórek nowotworowych
Bierna immunoterapia	1. Monoklonalne przeciwciała 2. Monoklonalne przeciwciała jako nośniki: a) Radioizotopy b) Toksyny c) Leki

TIL – limfocyty naciekające nowotwór (ang. *tumor infiltrating lymphocytes*), LAK – aktywowane limfokinami komórki zabijające (ang. *lymphokine activated killer cells*)

KONSTRUKCJA SZCZEPIONEK PRZECIWNOWOTWOROWYCH Z WYKORZYSTANIEM GLIKOLIPIDÓW I GLIKOPROTEIN

Antygeny węglowodanowe ulegają ekspresji na komórkach rakowych w postaci glikolipidów i glikoprotein. Antygeny te ulegają również ekspresji w normalnych glikoproteinach, np. mucyn. Antygen Thomsen-Friendenreich (Gal B1-GalNAca-O-Ser) ulega ekspresji na komórkach nowotworu sutka. Posłużyło to do przygotowania szczepionki przeciwnowotworowej z mucyny gruczołów podszczękowych bydła. Antygen sialylowany (sTn) wiązano kowalencyjnie z hemocyjaniną wyizolowaną ze ślimaków (KLH – *keyhole limpet hemocyanin*) lub z innym nośnikiem. Po podaniu takiej szczepionki stwierdzono obecność przeciwciał IgM i IgG oraz reakcje opóźnionej nadwrażliwości przeciwko temu antygenowi, a także wyleczenie myszy z ustalonego nowotworu [31].

Szereg antygenów glikoproteinowych wyizolowanych z melanomy określono jako Gp 75. Są one białkami integralnymi błon melanosomów. Badania o charakterze przeciwnowotworowym dotyczą głównie dwóch antygenów: melanoferryiny p97 i antygeny proteoglikanu komórek melanomy – chondroityny 58 kDa. Przeciwciała przeciwko chondroitynie melanomy wykryto u osobników immunizowanych szczepionką anti-idiotypową, co powodowało przedłużenie czasu przeżycia. Natomiast użycie jako szczepionki zrekombinowanego wirusa krowianki [wg 30], u którego

występowała ekspresja białka gp 97 powodowało wzrost odporności przeciwko komórkom melanomy u gryzoni i małp.

Polimorficzny nabłonkowy antygen mucynowy (PEM) ulegający również ekspresji w komórkach adenocarcinomy sutka został użyty do immunizacji szczurów przeciwko nowotworowi przy użyciu rekombinanta wirusa krowianki (vaccinia), u którego dochodzi do ekspresji tego genu [21]. Antygen peptydowy PEM i wektor wirusa vaccinia używany jest obecnie w placówkach badawczych w stadium przedklinicznym jako szczepionka przeciwnowotworowa.

Immunizacja myszy produktem ludzkiego onkogenu HER2-neu kodujący transmembranowe białko kinazy tyrozynowej 183 kDa, który ulega ekspresji w wielu nowotworach, np. nowotworach jajnika, indukuje transplantacyjną odporność przeciw syngenicznym nowotworom transfekowanych ludzkim genem HER2-neu [6].

WAKCYNACJA REKOMBINACYJNYMI DROBNOUSTROJAMI

Inną możliwością wakcynacji przeciwnowotworowej jest zastosowanie wirusów rekombinacyjnych [5,17,41,47,49] lub rekombinantów mykobakterii [13], jako wektorów, u których dochodzi do ekspresji określonych antygenów. W następstwie infekcji wektorem dochodzi do wewnątrzkomórkowego wytwarzania antygeny, a w wyniku ekspresji antygeny w kontekście antygenów klasy I i II MHC dochodzi do indukcji zarówno CTL, jak i komórek pomocniczych Th.

UDZIAŁ ADIUWANTÓW IMMUNOLOGICZNYCH

Szczególne miejsce w konstrukcji szczepionek przeciwnowotworowych zajmują adiuwanty immunologiczne, które powodują wzrost odpowiedzi immunologicznej na antygeny. Bardzo ważne znaczenie mają tutaj:

- 1) efekt umiejscowienia (ang. *depot effect*) czyli "sekwestracja" antygeny, powolne uwalnianie i fagocytoza przez makrofagi oraz inne komórki prezentujące antygen,
- 2) aktywacja makrofagów,
- 3) aktywacja komórek-T i B.

Obecnie znanych jest bardzo wiele nowych adiuwantów. Do najnowszej generacji adiuwantów zaliczyć można [wg 30]:

- (1) niejonowe kopolimery L121, które aktywują makrofagi i powodują doczepienie antygeny do frakcji lipidowo-wodnej [30],
- (2) SAF-m, który zawiera analog dwupeptydu muramylowego [31],
- (3) Detox, który zawiera monofosforyl lipidu A (analog szkieletu ściany mykobakterii),

- (4) QS 21, który jest frakcją oczyszczonej saponiny,
- (5) glikozydy i alkaloidy roślin tropikalnych [3,28] oraz
- (6) frakcje komórkowe bakterii z rodzaju *Corynebacterium*, *Mycobacterium* i *Nocardia* [46,52,53].

ROZWÓJ TERAPII GENOWEJ

Istotne miejsce w badaniach nad przygotowaniem subklonów nie-tumorogennych z komórek tumorogennych odegrały badania zapoczątkowane przez Boona i wsp. [wg 38]. Zastosowano technikę zwaną "shot gun". W wyniku identyfikacji fragmentów DNA kodujących antygeny rozpoznawane przez klony cytotoksycznych limfocytów-T (CTL) pochodzących od myszy immunizowanych wariantem komórek nowotworowych tum- (nieimmunogennych) ustalono, że nastąpiła zmiana punktowa pojedynczych aminokwasów w regionie genu odpowiedzialnego za wiązanie się z cząsteczką Ld MHC klasy I ulegającej ekspresji w nowotworze [38]. Tworzenie immunogennych wariantów przez transfekcję obcych genów to nowy sposób strategii mutagenезy z zastosowaniem techniki transfekcji do indukowania ekspresji nowych genów w nowotworach. Pierwsze badania dotyczyły wprowadzenia allogenicznych genów klasy I MHC do nowotworu [25]. Kiedy gen Ld klasy I MHC został wprowadzony do linii H2b raka płuc Lewisa, komórki takie były odrzucane u syngenicznych myszy C56BL6. Wprowadzenie genu Ld do komórek nowotworowych osłabiało ich tumorogenność aż o 40 razy w stosunku do komórek macierzystych. Po inokulacji i spontanicznej regresji klonów Ld+ myszy nabywały odporności przeciwko dawce macierzystych komórek nowotworowych [25].

Kolejne próby konstrukcji szczepionek przeciwnowotworowych związane były z transfekcją genów wirusowych, kodujących białka o wysokiej immunogenności indukujących silną odpowiedź przeciwwirusową, do komórek nowotworowych [14]. Wprowadzenie genu HA wirusa grypy do komórek nowotworowych okrężnicy CT26 u myszy Balb/c powodowało, że transfektanty były odrzucane przez myszy w dawce 100-krotnie wyższej niż wyjściowy nowotwór. Ponadto transfektanty indukowały systemową odpowiedź odpornościową przeciwko pierwotnemu nowotworowi CT26.

Próbowano również wprowadzać geny kodujące antygeny klasy II MHC do komórek nowotworowych [37]. W pewnych modelach nowotworów wprowadzenie genów kodujących antygeny klasy II MHC do komórek nowotworowych powoduje zmniejszenie ich tumorogenności i wytworzenie systemowej odpowiedzi odpornościowej przeciwko macierzystemu nowotworowi [37].

Największa ilość badań przeprowadzonych w ostatnich latach w celu przygotowania szczepionki genetycznie zmienionych komórek nowotworowych dotyczyła wprowadzania do nich genów cytokin [8,11,12,16,17,18,19,39,40,47,54]. Kilka genów cytokin wprowadzonych do komórek nowotworowych wywoływało różnorodne efe-

kty dotyczące zarówno immunogenności, jak i tumorogenności [22]. Wiele cytokin wytwarzanych przez komórki nowotworowe indukowało lokalny stan zapalny, w wyniku czego dochodziło do eliminacji i odrzucania nowotworu. Ostatnio przeprowadzone eksperymenty [38,44,45,48] wykazały, że komórki nowotworowe indukowane przez transfer genów do sekrecji różnych cytokin [IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-7, IL-6] są odrzucane u syngenicznych gryzoni. Odrzucanie przeszczepu nowotworu uzależnione jest od wysokiego poziomu wytwarzania cytokin przez genetycznie modyfikowane komórki nowotworowe i przynajmniej częściowo prowadzi do parakrynej stymulacji efektorowych, przeciwnowotworowych mechanizmów obronnych gospodarza. Odrzucanie komórek nowotworowych wytwarzających cytokiny często indukuje trwałą odporność na niezmodyfikowane komórki nowotworowe.

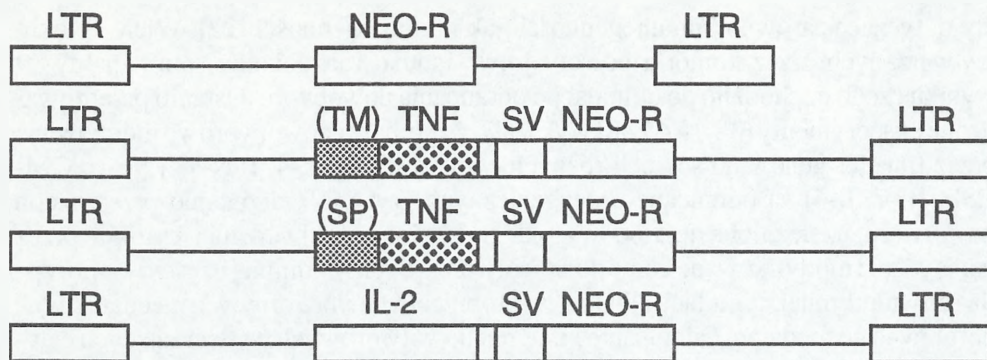
Po wprowadzeniu do nowotworów genu IL-2 [5,11,15,16,19,22,39], komórki nowotworowe wydzielają tę cytokinę, a wysoki poziom sekrecji powodował regresję nawet dużego inokulum komórek nowotworowych użytych do transplantacji. W badaniu histologicznym odrzucanego guza stwierdzono znaczny naciek tkanki nowotworowej przez limfocyty. Ponadto ustalono, że lokalnie aktywowane komórki NK są głównymi komórkami efektorowymi odpowiedzialnymi za odrzucanie komórek nowotworowych po transfekcji genem IL-2.

W wyniku autokrynej stymulacji komórek B przez IL-4 następowało odrzucanie nowotworu po transplantacji komórek nowotworowych do syngenicznych zwierząt [18,40,50]. W tkance nowotworowej stwierdzono dużą ilość makrofagów i eozynofili. Ustabilizowany nowotwór Reneca może być leczony przez immunizację komórkami po transdukcji IL-4 [18], nawet w odległym miejscu od pierwotnego guza.

Badania nad wprowadzeniem genu IFN- γ [17,22,41,47] do komórek nowotworowych wykazały, że następuje indukcja zarówno produktów genów MHC klasy I i klasy II, a w pewnych wypadkach powodowało odrzucenie nowotworu [47]. Jednak wpływ IFN- γ był zależny od typu nowotworu, a w pewnych przypadkach kotransdukcja genami innych cytokin wywierała wpływ hamujący IFN- γ na generowanie systemowej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Po transdukcji genu TNF- α generalnie komórki nowotworowe rosły wolniej *in vitro* i zdarzało się często, że po transplantacji były odrzucane u syngenicznych zwierząt [8,15,22]. Nie wiadomo jednak, czy odrzucanie tkanki nowotworowej następuje w wyniku prostego oddziaływania TNF- α na komórki nowotworowe, czy też występuje dodatkowy efekt oddziaływania TNF- α na komórki stanu zapalnego, np. na makrofagi. Wielu badaczy stwierdziło, że zwierzęta, które odrzucały komórki nowotworowe po transdukcji genu TNF- α , wykazywały odporność na transplantację komórek niezmodyfikowanych genetycznie.

Podobną przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną uzyskano w wyniku immunizacji komórkami nowotworowymi "mastocytoma" zmienionymi w wyniku transferu genu IL-7 [24].



Rys. 1. Schemat wektora retrowirusa dla transdukcji genów do komórek nowotworowych lub limfocytów naciekających nowotwór (TIL); geny dla: fosfotransferazy neomycyny (Neo-R), czynnika martwicy nowotworu (TNF) i interleukiny-2 (IL-2); LTR – długa sekwencja powtórzona, SV – promotor wirusa SV, TM – fragment transmembranowy, SP – peptyd sygnałowy [wg 44]

Można wysunąć wniosek, że komórki nowotworowe zmodyfikowane w wyniku wprowadzenia nowych genów powodują powstanie znacznie silniejszej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej w porównaniu z zastosowaniem adiuwantów czy napromieniowanych komórek nowotworowych.

WPŁYW MODYFIKOWANYCH KOMÓREK EFEKTOROWYCH

Adopcyjny transfer aktywowanych komórek efektorowych również może prowadzić do regresji nowotworu. Ostatnio konstruuje się szczepionki z naciekających nowotwór limfocytów TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*) i poddaje działaniu IL-2 [44]. Następnym krokiem jest transdukcja do komórek TIL przy udziale retrowirusa transferu genów cytokin z markerem genu bakteryjnego neo [44].

Bardziej bezpośrednie wprowadzenie terapii genowej mogłoby mieć miejsce, gdyby docelowe geny mogły ulegać ekspresji bardziej efektywnie w pierwotnych i wtórnych miejscach pojawiania się komórek nowotworowych *in vivo* prowadząc do lokalnej syntezy białek uczestniczących w destrukcji nowotworu [36,44,45]. Wydaje się, że w najbliższej przyszłości firmy biotechnologiczne będą kontynuować przedstawione w artykule kierunki badań z wykorzystaniem najnowszych technik stosowanych w biologii molekularnej.

LITERATURA

- [1] ALLEVA DG, BURGER CJ, ELGERT KD. Interferon- γ reduces tumor-induced Ia macrophage-mediated suppression: role of prostaglandin E₂, Ia, and tumor necrosis factor- α . *Immunopharmacology* 1993; **25**: 215–227.

- [2] BAROT-CIORBARU R, CORNIL I, GRAND-PERET T, PUPON MF. Antimetastatic effect of immunomodulators from *Nocardia opaca* in mice and rates activation of peritoneal macrophages by these fractions. *Cancer Immunol Immunother* 1987; **25**: 111–118.
- [3] BARRET Y, SAUVAIRE Y. Fagaronine a novel antileukaemic alkaloid. *Phytotherapy Res* 1992; **6**: 59–63.
- [4] BARTHOLEYNS J. Monocytes and macrophages in cancer immunotherapy. *Annales de l'Institute Pasteur* 1993; **144**: 288–291.
- [5] BASH JA. Recombinant Vaccinia interleukin-2-infected tumor cell vaccines in immunotherapy of murine colon adenocarcinoma. *J Immunother* 1993; **14**: 269–272.
- [6] BERNARDS R, DESTREE A, McKENZIE S, GORDON E. Effective tumor immunotherapy directed against an oncogene-encoded product using a Vaccinia virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6854–6858.
- [7] BLACK PL, PHILIPS H, TRIBBLE HP, PENNINGTON R, SCHNEIDER M. Antitumor response to recombinant murine interferon- γ correlates with enhanced immune functions of organ-associated, but not recirculating cytolytic T lymphocytes and macrophages. *Cancer Immunol Immunother* 1993; **37**: 229–306.
- [8] BLANKENSTAIN T, QIUN Z, UBERLA K, MULLER W, ROSEN H, VOLK HD, DIAMASTEIN T. Tumor suppression after tumor-cell-targeted tumor necrosis factor a gene transfer. *J Exp Med* 1991; **173**: 1047–1052.
- [9] BROWNING MJ, BODMER WF. MHC antigens and cancer: implications for T-cell surveillance. *Current Op Immunol* 1992; **4**: 613–618.
- [10] van der BRUGGEN P, van der EYNDE B. Molecular definition of tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Current Op Immunol* 1992; **4**: 608–612.
- [11] BUBENIK J, ZEUTHEN J, BUBENIKOVA D, SIMOVA J, JANDLOVA T. Gene therapy of cancer: use of IL-2 gene transfer and kinetics of local T and NK cell subsets. *Anticancer Res* 1993; **13**: 1457–1460.
- [12] BUBENIK J, ZEUTHEN J, INROVA M, BUBENIKOVA D, SIMOVA J. Kinetics and function of peritoneal exudate cells during local IL-2 gene therapy of cancer. *Int J Oncol* 1993; **3**: 1–4.
- [13] DELLAGOSTIN OA, WALLS S, NORMAN E, SHAUGHNESSY TO, DALE JW, McFADDEN JJ. Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. *Molec Microbiol* 1993; **10**: 983–993.
- [14] FEARONE E, ITAYA T, HUNT B, VOGELSTEIN B, FROST P. Induction in a murine tumor of immunogenic tumor variants by transfection with a foreign gene. *Cancer Res* 1988; **38**: 2975–2980.
- [15] FRACKER DL, NORTON JA. The role of tumor necrosis factor in the toxicity and the antineoplastic activity of interleukin-2 immunotherapy [w] Tumor necrosis factor: molecular and cellular biology and clinical relevance. Buurman FW [red.] Basel: Karger 1993; 221–225.
- [16] GANSBACHER B, ZIER K, DANIELS B, CRONIN K, BANNERI R, GILBOA E. Interleukin-2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* 1990; **172**: 1217–1224.
- [17] GANSBACHER B, BANNERI R, DANIELS B, ZIER K, CRONIN K, GILBOA E. Retroviral vector-mediated γ -interferon gene transfer into tumor cells generate potent and long lasting antitumor immunity. *Cancer Res* 1990; **50**: 7820–7825.
- [18] GAUDEMBEK P, LAZENBY A, HEVITZKY H, JAFEE E, KARASUYAMA H, BAKER M, PARDOLL D. Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 1991; **254**: 713–716.
- [19] HADDADA H, RAGOT T, CORDIER L, DUFFOUR MT, PERRICAUDET M. Adenoviral interleukin-2 gene transfer into P815 tumor cells abrogates tumorigenicity and induces antitumor immunity of mice. *Human Gene Ther* 1993; **4**: 703–711.

- [20] HANK JA, ALBERTINI MR, SCHILER J, SONDEL PM. Activation of multiple effector mechanisms to enhance tumor immunotherapy. *J Immunother* 1993; **14**: 329–335.
- [21] HAREUVENI M, GAUTIER C, KIENY MP, WRESCHNER D, CHAMBON P, LATHE R. Vaccination against tumor cells expressing breast cancer epithelial tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9498–9502.
- [22] HEATON KM, GRIMM EA. Cytokine combinations in immunotherapy for solid tumors. *Cancer Immunol Immunother* 1993; **48**: 245–251.
- [23] HERLYN D, WETTENDORFF M, SCHMOLL E, ILIOPOULOS D, SCHEDEL I, DREIKHAUSEN U, RAAB R, ROSS AH, JAKSCHE H, SCRIBA M, KOPROWSKI H. Antidiotype immunization of cancer patients: modulation of the immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8055–8059.
- [24] HOCK H, DORSCH M, DIAMANSTEIN T, BLANKENSTEIN T. Interleukin-7 induces CD4+ T cell-dependent tumor rejection. *J Exp Med* 1991; **174**: 1291–1298.
- [25] ITAYA T, YAMAGIVA S, OKADA F, OIKAWA T, KURUMAKI N, TAKEICHI N, HOSOKAW M, KOBAYASCHI H. Xenogenisation of a mouse lung carcinoma (311) by transfection with an allogenic class I Major Histocompatibility Complex gene (H-2Ld). *Cancer Res* 1987; **47**: 3136–3140.
- [26] KAYAKIRI H, NAKAMURA K, TAKASE S, UCHIDA J, TERANO H, HASHIMOTO M, TADA T, KODA S. Structure and synthesis, a new immunomodulator isolated from a fungus. *Chem Pharm Bull* 1991; **39**: 2807–2812.
- [27] KIHO T, SHIOSE Y, NAGAI K, UKAI S. Polysaccharides in fungi: antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. *Chem Pharm Bull* 1992; **40**: 2110–2114.
- [28] KINOSHITA K, MORIKAWA K, FUJITA M, NATORI S. Inhibitory effects of plant secondary metabolites on cytotoxic activity of polymorphonuclear leukocytes. *Planta Med* 1992; **58**: 137–145.
- [29] LEBOVICI J, HOENING S, HORODNICEANU E, BAROT-CIORBARU R. Local cellular host response induced by *Nocardia*–delipidated cell mitogen in Lewis Lung Carcinoma-bearing mice. *In vivo* 1990; **4**: 299–308.
- [30] LIVINGSTONE PO. Construction of cancer vaccines with carbohydrate and protein (peptide) tumor antigens. *Current Op Immunol* 1992; **4**: 624–629.
- [31] LIVINGSTON PO, KOGANTY R, LOGENECKER BM, LLOYD KO, CALVES M. Studies on immunogenicity of synthetic and natural Thomsen-Freidenreich (TF) antigens in mice. Augmentation of the response by Quil A and SAF-m adjuvants and analysis of the specificity of the response. *Vaccine Res* 1992; **50**: 99–109.
- [32] MALLMANN P. Autologous tumor-cell vaccination and lymphokine-activated tumor infiltrating lymphocytes (LAK-TIL). *Hybridoma* 1993; **12**: 559–566.
- [33] MATHEWS DC, SMITH FO, BERNSTEIN ID. Monoclonal antibodies in the study and therapy of hematopoietic cancers. *Current Op Immunol* 1992; **4**: 641–646.
- [34] MOBUS V, HORN S, STOCK M, SCHIRRMACHER V. Tumor cell vaccination for gynecological tumors. *Hybridoma* 1993; **12**: 543–547.
- [35] NEIDHART JA. Hematopoietic cytokines. Current use in cancer therapy. *Cancer Supplement* 1993; **72**: 3381–3386.
- [36] OLD LJ. Tumor immunology – the first century. *Curr Op Immunol* 1992; **4**: 603–607.
- [37] OSTRAND-ROSENBERG S, THAUKUR A, CLEMENTS V. Rejection of mouse sarcoma cells after transplantation of MHC class II genes. *J Immunol* 1990; **144**: 4068–4071.
- [38] PARDOLL D. New strategies for active immunotherapy with genetically engineered tumor cells. *Curr Op Immunol* 1992; **4**: 619–623.
- [39] PORGADOR A, TEHOVALE E, VADAI E, FELDMAN M, EISENBACH L. Immunotherapy via gene therapy: comparison of the effects of tumor cells transduced with interleukin-2, interleukin-6, or interferon- γ genes. *J Immunother* 1993; **14**: 191–201.

- [40] PURI RK, SIEGEL JP. Interleukin-4 and cancer therapy. *Cancer Investigation* 1993; **11**: 473–486.
- [41] RESTIFO NP, SPIESS PJ, KARP SE, MULE JJ, ROSENBERG SA. A nonimmunogenic sarcoma transduced with cDNA for interferon- γ elicits CD8+ T cells against the wild-type tumor: correlation with antigen presentation capability. *J Exp Med* 1992; **173**: 1423–1431.
- [42] RESTIFO NP, KAWAKAMI Y, MARINCOLA F, SHAMAMIAN P, TAGGARSE A, ESQUIVEL F, ROSENBERG SA. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother* 1993; **14**: 182–190.
- [43] RIETCHMULLER G, JOHNSON JP. Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic epithelial cancers. *Current Op Immunol* 1992; **4**: 647–655.
- [44] ROSENBERG S, ANDERSON WF, BLUESE M, HWU P, YANNELI JR, YANG JC, TOPALIAN SL, SCHWARTZENTRUBER DJ, WEBER JS, ETTINGHAUSEN SE, PARKINSON DN, WHITE DE. The development of the gene therapy for the treatment of cancer. *Annales of Surgery* 1993; **12**: 455–464.
- [45] RUSSELL SJ. Gene therapy for cancer. *Cancer J* 1993; **6**: 21–25.
- [46] SASAKI H, SCHMITT DA, KOBAYASHI M, HAYASHI Y, POLLARD RB, SUZUKI F. Prolongation of concomitant antitumor immunity in mice treated with Z-100 arabinomannan extracted from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunity* 1993; **12**: 152–164.
- [47] SHILONI S, KARP SE, CUSTER MC, SHILANSKY J, RESTIFO NP, ROSENBERG S, MULE JJ. Retroviral transduction of interferon- γ cDNA into a nonimmunogenic multifibrosarcoma: generation of T cells in draining lymph nodes capable of treating established parental metastatic tumor. *Cancer Immunol Immunother* 1993; **37**: 286–292.
- [48] STEPLEWSKI Z. Advances and outlooks for immunotherapy of cancer. *Hybridoma* 1993; **12**: 493–500.
- [49] TARTAGLIA J, PINGUS S, PAOLETTI E. Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Immunology* 1990; **10**: 13–30.
- [50] TEPPER R, PATTENGAL P, LEDER P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity *in vivo*. *Cell* 1989; **57**: 503–512.
- [51] TOMECKI JK, CIEŚLIK K, KORDOWIAK AM, BAROT R. Immunomodulatory activities of *Nocardia opaca*. *Acta Microbiol Polon* 1993; **42**: 151–156.
- [52] TOMECKI J, SUKIENNIK J, KORDOWIAK A. Immunoregulation of antitumor response; differential secretion of arachidonic acid metabolites by macrophage during stimulation *in vitro* with BCG and *Corynebacterium parvum*. *Arch Immunol Ther Exp* 1993; **41**: 45–50.
- [53] TOMECKI J. Aktywacja makrofagów w świetle wyników badań nad cytolizą komórek nowotworowych. *Zeszyty Naukowe UJ, Prace z biol. molekul.* 1990; **18**: 121–130.
- [54] WU B, SHEN RN, WANG WX, BRIOXMEYER H, LU L. Antitumor effect of interleukin-7 in combination with local hyperthermia in mice bearing B16a melanoma cells. *Stem Cells* 1993; **11**: 412–421.

Jarosław Tomecki

Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

... the ... of ...

MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNEGO ZASTOSOWANIA MODYFIKOWANYCH, SYNTETYCZNYCH I OTRZYMANÝCH W DRODZE REKOMBINACJI INHIBITORÓW PROTEINAZ SERYNOWYCH*

PERSPECTIVES OF THE THERAPEUTIC USE
OF MODIFIED, SYNTHETIC AND RECOMBINANT
INHIBITORS OF SERINE PROTEINASES

Aneta KASZA, Anna ŁĄCZKA

Zakład Biochemii Zwierząt Instytutu Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Praca obejmuje przegląd artykułów z ostatnich kilku lat dotyczących poszukiwań specyficznych, aktywnych *in vivo* i nietoksycznych inhibitorów proteinaz serynowych, w tym przede wszystkim inhibitorów elastaz. Przedstawiono kierunki badań zmierzające do odkrycia środka niwelującego skutki niedoboru lub wadliwego funkcjonowania $\alpha 1$ -inhibitora proteinaz – głównego inhibitora proteinaz serynowych osocza ludzkiego. Podano krótką charakterystykę omawianych związków z uwzględnieniem ich ewentualnego terapeutycznego wykorzystania.

Słowa kluczowe: proteinazy serynowe, elastaza, inhibitory, $\alpha 1$ -inhibitor proteinaz, rozedma płuc.

Summary: This paper contains a review of recent publications concerning specific, non-toxic serine proteinase inhibitors exhibiting *in vivo* activity. We present research strategies directed towards characterization of a factor able to diminish consequences of deficiency or malfunction of $\alpha 1$ -proteinase inhibitor a major serine proteinase inhibitor in human serum. A short characteristics of the factors including their putative therapeutic activity is presented.

Key words: serine proteinases, elastase, inhibitors, $\alpha 1$ -proteinase inhibitor, emphysema.

*Praca finansowana z projektu badawczego KBN nr 0639/P2/94/07.

Stosowane skróty: API – α 1-inhibitor proteinaz; HNE – ludzka elastaza neutrofilowa; PCI – p-nitrofenylo N-(bursztynylo-L-alanylo-L-alanylo-L-prolylo-metylo)-N-izopropylkarbaminian; PPCI – połączenie PCI z hydrofilowym polimerem: α , β -poli [N (2-hydroksyetylo)-D,L-aspartamidem]; SLPI – wydzielniczy leukocytny inhibitor proteinaz; SC-39026 – kwas benzoowy 2-chloro-4-l-hydroksyoktadecylowy.

Prawidłowy przebieg procesów zachodzących w organizmie jest uwarunkowany m.in. kontrolą aktywności enzymów proteolitycznych. Najszerzej rozpowszechnioną i najlepiej poznaną grupą enzymów proteolitycznych są proteinazy serynowe. Chroniczny brak równowagi między inhibitorami proteinaz serynowych a ich enzymami docelowymi prowadzi do szeregu schorzeń, takich jak: rozedma płuc, zapalenie trzustki, obrzęk naczynioruchowy czy niektóre choroby układu krzepnięcia krwi. Głównym inhibitorem proteinaz serynowych osocza ludzkiego jest α 1-inhibitor proteinaz (α 1-antyproteinaza, α 1-antyptrypsyna – API). API jest zdolny hamować niemalże wszystkie proteinazy serynowe u ssaków, jednakże pomiary stałej szybkości tworzenia kompleksów z różnymi proteinazami wskazują, że głównym docelowym enzymem dla tego inhibitora jest elastaza [63]. Stwierdzono, że stężenie 1,7 μ M inhibitora w płynie surowiczym nabłonka oddechowego wystarcza do ochrony tkanek płuc przed strawieniem przez elastazę [24]. Gen API wykazuje silny polimorfizm. Allele normalne charakterystyczne dla ludzi z prawidłowym poziomem aktywnego API w surowicy dominują w populacji stanowiąc 95% wszystkich alleli. Allele deficytowe powstały w wyniku mutacji punktowych. Najczęstsze allele w tej grupie występują w populacjach rasy kaukaskiej z częstością wahającą się od 1 do 4%. Mutacje punktowe typu zmiana fazy odczytu oraz mutacje nonsensowne są przyczyną całkowitego braku API w surowicy krwi. Występują one z częstością ok. 0,1% [30]. Niedobór lub wadliwe funkcjonowanie API, skorelowane z nadmierną aktywnością elastaz przyczynia się do rozwoju rozedmy płuc, choroby charakteryzującej się powiększeniem objętości pęcherzyków płucnych na skutek zaniku elementów sprężystych, pękania przegród międzypęcherzykowych i zmniejszenia liczby naczyń włosowatych. Zmniejszenie powierzchni kontaktu krwi z powietrzem doprowadza do niewydolności płuc objawiającej się postępującą dusznością. Zaburzenia genetyczne nie są jedynym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi rozedmy płuc. Potencjalne zagrożenie stanowią mogą również czynniki utleniające zarówno endogenne (uwalniane przez aktywowane granulocyty i makrofagi), jak i egzogenne (zawarte na przykład w dymie papierosowym). Spowodowane jest to wyeksponowaną, a przez to wyjątkowo podatną na utlenienie resztą metioniny w centrum reaktywnym inhibitora. Utlenienie *in vitro* tej krytycznej reszty do sulfotlenku metioniny prowadzi do tysiąc-krotnego obniżenia zdolności hamowania aktywności elastaz leukocytów [49].

Prace zmierzające do odkrycia środka, który niwelowałby skutki wynikające z braku lub wadliwego funkcjonowania API poszły w trzech kierunkach:

a) izolowania natywnego inhibitora z osocza osób zdrowych,

Poza wyżej wymienionymi inhibitorami w fazę badań nad zastosowaniem terapeutycznym weszło białko wyizolowane z pijawki lekarskiej, eglina c. Otrzymana w drodze rekombinacji eglina c ma taką samą sekwencję aminokwasów jak natywne białko (jedyną różnicę stanowi reszta kwasu octowego na N-końcu zrekombinowanego białka) i rozpoznawana jest przez przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko natywnemu białku. Wykazuje taką samą jak swój natywny odpowiednik aktywność inhibitorową w stosunku do elastazy, katepsyny G, chymazy i chymotrypsyny. Zastosowanie terapeutyczne tego inhibitora mogłoby mieć bardzo korzystne znaczenie ze względu na jego dużą stabilność, wynikającą z wysokiej odporności na atak proteinaz. Zaletą również jest to, że nie reaguje on z białkami układu krzepnięcia i fibrynolizy ani z czynnikami układu dopełniacza. Podany dotchawiczo chomikom na 8 godzin przed podaniem ludzkiej elastazy z neutrofilii skutecznie uniemożliwił rozwój rozedmy płuc. Również badania nad jego zastosowaniem w hamowaniu wstrząsu endotoksynowego i wstrząsu urazowego przeprowadzone na modelach zwierzęcych przyniosły bardzo obiecujące rezultaty. Niestety ponieważ wywoływał on silną reakcję alergiczną, zaniechano dalszych prac badawczych nad terapeutycznym zastosowaniem tego białka [51].

Wydajną ekspresję sklonowanego cDNA można osiągnąć zarówno w komórkach bakteryjnych, drożdżach, jak i w komórkach eukariotycznych. Ze względu na obróbkę potranslacyjną białka wskazane jest zastosowanie metod inżynierii genetycznej w celu ekspresji cDNA u organizmów eukariotycznych. Wykazano m.in. ekspresję API w oocytach *Xenopus levis* po mikroiniekcji mRNA [14], niemniej jednak doświadczenia w tym kierunku mają małe możliwości zastosowań praktycznych. Bardziej obiecujące wyniki uzyskano stosując zwierzęta transgeniczne. Wykazano ekspresję ludzkiego API u myszy transgenicznych poprzez hybrydyzację *in situ* [28]. Pokazano również wydzielanie ludzkiego API przez hepatocyty myszy transgenicznych [53]. Transplantując komórki transdukowane *in vitro* możliwe stało się rozwinięcie najbardziej spektakularnego i zarazem dyskusyjnego osiągnięcia inżynierii genetycznej – terapii genowej. Metodami terapii genowej próbuje się leczyć wiele schorzeń w tym również schorzenia wynikające z mutacji wewnątrz genu API [13,15,35,36,52,66]. Eksperymenty oparte na technice wprowadzania konstruktów zawierających ludzki API obejmowały doświadczenia zarówno na poziomie *in vitro*, jak i *in vivo*. W doświadczeniach *in vitro* infekowano komórki linii CHO i HeLa defektywnym adenowirusem przenoszącym gen ludzkiego API. W wyniku tej infekcji uzyskano ekspresję genu inhibitora w komórkach obu linii oraz wydzielanie API do pożywki, w której były one hodowane [17]. Również w hodowli pierwotnej komórek nabłonkowych szczura (*Sigmodon hispidus*) po transdukcji komórek konstruktem zawierającym gen ludzkiego API metodą hybrydyzacji *in situ* stwierdzono ekspresję genu i obecność transkryptu ludzkiego API. Równocześnie taki transkrypt nie był obecny w nieinfekowanych, świeżo pobranych komórkach nabłonkowych [46].

W przypadku rozedmy płuc możliwe jest dostarczanie prawidłowego genu bezpośrednio do komórek nabłonkowych płuc przez układ oddechowy. Wykorzystano tę dogodność w doświadczeniach *in vivo*. Szczurom dotchawczo podawano defektywne adenowirusy przenoszące gen ludzkiego API. Od dwóch dni do tygodnia po infekcji w płucach szczurów wykrywalny był transkrypt ludzkiego API. Stwierdzono również wydzielanie do płynu surowiczego nabłonka oddechowego API, który reagował z przeciwciałami dla ludzkiego inhibitora. W płucach szczurów, którym podano sól fizjologiczną lub adenowirusy z delecją rejonu Ela (blokującą zdolność wirusa do replikacji), nie stwierdzono obecności mRNA dla API [46]. Uzyskany po transdukcji komórek poziom API w płynie surowicznym nabłonka oddechowego był 50-krotnie niższy od stężenia inhibitora wystarczającego do ochrony tkanek płuc przed strawieniem przez elastazę. Teoretycznie można osiągnąć wystarczające stężenie inhibitora poprzez zwiększenie ilości wektorów w jednej dawce, dostarczenie wektorów w aerozolu (co zwiększyłoby powierzchnię poddawaną infekcji) czy też przez powtarzanie zabiegu. Zastosowanie adenowirusów jako wektora w przypadku transdukcji komórek nabłonkowych płuc jest uwarunkowane kilkoma czynnikami. Przede wszystkim podział komórek gospodarza (w tym wypadku komórek nabłonkowych) nie jest konieczny, aby zaszła ekspresja genów adenowirusa [6]. Ponadto adenowirusy są naturalnie pochłaniane przez komórki nabłonka, co ułatwia proces transdukcji. Adenowirusy jako wektory są również korzystne z tego względu, że nie integrując się z genomem gospodarza zmniejszają ryzyko rekombinacji genetycznych i związanych z tym mutacji [4, 6, 22].

Synteza API w hepatocytach jest 200-krotnie bardziej intensywna niż w innych badanych tkankach [37]. Dlatego też bardzo duże znaczenie terapeutyczne przywiązuje się do metod umożliwiających transdukcję genów do hepatocytów. Jedną z nich polega na izolacji komórek wątroby, transdukcji hodowli pierwotnej konstruktem zawierającym cDNA lub gen, którego ekspresję chcemy uzyskać i ponownym wprowadzeniu transdukowanych hepatocytów do organizmu. Doświadczenia, w których sprawdzano możliwość efektywnego wprowadzenia hepatocytów do organizmu, prowadzone były na myszach [21,43]. Świeżo wyizolowane hepatocyty z myszy transgenicznych wprowadzane były bezpośrednio do śledziony lub żyły wrotnej myszy pokrewnych. Wprowadzone komórki wędrowały do wątroby i stawały się jej funkcjonalną częścią. W doświadczeniach prowadzonych na psach pierwotną hodowlę hepatocytów psa transdukowano konstruktem zawierającym cDNA dla ludzkiego API pod kontrolą promotora wirusa cytomegalii. Wektorem przenoszącym informację genetyczną był defektywny retrowirus. Następnie przeprowadzono autoprzyszczep transdukowanych komórek, wstrzykując je do śledziony. Transdukowane hepatocyty migrowały do wątroby i przez 30 dni produkowały znaczne ilości inhibitora [26]. Z doświadczeń wynika, że ok. 5% masy wątroby może być transplantowane tą metodą. Ostateczny zanik ludzkiego API w osoczu psa, pomimo stwierdzonej zachowanej żywotności transdukowanych hepatocytów, sugeruje zaha-

- b) produkcji syntetycznych inhibitorów oraz dzięki rozwojowi metod inżynierii genetycznej możliwości uzyskiwania zrekombinowanych inhibitorów elastaz,
- c) leczenia zaburzeń genetycznych "u źródła" poprzez terapie genowe.

Najbardziej oczywistą metodą leczenia niedoborów API jest terapia polegająca na wprowadzeniu do organizmu chorego natywnego inhibitora, wyizolowanego z osocza ludzi zdrowych. W badaniach przedklinicznych prowadzonych na zwierzętach badano częściowo oczyszczony preparat API i wykazano, że pod względem biologicznym, immunologicznym i fizjologicznym zachowywał się prawie identycznie z naturalnie występującym API w osoczu ludzkim. Preparat ten testowano w wielu klinikach i określono, że dożylnie podawanie pacjentowi dawki API 60 mg/kg masy ciała raz w tygodniu przez okres kilku do kilkunastu miesięcy skutecznie przywracało prawidłowy poziom i ochronne działanie API w dolnych drogach oddechowych [9, 23]. Obecnie na rynku istnieje już lek na bazie natywnego API o nazwie handlowej ProLactin [51].

W celu przedłużenia czasu przebywania preparatu w osoczu, a tym samym zwiększenia skuteczności jego działania rozpoczęto badania nad modyfikowanymi chemicznie naturalnymi inhibitorami proteinaz serynowych. Wśród chemicznych modyfikacji bardzo popularne są modyfikacje syntetycznymi polimerami. Przedłużają one czas półtrwania preparatu w osoczu oraz zwiększają jego dostępność we krwi i tkankach. Ponadto polimery mogą maskować antygenowe determinanty w białkach o innym niż ludzkie pochodzeniu, a także zmieniać immunogenność szczepionek. Polimery można użyć również w celu zmiany biodystrybucji makrocząsteczki przez:

- a) modyfikacje zwiększające powinowactwo do błon biologicznych (użycie amfipatycznych polimerów),

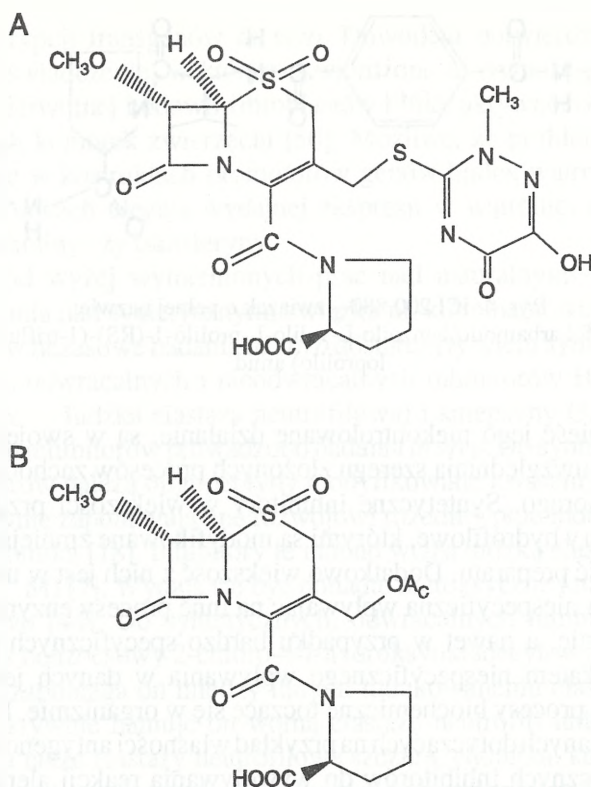
- b) specyficzne receptory, wiążąc końcowy ligand z polimerem.

Najczęściej używanym do modyfikacji białek polimerem jest glikol polietylenowy aktywowany karbonyldiimidazolem. Wybór uzasadniony jest jego komercyjną dostępnością, wysoce hydrofilową naturą cząsteczki oraz łatwością syntezy pochodnych. W przypadku API i wielu innych białek modyfikacje syntetycznymi polimerami rozwiązują problem gwałtownego usuwania tych preparatów z osocza. Na bazie modyfikacji glikolem polietylenowym wołowej deaminazy adenozykowej powstał lek o nazwie handlowej Adagen, stosowany w leczeniu złożonych niedoborów odpornościowych. Dalsze badania zmierzają w kierunku połączenia modyfikacji glikolem polietylenowym z metodami ukierunkowanej mutagenezy, celem uzyskania ściśle zdefiniowanych pochodnych [54].

Izolacja natywnego inhibitora pociąga za sobą problemy związane ze znalezieniem odpowiednich dawców oraz uzyskiwaniem wystarczającej dawki preparatu. Klonowanie i ekspresja określonego cDNA umożliwiła uzyskanie zrekombinowanych inhibitorów proteinaz serynowych. Dotychczas sklonowano i opisano sekwencje nukleotydowe między innymi dla następujących ludzkich inhibitorów: API [10,31,45], α 1-antychymotrypsyna [47], C1, inhibitor [61], inhibitor aktywatora

plazminogenu [18, 65], wydzielniczy leukocytny inhibitor proteinaz (ang.: *secretory leukocyte proteinase inhibitor* – SLPI [40], a ponadto dla szczurzego i króliczego API [8, 49], API świnki morskiej [59] oraz kontrapsyny świnki morskiej [59], myszy i szczura [58, 38]. Scharakteryzowana została również struktura genów kodujących serpiny, między innymi dla ludzkich API, ACT [5], PAI-1 [57], PAI-2 [1], szczurzego angiotensynogenu i API [60]. API produkowany jest głównie przez hepatocyty oraz przez fagocyty jednojądrzaste, monocyty krwi, makrofagi pęcherzyków płuc [37] i komórki nabłonkowe jelita [42]. Otrzymany w drodze rekombinacji genetycznej API (rAPI) uzyskany z organizmów prokariotycznych pozbawiony jest reszt cukrowych, które stanowią ok. 20% masy natywnego białka. Nie wpływa to jednak na jego efektywność hamowania elastazy czy katepsyny G. Doświadczenia przeprowadzone na chomikach wykazały, że rAPI w pełni hamuje rozwój rozedmy płuc indukowanej podaniem ludzkiej elastazy z neutrofilii. Dodatkową korzyścią wynikającą z możliwości terapeutycznego stosowania rAPI jest możliwość wprowadzenia mutacji w obrębie pojedynczych kodonów. Ponieważ ludzki API jest wrażliwy na utlenianie, uzyskano punktowe mutanty ze zmienionym centrum aktywnym o niezmienionej specyficzności, lecz odporne na utlenianie [11, 45, 62]. W ten sam sposób (podstawiając Arg 358 w miejsce Met 358) uzyskano zrekombinowany API o zmienionej specyficzności hamujący trombinę [16, 34]. Wadą rAPI, wynikającą z braku glikozylacji zrekombinowanego białka jest znacznie krótszy czas półtrwania w osoczu (1–2 godzin) w porównaniu z natywnym API (2–4 dni). Jednakże podanie rAPI w aerozolu zwiększa czas półtrwania zrekombinowanego inhibitora do kilkunastu godzin. Nie stwierdzono reakcji alergicznej po podaniu rAPI.

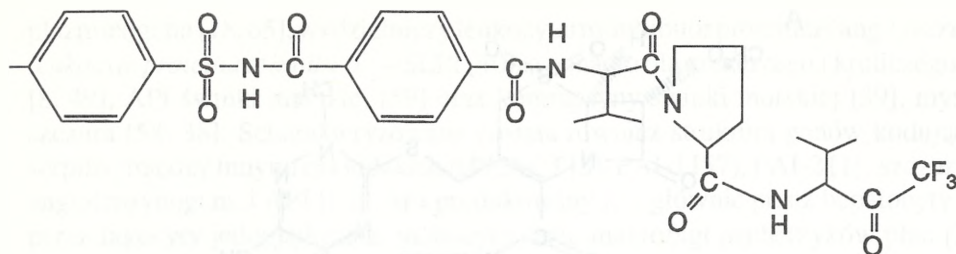
Innym sklonowanym inhibitorem, z którym wiąże się nadzieje na terapeutyczne zastosowanie, jest wydzielniczy leukocytny inhibitor proteinaz – SLPI. U człowieka jest on obecny we wszystkich wydzielinach śluzowych i w osoczu (w bardzo niskim stężeniu). W płucach jest syntetyzowany przez nieorzęsiony nabłonek oskrzelików i nabłonek górnych dróg oddechowych. Przyjmuje się, że podczas gdy API jest głównym inhibitorem kontrolującym aktywność elastaz w dolnych drogach oddechowych, SLPI jest głównym inhibitorem elastaz w górnych drogach oddechowych. Podobnie jak rAPI podany dotchawiczo rSLPI skutecznie hamował rozwój indukowanej elastazą rozedmy płuc u chomika. Stwierdzono również, że rSLPI hamuje zmiany morfologiczne komórek wydzielniczych oskrzelików [32] oraz rozedmę płuc indukowane podaniem chomikowi lipopolisacharydu [48]. rSLPI nie powodował reakcji alergicznej ani nie reagował z czynnikami dopełniacza. Skutkiem ubocznym podania dożylnego rSLPI był spadek ciśnienia i nieznaczne obniżenie krzepnięcia krwi. Stwierdzono, że czas przeżycia w krążeniu rSLPI po dożylnym podaniu wynosił u szczura 40 minut, a po podaniu bezpośrednio do płuc 4 godziny u szczura i 12 godzin u owcy. Istnieje również możliwość diagnostycznego zastosowania rSLPI w związku ze zmianami stężenia tego białka w osoczu osób z zapaleniem płuc [27].



Rys. 3. a) L-659,286; b) L-658,758

płuc przez inhalację wykazywał wysoką aktywność i długi czas życia w tkance płucnej, natomiast podany dożylnie był szybko usuwany z krwiobiegu. Podany w aerozolu chomikom przed wkropleniem HNE długotrwale hamował wywołane elastazą zaburzenia w dolnych drogach oddechowych. Obecnie preparat ten jest testowany u ludzi [64]. Syntetyczne inhibitory proteaz kaskady krzepnięcia zastosowano do obniżenia rozległej, wewnątrznaczyniowej krzepliwości krwi. Klinicznie stosowane są obecnie preparaty o nazwie handlowej Foy, Futhan i Miraclicid. Inhibitory te nie wymagają antytrombiny do swojej aktywności. Czas półtrwania tych związków we krwi wynosi kilkanaście minut i jest krótszy od czasu półtrwania heparyny [2].

Przedstawione kierunki poszukiwań skutecznego leku dla chorych z niedoborem lub wadliwym funkcjonowaniem API pozostają w większości przypadków w fazie badań na modelach zwierzęcych. Badania te ograniczają się przeważnie do wywołania rozedmy płuc lub innych jednostek chorobowych przez podanie ludzkiej elastazy neutrofilowej lub świńskiej elastazy trzustkowej wraz z podaniem badanego inhibitora. Modele, w których podaje się w nadmiarze jeden czynnik oraz czynnik, który



Rys. 4. ICI 200,880 – związek o pełnej nazwie:

4-(4-chlorofenylosulfokarbamoilo)benzoilo-L-valilo-L-proliło-1-(RS)-(1-trifluoroacetylb-2-metyloproliło) amid

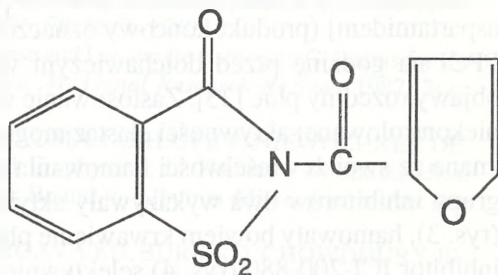
ma za zadanie znieść jego niekontrolowane działanie, są w swojej istocie bardzo uproszczone i nie uwzględniają szeregu złożonych procesów zachodzących w stanie patogennym u chorego. Syntetyczne inhibitory w większości przypadków są toksyczne, a polimery hydrofilowe, którymi są modyfikowane zmniejszają tylko częściowo szkodliwość preparatu. Dodatkowo większość z nich jest w mniejszym lub w większym stopniu niespecyficzna wpływając na inne procesy enzymatyczne zachodzące w organizmie, a nawet w przypadku bardzo specyficznych preparatów nie badano ich pod kątem niespecyficznego wpływania w danych jednostkach chorobowych na inne procesy biochemiczne toczące się w organizmie. Brakuje ponadto wyczerpujących danych dotyczących na przykład własności antygenowych preparatu, zdolności syntetycznych inhibitorów do wywoływania reakcji alergicznej, czy też innych skutków ubocznych u zwierząt i ludzi. Nie prowadzi się długoterminowych badań testowanych zwierząt. Nie ma też jednolicie przyjętego czasu, po jakim można uznać preparat za całkowicie bezpieczny. Równie dużo problemów i kontrowersji budzi terapia genowa. Nie ma całkowitej pewności co do aspektów związanych z bezpieczeństwem i późniejszymi możliwymi skutkami tego typu działań. Szeroka skala prowadzonych prac badawczych daje jednakże dużą nadzieję na uzyskanie skutecznych środków pozwalających leczyć dolegliwości osób z niedoborem lub wadliwym funkcjonowaniem inhibitorów enzymów proteolitycznych.

LITERATURA

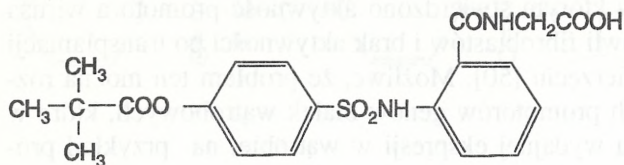
- [1] ANTALIS TM, CLARK MA, BARNES T, LEHRBACH PR, DEVINE PL, SCHEVZOV G, GOSS NH, STEPHENS RW, TOLSTOSHEV P. Cloning and expression of a cDNA coding for a human monocyte - derived plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**:985-989.
- [2] ARAMOTO H, SAITO H, SHIGEMATSU H, MUTO T. Synthetic Protease Inhibitors in the Treatment of Disseminated Intravascular Coagulation. *Nippon-Rinsho* 1993; **511**: 93-98.
- [3] ARDELT W, KOJ A, CHUDZIK J, DUBIN A. Inactivation of some pancreatic and leukocyte elastases by peptide chloromethyl ketones and alkyl isocyanates *FEBS Lett.* 1976; **67**: 156-160.

mowanie transkrypcji transgenów *in vivo*. Dowodem potwierdzającym tę ewentualność jest doświadczenie, w którym stwierdzono aktywność promotora wirusa cytomegalii w pierwotnej hodowli fibroblastów i brak aktywności po transplantacji transdukowanych komórek zwierzęciu [50]. Możliwe, że problem ten można rozwiązać używając w konstruktach promotorów genów białek wątrobowych, które w normalnych warunkach ulegają wydajnej ekspresji w wątrobie, na przykład promotora genu albuminy czy transferyny.

Niezależnie od wyżej wymienionych prac nad naturalnymi inhibitorami prowadzone są badania nad syntetycznymi związkami, które hamowałyby enzymy proteolityczne. Dotychczasowe badania *in vitro* dostarczyły wielu syntetycznych, niskocząsteczkowych, odwracalnych i nieodwracalnych inhibitorów HNE (ang.: *human neutrophil elastase* – ludzka elastaza neutrofilowa) i katepsyny G, jednakże tylko z niektórymi z tych inhibitorów prowadzono badania *in vivo*. Do syntetycznych, odwracalnych inhibitorów należą oligopeptydy modyfikowane kwasem borowym. Wykazano, że efektywnie zapobiegają one rozwojowi rozedmy płuc indukowanej elastazą trzustkową u chomika [18]. Inhibitory te mocno wiążą ludzką elastazę neutrofilową ($K_i = 5,7 \times 10^{-10}$ M) [7]. Wydają się być ponadto nietoksyczne i mają wystarczającą stabilność *in vivo* [44]. Do syntetycznych, odwracalnych inhibitorów należy też SC-39026: kwas benzoowy 2-chloro-4-*l*-hydroksyoktadecylowy. Podany z pokarmem szczurom zapobiega on między innymi indukowanemu elastazą nadciśnieniu płucnemu. Selektynie hamuje on wolną elastazę neutrofilów ludzkich, kompleksy HNE-elastyna, a także elastazy neutrofilowe szczura, chomika, królika i świni [38]. Szeroko badane pod względem terapeutycznym były chlorometyloketony oligopeptydów należące do syntetycznych, nieodwracalnych inhibitorów, takie jak butyloksykarbonylo-Ala₃-CH₂Cl [3] czy N-bursztynylometylo-Ala₂-Pro-Val-CH₂Cl [7]. Wykazano, że dootrzewnowe podanie chlorometyloketonów równocześnie z elastazą chroni tkankę płucną zwierząt przed uszkodzeniami powodowanymi enzymem. Stwierdzono jednakże toksyczne działanie tych związków objawiające się ogniskowymi, śródmiąższowymi chorobami nerek [20, 55]. Terapeutyczne właściwości syntetycznych inhibitorów mogą być wzmocnione, a ich ewentualny toksyczny efekt zredukowany, jeżeli są podane bezpośrednio do płuc poprzez nośnik. W tym celu opracowano preparatykę prowadzącą do otrzymania chlorometyloketonów oligopeptydów kowalencyjnie połączonych z dostępnymi w handlu mikrocząstkami ludzkiej albuminy. Związki te podane przed ekspozycją płuc na działanie elastazy spełniały rolę ochronną w doświadczalnie wywołanej rozedmie płuc, co wykazywano poprzez badania histologiczne płuc [20]. Z innych,



Rys. 1. Furoilosacharyna



Rys. 2. ONO-5046 – związek o pełnej nazwie: N-[2-[4-(2,2-dimetylopropionyloksy)fenylosulfoniloamino]benzoilo] kwas aminooctowy

mniej badanych syntetycznych, nieodwracalnych inhibitorów potencjalnie terapeutyczne znaczenie mogą mieć azolid estru metylowego L-norwaliny związek o strukturze:



oraz furoilosacharyna (rys. 1). Drugi z wymienionych związków hamuje elastazę rozszczepiającą wiązanie CON w pierścieniu inhibitora. Zacylowany enzym deacyluje niezmiernie wolno ($k_{\text{cat}} = 1,4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ dla elastazy leukocytów) [7]. Badania obu związków *in vivo* wykazały ich ochronne działanie w rozwoju rozedmy płuc u zwierząt doświadczalnych [19]. Poszukiwania wśród szerokiej gamy syntetycznych inhibitorów zmierzają w kierunku znalezienia wysoce specyficznych inhibitorów elastazy neutrofilii, które zachowywałyby swą aktywność również podane dożylnie. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że ONO-5046 (rys. 2) selektywnie hamuje aktywność wieprzowej elastazy trzustkowej oraz ludzkiej elastazy neutrofilowej, a także elastazy leukocytów królika, szczura, chomika i myszy. W badaniach *in vivo* ONO-5046 podany dotchawiczo hamuje krwawienie płucne, natomiast podany dożylnie skutecznie hamuje nadmierną przepuszczalność skóry u zwierząt doświadczalnych, oba objawy wywołane wcześniejszym podaniem elastazy [25]. Krwawienie płucne u chomika, indukowane HNE hamują również podane dotchawiczo oligopeptydy modyfikowane karbaminianami, pełna nazwa przykładowego związku:

p-nitrofenyloN-(bursztynylo-L-alanylo-L-alanylo-L-prolylo-metylo)-N-izopropylkarbaminian (PCI).

Nie łagodzą one jednak indukowanej HNE rozedmy płuc u tych zwierząt [56]. Połączenie PCI z hydrofilowym polimerem: α, β , -poli [N(2-hydroksyetylo)-D,L-aspartamidem] (produkt końcowy oznaczony w skrócie PPCI) sprawiło, że podanie PPCI na godzinę przed dotchawicznym wkropleniem elastazy znacznie łagodziło objawy rozedmy płuc [33]. Zastosowanie w leczeniu schorzeń powstałych w wyniku niekontrolowanej aktywności elastaz mogą znaleźć również obojętne cefalosporyny, znane ze swoich właściwości hamowania proteinaz serynowych bakterii. Wśród tej grupy inhibitorów dwa wykazywały aktywność *in vivo*: L-659,286 oraz L-658,758 (rys. 3), hamowały bowiem krwawienie płucne u chomika [12]. Zsyntetyzowano też inhibitor ICI-200-880 (rys. 4) selektywnie i mocno wiążący się z HNE ($K_i = 5,0 \times 10^{-10} \text{ M}$) i znacznie słabiej ze świńską elastazą trzustkową. Podany bezpośrednio do

- [4] BALLAY A, LEVRERO M, BUENDIA MA, TIOTLAIS P, PERRICAUDET M. *In vitro* and *in vivo* synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses. *EMBO J* 1985; **4**: 3861–3865.
- [5] BAO J, SIFERS RN, VINCENT JK, LEDLEY FD, WOO SLC. Molecular evolution of serpins: homologous structure of the human α_1 -antichymotrypsin and α_1 -antitrypsin genes. *Biochemistry* 1987; **26**: 7755–7759.
- [6] BERKNER KL. Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques* 1988; **6**: 616–629.
- [7] BIETH JG. Elastases: Catalytic and Biological Properties. w: Regulation of Matrix Accumulation Mecham RP. (ed.) Academic Press, Inc. Orlando, Toronto, 1986; 217–320.
- [8] CHAO S, CHAI KX, CHAO L, CHAO J. Molecular cloning and primary structure of rat α_1 -antitrypsin. *Biochemistry* 1990; **29**: 323–329.
- [9] COAN MH. Purification of Alpha-1-Proteinase Inhibitor Preparation and Properties of a Therapeutic Concentrate. *The American Journal of Medicine* 1988; **84**: 32–36.
- [10] COURTNEY M, BUCHWALDER A, TESSIER L, JAYE M, BENAVENTE A, BALLAND A, KOHLI V, TOTSTASHEV P, LACOCQ J. High-level production of biologically active human α_1 -antitrypsin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 669–673.
- [11] COURTNEY M, JALLAT S, TESSIER L, BENAVENTE A, CRYSTAL RG, LECOCQ J. Synthesis in *E. coli* of α_1 -antitrypsin variants of therapeutic potential for emphysema and thrombosis. *Nature* 1985; **313**: 149–151.
- [12] DAVIES P, ASHE BM, BONNEY RJ, DORN C, FINKE P, FLETCHER D, HANLON WA, HUMES JL, MAYCOCK A, MUMFORD RA, NAVIA MA, OPAS EE, PACHOLOKS, SHAH S, ZIMMERMAN M, DOHERTY JB. The Discovery and Biologic Properties of Cephalosporin Based Inhibitors of PMN Elastase. w: Pulmonary Emphysema, The Rationale for Therapeutic Intervention. Weinbaum G, Giles RE, Krell RD. (ed.) *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; **624**: 219–229.
- [13] DODET B. Commercial prospects for gene therapy a company survey. *TIBTECH* 1993; **11**: 182–189.
- [14] ERRINGTON DM, BATHURST IC, CARRELL RW. Human α_1 -antitrypsin expression in *Xenopus* oocytes. *Eur J Biochem* 1985; **153**: 361–365.
- [15] FRIEDMANN T, JINNAH HA. Gene therapy for disorders of the nervous system. *TIBTECH* 1993; **11**: 192–197.
- [16] GEORGE PM, PEMBERTON P, BATHURST JC, CARRELL RW, GIBSON HL, ROSENBERG S, HALLEWELL RA, BARR PJ. Characterization of antithrombins produced by active site mutagenesis of human α_1 -antitrypsin expressed in yeast. *Blood* 1989; **74**: 490–496.
- [17] GILARDI P, COURTNEY M, PAVIARANI A, PERRICAUDET M. Expression of human alpha α_1 -antitrypsin using a recombinant adenovirus vector. *FEBS Lett* 1990; **267**: 60–62.
- [18] GINSBURG D, ZEHEB R, YANG AY, REFFERTY UM, ANDREASEN PA, NIELSEN L, DANO K, LEBO RV, GELEHRTER TD. cDNA cloning of human plasminogen activator - inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest* 1986; **78**: 1673–1680.
- [19] GROUTAS WC. Inhibitors of Leukocyte Elastase and Leukocyte Cathepsin G Agents for the Treatment of Emphysema and Related Ailments. *Medicinal Research Reviews* 1987; **7**(2): 227–241.
- [20] GUDAPATY SR, LIENER IE, HOIDAL JR, PADMANABHAN RV, NIEWOEHNER DE, ABEL J. The Prevention of Elastase Induced Emphysema in Hamsters by Intratracheal Administration of a Synthetic Elastase Inhibitor Bound to Albumin Microspheres. *Am Rev Respir Dis* 1985; **132**: 159–163.
- [21] GUPTA S, ARAGONA E, VERMU RP, BHARGAVA KB, BURK RD, CHOWDHURY JR. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver implications for gene therapy and liver repopulation. *Hepatology* 1991; **14**: 144–149.

- [22] HAJ-AHMAD Y, GRAHAM FL. Development of a helper - independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *J Virol* 1986; **57**: 267-274.
- [23] HUBBARD RC, CRYSTAL RG. Alpha-1 Antitrypsin Augmentation Therapy for Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *The American Journal of Medicine* 1988; **84**: 52-62.
- [24] HUBBARD RC, CRYSTAL RG. Strategies for aerosol therapy of alpha-1-antitrypsin deficiency by the aerosol route. *Lung* 1990; **168** (suppl): 565-578.
- [25] KAWABATA K, SUZUKI M, SUGITANI M, IMAKI K, TODA M, MIYAMOTO T. ONO-5046, a Novel Inhibitor of Human Neutrophil Elastase *Biochem Biophys Res Comm* 1991; **177**: 814-820.
- [26] KAY MA, BAILEY P, ROTHENBERG S, LELAND F, FLEMING L, PONDER KP, LIU T, FINEGOLD M, DARLINGTON G, POKORNY W, WOO SLC. Expression of human α_1 -antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 89-93.
- [27] KINDA K, MIZUUCHI T, TAKEYAMA K, HIRATSUKA T, JINNO S., HOSODA K, IMAIZUMI A, SUZUKI Y. Serum secretory leukoprotease inhibitor levels to diagnose pneumonia in the elderly. *Am Rev Respir Dis* 1992; **146**(6): 1426-1429.
- [28] KOOPMAN P, POVEY S, LOVELL-BADGE RH. Wildspread expression of human α_1 -antitrypsin in transgenic mice revealed by *in situ* hybridization. *Genes Dev* 1989; **3**: 16-5.
- [29] KORDULA T, DUBIN A, SCHOOLTINK H, KOJ A, HEINRICH PC, ROSE-JOHN S. Molecular cloning and expression of an intracellular serpin: an elastase inhibitor for horse leukocytes. *Biochem J* 1993; **293**: 187-193.
- [30] KOWALSKA A. Polimorfizm genu alfa₁-antitrypsyny (locus Pi inhibitora proteaz). *Postępy Biochemii* 1993; **4**: 236-241.
- [31] LONG LG, CHANDRA T, WOO SLC, DAVIE EW, KURACHI K. Complete sequence of the cDNA for human α_1 -antitrypsin and the gene for S variant. *J Biol Chem* 1984; **23**: 4828-4837.
- [32] LUCEY EC, STONE PJ, CICCOLELLA DE, BREUER R, CHRISTENSEN TG, THOMPSON RC, SNIDER GL. Recombinant human secretory leukocyte-protease inhibitor *in vitro* properties, and amelioration of human neutrophil elastase-induced emphysema and secretory cell metaplasia in hamster. *J Lab Clin Med* 1990; **115**(2): 224-232.
- [33] LUCEY EC, STONE PJ, DIGENIS GA, SNIDER GL. A Polymer - Bound Elastase Inhibitor is Effective in Preventing Human Neutrophil Elastase - Induced Emphysema, w: Pulmonary Emphysema, The Rationale for Therapeutic Intervention Weinbaum G, Giles RE, Krell RD (ed.) . *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; **624**: 341-342.
- [34] MATHENSON NR, GIBSON HL, HALLEWELL RA, BARR PJ, TRAVIS J. Recombinant DNA - derived forms of human 1- proteinase inhibitor *J Biol Chem* 1986; **261**: 10404-10409.
- [35] MEAGER A, GRIFFITHS E. Human somatic gene therapy. *TIBTECH* 1994; **12**: 108-113.
- [36] MITANI T, CASKEY CT. Delivering therapeutic genes-matching approach and application. *TIBTECH* 1993; **11**: 162-166.
- [37] MORNEX JF, CHYTIŁ-WEIR A, MARTINET Y, COURTNEY M, LECOQ JP, CRYSTAL RG. Expression of the alpha-1- antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin- deficient individuals *J Clin Invest* 1986; **77**: 1952-1961.
- [38] NAKAO A, PARTIS RA, JUNG GP, MUELLER RA. SC-39026, a Specific Human Neutrophil Elastase Inhibitor. *Biochem Biophys Res Comm* 1987; **147**(2): 666-674.
- [39] OHKUBO K, OGATA S, MISUMI Y, TAKAMI N, IKEHARA Y. Molecular cloning and characterization of rat contrapsin - like protease inhibitor and related proteins. *J Biochem* 1991; **109**: 243-250.
- [40] OHLSSON K, ROSENGREN w: Pulmonary Emphysema and Proteolysis. Taylor JC, Mitman C (ed.) Academic Press, Inc. Orlando, Fl. 1987; 307-322.

- [41] PADRINES M, SCHNEIDER-POZZER M, BIETH JG. Inhibition of neutrophil elastase by alpha1-proteinase inhibitor oxidized by activated neutrophils. *Am Rev Respir Dis* 1989; **139**: 783–790.
- [42] PERLMUTTER DH, COLE FS, KILBRIDGE P, ROSSING TH, COLTEN HR. Expression of the alpha1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**:795–799.
- [43] PONDER KP, GUPTA S, LELAND F, DARLINGTON G, FINEFOLD M, DEMAYO J, LEDLEY J, CHOWDHURY JR, WOO SLC. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1217–1221.
- [44] POWERS JM, BENGALI ZB. Elastase Inhibitors for Treatment of Emphysema Approaches to Synthesis and Biological Evaluation. *J Enzyme Inhibition* 1987; **1**: 311–319.
- [45] ROSENBERG S, BARR PJ, NAJARIAN RC, HALLEWEL RA. Synthesis in yeast of functional oxidation-resistant mutant of human α 1-antitrypsin. *Nature* 1984; **312**: 77–80.
- [46] ROSENFELD MA, SIEGFRIED W, YOSHIMURA K, YONEYAMA K, FUKAYAMA M, STIER LE, PAAKKO PK, GILARDIP, STRATFORD-PERRICAUDET LD, PERRICAUDET M, JALLAT S, PAVIRANI A, LECOCQ JP, CRYSTAL RG. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant α 1-antitrypsin gene to the lung epithelium *in vivo*. *Science* 1991; **252**: 431–434.
- [47] RUBIN H, WANG Z, NICKBARG EB, McLARNEY S, NAIDOO N, SCHOENBERGER OL, JOHNSON JL, COOPERMAN BS. Cloning, expression, purification and biological activity of recombinant native and variant human α 1-antichymotrypsin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 1199–1207.
- [48] RUDOLPHUS A, STOLK J, DIJKMAN JH, KRAMPS JA. Inhibition of lipopolysaccharide-induced pulmonary emphysema by intratracheally instilled recombinant secretory leukocyte proteinase inhibitor. *Am Rev Respir Dis* 1993; **174**(2): 442–447.
- [49] SAITO A, SINOHARA H. Cloning and Sequencing of cDNA coding for rabbit α -1-antiproteinase F: amino acid sequence comparison of α -1-antiproteinases of six mammals. *J Biochem* 1991; **109**: 158–162.
- [50] SCHARFMANN R, AXELROD JH, VERMA IM. Long-term *in vivo* expression of retrovirus - mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4626–4630.
- [51] SCHNEBLI HP. Recombinant Elastase Inhibitors for Therapy. w: Pulmonary Emphysema, The Rationale for Therapeutic Intervention. Weinbaum G, Giles RE, Krell RD. (ed.) *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; **624**: 212–218.
- [52] SIEGFRIED W. Perspectives in gene therapy with recombinant adenoviruses. *Exp Clin Endocrinol* 1993; **101**:7–11.
- [53] SIFERS NR, ROGERS BB, HAWKINS HK, FINEGOLD MJ, WOO SLC. Elevated synthesis of human α 1-antitrypsin hinders the secretion of murine α 1-antitrypsin from hepatocytes of transgenic mice. *J Biol Chem* 1989; **264**: 15696–15700.
- [54] SMITH RAG, DEWDNEY JM, FEARS R, POSTE G. Chemical derivatization of therapeutic proteins. *TIBTECH* 1993; **11**: 397–403.
- [55] SNIDER GL, STONE PJ, LUCEY EL, BREUER R, CALORE JD, SESHADRI T, CA TANESE A, MASHLER R, SCHEBLI HP. Eglin-C, a Polypeptide Derived from the Medicinal Leech, Prevents Human Neutrophil Elastase - Induced Emphysema and Bronchial Secretory Cell Metaplasia in the Hamster. *Am Rev Respir Dis* 1985; **132**: 1155–1161.
- [56] STONE PJ, LUCEY EC, NOSKOVA D, DIGENIS GA, SNIDER GL. Covalently Linking a Peptidyl Carbamate Elastase Inhibitor to a Hydrophilic Polymer Increases its Effectiveness in Preventing Emphysema and Secretory Cell Metaplasia in the Hamster. *Am Rev Respir Dis* 1992; **146**(2): 457–461.
- [57] STRANDBERG L, LAWRENCE D, NY T. The organization of the human-plasminogen activator-inhibitor-1 gene. *Eur J Biochem* 1988; **176**: 609–616.

- [58] SUZUKI Y, YAMAMOTO K, SINOHARA H. Molecular cloning and sequence analysis of full-length cDNA coding for mouse contrapsin. *J Biochem* 1990; **108**: 344–346.
- [59] SUZUKI Y, YOSHIDA K, HONDA E, SINOHARA H. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for guinea pig α_1 -antitrypsinases S and F and contrapsin. *J Biol Chem* 1991; **266**: 928–932.
- [60] TANAKA T, OKHUBO H, NAKANISHI S. Common structural organisation of the angiotensinogen and the α_1 -antitrypsin genes. *J Biol Chem* 1984; **259**: 8063–8065.
- [61] TOSI M, DUPONCHEL C, BOURGAREL P, COLOMB M, MEO T. Molecular cloning of human C1 inhibitor sequence homologies with α_1 -antitrypsin and other members of the serpin superfamily. *Gene* 1986; **42**: 265–272.
- [62] TRAVIS J, OWEN M, GEORGE P, CARREL R, ROSENBERG S, HALLEWELL RA, BARR PJ. Isolation and properties of recombinant DNA produced variants of human α_1 -proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1985; **260**: 4384–4389.
- [63] TRAVIS J, SALVESEN G. Human plasma proteinase inhibitor. *Annu Rev Biochem* 1983; **52**: 655–709.
- [64] WILLIAMS JC, STEIN RL, GILES RE, KRELL RD. Biochemistry and Pharmacology of ICI 200-880, a Synthetic Peptide Inhibitor of Human Neutrophil Elastase w: Pulmonary Emphysema, The Rationale for Therapeutic Intervention. Weinbaum G, Giles RE, Krell RD. (ed.) *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; **624**: 230–243.
- [65] YE RD, WUN T, SADLER JE. cDNA cloning and expression in *Escherichia coli* of a plasminogen activator inhibitor from human placenta. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3718–3725.
- [66] ZABNER J, COUTURE LA, GREGORY RJ, GRAHAM SM, SMITH AE, WELSH MJ. Adenovirus-mediated gene transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 1993; **75**: 207–216.

A. Kasza, A. Łączka
Instytut Biologii Molekularnej UJ
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

ANTYBAKTERYJNE BIAŁKA I PEPTYDY LUDZKICH NEUTROFILII. W POSZUKIWANIU NOWYCH ANTYBIOTYKÓW*

ANTIBACTERIAL PROTEINS AND PEPTIDES
OF HUMAN NEUTROPHILS. IN SEARCH OF NEW ANTIBIOTICS

PAWEŁ MAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. W pracy przedstawiono przegląd współczesnej wiedzy na temat niezależnego od tlenu, nieenzymatycznego zabijania mikroorganizmów przez neutrofile – najistotniejsze komórki fagocytykujące ludzkiego organizmu. Mechanizm ten wykorzystuje niespecyficzne działanie białek i peptydów obecnych w ziarnistościach pierwotnych i wtórnych oraz w cytoplazmie. Do substancji, których działanie antybakteryjne nie jest związane z normalnie przypisywanymi im właściwościami enzymatycznymi czy fizjologicznymi, należą: a) bakteriobójczy czynnik zwiększający przepuszczalność błon, b) tzw. serprocydyny – antybakteryjne proteinazy serynowe (elastaza, katepsyna G, proteinaza 3 oraz nieaktywny proteolitycznie ich homolog – azurocydyna), c) tzw. defensyny – grupa antybakteryjnych peptydów ziarnistości pierwotnych, d) powszechnie znane białka – lizozym i laktoferyna oraz e) cytoplazmatyczny kompleks określany mianem kalprotektyny. Oprócz krótkiej charakterystyki przedstawiono hipotezy dotyczące mechanizmów działania tych czynników oraz wyniki badań prowadzonych w celu opracowania nowych, skutecznych antybiotyków.

Słowa kluczowe: aktywność bakteriobójcza krwi, neutrofile, chemia czynników bakteriobójczych, cytotoxycywność.

Summary. In this study, the review of contemporary knowledge about oxygen-independent, nonenzymatic microorganisms killing by important phagocytic cells of human organism – neutrophils, was presented. This mechanism utilizes an unspecific action of proteins and peptides, that are present within primary and secondary granules and in cytosol. To the factors, whose antimicrobial properties are not associated with their normal enzymatic and physiological role, belongs:

*Praca wykonana w ramach projektu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych nr PB 0639/P2/94/07.

a) bactericidal/permeability increasing factor, b) serprocidins – antimicrobial serine proteinases (elastase, cathepsin G, proteinase 3 and proteolytic inactive homolog – azurocidin), c) defensins – a family of antimicrobial peptides of primary granules, d) the well-known proteins – lysozyme and lactoferrin and e) cytosolic complex – calprotectin. Except short characterization, the actual hypothesis of mechanisms of action were described and the results of some investigations, that lead to new, effective antibiotics, were presented.

Key words: blood bactericidal activity, neutrophils, antiinfective agents chemistry, cytotoxicity.

Wykaz skrótów: AGP7 – białko 7 ziarnistości azurofilnych, BP – białko bakteriobójcze, BPI – bakteriobójcze białko zwiększające przepuszczalność błon, CAP – kationowe białko bakteriobójcze, Gr⁻ – bakterie gramujemne, Gr⁺ – bakterie gramododatnie, HBP – białko wiążące heparynę, HSV – wirus *Herpes simplex*, LBP – białko wiążące lipopolisacharyd, LPS – lipopolisacharyd (endotoksyna), NK – limfocyty zabijające, TNF – czynnik nekrozy nowotworów.

1. WPROWADZENIE

Jako komórki żerne znacznie przewyższające liczebnością inne fagocyty – makrofagi, monocyty i eozynofile – granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) spełniają w nieswoistej, a w szczególności przeciwwakacyjnej odpowiedzi immunologicznej organizmu bardzo ważną rolę [27]. Uwalniane w miejscu inicjowanej odpowiedzi zapalnej lub immunologicznej czynniki chemotaktyczne powodują przemieszczanie się neutrofilów w tym kierunku, lokalny zaś wzrost przepuszczalności naczyń ułatwia ich migrację. Mikroorganizmy ulegają fagocytozie, która poprzedza ich zabicie i strawienie w fagolizosomie powstałym w wyniku fuzji fagosomu z lizosomem pierwotnym. Proces zabijania drobnoustrojów odbywa się tzw. drogą zależną od tlenu, zapoczątkowaną aktywacją oksydazy NADPH i m.in. przy udziale mieloperoksydazy prowadzi do powstania toksycznych, wysoce reaktywnych związków – nadtlenu wodoru, rodników hydroksylowych, tlenu singletowego, kwasu podchlorawego oraz chloramin. Mechanizmami biegnącymi równolegle, wyłącznymi w przypadku mikroorganizmów nie stymulujących syntezy reaktywnych związków tlenowych, jest zabijanie niezależne od tlenu. Wiąże się ono z obecnością w lizosomach pierwotnych (zwanych też ziarnistościami azurofilnymi), a w mniejszym stopniu również i w ziarnistościach wtórnych oraz w cytoplazmie szeregu białek i peptydów o działaniu bakteriostatycznym i bakteriobójczym. Są to zarówno duże białka, np. czynnik bakteriobójczy zwiększający przepuszczalność błon, jak i kilkudziesięcioaminokwasowe peptydy – defensyny. Należy tutaj również bakteriobójcza rodzina homologów proteinaz serynowych, tzw. serprocydyny (elastaza, katepsyna G, proteinaza 3, azurocydyna), kalprotektyna oraz powszechnie znane białka – lizozym i laktoferyna. W pracy niniejszej przedstawiono najważniejsze z doniesień dotyczących tych białek i peptydów ludzkich neutrofilów, których zdolności do zabijania mikroorganizmów nie są związane z ich ewentualną aktywnością enzymatyczną. W ostatnich latach związki te

cieszyły się znacznym zainteresowaniem badaczy, co wynikało zarówno z eksploracji ciekawego obszaru z pogranicza nauk podstawowych, medycyny i farmakologii, jak i z potencjalnie bardzo chłonnym na skuteczniejsze antybiotyki rynkiem zbytu dla firm farmaceutycznych i biotechnologicznych.

2. BAKTERIOBÓJCZY CZYNNIK ZWIĘKSZAJĄCY PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON (BPI)

BPI (inne określenia spotykane w literaturze: CAP57, BP) jest bogatym w lizynę, nieenzymatycznym białkiem o m. cz. 55–58 kDa, stanowiącym ok. 0,3% całkowitego białka neutrofilii [53]. Jest syntetyzowany i pakowany do ziarnistości azurofilnych tylko podczas promielocytarnych i mielocytarnych stadiów rozwoju neutrofilii. Nie wykryto go w innych liniach komórkowych człowieka.

Kodowany jest przez gen zlokalizowany w tym samym miejscu chromosomu 20 co gen kodujący LBP (białko wiążące lipopolisacharyd należące do białek ostrej fazy, uwalniane podczas infekcji bakteriami Gr^-) i wykazuje do tego białka duże podobieństwo strukturalne [23]. Wykazano również, że białko wiążące lipopolisacharyd obecne na powierzchni neutrofilii jest identyczne z BPI [56]. Już wcześniej domyślano się, że natywny BPI działa w stanie związanym z membranami, ponieważ jego C-końcowy fragment jest hydrofobowy i może doskonale spełniać funkcję kotwiczącą. Przynależność do rodziny białek wiążących lipopolisacharyd (LPS) jest jedną z podstawowych cech BPI. Wykazano, że za wiązanie z lipidem A (silnie konserwatywnym fragmentem cząsteczki LPS), odpowiedzialny jest 199-aminokwasowy, N-końcowy fragment BPI, który otrzymano już w drodze rekombinacji [21]. Ten 25 kDa fragment łączy się przy tym z częścią kotwiczącą odcinkiem o sekwencji potencjalnie rozszczepianej przez elastazę [31]. Ponieważ uwalnianie LPS (endotoksyny) podczas infekcji bakteriami Gr^- inicjuje kaskadę cytokin powodując w efekcie szok, uszkodzenia wielonarządowe i nawet śmierć, sugestia zastosowania terapeutycznego BPI jest bardzo wyraźna [34]. Efekt letalny wywołuje BPI już w ilościach 0,1–5 $\mu\text{g/ml}$ w zależności od szczepu bakterii [53]. Antybakteryjna domena BPI ma zarówno właściwości amfipatyczne, jak i kationowe, manifestując swe zdolności zabójcze wyłącznie wobec bakterii Gr^- , optimum działania wykazując w pH neutralnym, przy stosunkowo małej wrażliwości na zmiany siły jonowej [31]. Poznanie mechanizmu działania tego czynnika wymaga jeszcze wielu badań, wiadomo już jednak, że w pierwszym etapie BPI lub też jego antybakteryjna domena w odwracalny sposób wiąże się z powierzchnią zewnętrzną błony komórki bakteryjnej, nie dopuszczając do jej wzrostu i podziału, zaś w etapie drugim, nieodwracalnym, w znacznie większym stopniu wrażliwym na zmiany pH, indukuje zabójczy dla komórki wzrost przepuszczalności błony i wpływ metabolitów. Nieznaną dotychczas drogą dochodzi do

aktywacji bakteryjnych enzymów degradujących fosfolipidy i peptydoglikany [31,-33]. Wykazano również, że BPI i jego N-końcowy fragment jest zdolny do zabijania bakterii Gr⁻ w pełnej krwi, i to nawet w przypadku szczepów opornych na inne osoczowe mechanizmy inaktywacji drobnoustrojów. BPI hamuje jednocześnie indukowane bakteryjnie wydzielanie TNF [57].

3. SERPROCYDYNY

Ziarnistości azurofilne zawierają grupę proteinaz serynowych, do których należą elastaza, katepsyna G, proteinaza 3 oraz nieaktywna enzymatycznie azurocydyna. Wszystkie te białka mają prawdopodobnie wspólne pochodzenie ewolucyjne oraz wysoki stopień homologii, wyrażający się podobieństwem centrum aktywnego i miejsca wiążącego substrat oraz podobieństwami w sekwencji i strukturze przestrzennej. Odgrywają one istotną rolę w bardzo wielu procesach fizjologicznych [3]. W 1975 roku po raz pierwszy wykazano zdolności dwóch z tych białek (katepsyny G i elastazy) do zabijania bakterii [43] – i w związku z tymi właśnie bakteriobóczymi właściwościami utworzono wspólne określenie tej grupy białek – serprocydyny (od słów angielskich *SER*ine *PRO*teinase *bacteriCID*al *proteins*). Nie znaleziono w literaturze sugestii o ewolucyjnym rodowodzie takich właściwości wśród proteinaz serynowych.

3.1. ELASTAZA

Antybakteryjne właściwości elastazy [4] są niezależne od aktywności proteolitycznej enzymu [43]. Aktywny enzym degradując białka otoczki komórki bakteryjnej może jednak w znacznym stopniu wzmacniać efekt działania innych czynników bakteriobójczych. Wykazano ponadto inne, nieenzymatyczne, synergistyczne wzmacnianie aktywności bakteriobójczej katepsyny G i azurocydyny [40], oraz zdolność do uwalniania z natywnego BPI 25 kDa domeny antybakteryjnej [31]. Szczegółowych prac nad antybakteryjnym działaniem elastazy dotychczas nie prowadzono, z wyjątkiem określania wrażliwości konkretnych patogenów [35]. Ostatnio na podstawie ok. 40% homologii antybakteryjnej domeny azurocydyny z resztami 20–44 elastazy zsyntetyzowano jej bakteriobójczy peptyd (LRGGHF⁺CGATLIAPNFVMSAAHC-VA), przy czym ogólnie działał on na testowy szczep bakterii Gr⁻ w większych stężeniach niż jego azurocydynowy odpowiednik, wykazując równocześnie bardziej stromą zależność zdolności bakteriobójczych od dawki [45]. Wykazano również [39], że w pobliżu N-końca elastazy znajduje się sekwencja IVGGR, która jest odpowiednikiem jednej z najbardziej bakteriobójczych domen katepsyny G (IIGGR). Jak wynika z badań porównawczych [1], aby wykazać efekt bakteriobójczy peptydu IVGGR wobec *Neisseria gonorrhoeae* i *Staphylococcus aureus* konieczne jest jednak średnio ok. dwa razy większe jego stężenie niż peptydu IIGGR i ponadto peptyd

elastazy w odróżnieniu od swego katepsynowego odpowiednika okazuje się być całkowicie nieaktywny wobec patogenów jamy ustnej [39].

3.2. KATEPSYNA G

Katepsyna G jest zmiennie glikolizowaną proteinazą serynową o m. cz. 27 kDa, stanowi ok. 0,5% całkowitego białka ludzkich neutrofilii i w mniejszych ilościach występuje również w monocytach. Produkowana w postaci pierwotnej formy prekursorowej, pakowana jest do ziarnistości podczas stadiów promielocytarnych i mielocytarnych [53]. Białko to jest aktywne wobec szerokiego spektrum bakterii Gr⁻ i Gr⁺ oraz grzybów przy stężeniach rzędu 25 µg/ml [31]. Aktywność bakteriobójcza nie ulega zahamowaniu przy zablokowaniu inhibitorem centrum katalitycznego enzymu, choć oczywiście enzym aktywny jest bardzo "pomocny" w nadtrawianiu zewnętrznych struktur białkowych komórek mikroorganizmów oraz po ich zabicu – do trawienia resztek. Aktywność antybakteryjna katepsyny G jest związana z dwoma krótkimi peptydami IIGGR i HPQYNQR, uzyskanymi po trawieniu enzymu klostrypainą [1,48]. Peptydy te są najbardziej bakteriobójcze spośród produktów klostrypainy i mają identyczne jak katepsyna G optima działania: temperatura 37°C, pH 7,0–7,5, niska siła jonowa. Wzorując się na podobieństwie bakteriobójczego peptydu azurocydyny (reszty 20–44) do sekwencji 20–47 katepsyny G, Pereira i wsp. [45] zsyntetyzowali go i wykazali jego bakteriobójcze własności, przy czym wymagane były jednak kilkukrotnie wyższe stężenia. Sugeruje się, że zgodnie z pierwszymi hipotezami dotyczącymi mechanizmu zabijania przez katepsynę G, jej aktywne domeny tworzone przez wymienione peptydy, jak i również one same wiążą się z powierzchnią błony komórki bakteryjnej i ulegają wbudowywaniu, zaburzając jej strukturę. Wyniki najnowszych badań dają podstawę do stwierdzenia, że oddziaływanie związane z pierwszą fazą są nieswoiste, bowiem zsyntetyzowane D-aminokwasowe odpowiedniki aktywnych peptydów katepsyny G działały dokładnie tak samo jak ich naturalne L-aminokwasowe odpowiedniki [39]. Ponadto studia nad wpływem substytucji innymi aminokwasami i wprowadzaniem grup funkcyjnych wykazały istotność nie tyle sumarycznego ładunku cząsteczki, co jego wewnątrzcząsteczkowej dystrybucji. Sugeruje to podobny do detergentów i defensyn mechanizm działania. Z drugiej jednak strony niespodziewanie wykazano, że endotoksyna (LPS) *Pseudomonas aeruginosa* jest kompetycyjnym inhibitorem zarówno enzymatycznych jak i bakteriobójczych własności katepsyny G. Chociaż nie ma doniesień, czy endotoksyny innych bakterii również mają takie własności, jest to ważny sygnał sugerujący istnienie specyficznych dróg oddziaływania tego białka z bakteriami, zwłaszcza, że wcześniej stwierdzono już jego powinowactwo do kwasu teichojowego i białka wiążącego penicylinę [53]. Warto ponadto zaznaczyć, że sekwencje homologiczne do aktywnych peptydów katepsyny G znaleziono w granzymie B – białku cytolitycznych ziarnistości limfocytów T cytotoksycznych oraz w chymazie (enzym proteolityczny

komórek tucznych). W przypadku chymazy z powodów sterycznych sekwencje te nie mogą jednak manifestować swych bakteriobójczych własności [48].

3.3. PROTEINAZA 3

Oprócz omówionych już wyżej dwóch enzymów do grona aktywnych proteolitycznie serprocydyn ziarnistości azurofilnych ludzkich neutrofilii zalicza się też proteinazę 3 (cytowaną w literaturze również jako: AGP7, p29b, mieloblastyna i autoantigen ziarnicy Wegenera [28]). Mimo stosunkowo późnego odkrycia, jest to już dobrze poznany enzym [5, 7, 47] o m. cz. 29 kDa, szerokiej specyficzności substratowej, odróżniający się od katepsyny G i elastazy niezdolnością do trawienia specyficznych dla nich substratów peptydowych oraz brakiem hamowania przez leukocytowy inhibitor proteinaz i słabym hamowaniem przez eglinę C (inhibitor wyizolowany z pijawki lekarskiej). Ponadto enzym ten wykazuje istotne różnice w budowie zarówno miejsca katalitycznego, jak i miejsca wiążącego substrat [28]. Proteinaza 3 wykazuje identyczną z azurocydyną (patrz niżej) aktywność bakteriobójczą w przypadku bakterii Gr^- i Gr^+ zaś zabijanie grzybów wymaga już stężeń proteinazy 3 o co najmniej 50% wyższych niż analogiczne efektywnie stężenie azurocydyny. Ponadto zabijanie bakterii (podobnie jak w przypadku elastazy i katepsyny G) jest niezależne od aktywności enzymatycznej [6]. Dokładniejsze studia nad bakteriobójczym działaniem proteinazy 3 nie były prowadzone, wiadomo jednak, że nie zawiera ona sekwencji podobnych do najaktywniejszych peptydów katepsyny G (IIGGR i HPQYNQR), aktywność bakteriobójcza peptydu zaś z charakterystycznego dla serprocydyn regionu reszt 20–44 nie była badana. Wydaje się jednak, że jeżeli peptyd 20–44 azurocydyny ma największe zdolności bakteriobójcze spośród analogicznych peptydów katepsyny G i elastazy, to przy przyjęciu założenia o wpływie stopnia homologii na aktywność bakteriobójczą peptyd rejonu 20–44 proteinazy 3 mającej 15 aminokwasów powinien być bardziej bakteriobójczy od analogicznie usytuowanego peptydu elastazy (13 zgodnych aminokwasów) i katepsyny G (11 zgodnych).

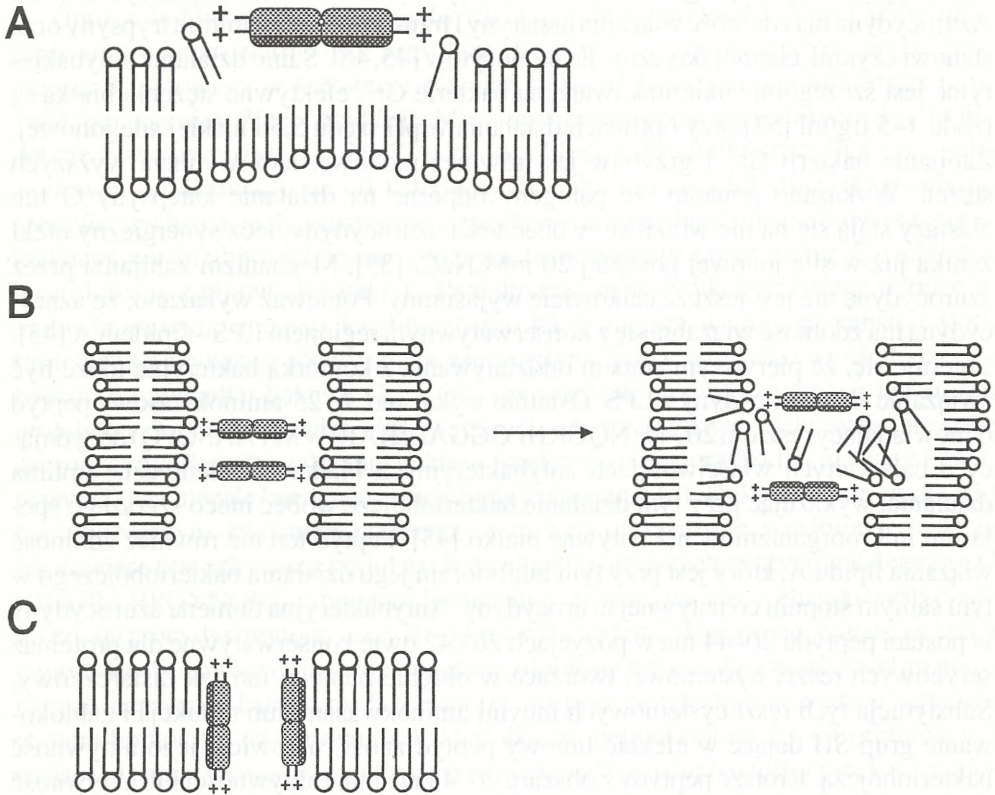
3.4. AZUROCYDYNA

Białko to (o spotykanych również w literaturze określeniach CAP37 i HBP) ma masę cząsteczkową 37 kDa i charakteryzuje się dużą, związaną ze zmienną glikozylacją, heterogenicznością w ruchliwości elektroforetycznej [18]. Azurocydyna jest obecna tylko w azurofilowych ziarnistościach neutrofilii, monocytach oraz promiocytozarnej linii komórek szpiku, metody znakowania immunofluorescencyjnego zaś lokalizują ją jako nieintegralne białko zasocjowane z błoną ziarnistości. N-koniec azurocydyny stanowi bogatą w zasadowe reszty, wyeksponowaną na zewnątrz domenę. Azurocydyna ma szczególnie duży stopień homologii z elastazą, lecz charakteryzuje się bardzo istotnymi podstawieniami aminokwasowymi w centrum aktywnym: His II Ser i Ser II Gly, które powodują, że decydujące o aktywności proteolitycznej

przeniesienie ładunku w odrębie triady aminokwasów nie jest tu możliwe [18]. Nie jest to jednak przypadek odosobniony, znanych jest wiele nieaktywnych enzymatycznie analogów różnych białek, gdzie również doszło do podobnych substytucji ewolucyjnych, np. haptoglobina, białko Z czy czynnik wzrostu hepatocytów [46]. Azurocydyna ma zdolność wiązania heparyny i trzustkowego inhibitora trypsyny oraz stanowi czynnik chemotaktyczny dla monocytów [45, 46]. Samo działanie antybakteryjne jest szczególnie ukierunkowane na bakterie Gr⁻, efektywne stężenia białka są rzędu 1–5 µg/ml [53] przy optymach działania w pH rzędu 5,5 i niskiej sile jonowej. Zabijanie bakterii Gr⁺ i grzybów jest również możliwe, lecz wymaga wyższych stężeń. Wykazano ponadto, że patogeny odporne na działanie katepsyny G lub elastazy stają się na nie wrażliwe w obecności azurocydyny, lecz synergiczny efekt zanika już w sile jonowej powyżej 20 mM NaCl [35]. Mechanizm zabijania przez azurocydynę nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony. Ponieważ wykazano, że azurocydyna ma zdolność wiązania się z konserwatywnym regionem LPS – lipidem A [45], sugeruje się, że pierwszym etapem oddziaływania z komórką bakteryjną może być związanie się azurocydyny z LPS. Ostatnio wykazano, że 25-aminokwasowy peptyd odpowiadający resztom 20–44 (NQGRHF⁺CGGALIHAR⁺FVMTAASC⁺FQ) decydujący o całkowitych właściwościach antybakteryjnych białka ma identyczne optima działania, wykazując przy tym działanie bakteriobójcze wobec nieco szerszego spektrum mikroorganizmów niż natywne białko [45]. Peptyd ten ma również zdolność wiązania lipidu A, który jest przy tym inhibitorem jego działania bakteriobójczego w tym samym stopniu co natywnej azurocydyny. Antybakteryjna domena azurocydyny w postaci peptydu 20–44 ma w pozycjach 26 i 42 dwie konserwatywne dla proteinaz serynowych reszty cysteinowe, tworzące w obrębie peptydu mostek disiarczkowy. Substytucja tych reszt cysteinowych innymi aminokwasami lub redukcja i zablokowanie grup SH dające w efekcie liniowy peptyd znosi całkowicie jego aktywność bakteriobójczą. Krótsze peptydy z obszaru 20–44 nie mają aktywności lub aktywność ta jest bardzo słaba. Ponieważ sugeruje się [18], że po asocjacji azurocydyny czy jej aktywnej domeny z błoną właściwy efekt zabijający związany jest z interkalacją do niej, to wydaje się, że ważną cechą tych cząsteczek powinien być ich ładunek. Wobec silnie zasadowego charakteru azurocydyny peptyd 20–44 ma w swym optymalnym pH sumaryczny ładunek rzędu +4, którym charakteryzuje się jednak również i inny, nieaktywny bakteriobójczo peptyd z odmiennego regionu białka [45]. Być może więc o działaniu antybakteryjnym peptydu 20–44 decyduje suma czynników:

- a) przestrzenna dystrybucja ładunku,
- b) w większości hydrofobowe własności reszt,
- c) zasadowy charakter,
- d) stabilizowany wiązaniem disiarczkowym mały rozmiar cząsteczki.

O znaczeniu powyższych czynników zdaje się zwłaszcza świadczyć fakt, że szczep bakteryjny, charakteryzujący się wskutek substytucji w lipidzie A mniej ujemnym



Rys. 1. Poglądowy schemat ilustrujący proponowany mechanizm działania defensyn: A – każda cząsteczka ma dodatnio naładowany biegun z eksponowanymi resztami argininy, domenę hydrofobową, na rysunku zacieniowaną, oraz miejsce, do którego może się związać inna cząsteczka defensyny, tworząc w miejscu połączenia miniaturowy kanał; utworzony dimer jednym z dodatnich biegunów elektrostatycznie oddziałuje z ujemnie naładowaną powierzchnią błony, a następnie ulega interkalacji, eksponując swe domeny hydrofobowe do również hydrofobowego wnętrza błony, destabilizując tym samym jej strukturę; B – podwójny dimer zdolny jest poprzez dwustronne oddziaływania elektrostatyczne oraz utworzenie lokalnego środowiska hydrofobowego do indukowania fuzji dwóch membran; C – wielokrotne kompleksy dimerów defensyn mogą również utworzyć w poprzek błony kanał o znacznych rozmiarach (dwa pozostałe dimery lokują się nad i pod płaszczyną rysunku), zmodyfikowane za [24,16]

ładunkiem lipopolisacharydu, wykazuje równocześnie zwiększoną oporność na azurocydynę [45].

4. DEFENSYNY

Od pierwszych doniesień o lizosomalnych peptydach kationowych minęło już około 30 lat [59], lecz w zasadzie apogeum jakościowe i ilościowe prac ukazujących się na ich temat przypadło na drugą połowę lat 80 i początek 90. Ostatnio ukazała się poświęcona defensynom znakomita praca przeglądowa [32] i do tej pozycji odsyła autor szczególnie zainteresowanych obszerną bibliografią. Defensyny są antybakteryjnymi i cytotoksycznymi peptydami, zawierającymi 29 do 35 aminokwasów z konserwatywnym motywem sześciu reszt cysteinowych, tworzących trzy wewnętrzne międzycząsteczkowe mostki disiarczkowe. Mostki te są niezbędne dla aktywności peptydu i stabilizują całkowicie β -strukturalną architekturę cząsteczki, której kształt przypomina wydłużoną elipsoidę [24]. Defensyny mają zdolność do tworzenia form di-, tri- i tetramerycznych i wydaje się to być bardzo istotną właściwością przy rozpatrywaniu ich mechanizmu działania. Testy *in vitro* wykazały szerokie spektrum działania bakteriobójczego w stężeniach 10–100 $\mu\text{g/ml}$, przy czym szczególną aktywność wykazano wobec bakterii Gr^+ i grzybów, a nieco mniejszą wobec bakterii Gr^- . Defensyny są również zdolne do zabijania krętków, mikobakterii oraz do bezpośredniej neutralizacji niektórych wirusów z otoczkami (jak HSV, wirus zapalenia jamy ustnej i grypy) [32]. Hamują również *in vitro* replikację wirusa HIV-1 [42]. Efekt bakteriobójczy jest zawsze związany z wbudowywaniem do błony komórkowej mikroorganizmu i zwiększeniem jej przepuszczalności. Badania z użyciem sztucznych błon fosfolipidowych wykazały, że zdolność do związania się kationowej defensyny z powierzchnią błony jest ściśle związana z jej powierzchniowym ładunkiem i w związku z tym, indukowane elektrostatycznymi oddziaływaniami przyłączenie defensyny do powierzchni membrany uważa się za pierwszy etap działania. Następnie dochodzi do uwarunkowanej oddziaływaniami hydrofobowymi integracji defensyny do błony, utworzenia poru ułatwionego połączeniem się dwóch lub więcej defensyn (powstaje wtedy w miejscu asocjacji cząsteczek mały kanał) i w efekcie do wyrównania potencjału po obu stronach błony i wypłynięcia jonów, peptydów i innych niezbyt dużych metabolitów [16, 24] (rys. 1). Niespecyficzne, podobne do detergentów, oddziaływanie defensyn z powierzchnią błon biologicznych sugeruje, że defensyny mogą również wywoływać w obrębie organizmu efekt cytotoksyczny. I rzeczywiście – wykazano takie działanie wobec limfocytów, neutrofilii, komórek endotelialnych i innych, przy czym okazało się również, że defensyny są zdolne do lizy komórek odpornych na TNF i czynnik cytolityczny komórek NK [32, 50]. Postuluje się, że mechanizmem chroniącym przed autocytotoksycznym efektem defensyn jest syntetyzowanie ich jako prepropeptydów, których 40- do 45-aminokwa-

sowy profragment zawierający liczne reszty anionowe stanowi czynnik neutralizujący kationowy charakter dojrzałej defensyny [36]. Chociaż docelowe działanie na błony wydaje się być najważniejsze, to zaobserwowano również, że defensyny są zdolne do indukowania jednoniciowych przerw w komórkowym DNA [22]. Peptydy te zostały również zidentyfikowane jako:

- a) chemoatraktanty [55],
- b) czynniki kortykostatyczne [17],
- c) inhibitory białkowej kinazy C [8],
- d) opsoniny [32].

Ludzkie defensyny są charakterystyczne dla ziarnistości azurofilnych neutrofilów, gdzie trzy z czterech ludzkich defensyn stanowią 30–50% całkowitego białka ziarnistości [32], w największym stopniu decydując o niezależnym od tlenu zabijaniu. Uczestniczą one ponadto prawdopodobnie w bardziej uogólnionych mechanizmach odpornościowych, bowiem wykazano, że są one wydzielane do osocza i poziom ich w osoczu podnosi się podczas infekcji [49,20]. Nie ukazały się doniesienia o obecności defensyn w innych populacjach ludzkich komórek (poza oczywistym wyjątkiem prekursorowych komórek neutrofilów w szpiku), tym niemniej jednak, homologiczne do ludzkich defensyn peptydy wykryto w niektórych populacjach komórkowych takich zwierząt, jak: szczur [12], świnka morska [41], królik [17] i mysz [13,14], a peptydy o zbliżonych funkcjach znaleziono również u konia [10], bydła [15], niższych kręgowców [37] oraz u owadów [9] i roślin [11].

5. LIZOZYM I LAKTOFERRYNA

Lizozym i laktoferryna w przeciwieństwie do wszystkich dotychczas opisanych substancji są charakterystyczne dla ziarnistości drugorzędowych (zwanymi też specyficznymi). Spotkać je można również w znaczących ilościach w niemal wszystkich płynach fizjologicznych. Antybakteryjne działanie lizozymu jest powszechnie znane [31]. Nie tak dawno jednak wykazano, że działanie antybakteryjne niekoniecznie musi być związane z jego aktywnością muraminidazową [30]. Redukcja bowiem istotnych dla tej aktywności mostków disiarczkowych lub zablokowanie enzymu oligosacharydami nie znosiło jego bakteriobójczych własności. Stwierdzono, że za właściwości takie odpowiedzialna jest (podobnie jak w niektórych opisanych wyżej przypadkach) silnie kationowa natura białka ($pI > 10,5$). Już dość dawno temu wykazano, że bakteriobójcze własności *in vitro* wykazuje podobnie kationowa grupa białek, jaką są histony [25]. Lizozym działa bakteriobójczo przy stężeniach 10–30 $\mu\text{g/ml}$, które to stężenie jest efektywnie takie same dla podobnie jak lizozym kationowych, krótkich monopolimerów lizyny czy argininy [30]. Warto zwrócić uwagę na to, że lizozym działa w odróżnieniu od innych opisanych tu białek szczególnie wielokierunkowo. Aktywność muraminidazowa hydrolizuje wiązania β -(1,4)-glikozydowe w obrębie

peptydoglikanu bakteryjnej ściany komórkowej. Wiązanie polikationowych domen lizozymu do ujemnie naładowanych części LPS zewnętrznej błony komórek bakterii Gr^- powoduje destabilizację tej błony i dodatkowo uwrażliwia peptydoglikan na atak od wnętrza komórki [44]. Ponadto ostatnio wykazano, że przyłączenie do C-końca lizozymu hydrofobowego pentapeptydu FFVAP umożliwiało penetrację takiej hybrydowej cząsteczki do błony wewnętrznej, co wywoływało obniżenie fizjologicznego potencjału elektrochemicznego membrany i znaczne tym samym wzmocnienie efektu bakteriobójczego [26].

Laktoferyna jest białkiem lekko zasadowym (m. cz. 78 kDa) i należy do transferynowej rodziny białek wiążących żelazo [31]. Wiążąc żelazo niezbędne bakteriom do syntezy katalazy czy cytochromów, laktoferyna hamuje ich wzrost. Wykazano jednak, że zablokowanie miejsc wiążących ten jon nie blokuje bynajmniej bakteriostatycznej i bakteriobójczej aktywności i białko takie w dalszym ciągu zdolne jest przy stężeniach rzędu 100 $\mu\text{g/ml}$ do zabijania bakterii Gr^- , a w mniejszym stopniu również Gr^+ oraz grzybów [58]. Udowodniono, że takie same, a nawet nieco spotęgowane działanie ma N-końcowy, uwalniany przez pepsynę, 23-aminokwasowy fragment laktoferyny, tzw. laktoferycyna H, o unikalnej sekwencji (TKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKR), przy czym do aktywności bakteriobójczej tego peptydu nie jest niezbędny jego wewnątrzcząsteczkowy mostek disiarczkowy [2]. Podobnie jak w wielu opisanych wyżej przypadkach peptyd ten ma charakter kationowy i poza tym charakteryzuje się zdolnością do uwalniania z powierzchni bakterii Gr^- cząsteczek lipopolisacharydu, co wywołuje dodatkowe uwrażliwienie mikroorganizmów na działanie hydrofobowych antybiotyków. Uwalnianie przez laktoferycynę endotoksyny jest przy tym znacznie wzmacniane wcześniejszą ekspozycją bakterii na IgG oraz IgA. Zarówno laktoferyna, jak i jej bakteriobójczy peptyd tracą swe właściwości pod wpływem wysokiej siły jonowej.

6. KALPROTEKTYNA

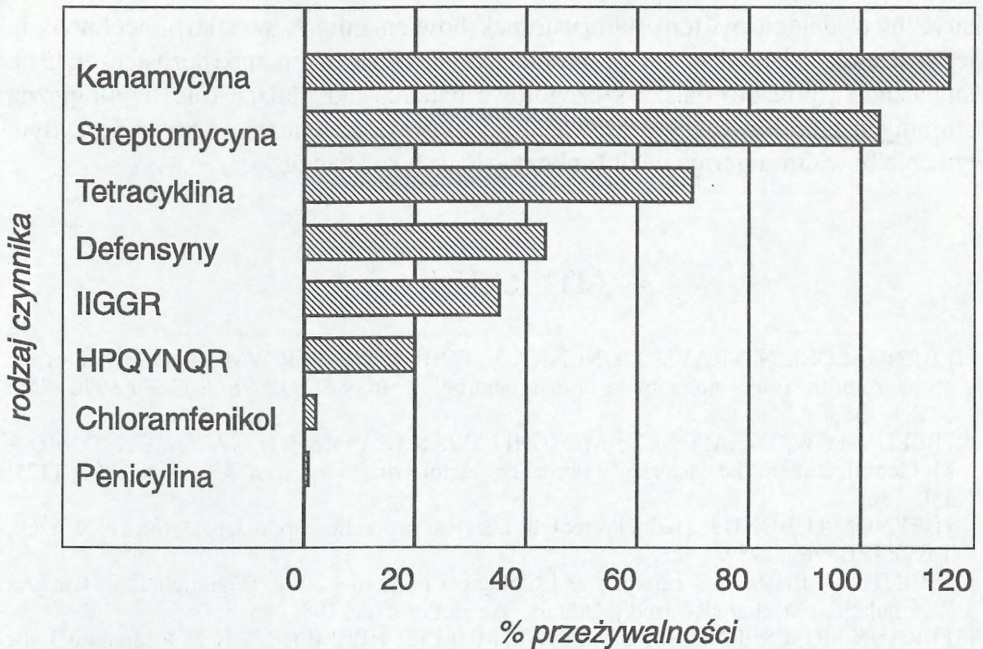
W cytozolu ludzkich neutrofilii, niektórych makrofagów oraz keratynocytów epitelium jamy ustnej, a także w osoczu krwi wykryto występujący obficie, nieczynny enzymatycznie kompleks dwóch anionowych białek opisywanych jako frakcja L1 białek wiążących wapń [54] lub jako antybakteryjne i grzybobójcze białko – kalprotektyna [52]. Działanie bakteriobójcze i grzybobójcze kalprotektyny stanowi mechanizm zabijania tych patogenów, które, jak np. bakterie z rodzaju *Capnocytophaga* ulegają bezpośredniej internalizacji do cytozolu a nie do obłonionych fagosomów [38]. Kalprotektyna stanowi również istotny czynnik bakteriobójczy uwalniany i działający po lizie neutrofilii. Efektywne stężenia kalprotektyny są rzędu kilkudziesięciu $\mu\text{g/ml}$, przy czym komórki grzybów wydają się być bardziej wrażliwe niż komórki bakteryjne. Mechanizm działania nie został jeszcze zaproponowany.

7. PODSUMOWANIE

W powyższym, ze względu na szczupłość miejsca dość pobieżnym przeglądzie małego wycinka mechanizmów obronnych organizmu ludzkiego, jakim są naturalne "antybiotyki" neutrofilii, autor starał się położyć nacisk na te informacje, które pozwalają na łatwiejsze uchwycenie pewnych wspólnych cech tych związków. Bardzo zasadne wydawać by się mogło więc zestawienie porównawcze, obrazujące ich aktywność wobec patogenów. Wydaje się jednak, że ze względu na mnogość warunków, w jakich przeprowadzono testy (niemal wyłącznie przeprowadzanych *in vitro*) – różne pH, siła jonowa, obecność różnych dodatków w buforach inkubacyjnych oraz ze względu na różnorodność stosowanych mikroorganizmów i nawet jednostek, w jakich prezentowano efekty bakteriostatyczne czy bakteriobójcze – zestawienie takie zupełnie nie spełniłoby swego zadania. W jednej z prac [19] porównano aktywności poszczególnych frakcji uzyskanych z błon ziarnistości azurofilnych wobec przedstawiciela bakterii Gr⁻, Gr⁺ oraz grzybów, lecz wobec niehomogenności tych frakcji interpretacja wyników może być problematyczna. Bardzo eleganckie zestawienie aktywności zabijającej *in vitro* peptydów uzyskanych z katepsyny G oraz defensyn wobec patogenu wywołującego rzeżączkę, wraz z aktywnościami powszechnie stosowanych, klasycznych antybiotyków opublikowano w pracy [1] i te wyniki warto przytoczyć (rys. 2).

Charakterystyczne jest, że przy większości opisanych w niniejszej pracy czynników zastosowano podobny scenariusz badań. Najpierw sprawdzano na kilku mikroorganizmach aktywność albo homogenatu danej frakcji komórkowej, którą następnie po dalszej analizie identyfikowano, albo też od razu stosowano do oznaczeń jednorodny preparat. W przypadku białek o aktywności enzymatycznej korzystając z syntetycznych inhibitorów sprawdzano, jak mają się do siebie aktywności enzymatyczne i bakteriobójcze, po czym identyfikowano ewentualną aktywną domenę, syntetyzowano ją w drodze chemicznej i metodami substytucji aminokwasowej bądź wprowadzaniem grup funkcyjnych starano się określić wymagania strukturalne konieczne dla zachowania zdolności antybiotycznych, czasem (jak w przypadku defensyn) bardzo szczegółowo uzupełniając tę wiedzę informacjami uzyskanymi z zastosowania metod dyfrakcji rentgenowskiej i jądrowego rezonansu magnetycznego.

Powszechnie znane antybiotyki peptydowe zawierają grupę substancji, takich jak np. polimyksyny, tyrocydyny, bacytracyna czy gramicydyna S, których wspólną cechą jest amfipatyczna budowa, umożliwiającą związanie się z powierzchnią błony dzięki siłom elektrostatycznym i uwarunkowane oddziaływaniami hydrofobowymi wbudowywanie się do niej, zaburzające tym samym strukturę takiej błony. Jest to jednak również właściwość innej klasy związków, o jeszcze bardziej niespecyficznych, modelowych często oddziaływaniach z błonami biologicznymi, jakimi są stosowane jako antyseptyki detergenty kationowe, np. cetrimid czy chlorohexydydina [29]. Wspólną jednak cechą tych substancji włączając i wymienione antybiotyki



Rys. 2. Porównanie bakteriobójczych zdolności dwóch najbardziej aktywnych peptydów katepsyny G, częściowo oczyszczonej mieszaniny defensyn oraz kilku popularnych antybiotyków wobec *Neisseria gonorrhoeae*; bakterie były inkubowane 30 min w $5,0 \cdot 10^{-4}$ M roztworze czynnika w buforze Hanksa, pH 7,5, po czym były wysiewane na płytki i po 48 h inkubacji liczono ilość kolonii, wyrażając efekt procentowo w stosunku do liczby kolonii wyrosłych po inkubacji w samym buforze; widać, że peptydy oraz defensyny efektywniej zabijały bakterie niż tetracyklina, streptomycyna i kanamycyna (zmodyfikowane za [1])

peptydowe jest ich duża ogólna cytotoksyczność: ciężkie uszkodzenia nerek po ogólnym podaniu bacytracyny nie należą do rzadkości.

Informacje uzyskane nad badaniem naturalnych ludzkich antybiotyków mogą doprowadzić do skonstruowania peptydowych środków o:

a) obniżonej immunogenności, co związane będzie nie tyle z małymi wymiarami cząsteczek, ile z konsekwencją wprowadzenia do organizmu znanych mu już epitopów,

b) obniżonej wrażliwości na działanie proteinaz i długim tym samym czasie półtrwania, jako efektu możliwości wprowadzenia nierozpoznawalnych metabolicznie D-enancjomerycznych odpowiedników,

c) skutecznych wobec wielu nie poddających się obecnie efektywnemu traktowaniu patogenów (np. [39]) oraz wobec pojawiających się coraz to nowych, odpornych na dotychczasowe antybiotyki szczepów bakteryjnych.

Koniecznym i niezbędnym warunkiem wprowadzenia tych substancji do terapii będzie jednak określenie stopnia i zakresu ich cytotoksyczności oraz opracowanie wydajnych i, co bardzo ważne, tanich metod ich uzyskiwania. Szczególnie proble-

matyczny wydaje się być ten ostatni warunek, bowiem mimo wszystko biotechnologia nie radzi sobie dzisiaj dobrze z ekonomicznym uzyskiwaniem makrocząsteczek [51]. Konieczne są ponadto dalsze szczegółowe badania określające rolę fizjologiczną naturalnych antybiotyków ludzkich neutrofilów – przykład defensyn oraz serprocydyn, wyraźnie bowiem sugeruje wielofunkcyjność tych substancji.

LITERATURA

- [1] BANGALORE N, TRAVIS J, ONUNKA V, POHL J, SHAFER WM. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *J Biol Chem* 1990; **265**: 13584–13588.
- [2] BELLAMY W, TAKASE M, YAMAUCHI K, WAKABAYASHI H, KAWASE K, TOMITA M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1121**: 130–136.
- [3] BEYNON RJ, BOND JS [red.]. Proteolytic enzymes: a practical approach. Oxford, New York, Tokio: IRL Press 1989.
- [4] BIETH JG. Elastases – catalytic and biological properties. [w] Degranulation of matrix accumulation. Mecham RG [red.]. Orlando: Acad. Press Inc. 1986.
- [5] BRAUN MG, CSERNOK E, GROSS WL, MULLER-HERMELING H-K. Proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. *Am J Pathol* 1991; **139**: 831–838.
- [6] CAMPANELLI D, DETMERS P, NATHAN CF, GABAY JE. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. *J Clin Invest* 1990; **85**: 904–915.
- [7] CAMPANELLI D, MELICHOR M, FU Y, NAKATA M, SHUMAN H, NATHAN C, GABAY JE. Cloning of cDNA for proteinase 3: A serine protease, antibiotic and autoantigen from human neutrophils. *J Exp Med* 1990; **172**: 1709–1715.
- [8] CHARP PA, RICE WG, RAYNOR RL, REINMUND E, KINDKADE JM JR., SELSTED ME, LEHRER MI, KUO JF. Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 1988; **37**: 951–956.
- [9] COCIANCICH S, GHAZI A, HETRU C, HOFFMAN JA, LETTELIER L. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19239–19245.
- [10] COUTO MA, HARWIG SSL, CULLOR JS, HUGHES JP, LEHRER RI. Identification of eNAP-1, an antimicrobial peptide from equine neutrophils. *Infect Immun* 1992; **60**: 3065–3071.
- [11] DUNVICK JP, ROOD T, RAO AG, MARSHAK DR. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Biol Chem* 1992; **267**: 18814–18820.
- [12] EISENHAUER P, HARWIG SS, SZKLAREK D, GANZ T, LEHRER RI. Polymorphic expression of defensins in neutrophils from outbred rats. *Infect Immun* 1990; **58**: 3899–3902.
- [13] EISENHAUER PB, HARWIG SSSL, LEHRER RI. Cryptidins: Antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect Immun* 1992; **60**: 3556–35565.
- [14] EISENHAUER PB, LEHRER RI. Mouse neutrophils lack defensins. *Infect Immun* 1992; **60**: 3446–3447.
- [15] FRANK RW, GENNARO R, SCHNEIDER K, PRZYBYLSKI M, ROMEO D. Amino acid sequence of two proline-rich bactericins. *J Biol Chem* 1990; **265**: 18871–18874.
- [16] FUJI G, SELSTED ME, EISENBERG D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci* 1993; **2**: 1301–1312.

- [17] FUSE N, HAYASHI Y, FUKATA J, TOMINAGA T, EBISUI O, SATOH Y, ISOHARA T, UNO I, IMURA H. Purification and characterization of new anti-adrenocorticotropin rabbit neutrophils peptides (defensins). *Eur J Biochem* 1993; **216**: 653–659.
- [18] GABAY JE, ALMEIDA RP. Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes: defensins and azurocidin. *Curr Opin Immunol* 1993; **5**: 97–102.
- [19] GABAY JE, SCOTT RW, CAMPANELLI D, GRIFFITH J, WILDE C, MARRA MN, SEEGER M, NATHAN CF. Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 5610–5614.
- [20] GANZ T. Extracellular release of human antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1987; **55**: 568–571.
- [21] GAZZANO-SANTORO H, PARENT JB, GRINNA L, HOROWITZ A, PARSONS T, THEOFAN G, ELSBACH P, WEISS J, CONLON PJ. High affinity binding of bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1992; **60**: 4754–4761.
- [22] GERA JF, LICHTENSTEIN A. Human neutrophil peptide defensins induces single strand DNA breaks in target cells. *Cell Immunol* 1991; **138**: 108–120.
- [23] GRAY PW, CORCORAN AE, EDDY RL JR., BYERS MG, SHOWS TB. The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal/permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics* 1993; **15**: 188–190.
- [24] HILL CP, YEE J, SELSTED ME, EISENBERG D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: Mechanism of membrane permeabilization. *Science* 1991; **251**: 1481–1485.
- [25] HIRSH JG. Bactericidal action of histone. *J Exp Med* 1958; **108**: 925–944.
- [26] IBRAHIM HR, YAMADA M, MATSUSHITA K, KOBAYASHI K, KATO A. Enhanced bactericidal action of lysozyme to *Escherichia coli* by inserting a hydrophobic pentapeptide into its C terminus. *J Biol Chem* 1994; **269**: 5059–5063.
- [27] JAKÓBISIAK M [red]. Immunologia. Warszawa: PWN 1993.
- [28] KAM C-M, KERRIGAN JE, DOLMAN KM, GOLDSCHMEIDING R, VON DEM BORNE AEGK, POWERS JC. Substrate and inhibitor studies on proteinase 3. *FEBS Lett* 1992; **296**: 119–123.
- [29] KWIATKOWSKI ZA. Odporność bakterii na antybiotyki. Warszawa: PWN 1992.
- [30] LAIBLE NJ, GERMAINE GR. Bactericidal activity of human lysozyme, muraminidase inactive lysozyme and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* 1985; **48**: 720–728.
- [31] LEHRER RI, GANZ T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 1990; **76**: 2169–2181.
- [32] LEHRER RI, LICHTENSTEIN AK, GANZ T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 105–128.
- [33] MANNION BA, WEISS J, ELSBACH P. Separation of sublethal and lethal effects of the bactericidal/permeability increasing protein on *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 1990; **85**: 853–860.
- [34] MARRA MN, WILDE CG, COLLINS MS, SNABLE JL, THORNTON MB, SCOTT RW. The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J Immunol* 1992; **148**: 537–537.
- [35] MIASAKI KT, BODEAU AL. In vitro killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* ssp. by human neutrophil cathepsin G and elastase. *Infect Immun* 1991; **59**: 3015–3020.
- [36] MICHAELSON D, RAYNER J, COUTO M, VALORE EV, GANZ T. Cationic defensins arise from charge neutralised propeptides: A potential mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity. *J Leuk Biol* 1992; **51**: 634–639.
- [37] MIGNOGNA G, SIMACO M, KREIL G, BARRA D. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J* 1993; **12**: 4829–4832.

- [38] MIYASAKI KT, BODEAU AL, MURTHY AR, LEHRER RI. *In vitro* antimicrobial activity of the human neutrophil cytosolic S-100 protein complex, calprotectin, against *Capnocytophaga sputigena*. *J Dent Res* 1993; **72**: 517–523.
- [39] MIYASAKI KT, BODEAU AL, POHL J, SHAFER WM. Bactericidal activities of synthetic human leukocyte cathepsin G - derived peptides and congeners against *Actinobacillus actinomycesemcomitans* and *Capnocytophaga sputigena*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1993; **37**: 2710–2715.
- [40] MIYASAKI KT, BODEAU AL. Human neutrophil azurocidin synergizes with leukocyte elastase and cathepsin G in the killing of *Capnocytophaga sputigena*. *Infect Immun* 1992; **60**: 4973–4975.
- [41] NAGOKA I, YMOGIDA S, NAKAMURA S, SOMEYA S, IWABUCHI K, YAMASHITA T. Evaluation of the expression of the cationic peptide gene in various types of leukocytes. *FEBS Lett* 1992; **302**: 279–283.
- [42] NAKASHIMA H, YAMAMOTO N, MASUDA M, FUJI N. Defensins inhibits HIV replication *in vitro*. *AIDS* 1993; **7**: 1129.
- [43] ODEBERG H, OLSSON I. Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes. *J Clin Invest* 1975; **56**: 1118–1124.
- [44] OHNO N, MORRISON DC. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme - binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J Biol Chem* 1989; **264**: 4434–4441.
- [45] PEREIRA HA, ERDEM I, POHL J, SPITZNAGEL JK. Synthetic bactericidal peptide based on CAP37: A 37-kDa human neutrophil granule-associated cationic antimicrobial protein chemotactic for monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4733–4737.
- [46] PETERSEN LC, BIRKTOFT JJ, FLODGAARD H. Binding of bovine pancreatic trypsin inhibitor to heparin binding protein\ CAP37\ azurocidin. *Eur J Biochem* 1993; **214**: 271–279.
- [47] RAO NV, WEHNERS NG, MARSHALL BC, GRAY WR, GRAY BH, HOIDAL JR. Characterization of proteinase 3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. *J Biol Chem* 1991; **266**: 9540–9548.
- [48] SHAFER WM, POHL J, ONUNKA VC, BANGALORE N, TRAVIS J. Human lysosomal cathepsin G and granzyme B share a functionally conserved broad spectrum antibacterial peptide. *J Biol Chem* 1991; **266**: 112–116.
- [49] SHIOMI K, NAKAZATO M, IHI T, KANGAWA K, MATSUO H, MATSUKURA S. Establishment of radioimmunoassay for human neutrophil peptides and their increasing in plasma and neutrophil in infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **195**: 1336–13344.
- [50] SHLUESNER HJ, RADERMACHER S, MELMS A, JUNG S. Leukocytic antimicrobial peptides kills autoimmune T cells. *J Neuroimmunol* 1993; **47**: 199–202.
- [51] SMITH RAG, DEWDNEY JM, FEARS R, POSTE G. Chemical derivatization of therapeutic proteins. *Tibtech* 1993; **11**: 397–403.
- [52] SOHNLE PG, COLLINS-LECH C, WEISSNER JH. Antimicrobial activity of an abundant calcium-binding protein in the cytoplasm of human neutrophils. *J Infect Dis* 1991; **163**: 187–192.
- [53] SPITZNAGEL JK. Antibiotic proteins of human neutrophils. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1381–1386.
- [54] STEINBAKK M, NAESS-ANDERSEN CF, LINGAS E, DALE I, BRANDTZAEG P, FAGERHOL MK. Antimicrobial action of calcium L1 binding protein, calprotectin. *Lancet* 1990; **336**: 763–765.
- [55] TERRITO MC, GANZ T, SELSTED ME, LEHRER MI. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; **84**: 2017–2020.
- [56] WEERSINK AJ, van KESSEL KP, van den TOL ME, van STRIJP JA, TORENSMA R, VERHOEF J, ELSBACH P, WEISS J. Human granulocytes express a 55-kDa lipopolysac-

- charide-binding protein on the cell surface that is identical to the bactericidal/permeability increasing protein. *J Immunol* 1993; **150**: 253–263.
- [57] WEISS J, ELSBACH P, SHU C, CASTILLO J, GRINNA L, HOROWITZ A, THEOFAN G. Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1122–1130.
- [58] YAMAUCHI K, TOMITA M, GIEHL TJ, ELLISON RT. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* 1993; **61**: 719–728.
- [59] ZEA HI, SPITZNAGEL JK. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes, 1. Resolution of antibacterial and enzymatic activities. *J Bacteriol* 1966; **91**: 750–754.

Paweł Mak

Instytut Biologii Molekularnej UJ
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

WYBRANE METODY SPECYFICZNEGO WPROWADZANIA NIENATURALNYCH AMINOKWASÓW DO BIAŁEK

SITE-SPECIFIC INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS INTO PROTEINS

Artur OSYCZKA^x, Bohdan TURZYNA^{xx}

^xZakład Biofizyki, ^{xx}Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: W artykule przedstawiono metody wprowadzania w określoną pozycję łańcucha białkowego analogów aminokwasów nie występujących naturalnie w białkach. Szczególną uwagę poświęcono metodzie opartej na wykorzystaniu zjawiska supresji mutacji nonsensownej. Podano również przykłady jej dotychczasowego zastosowania z zaznaczeniem perspektywicznych możliwości w badaniu struktury dynamicznej białek.

Słowa kluczowe: ukierunkowana mutagenеза, supresorowy aa-tRNA, nienaturalne aminokwasy, konformacja białek.

Summary: In this paper some methods of site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins are presented. The new strategy based on the suppression of the nonsense mutation phenomenon is described. Some examples of its application and future perspectives in protein conformation studies are given.

Key words: site-directed mutagenesis, suppressor aa-tRNA, unnatural amino acids, protein conformation.

Ogromny postęp i zaawansowanie w badaniach nad konformacją dynamiczną białek narzucają konieczność stosowania coraz bardziej wyszukanych technik modyfikacji łańcuchów białkowych.

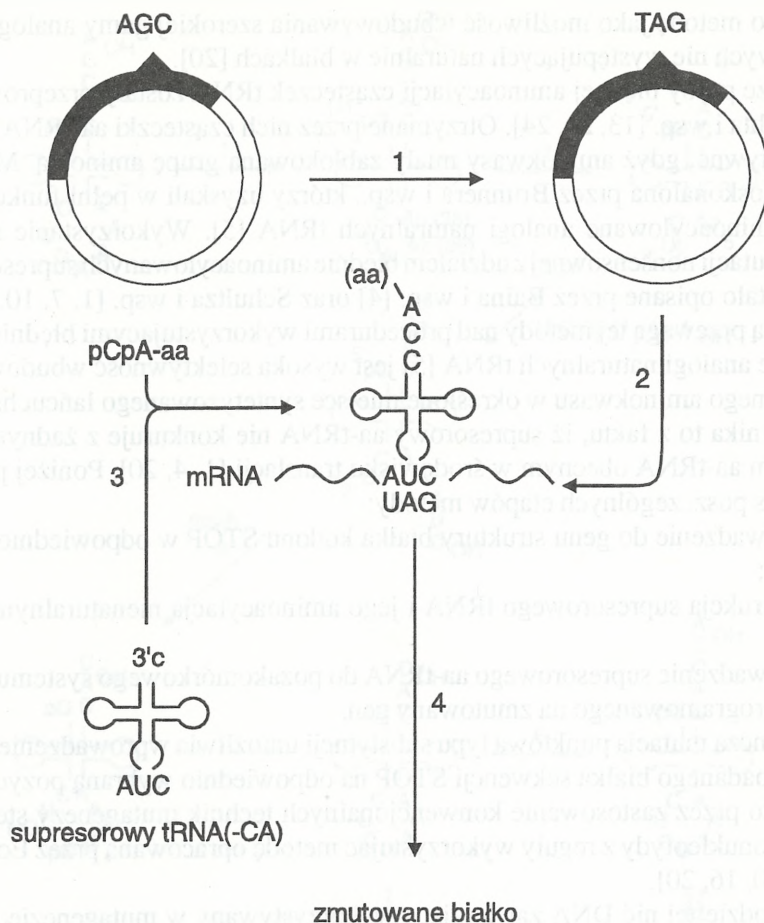
W pierwszej kolejności zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania reaktywnych chemicznie grup reszt aminokwasowych naturalnie występujących w białkach.

Wybiórcza modyfikacja określonym związkem chemicznym odpowiedniej grupy aminokwasowej w białku daje stosunkowo prostą możliwość uzyskania różnego rodzaju pochodnych białkowych. Z punktu widzenia badań nad strukturą dynamiczną białek najwięcej informacji uzyskano wykorzystując monopochodne białkowe (białka, w których tylko jedna określona reszta aminokwasowa jest zmodyfikowana). Jeśli cząsteczka białka miała więcej niż jedną grupę chemiczną dostępną do modyfikacji, dla uzyskania poszczególnych monopochodnych stosowano szereg metod ich rozdzielenia opartych przede wszystkim na chromatografii jonowymiennej. W omawiany sposób otrzymane były m.in. frakcje cytochromu c modyfikowane na grupach ϵ -aminowych poszczególnych reszt lizynowych [8, 12, 21, 26].

Ponieważ tego typu chemiczne modyfikacje ograniczały się jedynie do miejsc determinowanych strukturą białka, opracowano szereg metod umożliwiających wprowadzenie w wybrane miejsce łańcucha białkowego aminokwasów naturalnie nie występujących w danym białku (tzw. nienaturalnych aminokwasów). Obok technik opartych na całkowitej syntezie lub semisyntezie peptydów i białek [23, 24, 27] zaliczyć do nich należy grupę metod bazujących na technikach ukierunkowanej mutagenyzy. Przykładem może być ukierunkowane wprowadzanie znaczków spinowych (ang. SDSL; *site-directed spin labeling*), technika, w której przy użyciu mutagenyzy sterowanej oligonukleotydami [11] otrzymuje się mutanty białkowe mające w wybranym miejscu łańcucha wprowadzoną resztę cysteiny. Z kolei zastosowanie znacznika spinowego reagującego selektywnie wyłącznie z grupą sulfhydrylową cysteiny daje możliwość modyfikowania zmutowanych białek jedynie na tych resztach aminokwasowych, a więc w miejscach zdeterminowanych przeprowadzoną mutacją. Technika SDSL uzyskano szereg znakowanych spinowo mutantów bakteriorodopsyny [2, 3, 17], kolicyny [25] i anhidrazy węglanowej [14]. Pochodne bakteriorodopsyny i kolicyny zostały wykorzystane w badaniach nad zmianami strukturalnymi tych białek podczas oddziaływania z błonami. Natomiast zmodyfikowana tą techniką anhidraza węglanowa posłużyła do badań przebiegu procesów zwijania i rozwijania łańcucha białkowego.

W świetle wymienionych powyżej technik całkowicie uniwersalnym sposobem wbudowywania nienaturalnych aminokwasów do białek wydaje się być nowo opracowana metoda wykorzystująca zjawisko supresji mutacji nonsensownej [1,20]. Umożliwia ona bezpośrednie wprowadzenie nienaturalnego aminokwasu w trakcie translacji *in vitro* przy użyciu funkcjonalnego analogu aa-tRNA, tzw. błędnie aminoacylowanego supresorowego tRNA.

Ogólną zasadę metody przedstawiono na rysunku 1. Polega ona na wymianie sekwencji kodującej odpowiednio wybrany aminokwas w genie struktury badanego białka na sekwencję STOP i wykorzystaniu tak zmutowanego genu w pozakomórkowym systemie translacji. Do genu tego wprowadza się supresorowy tRNA aminoacylowany wybranym analogiem aminokwasu. Uzyskany w ten sposób produkt translacji



Rys. 1. Ogólny schemat metody wprowadzania nienaturalnych aminokwasów do białek: 1 – mutageniza sterowana przez oligonukleotydy; 2 – transkrypcja *in vitro*; 3 – aminoacylacja; 4 – translacja *in vitro* [wg 20]

in vitro zawiera nienaturalny aminokwas wbudowany w miejscu rozpoznawanym przez supresorowy aa-tRNA, a więc zdeterminowanym przeprowadzoną mutacją.

Strategia metody została oparta na obserwowanym zjawisku supresji tripletu nonsensownego TAG zachodzącym w układach *in vivo* i *in vitro* przy udziale naturalnego lub semisyntetycznego supresorowego aa-tRNA [20]. Biorąc pod uwagę, iż rozpoznanie kodon-antykonon zachodzi niezależnie od rodzaju aminokwasu przyłączonego do końca akceptorowego tRNA oraz że zarówno syntetaza peptydylowa, jak i białkowe czynniki elongacyjne wykazują relatywnie niską specyfikę substratową,

traktowano metodę jako możliwość wbudowywania szerokiej gamy analogów aminokwasowych nie występujących naturalnie w białkach [20].

Pierwsze próby błędnej aminoacylacji cząsteczek tRNA zostały przeprowadzone przez Hechta i wsp. [13, 22, 24]. Otrzymane przez nich cząsteczki aa-tRNA nie były jednak aktywne, gdyż aminokwasy miały zablokowaną grupę aminową. Metoda ta została udoskonalona przez Brunnera i wsp., którzy uzyskali w pełni funkcjonalne, błędnie aminoacylowane analogi naturalnych tRNA [5]. Wykorzystanie zjawiska supresji mutacji nonsensownej z udziałem błędnie aminoacylowanych supresorowych tRNA zostało opisane przez Baina i wsp. [4] oraz Schultza i wsp. [1, 7, 10, 16, 20]. Zasadniczą przewagą tej metody nad procedurami wykorzystującymi błędnie aminoacylowane analogi naturalnych tRNA [5] jest wysoka selektywność wbudowywania nienaturalnego aminokwasu w określone miejsce syntetyzowanego łańcucha białkowego. Wynika to z faktu, iż supresorowy aa-tRNA nie konkuruje z żadnym innym naturalnym aa-tRNA obecnym w środowisku translacji [1, 4, 20]. Poniżej przedstawiono opis poszczególnych etapów metody:

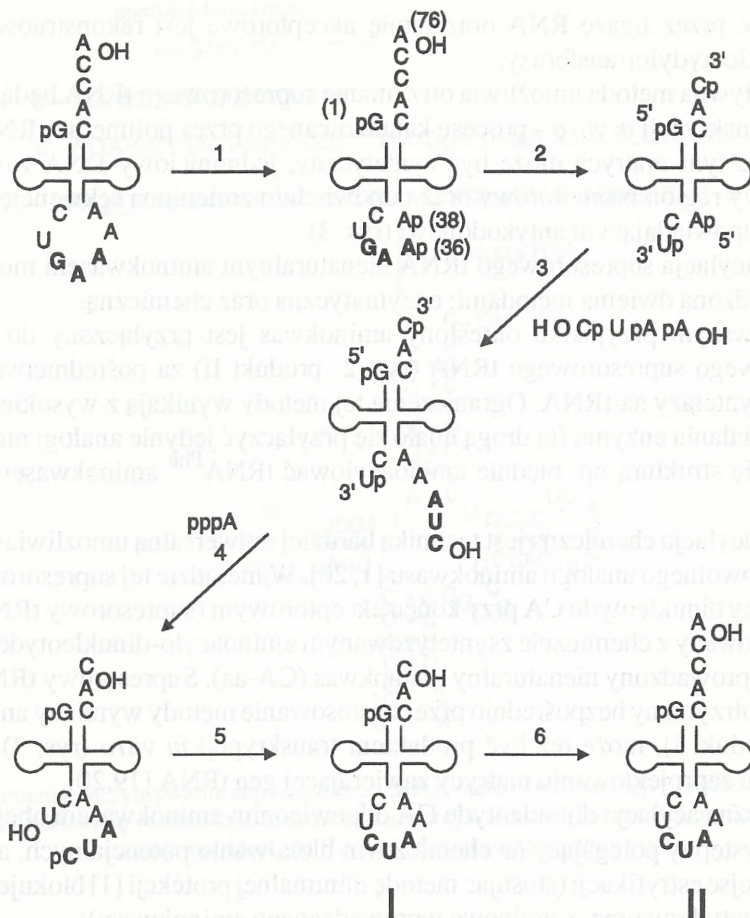
- wprowadzenie do genu struktury białka kodonu STOP w odpowiednie miejsce sekwencji;
- konstrukcja supresorowego tRNA i jego aminoacylacja nienaturalnym aminokwasem;
- wprowadzenie supresorowego aa-tRNA do pozakomórkowego systemu syntezy białek zaprogramowanego na zmutowany gen.

Pojedyncza mutacja punktowa typu substytucji umożliwia wprowadzenie do genu struktury badanego białka sekwencji STOP na odpowiednio wybraną pozycję. Użytkuje się to przez zastosowanie konwencjonalnych technik mutagenyzy sterowanej przez oligonukleotydy z reguły wykorzystując metodę opracowaną przez Ecksteina i wsp. [1, 10, 16, 20].

W metodzie tej nić DNA zawierająca wykorzystywany w mutagenyzy oligonukleotyd jest syntetyzowana w obecności czterech nukleozydotrifosforanów, w tym jednego tionukleotydu. Wykorzystując odpowiednią restryktazę, która nie hydrolizuje wiązania fosfodiesterowego, przeprowadza się trawienie wyłącznie nietiolowanej nici matrycy tak, aby odsłonięty został fragment DNA zawierający mutację. Powstała luka wypełniana jest enzymatycznie dając w pełni zmutowaną nić DNA. Stosowanie tej techniki znacznie podnosi wydajność prowadzonej mutagenyzy (nawet do 100%) ze względu na to, iż mutacje zawierają obie nici wektora, którym transformowane są komórki bakteryjne [15].

Supresorowy tRNA może być otrzymany przy użyciu jednej z dwóch opisanych poniżej procedur.

Pierwsza z nich opracowana przez Bruce'a i Uhlenbecka [6] polega na wymianie antykodonu w naturalnym tRNA na dowolny triplet komplementarny do kodonów terminalnych (ang. *anticodon loop replacement*). Sześcioetapowy schemat tej procedury przedstawiony jest na rysunku 2. Na wstępie cząsteczka tRNA jest specyficznie



Rys. 2. Schemat otrzymywania supresorowego tRNA metodą wymiany antykodonu w naturalnym tRNA: 1 – depurynicacja i rozkład na dwa fragmenty; 2 – działanie rybonukleazy A; 3 – działanie ligazy RNA; 4 – defosforylacja końca 3' i fosforylacja końca 5'; 5 – działanie ligazy RNA; 6 – działanie nukleotydylotransferazy; produkt I jest wykorzystywany do chemicznej aminoacylacji, a produkt II do enzymatycznej aminoacylacji [wg 6]

depurynowana w pozycji 37 i rozkładana na dwa fragmenty: pierwszy – zawierający antykodon (od pozycji 1 do 36) oraz drugi – zakończony ramieniem akceptorowym (pozycje 38 do 76). Fragmenty te poddawane są działaniu rybonukleazy A, która specyficznie wycina antykodon oraz usuwa dimer CA od końca 3' akceptorowego. Kolejny etap polega na przyłączeniu syntetycznego tetrameru nukleotydowego zawierającego sekwencję komplementarną do kodonu nonsensownego, po czym przeprowadza się defosforylację nukleotydów na pozycjach terminalnych 3' oraz fosforylację końca 5' dodanego tetrameru. W etapach końcowych oba fragmenty tRNA są ponow-

nie łączone przez ligazę RNA oraz ramię akceptorowe jest rekonstruowane przy użyciu nukleotydylotransferazy.

Alternatywna metoda umożliwiła otrzymanie supresorowego tRNA będącego produktem transkrypcji *in vitro* – procesu katalizowanego przez polimerazę RNA [4,19]. W procesie tym matrycą może być syntetyczny, jednoniciowy DNA zawierający dwuniciowy region promotorowy oraz odpowiednio zmienioną sekwencję zasad na odcinku odpowiadającym antykodonowi (rys. 3).

Aminoacylacja supresorowego tRNA nienaturalnym aminokwasem może zostać przeprowadzona dwiema metodami: enzymatyczną oraz chemiczną.

W pierwszym przypadku określony aminokwas jest przyłączony do ramienia akceptorowego supresorowego tRNA (rys. 2 produkt II) za pośrednictwem odpowiedniej syntetazy aa-tRNA. Ograniczenia tej metody wynikają z wysokiej specyficzności działania enzymu (tą drogą udało się przyłączyć jedynie analogi nieznacznie różniące się strukturą np. błędnie aminoacylować tRNA^{Phe} aminokwasem [³H]Phe [20]).

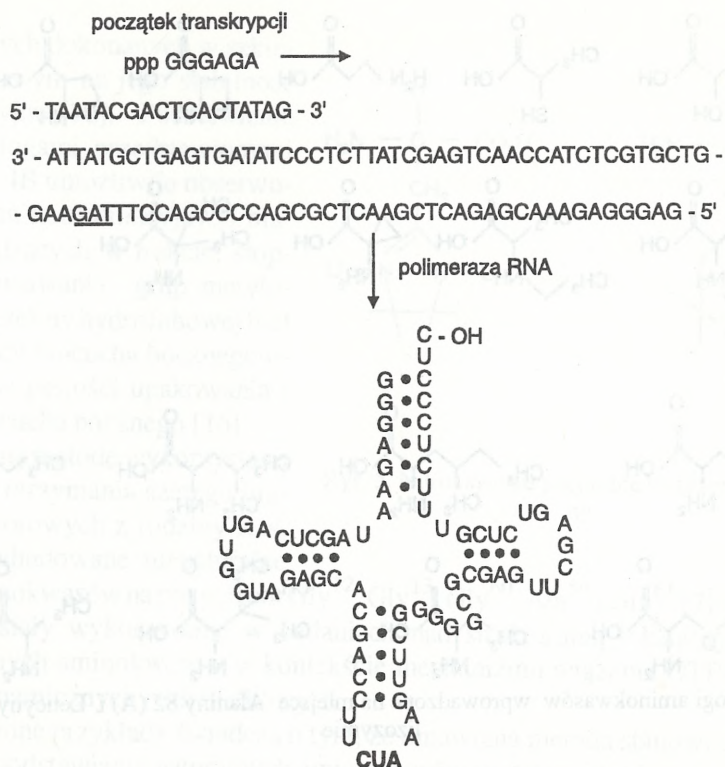
Aminoacylacja chemiczna jest techniką bardziej uniwersalną umożliwiającą przyłączenie dowolnego analogu aminokwasu [1, 20]. W metodzie tej supresorowy tRNA pozbawiony dinukleotydu CA przy końcu akceptorowym (supresorowy tRNA(-CA)) jest ligandowany z chemicznie zsyntetyzowanym aminoacylo-dinukleotydem zawierającym wprowadzony nienaturalny aminokwas (CA-aa). Supresorowy tRNA (-CA) może być otrzymany bezpośrednio przez zastosowanie metody wymiany antykodonu (rys. 2 produkt I), może też być produktem transkrypcji *in vitro* (rys. 3) przy odpowiednim zaprojektowaniu matrycy zawierającej gen tRNA [19,20].

Chemiczna acylacja dinukleotydu CA odpowiednim aminokwasem obejmuje:

- etap wstępny polegający na chemicznym blokowaniu potencjalnych, a niepożądanym miejsc estryfikacji (stosując metodę minimalnej protekcji [1] blokuje się grupę aminową cytydyny oraz α -aminową wprowadzanego aminokwasu);
- etap właściwej acylacji przeprowadzany w obecności chemicznych czynników aktywujących;
- etap końcowy, którego celem jest usunięcie uprzednio wprowadzonych grup blokujących.

Przygotowany w ten sposób aminoacylo-dinukleotyd jest przyłączany do supresorowego tRNA (-CA) za pośrednictwem ligazy RNA.

Błędnie aminoacylowany supresorowy tRNA jest następnie wprowadzany do pozakomórkowego układu syntezy białka, w którym rolę matrycy pełni mRNA mający kodon nonsensowny na pozycji zdeterminowanej przeprowadzoną w genie struktury mutacją punktową. Stosowane na tym etapie układy biosyntezy mogą pochodzić z ekstraktów *Escherichia coli* [1,10,16,20] lub też mogą to być komercyjnie dostępne ekstrakty retikulocytów królika (ang. *cell-free rabbit reticulocyte lysate translation system*) [4].



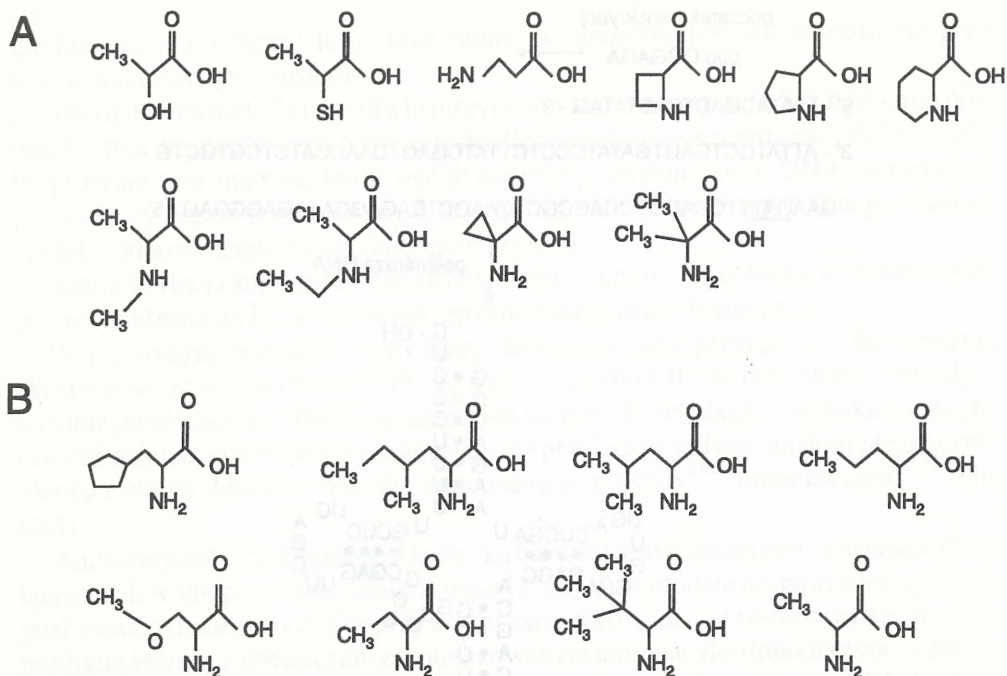
Rys. 3. Schemat otrzymywania supresorowego tRNA metodą transkrypcji *in vitro*, GAT oznacza zmienioną sekwencję w odcinku odpowiadającym antykodonowi, ostateczny produkt jest pozbawiony dinukleotydu CA na końcu akceptorowym [wg 4]

Oczekiwane zjawisko supresji mutacji nonsensownej zajdzie wówczas, gdy wprowadzony supresorowy aa-tRNA nie zostanie rozpoznany przez żadną z obecnych w pozakomórkowym układzie biosyntezy syntetaz aa-tRNA. W wyniku takiego rozpoznania aa-tRNA mógłby zostać deaminoacylowany i powtórnie acylowany innym aminokwasem obecnym w środowisku translacji.

Jeśli supresorowy aa-tRNA został skonstruowany na bazie naturalnego tRNA, do układu biosyntezy wprowadza się supresorowy aa-tRNA obcy gatunkowo (przede wszystkim tRNA z drożdży). Wykazano bowiem na przykładzie fenyloalanylo-tRNA, że drożdżowy tRNA^{Phe} jest rozpoznawany w mniej niż jednym procencie przez bakteryjną syntetazę fenyloalanylo-tRNA [20].

Semisyntetyczny supresorowy tRNA – produkt transkrypcji *in vitro* nie jest rozpoznawany przez syntetazy aa-tRNA, co wynika z faktu, iż nie ulega on posttranskrypcyjnym modyfikacjom, jakim podlegają naturalne, komórkowe tRNA [19].

Etapem końcowym omawianej procedury jest izolacja i oczyszczenie właściwego produktu białkowego, a następnie weryfikacja prawidłowości wbudowania nienatu-



Rys. 4. Analogi aminokwasów wprowadzone na miejsce Alaniny 82 (A) i Leucyny 133 (B) w lizozymie

ralnego aminokwasu w określone miejsce łańcucha białkowego. Wykorzystywane w tym celu metody obejmują trawienie enzymatyczne frakcji zmodyfikowanego białka oraz analizę aminokwasową poszczególnych peptydów poprzedzoną ich chromatograficznym rozdzieleniem [20].

Skuteczność metody wykazano wprowadzając znakowaną radioaktywnie jodotyrozynę w zdefiniowaną pozycję modelowego polipeptydu [4] stwierdzając przy tym, iż wydajność supresji zależy od rodzaju stosowanego kodonu nonsensownego (dla kodonów opal, amber i ochre wynosiła ona odpowiednio 81, 63 i 43%), nie zależy natomiast od rodzaju metody, jaką otrzymano supresorowy aa-tRNA [19].

Opisaną metodą posłużono się przy wprowadzaniu syntetycznych aminokwasów na miejsce Phe⁶⁶ w β -laktamazie (EC 3.5.2.6.) z *Escherichia coli*. Otrzymano szereg mutantów, w których ten konserwatywny aminokwas zlokalizowany w centrum aktywnym enzymu został zastąpiony pochodnymi fenyloalaniny lub tyrozyny [20]. Mutanty te scharakteryzowano pod względem ich aktywności enzymatycznej prezentując w ten sposób możliwości, jakie daje metoda w kontekście badań nad rolą poszczególnych aminokwasów w strukturze i funkcjonowaniu białek.

Opisaną metodą wprowadzono selektywnie szereg nienaturalnych aminokwasów w pozycję Ala⁸² i Leu¹³³ w lizozymie [10, 16]. Podstawienie Ala⁸² analogami przedstawionymi na rysunku 4A miało na celu zbadanie wpływu punktowych zmian

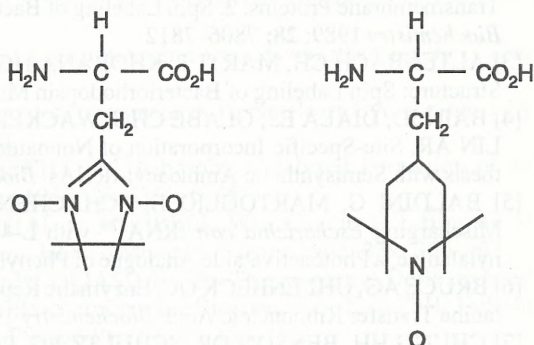
strukturalnych dokonanych w szkielecie białkowym na jego stabilność konformacyjną [10]. Podstawienie Leu¹³³ analogami przedstawionymi na rysunku 4B umożliwiło obserwowanie zmian konformacyjnych białka zachodzących w trakcie: stopniowego usuwania grup metylowych ze szczeliny hydrofobowej białka, solwatacji łańcucha bocznego oraz zmian w gęstości upakowania i entropii łańcucha bocznego [16].

Omawianą metodę wykorzystano również do otrzymania szeregu białek nowotworowych z rodziny Ras, mających wbudowane nienaturalne

analogi aminokwasów na pozycjach: Gly¹², Gly¹³, Gly⁶⁰, Ala⁵⁹ i Gln⁶¹ [7]. Uzyskane mutanty zostały wykorzystane w badaniach nad strukturalną i katalityczną rolą poszczególnych aminokwasów w kontekście mechanizmu wiązania GTP oraz konformacji dynamicznych pętli białkowych.

Wymienione przykłady świadczą o tym, że omawiana metoda stanowi efektywną możliwość podstawiania naturalnych aminokwasów syntetycznymi analogami naturalnie nie występującymi w układach biologicznych. Dodatkową, niezwykle atrakcyjną zaletą omawianej metody wydaje się być możliwość podstawiania naturalnych aminokwasów takimi analogami, które w powiązaniu z innymi technikami badawczymi (np. ESR, spektroskopia fluorescencyjna) pełniłyby rolę sond molekularnych [9]. Przykładem tego typu analogów mogą być przedstawione na rysunku 5 syntetyczne nitroksylowe aminokwasy pełniące rolę znaczników spinowych [18].

Uniwersalny charakter metody polega na tym, że potencjalnie dowolny analog może zostać wbudowany w wybrane miejsce łańcucha białkowego (jeśli tylko po połączeniu z supresorowym aa-tRNA będzie funkcjonalnym substratem dla syntetazy peptydylowej w miejscu A rybosomu). Modyfikacje białek analogami o odpowiednio dobranych właściwościach strukturalnych i chemicznych mogą dostarczyć wielu informacji na temat konformacji badanego regionu białka, a także roli poszczególnych aminokwasów w utrzymaniu stabilności i funkcjonalności cząsteczki białka.



Rys. 5. Nitroksylowe pochodne histydyny i tyrozyny

LITERATURA

- [1] ANTHONY-CAHILL SJ, GRIFFITH MC, NOREN CHJ, SUICH DJ, SCHULTZ PG. Site-Specific Mutagenesis with Unnatural Amino Acids. *TIBS* 1989; **14**: 400–403.

- [2] ALTENBACH CH, FLITSCH SL, KHORANA HG, HUBBELL WL. Structural Studies on Transmembrane Proteins. 2. Spin Labeling of Bacteriorhodopsin mutants at Unique Cysteines. *Biochemistry* 1989; **28**: 7806–7812.
- [3] ALTENBACH CH, MARTI T, KHORANA HG, HUBBELL WL. Transmembrane Proteins Structure: Spin Labeling of Bacteriorhodopsin Mutants. *Science* 1990; **248**: 1088–1092.
- [4] BAIN JD, DIALA ES, GLABE CHG, WACKER DA, LYTTLE MH, DIX TA, CHAMBERLIN AR. Site-Specific Incorporation of Nonnatural Residues during In vitro Protein Biosynthesis with Semisynthetic Aminoacyl-tRNAs. *Biochemistry* 1991; **30**: 5411–5421.
- [5] BALDINI G, MARTOGLIO B, SCHACHENMANN A, ZUGLIANI C, BRUNNER J. Mischarging *Escherichia coli* tRNA^{Phe} with L-4-[3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]phenylalanine, a Photoactivatable Analogue of Phenylalanine. *Biochemistry* 1988; **27**: 7951–7959.
- [6] BRUCE AG, UHLENBECK OC. Enzymatic Replacement of the Anticodon of Yeast Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acid. *Biochemistry* 1982; **21**: 855–861.
- [7] CHUNG HH, BENSON DR, SCHULTZ PG. Probing the Structure and Mechanism of Ras Protein with an Expanded Genetic Code. *Science* 1993; **259**: 806–809.
- [8] CONRAD DW, ZHANG H, STEWART DE, SCOTT RA. Distance Dependence of Long-Range Electron Transfer in Cytochrome c Derivatives Containing Covalently Attached Cobalt Cage Complex. *J Am Chem Soc* 1992; **114**: 9909–9915.
- [9] CORNISH VW, BENSON DR, ALTENBACH CA, HIDEK K, HUBBELL WL, SCHULTZ PG. Site-Specific Incorporation of Biophysical Probes Into Proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2910–2914.
- [10] ELLMAN JA, MENDEL D, SCHULTZ PG. Site-Specific Incorporation of Novel Backbone Structures into Proteins. *Science* 1992; **255**: 197–200.
- [11] FLITSCH SL, KHORANA HG. Structural Studies on Transmembrane Proteins. 1. Model Study Using Bacteriorhodopsin Mutants Containing Single Cysteine Residues. *Biochemistry* 1989; **28**: 7800–7805.
- [12] GORREN ACF, CHAN ML, CROUSE BR, SCOTT RA. Synthesis and Characterization of Singly Modified (Carboxyferrocenyl)cytochrome c Derivatives. *Bioconjugate Chem* 1992; **3**: 291–294.
- [13] HECKLER TG, CHANG LH, ZAMA Y, NAKA T, CHORGHADDE MS, HECHT SM. T4 RNA Ligase Mediated Preparation of Novel "Chemically Miscylated" tRNA^{Phe}s. *Biochemistry* 1984; **23**: 1468–1473.
- [14] LINDGREN M, SWENSSON M, FRESKGDARD PA, CARLSSON U, JONSSON BH, MARTENSSON LG, JONASSON P. Probing Local Mobility in Carbonic Anhydrase: EPR of Spin-labelled SH Groups Introduced by Site-directed Mutagenesis. *J Chem Soc Perkin Transactions* 2 1993; **11**: 2003–2008.
- [15] MEJNARTOWICZ M, KRZYŻOSIAK WJ. Metody mutagenезy *in vitro*. *Post Biochem* 1990; **3–4**: 5–16.
- [16] MENDEL D, ELLMAN JA, CHANG Z, VEESTRA DL, KOLLMAN PA, SCHULTZ PG. Probing Protein Stability with Unnatural Amino Acids. *Science* 1992; **256**: 1798–1802.
- [17] MILLHAUSER GL. Selective Placement of Electron Spin Resonance Spin Labels: New Structural Methods for Peptides and Proteins. *TIBS* 1992; **17**: 448–452.
- [18] MORRISETT JD. The Use of Spin Labels for Studying the Structure and Function of Enzymes. [w] Spin Labelling, Theory and Applications. Berliner LJ [red.] New York: Academic Press 1976: 273–339.
- [19] NOREN CHJ, ANTHONY-CAHILL SJ, SUICH DJ, NOREN KA, GRIFFITH MC, SCHULTZ PG. In Vitro Suppression of an Amber Mutation by a Chemically Aminoacylated Transfer RNA Prepared by Runoff Transcription. *Nucleic Acid Research* 1989; **18**: 83–88.
- [20] NOREN CHJ, ANTHONY-CAHILL SJ, GRIFFITH MC, SCHULTZ PG. A General Method for Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins. *Science* 1989; **224**: 182–188.

- [21] PAN LP, DURHAM B, WOLINSKA J, MILLETT F. Preparation and Characterization of Singly Labeled Ruthenium Polypyridine Cytochrome c Derivatives. *Biochemistry* 1988; **27**: 7180–7184.
- [22] PEZZUTO JM, HECHT SM. Amino Acid Substitutions in Protein Biosynthesis. *J Biol Chem* 1980; **255**: 865–869.
- [23] RAPHAEL AL, GRAY HB. Axial Ligand Replacement in Horse Heart Cytochrome c by Semisynthesis. *Proteins* 1989; **6**: 338–340.
- [24] ROESSER JR, CHORGHADDE MS, HECHT SM. Ribosome-Catalyzed Formation of an Abnormal Peptide Analogue. *Biochemistry* 1986; **25**: 6361–6365.
- [25] SHIN YK, LEVINTHAL C, LEVINTHAL F, HUBBELL WL. Colicin E 1 Binding to Membranes: Time-Resolved Studies of Spin-labeled Mutants. *Science* 1993; **259**: 960–963.
- [26] THEODORAKIS JL, ARMES LG, MARGOLIASH E. The Thiopropionyl Derivatives of Cytochrome c.[w] *Advances in Membrane Biochemistry and Bioenergetics*. Kim ChH, Tedeshi H, Salerno JC [red.] New York, London: Plenum Press 1987: 185–192.
- [27] WALLACE CJA. Understanding Cytochrome c Function: Engineering Protein Structure by Semisynthesis. *FASEB J* 1993; **7**: 505–515.

B. Turyna

31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3.

ENDOGENEOUS LECTINS IN CIRCULATING CELLS AND THEIR GLYCOSYLATED LIGANDS: POTENTIAL TOOLS FOR ADHESION-BASED THERAPY

CLAUDINE KIEDA

Glycobiologie, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans, France

Summary. Specific intercellular recognition events are fundamental for the establishment of essential processes. They are also involved in inflammation and pathologies as metastasis of cancer cells. The critical first interaction takes place at the endothelium level, where a circulating cell adhere to endothelial cells, rolls and extra vasate in the tissue. This is highly environment-dependent. Many adhesion molecules are responsible for the achievement of these recognitions, they belong to different superfamilies and they cooperate to control one another's expression and activity. Lectins and their glycoconjugates ligands are among the molecules involved in the adhesion processes as very early step-acting molecules; thus determining the subsequent specificity of circulating cells homing. Here are reviewed examples of lectins and glycoconjugates which have been demonstrated to take part in homing and invasion and of further developments for cancer therapy and general immunocompensation that can result from the knowledge of membrane lectin specificity and glycoconjugate structure studies.

The past few years have permitted a remarkable expansion of our knowledge on cell adhesion and recognition which results mainly from three steps in the progress of scientific acquisitions: the burst of interest about adhesion molecules, the knowledge of the key part played by endothelium and endothelial cells activity as well as, the role of lectins and their glycosylated ligands in the establishment of specific intercellular recognition-dependent events in both normal biological responses and pathological processes.

Numerous adhesion molecules have been described; so that, they had to be classified into three main families (see the review by Springer [30]). The several steps which co-operate to produce an efficient adhesion were attempted to be deciphered [8]. This established the role of lectin (selectin) molecules in binding their glycoconjugate ligands as being the first event of the adhesion cascade which allows braking, rolling and arrest of blood borne circulating cells onto the endothelial monolayer [28],

to finally enter the underlying tissue (Figure 1). Such extravasation will then lead to immune, inflammatory responses with normal leukocytes or, in the case of cancer cells, may end producing metastasizing foci.

Underlining the importance of lectin/glycoconjugate-mediated recognitions in cell-cell interactions during homing in normal and pathological cases, the critical biological role of oligosaccharides and complex glycans appear more and more obvious, even though it has long been neglected. Recent data demonstrate the involvement of glycosylated moieties in glycoprotein biological properties and have led to the evidence that glycans are not futile decoration or protective elements for the protein: they play an active and specific role as recognition signals.

To add to the fine specificity which results from the very high diversity of glycanic structures, substitutions by phosphoryl or sulphate groups are often present in complex glycans which are lectins ligands in the leukocyte-endothelial cell recognitions (selectins) or in infectious diseases (viral lectins). Such biological implications of glycans open new therapeutics based on specific osidic sequences (see below).

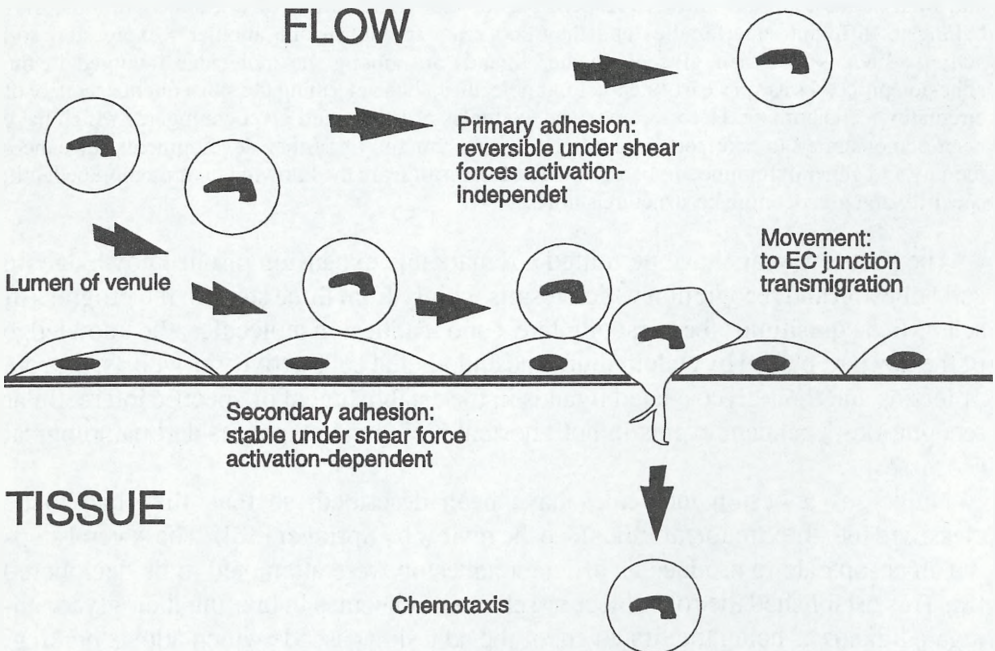


Figure 1 : Schematic representation of leukocyte arrest, rolling and extravasation through endothelium (adapted from [28]); effect of dynamic blood flow on primary adhesion which is non activation-dependent, induces secondary adhesion that is stable and allows transmigration

LECTINS AS HOMING SIGNAL MOLECULES

The study of lymphocyte responses has revealed the importance of lectin-oxide recognitions in cellular interactions. Separate works have led to this conclusion and to the identification of a new family of molecules of fundamental importance for specific homing [9] and localisation of circulating cells into specialized reaction sites: namely the selectin family [4, 20, 25, 29].

After characterization by the use of monoclonal antibodies which identified them as adhesion molecules, the classification of three molecules into a family was made possible by the publication of their cDNA. As such, the first three members of the family have been described :

- the E-selectin on cytokine-activated endothelial cells;
- the murine homing receptor, designated L-selectin on leukocytes; these two molecules are known to participate to leukocyte-endothelial adhesive events in various settings while,
- the third one, known as platelet activation-dependent granule protein, P-selectin is also present in endothelial cells after activation by thrombin [26].

Those three molecules were sequenced. Data predicted a Type 1, transmembrane protein for the three of them. Further common features (Figure 2) are mainly: an N-terminal sequence which shows lectin-like homology, then an epidermal growth

selectins

Schematic representation of homologies

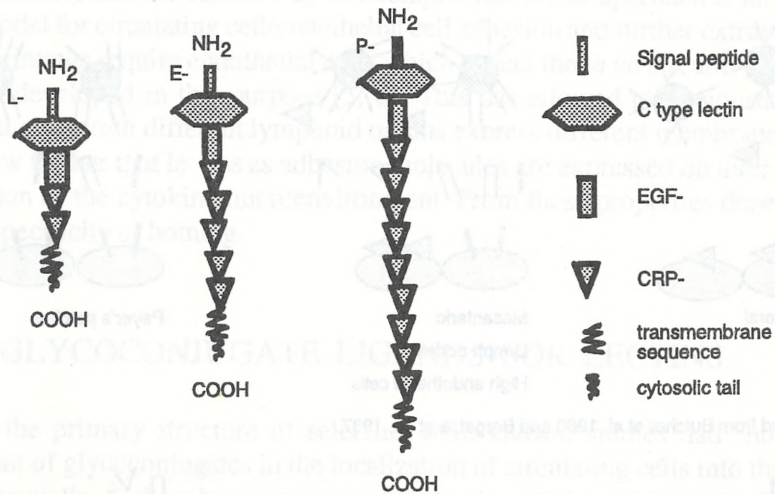


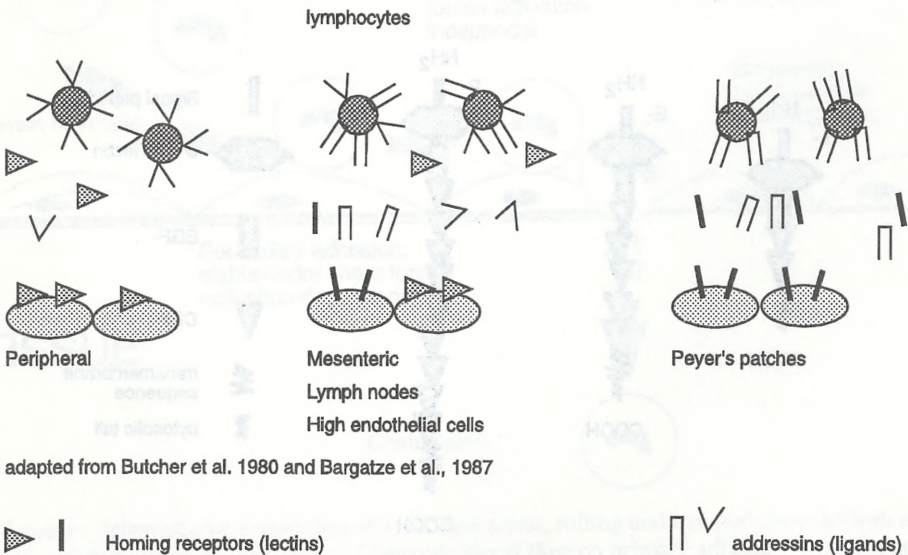
Figure 2. Sequence homologies of the three selectins (adapted from [30])

factor repeat (EGF) and a variable number of repeats analogous to complement regulatory proteins. The carbohydrate recognition domain sequence shows that these molecules are members of the C-type (calcium dependent) animal lectins [11] and the search for their glycoconjugate ligand has developed intensively. In parallel, biochemical studies on lymphocyte maturation had shown the existence of lectin-like molecules [22, 24]. Meanwhile, early biological experiments by Woodruff and co-workers [34] on lymphocyte homing prompted to formulate the hypothesis of a role for glycoconjugates and their receptors leading the localization of immune cells.

Bargatze *et al.* [1], showed that lymphoma cells express receptors for endothelial cells of post-capillary venules (Figure 3). As far as endothelial cells are concerned, surface properties are a function of their localization, surface antigenic molecules and properties are highly modulable depending upon the cytokine environment of endothelial cells. This work contributed to establish the role of endothelium in arresting blood borne cells. Furthermore, it indicated that tumor cells metastases might be established as a result of the same mechanisms which allow normal cells to achieve proper homing. This was in accordance with our hypothesis of a *double lectin-glycoconjugate recognition event* to set endothelial cell-circulating cell-specific adhesion (Figure 4). This has been prompted by data obtained with tumor cells and host tissue endothelial cells [23].

Homing receptors

membrane-associated and soluble forms of lectins and ligands



adapted from Butcher *et al.* 1980 and Bargatze *et al.*, 1987

Figure 3. Organ-specific homing receptor molecules on leukocytes and corresponding addressins on endothelial cells (adapted from [1, 9])

Double lectin-glycoconjugate recognition

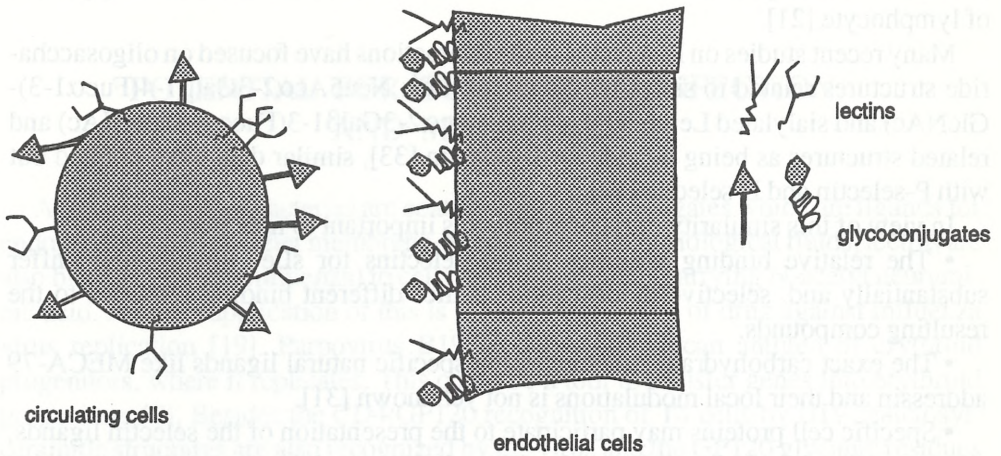


Figure 4. Double lectin-glycoconjugate hypothesis in cell-cell recognition

The double lectin-glycoconjugate recognition hypothesis is being demonstrated in various instances and the easiest way to attempt a molecular approach is an *in vitro* cellular model for circulating cell/endothelial cell adhesion and further extravasation. Such experiments require endothelial cells which reflect the *in vivo* reality; cell lines have been developed in this purpose [5, 6]. This has allowed to demonstrate that endothelial cells from different lymphoid organs express different membrane lectins and to show further that lectins as adhesion molecules are expressed on their surface as a function of the cytokine microenvironment. From these properties depends the resulting specificity of homing.

GLYCOCONJUGATE LIGANDS FOR LECTINS

Before the primary structure of selectins were known, studies had shown the involvement of glycoconjugates in the localization of circulating cells into their host tissues. Especially, 6-phosphomannosylated derivatives and fucoidan were shown to inhibit the homing receptor of lymphocytes which specifically localize into peripheral lymph nodes [35].

The direct role of lectins in lymphocyte homing could be demonstrated by *in vivo* experiments tracking the behaviour of *lectin-distinct* cell subpopulation. Cells had been *ex vivo* separated on the basis of the type of lectin they express on their plasma membrane and further reinjected. While conducting such experiments, it also directly showed the participation of endothelial cell membrane lectins in the homing pattern of lymphocyte [21].

Many recent studies on E-selectin-oxide interactions have focused on oligosaccharide structures related to sialylated Lewis x (sLe^x : Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)-GlcNAc) and sialylated Lewis a (sLe^a : Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc) and related structures as being ligands for E-selectin [33], similar data were pointed out with P-selectin and L-selectin [12].

In view of this similarity of recognition, it is important to note that :

- The relative binding affinities of the selectins for sLe^x ligands may differ substantially and, selective modifications confer different binding affinities to the resulting compounds.

- The exact carbohydrate structure of the specific natural ligands like MECA-79 addressin and their local modulations is not yet known [31].

- Specific cell proteins may participate to the presentation of the selectin ligands; consequently, the binding of one lectin to different osidic structures may or not involve the same mechanism.

- The three selectins described, are not the only members of the lectin family involved in the homing process. As shown recently, other lectin-receptors are present on endothelial cells and on leukocytes and are involved in adhesion [6, 15]

FUNCTION OF LECTIN-GLYCOCONJUGATE INTERACTIONS IN BIOLOGY

Recent studies in animal models have illustrated the participation of leukocyte-endothelial adhesion molecules in diseases and inflammatory processes. Blocking of E-selectin blocks neutrophils extravasation into the lung and vascular leak as well as influx associated with asthma. Antibodies to P- and L-selectins have been used to demonstrate their participation in a variety of models of inflammation [16, 27].

In human immunobiology, T memory cells that carry HECA-452 antigen are recruited into the skin through E-selectin binding. HECA-452 antigen is glycosylated and the antibody identifies a population of T cells preferentially recruited in case of inflammation in the skin. It recognizes sLe^x and sLe^a [2,3].

In addition to these examples, soluble forms of selectins have been found and recently reviewed for their role in diseases [13] and their possible use for prognosis. Furthermore, soluble forms of membrane lectins may be useful immunomodulators

[14]. Soluble lectins in the circulation may alter immunological and inflammatory responses in a very potent way. They, along with oligosaccharides as their ligands and addressins such as GlyCAM-1 [18] are down regulated by shedding and/or endocytosis from the cell surface and this can be taken as an advantage to design therapeutic agents.

POTENTIAL FOR CONTROL OF INFECTION AND METASTASIS

As it is known that bacteria are coated with glycoconjugates which are ligands for endogeneous lectins either membrane-bound or soluble in biological fluids, lectins are also binding viruses (influenza) to cells *via* glycoproteins carrying N-acetyl neuraminic acid. A direct application of this is found in the design of drug against influenza virus replication [19]. Parpovirus B19 recognizes P glycan antigen of erythroid progenitors, where it replicates. This could be a tool to transfer genes into erythroid progenitors [7]. Besides the CD4/GP120 recognition of T4 cells by HIV, galctosyl-ceramide structures are also recognized by the virus and the GP120 glycanic residues are responsible for the mannosic binding protein opsonization [17].

Based upon the rationale of lectin-glycoconjugates interactions involvement in recruitment inflammatory cells into appropriate sites, protocols for oligosaccharidic drugs are to be applied [27] and appear to be highly potent.

In tumor biology, direct demonstration of a possible requirement for glycoconjugates in the establishment of metastases has been widely documented and initial studies showing that tumor cells bound efficiently to cytokine-activated endothelium opened investigation towards lectins and adhesion molecules. Especially: in the case of lung carcinoma [23], melanoma and colon cancer cells, it has been shown that adhesion is dependent upon E-selectin binding and upon the expression of abundant quantities of sLe^x and sLe^a antigens on the cancer cell surface [10, 32].

AS CONCLUDING REMARKS

Glycannic moieties of glycoconjugates are the key of their function and fate largely because of their interaction with endogenous lectins.

Glycan structures depend upon both the protein and the cell which expresses it. Consequently: a glycoprotein has "glycoforms" or variant forms of the same molecule, and, recombinant molecules obtained by genetic engineering might be inactive or might have the wrong effects when they are not produced by the proper cell. Transgenic animals obtained by knocking out the gene of a lectin, of a glycosyl

transferase or a glycosylase should help to rapidly know more about the role of lectins and glycans. The precise knowledge of the exact structure of complex glycans which are recognized by lectins will allow the design of appropriate drugs and biological modulators and the should favour the transfection of lectin and/or glycan genes; thus making a link between glycobiology and gene therapy.

REFERENCES

- [1] BARGATZE RF, WU NW, WEISSMAN IL, BUTCHER EC. High endothelial venules binding as a predictor of the dissemination of passaged murine lymphomas. *J Exp Med* 1987; **166**: 1125–1131.
- [2] BERG EL, ROBINSON MK, MANSON O, BUTCHER EC, MAGNANI JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le^a and sialyl Le^x is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule (ELAM-1). *J Biol Chem* 1991; **23**: 14869–14872.
- [3] BERG EL, YOSHINO T, ROTH LS, ROBINSON MK, WARNOCK A, KISHIMOTO TK, PICKER LJ, BUTCHER EC. The cutaneous lymphocyte is a skin homing receptor for the vascular lectin endothelial cell leukocyte adhesion molecule. *J Exp Med* 1991; **174**: 1461–1466.
- [4] BEVILACQUA MP, STENGELIN S, GIMBRONE MA jr, SEED B. Endothelial adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; **243**: 1160–1165.
- [5] BIZOUARNE N, DENIS V, LEGRAND A, MONSIGNY M, KIEDA C. A SV-40 immortalized murine endothelial cell line from peripheral lymph node high endothelium expresses a new α -L-fucose binding protein. *Biol Cell* 1993; **79**: in press.
- [6] BIZOUARNE N, MITTERRAND M, MONSIGNY M, KIEDA C. Characterization of membrane sugar-specific receptors in cultured high endothelial cells from mouse peripheral lymph nodes. *Biol Cell* 1993; **79**: 27–37.
- [7] BROWN KE, ANDERSON SM, YOUNG NS. Erythroid P antigen : cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993; **262**: 114–117.
- [8] BUTCHER EC. Leukocyte-endothelial cell recognition : three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; **67**: 1033–1037.
- [9] BUTCHER EC, SCOLLAY RG, WEISSMANN IL. Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. *Eur J Immunol* 1980; **10**: 556–561.
- [10] DEJANA E, MARTIN-PADURA I, LAURID, BERNASCONI S, BANI MR, GAROFALO A, GIAVAZZI R, MAGNANI J, MANTOVANI A, MENARS S. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to the vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type 1 carbohydrate chain. *Laboratory Investigation* 1992; **66**: 324–330.
- [11] DRICKAMER K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9557–9560.
- [12] FOXALL C, WATSON SR, DOWBENKO D, FENNIE C, LASKY LA, KISO M, HASEGAWA A, ASA D, BRANDLEY BK. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl lewis-x oligosaccharide. *J Cell Biol* 1992; **117**: 895–902.
- [13] GEARING AJH, NEWMAN W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology Today* 1993; **14**: 506–512.

- [14] GRILLON C, MONSIGNY M, KIEDA C. Soluble human lymphocyte sugar binding proteins with immunosuppressive activity. *Immunol Lett* 1991; **28**: 47–56.
- [15] GRILLON C, MONSIGNY M, KIEDA C. Cell surface lectins of human granulocytes: their expression is modulated by mononuclear cells and GM-CSF. *Glycobiol* 1990; **1**: 33–38.
- [16] GUNDEL RH, WEGNER CD, TORCELINI CA, CLARKE CC, HAYNES N, ROTHLEIN R, SMITH C W, LETTS LG. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) mediates antigen-induced acute airway inflammation and late-phase airway obstruction in monkeys. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1407–1411.
- [17] HAURUM JS, THIEL S, JONES IM. Complement activation upon binding of mannose binding protein to HIV envelope glycoproteins. *AIDS* 1993; **7**: 1307–1313.
- [18] IMAI Y, LASKY LA, ROSEN SD. Sulphation requirement for glyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature* 1993; **361**: 555–557.
- [19] von ITZSTEIN M, WU W-Y, KOK GB, PEGG MS, DYASON JC, JIN B, VAN PHAN T, SMYTHE ML, WHITE H F, OLIVER D W, COLMAN PM, VARGHESE JN, RYAN DM, WOODS JM, BETHELL RC, HOTHAM VJ, CAMERON J M, PENN C R. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 1993; **363**: 418–423.
- [20] JOHNSTON GI, COOK RG, MC EVER R.P. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 1989; **56**: 1033–1044.
- [21] KIEDA C, BIZOUARNE N, DENIS V, MITTERRAND M. T lymphocytes recognition molecules in homing: a flow cytometry study of lectin-glycoconjugates interactions. *NATO ASI series*, 1993; **H67**: 155–164
- [22] KIEDA C, BOWLES DJ, RAVID A, SHARON N. Lectins in lymphocyte membrane. *FEBS Letters* 1978; **94**: 391–396.
- [23] KIEDA C, MONSIGNY M. Involvement of sugar receptors and membrane glycoconjugates in the adhesion of 3LL subpopulations to cultured pulmonary cells. *Invasion Metastasis* 1986; **6**: 347–366.
- [24] KIEDA C, ROCHE AC, DELMOTTE F, MONSIGNY M. Lymphocyte membrane lectins. Direct visualization by the use of fluoresceinyl glycosylated cytochemical markers. *FEBS Letters* 1979; **99**: 329–332.
- [25] LASKY LA, SINGER MS, YEDNOCK TA, DOWBENKO D, FENNIE C, RODRIGUEZ H, NGUYEN T, STACHEL S, ROSEN SD. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* 1989; **56**: 1045–1051.
- [26] MC EVER RP, BECKSTEAD JH, MOORE KL, MARSHALL-CARLSON L, BAINTON DF, GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989; **84**: 92–99.
- [27] MULLIGAN MS, VARANI J, DAME MK, LANE CL, SMITH CW, ANDERSON DC, WARD PA. Role of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) in neutrophil mediated lung injury in rat. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1396–1406 .
- [28] PICKER LJ. Mechanisms of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 1992; **4**: 244–286.
- [29] SIEGELMAN MH, van de RIJN M, WEISSMAN IL. Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science* 1989; **243**: 1165–1172.
- [30] SPRINGER TA. Adhesion receptors in the immune system. *Nature* 1990; **346**: 425–434.
- [31] STREETER PR, ROUSE BTN, BUTCHER EC. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1853–1862.
- [32] TAKADA A, OHMORI K, YONEDA T. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res* 1993; **53**: 354–361.

- [33] WALZ G, ARUFFO A, KOLANUS W, BEVILACQUAM M, SEED B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 1990; **250**: 1132–1135
- [34] WOODRUFF JJ, GESNER BM. The effect of neuraminidase on the fates of transfused lymphocytes. *J Exp Med* 1969; **129**: 551–557
- [35] YEDNOCK T A, BUTCHER EC, STOOLMAN LM, ROSEN SD. Receptors involved in lymphocyte homing: relationship between a carbohydrate homing receptor and the MEL-14 antigen. *J Cell Biol* 1987; **104**: 725–731.

C. KIEDA

Glycobiologie, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans, France

UNIwersyteckie studia biotechnologii TEACHING OF BIOTECHNOLOGY AT THE UNIVERSITY

ZDZISŁAW ŻAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Nowoczesna biotechnologia stanowi dużą różnorodność na wielu polach badań i rozwoju gospodarczego. Aktywność naukowa i dydaktyczna uniwersytetu winna wiązać się z dobieraniem, stymulacją i nauczaniem zdolnych młodych Polaków wyposażonych w podstawową wiedzę, aby mieli niekonwencjonalne nowe inicjatywy w biotechnologii.

Słowa kluczowe: biotechnologia, nauczanie biotechnologii.

Summary. Modern biotechnology encompasses a great variety of diverse areas of research and development of economy. Teaching and research activities at the University is to detect, stimulate and educate talented young Polish with educational background, to encourage promising and unconventional new initiatives in biotechnology.

Key words: biotechnology, teaching of biotechnology, biotechnology at university.

Burzliwy rozwój biotechnologii przyczynił się do powstawania kierunków studiów kształcących na wyższych uczelniach w tym przedmiocie. W naszym kraju odbywa się kształcenie w biotechnologii na studiach uniwersyteckich, politechnicznych i technologii żywności w akademiach rolniczych. Spotkanie w Zakopanem podczas XXIII Seminarium Instytutu Biologii Molekularnej UJ w części końcowej miało w programie dyskusję nad charakterem studiów uniwersyteckich kierunku biotechnologii. W dyskusji poruszono problemy potrzeb kształcenia, struktury studiów uniwersyteckich oraz możliwości zatrudnienia absolwentów.

Współczesny rozwój ekonomii naszego kraju budzi wątpliwości w rozważaniach relacji między ilością absolwentów kończących studia a możliwością ich zatrudnienia. Pomimo niekorzystnych danych o ilości młodzieży kształconej na wyższych uczelniach, statystyki o bezrobociu ludzi z dyplomami wyższych uczelni są stałym hamulcem w powiększaniu liczby przyjmowanych na studia kandydatów i otwieraniu nowych kierunków. W dyskusji nad otwieraniem kierunków biotechnologii pojawia się pytanie, czy ludzie z dyplomem biotechnologa mają dziś możliwości zatrudnienia

i czy te perspektywy będą coraz większe. Pesymizm w tej sprawie był udziałem profesorów: Danuty Fronckowiak i Włodzimierza Korohody. Prof. Zofia Walter przedstawiła możliwości zatrudniania biotechnologów w różnych gałęziach produkcji, pracowniach analitycznych i w uczelniach ośrodka łódzkiego. Prof. Anna J. Podhajska uważa, że należy ostrożnie rozwijać kierunek z ograniczeniem liczby przyjmowanych na studia kandydatów i możliwie tworzyć warunki do zatrudnienia w danym regionie, przyjmując równocześnie założenie, że wśród studiujących biotechnologię w Gdańsku są absolwenci o sprecyzowanych zainteresowaniach oraz o zdolnościach przedsiębiorczych. Z nimi można wiązać nadzieję rozwoju instytucji biotechnologicznych w kraju. Prof. Leonowicz na podstawie dotychczasowych doświadczeń stwierdził, że aktualnie opuszczający UMCS absolwenci z dyplomami biotechnologów bez trudności znajdują zatrudnienie i niektóre zakłady nie mogą doprosić się o młodych biotechnologów. Na studia zgłasza się pięciu kandydatów na jedno miejsce. Dr Michael Boulton z Uniwersytetu w Manchester uważa, że w Polsce należy kształcić biotechnologów i modernizować przy ich pomocy przemysł. To będzie przesuwało równowagę w kierunku zmniejszenia importu.

Panuje przekonanie, że kształcenie na wyższych uczelniach powinno w każdej dziedzinie wyprzedzać potrzeby rynku pracy. Dobrze teoretycznie przygotowani absolwenci powiększą kadre dobrych pracowników i stają się motorem rozwoju istniejących zakładów produkcyjnych. Ponadto ich zdolności przedsiębiorcze dają możliwość udziału we wprowadzaniu nowych technologii w tworzących się nowych zakładach. Oni po zdobyciu gruntownej wiedzy teoretycznej i po dobrym stażu w placówkach biotechnologicznych w kraju lub zagranicą mogą stawać się organizatorami nowoczesnej biotechnologii w Polsce. Wydaje się, że przeżywamy kryzys w docenianiu inwestycji w rozwój intelektualny młodych Polaków. W drodze do problemów XXI wieku leży przed nami konieczność podjęcia wezwania związanego z rozwojem biotechnologii. Prognozy wskazują, że biotechnologia ma szanse dorównania i może być bardziej użyteczną w porównaniu z mikroelektroniką. Wszelkie obawy, że równowaga między liczbą absolwentów a liczbą miejsc zatrudnienia będzie zachwiana, są nie na czasie. Winniśmy przesuwać tę równowagę na korzyść liczby ludzi kształconych w biotechnologii, co niewątpliwie przyczyni się do rozwoju gospodarczego i intelektualnego naszego kraju.

Struktura studiów była równie burzliwie dyskutowana poczynając od propozycji studiów łączących przedmioty teoretyczne z aplikacyjno-technologicznymi do studiów bez przedmiotów technologicznych dających rzetelną wiedzę teoretyczną, którą absolwent może wykorzystać zarówno w jednostkach naukowych, jak i produkcyjnych i laboratoriach typu analitycznego. Bardzo krytycznie odniesiono się do projektu studiów dwustopniowych. Pierwszy stopień trzyletnich studiów, kończący się licencjatem obejmowałby przedmioty obowiązkowe. Pierwszy rok przewidywał przedmioty podstawowe: matematykę, informatykę, fizykę, chemię i podstawy z biologii. Drugi rok obejmowałby przedmioty będące podstawą do studiów biotechno-

logicznych, takie jak: biochemia, biofizyka, mikrobiologia, genetyka, wirusologia, immunologia itp., natomiast trzeci rok – przedmioty biotechnologiczne z profilem aplikacyjnym: enzymologia przemysłowa, mikrobiologia przemysłowa, bioreaktory, inżynieria genetyczna, inżynieria komórkowa i tkankowa, biotechnologia środowiska. Podczas studiów pierwszego stopnia przewidziane są dwie jednomiesięczne praktyki wakacyjne: po drugim roku praktyka analityczna w zakładzie przemysłowym i druga po trzecim roku technologiczno-produkcyjna.

Drugi stopień studiów-magisterskich miałby charakter studiów indywidualnych z dwiema grupami specjalności. Jedna grupa to specjalności teoretyczno-podstawowe: biofizyczno-biochemiczna, genetyki molekularnej, mikrobiologiczna itp., druga specjalności aplikacyjno-produkcyjne: biotechnologii żywności, biotechnologii środowiskowej, biotechnologii farmaceutycznej, biotechnologii biopreparatów itp.

Po pierwszym stopniu studiów absolwenci powinni osiągnąć dobrą znajomość języka angielskiego. Po drugim stopniu studiów magisterskich absolwent powinien wykazać się dobrą znajomością drugiego języka obcego.

Dyskusja potoczyła się w kierunku krytyki przedstawionego przez prof. Zdzisława Żaka projektu dwustopniowych studiów. Głównym zarzutem był brak swobody w wyborze przedmiotów podczas studiów pierwszego stopnia. Ilość zajęć dydaktycznych oceniono jako bardzo dużą, co powoduje ograniczenie możliwości studiowania przedmiotów związanych z indywidualnymi zainteresowaniami.

Prof. Anna J. Podhajska przeciwstawiła organizację studiów w Gdańsku, gdzie założeniem podstawowym jest przyjęta zasada, że kierunek biotechnologii jest kierunkiem elitarnym, liczba przyjętych na studia jest ograniczona do 30 osób, które mają się wykazać dobrą znajomością języka angielskiego i przedmiotów ścisłych. Z dalszych wypowiedzi wynikało, że należy się przeciwstawić ubezsamowolnieniu studentów. Studenci powinni sami decydować o swoich zainteresowaniach i o tym, co chcą studiować. Uznano w Gdańsku, że są istotne sprawy, na których podstawie można ustalić zasadę organizacji studiów. W pierwszym rzędzie anglojęzyczność, co otwiera drogę do kontaktów z placówkami na zachodzie. Następnie określono limit godzinowy kursów do zaliczenia w ciągu studiów odpowiadający 150 kredytom (15 godzin wykładów lub 30 godzin ćwiczeń praktycznych w semestrze odpowiada jednemu kredytowi), przy czym co najmniej 130 kredytów powinno być merytorycznie związanych z kierunkiem studiów. Za najważniejsze uważają zrobienie inwentaryzacji potencjału dydaktycznego. Taki program został rozpowszechniony wśród studentów z przedstawieniem możliwości kształcenia się w biotechnologii na terenie całego Wybrzeża. Okazało się, że jest wiele możliwości nauczania chemii, fizyki, mikrobiologii i przedmiotów biotechnologicznych. Wszyscy, którzy weszli w skład pracowników Wydziału Biotechnologii, to są ludzie z biologii molekularnej, genetyki, medycyny, farmacji, biologii. Wśród kandydatów są ludzie o różnych zainteresowaniach i dowiedzieli się, że mogą studiować przedmioty podstawowe ze studiów biologicznych, farmaceutycznych, lekarskich i innych.

Sumując Prof. Anna J. Podhajska nie jest zwolenniczką ustawiania sztywnego programu przedmiotów podstawowych i aplikacyjnych. Studenci są ludźmi o różnych zainteresowaniach i predyspozycjach, a będąc studentami uniwersytetu powinni mieć możliwość wyboru i to przede wszystkim przedmiotów podstawowych. Ci ludzie, którzy mają postawić nasz kraj na nogi ekonomicznie, powinni mieć zainteresowania aplikacyjne, ale od nas przede wszystkim dostaną rzetelne wykształcenie teoretyczne. W tym systemie jest także zasada porządkowania studiów indywidualnych. Wprowadzono system wymagań związanych z wcześniejszym zaliczeniem przedmiotów będących konieczną podstawą do studiowania danego docelowego kursu. Do studiowania mikrobiologii są potrzebne: chemia, fizyka, matematyka, biochemia. Do studiowania biofizyki potrzebne jest wcześniejsze zaliczenie: matematyki, fizyki itp. Takie podejście jest kluczem do tworzenia środowiska akademickiego. Studenci wędrują do różnych instytucji naukowych i mogą studiować dowolne zagadnienia, które ich naprawdę interesują. Zachodzi wymiana w obrębie placówek naukowych i dydaktycznych między instytutami Uniwersytetu, Akademii Medycznej i Politechniki Gdańskiej. Ta wymiana potencjału dydaktycznego i naukowego doprowadziła do utworzenia jednego wielkiego Uniwersytetu Wybrzeża. W ten sposób zbliżają się do modelu uniwersytetu zachodniego, co jest godne naśladowania.

Stałym niepokojem w nauczaniu na studiach biologicznych jest sprawa, że studenci mając swobodę wyboru przedmiotów są skłonni uczęszczać na kusy łatwe do zaliczenia. Optymistyczne wnioski przedstawiła prof. Ewa Bartnik stwierdzając, że kandydaci odpowiednio dobrani wg ostrych kryteriów są najczęściej ludźmi wiedzącymi, co chcą studiować i nie unikają trudnych przedmiotów. Prof. Anna J. Podhajska uważa, że dziś wielu młodych ludzi wie, że z brakami w wykształceniu nie dostaną się do dobrego laboratorium. Prof. Włodzimierz Korohoda także podkreślił, że studenci wybierają wartościowe kursy, ale obawia się, że w prowadzeniu wartościowych przedmiotów musimy liczyć się z kosztami. To wymaga ograniczenia liczby osób przyjmowanych na dane zajęcia. Prof. Anna Podhajska potwierdziła to stanowisko cytując, że w Stanach Zjednoczonych trzeba się rejestrować i nie wszyscy zgłaszający się na dane zajęcia są przyjmowani w danym okresie dydaktycznym. Student musi planować i odpowiednio rozliczyć się z zaliczonych i nie zaliczonych punktów kredytowych, co uczy studujących odpowiedzialności.

PODSUMOWANIE

W konsekwencji dyskusja potoczyła się w kierunku akceptacji propozycji Uniwersytetu Gdańskiego. Indywidualne studia biotechnologiczne na uniwersytecie powinny zapewnić dużą ilość kursów do wyboru. Umożliwi to wszechstronne kształcenie absolwentów w wiedzy teoretycznej, co jest właściwym celem kształcenia uniwersyteckiego.

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. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Dostarczenie pracy (po poprawieniu po recenzjach) na dyskietce znacznie przyspieszy jej opublikowanie.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe 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 i wysyłającego nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. 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 rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). 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 zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA 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 prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, 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 wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

TREŚĆ

Wstęp	1
PORWIT-BÓBR Z.: Molekularna cytogenetyka – diagnostyka zmiennych sekwencji DNA sondami minisatelitarnymi	3
WIŚNIEWSKI R.: Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> w cytogenetyce molekularnej	9
SEKOWSKA A.: Sztuczny chromosom drożdżowy: budowa i zastosowanie	19
WÓJCIK K. J.: Wpływ superskręcenia cząsteczki DNA i jego regulacji przez warunki środowiska na ekspresję bakteryjnych genów	27
KAWIAK J., HOSER G.: Ekspresja genów w komórkach określana cytometrią przepływową	39
PIERZCHALSKA M.: Miozyny <i>Dictyostellum discoideum</i> – przykład badania funkcji białka metodą ukierunkowanej mutagenyzy	49
DRUKAŁA J., SROKA J.: Masowe hodowle komórek ludzkich i zwierzęcych w biotechnologii	61
MAREWICZ E.: Hodowle skóry w transplantologii i biotechnologii	73
KOROHODA W., MADEJA Z.: Wprowadzanie cząsteczek do komórek w drodze odwracalnej perforacji błon	89
MICHALIK M.: Wprowadzanie makrocząsteczek do komórek przez fuzję z liposomami i cieniami erytrocytów	97
KLEIN A., CHEĆCIÓWNA D.: Hodowle zwierzęcych komórek nowotworowych jako źródło peptydowych czynników wzrostowych	119
TOMECKI J.: Strategie immunoterapii nowotworów – implikacje dla konstrukcji szczepionek przeciwnowotworowych	131
KASZA A., ŁĄCZKA A.: Możliwości terapeutycznego zastosowania modyfikowanych, syntetycznych i otrzymanych w drodze rekombinacji inhibitorów proteinaz serynowych	143
MAK P.: Antybakteryjne białka i peptydy ludzkich neutrofilii. W poszukiwaniu nowych antybiotyków	157
OSYCZKA A., TURYN B.: Wybrane metody specyficznego wprowadzania nienaturalnych aminokwasów do białek	175
KIEDA C.: Endogeneous lectins in circulating cells and their glycosylated ligands: potential tools for adhesion-based therapy	187
ŻAK Z.: Uniwersyteckie studia biotechnologii	197

Indeks 369705