

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

TOM 25 1998

Suplement nr 10

Redaktor Ryszard Słomski

POSTĘPY BIOLOGII MOLEKULARNEJ

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.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the UNESCO/PAN Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jacek KUŹNICKI (biologia molekularna, biochemia – *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*).

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chabubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – Przewodnicząca – President, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel.8340 344, fax 8340 470.

Recenzenci rocznika PBK są publikowani w zeszycie 4.

Referees of the volume are published in issue 4.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

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

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 25,5. Ark. druk. 21,5. Podpisano do druku w maju 1998 r. Druk ukończono w czerwcu 1998 r.

**Symposium Naukowe „Biotechnologia”
X Szkoła Letnia „Postępy biologii molekularnej”
22 czerwca 1998**

- 10:30 Otwarcie Sympozjów i X Szkoły Letniej
- 10:45 **Konferencja prasowa:** J. Barciszewski, W. Grajek,
 A. Horst, W. Krzyżosiak, J. Nowak, J. Pawełekiewicz,
 Z. Schneider, R. Słomski, K. Szyfter, M. Świtoński,
 D.J. Kwiatkowski, R. Perez Bercoff, W. Lassociński
- 13:00 **Diagnostyka molekularna**
 R. Słomski
 Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
 Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu
- 14:00 **Genome project and future of human genetics**
 D.J. Kwiatkowski (Boston)
- 14:45 **Struktura i funkcje białek zlokalizowanych w centrum katalitycznym
 rybosomu**
 J. Barciszewski
 Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
- 15:30 **Metody zwiększania produkcji barwników przez roślinne kultury
 tkankowe**
 W. Grajek
 Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii AR w Poznaniu
- 16:30 **Recombination of viral RNA genomes**
 R. Perez Bercoff (Rzym)
- 17:15 **Terapia genowa – stan obecny i perspektywy rozwoju**
 J. Nowak
 Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
- 18:00 **Aeroponika**
 W. Lassociński
 Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu

Kolegium Rungego

Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 52

**Symposium Naukowe „Genetyka molekularna”
X Szkoła Letnia „Postępy biologii molekularnej”
23 czerwca 1998**

- 9:45 Otwarcie Symposium
10:00 *Tuberous sclerosis: phenotype, genes, mosaicism, mice and growth control*
 D. J. Kwiatkowski (Boston)
- 11:00 *Strategie poszukiwania nowych genów na przykładzie genów RalGDS, XPMC2 H i TSC1 człowieka*
 J. Kwiatkowska
 Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
- 12:00 *BRCA1 i BRCA2 – geny dziedzicznych form raka piersi*
 W. Krzyżosiak
 Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
- 13:15 *Mukowiscydoza -- „modelowa” choroba dziedziczna*
 J. Bal
 Instytut Matki i Dziecka w Warszawie
- 14:15 *Markerowe mapy genomowe i ich wykorzystanie w hodowli zwierząt*
 M. Świtoński
 Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu
- 15:15 *Czynnik genetyczny w raku krtani*
 K. Szyfter
 Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
- 16:15 *Zastosowanie analizy DNA w ustalaniu ojcostwa*
 R. Słomski
 Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
 Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu
- 17:00 *Molekularne aspekty miażdżycy*
 Z. Schneider
 Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu

Kolegium Rungego

Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 52

X Szkoła Letnia „Postępy biologii molekularnej”

Wykłady 24 i 29 czerwca 1998

- 9:00 ***Metoda PCR w badaniach naukowych i diagnostyce molekularnej***
R. Słomski
Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu
- 14:00 ***Sekwencjonowanie DNA -- teoria, praktyka, problemy***
R. Słomski
Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu
- 17:00 ***Zastosowanie analizy hybrydacyjnej w badaniach genetycznych***
R. Słomski
Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu

Wykłady 25 i 30 czerwca 1998

- 9:00 ***Analogi oligonukleotydów w terapii antysensowej***
A. Kraszewski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
- 14:00 ***Geny supresorowe nowotworów***
A. Pławski, R. Słomski, A. Pawlak
Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
- 17:00 ***Nowe metody w cytogenetyce molekularnej***
M. Zawada
Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Wykłady 26 czerwca i 1 lipca 1998

- 9:00 ***Priony – nowa klasa cząstek infekcyjnych***
U. Szybiak-Stróżycka
Katedra Biochemii i Biotechnologii AR w Poznaniu
- 12:00 ***Oddziaływanie bodźców i stresu na człowieka i zwierzęta: założenia teoretyczne i wyniki empiryczne***
P. Gronek, R. Słomski
Katedra Hodowli i Produkcji Trzody Chlewnej AR w Poznaniu

Sala wykładowa im. B. Niklewskiego
Katedra Biochemii i Biotechnologii AR
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego
w Poznaniu, ul. Wołyńska 35

X Szkoła Letnia 1998 „Postępy biologii molekularnej” 24–26 czerwca 1998 i 29 czerwca – 1 lipca 1998

Zajęcia praktyczne

1. Pobieranie materiału biologicznego
2. Przechowywanie i przewożenie próbek
3. Izolacja DNA, izolacja wysokocząsteczkowego DNA
4. Metoda izolacji z odsalaniem białek
5. Metoda izolacji z zastosowaniem mocznika, izolacja DNA w skali półmikro
6. Izolacja całkowitego RNA
7. Ocena ilościowa i jakościowa preparatów DNA i RNA
8. Synteza cDNA na matrycy całkowitego RNA
9. Analiza restrykcyjna
10. Trawienie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi
11. Hybrydyzacja DNA z sondami molekularnymi
12. Ocena wyników analizy restrykcyjnej
13. Reakcja łańcuchowa polimerazy
14. Wykrywanie zmutowanego genu przez analizę polimorfizmu DNA techniką PCR-RFLP
15. Analiza polimorfizmu insercyjno-delecyjnego metodą PCR
16. PCR multipleks
17. Polimorfizm regionu D mitochondrialnego DNA
18. Wykrywanie mutacji punktowych i polimorfizmu DNA techniką PCR-SSCP
19. Barwienie DNA srebrem
20. Analiza polimorfizmu sekwencji minisatelitarnych PCR-VNTR
21. Analiza sekwencji mikrosatelitarnych $(CA)_n/(GT)_n$
22. Analiza sekwencji mikrosatelitarnych HUMPLA2A1(AAT)_n (fosfolipaza trzustkowa A-2)
23. Analiza sekwencji mikrosatelitarnych HUMCYARO(AAAT)_n (cytochrom P450)
24. Wykrywanie mutacji punktowych w genie supresorowym APC człowieka metodą heterodupleksów
25. Sekwencjonownia na zestawie ALF Express
26. Przygotowanie produktów PCR do sekwencjonowania
27. Sekwencjonowanie DNA metodą izotermiczną
28. Sekwencjonowanie DNA metodą cykliczną z zastosowaniem radioizotopów
29. Sekwencjonowanie DNA metodą cykliczną
30. Wykrywanie mutacji w genie APC metodą PTT

Sala ćwiczeń

Katedra Biochemii i Biotechnologii AR

Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, ul. Wołyńska 35

PRZEDMOWA

W bieżącym roku osiągnęliśmy skromny jubileusz. Z myślą o szerokiej grupie uczestników przygotowaliśmy X Szkołę Letnią *Postępy Biologii Molekularnej*. Gdy 10 lat temu organizowaliśmy pierwszą Szkołę, nie przypuszczaliśmy, że doczekamy się jubileuszu. Stało się to możliwe dzięki zaangażowaniu pracowników Zakładu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk i Katedry Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu oraz przychylności władz obydwu placówek. Przez wiele lat korzystaliśmy także z rad i dofinansowań Komitetu Patologii Komórkowej i Molekularnej PAN, reprezentowanego przez prof. Antoniego Horsta.

Gdy w 1989 roku zwróciłem się do prof. Antoniego Horsta z zapytaniem, czy sądzi, że zorganizowanie kursu z zakresu biologii molekularnej spotkałoby się z zainteresowaniem, Profesor usilnie namawiał mnie do zorganizowania takiego kursu. Jeszcze w tym roku w Zakładzie Genetyki Człowieka zorganizowałem kurs dla studentów Wydziału Lekarskiego AM w Poznaniu. W kursie brało udział 20 studentów. Kilku z nich zdecydowało się na podjęcie pracy w zakładach naukowych i dzisiaj po ukończeniu doktoratów i odbyciu staży naukowych należą do wyróżniającej się kadry. Wkrótce po kursie dla studentów, w dniach 21–25.08.1989 roku odbyła się w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN I Szkoła Letnia *Analiza kwasów nukleinowych i jej zastosowanie w naukach medycznych*. W tamtych latach przeprowadzenie praktycznego szkolenia wymagało nie tylko umiejętności i wiedzy prowadzących zajęcia, lecz przede wszystkim zabezpieczenia materiałów i sprzętu. Należy zaznaczyć, że nie istniały wtedy tak powszechne obecnie urządzenia, jak: termocyklery do metody PCR czy aparaty do syntezy oligonukleotydów. Dużą pomoc w organizacji okazała firma Beckman Instruments. Nie zakładano jednak, że Szkoła Letnia odbywać się będzie cyklicznie, a główny cel obejmował zapoznanie i przygotowanie uczestników do pracy z nowymi metodami badawczymi.

W kolejnych pięciu latach szkoły letnie odbyły się w Zakładzie Genetyki Człowieka, a od 1994 roku odbywają się one na terenie Akademii Rolniczej w Poznaniu. W zajęciach szkół letnich wzięło udział ogółem 318 słuchaczy, w tym w bieżącym

roku 60. Spośród licznej grupy współpracowników wyrazy wdzięczności należą się wszystkim, lecz przede wszystkim tym, którzy przez wszystkie lub prawie wszystkie lata aktywnie uczestniczyli w przygotowywaniu i prowadzeniu zajęć: mgr Hannie Chlebowskiej, dr Jolancie Kwiatkowskiej i dr Barbarze Siemieniako. W ostatnich latach dołączyli do nich: mgr Dobrawa Napierała, mgr Przemysław Nuc, mgr Katarzyna Nuc, lek. med. Tomasz Trzeciak, mgr Andrzej Pławski i Katarzyna Dziechciowska.

W kolejnych latach szkoły letnie prowadzone były w języku polskim lub angielskim. Wynikało to z prowadzenia zajęć praktycznych i wykładów przez kolegów z Niemiec, a w bieżącym roku także z Włoch i USA. Bardzo wdzięczny jestem za pomoc, jaką okazali mi w prowadzeniu zajęć szkoły: dr Jochen Reiss, dr Michael Wagner, dr Manfred Schloesser, dr Frauke Rininsland i dr Peter Burfeind (wszyscy z uniwersytetu w Getyndze), prof. Jörg Eppel (Uniwersytet w Bochum), dr Ingold Böhm (Laboratorium Diagnostyki Medycznej w Monachium), prof. Raul Perez Bercoff (Uniwersytet w Rzymie) i prof. David J. Kwiatkowski (Uniwersytet Havarda w Bostonie). Większość z nich przyjechała do Poznania z zestawami gotowymi do prowadzenia zajęć, wtedy gdy ich stosowanie nie było jeszcze rozpowszechnione. Ze względu na całodniowe zajęcia tylko w niewielkim stopniu mieli możliwość zapoznać się z Poznaniem i jego okolicami.

Przez prawie wszystkie lata działania naszej szkoły wykłady wygłaszali stale z nami współpracujący wykładowcy: prof. Antoni Horst, prof. Jerzy Nowak, prof. Jan Barciszewski i prof. Adam Kraszewski. Wykładali oni na prawie wszystkich szkołach letnich. Przygotowanie zajęć praktycznych możliwe było dzięki stałej pomocy ze strony firm, które co roku dostarczały odczynniki i materiały na ten cel. Szczególnie dużą pomoc okazała nam pani Jadwiga Czurak (Amersham), panowie Marian Kawczyński i Marek Duszota (Beckman Instruments), szczególnie w pierwszych latach działalności szkoły oraz pan Andrzej Reński (Pharmacia Biotech) i pan Zdzisław Mioduszewski (Sarstedt), którzy zawsze dbali nie tylko o materiały i odczynniki, ale także o uroczysty przebieg Szkoły.

Obecnie mam przyjemność zaprosić Państwa do udziału w X Szkole Letniej i organizowanych z tej okazji sympozjach naukowych. Jubileuszowa Szkoła Letnia z zakresu biologii molekularnej została przygotowana przez moich najbliższych współpracowników z Katedry Biochemii i Biotechnologii i Zakładu Genetyki Człowieka przy współudziale Komitetu Patologii Komórkowej Molekularnej, Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka i sponsorów. Na pierwsze dwa dni przygotowano obszernie wykłady z różnych dziedzin nt.: diagnostyki molekularnej, metody PCR w badaniach naukowych i diagnostyce molekularnej, współczesnych poglądów na dochodzenie spornego ojcostwa (prof. R. Słomski); wykrywania nowych genów i projektów badania genomów (prof. D.J. Kwiatkowski, dr J. Kwiatkowska); struktury i funkcji białek zlokalizowanych w centrum katalitycznym rybosomu (prof. J. Barciszewski); wykorzystania kultur tkankowych roślin dla celów biotechnologicznych

(W. Grajek); rekombinacji genomów wirusowych (prof. R. Perez-Bercoff); terapii genowej i klonowania organizmów (prof. J. Nowak); aeroponiki (dr W. Lassociński); mutacji genów BRCA w raku piersi (prof. W. Krzyżosiak); chorób metabolicznych (doc. J. Bal); mapowania genomów zwierząt (prof. M. Świtoński); czynnika genetycznego w raku krtani (doc. K. Szyfter); cholesterolu i miażdżycy (prof. Z. Schneider)*.

Na trzy kolejne dni Szkoły Letniej przygotowano wykłady z zakresu sekwencjonowania DNA (mgr P. Nuc, mgr K. Nuc, prof. R. Słomski); genów supresorowych (mgr A. Pławski, prof. R. Słomski, prof. A. Pawlak); prionów (dr U. Szybiak-Stróżycka); oligonukleotydów w biologii molekularnej (prof. A. Kraszewski); cytogenetyki molekularnej (dr M. Zawada) i stresu u organizmów wyższych (dr P. Gronek). Liczne przykłady ilustrujące możliwości aplikacyjne badań molekularnych pochodzą z badań własnych prowadzonych w zespołach kierowanych przez wykładowców. Zajęcia praktyczne przygotowano w takiej formie, aby przejść od uzyskania genu lub jego fragmentu do oznaczenia sekwencji, wykrycia polimorfizmów i mutacji. Obiektami badawczymi będą DNA człowieka, zwierząt i roślin, a prezentowane metody analityczne mogą być bezpośrednio wdrożone w laboratoriach uczestników kursu. Zademonstrowane zostaną metody i etapy pobrania materiału, transportu, przechowywania i nade wszystko izolacji DNA przy pomocy technik gwarantujących wysoką wydajność izolacji, jak i wysoki stopień czystości DNA, ponad to metody umożliwiające ocenę DNA oraz dokładną analizę różnymi wariantami metody PCR (PCR-RFLP, PCR-SSCP, PCR-HD) oraz przez sekwencjonowanie. Analiza fragmentów DNA przeprowadzona będzie zarówno metodami klasycznymi przez hybrydyzację z sondami molekularnymi i sekwencjonowanie z zastosowaniem radioizotopów, jak również metodami zautomatyzowanymi opartymi na fluorymetrii. Materiały niezbędne do praktycznego przeprowadzenia ćwiczeń dostarczone zostały w większości przez firmy współpracujące ze Szkołą.

Serdeczne podziękowania chciałbym złożyć prof. Jerzemu Kawiakowi za podjęcie się trudu wydania w rekordowo krótkim czasie zeszytu specjalnego Postępów Biologii Komórki, zawierającego wykłady X Szkoły Letniej, co zapewniło aktualność wiadomości z omawianych dziedzin. Chciałbym podziękować także wszystkim osobom, które przyczyniły się do przygotowania zeszytu specjalnego, a w szczególności prof. Jerzemu Pawełkiewiczowi, prof. Andrzejowi Pawlakowi, prof. Eugeniuszowi Kośmickiemu, doc. Krzysztofowi Szyfterowi, dr Wojciechowi Lassocińskiemu, dr Jolancie Kwiatkowskiej i mgr Hannie Chlebowskiej za pomoc w recenzowaniu prac i ich redakcji.

Poznań 22.05. 1998 r.

Ryszard Słomski

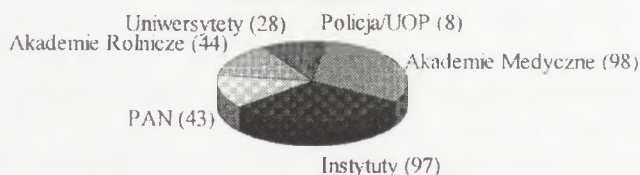
*Informację dotyczącą poprawnego zapisu nazw genów i białek zamieszczono na końcu niniejszej publikacji (s. 343)

Szkoły Letnie w latach 1989–1998

- I Szkoła Letnia: *Analysis of nucleic acids in medical sciences* – 21–25 sierpnia 1989
- II Szkoła Letnia: *Molecular biology – powerful diagnostic tool* – 24–29 września 1990
- III Szkoła Letnia: *Amplification and sequencing of DNA* – 27–30 sierpnia 1991
- IV Szkoła Letnia: *Application of the molecular techniques in the early diagnosis of human diseases* – 28 września–1 października 1992
- V Szkoła Letnia: *Molecular genetics in medicine* – 20–23 września 1993
- VI Szkoła Letnia: *Advances in molecular biology* i Sympozjum Naukowe: *DNA polymorphism and profiling* – 19–23 września 1994
- VII Szkoła Letnia: *Molecular diagnosis: sequence and signal amplification in studies of DNA* – 11–15 września 1995
- VIII Szkoła Letnia: *Automatyzacja badań DNA: Analiza fragmentów i sekwencjonowanie* – 24–27 września 1996
- IX Szkoła Letnia: *Analiza struktury genów* i Sympozjum naukowe: *Postępy Biologii Molekularnej* – Poznań 16–20 czerwca 1997
- X Szkoła Letnia: *Postępy Biologii Molekularnej* i sympozja naukowe: *Biotechnologia i Genetyka molekularna* – Poznań 22–26 czerwca 1998

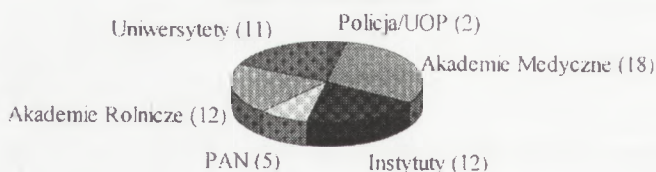
Szkoły Letnie 1989-1998

Liczba uczestników 318



Szkoła Letnia 1998

Liczba uczestników 60



DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

MOLECULAR DIAGNOSTICS

Ryszard SŁOMSKI^{1,2}, Barbara SIEMIENIAKO¹, Jolanta KWIATKOWSKA²,
Dobrawa NAPIERAŁA², Piotr GRONEK³

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza
im Augusta Cieszkowskiego, Poznań; ²Zakład Genetyki Człowieka, PAN, Poznań;

³Katedra Hodowli i Produkcji Trzody Chlewnej, Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: Techniki badań kwasów nukleinowych, takich jak: genotypowanie DNA mikroorganizmów, analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) i reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), przyczyniają się do stałego postępu w laboratoriach diagnostycznych. Analiza sekwencji amplifikowanych fragmentów DNA umożliwia lepszą identyfikację patogenów, wykrywanie zmutowanych genów, a także prognozowanie wystąpienia i terapii określonych chorób.

Słowa kluczowe: DNA, diagnostyka molekularna, wykrywanie patogenów, mutacje, polimorfizm.

Summary: Nucleic acids techniques, such as microbial DNA genotyping, analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) and polymerase chain reaction (PCR), are making increasing progress in diagnostic laboratories. Sequence analysis of amplified DNA allows better identification of pathogen, detection of mutant genes and more accurate prognosis and therapy of certain diseases.

Key words: DNA, molecular diagnostics, pathogen detection, mutation, polymorphism.

1. WSTĘP

Diagnostyka molekularna należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się działów biologii i medycyny. Pierwsze badania dotyczyły człowieka i zostały przeprowadzone w 1978 roku przez Kana i Dozy'ego [15] oraz niezależnie przez Orkina i wsp. [26], którzy zastosowali badania DNA w diagnostyce anemii sierpowatej. Obydwie prace dotyczyły wykrywania mutacji w 6 kodonie β globiny, w którym

doszło do tranzycji A→T. Kan i Dozy zastosowali do wykrycia tej mutacji analizie restrykcyjną DNA i hybrydyzację z sondą molekularną (fragmentem genu β globiny człowieka). Okazało się, że analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) może rozróżnić osoby chore od heterozygot (nosieli choroby) i osób zdrowych. Z kolei Orkin i wsp. do wykrycia tej samej mutacji zastosowali hybrydyzację z dwoma wariantami oligonukleotydowej sondy molekularnej, umożliwiającymi rozróżnienie alleli prawidłowych od zmutowanych. Badania DNA dołączyły w ten sposób do technik diagnostycznych, które do tej pory polegały głównie na reakcjach immunochemicznych antygeny z przeciwciałem.

Złożyło się na to wiele czynników, a przede wszystkim wprowadzenie sond molekularnych i enzymów restrykcyjnych, jak również nowych technik badawczych, takich jak: klonowanie DNA, transfer Southerna, sekwencjonowanie, znakowanie i detekcja DNA, PCR i synteza oligonukleotydów. Można przyjąć, że lata dziewięćdziesiąte przejdą do historii jako okres rozpowszechnienia diagnostyki molekularnej. Obecnie w diagnostyce molekularnej można już wyróżnić kierunki badań rutynowych oraz wskazać perspektywę dalszego jej rozwoju. Różnice między diagnostyką klasyczną a molekularną polegają przede wszystkim na zwiększeniu szybkości i czułości wykonania badań, dlatego diagnostyka molekularna jest coraz częściej stosowana w różnych dziedzinach nauk biologicznych, przemyśle korzystającym z osiągnięć biotechnologii, medycynie, medycynie weterynaryjnej i hodowli.

2. RODZAJE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ

Diagnostyka molekularna obejmuje dwa zasadnicze działy – diagnostykę bezpośrednią i pośrednią. Diagnostyka bezpośrednia obejmuje wykrywanie mutacji w DNA oraz wykrywanie DNA patogenów, natomiast w diagnostyce pośredniej o występowaniu zmutowanych genów wnioskuje się na podstawie analizy sprzężeń. Współczesna diagnostyka molekularna przebiega z zastosowaniem dwóch metod – analizy restrykcyjnej i hybrydyzacji z sondami molekularnymi oraz amplifikacji DNA metodą PCR. Z kolei ostateczny wynik diagnostyczny powstaje w wyniku oceny polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (RFLP), określenia długości badanego fragmentu DNA, wykrycia delecji, insercji, mutacji punktowych lub określenia sekwencji badanego fragmentu DNA.

3. DIAGNOSTYKA OPARTA NA HYBRYDYZACJI Z SONDAMI MOLEKULARNYMI

Historycznie najwcześniej wprowadzono badanie typu RFLP z grupy pośrednich analiz. Nie jest określany defekt genu, lecz jedynie jego dziedziczenie zawierające mutację. Ogromny postęp, który doprowadził do zwiększenia czułości i skrócenia

czasu hybrydyzacji oraz wprowadzenie nieradioaktywnych metod znakowania sond, sprawił, że pozostaje ona nadal bardzo atrakcyjnym narzędziem w diagnostyce molekularnej (patrz artykuł A. Kraszewskiego w niniejszym tomie). Istotą hybrydyzacji jest wzajemne oddziaływanie pomiędzy fragmentem kwasu nukleinowego a sondą, które prowadzi do utworzenia hybrydu (dupleksu) złożonego z dwuniciowych struktur. Tworzenie hybrydu poprzedzone jest przygotowaniem DNA, które w przypadku dwuniciowych kwasów nukleinowych obejmuje denaturację prowadzoną przez działanie zasadami lub przez ogrzewanie. Łączenie się sondy molekularnej z docelowym fragmentem kwasu nukleinowego jest w odpowiednich warunkach wysoce specyficzne i zachodzi według reguły komplementarności zasad. Badany DNA lub RNA może być denaturowany i unieruchamiany na filtrach nylonowych lub nitrocelulozowych, a następnie identyfikowany za pomocą znakowanej radioaktywnie bądź nieradioaktywnie sondy molekularnej. W diagnostyce molekularnej stosowane są, w zależności od potrzeb, krótkie (20–150 pz) lub długie sondy molekularne, komplementarne do unikalnej sekwencji badanego DNA lub RNA. Mogą to być syntetyczne oligomery, syntetyczne bądź naturalne geny lub ich fragmenty, cDNA, fragmenty chromosomów lub całe genomy bakteryjne. W ostatnich latach coraz częściej w diagnostyce bakteriologicznej stosuje się sondy będące odcinkami DNA komplementarnymi do unikatowych sekwencji rRNA. Odpowiednio przygotowana i zastosowana w warunkach dla siebie optymalnych sonda molekularna rozpoznaje sekwencje mogące różnić się zaledwie kilkoma nukleotydami i tworzy trwałe wiązania wyłącznie z komplementarnym fragmentem kwasu nukleinowego. Czułość w dużym stopniu zależy od metody wyznakowania sondy. Schemat postępowania jest podobny niezależnie od technicznego wariantu hybrydyzacji i obejmuje kilka zasadniczych etapów:

- 1) immobilizacja zdenaturowanego DNA lub RNA na membranie lub innym stałym podłożu;
- 2) inkubacja w roztworze sondy;
- 3) odpłukanie nie związanej sondy;
- 4) wykrywanie hybrydów metodami określonymi przez wyznacznik wprowadzony do sondy np. poprzez autoradiografię.

Stosowane obecnie metody hybrydyzacji różnią się od siebie przede wszystkim technicznie i można je zebrać w kilku grupach:

- 1) analiza hybrydyzacji w roztworach głównie w badaniach nad budową i strukturą genomu;
- 2) hybrydyzacja na nośniku stałym (hybrydyzacja z replikami kolonii bakteryjnych i fagowych, metoda Southerna, *Northern* i *Dot-blotting* oraz *DNA-fingerprinting*);
- 3) hybrydyzacja *in situ*.

Najważniejszą cechą hybrydyzacji jest fakt wysokiej komplementarności i stabilności formowanego dupleksu. Wykorzystano to początkowo do badania struktury DNA i RNA i odkryto istnienie sekwencji powtórzonych. W badaniach ewolucyjnych

zaś badanie stabilności termicznej dupleksów okazało się cenną metodą w określaniu pokrewieństwa między genami różnych gatunków roślin i zwierząt. Wprowadzona metodą lokalizowania pozycji specyficznych sekwencji nukleotydowych w jądrze lub chromosomach przez hybrydyzację sondy do materiału utrwalonego na szkiełku mikroskopowym. Następnie potrzeba posiadania metody wykrywania interesującej sekwencji w zrekombinowanych klonach doprowadziła do zastosowania hybrydyzacji do kolonii bakteryjnych i analizowania łysinek fagowych [33]. Najprostszą spośród wymienionych technik stanowi hybrydyzacja punktowa (ang. *dot blot hybridisation*), w której DNA lub RNA jest bezpośrednio nakładany na membranę, unieruchomiany przez ogrzewanie w temp. 80°C bądź naświetlanie promieniami UV, a następnie inkubowany z sondą. Hybrydyzacja punktowa pozwala na jednoczesne wykrywanie i identyfikację wielu próbek na tym samym filtrze oraz ilościową ocenę ich stężenia. Ponadto pozwala na bezpośrednie stosowanie komórek z hodowli lub bakterii zamiast kwasów nukleinowych. Technika ta jest szeroko stosowana do wykrywania wirusów w diagnostyce chorób zakaźnych zwierząt hodowlanych [45].

Jedną z najczęściej stosowanych jest metoda Southerna (ang. *Southern blot hybridisation*) dotycząca hybrydyzacji DNA-DNA [42]. Metoda ma na celu wyszukanie sekwencji DNA spośród mieszaniny fragmentów otrzymanych po trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Fragmenty DNA rozdzielane są następnie w żelu agarozowym proporcjonalnie do ich długości, denaturowane i przenoszone na podłoże metodą sączenia kapilarnego, a hybrydyzacja w roztworze sondy pozwala na zlokalizowanie komplementarnych sekwencji. W porównaniu do hybrydyzacji punktowej w metodzie Southerna uzyskuje się dodatkowe informacje o pozycji elektroforetycznej i długości odcinka DNA, w którym zlokalizowana jest szukana sekwencja. Metoda jest więc również cennym instrumentem mapowania genomów. Metody hybrydyzacyjne znajdują również zastosowanie w badaniu poziomu ekspresji poszukiwanego genu. Najczęściej informacje o ekspresji genu pochodzą z badań hybrydyzacyjnych RNA:DNA określanych jako badania typu *northern* (ang. *northern blot*), wykonywanych podobnie jak hybrydyzacja Southerna, z tym jednak, że frakcjonowanym kwasem nukleinowym jest RNA. W porównaniu do hybrydyzacji Southerna metoda *northern* dostarcza dodatkowych informacji o występowaniu w badanych komórkach określonego RNA.

Hybrydyzacja *in situ* jest metodą szeroko obecnie stosowaną do wykrywania specyficznych sekwencji w preparatach histologicznych, chromosomach, pojedynczych komórkach lub skrawkach tkanek (patrz artykuł M. Zawady w niniejszym tomie). Od poprzednich metod hybrydyzacji różni się tym, że wykonywana jest bezpośrednio na szkiełku mikroskopowym bez uprzedniego transferu na podłoże. Ze względu na fakt, że jest przeprowadzana na materiale z zachowaną strukturą tkankową możliwe jest nie tylko wykrycie poszukiwanych sekwencji DNA lub RNA, lecz także precyzyjne określenie ich przestrzennej lokalizacji w komórce.

Znajduje to zastosowanie np. do wykrywania RNA występującego w niewielkiej subpopulacji komórek, maskowanego innymi rodzajami RNA. W takich przypadkach opisana metoda gwarantuje większą czułość niż stosowana do RNA metoda *northern*. Hybrydyzacja *in situ* bardzo często stosowana jest w diagnostyce wirusologicznej i badaniach cytologicznych. Z powodzeniem została zastosowana do wykrywania wielu wirusów zwierzęcych [33,45].

Hybrydyzacja Southerna określana jako *DNA fingerprinting* ma również duże znaczenie diagnostyczne. Występowanie w eukariotycznym DNA sekwencji powtórzonych, cechujących się dużą zmiennością nadaje DNA poszczególnych osobników niepowtarzalną indywidualność podobnie jak w przypadku układu linii papilarnych będących indywidualną cechą każdego człowieka. Prawdopodobnie u podstaw tej zmienności leży mechanizm rekombinacji genetycznej w trakcie mejozy lub mitozy, polegający na nierównym rozdziale sekwencji powtórzonych, co prowadzi do powstawaniu polimorficznych alleli. Na autoradiogramach po hybrydyzacji z sondą molekularną wyraża się to obecnością lub brakiem charakterystycznych prążków.

W badaniach hybrydyzacyjnych stosuje się 5–10 µg DNA, który po trawieniu enzymem restrykcyjnym rozdzielany jest w żelu agarozowym i przenoszony na nośnik nitrocelulozowy (transfer Southerna). Unieruchomiony na filtrze DNA jest następnie poddawany hybrydyzacji z sondą molekularną znakowaną ^{32}P . Coraz częściej znakowanie sond molekularnych radioizotopami fosforu (^{32}P , ^{33}P) zastępowane jest znakowaniem ligandami, które rozpoznawane są swoistymi przeciwciałami skoniugowanymi z enzymami. W opinii autorów największe zastosowanie znajdują sondy znakowane digoksygeniną lub biotyną, w których wykrycie ligandu przebiega z zastosowaniem reakcji immunochemicznych i kolorymetrii, jak również sondy, dla których końcowym etapem detekcji jest chemiluminescencja. Analiza hybrydyzacyjna jest szczególnie cenna w poradnictwie genetycznym, w diagnostyce prenatalnej i preimplantacyjnej, ze względu na ograniczenia czasowe do 24 godzin (np. w przypadku diagnostyki preimplantacyjnej). Diagnostyka prenatalna pozostawia więcej czasu na wykonanie badań, jednakże dla licznej grupy chorób genetycznych określenie mutacji w krótkim czasie nie jest możliwe i dlatego często stosuje się badanie pośrednie typu RFLP.

4. DIAGNOSTYKA OPARTA NA AMPLIFIKACJI DNA

Diagnostyka molekularna z zastosowaniem PCR rozwija się bardzo dynamicznie i stopniowo zastępuje badania hybrydyzacyjne. W badaniach RFLP można również zastosować reakcję łańcuchową polimerazy (PCR-RFLP). Badanie sprowadza się do uzyskania produktu PCR, w którym występuje polimorfizm, a następnie do

trawienia produktu enzymem restrykcyjnym specyficznym dla miejsca wykazującego polimorfizm [34]. Po upowszechnieniu techniki PCR nastąpił przełom w diagnostyce molekularnej. Już pierwsze opracowanie Saiki i wsp. dotyczyło diagnostyki molekularnej anemii sierpowatej [38]. Badania nosiły wtedy nazwę amplifikacji DNA *in vitro* i dopiero w 1987 r. nazwa uległa zmianie na reakcję łańcuchową polimerazy [20]. Początkowo w etapie syntezy stosowano termolabilny fragment Klenowa polimerazy z *E. coli*, co wymagało dodawania enzymu każdorazowo po etapie denaturacji. Wprowadzenie termostabilnej polimerazy z bakterii (polimeraza Taq) w znaczący sposób uprościło reakcję amplifikacji i obniżyło jej koszty, a także przyczyniło się do szybkiego zastosowania tej reakcji w biologii i medycynie. Obecnie dostępna jest na rynku liczna grupa polimeraz termofilnych Prokaryota: obok wspomnianej już polimerazy z *Thermus aquaticus* dostępne są również polimerazy z *Thermus thermophilus*, *Bacillus stercorophilus*, *Thermococcus litoralis*. Pojawiły się też liczne urządzenia, termocyklery zapewniające automatyzację PCR [40,41].

Najważniejszym zastosowaniem PCR w diagnostyce jest wykorzystanie tej techniki do uzyskania zwiększonej ilości DNA przed jego dalszą analizą. Po uzyskaniu fragmentu genu możliwe jest dalsze jego badanie za pomocą metody RFLP, a uzyskany wynik podobny do wyniku uzyskiwanego z zastosowaniem transferu Southerna i hybrydyzacji z sondą molekularną, przy czym technika PCR jest mniej czasochłonna. Już w 1988 r. Williams i wsp. [44] przeprowadzili pełną diagnostykę jednej z najczęstszych chorób genetycznych – mukowiscydozy w ciągu jednego dnia. Wykrycie ponad 400 mutacji genu *CFTR* warunkującego mukowiscydozę byłoby niemożliwe bez zastosowania techniki PCR. Obecnie PCR-RFLP stosowany jest w przypadku wielu chorób genetycznych m.in. wspomnianej już mukowiscydozy, fenyloketonurii, niedoboru $\alpha 1$ -antytrypsyny, anemii sierpowatej, hemofilii, dystrofii mięśniowych, zespołu łamliwego chromosomu X (FraX). PCR-RFLP może być stosowana zarówno do bezpośredniego identyfikowania mutacji lub określania nosicielstwa. W przypadku określania nosicielstwa okres jednego tygodnia niezbędny do wykonania badania metodą transferu Southerna i hybrydyzacji z sondą molekularną ulega skróceniu do kilku godzin przy zastosowaniu PCR. PCR-RFLP można zastosować również w badaniach, w których sztucznie wprowadza się miejsce restrykcyjne w celu zidentyfikowania mutacji. Ten rodzaj RFLP może być wykonany wyłącznie w połączeniu z reakcją PCR [2, 21].

W badaniach genu *DMD*, którego mutacje prowadzą do wystąpienia dystrofii mięśniowej Duchenne'a, zastosowano po raz pierwszy wariant typu PCR umożliwiający jednoczesną amplifikację kilku eksonów (*multiplex PCR*). W pionierskiej pracy Chamberlaina i wsp. (1988) reakcja *multiplex* obejmowała sześć eksonów, w regionach genu *DMD*, w których najczęściej występują delecje [5]. Pojedynczą reakcją PCR można było wykryć blisko 60% wszystkich delecji. Nic dziwnego, że ta reakcja znalazła natychmiastowe zastosowanie w praktyce. Po włączeniu do

reakcji *multiplex* jeszcze dziewięciu eksonów i regionu promotora genu, wykrywalność delecji zwiększyła się do 98% [3].

Ukazały się ponadto doniesienia o wykrywaniu delecji i mutacji punktowych poprzez analizę mRNA limfocytów krwi obwodowej, z wykorzystaniem zjawiska nieuprawnionej transkrypcji (ang. *illegitimate transcription*), wykazanej po raz pierwszy przez Chelly'ego i wsp. (1989) [6]. W tej metodzie materiałem wyjściowym jest całkowity RNA limfocytów. Na matrycy RNA przeprowadza się syntezę cDNA stosując startery specyficzne dla genu, a następnie dwie reakcje PCR z wewnętrznymi starterami (ang. *nested-PCR*). Ukazało się już kilka doniesień o zastosowaniu tej metody nie tylko do analizy patologicznych transkryptów, lecz również do ustalania nosicielstwa.

Metoda PCR jest obecnie szeroko stosowana do szybkiego wykrywania patogenów, szczególnie takich, których hodowla *in vitro* jest trudna lub długotrwała. Obecnie ponad 100 szczepów bakteryjnych można wykrywać i różnicować technikami biologii molekularnej. Do wykonania badania metodą PCR nie jest konieczny materiał świeżo pobrany, metoda jest bardziej czuła w porównaniu z innymi i ponadto do analizy można zastosować rozmazy i bloczki parafinowe. Można również wykonać znaczną część badań w standardowym laboratorium bez konieczności transportu materiału zakaźnego. Metoda PCR znalazła zastosowanie do wykrywania pasożytów przez bezpośrednią amplifikację DNA pasożyta. Materiałem wyjściowym może być DNA uzyskany z płynów ustrojowych człowieka, jak i pośrednich gospodarzy pasożyta, np. moskitów. Zarówno wirusy DNA, RNA i retrowirusy będące czynnikami etiologicznymi w białaczkach, limfomach, mięsakiach i karcinoma mogą być wykryte metodą PCR. W wielu przypadkach udało się podnieść czułość wykrywania wirusów prawie 100 razy w porównaniu z metodą Southerna lub hybridyzacją typu *dot blot*. Przy wykrywaniu retrowirusów często korzysta się z odwrotnej transkrypcji, a następnie wykonuje się dwie reakcje PCR. Ze względu na dużą liczbę cykli PCR występuje niebezpieczeństwo uzyskania artefaktów, głównie wyników fałszywie pozytywnych. Klasycznym przykładem zastosowania PCR w wirusologii jest wykrywanie patogenu przed wystąpieniem objawów klinicznych. Najdobitniej zaobserwować można to na przykładzie wirusa HIV, który może być wykryty na wiele lat przed wystąpieniem objawów AIDS [22, 37]. Również wykrywanie genów uczestniczących w onkogenezie jest jednym z głównych zastosowań metody PCR. W ostatnich latach dla kilkudziesięciu genów, dla których wykazano występowanie zmian w DNA komórek nowotorowych, opracowano testy diagnostyczne umożliwiające wykrycie mutacji. Występują jednak zasadnicze różnice w diagnostyce chorób nowotorowych w porównaniu z innymi działami diagnostyki molekularnej. Przede wszystkim różnica dotyczy postępowania z materiałem badawczym, w którym DNA komórek nowotorowych występuje w danym organizmie razem z prawidłowym DNA. Obecnie kilkaset chorób genetycznych można diagnozować stosując techniki molekularne. W pierwszych latach dominowały badania

hybrydizacyjne z zastosowaniem sond molekularnych, obecnie zostały one prawie całkowicie zastąpione przez PCR. Preimplantacyjna diagnostyka molekularna chorób genetycznych rozwinęła się wraz z szerokim stosowaniem zapłodnienia *in vitro*. Jest ona właściwie konsekwencją zapłodnienia *in vitro* i możliwości badania DNA pojedynczych komórek przez PCR. Badania preimplantacyjne są już wykonywane w Wielkiej Brytanii i w 1991 r. umożliwiły urodzenie kilkunastu zdrowych dzieci w rodzinach z wysokim ryzykiem wystąpienia ciężkich chorób genetycznych. Przykłady stosowania metody PCR w diagnostyce przedstawiono w artykule R. Słomskiego w niniejszym tomie.

5. RYNEK BADAŃ KWASÓW NUKLEINOWYCH W CHOROBYCH CZŁOWIEKA

Pomimo gwałtownego rozwoju w ostatnich latach rynek badań DNA stanowi nadal jedynie niewielką część rynku diagnostycznego. Można jednak przyjąć, że badania DNA stanowią 1–10% dochodów z badań diagnostycznych, które w 1996 roku przekroczyły na świecie 30 mld dolarów. Przewiduje się, że badania DNA w najbliższych latach przekroczą wartość 2 mld dolarów. Głównym zainteresowaniem w tych badaniach, które jak dotąd stanowi amplifikacja sekwencji DNA, są choroby przenoszone drogą płciową, diagnozowane dotychczas przy użyciu pracochłonnych hodowli. Zróznicowana diagnostyka rzeżączki i chlamydii jest stosunkowo trudna z zastosowaniem technik klasycznych, stanowi więc idealny obiekt do opracowań testów genetycznych. Bezpośrednie wykrywanie wirusów HIV i HCV przyczynia się również do rozwoju badań nad poszukiwaniem nowych leków i monitorowaniem terapii, której koszt jest obecnie bardzo wysoki. Innym przykładem zainteresowań firm farmaceutycznych jest badanie mykobakterii. Występuje tutaj istotna przewaga badań molekularnych nad badaniami obejmującymi hodowle, ponieważ w badaniach molekularnych uzyskuje się wynik w ciągu 1 dnia, podczas gdy badania klasyczne trwają nieraz kilka tygodni.

Wśród firm farmaceutycznych, które w swoich testach stosują amplifikację DNA, na czołowe miejsce wysuwają się Abbott Laboratories, które obejmują ponad 53% rynku diagnostycznego. Dla badań DNA firma Abbott opracowała dwie nowe reakcje zbliżone do PCR – reakcję łańcuchową ligazy (LCR) i reakcję łańcuchową naprawy (RCR – *repair chain reaction*). Uzyskano bardzo pozytywne wyniki badań z zastosowaniem LCR u kobiet z chlamydią w porównaniu z hodowlami materiału pobranego z wymazów cytologicznych. Podobne testy wykonane u mężczyzn w badaniach moczu wykazały jednak duży odsetek wyników fałszywie negatywnych, co spowodowało wzrost zainteresowań wstępnym etapem przygotowań próbek do badań w taki sposób, aby zostały usunięte inhibitory reakcji. Bardzo szybko doceniła

przydatność PCR w diagnostyce firma Hoffmann-La Roche. Ta firma dysponuje najważniejszą technologią badania DNA – reakcją łańcuchową polimerazy (PCR), którą odkupiła za 300 mln dolarów od firmy Cetus w 1992 roku. Abbott i Roche zawarły w 1994 roku porozumienie o wymianie swoich technologii. Tak więc Roche stosować może w badaniach diagnostycznych PCR, LCR, RCR, jak również testy hybrydowe PCR/LCR. Firma Roche położyła duży nacisk na przygotowanie testów diagnostycznych do określania HLA-DRB oraz wykrywania enterowirusów, wirusa HIV, cytomegalowirusa, *Mycobacterium avium* i *Mycobacterium intracelulare*, a także testu wykrywającego liczne mutacje genu *CFTR*, prowadzących do wystąpienia mukowiscydozy. W najbliższej przyszłości wdrażaniem objęte mają być badania oporności na rifampicynę w gruźlicy. Jeśli chodzi o osiągnięcia techniczne, firma przygotowała analizator Cobas Amplicor umożliwiający przeprowadzenie detekcji przekraczającej 50 próbek/godz. Można tutaj zauważyć, że mimo istotnego postępu metodycznego w diagnostyce molekularnej w dalszym ciągu dużym problemem jest wstępne przygotowanie materiału do badania diagnostycznego, które również dla omawianych wyżej przypadków nie jest jeszcze zautomatyzowane. Firma Johnson & Johnson jako jedyna nie zajęła się jeszcze chorobami zakaźnymi i jej główne zainteresowanie zwrócone jest na badania genetyczne. W ostatnich latach ukazały się nowe testy diagnostyczne w tym jeden na mukowiscydozę. Oparte one są na wariacie PCR, tzw. ASA-PCR, w którym startery do reakcji PCR charakteryzują się specyficznością dla DNA typu dzikiego lub zmutowanego. Do grupy firm wprowadzających badania DNA w swoich testach diagnostycznych należy również firma Chiron, sprzedająca swoje testy pod nazwą Quantiplex. Rozprowadza ona zestawy diagnostyczne do badań HBV-DNA, HCV-RNA, HIV-RNA, CMV i mRNA dla cytokin, co wskazuje na zwrócenie się w kierunku badań onkologicznych. W badaniach dotyczących RNA duży udział ma również firma Organon-Teknika. W próbnym badaniu jest już zestaw diagnostyczny do wykrywania RNA wirusa HIV. Dotychczasowe główne osiągnięcia firmy to dwa zestawy dostępne w USA i Europie do wykrywania HIV: test jakościowy HIV-1 RNA QL i test ilościowy HIV RNA QT. Firma Organon Teknika jest właścicielem technologii określonej jako NASBA, umożliwiającej amplifikację RNA, a której wykonanie nie jest uzależnione od specjalistycznego sprzętu. W najbliższym czasie ukazać się mają zestawy do wykrywania translokacji w CML, mutacji czynnika V, hepatitis, CMV, chłamydii i MTB. Japonia reprezentowana jest na rynku diagnostycznym DNA przez firmę Gene-Probe, która opracowała zestawy diagnostyczne do badań DNA *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoea*. Z kolei Boehringer Mannheim drugi, co do wielkości potentat diagnostyczny zakupił pod koniec 1994 r. duńską firmę PNA Diagnostics i w ten sposób dołączył do grupy dystrybutorów zestawów do badań DNA.

6. BADANIA MEDYCZNO-SĄDOWE

W 1985 roku Jeffreys doniósł o nowej metodzie identyfikacji indywidualnej opartej o zjawisko polimorfizmu DNA. Metoda Jeffreys'a znalazła natychmiastowe zastosowanie w praktyce i pod nazwą *DNA fingerprinting* jest obecnie szeroko stosowana w badaniach pokrewieństwa, którego ustalenie konieczne jest nie tylko w sprawach sądowych, lecz również niezbędne jest dla potrzeb medycznych w poradnictwie genetycznym, diagnostyce prenatalnej i transplantologii [13,14]. Badania *DNA fingerprinting* są wykonywane rutynowo w ponad 40 krajach (patrz artykuł Słomskiego w niniejszym tomie). Na potrzeby diagnostyczne analizuje się polimorficzne sekwencje minisatelitarne i mikrosatelitarne. Sekwencje minisatelitarne, w których długość powtórzenia sekwencji wynosi 7–100 pz, analizowane są głównie u człowieka, z zastosowaniem metody hybrydyzacji z sondą molekularną lub PCR. Z kolei sekwencje mikrosatelitarne, w których element powtarzający się obejmuje 1–6 pz, analizowane są wyłącznie metodą PCR, przy czym analizy wykonywane są dla drobnoustrojów, roślin, zwierząt i człowieka. Prawdopodobnie w genomie człowieka występuje kilka tysięcy mikrosatelitarnych loci. Szczególnym zainteresowaniem cieszy się grupa sekwencji mikrosatelitarnych obejmująca powtórzenia 3 lub 4 nukleotydów. Tego typu powtórzenia występują u wszystkich Eukaryota i również wykazują polimorfizm. Dodatkową zaletą tych powtórzeń jest to, że po amplifikacji metodą PCR nie trzeba ich rozdzielać na dużych żelach sekwencyjnych, jak to jest w przypadku powtórzeń (CA)_n. W diagnostyce molekularnej, a szczególnie w medycynie sądowej te sekwencje bardzo często poddaje się analizie, ponieważ charakteryzują się krótkimi, lecz polimorficznymi allelami, co jest bardzo ważne, gdy analizowany jest częściowo zdegradowany DNA [27]. Przykłady zastosowań analizy DNA na potrzeby medyczo-sądowe przedstawiono w niniejszym tomie w artykule R. Słomskiego i wsp.

7. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA W NOWOCZESNEJ HODOWLI ZWIERZĄT

Najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej i genetyki pozwalają uzyskać bardziej efektywny postęp hodowlany. Cechy ilościowe zwierząt, takie jak: wydajność i skład mleka, jakość mięsa, płodność, plenność, odporność lub podatność na infekcje, są efektem oddziaływania wielu genów. Pomimo wysoce rozwiniętych technologii obejmujących sztuczną inseminację, superowulację oraz przenoszenie zarodków (MOET – *multiple ovulation and embryo transfer*) i pozwalających na uzyskanie zwierząt o określonym, korzystnym dla hodowcy genotypie, szereg problemów w hodowli zwierząt pozostaje nierozwiązanych. Geny warunkujące cechy

ilościowe, ich mutacje lub sprzężone z nimi markery są przedmiotem intensywnych badań po wykazaniu, że sondy molekularne wykorzystywane do identyfikacji genów człowieka przydatne są również do identyfikacji genów zwierząt.

Dzięki wykorzystaniu techniki polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RLFP) i hybrydyzacji z sondą molekularną, którą stanowił fragment cDNA człowieka, zawierający część sekwencji genu DQB1 uzyskano w przypadku bydła wzór prążkowy fragmentów restrykcyjnych po trawieniu DNA przez Pvu II dla 12 alleli locus Bo LA-DQ. Wzór ten zawiera określone stałe i zmienne prążki charakterystyczne dla danego allelu, co pozwala na identyfikację genów dla antygenów II klasy głównego kompleksu zgodności tkankowej [1]. Zastosowanie enzymów identyfikujących inne allele spośród 12 w locus DQBβ daje możliwość prostej i szybkiej identyfikacji polimorfizmu HLA i większego zróżnicowania międzyosobniczego. Ma to ogromne znaczenie ze względu na korelację między określonymi antygenami a odpornością na określone jednostki chorobowe zwierząt [43]. Polimorfizm obejmuje również regiony niekodujące genomowego DNA i dotyczy sekwencji powtarzających się. Znaczenie tych sekwencji ciągle pozostaje nie wyjaśnione, wiadomo jednak, że mogą stanowić niezwykle ważne markery genetyczne w hodowli i selekcji zwierząt. W badaniach tego typu szczególne znaczenie przypisuje się mini- i mikrosatelitom. Do identyfikacji najczęściej wykorzystywane są sondy 33.5, 33.6, i 33.15, opracowane przez Jeffreysa i wsp. [13], stosowane z równym powodzeniem u człowieka, jak i u zwierząt. Drugą grupą sekwencji powtarzających się i rozproszonych w całym genomie są mikrosatelity, identyfikowane przez hybrydyzację z sondami (GATA)_n, (GACA)_n, (GT)_n, (CAC)_n. Po trawieniu genomowego DNA jednym z enzymów często tnących (HinfI, HaeIII, AluI) i hybrydyzacji z jedną z sond uzyskuje się charakterystyczny *fingerprint* dla danego osobnika. Dobór właściwego enzymu restrykcyjnego oraz sondy molekularnej umożliwia otrzymanie wzoru prążków o najbardziej przydatnym do analizy zróżnicowaniu międzyosobniczym [4].

W nowoczesnej hodowli zwierząt badania dotyczące polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych oraz sekwencji mini- i makrosatelitarnych wypierają coraz bardziej badania związane z grupami krwi i polimorfizmem białek krwi ze względu na możliwość identyfikacji niewspółmiernie licznej grupy alleli. Mikrosatelity zidentyfikowane u bydła, koni, świń i owiec są zarejestrowane w międzynarodowym banku genów (GenBank lub EMBL) [19]. W ostatnich latach zidentyfikowano liczne loci u bydła [17], u koni [10], u świń [35] i owiec [8]. Stanowią one pulę markerów przydatnych nie tylko w badaniach teoretycznych, takich jak: charakterystyka struktury populacji i stopnia inbredu, ocena dystansu genetycznego pomiędzy liniami, rasami i populacjami zwierząt, ale przede wszystkim w badaniach mających bezpośredni związek z praktyką hodowlaną. Jednym z problemów hodowlanych jest zjawisko frymartyzmu często powodujące niepłodność zwierząt pochodzących z cięż mnogich. Przyczyną jest wymiana komórek będących prekursorami szpiku

kostnego pomiędzy zarodkami różnopłciowych bliźniąt u bydła, koni, świń i owiec. W wyniku takiej wymiany powstają leukocyty o różnym kariotypie, przy czym część wykazuje obecność chromosomów XX, w części występuje XY. Określenie kariotypu identyfikuje frymartynizm tylko w przypadku bliźniąt różnej płci, zastosowanie hybrydyzacji z odpowiednią sondą pozwala wykryć chimeryzm także w przypadku bliźniąt tej samej płci. Plante i wsp. [29] wykazali, że stosując sondę pSRC-7 można zidentyfikować nie tylko chimeryzm leukocytarny u różnopłciowych bliźniąt, lecz również brak wymiany komórek krwi pomiędzy bliźniętami tej samej płci. W strukturze chromosomu Y obok typowych sekwencji DNA występują sekwencje powtórzone swoiste dla danego gatunku [16,7]. Sekwencje te zostały wyizolowane i sklonowane, a następnie użyte jako sondy molekularne w hybrydyzacji *in situ*, *dot blot* lub wg Southerna między innymi do określania płci zarodków. Identyfikacja sekwencji DNA zlokalizowanych na chromosomie Y pozwalająca określić płeć jest niezwykle istotna w przypadku wyboru zarodków do transferu [7].

Poważny problem w hodowli stanowią również infekcje wirusowe u zwierząt, zwykle diagnozowane na podstawie obecności w surowicy przeciwciał dla białek wirusowych. Metody dotąd stosowane pozwalają na ich wykrycie w okresie 1–3 tygodni po infekcji, testy wykorzystujące metodę PCR znacznie przyspieszają wykrycie zakażenia, są przy tym dziesięciokrotnie bardziej czułe niż metody tradycyjne i stwarzają możliwość wykrycia wirusa nawet przy bardzo małej ilości [25].

Nowoczesna hodowla dąży do uzyskania jak najkorzystniejszych efektów selekcyjnych, czego przykładem mogą być badania loci mikrosatelitarnych w przypadku kurcząt, które doprowadziły do uzyskania markerów genetycznych mających posłużyć w selekcji pożądanego genomu w danej populacji [36]. Rozpoznane mutacje niektórych genów pozwalają odpowiednio ułożyć program kojarzeń, a metody diagnozowania infekcji wirusowych stwarzają szansę podjęcia skutecznego przeciwdziałania.

8. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA W BADANIACH ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ ROŚLIN

W poznaniu struktury i organizacji genomów roślinnych jednym z ważniejszych osiągnięć jest odkrycie i wykorzystanie molekularnych systemów markerowych. Są one przydatne w rozwiązaniu wielu problemów pojawiających się w badaniach opartych na klasycznych testach fenotypowych. Efektywność analizy genetycznej w tym przypadku jest funkcją dziedziczności cechy, czynniki, takie jak: wpływ środowiska, dziedziczenie wielogenowe i ilościowe lub częściowa czy też całkowita dominacja mogą zakłócać ekspresję badanego genu. Ponadto liczba markerów fe-

notypowych oznaczanych w pojedynczej krzyżówce jest ograniczona, więc wykrywane sprzężenia dotyczą tylko małej frakcji genomu. Zastosowanie markerów molekularnych zasadniczo eliminuje te trudności przez bezpośrednie wykrywanie dziedziczenia różnic w strukturze alleli na poziomie sekwencji DNA [9]. Markery genetyczne powstają w toku badań opartych zasadniczo na dwóch najważniejszych systemach. Pierwszą grupę oznaczeń stanowią analizy bazujące na polimorfizmie długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Jest to najczęściej stosowana technika w konstruowaniu map genetycznych oraz mapowaniu ważniejszych cech agronomicznych u roślin o znaczeniu gospodarczym. Polimorfizm DNA wykazywany jest przez trawienie DNA restryktazą i wizualizację fragmentów po hybrydyzacji metodą Southerna. Uzyskane tą drogą markery są bardzo atrakcyjne do dalszych analiz, wykazują kodominację, co jest szczególnie ważne w różnicowaniu homozygot od heterozygot i daje możliwość detekcji alleli polimorficznych. Ponadto markery RFLP wykorzystuje się do detekcji polimorfizmów specyficznych dla danego locus w toku badań odrębnych gatunków, dzięki czemu opisano zależności występujące u traw i u roślin strączkowych wskazujące na analogię budowy genomów charakterystyczną dla tych gatunków [9, 32]. Technika ta ponadto ma dodatkową zaletę, mimo stosunkowo dużej ilości DNA (5–10 µg) potrzebnego do analizy, ten sam filtr może być hybrydyzowany wielokrotnie przez długi okres, co ułatwia badanie i obniża koszty. Co więcej DNA wielu osobników może być hybrydyzowany równocześnie, co pozwala na tworzenie map RLFP o wysokiej gęstości [9, 32].

Drugą grupę oznaczeń stanowią metody oparte na amplifikacji DNA, takie jak: RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA*), AP-PCR (ang. *arbitrarily primed PCR*), SSR (ang. *simple sequence repeat*), DAF (ang. *DNA amplification fingerprinting*), CAPS (ang. *cleaved amplified polymorphic sequence*) [9]. Badania wykorzystujące wszystkie wymienione techniki umożliwiły zebranie wielu informacji dotyczących struktury i organizacji genomów wielu roślin uprawnych, co jest szczególnie istotne w przypadku dużego udziału niektórych roślin w światowej produkcji żywności.

Rośliny charakteryzują się wielką różnorodnością sposobów reprodukcji. Większość rozmnaża się głównie przez produkcję nasion, lecz znaczna liczba gatunków jest zdolna również do reprodukcji w sposób wegetatywny, co bardzo komplikuje badania struktury populacji roślinnych. Genetyczna zmienność w nasionach uwarunkowana jest głównie systemem rozmnażania, który może być bardzo różny nawet w przypadku blisko spokrewnionych gatunków. Ponadto wśród nasion często obserwuje się występowanie kombinacji powstałych w drodze zapylenia krzyżowego i samozapylenia odpowiednio do mechanizmów, które promują jeden z nich, jednocześnie nie wykluczając drugiego. Mechanizmy zapylenia mają niebagatelny wpływ na poziom rekombinacji genetycznej szczególnie w przypadku gatunków, które preferują samozapylenie. W kolejnych generacjach powstających tą drogą maleje znacznie zmienność genetyczna bądź powstają rośliny genetycznie identyczne

[24]. Co więcej nasiona mogą powstawać również w drodze aseksualnej reprodukcji – apomiksji [11]. Rośliny potomne, jednak nie tracą zdolności do normalnego rozrodu drogą zapłodnienia. W ten sposób w danej populacji nasion równolegle mogą występować zarówno nasiona powstałe w wyniku rekombinacji, jak i te powielające genotyp matczynej [24]. Rozmnażanie wegetatywne jest szeroko rozpowszechnione w świecie roślin i obejmuje bardzo różne sposoby: od tworzenia cebulek czy rodzajów bulw na naziemnych częściach rośliny, podziału masy korzeniowej starszej rośliny przez wyrastanie na jej bazie odrostów korzeniowych w postaci nowych pędów do tworzenia tzw. rozłogów, czyli nowych roślinek genotypowo identycznych, wyrastających na naziemnej części rośliny matczynej. Jeśli jeszcze weźmie się pod uwagę wymiar czasowy problemu, to uzyskany obraz zaciemni się jeszcze bardziej.

Dokładne oszacowanie występowania i dystrybucji zróżnicowania genetycznego jest niezwykle ważne dla wielu dziedzin nauki, takich jak: taksonomia roślin, ekologia czy genetyka populacyjna. W przypadku gatunków, które utraciły zdolność rozmnażania wegetatywnego, każda roślina potomna jest wynikiem rekombinacji, co znacznie ułatwia badania. Rozmnażanie wegetatywne natomiast nastęrcza badającym wiele trudności związanych z rozróżnieniem pochodzenia poszczególnych roślin potomnych, podobnie jak zazwyczaj niemożliwe jest rozróżnienie między nasionami i sadzonkami pochodzenia apomiktycznego a tymi powstałymi drogą płciową [24]. Wystąpiła więc wyraźna potrzeba znalezienia metod, które pozwolą zidentyfikować poszczególne genotypy z dużą dozą pewności. Badania hybrydyzacyjne z zastosowaniem sond specyficznych dla sekwencji minisatelitarnych i prostych sekwencji powtórzonych okazały się bardzo czułą metodą detekcji zmienności genetycznej także w świecie roślin, czego przykładem mogą być badania Nyboma i Krafta [23] dotyczące populacji gatunków jeżyn rozprzestrzenionych w różnych częściach Europy. Autorzy wykazali, że mimo ogromnych podobieństw populacji szwedzkiej, duńskiej czy niemieckiej, na podstawie badań hybrydyzacyjnych można oszacować poziom zmienności genetycznej w poszczególnych populacjach, a co więcej odróżnić apomiktyczne nasiona od powstałych w trakcie procesu rekombinacji [23].

Grzyby i drożdże często są poważnymi patogenami roślin i człowieka, stają się również coraz ważniejsze dla różnych celów przemysłowych. Identyfikacja, rozróżnianie i klasyfikacja gatunków lub ras niższych Eucaryota, oparta wyłącznie na cechach morfologicznych czy charakterystyce hodowlanej jest bardzo trudna. Obecnie, w tym celu stosuje się techniki biochemiczne, takie jak RLFP i hybrydyzacja, chociaż nie są jeszcze rutynowo używane do celów diagnostycznych i epidemiologicznych. Od kiedy jednak infekcje grzybicze stały się poważnym problemem w hodowli roślin i zwierząt dotykając również ludzi, w szczególności chorych na AIDS lub z przeszczepami narządów, poszukiwanie prostych i szybkich metod identyfikacji uległo znacznemu przyspieszeniu. Spośród wielu stosowanych metod dwie okazały się mieć wielki potencjał badawczy w tym względzie: DNA

fingerprinting opisany przez Jeffreysa i RAPD, obie doskonale nadające się do celów identyfikacyjnych. Metoda RAPD ma jednak pewną przewagę, jest przede wszystkim szybsza i może objąć analizą większą liczbę osobników. Połączono więc obie metody przez użycie sond, stosowanych w klasycznym *fingerprinting*, jako starterów w amplifikacji zmiennych sekwencji DNA grzybów. Kombinacja ta określona jako *PCR-fingerprinting* stała się szybką, czułą i wiarygodną metodą, która może być stosowana w eksperymentach na większą skalę [18]. Dzięki zastosowaniu *DNA fingerprinting* udało się np. wykazać genetyczne różnice pomiędzy agresywnymi i nieagresywnymi izolatami *Leptosphaeria maculans*, dzięki czemu metoda stała się narzędziem w diagnostyce ważnych patogenów roślinnych. Podobnie, zastosowanie *PCR-fingerprinting* z użyciem sond: (CA)₈, (CT)₈, (GTG)₅ i (GACA)₄ jako starterów pozwoliło na rozróżnienie między ludzkimi patogenami. *Cryptococcus neoformans* jest przedstawicielem drożdży i bardzo ważnym ludzkim patogenem. Infekcje grzybicze związane z AIDS istotnie zwiększają ryzyko zagrożenia życia, średnio 5–15% chorych na AIDS łatwo zapada na zapalenie opon mózgowych powodowane przez *Cryptococcus*. Stosując odpowiednie startery zidentyfikowano wszystkie 42 badane rasy *C. neoformans*, ponadto rozróżniono dwie odmiany przypisane do różnych serotypów [18]. Zastosowane techniki są wysoce powtarzalne i przydatne do identyfikacji oraz rozróżniania gatunków, ras pato- i serotypów grzybów, jednocześnie są dowodem dużej różnorodności sekwencji powtórzonych w DNA grzybów. Wiele wnoszą również w rozszerzenie wiedzy na temat biologii grzybów, ich powiązań taksonomicznych, a co najważniejsze otwierają drogę badaniom dotyczącym typowania innych biotechnologicznie ważnych mikroorganizmów.

Badania sekwencji mikrosatelitarnych u roślin mają coraz istotniejsze znaczenie w analizach genomów [30]. Duża częstość, z jaką sekwencje te występują w DNA, oraz ich wysoki polimorfizm czynią je niezwykle przydatnymi markerami genetycznymi znajdującymi zastosowanie do mapowania, genetycznej analizy sprzężeń, określania czystości nasion i jakości hybrydów. Bazy sekwencyjne są wyraźnie uboższe w sekwencje roślinne w porównaniu do zwierzęcych. Niemniej, na ich podstawie można wykazać zdecydowane różnice ilościowe i jakościowe pomiędzy mikrosatelitami roślin i zwierząt. W porównaniu z genomami ssaków u roślin jest znacznie mniej powtórzeń, zwłaszcza dwunukleotydomowych, ponadto obserwuje się różnice jakościowe. W genomie roślinnym przeważają powtórzenia o motywie AT/TA, podczas gdy zwierzęce powtórzenia zawierają motyw CA/GT [31]. Nadal jednak informacje o rzeczywistej organizacji genowej i fizycznej lokalizacji mikrosatelitów w genomach roślinnych są znacznie uboższe w porównaniu do świata zwierzęcego. Wydaje się jednak, że każdy motyw mikrosatelitów ma charakterystyczny i unikalny wzór uzyskany zarówno w hybrydyzacji Southerna, jak i *in situ*, co może wskazywać na ich niezależną amplifikację i rozmieszczenie. Przykładowo dwunukleotydomowe powtórzenia typu (CA)_n zlokalizowano w regionach

centromerowych u buraka i w genomie pomidora. Powtórzenia o motywie (AT)_n znaleziono w genach kodujących rRNA. Próby lokalizacji sekwencji STR dały natomiast bardzo ciekawe informacje: bloki mono-, dwu- i czteronukleotydujących powtórzeń położone są niemal wyłącznie w obszarach nie kodujących w przeciwieństwie do trójnukleotydujących, których znaczna część leży w regionach kodujących. Generalnie obserwuje się niską częstość sekwencji STR organellowych w porównaniu z jądrowymi, przy czym STR chloroplastowe dominują nad mitochondrialnymi. Ponadto znaczna część tego typu sekwencji jest zlokalizowana w metylowanych regionach genomu, o niskim poziomie transkrypcji [39]. *DNA fingerprinting* w badaniach populacji roślinnych nie jest jeszcze w pełni wykorzystaną metodą, lecz wiele obiecujących prac bazujących na niej jest już realizowanych. Wielopunktowa analiza DNA (MLS) staje się wygodną i bardzo czułą metodą w identyfikowaniu różnic genetycznych na poziomie osobniczym, klonów i linii wsobnych. W przypadku bardziej oddalonych genetycznie osobników nadal wykorzystuje się tańsze, szybsze i mniej czułe metody, takie jak oparta na izoenzymach, a ostatnio również metodę RAPD. Jakkolwiek w niektórych grupach roślin wykazujących niższą rekombinację w związku z występowaniem apomiksji i wegetatywnego rozmnażania, badania typu MLS mogą wiele wnieść w badania taksonomiczne także na poziomie gatunku. Potencjalnie profile uzyskiwane po zastosowaniu sond typu SLS mogą wkrótce stać się wyjątkowo użytecznym, dodatkowym narzędziem w badaniach przepływu genów [24].

9. PERSPEKTYWY DALSZEGO ROZWOJU DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ

W najbliższej przyszłości oczekiwać można dalszego postępu w badaniach DNA i coraz szerszego stosowania diagnostyki molekularnej. Zapotrzebowanie na nowe testy diagnostyczne jest ogromne i w krajach zachodnich, w celu diagnozowania wielu chorób genetycznych, nowotworowych i wykrywania patogenów wykonywane są one już rutynowo, przy czym dotyczą one właściwie całego świata ożywionego. Szczególnie w przypadkach zakażeń, metody amplifikacji sekwencji umożliwiają wykrycie patogenu w czasie zdecydowanie krótszym niż hodowle. W obawie przed ewentualnymi konsekwencjami wynikającymi z opóźnienia terapii przez oczekiwanie na wynik hodowli (nieraz 3 tygodnie) placówki medyczne wdrażają testy molekularne. Zgodność wyników takich testów uzyskanych metodami amplifikacji DNA z wynikami hodowli, dla których przyjmuje się 100%, jest bardzo wysoka i sięga powyżej 99%.

W etapie wstępnym przygotowania materiału do badań występuje na pewno opóźnienie metodyczne i sprzętowe w stosunku do samej strategii badań DNA,

która w reakcji sekwencjonowania umożliwia wykrycie zmian pojedynczych nukleotydów (patrz artykuł P. Nuca i wsp. w niniejszym tomie). Etap przygotowania DNA do badań jest jednak najważniejszy, gdyż rzutuje na wykonywane analizy. Dla przykładu obecność inhibitorów enzymów w preparatach DNA uniemożliwia badanie DNA lub powoduje powstanie artefaktów. Jest to szczególnie niebezpieczne przy stosowaniu badań opartych wyłącznie o enzymatyczną amplifikację DNA *in vitro*.

Matrycami wyjściowymi w badaniach diagnostycznych może być zarówno RNA, jak i DNA. Diagnostyka molekularna przebiega najczęściej przez amplifikację DNA metodą PCR. PCR jest również metodą wyjściową dla większości innych analiz molekularnych, które mogą prowadzić do wykrycia obecności defektu molekularnego lub/i podania dokładnej jego charakterystyki. Badania hybrydyzacyjne nie tracą jednak na aktualności, jednakże stosowane są coraz częściej w połączeniu z metodą PCR. Sama metoda PCR ma jedynie dwa poziomy specyficzności wyznaczane przez zastosowanie specyficznych starterów reakcji i ocenę produktu PCR. Dodanie jeszcze jednego poziomu specyficzności przez zastosowanie sondy molekularnej, która hybrydując z produktem PCR ma potwierdzić (lub wykluczyć) prawidłową sekwencję DNA, staje się jednym z głównych elementów zestawów diagnostycznych. Ostatnio doniesiono o jeszcze jednej możliwości podniesienia specyficzności diagnostyki molekularnej poprzez włączenie jeszcze jednego etapu hybrydyzacji na wstępie analizy i utworzenie tripleksu zabezpieczającego DNA w miejscu występowania mutacji lub zabezpieczającego DNA patogenu (TPA, ang. *target protection assay*). W ten sposób osiągnięto cztery poziomy specyficzności badania.

Osiągnięcia współczesnej genetyki molekularnej doprowadziły również do intensywnego rozwoju prac nad mapowaniem genomów zwierząt. Dzięki odkryciu sekwencji mini- i mikrosatelitarnych, stanowiących bogate źródło markerów genetycznych udoskonalono metody hybrydyzacji *in situ* z sondami znakowanymi zarówno radioaktywnie, jak i nieradioaktywnie i uruchomiono międzynarodowe programy mapowania genomów świń, bydła i innych zwierząt domowych. W niektórych jak dotyczących genomu konia czy psa uczestniczą również polskie laboratoria (patrz artykuł M. Świtońskiego w niniejszym tomie).

Poszukiwane mutacje w DNA lub wykrycie patogenu we wczesnych stadiach infekcji przypomina poszukiwanie przysłowiowej igły w stogu siana. Zadaniem diagnostyki molekularnej na nadchodzące lata jest przygotowanie takich metod diagnostycznych, które umożliwią łatwe odszukanie takich igieł przez, być może spalenie stogu, bo wtedy ich zebranie nie nastarczy problemu.

LITERATURA

- [1] ANDERSSON L, BOHME J, RASK L, PETERSON PA. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 1. Extensive polymorphism of DQ α and DQ β genes. *Anim Genet* 1986; **17**: 95–112.
- [2] ARNHEIM N, ERLICH H. Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem* 1992; **61**: 131–156.
- [3] BEGGS AH, KOENIG M, BOYCE FM, KUNKEL LM. Detection of 98 % of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; **86**: 45–48.
- [4] BUITKAMP J, AMMER H, GELDERMANN H. DNA fingerprinting in domestic animals. *Electrophoresis* 1991; **12**: 169–174.
- [5] CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, NGUYEN PN, CASKEY CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 11141–11156.
- [6] CHELLY J, CONCORDET JP, KAPLAN JC, KAHN A. Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2617–2621.
- [7] COTINOT C, KIRSZENBAUM M., LEONARD M., GIANQUINTO L, VAIMAN M. Isolation of bovine Y-derived sequence: potential use in embryo sexing. *Genomics* 1991; **10**: 646–653.
- [8] CRAWFORD AM, DODDS KG, EDE AJ, PIERSON CA, MONTGOMERY GW, GARMONSWAY HG, BEATTIE AE, DAVIES H, MADDOX JF, KAPPES SW, STONE RT, NGUEN TC, PENTY JM, LORDE EA, BROOM JE, BUITKAMP J, SCHWAIGER W, EPPLIN JT, MATTHEW P., MATTHEWS ME, HULME DJ, BEH KJ, McGRAW RA, BEATTIE CW. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 1995; **140**: 703–724.
- [9] DENIZIAK M. BARCISZEWSKI J. Diagnostyka molekularna roślin. *Post Biol Kom* 1995; **22** (6): 1–12.
- [10] GRAVES KT, RANEY N, EUNIS R, COOGLE L, REID R, BAILEY E, Van de GOOR L, COTHRAN EG, GUERIN G, SKOW L, BREEN M., BELL K. Equine gene mapping: syntenic mapping DNA markers. *Anim Genet* 1996; **27**, Suppl. 2: 73.
- [11] GRIMANELLI D, LEBLANC O, ESPINOSA E, PEROTTI E, GONZALES de LEON D, SAVIDAN Y. Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-Tripsacum hybrids caused by a transmission ratio distortion. *Heredity* 1998; **80**: 40–47.
- [12] HRUBAN R, Van der RIET H, EROZAN YS, SIDRANSKY D. Molecular biology and the early detection of carcinoma of the bladder – the case of Hubert H. Humphrey. *N Engl J Med* 1994; **330**: 1276–1278.
- [13] JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SW. Hypervariable minisatellite region in human DNA. *Nature* 1985; **314**: 67–73.
- [14] JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SW. Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* 1985; **316**: 76–79.
- [15] KAN YW, DOZY AM. Antenatal diagnosis of sickle cell anemia by DNA analysis of amniotic fluid cells. *Lancet* 1978; **2**: 910–912.
- [16] LAMAR EE, PALMER E. Y encoded species-specific DNA in mice: Evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* 1984; **37**: 171–177.
- [17] MA RZ, BEEVER JE, DA Y, GREEN CA, RUSS I, PARK C, HEYEN DW, EVERTS RE, FISHER SR, OVERTON KM, TEALE AJ, KEMP SJ, HINES HC, GUERIN G, LEVIN HA. A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *J. Heredity* 1996; **87**: 261–271.
- [18] MEYER W, LIECKFELDT K, KUHLS E, FREEDMAN Z, BORNER T, MITCHELL TG. DNA- and PCR-fingerprinting in fungi. *DNA Fingerprinting: State of the Science* (ed. by Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T. & Jeffreys A.J.) 1993; pp. 311–320.

- [19] MOORE SS, BARENDSE W, BERGER KT, ARMITAGE SM, HETZEL DJS. Bovine and ovine DNA microsatellites from EMBL and GENE BANK databases. *Anim Genet* 1992; **23**: 463–467.
- [20] MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**: 335–350.
- [21] MULLIS KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am April* 1990; 56–65.
- [22] MURAKAWA GJ, ZAIA JA, SPALLONE PA et al. Direct detection of HIV-1 RNA from AIDS and ARC patient samples. *DNA* 1988; **7**: 287.
- [23] NYBOM H, KRAFT T. Application of DNA fingerprinting to the taxonomy of European blackberry species. *Electrophoresis* 1995; **16** (9): 1731–1735.
- [24] NYBOM H. Applications of DNA fingerprinting in plant population studies *DNA Fingerprinting: State of the Science* (ed, by Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T. & Jeffreys A.J.) 1993; pp. 293–309.
- [25] ORAVEERAKUL K, CHOI CS, MOLITOR TW. Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization. *J Vet Diagn Invest* 1990; **2**: 85–91.
- [26] ORKIN SH, ALTER BP, ALTAY C. Direct detection of common mutations with synthetic DNA probes. *N Engl J Med* 1978; **299**: 166–172.
- [27] PENA SDJ, CHAKRABORTY R, EPPLEN JT, JEFFREYS AJ. DNA Fingerprinting, State of the Science, Birkhauser Verlag, Basel 1993
- [28] PENA SDJ, CHAKRABORTY R. Paternity testing in the DNA era. *Science* 1994; **19**: 204–209.
- [29] PLANTE Y, SCHMUTE S, LANG KDM, MOKER JS. Detection of leucocimaerism in bovine twins by DNA fingerprinting. *Anim Genet* 1992; **23**: 295–302.
- [30] POWELL W, MACHRAY GC, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1996; **1**: 215–222.
- [31] POWELL W, MORGANTE M., MCDEVITT R, VENDRAMIN GG, RAFALSKI JA. Polymorphism simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; **92**: 7759–7763.
- [32] RAFALSKI AJ, TINGEY SV. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* 1993; **9**: 275–280.
- [33] REICHERT M, GRUNDBOECK J. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych- zastosowanie w inżynierii genetycznej i diagnostyce. *Medycyna Wet* 1993; **49** (6): 256–260.
- [34] ROBERTS RG, COLE CG, HART KA, BOBROW M, BENTLEY DR. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 811.
- [35] ROHRER GA, ALEXANDER LJ, HU Z, SMITH TPL, KEELE J.W., BEATTLE CW. A comprehensive map of porcine genome. *Genome Res* 1996; **6**: 371–391.
- [36] ROSOCHACKI SJ, HILLEL J, JASZCZAK K, ZAWADZKA M. DNA fingerprints generated by R.18.1 DNA probe in two stocks of chicken: Green Legged Patridgenous (GLP) and Rhode Island Red (RIR). *J Appl Genet* 1997; **38**: 173–178.
- [37] RUDIN C, SENN HP, BERGER R et al. Repeated polymerase chain reaction complementary to other conventional methods for early detection of HIV infection in infants born to HIV-infected mothers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; **10**: 146–156.
- [38] SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350–1354.
- [39] SAKOWICZ T. Sekwencje mikrosatelitarne w genomach roślin. *Post Biol Kom* 1997; **24** (9): 81–92.
- [40] SŁOMSKI R, CHLEBOWSKA H, REISS J. Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w diagnostyce klinicznej. *Post Biochem* 1992; **36**: 75–88.

- [41] SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J. Diagnostyka molekularna chorób genetycznych. *Post Biol Kom* 1995; **22** (6): 27–40.
- [42] SOUTHERN EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; **98**: 503–517.
- [43] TEALE AJ, KEMP SJ, MORRISON WI. The major histocompatibility complex and disease resistance in cattle. W: *Breeding for Disease resistance in Farm Animals* J.J.B. Owen RFE Axford C.A.B. International Walingford United Kingdom. 1991; 86–99.
- [44] WILLIAMS C, WILLIAMSON R, COUTELLE C, LOEFFLER F, SMITH J, IVINSON A. Same-day, first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification. *Lancet* 1988; ii, 102–103.
- [45] WINIARCZYK S. Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce weterynaryjnej. *Medycyna Wet* 1993; **49** (6): 260–264.

STRUKTURA I FUNKCJA BIAŁEK ZLOKALIZOWANYCH W CENTRUM KATALITYCZNYM RYBOSOMU

STRUCTURE AND FUNCTION OF PROTEINS LOCALIZED IN RIBOSOMAL CATALYTIC CENTRE

Katarzyna MIKOŁAJCZYK¹, Jan BARCISZEWSKI²

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, ²Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
Poznań

Streszczenie: Przedstawiono aktualny stan badań mających na celu poznanie struktury i funkcji białek rybosomalnych, tworzących jedno z centrów katalitycznych rybosomu. Ukazano oddziaływania białek i rybosomalnych kwasów rybonukleinowych, z uwzględnieniem ich roli w katalitycznych funkcjach rybosomu podczas elongacji łańcucha polipeptydowego. W pracy dyskutowane są inne funkcje białek rybosomalnych w odniesieniu do tzw. hipotezy świata RNA. Pokazano zjawisko mimikry makromolekularnej występującej w procesie translacji.

Słowa kluczowe: rybosom, domena GTP-azy, elongacja, białka rybosomalne: L10, L11, L12, P0, P1, P2.

Summary: Current knowledge concerning the structure and function of ribosomal proteins localized in a ribosomal catalytic centre is presented. Interactions between proteins and ribosomal nucleic acids are shown, with respect to their role in catalytic activity of ribosome during polypeptide chain elongation. Other possible functions of ribosomal proteins, referring to the „RNA World” hypothesis, are discussed. Finally idea of macromolecular mimicry in the translation process is discussed.

Key words: ribosome, GTP-ase domain, elongation, ribosomal proteins: L10, L11, L12, P0, P1, P2.

1. WSTĘP

Rybosomy są to kompleksy nukleinowo-proteinowe, o sferycznej strukturze, przekroju ok. 2500 nm i masie od $2,8 \cdot 10^6$ daltonów (D) u eubakterii, do $3 \cdot 10^6$ D u roślin i ssaków [44]. W ich skład wchodzi rybosomalne kwasy rybonukleinowe (rRNA) – stanowiąc ok. 80% RNA komórkowego oraz białka, w ilości ok. 10%

TABELA 1. Wielkość i skład rybosomów różnych organizmów [46]

Organizm	Organelum	Masa rybosomu	Ilość białek	Rybosomalny RNA
Bakterie	–	70S	50+ 60	5S, 16S, 23S
Rośliny	chloroplasty	70S	5 0+ 60	5S, 16S, 23S, (4.5S)
	mitochondria	75S	nieznana	5S, 18S, 26S
Pierwotniaki i grzyby	mitochondria	75S	65+75	15S 17S, 21S 24S
Ssaki	mitochondria	55S	80 ÷ 90	12S, 16S
Organizmy eukariotyczne (cytoplazma)	–	80S	75+ 90	5S, 5.8S, 17S-18S, 25S+28S

wszystkich białek komórkowych (tab. 1). Rybosomy zaliczane były pierwotnie do organeli komórkowych, ale brak podwójnej błony białkowo-lipidowej oraz matriksy wyklucza taką definicję. Pełnią one rolę katalityczną i w związku z tym nazywane są polimerazami polipeptydowymi. Katalizują one reakcję tworzenia łańcucha polipeptydowego na matrycy RNA [16]. Reakcje zachodzące przy udziale rybosomu można zapisać schematycznie:



gdzie: aa-tRNA oznacza aminoacylo-tRNA, GTP – guanozynotrójfosforan, GDP – guanozynodwufosforan, Pi – fosforan nieorganiczny.

Od ponad czterdziestu lat prowadzone są badania biosyntezy białka, które między innymi obejmują oprócz badań struktury i funkcji rybosomów, również zagadnienia ewolucyjne. Jeden z aspektów tych ostatnich wiąże się z hipotezą tzw. pierwotnego świata RNA, w którym większość funkcji strukturalnych i katalitycznych pełniły cząsteczki RNA, będące jednocześnie nośnikami informacji. Jako samoreplikujące jednostki mogłyby stanowić punkt wyjścia dla ewolucji, prowadzącej do rozwoju wszystkich współcześnie żyjących organizmów [16].

Odkrycie właściwości katalitycznych RNA [3] stanowiło ważną przesłankę dla hipotezy, że pierwotne rybosomy mogły składać się wyłącznie z rRNA. Jednakże, w toku ewolucji, niektóre funkcje kwasów rybonukleinowych mogły zostać przejęte przez białka, ulegające przyłączeniu do RNA, podczas gdy inne funkcje pozostały swoiste dla rRNA i są przez białka modulowane [4]. Istnieją przynajmniej dwie możliwości powstawania białek rybosomalnych. Po pierwsze, mogły być one przeznaczone wyłącznie do budowy rybosomów. Po drugie, białka zaangażowane w różne procesy komórkowe i mające elementy strukturalne, umożliwiające wiązanie

do kwasów nukleinowych przyłączyły się do RNA. Pojawiające się informacje o zaangażowaniu białek rybosomalnych w procesy inne niż biosynteza białka, jak np. udział w replikacji – białka S1, L14, transkrypcji – S10, S20, dojrzewaniu RNA – S12, naprawie DNA – S9, S3, P0, jak również występowanie charakterystycznych elementów strukturalnych, np. helisa-skręt-helisa, tzw. palce cynkowe, struktury typu β , analogiczne do tzw. zamków leucynowych wskazują, że przynajmniej niektóre z białek rybosomalnych miały również inne funkcje [47].

Jaka jest zatem rola białek rybosomalnych, które w procesie ewolucji uległy asocjacji do rRNA? Większość z nich pełni funkcje strukturalne, umożliwiając odpowiednią konformację rybosomalnych RNA [23]. Inne, zlokalizowane w pobliżu centrum GTP-azy i peptydylotransferazy, odgrywają istotną rolę w syntezie białek, przy czym ich dokładne właściwości w tych procesach nie zostały jeszcze jednoznacznie zdefiniowane [12].

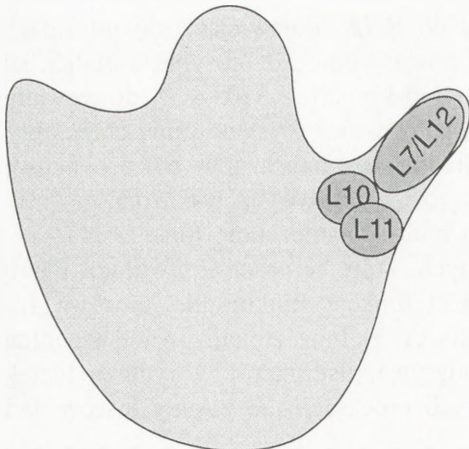
W komórkach organizmów żywych występują różne rodzaje rybosomów: cytoplazmatyczne i organellowe u eukariontów oraz rybosomy bakteryjne. Różnią się one między sobą nie tylko wielkością, ale również ilością rRNA i białek (tab. 1).

Dotychczas określono sekwencję rRNA oraz wszystkich białek rybosomalnych *E. coli* [18]. W skład małej podjednostki wchodzi 16S rRNA oraz 21 białek; duża natomiast obejmuje 23S rRNA, 5S rRNA oraz 31 białek. Wszystkie białka, z wyjątkiem L12, występują w rybosomie w ilościach stechiometrycznych. Eukariotyczne odpowiedniki prokariotycznych białek L10, L7 i L12 określane są jako P0, P1 i P2; wynika to z faktu, iż w odróżnieniu od innych białek rybosomalnych występują one w formie ufosforylowanej. Nomenklatura ta została zaproponowana w 1991 roku [49] dla białek rybosomów drożdży oraz ssaków i obecnie została zaakceptowana dla wszystkich analogicznych białek rybosomów eukariotycznych [35].

2. DOMENA GTP-azy

Do cech zachowawczych rybosomów należy tzw. wypustka (ang. *stalk*) zlokalizowana w pobliżu centralnej platformy dużej podjednostki (rys. 1). Miejsce to jest istotne dla wiązania czynników elongacyjnych EF-Tu i EF-G zachodzącego z udziałem energii, pochodzącej z hydrolizy GTP [13]. W rybosomach prokariotycznych wypustkę tworzą: kompleks czterech białek L12 i białka L10 oraz białko L11, przyłączone do regionu 23S rRNA w rejonie nukleotydów 1030 i 1120 [33].

Wykazano, że analogicznie do rybosomów eubakteryjnych, w rybosomach archebakteryjnych oraz eukariotycznych występuje również wypustka składająca się z białek P0 i (P1/P2) oraz L11 [5], przy czym białka P0, P1 oraz P2 są ufosforylowane, w odróżnieniu od analogicznych białek prokariotycznych [48].

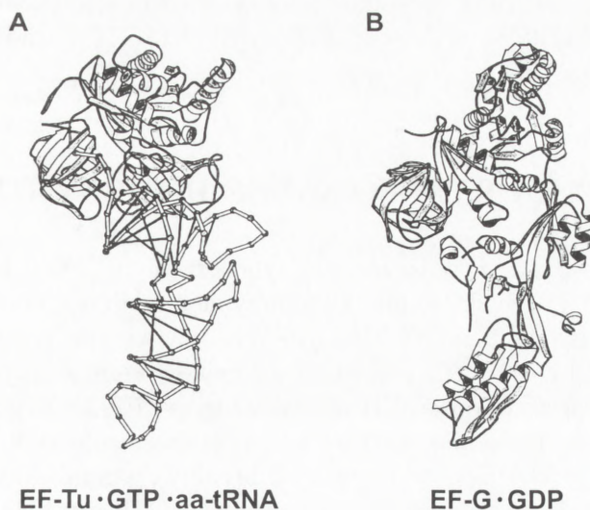


RYSUNEK 1. Schematyczna lokalizacja białek L10, L11, L12 w dużej podjednostce rybosomów *E. coli*

Podczas procesu translacji następuje przeniesienie polipeptydu przyłączonego do tRNA w miejscu P do aminoacylo-tRNA znajdującego się w miejscu A oraz synteza wiązania peptydowego. Ta aktywność rybosomu określana jest mianem peptydylotransferazy (ang. *peptidyl transferase*) [9], przy czym niezbędna jest obecność zarówno rRNA, jak i białek rybosomalnych, a także czynnika elongacyjnego EF-Tu u bakterii lub EF-1 u pozostałych organizmów [20]. Kompleks EF-Tu • GTP przyłącza aminoacylo-tRNA, tworząc kompleks potrójny (ang. *ternary complex*): aminoacylo-tRNA • EF-Tu • GTP, który przyłącza do miejsca A rybosomu aminoacylo-tRNA wyłącznie wtedy, gdy w miejscu P znajduje się peptydylo-tRNA. Po umieszczeniu AA-tRNA w miejscu A następuje hydroliza GTP oraz uwolnienie EF-Tu • GDP. Do jego zamiany w formę aktywną zdolną do wiązania aminoacylo-tRNA (EF-Tu • GTP), niezbędny jest inny czynnik elongacyjny – EF-Ts [45].

Wydłużeniu łańcucha polipeptydowego o kolejny aminokwas towarzyszy transllokacja, podczas której rybosom przesuwają się o kolejny triplet nukleotydów mRNA. Efektem tego jest usunięcie tRNA z miejsca P; u prokariotów – przez miejsce E, u eukariotów natomiast bezpośrednio do cytozolu [30]. Proces ten odbywa się z udziałem energii wiązania GTP, hydrolizowanego przez rybosom po przyłączeniu faktora EF-G u bakterii, a EF-2 u pozostałych organizmów [15].

Kompleks EF-Tu • GTP wykazuje specyficzne właściwości, które umożliwiają rozpoznanie wszystkich rodzajów tRNA. Tak szeroki zakres oddziaływań może być wynikiem przyłączania się białka do tych rejonów tRNA, które są wspólne dla wszystkich cząsteczek. Ponadto EF-Tu • GTP swoiście wiąże tylko aminoacylo-tRNA, a nie wolny tRNA. Określono strukturę kompleksu potrójnego: Phe-tRNA z drożdży • EF-Tu z *Thermus aquaticus* • GDPNP (analog GTP, nie ulegający hydrolizie) [21]. Kompleks ten ma charakter wydłużony. Aminokwas wiąże się, wewnątrz kieszeni formowanej między domenami 1 i 2 EF-Tu, do pierścienia aromatycznego histydyny 67 EF-Tu *T. aquaticus*. Ta kieszeń jest na tyle głęboka, że może pomieścić wszystkie naturalnie występujące aminokwasy. Aminoacylo-tRNA swoiście oddziałuje na EF-Tu przez wiązania wodorowe, które nie tworzą się jednak w przypadku formylometionylo-tRNA, ponieważ grupa formylowa blokuje te oddziaływania. Porównanie struktur kompleksu trzeciorzędowego i czynnika elon-



RYSUNEK 2. Struktury: A – kompleksu potrójnego EF-Tu oraz B – czynnika elongacyjnego EF-G [50]

gacyjnego EF-G wykazało ich znaczne podobieństwo określane jako tzw. mimikra makromolekularna (ang. *macromolecular mimicry*) (rys. 2) [24].

Niektóre domeny EF-G przypominają strukturę cząsteczki tRNA w kompleksie potrójnym. EF-G składa się z pięciu domen, z których pierwsze dwie są podobne do domen 1 i 2 EF-Tu•GTP. Pozostałe trzy domeny EF-G zajmują to samo miejsce na rybosomie, co Phe-tRNA będącym w kompleksie potrójnym; domena 3 EF-G przypomina kształt ramienia akceptorowego, domena 4 – pętlę antykodonu, domena 5, natomiast, ramię T. Jest bardzo prawdopodobne, że zarówno EF-Tu, jak i EF-G przyłączają się do tego samego miejsca na rybosomie. Potwierdzeniem tego przypuszczenia jest fakt, iż oba czynniki białkowe wiążą się do tzw. „pętli sarcyny” 23S rRNA – zachowawczego regionu rRNA w pobliżu A-2660, który jest miejscem oddziaływania toksyn białkowych – α -sarcyny i rycyny. Ponadto oba czynniki białkowe mają podobną lokalizację na powierzchni rybosomu w badaniach z zastosowaniem technik immunologicznych [6]. Interesująca jest również obserwacja, że struktura EF-G związanego z GDP przypomina bardziej strukturę EF-Tu oddziałującego z GTP niż z GDP. Kompleks EF-G•GTP oddziałuje z rybosomem, który znajduje się w fazie przed translokacją, katalizując przejście rybosomu do fazy po translokacji. Natomiast EF-Tu•GTP•aminoacylo-tRNA powoduje przejście w kierunku przeciwnym, wiążąc się do rybosomu w fazie po translokacji. Tak więc, oba kompleksy oddziałują z miejscem A rybosomu, przy czym nie odbywa się to jednocześnie [1].

Nie znane są jednak dokładne mechanizmy tych niezwykle istotnych dla metabolizmu komórki procesów; nie wiadomo, w jaki sposób czynniki elongacyjne

wywołują zmiany struktury rybosomu podczas translokacji, jak również, jakie są mechanizmy, dzięki którym rybosom inicjuje hydrolizę GTP, zachodzącą z udziałem czynników elongacyjnych [20].

3. BIAŁKA RYBOSOMALNE DOMENY GTP-azy

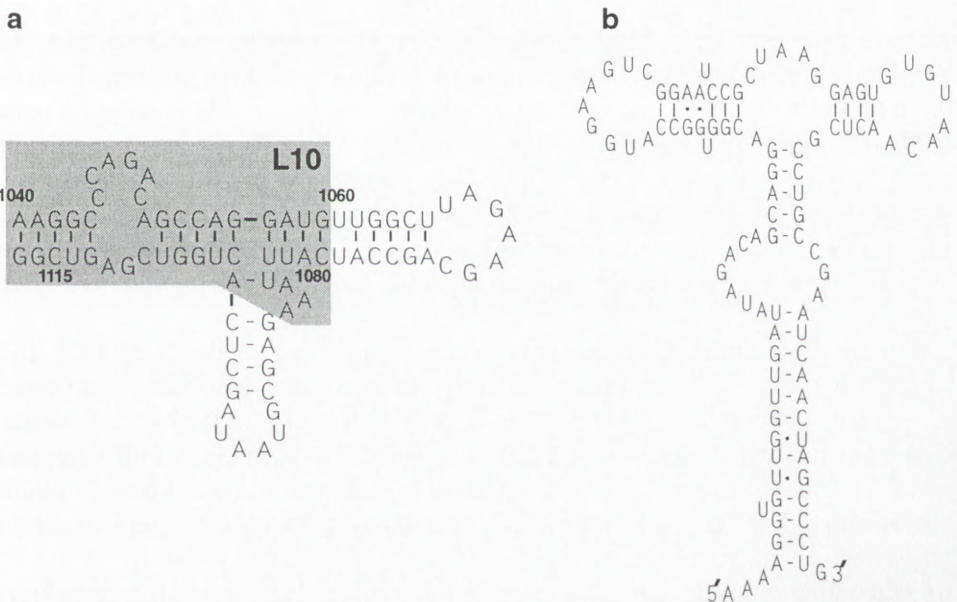
Domeneę tę tworzy, w połączeniu z rybosomalnym RNA, kompleks białek (L12)₄L10 oraz L11. Białka te nie tylko utrzymują właściwą konformację rRNA, lecz także są istotne dla funkcji GTP-azy. Rybosomy wątroby szczura, pozbawione *in vitro* białek L11, P0 i P2, nie wiążą czynników elongacyjnych EF-1 i EF-2 oraz nie wykazują aktywności GTP-azy zależnej od EF-2. Wykazano, że wyodrębniony kompleks białek P0, P1/P2 i L11 oraz fragmentu rRNA pomiędzy nukleotydami 1838 a 1936, oddziałuje z przeciwciałami „anty-28S rRNA”, specyficznymi dla wysoce zachowawczej domeny GTP-azy [41].

Zaobserwowano związek między obecnością białek o charakterze kwaśnym w rybosomie a jego aktywnością w procesie translacji. W formach przetrwalnikowych *S. antibioticus*, w których wszystkie procesy metaboliczne (w tym translacja) są zahamowane, tetramer białek L12 nie występuje; jest on obecny natomiast w fazie wzrostu w rybosomach komórek bakteryjnych [26]. W badaniach z zastosowaniem mutantów delecyjnych wykazano, że komórki organizmów eukariotycznych, których rybosomy zostały pozbawione tetrameru L12 nie są zdolne do życia [29]. Wysłunięto hipotezę, że białka L10(L12)₄ regulują aktywność rybosomów eukariotycznych [34]. Stwierdzono, że komórki *S. cerevisiae* znajdujące się w wykładniczej fazie wzrostu (intensywna biosynteza białka) zawierają o około 40% więcej tych białek niż komórki w fazie stacjonarnej; podobna zależność występuje pomiędzy rybosomami zorganizowanymi w polisomy (intensywna biosynteza białka) a wolnymi rybosomami (gdzie translacja nie zachodzi). Interesujący jest fakt, że białka związane z rybosomami występują w formie ufosforylowanej. W cytozolu natomiast istnieje pula białek nie fosforylowanych, które nie wiążą się do rybosomu. W związku z tym możliwe jest, że regulacja aktywności rybosomów następuje przez fosforylację białek P0 oraz P1/P2 [34]. Zestawienie organizmów, dla których znane są sekwencje powyższych białek przedstawia tabela 2. Wiele sekwencji aminokwasowych, a szczególnie pochodzące z organizmów eukariotycznych, uzyskano na podstawie analizy sekwencji cDNA kodujących te białka.

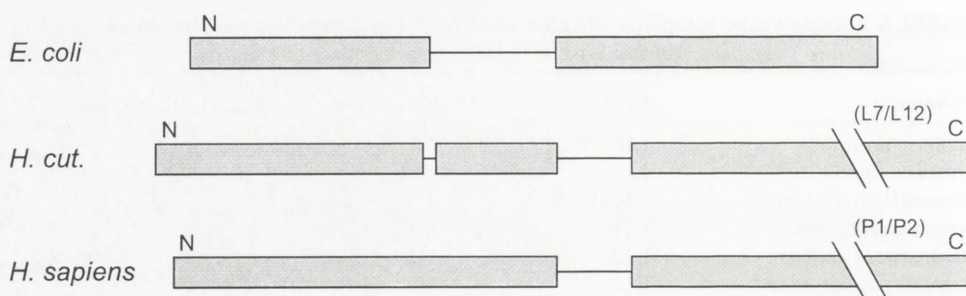
U *E. coli* określono region oddziaływania L10 z 23S rRNA w rejonie nukleotydów 1040 a 1117 (rys. 3a). Natomiast w przypadku rybosomów szczura wykazano, że 28S rRNA oddziałuje z P0 w regionie pomiędzy nukleotydamy 1838 a 1936 [41] (rys. 3b).

TABELA 2. Zestawienie gatunków, dla których określono sekwencje cDNA lub aminokwasowe białek L10 (P0), L11, L12 (P2) [12]

Prokarioty	Białko	Eukarioty	Białko
<i>Escherichia coli</i>	L10 (P0), L11, L12	<i>Dictyostelium discoideum</i>	L10,
<i>Proteus vulgaris</i>	L11	<i>Drosophila melanogaster</i>	L10, L12
<i>Salmonella typhimurium</i>	L10 (P0)	<i>Artemia salina</i>	L12
<i>Serratia marcescens</i>	L11	<i>Gallus gallus</i>	L12
<i>Streptomyces griseus</i>	L12	<i>Homo sapiens</i>	P0, P2
<i>Streptomyces virginiae</i>	L11	<i>Mus musculus</i>	L10
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	L10 (P0)	<i>Rattus rattus</i>	L11 (L12)
<i>Thermoroga maritima</i>	L10 (P0), L11, L12	<i>Rattus norvegicus</i>	P0
<i>Spinacea oleracea</i> (plastydy)	L10 (P0), L11, L12	<i>Tetrahymena thermophila</i>	L12
<i>Halobacterium cutirubrum</i>	L10 (P0), L11, L12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P0, L11 (L15), L12 (P2)
<i>Halobacterium halobium</i>	L10 (P0), L11, L12	<i>Schizosacch. pombe</i>	P2
<i>Haloarcula marismortui</i>	L10 (P0), L11, L12	<i>Trypanosoma cruzi</i>	P2
<i>Haloferax volcanii</i>	L10 (P0), L11, L12	<i>Oryza sativa</i>	P0
<i>Methanococcus vannielii</i>	L10 (P0), L12	<i>Zea mays</i>	P2
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	L12	<i>Chenopodium rubrum</i>	P0
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	L10 (P0), L11, L12	<i>Glycine max</i>	P0
		<i>Lupinus luteus</i>	P0



RYSUNEK 3. Fragmenty rRNA oddziałujące z: a – białkiem L10 rybosomów *E. coli*, b – kompleksem białek P0, P1 i P2 *S. cerevisiae* [41]



RYSUNEK 4. Organizacja domen N- i C-końcowych w białkach L10 (P0) cubakterii (*E. coli*), archebakterii (*H. cutirubrum*) oraz organizmów wyższych (*H. sapiens*); (L7/L12) oraz (P1/P2) – regiony o wysokiej homologii do odpowiednich białek [25]

Masa cząsteczkowa białek L10 (P0) wynosi od ok. 30 do 40 kD. W ich strukturze drugorzędowej można wyróżnić trzy główne elementy: domenę N-końcową, region łączący oraz domenę C-końcową (rys. 4). Cechą charakterystyczną tych białek jest ich charakter kwaśny [50]. Prawie wszystkie białka rybosomalne, z wyjątkiem P0 oraz L7/L12 (P1/P2) są zasadowe. Ponadto specyficzną cechą białek eukariotycznych jest również obecność ufosforylowanej seryny, znajdującej się przy C-końcu cząsteczki [28].

Białka te mają w swej strukturze szereg regionów zachowawczych. W części N-końcowej, pomiędzy aminokwasami 45 a 67 występuje fragment bogaty w aminokwasy zasadowe, stanowiący przypuszczalnie miejsce wiązania 28S rRNA [49]. W regionie przy końcu C występuje fragment, obejmujący około 40 aminokwasów, wśród których znaczna część to alaniny, leucyny oraz glicyny. Wykazuje on ponad 50% homologii z analogicznym regionem białka P2 (rys. 4) i zawiera charakterystyczny dla obu białek motyw MGFGLFD, stanowiący antygen dla przeciwciał występujących u chorych na autoimmunologiczną chorobę, określoną jako SLE (ang. *systemic lupus erythematosus*) [22]. Białka P0, P1 i P2 człowieka, szczura i drożdży wykazują tzw. reaktywność krzyżową (ang. *immunological cross-reactivity*).

Wykazano, iż białko P0 *H. sapiens* tworzy kompleks z białkami P1 i P2 [32]. Jednak nie znane są mechanizmy oddziaływań pomiędzy białkami – zarówno u bakterii jak i organizmów wyższych. U *E. coli*, białko L10 oddziałuje z domenami N-końcowymi obu dimerów (L7/L12)₂; nie wiadomo natomiast, który fragment białka L10 zaangażowany jest w wiązanie [34]. Domniemana sekwencja aminokwasowa białka P0 drożdży obejmuje 312 aminokwasów (rys. 5) i zawiera charakterystyczne domeny.

Szczególnie interesujące jest występowanie łańcuchów bocznych o charakterze alifatycznym, co siódmy aminokwas, począwszy od leucyny w pozycji 202. Zgodnie z uzyskanym modelem struktury drugorzędowej tego fragmentu (LLAIPLLAIA),

```

                                                    50
MGGIREKKAE YFAKLREYLE EYKSLFVVGV DNVSSQQMHE VRKELRGRAV
                                                    100
VLMGKNTMVR RAIRGFLSDL PDFEKLLPFV KGYVGFVFTN EPLTEIKNVI
                                                    150
VSNRVAAPAR AGAVAPEDIW VRAVNTGMEP GKTSFFQALG VPTKIARGTI
                                                    200
EIVSDVKVVD AGNKVGQSEA SLLNLLNISP FTFGLTVVQV YDNGQVFPSS
                                                    250
ILDITDEELV SHFVSAVSTI ASISLAIGYP TLPSVGHTLI NNYKDLLAVA
                                                    300
IAASYHYPEI EDLVDRIENP EKYAAAAPAA TSAASGDAAP AEEAAAAEEEE
ESDDDMGFGL FD

```

RYSUNEK 5. Sekwencja aminokwasowa białka P0 *S. cerevisiae*

według algorytmu Chou i Fasman, tworzy on helisę. Powstaje w ten sposób zamek hydrofobowy, zawierający reszty alaniny, które prawdopodobnie mają słabszą zdolność wiązania aniżeli typowy ekler-leucynowy [10]. Na podstawie analizy sekwencji białek drożdżowych wykazano możliwość oddziaływania białka P0 z P1 i P2 zamkami hydrofobowymi – przez analogię do zamków leucynowych [40].

Badania mutantów drożdżowych pozbawionych białka P0 wykazały, że jest ono tym elementem, który utrzymuje białka P1 i P2 w rybosomie, oraz że mutacje takie są dla komórek letalne [35]. W doświadczeniach wykorzystujących przeciwciała monoklonalne dla L10 *E. coli* następowało zahamowanie syntezy polifenyloalaniny, co wskazywałoby na istotną rolę tego białka w procesie translacji [19].

Interesujące wyniki uzyskano również podczas badania wiązania łańcucha A rycyny do podjednostki 60S rybosomów eukariotycznych. W wyniku wiązania krzyżowego znakowanego jodem ^{125}I łańcucha A rycyny uzyskano efekt wiązania do rybosomów w bliskim sąsiedztwie białek L9 i L10 [43]. Rezultaty te stanowią mogą punkt wyjścia do badań rybosomów eukariotycznych – ssaków oraz roślin wyższych.

Znane są sekwencje białek L11 pochodzących z rybosomów eubakteryjnych, archebakteryjnych oraz eukariotycznych (tab. 2). Rysunek 6 przedstawia sekwencje białek L11 *E. coli* i *H. cutirubrum*.

Białka L11, o wielkości 15–17 kD, mają charakter zasadowy. Są bogate w reszty proliny i glicyny, a znaczna ich liczba jest zachowawcza. Charakterystyczna dla L11 *E. coli* jest metylacja grupy aminowej w pozycji 2 oraz grup aminowych dwu lizyn w pozycji 4 i 40 [27]. W białku L11 *E. coli* domena N-końcowa wydaje się być istotna dla oddziaływań rybosomu z czynnikiem uwalniającym RF-1 [38]. Białko L11 *E. coli* rozpoznaje wysoce zachowawczą strukturę 23S rRNA o długości 58 nukleotydów [33]; 19 zasad jest identycznych w obrębie tej sekwencji u 162

1				50
<i>E. coli</i>MAKKVQ	AYVKLQVAAG	MANPSPVGP ALGQQGVNIM
<i>H. cutirubrum</i>MA	ETIEVLVAGG	QADPGPLGP ELGPTPVDVQ
	51			100
<i>E. coli</i>	EFCKAFNAKT	DSIEKGLPIP	VVITVYADRS	FTFVTKTPPA AVLLKKAAGI
<i>H. cutirubrum</i>	AVVQEINDQT	EAFD.GTEVP	VTIEYEDDGS	FSIEVGVPPPT AALVKDEAGF
	101			150
<i>E. coli</i>	KSGSGKPNKD	KVGKISRACL	QEIAQTKAAD	MTGADIEAMT RSIEGTARSM
<i>H. cutirubrum</i>	DTGSGEPQEN	FVADLSIEQL	KTIAEQKKPD	LLAYDARNA A KEVAGTCASL
	151			
<i>E. coli</i>	GLVVED....
<i>H. cutirubrum</i>	GVTIEGEDAR	TFNERVDDGD	YDDVLGDELA	AA

RYSUNEK 6. Zestawienie sekwencji aminokwasowych białek L11 *E. coli* i *H. cutirubrum*

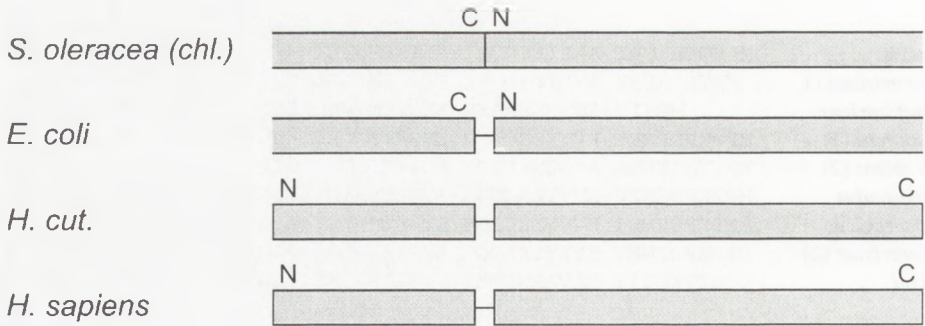
poznanych sekwencji rRNA różnych organizmów [8]. Białko eubakteryjne wiąże się do rRNA innych organizmów, należących do odrębnych królestw, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [17]. Wyjątkowa zachowawczość tych oddziaływań wskazuje, że mają one szczególne znaczenie dla funkcji rybosomu oraz że pozostały one niezmienione w toku ewolucji biotycznej. Rybosomy pozbawione L11 prowadzą syntezę białka dwukrotnie wolniej, z powodu zaburzenia funkcji GTP-azy zależnej od EF-G oraz terminacji zależnej od czynnika RF-1. Wykazano, że antybiotyk tiorstrepton wiąże się do tej samej domeny rRNA, co białko L11, blokując wiązanie kompleksów EF-G GDP i EF-Tu aminoacylo-tRNAGTP do rybosomu. Na oddziaływanie rRNA – L11 wpływa kompleks białek L10(L12)₄ lub inne białka rybosomalne. Wykazano, że kompleks L11tiorstreptonRNA jest ok. 200 razy bardziej stabilny, niż wynikałoby to z porównania powinowactwa L11 do RNA i tiorstreptonu do RNA. Daje to podstawę do wnioskowania, że tiorstrepton może naśladować niektóre składniki rybosomalne bądź czynniki białkowe, które oddziałują z N-terminalną domeną białka L11 [51].

Białko L12 jest jedynym białkiem rybosomalnym, występującym w czterech kopiach [35]. Jak wspomniano wyżej, oddziałując z białkiem L10 tworzy charakterystyczną wypustkę w dużej podjednostce rybosomalnej. Tetramer (L12)₄ charakteryzowany jest również jako (L7/L12)₄, ponieważ białka L7 i L12 mają identyczną sekwencję aminokwasową z tym, że L7 jest acetylowana pochodną L12. Sekwencje aminokwasowe białek L12, uzyskane na podstawie analizy cDNA lub białek zestawione są na rysunku 7.

Spośród innych białek rybosomalnych L12 wyróżnia się tym, że ma charakter kwaśny (pI 4.8) [46] oraz wysoką zawartość reszt alaniny i proliny. W jego strukturze wyróżnić można dwie domeny: N- i C-końcową. Region przy końcu N jest istotny dla oddziaływań z białkiem L10, fragment przy końcu C, natomiast, dla wiązania czynników elongacyjnych [31]. Interesujące jest to, że w toku ewolucji domeny

	1		50
<i>Z. mays</i>	MASGELACRY	AALILSDDDGI	AITAEKIATI VKAANIKVES YWPALFAKLL
<i>S. cerevisiae</i> (1)	.MSTESALSY	AALILADSEI	EISSEKLLTL TNAANVPDEN IWADIFAKAL
<i>S. solfataricus</i>MEYIY	ASLLLHAAKK	EISEENIKNV LSAAGITVDE VRLKAVAAAL
<i>H. sapiens</i> (1)	MPPKFPDNEI	KVVYLRCTGG	EVGATSALAP KIGPLGLSPK KVGDDIAKAT
<i>H. sapiens</i> (2)	MRYVASYLLA	ALGGNSSPSA	KDIKKILDSV GIEADDDRLN KVISELNGKN
<i>M. musculus</i>	MPPKFPDNEV	KVVYLRCTGG	EVGATSALAP KIGPLGLSPK KVGDDIAKAT
<i>R. norvegicus</i>	MPPKFPDNEI	KVVYLRCTGG	EVGATSALAP KIGPLGLSPK KVGDDIAKAT
<i>S. cerevisiae</i> (2)	MPPKFPDNEV	KYLYLRAVGG	EVGASAALAP KIGPLGLSPK KVGEDIAKAT
<i>E. coli</i>	. .SITKDQII	EAVAAMSVMD	VVELISAMEE KFGVSAAAAV AVAAGPVEAA
	51		100
<i>Z. mays</i>	EKRNVEDLIL	SVGSGGGAAP	VAAAAPAGGA AAAAAPAV . . .EEKKEEAKE
<i>S. cerevisiae</i> (1)	DGQNLKDLLV	NFSAGAAAPA	GVAGGVAGGE AGEAEAEKEE .EEAKEE.SD
<i>S. solfataricus</i>	KEVNIDEIL . .	KTATAMPV	AAVAAPAGQQ TQQAEEKKEE . . .KKEEEKK
<i>H. sapiens</i> (1)	GDWKGLRITV	KLTIQNRQAQ	IEVVPASAL I IKALKEPPR .DRKQKNIK
<i>H. sapiens</i> (2)	IEDVIAQGIG	KLASVPAGGA	VAVSAAPGSA APAAGSAPAA AEEKKDEKKE
<i>M. musculus</i>	GDWKGLRITV	KLTIQNRQAQ	IEVVPASGL I IKALKEPPR DR .KKQKNIK
<i>R. norvegicus</i>	GDWKGLRITV	KLTIQNRQAQ	IEVVPASAL I IKALKEPPR DR .KKQKNIK
<i>S. cerevisiae</i> (2)	KEFKGIKVTV	QLKIQRQAA	ASVVPASSL VITALKEPPR DR .KKDKNVK
<i>E. coli</i>	EEKTEFDVIL	KAAGANKVAV	IKAVRGATGL GLKEAK
	101		150
<i>Z. mays</i>	E . . .SDDDMG	FS .LFD
<i>S. cerevisiae</i> (1)DDMG	FG .LFD
<i>S. solfataricus</i>	GPSEEEIGGG	LSSLFG
<i>H. sapiens</i> (1)	HSGNITFDEI	VNIARQMRHR	SLARELSGTI KEILGTAQSV GCNVDRGRPHD
<i>H. sapiens</i> (2)	ESEESDDDMG	FG .LFD
<i>M. musculus</i>	HSGNITFDEI	VNIARQMRHRS	LARELSGTIK EILGTAQSVG CNVDGRGRPHD
<i>R. norvegicus</i>	HNGNITFDEI	VNIARQMRHRS	LARELSGTIK EILGTAQSVG CNVDGRGRPHD
<i>S. cerevisiae</i> (2)	HSGNIQLDEI	IEIARQMRDKS	FGRTLASVTK EILGTAQSVG CRVDFKNPHD
<i>E. coli</i>DLV	ESAPAALKEG	VSKDDAEALK KALBEE . . .G AEVEVK
	151	166	
<i>Z. mays</i>	
<i>S. cerevisiae</i> (1)	
<i>S. solfataricus</i>	
<i>H. sapiens</i> (1)	DIIDDINGA	VECPAS	
<i>H. sapiens</i> (2)	
<i>M. musculus</i>	DIIDDINGA	VECPAS	
<i>R. norvegicus</i>	DIIDDINGA	VECPAS	
<i>S. cerevisiae</i> (2)	DIIEGINAGE	IEIPEN	
<i>E. coli</i>	

RYSUNEK 7. Zestawienie sekwencji aminokwasowych białek L12 (P0) *E. coli*, *S. solfataricus*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *Z. mays*



RYSUNEK 8. Schematyczne zestawienie organizacji domen w białkach L12: a – chloroplastowych, b – eubakteryjnych, c – archebakteryjnych, d – eukariotycznych [25]

te uległy transpozycji: N-końcowa domena białka eubakteryjnego i chloroplastowego stanowi domenę przy końcu C białka archebakteryjnego i eukariotycznego (rys. 8).

Nie stwierdzono jednak, czy w wyniku zamiany lokalizacji domen uległy również transpozycji regiony wiązania białka L12 z L10 oraz z czynnikami białkowymi. Próbę rozwiązania tego problemu zawierała hipoteza dotycząca oddziaływań L12 (P2) z L10 (P0) *S. cerevisiae*, która powstała na podstawie analizy struktury drugorzędowej białka P2 z drożdży. Wykazała ona, że w rejonie przy końcu N, pomiędzy 1 a 49 aminokwasem występuje struktura helikalna. Na przeciwległych płaszczyznach helisy zlokalizowane są obok siebie aminokwasy hydrofobowe, tworząc dwa szeregi nazwane zamkami hydrofobowymi [40]. Szczególnie interesująca jest ich lokalizacja na przeciwległych stronach przypuszczalnej α -helisy, formując „dwupłaszczyznowy” zamek hydrofobowy (ang. *bilateral hydrophobic zipper*). Taka struktura umożliwia oddziaływania zarówno z białkiem P0, jak i z sąsiednimi białkami P1 i P2. Na podstawie tej hipotezy można by wnioskować, że w eukariotycznych odpowiednikach białka L12 nastąpiła również funkcjonalna rearanżacja domen. Jednak nie wiadomo, w jaki sposób białko P2 oddziałuje z czynnikami elongacyjnymi, a także nie ma danych eksperymentalnych dla potwierdzenia powyższej hipotezy. Rozwiązaniem tego problemu byłaby strukturalna analiza kompleksu białek P0 i P2.

Białko L12 *E. coli*, o masie cząsteczkowej 12,2 kD (120 aminokwasów) charakteryzuje się specyficznym składem aminokwasowym; ok. 60% stanowią reszty lizyny, alaniny, waliny oraz glutaminy. Nie zawiera tryptofanu, tyrozyny, cysteiny i histydyny [39]. Wykazano, że lizyna w pozycji 81 jest metylowana. L12 występuje w formie podwójnego dimeru, który ma zdolność przyłączania się do rybosomu [42]. Na podstawie analizy rentgenostrukturalnej określono wymiary dimeru: 18·3,2·1,2 nm. Przy użyciu sekwencji aminokwasowej oraz analizy widm dichroizmu kołowego stwierdzono, że 42–64% struktury stanowią helisy. Otrzymano

kryształy domeny C-końcowej białka L12 *E. coli* z rozdzielczością do 0.17 nm i wyznaczono jej wymiary na $3,5 \cdot 3,5 \cdot 2,5$ nm [11]. Domena C-końcowa białka L12, pomiędzy 69 a 87 aminokwasem, zawiera motyw typu: helisa-skręt-helisa, charakterystyczny dla białek regulatorowych specyficznie wiążących DNA [2].

Element ten składa się z dwóch, w przybliżeniu prostopadłych helis, połączonych krótkim, wyraźnym „skrętem” i wykazuje wysoki stopień podobieństwa do analogicznych struktur krystalicznych określonych dla białek: CAP, represorów: λ cI, λ cro, 434, tryptofanowego oraz do struktury określonej przy pomocy badań jądrowego rezonansu magnetycznego represora lac. Powyższe białka wiążą się do formy B DNA przez oddziaływania regionu aminowego drugiej helisy z dużą bruzdą DNA. Łańcuchy boczne aminokwasów o ładunku dodatnim oddziałują z grupami fosforanowymi dużej bruzdy. Interesujące jest, że pomimo tego, iż motyw helisa-skręt-helisa białka L12 ma charakterystyczne cechy, wyróżniające tego typu struktury (występowanie glicyny na początku skrętu oraz grupy hydrofobowych łańcuchów bocznych), jednak nie ma istotnego podobieństwa sekwencji aminokwasowej do innych białek, zawierających ten motyw [2]. W białku L12 domeny N- i C-końcowe połączone są regionem zawiasowym (ang. *hinge*) [32], w którym pomiędzy aminokwasem 40 a 52 występują reszty alaniny i glicyny. Taka struktura umożliwia ruch domeny C-końcowej, obserwowany w badaniach $^1\text{H-NMR}$. Badania strukturalne i funkcjonalne dimeru L7/L12 rybosomów *E. coli* z zastosowaniem analizy widm dichroizmu kołowego potwierdziły wcześniejsze obserwacje [7]. Wykazano również, że regiony N-końcowe białek mają strukturę helikalną i oddziałują ze sobą, umożliwiając tworzenie dimeru. Białka L12 cytoplazmatycznych rybosomów eukariotycznych są fosforylowane [34]. Inną wyróżniającą je cechą jest wysoka zachowawczość sekwencji C-końcowych, które stanowią epitopy dla przeciwciał znajdujących się w surowicach chorych cierpiących na chorobę autoimmunologiczną *systemic lupus erythematosus* [22]. Metodami immunochemicznymi wykazano funkcjonalną homologię między białkiem L12 *E. coli* a *S. cerevisiae* i *R. norvegicus*, stwierdzono również oddziaływania przeciwciał dla L7/L12 *E. coli* z białkami eukariotycznymi, a także włączanie drożdżowego białka L12 do rybosomów *E. coli*, w doświadczeniach mających na celu rekonstrukcję rybosomów *in vitro* [36].

4. PODSUMOWANIE

Badania struktury i funkcji rybosomów koncentrują się wokół poznania organizacji ich elementów składowych: rybosomalnych kwasów rybonukleinowych, białek rybosomalnych, a także ich funkcji, wzajemnego oddziaływania oraz roli w procesie translacji. Jednym z intensywnie badanych rejonów jest tzw. domena GTP-azy. Niezwykle ważnym zagadnieniem jest mechanizm oddziaływania kwasów rybo-

nukleinowych oraz białek w tak złożonym kompleksie, jakim jest rybosom. Dlatego istotne jest uzyskiwanie poszczególnych białek rybosomalnych, pochodzących z różnych gatunków organizmów oraz badanie ich struktury i oddziaływań z rRNA, jak również z innymi białkami.

Jak wiadomo, regulacja translacji w komórce skoordynowana jest z jej stanem metabolicznym. Komórki roślinne różnią się od zwierzęcych i dlatego również mechanizmy procesu biosyntezy białka mogą być nieco inne. Obecnie prowadzone są intensywne badania, których celem jest poznanie i funkcji roślinnych rRNA oraz białek, a także ich wzajemnych oddziaływań. Informacje te są kluczowe dla zrozumienia poszczególnych etapów biosyntezy białka.

LITERATURA

- [1] ABEL K, JURNAK F. An alpha to beta conformational switch in EF-Tu. *Structure* 1996; **4**: 229–238.
- [2] CASIANO C, MATHESON AT, TRAUT RR. Occurrence in the archaebacterium *Sulfolobus solfataricus* of a ribosomal protein complex corresponding to *Escherichia coli* (L7/L12)4.L10 and eukaryotic (P1)2/(P2)2.P0. *J Biol Chem* 1990; **265**: 18757–18761.
- [3] CECH TR, BASS BL. Biological Catalysis by RNA. *Annu Rev Biochem* 1986; **55**: 599–629.
- [4] DRAPER DE. Structure and Function of Ribosomal Protein-RNA Complex: Thermodynamic Studies. w: "The Ribosome, Structure, Function & Evolution". Hill WE, Moore PB, Dahlberg A, Schlessinger D, Garret RA, Warber JR. (red.) American Society for Microbiology Washington D.C. 1990: 160–168.
- [5] ELKON K, SKELLY S, PARNASSA A, MÖLLER W, DAHNO H, WEISSBACH H, BROTH N. Identification and Chemical Synthesis of Ribosomal Protein Antigenic Determinant in Systemic *Lupus erythematosus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; **83**: 7419–7423.
- [6] GIRSHOVICH AS, KURTSHALIA TV, OVCHINNIKOV YA, VASILIEV VD. Localization of the elongation factor G on *Escherichia coli* ribosome. *FEBS Lett* 1981; **30**: 54–59.
- [7] GUDKOV AT. The L7/L12 Ribosomal Domain of the Ribosome: Structural and Functional Studies. *FEBS Lett* 1997; **407**: 253–256.
- [8] GUTELL RR, SCHNARE MN, GRAY MW. A compilation of large subunit (23S- and 23S-like) ribosomal RNA structures. *Nucl Acids Res* 1992; **20** (suppl): 2095–2109.
- [9] HAMPL H, SCHULZE H, NIERHAUS KH. Ribosomal Components from *E. coli* 50S Subunit Involved in the Reconstitution of Peptidyltransferase Activity. *J Biol Chem* 1981; **256**: 2284–2288.
- [10] LANDSCHULZ WH, JOHNSON PT, McKNIGHT SL. Zero-length cross-linking of the C-terminal domain of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12 to L10 in the ribosome and in the (L7/L12)4-L10 pentameric complex. *Science* 1988; **240**: 1759–1764.
- [11] LEIJONMARCK M, LILJAS A. Inhibition of EF-G dependent GTPase by an aminoterminal fragment of L7/L12. *J Mol Biol* 1987; **195**: 555–580.
- [12] LIAO D, DENNIS PP. Molecular Phylogenies Based on Ribosomal Protein L11, L1, L10 and L12 Sequences. *J Mol Evol* 1994; **38**: 405–419.
- [13] LILJAS A. Structural Studies of Ribosomes. *Prog Biophys Mol Biol* 1982; **40**: 161–228.
- [14] MÜLLER E-C, WITTMANN-LIEBOLD B. Phylogenetic Relationship of Organisms Obtained by Ribosomal Protein Comparison. *Cell Mol Life Sci* 1997; **53**: 34–50.

- [15] MAKAROV EM, OLEINIKOV AV, ZECHERLE GN, TRAUT RR. Zero-length cross-linking of the C-terminal domain of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12 to L10 in the ribosome and in the (L7/L12)4-L10 pentameric complex. *Biochimie* 1993; **75**: 963–969.
- [16] MOAZED D, ROBERTSON JM, NOLLER HF. Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* (London) 1988; **334**: 362–364.
- [17] MOORE PB. Ribosomes and the RNA World. w: „Ribosomes and the RNA World”. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993: 119–135.
- [18] MUSTERS W, GONÇALVES PM, BOON K, RAUÉ HA, van HEERIKHUIZEN H, PLANTA JR. The conserved GTPase center and variable region V9 from *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA can be replaced by their equivalents from other prokaryotes or eukaryotes without detectable loss of ribosomal function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; **88**: 1469–1473.
- [19] NAG B, AKELLA SS, CANN PA, TEWARI DS, GLITZ DG, TRAUT RR. Monoclonal antibodies to *Escherichia coli* ribosomal proteins L9 and L10. Effects on ribosome function and localization of L9 on the surface of the 50 S ribosomal subunit. *J Biol Chem* 1991; **226**: 22129–22135.
- [20] NIERHAUS KH. Protein synthesis. An elongation factor turn-on. *Nature* 1996; **379**: 491–492.
- [21] NISSEN P, KJELDGAARD M, THIRUP S, POLEKHINA G, RESHETNIKOVA L, CLARK BFC, NYBORG J. Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* 1995; **270**: 1464–1472.
- [22] NOJIMA Y, MINOTA S, YAMADA A, TAKAKU F, AOTSUKA S, YOKOHARI R. Correlation of antibodies to ribosomal P protein with psychosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1992; **51**: 1053–1055.
- [23] NOLLER HF. On the Origin of Ribosome: Coevolution of Subdomains of RNA and DNA. w: „Ribosomes and the RNA World”. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993: 137–156.
- [24] NYBORG J, NISSEN P, KJELDGAARD M, THIRUP S, POLEKHINA AG, CLARK BFC. Structure of the Ternary Complex of Ef-Tu: Macromolecular Mimicry in Translation. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 81–82.
- [25] OTAKA E, HASHIMOTO T, MIZUTA K, SUZUKI K. The Ribosomal Proteins: Compilation of Protein Species Equivalents from Various Organisms, Based on Evolutionary Analyses. W: Translational Apparatus. wyd. przez Nierhaus, K., Franceschi, F., Subramanian, A.R., Erdmann, V.E. & Wittmann-Liebold (red.), B. Plenum Press. 1993 New York & London.
- [26] PARRA F, BLANCO G, ALONSO JMM, BALBIN M, MÉNDEZ C, SALORS JA. Cloning and sequence of a gene encoding the L7/L12 ribosomal protein equivalent of *Streptomyces antibioticus*. *Gene* 1992; **118**: 127–129.
- [27] RAMIREZ C, SHIMMIN LC, DENNIS PP, MATHESON AT. Comparison of the structure of archaeobacterial ribosomal proteins equivalent to proteins L11 and L1 from *Escherichia coli* ribosomes. *Protein Seq Data Anal* 1991; **4**: 75–79.
- [28] REMACHA M, JIMENEZ-DIAZ A, SANTOS C, BRIONES E, ZAMBRANO R, GABRIEL MAR, GUARINOS E, BALLESTA JPG. Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem Cell Biol* 1995; **73**: 959–968.
- [29] REMACHA M, SANTOS C, BALLESTA JPG. Disruption of single-copy genes encoding acidic ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 2182–2190.
- [30] RHEINBERGER HJ, NIERHAUS KH. Allosteric Interactions Between the Transfer-RNA Binding Sites A and E. *J Biol Chem* 1986; **261**: 9133–9139.
- [31] RICE PA, STEITZ TA. Ribosomal protein L7/L12 has a helix-turn-helix motif similar to that found in DNA-binding regulatory proteins. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 3757–3762.
- [32] RICH BE, STEITZ JA. Human Acidic Ribosomal Phosphoproteins P0, P1 and P2: Analysis of cDNA Clones, *In Vitro* Synthesis, and Assembly. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 4065–4074.
- [33] RYAN PC, LU M, DRAPER DE. Recognition of Highly Conserved GTPase Center of 23S Ribosomal RNA by Ribosomal Protein L11 and Antibiotic Thiostrepton. *J Mol Biol*. 1991; **221**: 1257–1268.

- [34] SAENZ-ROBLES MT, REMACHA M, VILELLA MD, ZINKER S, BALLESTA JPG. The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim Biophys* 1990; **1050**: 51–55.
- [35] SANTOS C, BALLESTA JPG. Ribosomal Protein P0, Contrary to Phosphoproteins P1 and P2 is Required for Ribosome Activity and *Saccharomyces cerevisiae* Viability. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15689–15696.
- [36] STÖFFLER-MEILICKE M, STÖFFLER G. The binding site of ribosomal protein L10 in eubacteria and archaeobacteria is conserved: reconstitution of chimeric 50S subunits. *Biochimie* 1991; **73**: 797–804.
- [37] STÖFFLER-MEILICKE M, STÖFFLER G. Topography of the Ribosomal Proteins from *Escherichia coli* within the Intact Subunits as Determined by Immunoelectron Microscopy and Protein-Protein Crosslinking. W: „The Ribosome, Structure, Function & Evolution”. Hill W.E., Moore P.B., Dahlberg A., Schlessinger D., Garret R.A., Warber J.R. (wyd.). American Society for Microbiology Washington D.C. 1990: str. 123–134.
- [38] TATE WP, DOGNIN MJ, NOAH M, STÖFFLER-MEILICKE M, STÖFFLER G. The NH₂-terminal domain of *Escherichia coli* ribosomal protein L11. Its three-dimensional location and its role in the binding of release factors 1 and 2. *J Biol Chem* 1984; **259**: 7317–7324.
- [39] TERHORST C, WITTMANN-LIEBOLD B, MÖLLER W. 50-S ribosomal proteins. Peptide studies on two acidic proteins, A 1 and A 2, isolated from 50-S ribosomes of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1972; **25**: 13–19.
- [40] TSURUGI K, MITSUI K. Bilateral hydrophobic zipper as a hypothetical structure which binds acidic ribosomal protein family together on ribosomes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **174**: 1318–1323.
- [41] UCHIUMI T, KOMINAMI R. Direct Evidence for Interaction of the Conserved GTPase Domain within 28S RNA with Mammalian Ribosomal Acidic Phosphoproteins and L12. *J Biol Chem*. 1992; **267**: 19179–19185.
- [42] VAN AGTHOVEN AJ, MAASSEN JA, SCHRIER PJ, MÖLLER W. Inhibition of EF-G dependent GTPase by an aminoterminal fragment of L7/L12. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975; **64**: 1184–1191.
- [43] VATER CA, BARTLE LM, LESZYK JD, LAMBERT JM, GOLDMACHER VS. Ricin A chain can be chemically cross-linked to the mammalian ribosomal proteins L9 and L10e. *J Biol Chem* 1995; **270**: 12933–12940.
- [44] VERSCHOOR A, SRIVASTAVA S, GRASSUCCI R, FRANK J. Native 3D Structure of Eukaryotic Ribosome. *J Cell Biol* 1996; **133**: 495–505.
- [45] WEISSBACH H, REDFIELD B, BROTH N. Aminoacyl-tRNA-Tu-GTP Interaction with Ribosomes. *Arch Biochem Biophys* 1971; **145**: 676–684.
- [46] WITTMANN-LIEBOLD B, KOPKE AKE, ARNDT E, KROMER W, HATAKEYAMA T, WITTMANN HG. Sequence Comparison and Evolution of Ribosomal Proteins and their Genes. W: "The Ribosome, Structure, Function & Evolution". Hill W.E., Moore P.B., Dahlberg A., Schlessinger D., Garret R.A., Warber J.R. (red.). American Society for Microbiology Washington D.C. 1990: 598–615.
- [47] WOOL IG. Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins. *TIBS* 1997; **21**: 164–165.
- [48] WOOL IG. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu Rev Biochem* 1979; **48**: 719–754.
- [49] WOOL IG, CHAN YL, GLÜCK A, SUZUKI K. The Primary Structure of Rat Ribosomal Protein P0, P1 and P2 and a Proposal for a Uniform Nomenclature for Mammalian Ribosomal Proteins. *Biochimie* 1991; **73**: 861–870.
- [50] WOOL IG, CHAN Y-L, GLÜCK A. Structure and Evolution of Mammalian Ribosomal Proteins. *Biochem Cell Biol* 1995; **73**: 933–947.
- [51] XING X, DRAPER DE. Cooperative interactions of RNA and thiostrepton antibiotic with two domains of ribosomal protein L11. *Biochemistry* 1996; **35**: 158–1588.

METODY ZWIĘKSZANIA PRODUKCJI BARWNIKÓW PRZEZ ROŚLINNE KULTURY TKANKOWE

ENHANCEMENT OF PIGMENT PRODUCTION BY PLANT TISSUE CULTURE

Włodzimierz GRAJEK, Roman MARECIK

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza
im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* stwarza możliwość pozyskiwania wartościowych związków chemicznych, w tym wielu cennych barwników roślinnych. Ze względu na wolny wzrost tkanek roślinnych i niską akumulację barwników, podejmowanych jest szereg zabiegów technologicznych poprawiających efektywność produkcji. W pracy opisano metody pozwalające na zwiększenie wydajności syntezy i wydzielania barwników. Większość tych metod opiera się na regulacji takich warunków hodowli komórek, jak: dobór rodzaju stosowanej kultury roślinnej i składników pożywki hodowlanej, immobilizacja komórek, dodatek elicitorów oraz stosowanie optymalnych warunków fizyko-chemicznych hodowli. Wykazano także istotną rolę stosowania czynników zwiększających wydzielanie metabolitów poza komórkę i ich eliminowanie z układu hodowlanego. W pracy przedstawiono szereg przykładów pokazujących dużą efektywność poszczególnych zabiegów technologicznych.

Słowa kluczowe: metabolity wtórne, barwniki, składniki pożywek, bioreaktory, elicitory, immobilizacja, permeabilizacja, hodowla dwufazowa.

Summary: Production of secondary metabolites in plant cultures *in vitro* allows to obtain the chemical compounds of high commercial value, including plant pigments. Taking into consideration low growth rate of plant tissues and low accumulation of metabolites, numerous treatments are undertaken to improve the production efficiency. In this review numerous methods used to enhance pigment production are described. The majority of these methods concern the optimisation of culture conditions as selection of suitable form of plant tissue, optimisation of medium composition, cell immobilisation, addition of elicitors, as well as optimisation of physic-chemical conditions for cell growth and metabolite production. It was proved that some technological treatments play an important part in metabolite secretion and metabolite removal from culture medium. Numerous examples are presented to show the effectiveness of individual treatments.

Key words: secondary metabolites, pigments, medium composition, bioreactors, immobilization, elicitors, cell permeabilization, two-phase systems.

WSTĘP

Roślinne metabolity wtórne obejmują szeroką gamę związków chemicznych, takich jak: alkaloidy, barwniki, związki zapachowe, polisacharydy, pestycydy, herbicydy, trucizny, enzymy, bioinsektycydy, hormony, inhibitory enzymów, środki słodzące, kosmetyki, rekombinowane białka i wiele innych [2, 18, 25, 34]. Synteza chemiczna tych związków, ze względu na stopień skomplikowania ich budowy chemicznej, jest bardzo trudna i kosztowna. Stąd biosynteza metabolitów wtórnych metodami *in vitro* stanowi atrakcyjną drogę ich pozyskiwania.

Głównym obszarem zastosowań tej dziedziny biotechnologii jest farmacja, przemysł spożywczy, kosmetyczny i włókienniczy. Mimo dużego wysiłku finansowego ze strony przemysłu i wyraźnego zainteresowania nauki, co zaowocowało podjęciem dużej ilości projektów badawczych, produkty roślinne znalazły jak dotąd ograniczone zastosowanie przemysłowe (tab. 1). Przyczyną wolnego rozwoju tej dziedziny biotechnologii jest brak badań podstawowych, dotyczących poznania szlaków metabolicznych w tkankach roślinnych, a szczególnie katalizy enzymatycznej reakcji biosyntezy, mechanizmów sekrecji metabolitów, fizjologii tkanek roślinnych w kulturach *in vitro* oraz określenia czynników środowiskowych wpływających na wydajność biosyntezy. Z drugiej strony wolny wzrost kultur tkankowych, mała koncentracja metabolitów i utrata zdolności syntetycznych sprawiają, że produkcja metabolitów wtórnych jest trudna i kosztowna.

Celem współczesnej biotechnologii roślinnej jest takie pokierowanie metabolizmem tkanek roślinnych, aby w czasie niezbędnym do podwojenia biomasy komórkowej została wytworzona równoważna masa metabolitu. Zwiększenie akumulacji metabolitów może być osiągnięte przez ingerencję w metabolizm komórkowy metodami biologii molekularnej. Jedną z takich dróg jest genetyczna modyfikacja komórek roślinnych przez wprowadzenie do ich genomu dodatkowych genów kodujących enzymy eliminujące tzw. wąskie gardła w poszczególnych szlakach metabolicznych. Innym rozwiązaniem może być kierowanie metabolizmem komórkowym w taki sposób, aby produkowany metabolit gromadził się w określonych kompartmentach komórkowych, np. wakuolach, co ułatwiłoby separację produktu. Wreszcie ze względu na to, że zakres akumulacji produktów stanowi różnicę między jego biosyntezą a rozkładem, możliwe jest usuwanie określonych enzymów katalizujących rozkład produktu i utrzymanie w ten sposób wysokiej koncentracji metabolitu w tkance.

TABELA 1. Roślinne metabolity wtórne produkowane w skali przemysłowej [2, 25]

Produkt	Roślina	Firma, państwo
Szikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Mitsui Petrochemical Ind., Ltd. Japonia
Polisacharydy	<i>Echinacea purpurea</i>	Diversa Ges., Niemcy
Ginsenozydy	<i>Panax ginseng</i>	Nitto Denko Corp., Japonia
Berberyna	<i>Coptis japonica</i>	Mitsui Petrochemical Ind., Japonia
Geraniol	<i>Geranium</i>	Kanebo, Japonia
Kwas rozmarynowy	<i>Coleus blumei</i>	Natterman, Niemcy
Purpuryna	<i>Rubia okane</i>	Mitsui Petrochemical Ind., Japonia

W ostatnich latach widoczny jest systematyczny postęp zarówno w badaniach podstawowych, jak i biotechnologicznych. Niniejsza praca przeglądowa jest poświęcona temu ostatniemu aspektowi i przedstawia na przykładzie barwników roślinnych osiągnięcia związane z zastosowaniem metod pozwalających na przyspieszenie wzrostu kultur tkankowych, intensyfikację produkcji metabolitów oraz zwiększenie ich wydzielania.

BARWNIKI ROŚLINNE

Barwniki roślinne należą do ważnych metabolitów roślinnych i są od wieków wykorzystywane w celach użytkowych przez człowieka. Tradycyjnie ich pozyskiwanie odbywa się przez ekstrakcję z materiału roślinnego wyprodukowanego w uprawach polowych. Jednakże w ostatnich latach, wskutek wzrostu wymagań ze strony przemysłu, rośnie znaczenie jakości barwników. W sezonowych uprawach polowych, rosnących w niekontrolowanych warunkach klimatycznych, utrzymanie odpowiednio wysokiej i wystandaryzowanej jakości jest bardzo trudne, a często wręcz niemożliwe. Stąd też coraz większe zainteresowanie budzą metody biotechnologiczne oparte na hodowlach kultur tkankowych w bioreaktorach jako na potencjalnym źródle wysokiej jakości barwników [12, 18]. Hodowla w warunkach *in vitro* pozwala na pełną kontrolę szlaków biosyntezy oraz subtelne ingerowanie w metabolizm komórkowy za pomocą czynników środowiskowych. Hodowle prowadzone w bioreaktorach pozwalają na stosowanie wyselekcjonowanych linii komórkowych, umożliwiają zachowanie dużej skali produkcji i stosowanie pożywek płynnych, co pozwala na jednoczesną produkcję i ekstrakcję barwników.

Do najważniejszych odbiorców barwników roślinnych należy przemysł spożywczy. Przemysł ten poszukuje barwników o dobrze zdefiniowanym standardzie jakościowym. Mimo wysokiej ceny barwników naturalnych, niekiedy nawet ośmiokrotnie przewyższając cenę barwników syntetycznych, szybko wzrasta zain-

TABELA 2. Przykłady roślin bogatych w barwniki

Grupa barwników	Roślina	Nazwa barwnika
Flawonoidy – antocyjany	Marchew	β -karoten
	Len	
	Winorośl	
	Sałata	
	Aster chiński	
	Truskawka	
	Słonecznik	
Kukurydza		
Flawonoidy – flawony	Soja	Apigenina
	Fasola	Daidzenina
	Groch włoski	Formononetyna
	Morowiec amerykański	Moreina
Chinony	Przytulina wiosenna	Alizaryna
	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Szikonina
Chlorofil	Mięta	Chlorofil
	Sałata	
	Pietruszka	
Karotenoidy	Ruta	Karoten
	Marchew	β -karoten
	Petunia	Karoten
	Tytoń	Karoten
Betacyjaniny	Burak ćwikłowy	Betanina
Betalaniny		Wulgaksantyna
Betaksantyny		

interesowanie takimi produktami ze strony klientów, którzy coraz częściej są zdecydowani zapłacić wyższą cenę za produkt naturalny. Dla przemysłu istotną cechą preparatów zawierających barwniki roślinne jest ich trwałość i neutralność sensoryczna. Należy podkreślić, że w warunkach *in vitro* istnieje znacznie większa możliwość zapobiegania rozkładowi barwników i ich utlenianiu niż w materiale roślinnym uzyskanym z upraw polowych. Ponadto można znacznie ograniczyć ilość związków zapachowych i smakowych towarzyszących barwnikom (np. w burakach ćwikłowych, szafranie, papryce, pomidorach). Możliwość precyzyjnego sterowania warunkami hodowli umożliwia faworyzowanie poszczególnych szlaków metabolicznych i znaczną intensyfikację biosyntezy barwników. Być może w przyszłości barwniki roślinne znajdą również zastosowanie w medycynie. Kamei i in. [13] donoszą bowiem, że antocyjany ograniczają wzrost komórek rakowych. Jeżeli te

informacje zostaną potwierdzone, atrakcyjność produkcji wysokiej czystości barwników roślinnych może znacznie wzrosnąć.

Do najważniejszych grup barwników roślinnych należą chlorofile, flawonoidy, chinony, karotenoidy i betalainy (tab. 2). Obejmują one dziesiątki indywidualnych związków chemicznych i od wielu lat mają zastosowanie komercyjne. Do najbardziej spektakularnych sukcesów w produkcji roślinnych barwników należy szikonina wytwarzana przez *Lithospermum erythrorhizon*. Jest to barwnik stosowany powszechnie przez przemysł kosmetyczny do produkcji szminek o barwie czerwonej.

SYSTEM HODOWLANY: TKANKA/BIOREAKTOR

Zdolność poszczególnych tkanek do syntezy określonych metabolitów jest ważnym kryterium przy wyborze rodzaju tkanki. W przypadku tej samej rośliny obserwowana jest zróżnicowana zdolność poszczególnych tkanek do produkcji barwników [19]. Poglądowym przykładem jest w tym przypadku porównanie produkcji barwników antocyjanowych przez żurawinę hodowaną w warunkach sztucznych i w warunkach polowych (tab. 3).

Spośród tkanek hodowanych *in vitro* najczęściej stosowane są dwa typy: zawiesina komórkowa i korzenie włośnikowate (transformowane). Hodowla kultury zawiesinowej stanowi analogię do hodowli bakterii. Należy jednak odnotować szereg istotnych różnic między parametrami hodowlanymi obu rodzajów komórek (tab. 4). W ostatnich latach coraz większą uwagę przyciągają korzenie włośnikowate, odznaczające się zwykle znacznie zwiększonymi zdolnościami do produkcji metabolitów wtórnych. Korzenie te uzyskuje się przez infekcję roślin przez bakterie *Agrobacterium rhizogenes* i transfer fragmentu T-DNA z plazmidu bakteryjnego Ri do komórki roślinnej. Fragment ten zostaje włączony do genomu roślinnego, w wyniku czego zachodzą istotne zmiany w metabolizmie komórkowym i następuje przyspieszenie wzrostu merystemu korzeni. Jedną z ważnych zalet tych kultur jest zdolność do wzrostu bez dodatku fitohormonów, co obniża koszty pożywek. Korzenie

TABELA 3. Produkcja antocyjanów przez żurawinę hodowaną w warunkach *in vivo* i *in vitro* [19]

Materiał roślinny	Antocyjany (AU/g mokrzej masy)
Naturalne owoce	29,62
Liście z mikrokultury	0,61
Kalus otrzymany z liści (bezbarwny)	0,112
Kalus otrzymany z liści (barwny)	3,31
Kalus z owoców (barwny)	2,19
Kalus z owoców (bezbarwny)	0,254

TABELA 4. Charakterystyka porównawcza parametrów hodowli bakterii i komórek roślinnych

Parametr hodowlany	Bakterie	Kultury komórkowe roślin
Wymiary komórek (μm)		20–200
Powierzchnia komórek (μm^2)	$\cong 10^2$	$\cong 10^4$
Objętość (μm^3)	max 10^2	10^5 – 10^6
Inokulum (% objętości świeżej pożywki)	małe 0,2–5	duże 0,1–20
Okres generacji (h)	mały 0,1–1	duży 15–200
Koncentracja biomasy (g s.m./l)	5–15	5–30
Czas hodowli (doby)	0,1–7	3–30
Stabilność genetyczna	duża	mała (zmienność somaklonalna)
Wrażliwość na stres mechaniczny	mała	duża
Miejsce gromadzenia metabolitów	poza komórką	na ogół w komórce
Zapotrzebowanie na tlen	duże	małe

włośnikowate wykazują zwykle zdolności syntetyczne porównywalne z normalnymi roślinami, a nawet je przewyższające. W literaturze można spotkać opisy hodowli korzeni włośnikowatych, których celem była produkcja barwników. Taya i in. [32] hodowali korzenie włośnikowate buraka ćwikłowego w celu produkcji barwników betalainowych. Uzyskali oni klony dorównujące w produkcji barwników naturalnym roślinom hodowanym w uprawach polowych. Zawartość czerwonego barwnika betaniny w normalnym materiale roślinnym wynosiła 4,4–6,3 mg/ g s.m., natomiast w korzeniach włośnikowatych 2,8–6,1 mg/ g s.m. Akumulacja żółtego barwnika wulgaksantyny-1 w korzeniach włośnikowatych wynosiła aż 5,3–9,3 mg/ g s.m., podczas gdy w normalnej roślinie tylko 2,9–3,8 mg/ g s.m. Oba wymienione barwniki były wydzielane przez korzenie włośnikowate do pożywki w momencie przerwania wytrząsania kultury na wytrząsarce, co można kojarzyć z obniżeniem stopnia natlenienia pożywki.

Innym przykładem korzyści z wyboru korzeni włośnikowatych może być hodowla korzeni *L. erythrorhizon* produkującej szikoninę. Produkcja tego barwnika przez kultury zawieszinowe tej rośliny wymaga stosowania dwóch różnych pożywek – jednej dla wzrostu komórek i drugiej do produkcji barwnika. Zastosowanie korzeni włośnikowatych eliminuje tę niedogodność. Shimomura i in. [29] pokazali, że hodowla korzeni włośnikowatych w bioreaktorze typu *air-lift* na specjalnej pożywce (RC; *root culture EMBO*) umożliwia produkcję dużych ilości barwnika, który był wydzielany do podłoża. Hodowlę prowadzono bez przerwy przez ok. 7 miesięcy. Ta sama pożywka została wykorzystana do produkcji czerwonego barwnika naftochinonowego, alkanniny, przez kulturę zawieszinową i korzenie włośnikowate *Alkanna tinctoria* [20]. Barwnik ten ma budowę zbliżoną do szikoniny. W przeliczeniu na gram świeżej biomasy koncentracja tego barwnika w komórkach wynosiła

24 µg, podczas gdy w korzeniach włośnikowatych ok. 290 µg, to jest ponad dziesięciokrotnie więcej.

Charakterystyka parametrów technologicznych roślinnych kultur komórkowych wskazuje, że do ich hodowli mogą być stosowane bioreaktory tradycyjnie używane do hodowli drobnoustrojów, z tym że powinny być wyposażone w system mieszania nie generujący dużych sił ścinających. Wydaje się, że optymalnym rozwiązaniem jest w tym przypadku bioreaktor wyposażony w mieszadło mechaniczne typu śruby okrętowej. Mieszadło to wywołuje małe stropy mechaniczne i większość komórek roślinnych nie ulega uszkodzeniu w czasie mieszania pożywki. Bioreaktory z mieszadłem mechanicznym zostały z powodzeniem zastosowane do produkcji antocyjanów w dużej skali. W 16-dniowej hodowli w bioreaktorze pilotowym o poj. 500 l Kobayashi i in. [16] uzyskali bardzo wysoką koncentrację biomasy komórkowej, dochodzącą do 138,4 g/l, a wydajność antocyjanów sięgała prawie 1,1 g/l, w przeliczeniu na suchą masę komórkową zawartość barwnika dochodziła do 17,2%. Ponadto autorzy odnotowali, że kluczowym parametrem decydującym o wzroście kultury była zawartość dwutlenku węgla w pożywce.

Do hodowli zawieszinowych mogą być stosowane także bioreaktory typu *air-lift*. W reaktorach tych mieszanie pożywki zachodzi pod wpływem rojów pęcherzyków powietrza unoszących się do góry. Wloty powietrza są tak umieszczone, aby utworzyły się strefy wznoszenia cieczy i strefy opadania, co gwarantuje intensywne mieszanie pożywki. Reaktory tego typu mogą także pracować jako reaktory fluidalne. Przykładem takiego rozwiązania jest hodowla komórek buraka ćwikłowego opisana przez Chmiela i in. [3] oraz Khlebnikova i in. [17]

Zupełnie odmienne wymagania stawia hodowla korzeni włośnikowatych. Z uwagi na ich duże rozmiary, znaczną masę i szybki wzrost, wypełniają one znaczną objętość bioreaktora utrudniając mieszanie i napowietrzanie pożywki. Często tkanki tego typu tworzą zbite maty o znacznych rozmiarach. Transfer tlenu w głąb maty jest trudny. Pęcherzyki powietrza zbierają się pod dolną powierzchnią maty, powodując jej flotację na powierzchnię pożywki. W zasadzie nie ma dotąd efektywnych rozwiązań konstrukcji bioreaktorów przystosowanych do hodowli korzeni włośnikowatych w dużej skali. Zwykle adaptuje się tradycyjne bioreaktory przez umieszczenie w nich specjalnych koszy wykonanych z drobnej siatki, ograniczające w ten sposób strefę wzrostu tkanki. Dobrym rozwiązaniem są komory hodowlane z rusztami, na których umieszcza się tkankę. Zwisające korzenie są zraszane pożywką z góry, przy jednoczesnym napowietrzaniu komory. Pożywka podlega recyrkulacji i możliwe jest uzupełnianie w trakcie hodowli brakujących składników pokarmowych.

WARUNKI HODOWLI

Wśród głównych czynników wpływających na wzrost tkanek roślinnych należy wymienić skład pożywki podstawowej, a szczególnie źródło węgla i azotu, sole

mineralne i fitohormony oraz naświetlenie, ciśnienie osmotyczne oraz stres mechaniczny wywołany przez stosowaną aparaturę (bioreaktor, pompy, moduły filtracyjne, armatura) [1, 6, 15].

Pożywka podstawowa

Jednym z najważniejszych czynników środowiskowych, za pomocą którego możemy wpływać na metabolizm komórkowy, jest pożywka. Wszystkie żywki stosowane w hodowli tkanek roślinnych *in vitro* cechują się złożonym składem chemicznym. Obok podstawowych makroskładników stosowany jest szereg czynników regulatorowych, takich jak: fitohormony, induktory i mikroelementy. Wpływ tych substancji na produkcję barwników roślinnych jest bardzo silny. Dobrym przykładem ilustrującym zależność produkcji metabolitu od składu chemicznego żywki podstawowej są badania nad produkcją antocyjanów przez kulturę zawieszinową truskawek (*Fragaria ananassa* cv Shikinari), prowadzone przez Mori i Sakurai [22]. Autorzy zastosowali trzy różne żywki podstawowe, tj. Linsmaiera-Skooga (LS), Murashige-Skooga (MS) i żywkę B5, i wykazali, że mają one duży, a zarazem zróżnicowany wpływ na wzrost biomasy i produkcję antocyjanów (tab. 5). Przykładowo, szybki wzrost kultury uzyskano w żywce LS i MS, natomiast produkcja barwnika była zdecydowanie faworyzowana przez żywkę B5. Oznacza to, że końcowa wydajność barwnika może być większa w żywkach, w których wzrost komórek jest umiarkowany.

Cukry

Produkcję antocyjanów można znacznie zintensyfikować przez dobór odpowiednich cukrów, stanowiących w żywce źródło węgla i energii. W tabeli 6 pokazano wpływ różnych cukrów na wzrost kultury zawieszinowej truskawki i akumulację barwnika. W obecności ksylozy, mannozy, ramnozy i arabinozy, jako głównego źródła węgla, nie zachodziła synteza antocyjanów, mimo że obserwowano wzrost komórek [22]. Silnym stymulatorem syntezy barwnika okazały się glukoza, sacharoza i fruktoza. Autorzy ci wykazali także, że produkcja barwnika przez komórki truskawek była zależna od stężenia sacharozy. Zhong i in. [35] donoszą, że zwiększenie stężenia

TABELA 5. Wpływ rodzaju żywki na wzrost kultury zawieszinowej truskawki i na produkcję antocyjanów [23]

Rodzaj żywki	Produkcja biomasy (g)	Zawartość antocyjanów w komórkach (μg/g)
Linsmaier-Skoog	47	70
Murashige-Skoog	47	55
B5	28	220

TABELA 6. Wpływ cukrów i źródła azotu na produkcję biomasy i produkcję antocyjanów przez kulturę zawiesinową truskawek [23]

Składnik pożywki	Produkcja biomasy (g)	Zawartość antocyjanów w komórkach; (µg/g)
Ksyloza	5	0
D-Mannoza	5	0
L-Ramnoza	7,5	0
D-Arabinoza	5	0
D-Galaktoza	17	70
D-Glukozą	36	225
Sacharoza	38	160
Fruktoza	34	180

sacharozy w pożywce LS z 30 g/l do 45 g/l silnie stymuluje wydzielanie czerwonych antocyjanów przez komórki *Perilla frutescens*.

Wpływ źródła węgla na syntezę antocyjanów przez kalus *Aralia cordata* badali Sakamoto i in. [27]. Produkcja barwnika zachodziła w obecności sacharozy, glukozy i fruktozy, lecz była hamowana przez ksylozę. Stwierdzono, że wpływ cukrów na syntezę barwnika był modyfikowany przez światło lub jego brak.

Źródło azotu

Duże znaczenie dla produkcji metabolitów wtórnych ma źródło azotu. Przykładem świadczącym o tym jest praca Mori i Sakurai [23] poświęcona syntezie barwników przez kulturę zawiesinową truskawki. Autorzy ci przeprowadzili serię hodowli, w których do pożywki LS wprowadzano siarczan amonu i azotan potasu. Sole te stosowano w łącznym stężeniu 30 mM lub 60 mM, przy różnych proporcjach między jonami amonowymi i azotanowymi. W przypadku dodawania pojedynczych źródeł azotu odnotowano, że w obecności wyłącznie jonów amonowych komórki truskawki nie produkowały barwnika, natomiast w obecności wyłącznie jonów azotanowych wytwarzały go w bardzo małych ilościach (tab. 7). Duże ilości antocyjanów uzyskano dopiero w pożywkach, które zawierały obie formy azotu, przy czym o wydajności syntezy barwnika decydował wzajemny stosunek ilościowy obu jonów. Dane te potwierdzają prace Sato i in. [28], którzy największą wydajność antocyjanów uzyskali w pożywce, w której azot amonowy stanowił 16,7% ogólnej ilości azotu. Autorzy wykazali także, że na syntezę barwnika przez kulturę zawiesinową truskawki, obok proporcji między obu formami azotu, istotny wpływ wywiera także całkowita zawartość azotu. Jako stężenie krytyczne soli azotowych podają 14,6 mM.

Badania nad wpływem pożywki azotowej na kulturę kalusową *Aralia cordata* przeprowadzili Sakamoto i in. [27]. Wykazali oni, że wysoka wydajność produkcji antocyjanów wystąpiła tylko przy odpowiednio dobranych proporcjach między stężeniem jonów amonowych i azotanowych (1:4). Stężenie cukrów i azotu w pożywce

TABELA 7. Wpływ stosunku azotu amonowego do azotanowego na produkcję antocyjanów przez kulturę zawiesinową truskawek [23]

Stosunek między azotem amonowym i azotanowym(mM)	Produkcja biomasy (g)	Zawartość antocyjanów w komórkach (µg/g)
0:60	12	10
10:50	40	130
20:40	40	140
60:0	4	0
0:30	21	20
2:28	47	200
10:20	48	105
30:0	5	0

odgrywa także dużą rolę w produkcji szikoniny przez kulturę zawiesinową *L. erythrorhizon* transformowaną za pomocą bakterii *A. tumefaciens* [30]. Dodatek większych ilości sacharozy do pożywki M-9 powodował 2–3-krotny wzrost akumulacji pochodnych szikoniny i 3–3,5-krotny wzrost produkcji rozpuszczalnych związków fenolowych, przy umiarkowanym wzroście biomasy komórkowej (10–30%). Z kolei wzbogacenie pożywki M-9 wyłącznie w azot owocowało wyraźnym przyspieszeniem wzrostu komórek przy małym wpływie tego czynnika na produkcję barwnika. Autorzy znacznie poprawili wydajność produkcji szikoniny przez odpowiednie zmiany w stężeniu cukrów i azotu w pożywce.

Fosforany

Wpływ pożywki na produkcję barwników przez kultury roślinne hodowane *in vitro* wskazuje na istotną rolę fosforanów w produkcji metabolitów wtórnych. Przy wzroście w pożywkach bogatych w fosforany rośliny akumulują fosfor w formie polifosforanów i kwasu fitowego. Przy deficycie fosforu następuje wykorzystywanie zapasów fosforu zgromadzonych głównie w wakuolach. Procesowi temu towarzyszy zwykle wzmożona produkcja metabolitów wtórnych. Potwierdzeniem tych obserwacji mogą być badania Taya i in. [33], którzy hodowali korzenie włośnikowate buraka ćwikłowego w pożywce MS (3% sacharozy, brak hormonów), stosując różne rozcieńczenia pożywki podstawowej. Stwierdzili oni, że kluczowym składnikiem pożywki wpływającym na akumulację czerwonego barwnika była mała koncentracja jonów fosforanowych. Usuwając całkowicie fosforan z pożywki MS uzyskali 4,8-krotny wzrost produkcji barwnika. Kluczową rolę jonów fosforanowych w biosyntezie betacyjanin przez kulturę zawiesinową *Beta vulgaris* potwierdza także publikacja Monroya i in. [21]. Autorzy ci wskazują, że początek syntezy barwnika jest skorelowany z momentem wyczerpania w pożywce jonów fosforanowych. Badali oni także wpływ różnych cukrów na syntezę barwników betalainowych i stwierdzili,

że spośród glukozy, galaktozy, laktozy i sacharozy, najlepszym źródłem węgla dla syntezy barwnika okazała się sacharoza.

Sato i in. [28] badali wpływ jonów fosforanowych na produkcję antocyjanów przez kulturę zawiesinową truskawki. Wykazali, że wzrost stężenia fosforanów prowadził do przyspieszenia wzrostu komórek. Krytycznym stężeniem fosforanów, poniżej którego obserwowano hamowanie wzrostu, było 0,63 mM. Odmienny wpływ na biosyntezę antocyjanów wywierało wysokie stężenie fosforanów. Największą akumulację antocyjanów uzyskano przy stężeniach fosforanu w zakresie 0,16–0,31 mM, a więc dużo niższych niż te, które faworyzowały wzrost komórek.

Fitohormony

W metabolizmie roślinnym szczególną rolę regulacyjną odgrywają fitohormony. Wpływ tych substancji na wzrost i produkcję metabolitów wtórnych był przedmiotem wielu badań także w odniesieniu do produkcji barwników roślinnych. Przykładem może być praca Sakamoto i in. [27], którzy testowali wpływ fitohormonów na produkcję antocyjanów w kulturach zawiesinowych *A. cordata*. W ciemności nie obserwowano istotnych różnic we wpływie auksyn na wzrost komórek i syntezę antocyjanów. Jedynie NAA i 2,4-D nieznacznie stymulował wzrost komórek i produkcję barwnika. Przy braku światła korzystny wpływ wykazała także kinetyna. W hodowlach prowadzonych przy naświetleniu produkcja barwnika była dużo mniejsza, niemniej, największą produkcję barwników uzyskano przy zastosowaniu kombinacji NAA lub 2,4-D z kinetyną.

Niezwykle ciekawe badania nad produkcją barwników przez kulturę kalusową buraka ćwikłowego przeprowadzili Girod i Zryd [9]. Uzyskali oni szereg linii komórkowych o indywidualnym fenotypie barwnym obejmujących wachlarz tkanek od komórek biało-zielonych, przez żółte, pomarańczowe do czerwonych i ciemno fioletowych. Poszczególne fenotypy uzyskano przez sekwencję czynników indukcyjnych, wśród których zasadniczą rolę odgrywały auksyny (2,4-D) i cytokiny (6-BAP).

Mori i in. [23] przedstawiają wyniki badań nad wpływem 2,4-D i benzyloadeniny (BA) na produkcję antocyjanów i ich składem w kulturze zawiesinowej komórek kalusowych liści truskawki. W pierwszej, wczesnej fazie wzrostu, obecność 2,4-D stymulowała rozmnażanie komórek, lecz pogarszała akumulację antocyjanów. Wprowadzenie tej auksyny w ilości 0,5 mg/l do kultury dwutygodniowej, wyraźnie stymulowało produkcję barwnika. Stwierdzono ponadto, że obecność 2,4-D i BA wpływała na stosunek ilościowy poszczególnych składników antocyjanowych. Podniesienie stężenia obu auksyn powodowało wzrost zawartości glikozydu cyjanidynowego. Przy dodatku auksyn w ilości 1 mg/l stężenie barwnika przewyższało siedmiokrotnie ilość barwnika uzyskaną w hodowli bez tych hormonów. Spośród obu stosowanych auksyn silniejsze działanie stymulujące syntezę glikozydu cyja-

nidynowego wykazywał 2,4-D. Ta sama auksyna ograniczała syntezę glikozydu peonidynowego. Świadczy to o ważnej roli auksyn w kontroli syntezy enzymów katalizujących szlaki metaboliczne produkcji obu barwników i o możliwości ich wykorzystania do regulacji produkcji antocyjanów.

Ciśnienie osmotyczne

Jednym z ważnych parametrów fizycznych środowiska hodowlanego jest ciśnienie osmotyczne pożywki. Czynnikiem ten determinuje wymianę masy między komórką a otoczeniem i tym samym wpływa bezpośrednio na metabolizm komórkowy. Może więc być wykorzystywany do regulacji wzrostu i produkcji metabolitów wtórnych przez komórki roślinne. Wiele publikowanych prac poświęconych kulturom tkankowym *in vitro* wskazuje na istotną rolę tego czynnika. Sato i in. [28], hodując kulturę zawiesinową truskawki, stwierdzają, że ograniczony wzrost ciśnienia osmotycznego pożywki, wywołany przez zwiększone stężenie sacharozy lub mannitolu, wyraźnie hamuje wzrost biomasy komórkowej, natomiast zwiększa produkcję antocyjanów. Dla wzrostu komórek najkorzystniejsze okazało się stężenie sacharozy na poziomie 0,09 M, podczas gdy dla syntezy barwnika stężenie 0,09–0,18 M. Podobne tendencje obserwowano w przypadku zwiększania stężenia mannitolu. Przy braku mannitolu w pożywce Murashige-Skooga (1/4 MS) koncentracja mokrej biomasy dochodziła do 408 g/l, natomiast produkcja antocyjanów wynosiła zaledwie ok. 0,2 mg/g biomasy. Po wprowadzeniu 0,4 M mannitolu koncentracja biomasy spadła do 76,7 g/l, natomiast produkcja antocyjanów wzrosła do 0,7 mg/g biomasy.

Korzystny wpływ na wydzielanie barwników przez kulturę zawiesinową *Perilla frutescens* odnotowali także Zhong i in. [35]. Przy wzroście początkowego stężenia sacharozy z 3% do 4,5% stwierdzili oni znaczne zwiększenie sekrecji barwników antocyjanowych do pożywki.

Światło

Wśród czynników środowiskowych, które wpływają na produkcję metabolitów wtórnych, ważną rolę odgrywa światło. Sato i in. [28] badali wpływ intensywności naświetlania kultury zawiesinowej truskawki na wzrost i produkcję antocyjanów. Stwierdzono, że intensywność naświetlania w zakresie 0–10 klux nie wywiera wpływu na wzrost komórek, jednak silnie oddziałuje na akumulację barwnika w komórkach i na wydajność jego produkcji. Ostatnie parametry zwiększają swą wartość w miarę wzrostu intensywności światła, przy czym najszybszy wzrost akumulacji i produkcji antocyjanów wystąpił przy zwiększaniu intensywności naświetlania od 2 do 5 klux.

Sakamoto i in. [27], badając metabolizm kultury zawiesinowej *A. cordata*, stwierdzili, że produkcja antocyjanów przebiega znacznie intensywniej w ciemności, pod-

czas gdy wzrost komórek jest faworyzowany przez światło. Rola światła jest bardzo skomplikowana i powiązana z innymi czynnikami środowiskowymi, na przykład z odżywianiem komórki. Istnieje wiele danych wskazujących na odmienny metabolizm komórki w ciemności i przy naświetlaniu kultury.

Recykulacja odfermentowanej pożywki

Jednym z ważnych elementów pożywki, zwracających uwagę badaczy, jest tzw. „czynnik kondycjonowania”. Pod tym pojęciem rozumie się wpływ dodatku płynów pochodowlanych do świeżej pożywki lub przeniesienie świeżej biomasy komórkowej do płynu pochodowlanego. Czynnik kondycjonowania wpływa bezpośrednio na wzrost kultury i wydajność produkcji metabolitów komórkowych. W warunkach *in vivo* funkcja metaboliczna komórki jest ściśle związana z jej udziałem w metabolizmie tkankowym. W obrębie tkanki roślina produkuje szereg metabolitów, które zakumulowane w określonych stężeniach, odgrywają rolę stymulatorów wzrostu i regulatorów metabolicznych dla pojedynczych komórek. Istotną rolę w tym procesie odgrywają takie parametry płynu pochodowlanego, jak wiek kultury, z której go pobrano i warunki hodowli poprzedniego pasażu (temperatura, pH, pożywka, długość światła, dodatki do pożywek). Mori i in. [23] prowadzili hodowlę kultury zawieszinowej truskawki w pożywce LS, do której dodawali filtrowany płyn pochodowlany. Stwierdzili oni wyraźny wzrost akumulacji antocyjanów po dodaniu 5–8-dniowych płynów pochodowlanych. Prowadząc hodowlę w 100% płynie pochodowlanym osiągnęli aż ośmiokrotny wzrost syntezy barwnika. Jednocześnie wykazali, że dodatek płynów wywarł wpływ na proporcje ilościowe między głównymi składnikami barwnika antocyjanowego, tj. glikozydu peonidowego i glikozydu cyjanidynowego. Warto przy tym zaznaczyć, że czynnik aktywny był termostabilny, gdyż płyny pochodowlane poddane sterylizacji termicznej wykazywały niezmienną aktywność biologiczną.

Wielkość inokulum

Istotną rolę w rozwoju każdej kultury tkankowej odgrywa początkowa gęstość komórek. Czynnikiem regulacyjnym jest w tym przypadku wielkość inokulum, wyrażana jako stosunek objętości żywej kultury komórkowej do świeżej pożywki. Mori i in. [22] stwierdzili, że inokulum odgrywa istotną rolę w produkcji antocyjanów przez kulturę zawieszinową truskawek. Z jednej strony determinuje ona czas potrzebny do zainicjowania wzrostu kultury zawieszinowej truskawek, a z drugiej strony oddziałuje na szybkość syntezy barwników. Wzrost komórek truskawek wymaga, aby wielkość inokulum wynosiła co najmniej 20 g/l. Im większe początkowe stężenie komórek, tym szybszy wzrost kultury. Należy podkreślić, że wielkość inokulum wpłynęła także w sposób istotny na zawartość antocyjanów w komórkach. Wysoką koncentrację barwnika uzyskano przy początkowym stężeniu komórek na poziomie

1,2 i 5 g/l. Odnotowano jednak, że akumulacja barwnika w trakcie hodowli wahała się w dużym zakresie dla każdego indywidualnego poziomu inokulum. Najwyższą stabilność wykazała kultura startująca przy początkowej gęstości komórek na poziomie 2 g/l.

IMMOBILIZACJA KOMÓREK

Immobilizacja na nośnikach

Immobilizacja komórek od lat budzi duże zainteresowanie biotechnologów ze względu na swoje zalety, wśród których należy wymienić możliwość prowadzenia procesów ciągłych przy dużym zagęszczeniu komórek w bioreaktorze, a tym samym możliwość uzyskania większej koncentracji metabolitów, łatwość oddzielenia biomasy komórkowej od pożywki, fizyczną separację metabolitów pozakomórkowych od biomasy komórkowej, ograniczenie zużycia pożywek oraz ochronę komórek przed stresami środowiskowymi, w tym przed zniszczeniem mechanicznym. Ten ostatni aspekt jest szczególnie istotny w hodowlach tkanek roślinnych, gdyż są one dużo wrażliwsze na stres mechaniczny niż bakterie.

Ważnym czynnikiem, który nie występuje w procesach mikrobiologicznych, jest umożliwienie wzajemnego, bliskiego kontaktu komórek (efekt tkankowy), co sprawia, że produkują one większe ilości metabolitów wtórnych. Często efekt tkankowy jest wręcz niezbędny dla zainicjowania podziałów komórkowych, a także do uruchomienia niektórych szlaków metabolicznych. Z drugiej strony należy pamiętać, że unieruchamianie komórek w przypadku prowadzenia hodowli w dużej objętości pożywki jest trudne i uciążliwe, nie mówiąc o wzroście kosztów produkcji.

Wśród najczęściej stosowanych metod immobilizacji komórek roślinnych należy wymienić więzienie w hydrożelach, adsorpcję na nośnikach stałych i hodowlę w bioreaktorach membranowych.

Kim i Chang [14], hodując komórki *L. erythrorhizon* w kulkach alginianu wapnia, uzyskali 2,5-krotny wzrost produkcji szikoniny. Dużą popularnością jako nośnik do immobilizacji komórek cieszy się pianka poliuretanowa. Iborra i in. [11] porównywali hodowlę komórek winogron odmiany Gamay rosnących w zawiesinie oraz unieruchomionych na „frytkach” poliuretanowych o wymiarach 2×2,5×3,5 cm. Zasiedlanie poliuretanu przez komórki winogron trwało ok. dwóch tygodni. Szybkość wzrostu komórek w obu hodowlach znacznie się różniła. Kultura immobilizowana rosła wolniej, chociaż przebieg wzrostu był bardzo podobny do wzrostu komórek rosnących w zawiesinie. Znaczne różnice wykazała natomiast kinetyka akumulacji antocyjanów. W pierwszym tygodniu hodowli ilość barwników zgromadzonych w komórkach wolnych przewyższała trzykrotnie ilość barwnika zgromadzoną w komórkach immobilizowanych. W dalszych etapach hodowli obserwowano syste-

matyczny wzrost koncentracji antocyjanów w kulturze immobilizowanej, podczas gdy zawartość barwnika w kulturze zawieszinowej zmalała. Po trzech tygodniach hodowli akumulacja antocyjanów była znacznie większa w komórkach rosnących na pianie poliuretanowej. Potwierdza to pogląd, że przy hamowaniu wzrostu kultury zwiększa się produkcja metabolitów wtórnych. Stwierdzono ponadto, że immobilizacja komórek wpłynęła na zróżnicowanie syntezy poszczególnych barwników antocyjanowych, z wyraźną przewagą akumulacji glikozydu peonidowego. Produkcja tego glikozydu związana jest głównie ze wzrostem kultury w warunkach występowania czynników ograniczających. Można więc sądzić, że rolę takiego czynnika pełni unieruchomienie w pianie poliuretanu.

Innym przykładem zwiększenia syntezy barwników przez immobilizację komórek jest hodowla kultury *Lavendula vera* uwięzionej w syntetycznej żywicy polimerizującej pod wpływem światła [24]. Żywica ta składała się w głównej mierze z łańcuchów alkoholu poliwinylowego o wysokim stopniu zmydlenia. Odniesieniem dla tej hodowli była kultura zawieszinowa tej rośliny i kultura uwięziona w alginianie wapnia. Hodowana tkanka produkowała niebieski barwnik w obecności L-cysteiny w pożywce. Dodawany aminokwas był jednocześnie inhibitorem wzrostu komórek, a początek syntezy tego barwnika przypadał na 5 dobę hodowli. Stwierdzono, że komórki hodowane w kulkach alginianowych wydzielały do pożywki aż 87% barwnika, natomiast kultura unieruchomiona w żywicy wydzielała do podłoża zaledwie 18% barwnika. Przyczyną tego było duże powinowactwo chemiczne barwnika do żywicy. W adsorpcji barwnika zasadniczą rolę odgrywały właściwości hydrofilowo/hydrofobowe układu. Hydrofilowość żywicy mogła być zmieniona przez zwiększenie stopnia zmydlenia alkoholu poliwinylowego w prepolimerze. Przy pełnym zmydleniu żywicy do pożywki przechodziło ponad 50% barwnika. Zmniejszenie stopnia zmydlenia powodowało zmniejszenie uwalniania barwnika.

Agregacja komórek

Jedną z form immobilizacji komórek jest ich agregacja. Dzięki temu zjawisku tworzone są duże skupiska tkanki, wyraźnie odróżniające się od wolno rosnących, pojedynczych komórek. Agregacja komórek może wywierać istotny wpływ na ich wzrost i metabolizm komórkowy (efekt tkankowy). Interesujące wyniki, wskazujące na możliwość zwiększenia syntezy barwnika przez dobór odpowiedniej wielkości agregatów komórkowych, zawiera praca Hanagaty i in. [10]. Autorzy ci prowadzili szereg pasażów kultury zawieszinowej *Carthamus tinctorius*, połączonych z systematyczną selekcją agregatów o określonych rozmiarach. Po każdym pasażu stosowano frakcjonowanie agregatów według następujących rozmiarów: < 0,50 mm, 0,50–0,84 mm, 0,84–1,00 mm, 1,00–1,41 mm i >1,41 mm. Każda indywidualna frakcja była przenoszona na świeżą pożywkę i dalej hodowana, po czym ponownie przeprowadzano frakcjonowanie na sitach o wymienionych rozmiarach otworów.

Stwierdzono, że największy udział w populacji komórek, ok. 80%, mają duże agregaty. Systematyczna selekcja agregatów o jednakowym wymiarze powodowała stałe zwiększanie udziału tych frakcji w dalszych pasażach. Po zakończeniu frakcjonowania stwierdzono wyraźne różnice w akumulacji czerwonego barwnika w poszczególnych frakcjach. W małych agregatach, o rozmiarach do 1,0 mm, koncentracja barwnika wielokrotnie przewyższała jego zawartość w agregatach o dużych rozmiarach. Warto przy tym zaznaczyć, że małe agregaty cechowały się wysoką gęstością cytoplazmy. Wiadomo przy tym, że rozmiary agregatów są w dużym stopniu determinowane przez fitohormony.

DODATEK ELICITORÓW

Ważnym czynnikiem zwiększającym biosyntezę i akumulację wielu metabolitów wtórnych są elicitory. Terminem tym określa się substancje chemiczne i biologiczne oraz czynniki fizyczne działające jako induktory lub stymulatory syntezy związków chemicznych zwiększających odporność rośliny na czynnik stresowy. Wśród tych związków można wymienić wysoko spolimeryzowane polisacharydy, związki fenolowe, glikoproteiny bogate w hydroksyprolinę oraz fitoaleksyny. Elicitory pełnią więc istotną rolę w mechanizmach obronnych rośliny [8]. Jednocześnie odgrywają one istotną rolę jako regulatory metabolizmu komórkowego. Do najbardziej znanych elicitorów należą polisacharydy i glikopeptydy pochodzenia mikrobiologicznego i roślinnego. Obecność tych substancji odbierana jest jako sygnał do produkcji fitoaleksyn, mimo że w środowisku nie ma patogenów roślinnych. Rolę elicitorów mogą pełnić także produkty hydrolizy składników własnej ściany komórkowej. Dla rośliny jest to sygnał chemiczny, że została zaatakowana przez patogena.

Dodatek elicitorów może być z powodzeniem wykorzystany do zwiększenia produkcji metabolitów wtórnych. Hanagata i in. [10] badali wpływ elicitorów na wytwarzanie czerwonego barwnika przez komórki kalusowe *Carthamus tinctorius*. Stwierdzili, że dodatek inaktywowanej grzybni grzybów strzępkowych, chemicznie czystych polisacharydów oraz mikroalg kilkakrotnie zwiększał produkcję barwnika (tab. 8).

Wzrost produkcji barwników antocyjanowych przez kultury kalusowe uzyskali także Rajendran i in. [26]. Hodowali oni kalus marchwi z dodatkiem wodnych ekstraktów grzybni *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium notatum* i *Fusarium oxysporum*. Największą aktywność wykazał ekstrakt z *A. flavus*, który zwiększał produkcję barwnika ponad dwukrotnie.

Innym przykładem osiągnięcia wzrostu produkcji barwnika dzięki użyciu elicitorów są badania Tani i in. [31]. Wprowadzali oni do pożywki LS, w której przebiegała hodowla *L. erythrorhizon*, oligogalakuronidy o stopniu polimeryzacji

TABELA 8. Wpływ elicitorów na produkcję barwnika przez kulturę *Carthamus tinctorius* [10]

	Elicitory	Produkcja barwnika (mg/l)
Kontrola	bez elicitorów	0,54
Grzyby	<i>A. versicolor</i>	3,48
	<i>A. alternata</i>	3,66
	<i>A. flavus</i>	2,46
	<i>Trichoderma</i> sp.	2,82
	<i>F. oxysporum</i> IFO 31985	4,40
Kontrola	bez elicitorów	0,68
	guma ksantanowa	2,09
Polisacharydy	fucoidan	2,04
	lichenan	1,92
Kontrola	bez elicitorów	0,60
	<i>Anabaena cylindrica</i>	4,82
Mikroalgi	<i>Anabaena variabilis</i>	5,03
	<i>Spirulina platensis</i>	1,81

12–20. Stwierdzili, że dodatek tej substancji wyraźnie aktywował serię reakcji enzymatycznych biorących udział w biosyntezie szikoniny. Najsilniej aktywowana była synteza enzymów katalizujących początkowe reakcje, szczególnie przejście geranylhydrochinonu do dihydroechinofuranu.

PERMEABILIZACJA PLAZMALEMMY

Jednym z najskuteczniejszych zabiegów technologicznych zwiększających wydobywanie barwnika z wnętrza komórek roślinnych jest permeabilizacja plazmalemmy oraz tonoplastów (tab. 9). Cel ten można osiągnąć przez zastosowanie takich zabiegów, jak: dodatek detergentów, zastosowanie enzymów lipolitycznych, dodatek polielektrolitów, zmiana siły jonowej, działanie wysokiego ciśnienia oraz elektroporacja membran [1, 15].

Do najczęściej stosowanych detergentów należy zaliczyć DMSO, powodujący ekstrakcję steroli usztywniających frakcję fosfolipidową błon biologicznych. W wyniku działania detergentów następuje uwolnienie barwników z wnętrza komórek, jednak należy podkreślić, że w większości przypadków zabieg ten prowadzi do śmierci komórek wskutek zniszczenia kompartmentacji komórek. Obok DMSO do permeabilizacji komórek zalecane są naturalne monoterpény i kwasy tłuszczowe [4].

TABELA 9. Metody zwiększania przepuszczalności błon komórkowych

Rodzaj obróbki	Stosowane czynniki	Istota zabiegu
Detergenty	DMSO, silikony	rozpuszczanie steroli i fosfolipidów
Enzymy	lipazy	deestryfikacja fosfolipidów
Polielektrolity	chitozan	zmiana potencjału membranowego w obrębie białek membranowych i fosfolipidów
Zmiana siły jonowej	sole, np. NaCl	działanie na białka membranowe
Elektroporacja	impulsy prądu elektrycznego	formowanie otworów w błonie, zmiana potencjału membranowego
Temperatura	ogrzewanie pożywki	denaturacja białek membranowych
Wysokie ciśnienie	ciśnienie hydrostatyczne, ciśnienie osmotyczne	zmiany w konformacji białek

Dużą skuteczność w permeabilizacji błon komórkowych wykazują lipazy. Działają one na fosfolipidy powodując rozluźnienie warstwy hydrofobowej plazmalemy i tonoplastów. Utworzone pory są szybko odbudowywane przez komórki, co ogranicza śmiertelność komórek.

Duże zastosowanie w zwiększaniu przepuszczalności błony cytoplazmatycznej mają polielektrolity. Najwięcej przeprowadzonych badań dotyczy chitozanu. Jest to silny polikation i jego działanie jest tym silniejsze, im większy jest stopień jego deacetylacji. Zbyt silnie naładowane chitozany mogą jednak uszkodzić błony komórkowe powodując śmierć całej populacji komórkowej. Ważną rolę odgrywa nie tylko stopień deacetylacji, ale również stężenie chitozanu.

Doermenburg i Knorr [7] do wydzielenia barwnika z kultury zawiesinowej *Chenopodium rubrum* i *Morinda citrifolia* zastosowali szybki wzrost ciśnienia hydrostatycznego do 350 MPa. Stwierdzili oni, że najkorzystniejsze ciśnienie do akumulacji metabolitów w komórce wynosiło 50 MPa, natomiast wzrost ciśnienia do 250–350 MPa spowodował przejście barwników do pożywki. Przyczyną tego była prawdopodobnie destrukcja tonoplastów i wypłynięcie ich zawartości z komórek. Autorzy ci do perforacji błon wykorzystali także elektroporację. Technika ta jest od wielu lat z powodzeniem stosowana do fuzji protoplastów i przenoszenia obcych genów. Zabieg ten polega na wprowadzeniu silnych impulsów pola elektrycznego wynoszących ponad 0,7 kV/cm. Niestety w miarę wzrostu natężenia pola gwałtownie malała przeżywalność komórek, chociaż odzysk czerwonego barwnika z komórek *Chenopodium rubrum* sięgał 100%.

USUWANIE PRODUKTU Z POŻYWKI W CZASIE HODOWLI

Produkcja metabolitów wtórnych jest procesem biochemicznym przebiegającym w kaskadzie wielu reakcji katalizowanych przez odpowiednie enzymy. Efektem

tych przemian jest wytworzenie przez komórkę produktu finalnego, który dla biotechnologów jest zwykle przedmiotem dużego zainteresowania. Dotychczasowe doświadczenia wskazują, że wiele metabolitów ogranicza wzrost komórek i działa hamująco na kontynuację indywidualnych szlaków metabolicznych. W tym kontekście usuwanie metabolitów końcowych umożliwia przesunięcie równowagi reakcji w stronę tworzenia metabolitów komórkowych. W praktyce istnieją dwa podstawowe rozwiązania technologiczne:

- ekstrakcja dwufazowa, w której metabolit przechodzi do fazy niewodnej (rozpuszczalnik, nie mieszający się z warstwą pożywki) lub
- adsorpcja wydzielonego metabolitu na adsorbencie stałym.

Ekstrakcja dwufazowa

Efektywnym rozwiązaniem biotechnologicznym jest prowadzenie hodowli dwufazowej, która polega na utworzeniu w bioreaktorze dwu rozdzielnych faz: jedną fazę, zwykle dolną, stanowi roztwór wodny (pożywka), a drugą fazę – rozpuszczalnik organiczny (faza górna). Układ dwufazowy tego typu umożliwia przejście metabolitu do rozpuszczalnika, dzięki czemu następuje ciągłe usuwanie metabolitu z hodowli tkankowej i tym samym wyeliminowany jest czynnik hamujący produkcję. Stosowanie rozpuszczalników organicznych zawęża zakres ekstrakcji do metabolitów słabo rozpuszczających się w wodzie, głównie o charakterze hydrofobowym. Przejście metabolitu do rozpuszczalnika umożliwia jego selektywne zagęszczanie oraz zabezpiecza przed hydrolizą lub utlenieniem. Klasycznym układem dwufazowym jest układ woda - alkohole, alkany, Miglyol, związki aromatyczne i inne. Pewien problem stanowi częściowa rozpuszczalność rozpuszczalników w wodzie. W tym przypadku może dochodzić do uszkodzenia błon fosfolipidowych w komórkach. Przy małym zakresie tego zjawiska mamy do czynienia z częściową permeabilizacją plazmalemmy wokół cytozolu, a nawet permeabilizacją tonoplastów. Może to być korzystne dla wydzielania metabolitu, lecz bardzo duże uszkodzenia błon mogą prowadzić do śmierci komórki. Oznacza to, że każdorazowo należy precyzyjnie dobrać rodzaj stosowanego rozpuszczalnika.

Kim i Chang [14] wykazali, że ekstrakcja *in situ* szikoniny w układzie woda/n-heksadekan znacznie zwiększa szybkość i wydajność produkcji barwnika. Autorzy ci łączyli ekstrakcję dwufazową z dodaniem do fazy wodnej elicitora. W hodowlach zawiesinowych *L. erythrorhizon* uzyskali aż 60 mg barwnika z litra pożywki, co oznacza że stężenie to było 24 razy większe niż w próbie kontrolnej, a produktywność objętościowa zwiększyła się aż 65 razy. Deno i in. [5], badając produkcję szikoniny, wykazali, że wydajność i produktywność objętościowa barwnika zwiększa się wraz ze wzrostem długości łańcucha stosowanych alkanów. Stwierdzono przy tym, że alkany o budowie pierścieniowej nie dają zadowalającego rozdziału międzyfazowego.

Dla separacji produktów białkowych najkorzystniejszym układem dwufazowym jest układ, w którym fazę dolną stanowi wodny roztwór polimeru polisacharydowego, np. dekstranu, natomiast fazę górną wodny roztwór glikolu polietylenowego. Alternatywnym rozwiązaniem jest układ: roztwór soli /glikol polietylenowy. Jako sole stosuje się bądź fosforany, bądź bezpieczniejsze dla środowiska naturalnego cytryniany.

Dodatek adsorbentów

W hodowlach dwufazowych fazą adsorbującą metabolit komórkowy może być ciało stałe. Zwykle stosuje się żywice jonowymiennie, szczególnie żywice Amberlite typu XAD. Obecność adsorbenta w pożywce hodowlanej pozwala nie tylko wiązać metabolit, ale także działa stymulująco na jego produkcję. Shimomura i in. [29] prowadzili hodowlę korzeni włośnikowatych *L. erythrorhizon* w pożywce płynnej RC z dodatkiem żywic Amberlite XAD-2,-4 i -7. Najlepsze rezultaty uzyskano przy zastosowaniu żywicy XAD-2. Produkcja szikoniny była dwukrotnie większa. Prawie 90% barwnika zostało związane z żywicą, podczas gdy w pożywce zostało tylko 1–5% szikoniny. Autorzy zastosowali tę metodę do produkcji szikoniny w bioreaktorze typu *air-lift* połączonym z kolumną wypełnioną adsorbentem. Prowadząc ciągle proces hodowli przez 220 dni uzyskiwali dziennie 2,6 mg szikoniny z jednego litra objętości roboczej bioreaktora. Intensyfikację produkcji barwników antocyjanowych przez winorośl opisali także Cormier i in. [4]. Do adsorpcji barwników wykorzystali żywicę Amberlite IR-120. Hodowlę dwufazową połączyli z permeabilizacją błon komórkowych za pomocą geraniolu, nerolu, neomentolu i kwasu kaprylowego oraz ze zmianami pH pożywki. Stwierdzili, że dodatek monoterpenu i kwasów tłuszczowych zwiększał wydobycie barwnika z wodniczek, ale niszczył integralność błon komórkowych i prowadził do śmierci komórek. Zastosowanie samego adsorbenta w ilości 10 g/l pozwoliło na wydobycie 80% barwnika przy zniszczeniu 70% komórek.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BUITELAAR RM, TRAMPER J. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *J Biotechnol* 1992; **23**: 111–141.
- [2] CHMIEL A. Biotechnologia komórek roślinnych. *Biotechnologia* 1992; **4(19)**: 5–16.
- [3] CHMIEL A, DE JEZUS M, SCHWITZGUEBEL J-P, ZRYD J-P. Modyfikacja bioreaktora do hodowli komórek roślinnych. *Biotechnologia* 1993; **3(22)**: 56–60.
- [4] CORNIER F, BAO DO C, MORESOLI C. Anthocyanin release from grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Biotechnol Lett* 1992; **14**: 1029–1034.

- [5] DENO H, SUGA C, MORIMOTO T, FUJITA Y. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. VI. Production of shikonin derivatives by a two-layer culture containing an organic solvent. *Plant Cell Rep* 1987; **6**: 197–199.
- [6] DICOSMO F, MISAWA M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnol Adv* 1995; **13**: 425–453.
- [7] DOERNENBURG H, KNORR D. Cellular permeabilization of cultured plant tissues by electric field pulses and high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnol* 1993; **6**: 35–48.
- [8] FERNANDEZ-BOLANOS J, HEREDIA A. Review: plant cell wall fragments as elicitors. *Rev Esp Cienc Tecnol Aliment* 1993; **33**: 577–596.
- [9] GIROD P-A, ZRYD J-P. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1991; **25**: 1–12.
- [10] HANAGATA N, ITO A, UEHARA H, ASARI F, TAKEUCHI T, KARUBE I. Behavior of cell aggregate of *Carthamus tinctorius* L. cultured cells and correlation with red pigment formation. *J Biotechnol* 1993; **30**: 259–269.
- [11] IBORRA JL, GUARDIOLA J, MONTANER S, CANOVAS M., MANJON A. Enhanced accumulation of anthocyanins in *Vitis vinifera* cells immobilized in polyurethane foam. *Enzyme Microb Technol* 1994; **16**: 416–419.
- [12] ILKER R. *In vitro* pigment production: An alternative to color synthesis. *Food Technol* 1987; **41**: 70–72.
- [13] KAMEI H, KOJIMA S, HASEGAWA M., UMEDA T, TERABE K, YUKAWA T. Suppressive effect of flavonoid extracts from flower petals on cultured human malignant cells. *J Clin Exper Med*. 1993; **164**: 829–830.
- [14] KIM DJ, CHANG HN. Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by *in-situ* extraction and calcium alginate immobilization. *Biotech Bioeng* 1990; **36**: 460–466.
- [15] KNORR D, CASTER C, DOERNEBURG H, DORN R, GRAF S, HAVKIN-FRENKEL D, PODSTOLSKI A, WERRMAN U. Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue cultures. *Food Technol* 1993; **12**: 57–63.
- [16] KOBAYASHI Y, AKITA M., SAKAMOTO K, LIU H, SHIGEOKA T, KOYANO T, KAWAMURA M., FURUYA T. Large-scale production of anthocyanin by *Aralia cordata* cell suspension cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993; **40**: 215–218.
- [17] KHLEBNIKOV A, DUBUIS B, KUT OM, PRENOSIL JE. Growth and productivity of *Beta vulgaris* cell culture in fluidized bed reactors. *Bioprocess Engn* 1995; **14**: 51–56.
- [18] KRÓLICZAK P, NOWAK A. Kultury tkankowe roślin jako źródło metabolitów wtórnych. *Post Nauk Roln* 1994; **5**: 69–79.
- [19] MADHAVI DL, SMITH MAL, BERBER-RAMIREZ MG. Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait). *J Food Sci* 1995; **60**: 351–355.
- [20] MITA G, GERARDI C, MICELI A, BOLLINI R, DE LEO P. Pigment production from *in vitro* cultures of *Alkanna tinctoria* Tausch. *Plant Cell Rep* 1994; **13**: 406–410.
- [21] MONROY MR, APARICIO AJ, ORTIZ GD, JIMENEZ GS. Effect of carbon source on cell growth and betalain production in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnol Lett* 1994; **16**: 853–858.
- [22] MORI T, SAKURAI M., SHIGETA J, YOSHIDA K, KONDO T. Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry plants. *J Food Sci* 1993; **58**: 788–792.
- [23] MORI T, SAKURAI M., SEKI M., FURUSAKI S. Effects of conditioning factor on anthocyanin production in strawberry suspension cultures. *J Sci Food Agric* 1994; **66**: 381–388.
- [24] NAKAJIMA H, SONOMOTO K, MORIKAWA H, SATO F, ICHIMURA K, YAMADA Y, TANAKA A. Entrapment of *Lavendula vera* cells with synthetic resin prepolymers and its application to pigment production. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986; **24**: 266–270.

- [25] PETERSEN M., ALFERMANN AW. Plant cell cultures. [w] Biotechnology, Second Edition. Rehm H-J, Reed G, Puehler A, Stadler P [red.]. Vol. 1. Biological Fundamentals. Salm H. [vol. red.], VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo 1993; 577–614.
- [26] RAJENDRAN L, SUVARNALATHA G, RAVISHANKAR GA, VENKATARAMAN LV. Enhancement of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. under the influence of fungal elicitors. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; **42**: 227–231.
- [27] SAKAMOTO K, IIDA K, SAWAMURA K, HAJIRO K, ASADA Y, YOSHIKAWA T, FURUYA T. Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. *Phytochem* 1993; **33**:357–360.
- [28] SATO K, NAKAYAMA M., SHIGETA J. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Sci* 1996; **113**: 91–98.
- [29] SHIMOMURA K, SUDO H, SAGA H, KAMADA H. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep* 1991; **10**: 282–285.
- [30] SRINIVASAN V, RYU DDY. Improvement of shikonin productivity in *Lithospermum erythrorhizon* cell culture by alternating carbon and nitrogen feeding strategy. *Biotechnol Bioeng* 1994; **42**: 793–799.
- [31] TANI M., TAKEDA K, YAZAKI K, TABATA M. Effects of oligogalacturonides on biosynthesis of shikonin in *Lithospermum* cell cultures. *Phytochem* 1993; **34**: 1285–1290.
- [32] TAYA M., MINE K, KINO-OKA M., TONE S, ICHI T. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *J Ferment Bioeng* 1992; **73**: 31–36.
- [33] TAYA M., YAKURA K, KINO-OKA M., TONE S. Influence of medium constituents on enhancement of pigment production by batch culture of red beet hairy roots. *J Ferment Bioeng* 1994; **77**: 215–217.
- [34] TEN HOOPEN HJG, VERPOORTE R. Secondary metabolites from plant cell and tissue cultures. *Biotechnologia* 1997; **2**(37): 15–28.
- [35] ZHONG J-J, XU G-R, YOSHIDA T. Effects of initial sucrose concentration on excretion of anthocyanin pigment in suspended culture of *Perilla frutescens* cells. *World J Microbiol Biotechnol* 1994; **10**: 590–592.

TERAPIA GENOWA STAN OBECNY I PERSPEKTYWY ROZWOJU

GENE THERAPY – TODAY AND PROGRESS PERSPECTIVES

Jerzy NOWAK

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie: Terapia genowa stanowi nową dyscyplinę biomedyczną wzbudzającą z jednej strony dużo emocji i nadziei, z drugiej szereg kontrowersji dotyczących podstaw naukowych, etycznych oraz prawnych. Podstawowe problemy związane z terapią genową dotyczą jej bezpieczeństwa, wyboru choroby, stosowanych metod, wprowadzania genów do komórek, efektywności transferu genu oraz skuteczności stosowanego schematu podawania komórek z terapeutycznym genem. W czasie 9 lat, jakie upłynęły od pierwszej terapii genowej, przeprowadzono łącznie 311 prób klinicznych przy użyciu zatwierdzonych protokołów. Terapia genowa w większości przypadków została zastosowana u chorych z nowotworami (62%), jednogennymi chorobami genetycznymi (15%) i AIDS (85%). Wyniki terapii genowej są dalekie od oczekiwań, jakie wiązano z tą nową formą leczenia. Terapia genowa stanowi niewątpliwie przełom koncepcyjny w leczeniu chorób nowotworowych i genetycznych. Jednak na pozytywne wyniki leczenia trzeba będzie jeszcze długo czekać. Zintensyfikowanie badań podstawowych powinno przyczynić się do opracowania wektorów swoiście rozpoznających komórki docelowe. Wektorów, które wprowadzałyby terapeutyczny gen dokładnie w miejsce genu brakującego lub dokonywałyby korekty mutacji. Ekspresja wprowadzonego genu powinna być regulowana zgodnie z wymogami leczniczymi. Pewne nadzieje na postęp w terapii genowej stwarza zastosowanie technologii hybrydowych cząsteczek RNA/DNA w powiązaniu z ligandami dla powierzchniowych receptorów komórek docelowych. Wydaje się, że po okresie niespełnionych oczekiwań wiązanych z terapią genową dalsze podstawowe badania powinny przyczynić się do jej znaczącego postępu.

Summary: Gene therapy is new biomedical discipline rising much emotions and high hopes on one side and number of controversies on the other side including basic research, ethical and legal aspects. There are questions concerning safety, disease selection, methods used, gene transfer technology, effectiveness of gene transfer and clinical efficacy of gene therapy. During the last 9 years, since the first gene therapy, altogether 311 clinical trials have been carried out according to the approved protocols. Among 311 clinical trials, majority involved cancer patients (62%), monogenic diseases (15%) and AIDS (8%). Results of gene therapy trials are far from expected. Gene therapy constitutes conceptual breakthrough in treatment of neoplasms and genetic diseases. However, for positive clinical results we still have to wait. Intensification of basic research should result in constructing new vectors specifically recognized

target cells. Future vector should introduce the therapeutic gene in the place of absent gene or should corrected mutated sequence. Regulation of transgene expression should be in concordance to the treatment. A progress in gene therapy may bring about application of novel RNA/DNA chimeric molecule technology along with specific ligand - target cell receptor interaction. It seems that more basic research should contribute in future development of gene therapy.

Obecnie mija 9 lat od pierwszego udanego eksperymentu z transferem genu oporności na neomycynę do limfocytów naciekających guz (TIL – *tumor infiltrating lymphocytes*). Pierwsza kliniczna próba terapii genowej została przeprowadzona przez Culviera, Bleasa, Andersona i Rosenberga 14 września 1990 roku u 4-letniej dziewczynki z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID – *severe combined immunodeficiency*) spowodowanym wrodzonym brakiem deaminazy adenozyiny (ADA) [7]. U dziewczynki tej w wyniku transferu genu ADA do limfocytów oraz dodatkowo dzięki podawaniu enzymu deaminazy adenozyiny w glikolu polietylenowym doszło do normalizacji podstawowych parametrów odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i humoralnego. Obecnie znajduje się w dobrym stanie klinicznym i może normalnie żyć [3]. Ten pierwszy udany wynik terapii genowej zrodził bardzo duże nadzieje na wyleczenie chorób genetycznych jednogenowych oraz chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo. Z początku wydawało się, że próby terapii genowej będą ograniczone do jednogenowych chorób dziedzicznych. Bardzo szybko okazało się, że technologia transferu genu może być zastosowana w próbach leczenia innych chorób. Największe zainteresowanie oraz nadzieje wiązano z terapią genową nowotworów oraz AIDS.

WEKTORY

Zasadniczym problemem w terapii genowej jest znalezienie takiego wektora, który w sposób swoisty rozpoznawałby komórki docelowe. Najczęściej używany wektor – zmodyfikowany retrowirus jest wiązany do powierzchni komórki przez receptor, którego budowa nie jest znana. Retrowirusy są cząsteczkami niestabilnymi, co może stwarzać problemy w uzyskiwaniu ilości koniecznej do stosowania ich na szerszą skalę. Również w warunkach *in vivo* retrowirusy mogą być szybko inaktywowane przez układ komplementu. Stąd też zastosowanie retrowirusów prawie wyłącznie w terapii *ex vivo*, czyli dokonanie transferu genu w warunkach *in vitro*, a następnie wprowadzenie do organizmu genetycznie zmodyfikowanych komórek. Integracja retrowirusa z genomem zachodzi wyłącznie w komórkach dzielących się. Część wektorów (retrowirusowych, pochodnych adenowirusów – *adenosociated virus*) ulega integracji z genomowym DNA. Czasami zdarza się, że dochodzi do blokady integracji i ekspresji retrowirusa w proliferujących komórkach. Sam mechanizm integracji retrowirusa z genomem nie został jeszcze poznany. Losowa

integracja z genomem komórki może wpływać na różny poziom ekspresji transgenu w różnych komórkach, jak również na stabilność transgenu. Istnieje bardzo niewielkie ryzyko, że losowa integracja może spowodować aktywację lub inaktywację funkcjonalnych genów. W retrowirusa można wbudować odcinek DNA nie dłuższy niż 1 kb, co ogranicza zastosowanie większych terapeutycznych genów. Ostatnio opracowano system retrowirusowych wektorów bazujących na wirusie HIV, które są w stanie zakażać również komórki nie dzielące.

Wektory najczęściej używane w terapii genowej

Wektor	Protokoły liczba	Chorzy liczba
Adenowirus +AAV	40	299
Liposomy	61	471
Wirusy ospy	17	121
Retrowirusy	163	1261
DNA	9	54
Innc	21	38

Wektory adenowirusowe

Znalazły zastosowanie przede wszystkim w próbach terapii mukowiscydozy z uwagi na ich tropizm do komórek epitelialnych układu oddechowego. Adenowirusy wykazują również tropizm w stosunku do komórek mięśniowych i neuronów. W przeciwieństwie do retrowirusów charakteryzują się dużą stabilnością. Adenowirusy można modyfikować do wektorów pozbawionych zdolności do replikacji. Głównym ograniczeniem stosowania wektorów adenowirusowych jest indukcja odpowiedzi immunologicznej. Odpowiedź skierowana jest przeciwko samemu wirusowi lub komórkom zainfekowanym adenowirusem. Wektory adenowirusowe są tak modyfikowane, żeby usunąć geny kodujące najbardziej immunogenne białka. Podejmowane były próby stosowania immunosupresji równocześnie z podawaniem wektorów adenowirusowych. Kolejne podawanie wektorów często nie powoduje wzrostu ekspresji transgenu, lecz nasila reakcje zapalne spowodowane prawdopodobnie przeciwciałami antywirusowymi neutralizującymi wektory. Niektóre białka adenowirusowe mogą wywierać cytotoksyczny wpływ na transdukowane komórki. W przypadku adenowirusów ekspresja terapeutycznego genu często jest krótkotrwała. Wektory adenowirusowe mogą pomieścić geny wielkości 7,5 kb. Ostatnio próbuje się konstruować adenowirusowe minichromosomy zdolne pomieścić znacznie większe odcinki DNA dzięki usunięciu wszystkich kodujących sekwencji wirusa. Dzięki temu zmniejsza się ryzyko wystąpienia odpowiedzi immunologicznej. Wektory ade-

nowirusowe wydają się być najbardziej odpowiednie dla chorób, w których długotrwała ekspresja terapeutycznego genu nie jest konieczna np. w nowotworach.

Wektory pochodne adenowirusów

Wektory te (*adenoassociated virus* – AAV) są zdolne do integracji z genomem komórki i przechodzą do komórek potomnych w trakcie kolejnych podziałów. W przeciwieństwie do retrowirusów ulegają integracji głównie do chromosomu 19. Jednakże integracja nie jest tak efektywna jak w przypadku retrowirusów. Mogą wbudować odcinek DNA wielkości do 5 kb. Wektory te są bardzo stabilne. Mogą transdukować różne rodzaje komórek zarówno dzielące, jak i nie dzielące się. Ograniczeniem jest ich jednoniciowość DNA, wklonowane transgeny mogą blokować replikację. Ponadto wymagają koinfekcji z adenowirusami w celu replikacji. Ostatnia praca Russella i Hiraty [22] wykazała, że zmodyfikowany AAV może skutecznie integrować w ściśle określonym miejscu genomu zgodnie z mechanizmem homologicznej rekombinacji. Uzyskanie homologicznej rekombinacji aż w 1% ludzkich fibroblastów wskazuje na możliwość wprowadzania zmian w genomowym DNA w ściśle określonym miejscu.

Wektory pochodne wirusa opryszczki

Głównym ograniczeniem są właściwości cytotoksyczne oraz krótkotrwała ekspresja transgeny. Zmodyfikowane wektory są zdolne do zakażenia tylko dzielących się komórek, co w przypadku guzów mózgu jest ich zaletą.

REGULACJA EKSPRESJI TRANSGENU

Istotną sprawą jest kontrola ekspresji wprowadzonych genów. Ekspresja transgeny może być regulowana w sposób niespecyficzny lub swoisty związany z obecnością promotorów lub wzmacniaczy (ang. *enhancerów*). Nieswoiste elementy regulacyjne (ang. *housekeeping type element*) zapewniają ekspresję w większości komórek. Regulacja ekspresji jest w takim przypadku niemożliwa, a jej wielkość zależy od liczby kopii transgeny i aktywności danego rodzaju komórek. Zastosowanie tkankowo-specyficznych promotorów pozwala na ekspresję wprowadzonego genu w docelowej tkance i zapobiega jego aktywności w innych komórkach. Użycie promotora obcego może prowadzić do konstytutywnej bądź indukowanej ekspresji transgeny. Dobrym przykładem jest promotor wrażliwy na kortykosteroidy (ang. *corticosteroid response element*). Jego zastosowanie umożliwia włączanie i wyłączanie ekspresji transgeny. Niektóre retrowirusy preferencyjnie integrują się w transkrypcyjnie aktywnej chromatynie. Mechanizm ten nie jest poznany, jednak

w takim przypadku istnieje prawdopodobieństwo uszkodzenia prawidłowo funkcjonującego genu przez transgen. Poziom ekspresji transgenu w niektórych chorobach, jak np. hemofilia, ma mniejsze znaczenie. Efekt terapeutyczny można osiągnąć przy ekspresji zapewniającej poziom kilku procent wartości prawidłowego stężenia czynnika krzepnięcia krwi.

W niektórych chorobach jednogenowych, jak np. w mukowiscydozie nasuwa się szereg dodatkowych problemów. Terapeutyczny gen należy wprowadzić do komórek nie dzielących się. Z tego względu w próbach klinicznych terapii genowej mukowiscydozy stosowane są adenowirusy i liposomy. Z uwagi na objawy różnych narządów nasuwa się pytanie, które z nich powinny być poddane terapii genowej – płuca, trzustka, wątroba, jądra. Kolejnym pytaniem jest okres, w którym należy rozpocząć terapię.

INDUKCJA ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

W wielu próbach terapii genowej istotnym problemem jest odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko białkom wektora. Odpowiedź immunologiczna może być indukowana przez komórki, do których został wprowadzony transgen. Również produkt transgenu, normalnie nie występujący w organizmie, może indukować odpowiedź immunologiczną typu humoralnego lub komórkowego.

Wyniki kliniczne

W ciągu ostatnich 9 lat przeprowadzono łącznie 311 prób klinicznych, w których wzięło udział ponad 2300 pacjentów. Podejmowane próby kliniczne terapii genowej można podzielić na 5 głównych grup. Są to choroby genetyczne jednogenowe, nowotwory, choroby zakaźne, mała grupa innych chorób oraz grupa obejmująca „znakowanie genów” (ang. *gene marking*).

Próby kliniczne terapii genowej

Rodzaj choroby	Protokoły		Chorzy	
	liczba	%	liczba	%
Choroby jednogenowe	47	15,1	238	10,2
Nowotwory	192	61,7	1427	60,9
AIDS	25	8	400	17,1
Inne choroby	7	2,3	61	2,6
Znakowanie genetyczne	40	12,9	218	9,3
Razem	311	100	2344	100

Badania kliniczne przebiegają w czterech zasadniczych fazach. Faza pierwsza obejmuje ocenę bezpieczeństwa i farmakologii stosowanych leków. W przypadku leków faza I przeprowadzana jest na zdrowych ochotnikach. Z uwagi na względy etyczne oraz środki ostrożności do fazy I badań klinicznych terapii genowej kwalifikowani są pacjenci znajdujący się w ciężkim stanie klinicznym. W przypadku leków I faza badań klinicznych obejmuje co najmniej 20–80 osób. W przypadku terapii genowej średnia dla I fazy wynosi 6 pacjentów. W fazie I celem jest wykazanie bezpieczeństwa stosowanych środków, ocena możliwości przeprowadzenia danego schematu leczenia oraz ocena akceptowalnej dawki wektorów, transdukowanych komórek.

W fazie II oceniana jest efektywność stosowanej terapii oraz ocena objawów ubocznych. Z reguły liczba pacjentów nie powinna być mniejsza niż 200. W przypadku terapii genowej średnia to 20 chorych.

III faza badań klinicznych może nastąpić po fazie II w przypadku wykazania skuteczności efektu terapeutycznego. W fazie III badania przeprowadzane są w dużej skali dla statystycznej oceny efektów leczenia zaobserwowanych w fazie II oraz porównanie nowej terapii z leczeniem standardowym. III faza terapii genowej została zatwierdzona po raz pierwszy w sierpniu 1996 roku i dotyczy wielośrodkowych badań pacjentów z myoblastoma leczonych transferem genu kinazy tymidynowej w połączeniu z gancyklovirem.

Dla terapii genowej faza IV to odległa przyszłość, która obejmuje badania po oficjalnym wprowadzeniu danego leku do lecznictwa i obejmuje monitorowanie rzadkich objawów ubocznych w populacji.

Aktualnie większość prób klinicznych znajduje się w fazie I lub w fazie I/II. Opierając się na niezbyt licznych danych literaturowych należy stwierdzić, że na ocenę skuteczności terapii genowej jest jeszcze za wcześnie. Dla chorób nowotworowych, w których najczęściej były podejmowane próby terapii genowej, wyniki skuteczności leczenia mogą być oceniane w perspektywie co najmniej 5-letniej. Ponadto, głównie ze względów etycznych, grupy chorych poddawane terapii genowej nie mają swoich grup kontrolnych z leczeniem konwencjonalnym włącznie. Obiecujące wyniki uzyskiwane w doświadczeniach na zwierzętach często wręcz kontrastują z niepowodzeniami takich samych prób terapii u ludzi. Dużo lepsza sytuacja jest w grupie chorób jednogenowych, jak np. w ADA-SCID, gdzie kilkuletnie efekty stosowania terapii genowej w wielu przypadkach są bardzo zadowalające. Terapia genowa niewątpliwie stanowi przełom koncepcyjny w medycynie, jednak na pozytywne wyniki lecznicze trzeba będzie jeszcze długo poczekać.

Dotychczasowe publikowane wyniki z I fazy terapii genowej niestety nie są zachęcające i tak przekonywujące, jak można było przypuszczać jeszcze kilka lat temu. W wielu przypadkach pomimo braku zachęcających wyników w fazie I przystępowano do fazy I/II. W przypadku mukowiscydozy pomimo istniejących 24

protokołów prób klinicznych w większości podjętych przed trzema laty żaden nie osiągnął fazy II.

Próby terapii genowej w różnych fazach badań klinicznych

Faza	Liczba zatwierdzonych protokołów	Liczba pacjentów
I	205	1127
I/II	84	811
II	21	406
III	1	0
Razem	311	2344

CHOROBY JEDNOGENOWE

Choroby jednogenowe były pierwszym celem terapii genowej z uwagi na poznaną nieprawidłowość DNA w formie braku genu lub jego mutacji. Ponadto wiele chorób jed-

nogenowych charakteryzuje się ciężkim przebiegiem klinicznym, a możliwości lecznicze, jeżeli istnieją, są bardzo ograniczone. W ciągu ostatnich kilkunastu lat dokonał się znaczący postęp w identyfikowaniu, lokalizacji i klonowaniu genów odpowiedzialnych za wiele chorób uwarunkowanych genetycznie. W chorobach jednogenowych defekt genetyczny występuje we wszystkich komórkach organizmu, jednakże korekta genu w jednej tylko tkance teoretycznie może być wystarczająca do poprawy stanu klinicznego.

W wielu chorobach jednogenowych istnieją zaburzenia w syntezie enzymów produkowanych przez wątrobę. Często występuje stosunkowo długi okres latencji ujawniania się objawów klinicznych. Przykładami mogą być niedobory takich enzymów, jak: beta-glukuronidaza, transkarbamylaza ornityny, glukocerebrozydaza. Podejmowane były próby transferu prawidłowego genu do komórek wątrobowych lub w formie przeszczepów ektopowych do ściany jelita.

Choroby jednogenowe, w których podejmowano próby terapii genowej, obejmują: ADA-SCID, niedobór alfa-1-antytrypsyny, chorobę Canavana, przewlekłą chorobę ziarniniakową, mukowiscydozę, rodzinną hypercholesterolemię, anemię Fanconiego, chorobę Gauchera, hemofilię B, zespół Huntera – mukopolisacharydoza typu II, zespół Hurlena, niedobór transkarbamylazy ornityny, niedobór nukleofosforylasy purynowej, zespół SCID sprzężony z chromosomem X.

ADA-SCID

Pierwsza pomyślna próba terapii genowej niedoboru ADA uzasadniała podejmowanie kolejnych prób w różnych ośrodkach. Tylko 25% SCID jest spowodowane brakiem ADA, który występuje z częstością 1/100 tys. urodzeń i z reguły kończy się zejściem śmiertelnym w pierwszych latach życia z uwagi na ciężko przebiegające infekcje spowodowane brakiem odporności. Tradycyjne leczenie SCID spowodo-

wanego brakiem ADA polega na podawaniu dożylnym brakującego enzymu związanego z glikolem polietylenowym (PEG). W krwioobiegu sam enzym ADA jest metabolizowany w ciągu kilku minut, natomiast związany z PEG pozostaje aktywny przez wiele dni. Po próbach z transferem genu *ADA* do limfocytów krwi [23] obwodowej podjęto próby wprowadzania genu *ADA* do komórek macierzystych CD34+ [10]. Wydawało się, że tego rodzaju przyczynowa terapia będzie rzeczywiście skuteczna.

Należy dodać, że w wielu przypadkach w trakcie przeprowadzania prób klinicznych z transferem genu *ADA* chore dzieci otrzymywały również, co prawda w zmniejszonych dawkach, sam enzym ADA związany z glikolem polietylenowym. W jednym przypadku stwierdzono ponad 50% limfocytów wytwarzających ADA. W innym przypadku wynik był 10-krotnie niższy, a po zakończeniu terapii krwi obwodowej stwierdzano tylko 0,1 do 1% limfocytów ADA+, jednak stan kliniczny był dobry. Rozpoczęto w 1993 roku próby terapii genowej u noworodków, którym podawano komórki krwi łożyskowej lub pępowinowej transdukowane *ex vivo* wektorem z *ADA*. Autorzy podają, że w dwa lata po przeprowadzonej terapii genowej podawanie PEG-*ADA* zostało znacznie obniżone. W większości przeprowadzanych prób stwierdzono brak toksyczności oraz poprawę kliniczną różnego stopnia. Okazało się, że odpowiedź pacjentów na wprowadzenie genu *ADA* była bardzo zróżnicowana. Co więcej niektóre próby kliniczne wykazały brak jakiegokolwiek poprawy.

Mukowiscydoza

Po wprowadzaniu za pomocą aerozolu wektora adenowirusowego zawierającego cDNA *CFTR* do górnych dróg oddechowych chorych z mukowiscydozą uzyskiwano jedynie przejściową transkrypcję na mRNA i produkcję białka *CFTR* [6]. Po 10 dniach nie wykrywano ekspresji genu *CFTR*. Próby terapii genowej podejmowane przez różne grupy z reguły uzyskiwały krótkotrwałe, maksymalnie kilkunastodniowe zwiększenie ekspresji *CFTR* [25]. Wydaje się, że aktualnie stosowana technologia wprowadzania genu *CFTR* nie skutkuje długotrwałą ekspresją. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość stosowania terapii genowej w mukowiscydozie oraz że stosowane metody wprowadzania wektorów są bezpieczne i nie wywołują efektów ubocznych [25]. Z tych względów można przyjąć, że faza pierwsza badań klinicznych w mukowiscydozie spełniła wymagane kryteria [19]. Pomyślność dalszych prób będzie przede wszystkim zależała od optymalizacji długotrwałej ekspresji genu *CFTR*.

Hemofilia B

W hemofilii B spowodowanej niedoborem czynnika IX terapeutyczny gen wprowadzany najczęściej do fibroblastów skóry przez transdukcję *ex vivo* retrowirusowym wektorem z cDNA dla czynnika krzepnięcia IX. Opublikowane wyniki wskazują

na podwyższenie poziomu czynnika IX we krwi utrzymujące się u pacjentów przez okres 6 miesięcy [14].

Rodzinna hypercholesterolemia

W rodzinnej hypercholesterolemii podejmowano kliniczne próby, w których dokonywano wprowadzania funkcjonalnego genu dla receptora LDL (*low density lipoprotein*) do komórek wątrobowych [8]. Obserwowano w wyniku transdukcji genu dla receptora LDL obniżony poziom cholesterolu utrzymywany przez okres półtora roku. Po transferze genu dla receptora LDL nie stwierdzano odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko transdukowanym *ex vivo* hepatocytom. Autorzy podają brak nasilania się objawów choroby wieńcowej. Jednakże na ocenę odległych korzyści zastosowanej terapii należy jeszcze poczekać.

Choroby nowotworowe

Pierwsze doświadczenia z wprowadzaniem genów markerowych (oporności na neomycynę) miały na celu określenie dalszych losów znakowanych *in vitro* limfocytów wprowadzonych z powrotem do organizmu pacjenta. Wyniki tych doświadczeń wskazujące na powrót TIL w miejsce nacieku nowotworowego uzasadniły podejmowanie dalszych prób terapii genowej nowotworów. Do TIL wprowadzono geny czynnika martwicy guza – TNF (*tumor necrosis factor*) i interleukiny 2. Terapeutyczne geny wprowadzone do TIL miały za zadanie zwiększenie swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. W celu zwiększenia immunogenności do komórek nowotworowych wprowadzono geny głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I *HLA-B7*, *HLA-A2*, *HLA-B13* [11]. Do komórek nowotworowych wprowadzono również geny supresorowe (*tumor suppressor gene*), tzw. geny samobójcy indukujące wrażliwość na wprowadzane leki (np. gancyklovir) [18, 24]. Największa grupa prób klinicznych dotyczy wprowadzania różnego rodzaju genów cytokin do limfocytów bądź komórek nowotworowych i obejmuje GM-CSF, IFN β , IFN γ , IL2, IL4, IL12 [12].

Stosowane były również geny dla dwóch lub trzech cytokin: IFN γ /IL2, IL2/GM-CSF, IL7/IL12/GM-CSF, w kombinacji z antygenem zgodności tkankowej – IL2/HLA-B7 [21] lub z genem dla receptora – IL6/sILR [15, 17]. Z genów samobójców najczęściej stosowany był gen kinazy tymidynowej. Najwięcej prób klinicznych przeprowadzano z genami dla cytokin, różnych antygenów oraz genów kinazy tymidynowej.

Szczepionki przeciwrakowe

Duża część eksperymentów terapii genowej nowotworów polega na stosowaniu tzw. szczepionek przeciwrakowych. Genetycznie zmodyfikowane komórki nowotworowe mają za zadanie wzmocnienie swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Komórki używane w szczepionkach najczęściej wykazują ekspresję antygenów nowotworowych w połączeniu z antygenami zgodności tkankowej. W wielu przypadkach genetycznie zmodyfikowane komórki nowotworowe produkują cytokiny, które mają działać stymulująco na cytotoksyczne limfocyty T. Wykazano, że cytokiny produkowane miejscowo w guzie są bardziej efektywne w potencjalizacji odpowiedzi przeciwnowotworowej w porównaniu z cytokinami podawanymi doustnie. Transfekcja genem tej samej cytokiny może w wielu przypadkach prowadzić do zwiększenia odpowiedzi immunologicznej, w niektórych zaś pozostaje bez efektów. Szczepionki z zasady używane są do profilaktyki chorób. W terapii genowej szczepionki w założeniu mają mieć działanie terapeutyczne. Część stosowanych szczepionek z komórek genetycznie zmodyfikowanych nie wykazuje większej efektywności działania niż podawanie naświetlanych komórek nowotworowych wraz z adiuwantem [2]. Ogólnie można stwierdzić, że wyniki stosowania szczepionek w terapii genowej nie są zbyt obiecujące. Z reguły odpowiedź na stosowane szczepionki w sensie zmniejszenia masy guza występuje tylko u części pacjentów, często poprawa jest tylko częściowa lub przejściowa.

Pewne nadzieje na lepszą skuteczność szczepionek wiązane są z zastosowaniem komórek dendrytycznych działających jako bardzo efektywne komórki prezentujące antygen. Komórki dendrytyczne można uzyskać ze szpiku kostnego lub z krwi obwodowej i namnożyć je w warunkach hodowli *in vitro* z udziałem czynnika GM-CSF i IL-4. Dodanie do hodowli mieszaniny peptydów rozpoznawanych na komórkach nowotworowych przez cytotoksyczne limfocyty T sprawia, że tak przygotowane komórki dendrytyczne wprowadzone z powrotem do organizmu prezentują te peptydy w warunkach *in vivo* powodując stymulację swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Dzięki immunizacji pacjentów z czerniakiem, komórkami dendrytycznymi preinkubowanymi ze swoistymi peptydami albo z lizatem komórek nowotworowych uzyskano znaczną poprawę u 5 z 16 chorych [16]. Obiecujące wyniki uzyskano również szczepiąc chorych z czerniakiem swoistymi dla tego nowotworu syntetycznymi peptydami wiążącymi się selektywnie z cząsteczkami HLA-A2. Wyraźną poprawę stanu klinicznego uzyskano u 13 z 31 pacjentów otrzymujących wymienioną szczepionkę wraz z interleukiną 2 [20].

AIDS

Z chorób zakaźnych jedynie w AIDS są podejmowane próby terapii genowej. Pomimo że AIDS nie spełnia wszystkich formalnych kryteriów do przeprowadzania testów klinicznych, to jednak kilkanaście protokołów zostało zatwierdzonych i kilkadziesiąt chorych aktualnie poddawanych jest testom klinicznym [9]. W AIDS szereg genów mających na celu zahamowanie rozszerzania się infekcji było wprowadzanych do limfocytów krwi obwodowej. Transgeny stosowane w AIDS obejmują antysensowne oligonukleotydy, rybozomy, geny toksyn, tzw. pułapki RNA (ang. *decoy RNA*) oraz geny kodujące przeciwciała. W przeprowadzonych próbach klinicznych stwierdzano brak toksyczności stosowanych transgenów. Na ocenę efektów terapeutycznych jest jeszcze za wcześnie.

Inne choroby

Z innych chorób, w których podjęto kliniczne próby terapii genowej, należy wymienić adrenoleukodystrofię – schorzenie demielinizacyjne centralnego układu nerwowego z ciężkimi objawami klinicznymi, stwardnienie boczne, amyotroficzne, chorobę wieńcową, restenozę naczyń wieńcowych, reumatoidalne zapalenie stawów i choroby naczyń obwodowych.

Próby terapii genowej obejmowały nowotwory centralnego układu nerwowego, przewodu pokarmowego wraz z przerzutami wątroby, układu moczowego, krwiotwórczego, skóry, głowy i szyi, płuc, piersi, jajnika, szyjki macicy, raki komórek germinalnych oraz mięsaki.

Hybrydowe oligonukleotydy RNA/DNA

Precyzyjna korekta mutacji genu stanowi podstawowy cel terapii genowej. Zastąpienie sekwencji zmutowanej prawidłową przez homologiczną rekombinację wydawało się najbardziej obiecującym podejściem. Niestety homologiczna rekombinacja jest procesem niezwykle mało wydajnym, toteż jak dotąd nie znalazła praktycznego zastosowania w terapii genowej. Ostatnio Cole-Strauss i wsp. [5] przedstawili wyniki wskazujące na korektę punktowej mutacji odpowiedzialnej za anemię sierpowatą przez wykorzystanie hybrydowych oligonukleotydów RNA/DNA. Pierwotnie ta sama grupa autorów przedstawiła wyniki wskazujące na korektę zmutowanego genu w episomalnym DNA stosując technologię hybrydów RNA/DNA. Istota tej nowej strategii opiera się na stwierdzeniu wysokiej aktywności hybrydowej cząsteczki RNA/DNA do wiązania się z homologicznymi sekwencjami *in vitro*. Konstrukcja hybrydowej cząsteczki sprawia, że jest ona chemicznie i termicznie stabilna oraz oporna na działanie RNA-az i DNA-az. Sekwencja RNA/DNA jest komplementarna do sekwencji zmutowanego genu z wyjątkiem pojedynczego nukleotydu. Anemia sierpowata występuje u homozygot z punktową mutacją w

genie beta globiny. W allelu β^S zmiana A na T w 6 kodonie beta globiny powoduje zmianę w łańcuchu globiny kwasu glutaminowego na walinę. Korekta allelu β^S na prawidłowy β^A przez mechanizm konwersji genu mogłaby stanowić przyczynowy sposób leczenia anemii sierpowatej. Utworzona hybrydowa cząsteczka RNA/DNA zawierająca sekwencje prawidłowego allelu β^A została wprowadzona w liposomach do komórek linii limfoblastoidalnej homozygotycznych dla allelu β^S . Po wprowadzeniu hybrydowej molekuly stwierdzono zmianę zmutowanego allelu na prawidłowy. Co więcej nie stwierdzono zmiany w genie delta globiny niewiele różniącego się od genu beta globiny. Wyniki te wskazują na istnienie możliwości precyzyjnej korekty mutacji punktowej. Podobne badania zostały wykonane przez Krena i wsp. [13], którzy wywołali punktową mutację w genie czynnika krzepnięcia IX u szczura przez ukierunkowaną mutagenezę. Zastosowano hybrydową cząsteczkę RNA/DNA homologiczną do sekwencji genu czynnika IX krzepnięcia z wyjątkiem jednego nukleotydu. Punktową zmianę genu czynnika IX uzyskano zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Stwierdzono wysoką wydajność ukierunkowanej mutagenезy – w 40% kopii genów doszło do konwersji pojedynczego nukleotydu. Nastąpiła zmiana kodonu dla argininy (CGT) na kodon dla seryny (AGT). Wprowadzona mutacja spowodowała obniżenie o 50% aktywności czynnika krzepnięcia. Tak duża wydajność pozwala przypuszczać, że technologia ukierunkowanej mutagenезy, a właściwie korekty genu, przy użyciu hybrydowych cząsteczek RNA/DNA może okazać się przełomem w terapii genowej chorób jednogenowych. Badania te dowiodły, że zarówno hepatocyty *in vitro*, jak i cała wątroba w warunkach *in vivo* może być celem hybrydowej cząsteczki RNA/DNA. Podając dożylnie hybrydową cząsteczkę związaną z ligandem dla receptora asjaloglikoproteinowego uzyskano zmianę genu w komórkach wątrobowych. Wykazano dawkozależność całego procesu oraz zmianę genu w komórkach spoczynkowych i proliferujących. Dane te wskazują na możliwość przyczynowego leczenia jednogenowych chorób dotyczących zaburzeń enzymów produkowanych przez komórki wątrobowe. Opisana strategia nie wymaga stosowania wektora wirusowego. Wydaje się, że technologia ukierunkowania korekty (mutagenезy) z udziałem hybrydowych cząsteczek RNA/DNA będzie znajdować coraz szersze praktyczne zastosowanie w podejmowanych próbach klinicznych terapii genowej chorób jednogenowych.

Jakkolwiek większość prób terapii genowej zakończyła się niepowodzeniem w sensie terapeutycznym, to jednak przeprowadzone próby kliniczne wskazują na techniczne możliwości dalszego prowadzenia terapii przy pomocy różnych wektorów. Zakończone doświadczenia kliniczne w fazie I wykazały, że różne strategie terapii genowej nie są w większości przypadków toksyczne. Niewątpliwie istnieje duży rozdźwięk między oczekiwaniami często zdesperowanych chorych a wynikami klinicznymi. Czas potrzebny do oceny wyników klinicznych musi być co najmniej kilkuletni. Obecnie publikowane wyniki badań klinicznych najczęściej zawężają okres obserwacji do kilku lub kilkunastu miesięcy. Często częściowa poprawa

u chorych nowotworowych jest tylko rodzajem remisji przed ponownym nasileniem się objawów. Stosowane aktualnie technologie wprowadzania terapeutycznych genów do komórek z pewnością zostaną wyparte przez nowe podejścia metodyczne. Pozytywnym przykładem jest technologia hybrydowych cząsteczek RNA/DNA w powiązaniu z ligandami, dla których występują receptory na powierzchni komórek docelowych. Wydaje się, że po okresie swoistej euforii nadszedł obecnie czas na zintensyfikowanie badań podstawowych, które powinny przyczynić się do dalszego znaczącego postępu terapii genowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BELLON G, MICHEL-CALEMARD L, THOUVENOT D, JAGNEAUX V, POITEVIN G, MALCUS C, ACCART M, LAYANI MP, AYMARD M, BERNON H, BIENVENU J, COURTNEY M, DORING G, GILLY B, GILLY R, LAMY D, LEVREY H, MOREL Y, PAULIN C, PERRAUD F, RODILLON L, SENE C, SO S, TOURAINE-MOULIN F, SCHATZ D, PAVIRANI A. Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum Gen Ther* 1997; **8**: 15–25.
- [2] BLANKENSTEIN T, QIN Z. Cancer vaccines in gene therapy. *Gene Therapy* 1996; **3**: 95–96.
- [3] BLEASE RM, CULVER KW, MILLER AD, CARTER CS, FLEISHER T, CLERICI M, SHEARER G, CHANG L, CHIANG W, TOLSTSHEV P, GREENBLATT JJ, ROSENGERG SA, KLEIN H, BERGER M, MULLEN CA, RAMSEY WJ, MUUL L, MORGAN RA, ANDERSON WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995, **270**: 475–480.
- [4] CARRASCO CH, FERSON D. Retrovirus-mediated wild type p53 gene transfer to tumours of patients with lung cancer. *Nature Med* 1996; **2**: 985–991.
- [5] COLE-STRAUSS A, YOON K, XIANG Y, BYRNE BC, RICE MC, GRYN J, HOLLOMAN WK, KMIEC EB. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 1996; **273**, **6**: 1386–1388.
- [6] CRYSTAL R, MCELVANEY M, ROSENFELD M, CHU C, MASTRANGELI A, HAY J, BRODY S, JAFFE H, EISSA N, DANIEL C. Administration of an Adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nature Genet* 1994; **8**: 42–50.
- [7] CULVER K, ANDERSON F, BLEASE R. Lymphocyte gene therapy. *Hum Gene Ther* 1991; **2**: 107–109.
- [8] GROSSMANN M, RAPER S, KOZARSKY K, STEIN E, ENGELHARDT J, MULLER D, LUPIEN P, WILSON J. Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nature Genet* 1994; **6**: 335–341.
- [9] HAUBRICH R, McCUTCHAN JA. Sponsor: Viagen Inc. An open-label, phase I/II clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (V) (HIV-1 IIIIB env/rev retroviral vector) in HIV-1-infected subjects. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 941–955.
- [10] HOOGERBRUGGE PM, VALERIO D, LEVINSKY RJ, HARVEY M, MOSELEY A, SKEOCH CH, FAIRBANKS LD, GASPAR B, MORGAN G, PERIGNON JL, LE DEIST F, DEBREE M, FISCHER A, VAN BEUSECHEM VW. Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther* 1996; **3**: 179–183.

- [11] HUI KM, ANG PT, TAY SK. Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Ther* 1997; **4**: 783–90.
- [12] JANTSCHIEFF P, BONGARTZ G, DIETRICH PY, SCHATZ C, MEHTALIM, COURTNEY M, HERMANN R, ROCHLITZ C. Phase I study of cytokine-transfected xenogeneic cells (Vero-IL2) in patients with metastatic solid tumors. *J Mol Med* 1997; **75** (5): B31 (98).
- [13] KREN BT, BANDYOPADHYAY P, STEER CJ. *In vivo* site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Med* 1998; **4**, **3**: 285–290.
- [14] LU DR, ZHOU JM, ZHENG B, QIU XF, XUE JL, WANG JM, MENG PL, HAN FL, MING BH, WANG XP. Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B. *Sci China B (China)* 1993; **36** (11): 1342–1351.
- [15] MACKIEWICZ A, GÓRNY A, ŁACIAK M, MALICKI J, MURAWA P, NOWAK J, WIZNEROWICZ RG, HAWLEY PC, HEINRICH SR-J. Gene therapy of human melanoma. Immunization of patients with autologous tumor cells admixed with allogeneic melanoma cells secreting interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *Human Gene Therapy* 1995, **6**: 805–811.
- [16] NESTLE FO, ALIJAGIC S, GILLIET M, SUN Y, GRABBE S, DUMMER R, BURG G, SCHADENDORF D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1998; **4**, **3**: 328–
- [17] NOWAK J, JANUSZKIEWICZ D, MAZUREK J, ZACHIK M, MALICKI J, MURAWA P, WIZNEROWICZ M, HEINRICH SR-J, MACKIEWICZ A. Gene therapy of human melanoma – from animal experiments to the clinical trial. (w:) *Interdisciplinary approaches to gene therapy: legal, ethical and scientific aspects*, ed. by S. Muller, J.W. Simon, J.W. Vesting, Springer Verlag Heidelberg; 1997, 27–39.
- [18] OLDFIELD EH, RAM Z, CHIANG Y, BLAESE RM. Intrathecal gene therapy for the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. GTI 0108. A phase I/II study. *Hum Gene Ther* 1995; **6**; 55–85.
- [19] PORTEOUS DJ, DORIN JR, MCLACHLAN G, DAVIDSON-SMITH H, DAVIDSON H, STEVENSON BJ, CARTHERS AD, WALLACE WAH, MORALEE S, HOENES C, KALLMEYER G, MICHAELIS U, NAUJOKS K, HOLP, SAMWAYS JM, IMRIE M, GREENING AP, INNES JA. Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 1997; **4**: 210–218.
- [20] ROSENBERG SA, YANG JC, SCHWARTZENTRUBER DJ, HWU P, MARINCOLA FM, TOPALIAN SL, RESTIFO NP, DUDLEY ME, SCHWARZ SL, SPIESS PJ, WUNDERLICH JR, PARKHURST MR, KAWAKAMI Y, SEIPP CA, EINHORN JH, WHITE DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Med* 1998; **4**, **3**: 321–
- [21] RUBIN J, CHARBONEAU JW, READING C, KOVACH JS. Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer. *Hum Gene Ther* 1994, **5**: 1385–1399.
- [22] RUSSELL D, HIRATE RK. Human gene targeting by viral vectors. *Nature Genetics* 1998, **18**: 225–228.
- [23] SAKIYAMA Y. Clinical study of gene therapy for ADA deficiency. *Arerugi* 1996; **45**: 621–626.
- [24] WEBER F, BOJAR H, PRESACK HB, FLOETH F, LENARTZ D, KIWI T, BOCK W. Gene therapy of glioblastoma – one year clinical experience with ten patients. *J Mol Med* 1997; **75** (5): B40 (126).
- [25] ZABNER J, COUTURE L, GREGORY R, GRAHAM S, SMITH A, WELSH M. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 1993; **75**: 207–216.

STRATEGIE POSZUKIWANIA NOWYCH GENÓW NA PRZYKŁADZIE GENÓW *RalGDS*, *XPMC2H* I *TSC1* CZŁOWIEKA

STRATEGIES OF IDENTIFICATION OF NEW GENES
BASED ON HUMAN *RalGDS*, *XPMC2H* AND *TSC1* GENES

Jolanta KWIATKOWSKA¹, David Joseph KWIATKOWSKI²,
Ryszard SŁOMSKI^{1,3}

¹Zakład Genetyki Człowieka, PAN, Poznań; ²Division of Experimental Medicine, Brigham and Womens Hospital, Boston; ³Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im A. Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: W pracy przedstawiono nowe rozwiązania metodyczne stosowane do poszukiwania nowych genów. Ponieważ tylko nieznaczna część genomu ssaków (u człowieka około 3%) stanowią sekwencje kodujące, w ostatnich latach zostały opracowane metody służące do wyszukiwania sekwencji ulegających transkrypcji. W zależności od danych, jakimi dysponuje się o badanym regionie, wybiera się różne strategie. Niektóre z opisanych metod zostały przez autorów zastosowane do wykrycia i scharakteryzowania genów *RalGDS*, *XPMC2H*, *TSC1* locus 9q34 człowieka.

Słowa kluczowe: analiza sprzężeń, mapy fizyczne, sekwencje kodujące, identyfikacja genu, klonowanie genów, struktura genów, wektory, sztuczne chromosomy.

Summary: A wide variety of physical mapping strategies have been used to analyse eukaryotic genomes. Since mammalian DNA has only a small percentage of coding DNA sequences (approximately 3% in the case of the human genome) different methods have been developed for selective analysis of transcribed sequences. Methods presented in this paper were used by authors in identification and characteristics of *RalGDS*, *XPMC2H* and *TSC1* genes.

Key words: linkage analysis, physical mapping, coding sequences, gene identification, gene cloning, gene structure, vectors, artificial chromosomes.

Poznanie molekularnego podłoża chorób genetycznych, jak również ustalenie położenia genów odpowiedzialnych za występowanie chorób i odniesienie ich do genomów zwierząt modelowych wymaga stosowania metod prowadzących do określenia sekwencji kodujących w poszczególnych chromosomach. W ostatnich latach opisano kilka nowych technik, które można wykorzystać do identyfikacji i izolacji genów warunkujących choroby genetyczne, jak również do opracowania organizacji struktury chromosomu. Wszystkie metody mają zalety i wady, dlatego bardzo często obranie określonej strategii zależy od danych, jakimi się dysponuje na temat analizowanego regionu. Efektywne techniki identyfikacji genów odgrywają ważną rolę w projekcie sekwencjonowania ludzkiego genomu, przy opracowaniu dokładnych map transkrypcyjnych dużych regionów genomów różnych organizmów.

Historia analizy sekwencji DNA różnych organizmów związana jest z rozwojem technologii rekombinacji DNA, która rozpoczęła się na początku lat siedemdziesiątych, kiedy odkryto, że ligaza DNA może łączyć dwie nici DNA, jeśli pojedynczoniowe końce łączonych DNA są komplementarne. Pionierskie doświadczenie polegało na przyłączeniu poli(dA) do jednej nici, a do drugiej poli(dT) za pomocą terminalnej transferazy, a następnie połączenie ich razem przy użyciu ligazy [1,2]. Następnie wykonano doświadczenie, w którym wykazano, że ligaza może łączyć dwie cząsteczki DNA o tzw. „tępych końcach”. Również w tym samym czasie zostały wykryte i wyizolowane pierwsze enzymy restrykcyjne, które umożliwiły fragmentację (hydrolizę), a następnie łączenie DNA różnego pochodzenia w dowolnej kombinacji. Dalszym ważnym osiągnięciem było opracowanie metody wprowadzania DNA do bakterii przez traktowanie ich jonami wapnia, powodującymi lokalną przepuszczalność w ścianie bakterii, co umożliwiło przenikanie obcego DNA do wnętrza komórki. Kolejnym, bardzo istotnym krokiem w inżynierii DNA było przygotowanie wektorów, za pomocą których wprowadzano zrekombinowane cząsteczki DNA do komórek bakteryjnych, gdzie ulegały intensywnemu namnażaniu (klonowaniu). Również od początku lat siedemdziesiątych datuje się rozwój technik elektroforetycznych umożliwiających frakcjonowanie fragmentów DNA o różnych wielkościach powstałych w wyniku działania nukleazami restrykcyjnymi. Kolejne lata zaowocowały skonstruowaniem nowych wektorów umożliwiających klonowanie dużych fragmentów DNA. Należą do nich plazmidy, kosmidy, fagi λ , fagi P1, sztuczne chromosomy drożdży (YAC) i sztuczne chromosomy bakterii (BAC). Poszczególne wektory różnią się między innymi pojemnością – wielkością insertu, który może być do nich włączony bez uszkodzenia ich funkcji.

W ostatnich latach opisano wiele szczepów fagów λ , które znalazły praktyczne zastosowanie. Różnią się one występowaniem miejsc restrykcyjnych, stosowanych do klonowania. Pomimo że wielkość insertu wklonowanego do faga λ jest ograniczona tylko do 10–25 tys. pz, co wynika z obniżenia żywotności faga, gdy wielkość całkowita jest mniejsza niż 78% lub większa niż 105% cząstki faga typu dzikiego, to jednak cieszą się one nadal dużym powodzeniem, ponieważ inserty są bardziej

stabilne niż w innych wektorach, a ponadto metody izolacji tych wektorów należą do łatwych i szybkich. W klonowaniu długich fragmentów DNA (ponad 10 tys. pz) problemem jest stosunkowo niska wydajność transformacji, przy zastosowaniu tradycyjnych metod. Obecnie bardzo często stosuje się elektroporację, bardzo efektywną metodę wprowadzania DNA do komórek gospodarza, umieszczonych w polu elektrycznym. Pod koniec lat siedemdziesiątych do klonowania DNA zostały wprowadzone pierwsze kosmidy. Są to hybrydy wektorów plazmidowych i bakteriofagowych dostarczających korzystnych cech obydwu systemów. Część plazmidowa zawiera informację o replikacji, markery selekcyjne i miejsca klonowania, a część fagowa informację o upakowaniu główek faga. Niezbędny jest jedynie krótki region (kilkaset pz) zawierający miejsce cos λ czy kohezyjne końce – miejsca sekwencji służące do wprowadzania DNA do komórki gospodarza. Wielkość insertu, jaki może być wklonowany do kosmidu, wynosi od 37–50 tys. pz i zależy od wielkości samego kosmidu. Na przykład kosmid pHC79 ma wielkość 6 tys. pz, a wielkość wklonowanego insertu może dochodzić do 40 tys. pz. Trwają poszukiwania nowych wektorów, takich jakie będą umożliwiały wklonowanie insertów o wielkości przekraczającej kilka milionów pz. W ten sposób możliwe będzie przeniesienie do skali wielkości obowiązujących w cytogenetyce, gdyż klonowaniem obejmie się region około 1 centymorgana (częstość rekombinacji 1%). Także klonowanie niektórych genów o dużych rozmiarach, np. genu *DMD* o wielkości 2,5 miliona pz, nastęrczyć może trudności w wyborze wektora.

Wektorem pośrednim pomiędzy kosmidami a sztucznym chromosomem drożdży są wektory P1 oparte na bakteriofagu P1, dla których wielkość wklonowanego insertu może dochodzić do 75–95 tys. pz. Pierwszy system replikacyjny tego wektora, pochodzenia plazmidowego, warunkuje utrzymanie się jednej kopii wektora na chromosom gospodarza, a drugi, pochodzenia litycznego warunkuje zwiększenie liczby kopii po indukcji do 20 na jedną komórkę. Rewolucją w opracowaniu map genetycznych było wprowadzenie sztucznego chromosomu drożdży (YAC), który zawiera dwie sekwencje telomerowe drożdży, centromer drożdży, region odpowiedzialny za autonomiczną replikację DNA (ARS) oraz odpowiedni marker selekcyjny. Wielkość klonowanego fragmentu może dochodzić do 200–500 tys. pz, a nawet do miliona par zasad. Jednak cechą negatywną tych wektorów jest to, że bardzo często dochodzi w nich do utraty części insertu lub do przestawień w wyniku rekombinacji. Ujemną stroną jest też niska wydajność transformacji. Bardzo wysoką wydajnością transformacji i stabilnością charakteryzują się sztuczne chromosomy bakteryjne (BAC), do których można wklonować insert do 300 tys. pz.

Rozwój technik molekularnych i wykrycie „narzędzi”, takich jak np.: enzymy restrykcyjne czy wektory, umożliwią opracowywanie map fizycznych, wykrywanie i klonowanie genów, sekwencjonowanie całych genomów. W zasadzie wyróżnia się dwa rodzaje map: mapy o niskiej rozdzielczości do kilku milionów pz i mapy o wysokiej rozdzielczości obejmujące fragmenty DNA od kilku tysięcy pz do po-

jedynczych nukleotydów. Przygotowanie takiej mapy jest poprzedzone przygotowaniem biblioteki DNA. W zależności od tego, czy poszukiwany jest określony gen, którego locus zostało wykryte na podstawie analizy sprzężeń wykonywanych dla rodzin z defektem tego genu, czy też celem jest poznanie sekwencji całego lub części genomu, strategia badań jest nieco odmienna. Jednak zawsze takie badania rozpoczynają się przygotowaniem mapy restrykcyjnej genomowego DNA lub całych chromosomów uzyskanych metodą cytometrii przepływowej, czy też dużych fragmentów DNA wklonowanych w wektory YAC czy kosmidy. W badaniu stosuje się enzymy restrykcyjne należące do grupy enzymów rzadko tnących, rozpoznających sekwencje 6–8 pz, w obrębie której występują jedna lub więcej par CpG i w wyniku hydrolizy generowane są u wszystkich kręgowców fragmenty DNA wielkości kilkuset tysięcy pz. Takie fragmenty mogą być rozdzielane jedynie elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). DNA nie może być izolowany metodami konwencjonalnymi, ponieważ część DNA zawsze ulega mechanicznemu uszkodzeniu. Do tego typu analizy pobierane są całe komórki, np. limfocyty, które mieszane są z rozpuszczoną agarozą, a następnie zastygają w agarozie w postaci bloczków agarozowych. Bloczki poddane są działaniu enzymów hydrolitycznych, które trawią białkowe składniki komórki, a następnie działaniu rzadko tnących enzymów restrykcyjnych. DNA z bloczków umieszczonych w żelu agarozowym migruje w zmiennym polu elektrycznym, pulsacyjnym, co znacznie zwiększa rozdzielczość. Kolejnym etapem jest przygotowanie serii klonów DNA z badanego regionu, których końce będą zachodziły na siebie. W tym celu DNA jest poddany częściowemu trawieniu enzymami restrykcyjnymi, a uzyskane po trawieniu fragmenty są wklonowane w wektory. Klony powinny pokrywać cały analizowany region, a ich końce powinny zachodzić na końce innych klonów. W następnym etapie sprawdza się organizację tych klonów, tzn. ich położenie względem siebie przez hybrydyzację jednego klonu z genomowym DNA z resztą klonów. Również jako sondy wykorzystuje się tylko końce insertów z klonów wcześniej wykrytych, w celu detekcji nowych klonów, w których poza wspólną sekwencją z końca insertu wykryta zostanie nowa sekwencja. Ta metoda nosi nazwę „spaceru po chromosomie”. Taka strategia może być wykonana dla genomowego DNA, dla DNA z biblioteki chromosomów, czy też zadanie będzie znacznie uproszczone, jeśli duży fragment genomowego DNA będzie w wektorze YAC czy kosmidzie.

Następnym krokiem jest przygotowanie mapy transkryptów i identyfikacja genów w sklonowanym DNA. Powszechnie stosowanymi metodami w identyfikacji genów są: „zoologiczny” *blot*, identyfikacja wysp CpG, hybrydyzacja klonów z genomowym DNA do blotów typu *Northern* lub do biblioteki cDNA, „wychwytywanie” eksonów (ang. *exon trapping*), selekcja cDNA oraz komputerowa analiza sekwencji DNA.

Zoologiczny blot jest rodzajem blotu Southerna, zawierającym DNA pochodzący od różnych gatunków zwierząt. Klon genomowego DNA użyty jako sonda molekularna, dający pozytywny sygnał w hybrydyzacji jest klonem zawierającym wy-

soko konserwatywną w rozwoju ewolucyjnym sekwencję kodującą – gen. Sekwencja takiego klonu jest odczytywana, a następnie przeznaczana do dalszej analizy komputerowej.

W identyfikacji genów wykorzystywane jest zjawisko, że na końcu 5' genów wielu kręgowców występują „wyspy” metylowanych sekwencji CpG długości ok. 1 tysiąca pz. U człowieka 56% genów [3] poprzedzonych jest taką sekwencją i należą tu wszystkie geny warunkujące funkcje życiowe komórki (ang. *housekeeping gene*), geny ulegające ekspresji w wielu tkankach, jak również liczna grupa genów (40%) ulegających tkankowo specyficznej ekspresji [4]. Wyspy CpG są rozpoznawane przez rzadko tnące enzymy restrykcyjne, np.: SacII czy EagI, które hydrolizują DNA częściej w obrębie wysp niż poza nimi. Tak więc częsta hydroliza genomowego DNA, która może być zidentyfikowana w hybrydyzacji, jest wskaźnikiem występowania sekwencji CpG, a więc genów.

W innej z kolei metodzie klonu genomowego DNA wykorzystuje się jako sondy do hybrydyzacji z mRNA lub całkowitym RNA (*Northern blot*) pochodzącym z różnych tkanek. Pozytywne sygnały są dowodem występowania w insercie sekwencji kodującej. Sondę stanowić może nawet fragment wielkości 40 tys. pz umieszczony w kosmidzie, jednak w takim przypadku należy spodziewać się bardzo słabego sygnału spowodowanego niską ekspresją genu, jak również wielkością eksonów (średnio 150–200pz).

Obecnie bardzo często stosowaną metodą identyfikacji genów jest „wychwytywanie” eksonów (ang. *exon trapping*). Genomowy DNA z kosmidów przeklonowuje się do wektora ekspresyjnego, a następnie tymi klonami transfekuje się linie komórek eukariotycznych, gdzie insert DNA ulega transkrypcji mRNA. Church [5] użył wektor pSPL3 zawierający sztuczny minigen złożony z fragmentu genomu wirusa SV40 z miejscem replikacji i sekwencją promotora, dwa eksony oddzielone intronem z wieloma miejscami do klonowania oraz miejsce poliadenylacji wirusa SV40. Przeklonowany z kosmidu do plazmidu genomowy DNA transfekowany jest do komórek Cos. Po transkrypcji przy udziale promotora wirusa SV40 z transkryptu usuwane są introny. Po izolacji RNA z komórek Cos, wykonuje się syntezę cDNA, a następnie PCR ze starterami komplementarnymi do eksonów wektora. Produkty PCR są wklonowane do plazmidów i sekwencjonowane. W ten sposób można odczytać sekwencje wielu eksonów.

Metoda określana mianem selekcji cDNA polega na formowaniu heterodupleksów typu: genomowy DNA-cDNA w wyniku hybrydyzacji genomowego DNA w określonym wektorze np.: YAC z mieszaniną cDNA z biblioteki cDNA [6]. W tej reakcji ostatnio wykorzystuje się biotyne i streptawidynę. Klon genomowego DNA poddany jest hydrolizie enzymem restrykcyjnym, a następnie do końców powstałych fragmentów przyłączone zostają krótkie oligomery, których sekwencja jest wykorzystana do przygotowania starterów, znakowanych biotyną i wykonywana jest reakcja amplifikacji. Również inserty cDNA są poddane reakcji PCR ze starterami

specyficznymi dla wektora. Produkty PCR z obydwu reakcji PCR poddaje się hybrydyzacji, po której heterodupleksy z jedną nicią genomowego DNA z biotyną i z drugą komplementarną z cDNA łączą się ze streptawidyną i są wychwytywane przez ziarna magnetyczne. Po wypłukaniu z kompleksu biotyna-streptawidyna wykonuje się ponownie PCR przy użyciu starterów specyficznych dla wektora cDNA i te produkty wykorzystuje się w kolejnych cyklach hybrydyzacji, aż do uzyskania specyficznych cDNA.

Końcowe postępowanie to komputerowa analiza sekwencji DNA. Warunkiem jest znajomość sekwencji nukleotydów klonów genomowego DNA. Takie zadanie jest obecnie ułatwione przez wprowadzenie na rynek automatycznych sekwencjonatorów. Poznana sekwencja może być porównana poprzez Internet z danymi z Banku Genów. Główne informacje o sekwencji DNA i białek znajdują się w USA w Narodowym Centrum Informacji Biotechnologii, w Wielkiej Brytanii w Europejskim Instytucie Bioinformatyki i w Japonii w Narodowym Instytucie Genetyki. Wiele danych dotyczących klonów z sekwencją cDNA jest przechowywane w bazach dbEST (ang. *expressed sequence tag*). Inne główne bazy obejmują również:

GDB – główne dane o mapowaniu genomu człowieka,

OMIM – listę znanych chorób dziedzicznych opracowanych przez McKusika,

MGD – dane o genomie myszy,

CHLC – dane o genotypach, markerach, analizie sprzężeń koordynowane przez Uniwersytet stanu Iowa,

CEPH – mapy fizyczne genomu człowieka oparte na dostępnych wektorach YAC opracowane w laboratorium CEPH w Paryżu oraz dane map fizycznych genomu człowieka z wektorów YAC opracowane w Instytucie Whitehead w Massachusetts.

Poza szukaniem danych w centrach informatycznych istnieje również możliwość identyfikacji granicy eksonów i intronów zsekwencjonowanych klonów z genomowym DNA przy udziale programu komputerowego GRAIL2 [7], wykorzystującego istnienie konserwatywnych sekwencji w miejscach łączenia eksonów z intronami oraz miejscach biorących udział w składaniu RNA (ang. *splice branch*).

Poszukiwania genu kodującego stwardnienie guzowate (TSC, ang. *Tuberous sclerosis*) zainicjowano ponad 10 lat temu i wkrótce badania zaowocowały identyfikacją prawdopodobnego locus na chromosomie 9q34. Dalsze badania wykazały, że wśród dużych rodzin z chorymi na TSC występują także takie, u których nie stwierdza się sprzężenia z chromosomem 9, natomiast wykazują one sprzężenie z chromosomem 16. Obecnie wiadomo, że za wystąpienie stwardnienia guzowatego odpowiedzialne są dwa geny *TSC1* w regionie 9q34 i *TSC2* w regionie 16p13. Gen *TSC2* z regionu 16p13 został wykryty w 1993 r. przez Europejskie Konsorcjum Stwardnienia Guzowatego [8] przy użyciu strategii pozycyjnego klonowania. Pomimo że dużo wcześniej zostało wykryte sprzężenie *TSC1* z chromosomem 9, to jednak ustalenie locus dla tego genu okazało się znacznie trudniejsze niż w

przypadku *TSC2* i to z kilku powodów. Do niepoprawnych wniosków przyczyniły się wyniki analizy sprzężeń, wykonywane dla rodzin ze stwardnieniem guzowatym w kilku ośrodkach naukowych intensywnie zajmujących się tym zagadnieniem, ponieważ występowała rekombinacja w mejozie. Ponadto w obrębie regionu 9q34 nie zaobserwowano żadnych dużych zmian, np. translokacji, które ułatwiłyby poszukiwanie genu. Badany region również okazał się niestabilny w klonowaniu, co spowodowało, że poszukiwanie zawartych w nim genów okazało się wyjątkowo trudne. Ponadto region 9q34 okazał się regionem, w którym występuje liczna grupa genów, a każdy z nich mógł okazać się genem *TSC1*. W celu dokładnego zmapowania i sklonowania genów z regionu 9q32-q34 została zainicjowana mapa fizyczna dla tego regionu, ponieważ wiele chorób m.in. stwardnienie guzowate mogło być warunkowane występującymi tam genami. Analiza sprzężeń wykazała, że gen *TSC1* leży w sąsiedztwie następujących genów: odpowiedzialnego za grupy krwi (*ABO*), genu kinazy adenylowej (*AK1*), genu onkogenu Abelsona (*ABL*) i wielu innych polimorfizmów z regionu 9q34 [9,10,11]. Henske i wsp. [12] w 1993 r. zidentyfikowali prawie wszystkie markery sekwencji powtórzonych typu dwunukleotydwów ($(GT)_n$) i trójnukleotydwów ($(AAT)_n$). W regionie wielkości ok. 1,2 miliona pz, pomiędzy locus D9S149 a D9S114 występuje 15 markerów STR (ang. *short tandem repeats* – krótkie tandemowe powtórzenia DNA), charakteryzujących się heterozygotycznością powyżej 70%. Autorzy opisali dwa miejsca tzw. *hot spots* dla rekombinacji między markerami S1199-S1198 i S1743-S114. Harris i wsp. [13] w 1993 r. ponownie przystąpili do charakterystyki tego regionu stosując dwie metody: elektroforezę w zmiennym polu elektrycznym (PFGE) i hybrydyzację punktową do chromosomów izolowanych z linii komórkowych, które charakteryzowały się zrównoważoną translokacją w regionie 9q11-q34. Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym pozwoliła wyodrębnić pięć grup markerów, a ich położenie i orientacja zostały ustalone bezpośrednio w hybrydyzacji genomowych sond z regionu 9q32-q34, sprzężonych z locus *TSC1* do filtrów, na których znajdowały się chromosomy z translokacjami. W 1994 r. Povey i wsp. [14] wykazali, że gen *TSC1* leży w regionie około 4 cM, pomiędzy loci D9S149 i D9S114. Analiza sprzężeń w obrębie tego regionu dawała sporne wyniki co do rzeczywistego położenia genu *TSC1*. Rekombinacje, jakie zaobserwowano w rodzinach ze stwardnieniem guzowatym, nasuwały wnioski, że gen leży dystalnie do markerów DBH [15] i D9S122 [16]. Jednak analiza sprzężeń wykonywana w rodzinach z *TSC1* przez innych badaczy wykazała proksymalne położenie genu *TSC1* w stosunku do markera DBH [17]. Z powodu tych niejasności Hornigold i wsp. [18] zastosowali metodę *fingerprinting* i hybrydyzacji dla klonów kosmidów wyizolowanych ze specjalnej biblioteki dla chromosomu 9, przygotowanej przez de Jonga w Narodowym Laboratorium Lawrence Livermore w Livermore, USA i uzyskali mapę zachodzących na siebie klonów z regionu D9S149-D9S114 wielkości 1,7 Mpz z jedną tylko przerwą wynoszącą około 20 kpz. W ten sposób zlokalizowali 12 wcześniej wykrytych genów, jak

również potwierdzili położenie 17 markerów genetycznych. W dalszym etapie kłony zostały użyte do izolacji genów z tego regionu, do analizy transkrypcji lub bezpośrednio do sekwencjonowania.

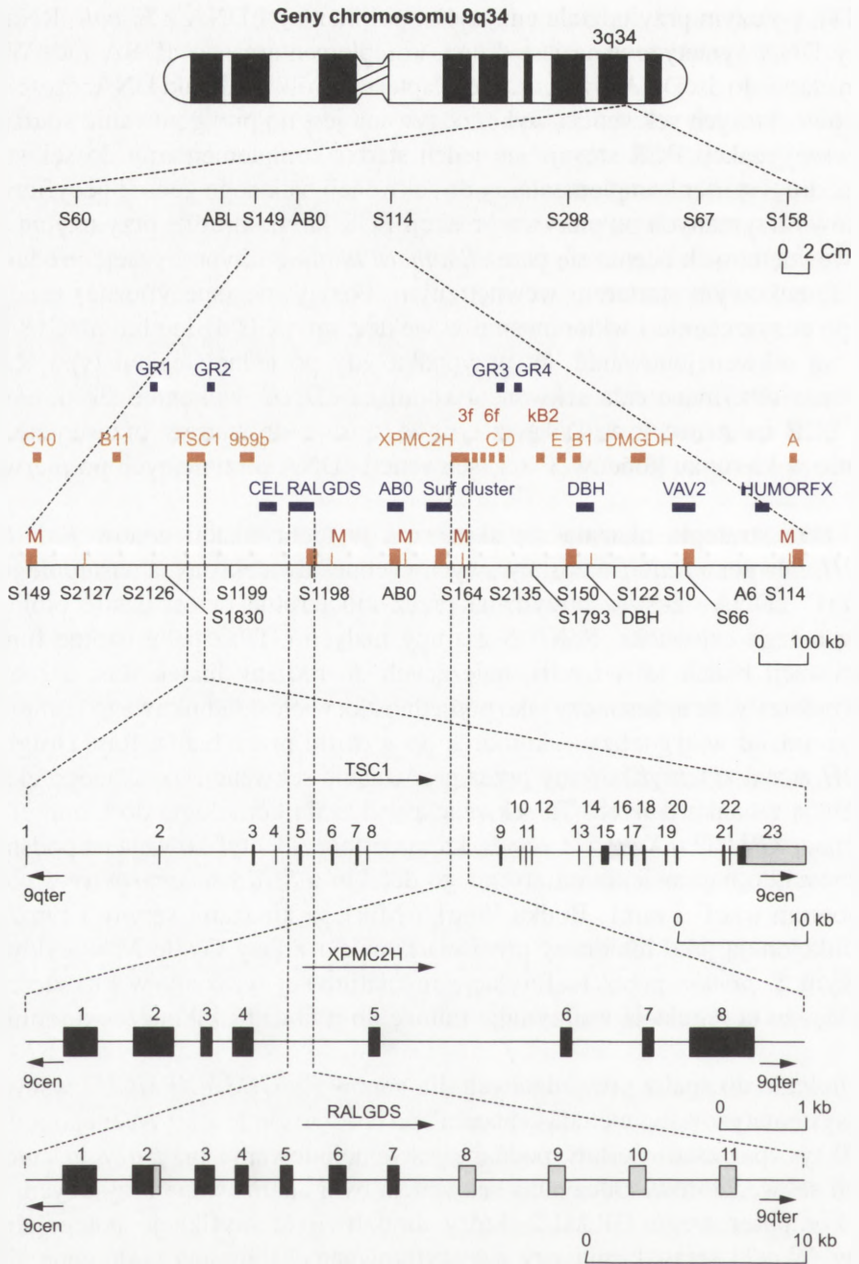
Również powyższe kłony zostały użyte w identyfikacji genów: *RalGDS* [19], *XPMC2H* [20] i *TSC1*[21]. W pierwszym etapie poszukiwania tych genów zastosowano metodę wychwytywania eksonów (*exon trapping*). W przypadku genu *RalGDS* kosmid 185F2 został poddany trawieniu enzymem restrykcyjnym PstI, losowo wklonowany w wektor pSPL3 i użyty do transformacji komórek bakteryjnych. Następnie wszystkie kolonie zebrano i przygotowano do transfekcji komórek *Cos* metodą elektroporacji. Po dwóch dniach z tych komórek wyizolowano RNA, który posłużył następnie jako matryca do syntezy cDNA. W kolejnym etapie wykonano reakcję PCR, a produkty amplifikacji wklonowano do wektora pGEMBlue, po czym poddano je sekwencjonowaniu. W ten sposób zidentyfikowano ponad 70 eksonów, z czego 45 okazało się nie przynależącymi do genów. Sekwencja eksonów została porównana z danymi z banku genów, z bazą dbEST przy użyciu programu komputerowego BLAST. Taka komputerowa analiza pozwala bardzo szybko ocenić pochodzenie wklonowanej sekwencji: z wektora, bakterii czy sekwencji repetytywnych człowieka, ale co najważniejsze pozwala zidentyfikować geny, które odpowiadają sekwencji uzyskanej metodą *exon trapping*. Eksony, dla których nie znaleziono sekwencji komplementarnej w banku genów (*Genbank*), zostały użyte jako sondy do przeszukiwania bibliotek cDNA z mózgu człowieka, ponieważ brak informacji o takiej sekwencji w banku genów świadczy, że jest to sekwencja nowa, należąca do jeszcze nie zidentyfikowanego genu. Na ogół sprawdza się około 250 000 klonów. Kłony pozytywne poddano sekwencjonowaniu, a w dalszym etapie te kłony przeznaczono do ponownego przeszukania biblioteki cDNA lub stosowano metodę RACE (ang. *rapid amplification of cDNA ends*) – metodę otrzymywania końców cDNA.

Otrzymanie całego regionu kodującego genu należy do bardzo ważnych, a zarazem bardzo trudnych zadań w charakterystyce genu, szczególnie gdy gen jest duży, a jego ekspresja zachodzi na niskim poziomie. Tradycyjna i bardzo pracochłonna metoda polega na skonstruowaniu biblioteki cDNA, a następnie przeszukiwaniu jej stosując jako sondę fragmenty kodujące, otrzymane metodą *exon trapping*. Opracowana w 1988 roku metoda RACE jest dużym ułatwieniem w uzyskaniu pełnej sekwencji cDNA. Jest ona powszechnie stosowana w przypadku, gdy znana jest tylko częściowo sekwencja genu (przynajmniej 23–28 nukleotydów). Metoda RACE z zastosowaniem starterów specyficznych dla badanego genu stała się metodą alternatywną do klonowania cDNA, szczególnie dla genów, które ulegają ekspresji na bardzo niskim poziomie oraz gdy istotnym czynnikiem jest mała ilość materiału wyjściowego. Metoda RACE jest nadal udoskonalana. W pierwszym etapie na matrycy całkowitego RNA lub oczyszczonego na kolumnie z oligo(dT) uzyskuje się matrycę cDNA przy udziale odwrotnej transkryptazy i zmodyfikowanego startera

z poli(dT), po czym przy udziale enzymów: polimerazy I DNA z *E. coli*, RNazyH i ligazy DNA syntetyzowana jest druga, komplementarna do cDNA nić. W następnym etapie do dscDNA przyłącza się adaptery – krótkie odcinki DNA, częściowo dwuniciowe, których sekwencja wykorzystywana jest do przygotowania starterów. W pierwszej reakcji PCR stosuje się jeden starter komplementarny do sekwencji adaptera, drugi starter komplementarny do sekwencji badanego genu. Specyficzność produktów otrzymanych po pierwszej reakcji PCR lub po drugiej przy użyciu starterów wewnętrznych ocenia się przez *Southern blotting* i hybrydyzację produktów PCR z dodatkowym starterem wewnętrznym. Pozytywne (specyficzne) produkty RACE po oczyszczeniu i wklonowaniu w wektor, np. pGEMBlue lub pUC18 poddawane są sekwencjonowaniu. W przypadku gdy po jednej reakcji typu RACE nie zostanie otrzymana cała sekwencja kodująca cDNA, wykonuje się ponownie reakcję PCR na matrycy dscDNA, z tym że stosuje się startery przesunięte maksymalnie w kierunku końców 3' i 5' sekwencji cDNA otrzymanych po pierwszej reakcji.

Powyższa strategia okazała się skuteczna w identyfikacji genów *RalGDS* i *XPMC2H*. Dla genu *RalGDS* zostały „wychwycone” dwa eksony, a następnie pełna sekwencja cDNA została otrzymana przez kilkakrotne przeszukanie biblioteki cDNA z mózgu człowieka. *RalGDS* z grupy małych GTPaz pełni istotne funkcje w inaktywacji białek *ralA* i *ralB*, należących do rodziny białek Ras, a ostatnie badania pokazały, że uczestniczy jako podjednostka wieloskładnikowego kompleksu biorącego udział w sygnalizacji komórek do wzrostu przez białka Ras. Drugi gen *XPMC2H* został zidentyfikowany przez porównanie sekwencji uzyskanego eksonu z sekwencją z banku danych. Ta sekwencja wykazała homologię do klonu cDNA z sekwencją *XPMC2* u *Xenopus laevis*, która została zidentyfikowana na podstawie jej zdolności do naprawienia mitotycznego defektu u *Schizosaccharomyces pombe* z niedoborem *wee1⁻* i *mik1*. Białka *Wee1* i *Mik1* są kinazami seryny i tyrozyny, które funkcjonują jako inhibitory przejścia komórki z fazy G₂ do M w cyklu komórkowym *S. pombe* przez fosforylację regulatorowej tyrozyny w kinazie *cdc2*. Uważa się, że ta regulacja wstrzymuje mitozę do momentu zakończenia replikacji DNA.

Równoległe do analiz prowadzonych dla genów *RalGDS* i *XPMCH2* wszystkie klony usystematyzowane metodą „spaceru” po chromosomie z krytycznego regionu (ok. 900 tys. par zasad) zostały poddane sekwencjonowaniu przy użyciu automatycznych sekwenatorów. Odczytana sekwencja była analizowana przy użyciu programu komputerowego GRAIL2, który umożliwił identyfikację potencjalnych eksonów. W celu sprawdzenia, czy zidentyfikowane eksony należą do genu *TSC1*, a więc czy występują w nich jakiegokolwiek zmiany, przygotowane zostały startery do amplifikacji tych eksonów i produkty reakcji sprawdzano metodą heterodupleksów. W badaniach użyto 20 przypadków z dużych rodzin, u których stwierdzono sprzężenie choroby z locus 9q34 i 40 przypadków sporadycznych. Identyfikacja



RYSUNEK 1. Geny chromosomu 9q34

zmian w obrębie jednego z badanych eksonów, a także dziedziczenie tych zmian w przypadkach rodzinnych oznaczała, że ten ekson należy do genu *TSC1*. Komputerowa analiza sekwencji, a także metoda RACE wykazały, że 3738 par zasad sekwencji kodującej ulega translacji, a fragment na końcu 3', wielkości 4500 par zasad nie ulega translacji. Funkcja genu nie jest do końca poznana, jak również nie wiadomo, jak produkt genu *TSC1* oddziałuje z produktem genu *TSC2*, ale fakt, że u chorych stwierdza się występowanie licznych guzów, może świadczyć, że gen bierze udział we wzroście i rozwoju komórki. Po charakterystyce genu, określeniu sekwencji regionów regulatorowych można przystąpić do badania ekspresji i funkcji genu.

Na rysunku 1 schematycznie przedstawiono geny chromosomu 9q34 z uwzględnieniem wykrytych przez autorów genów *RalGDS*, *XPMC2H* i *TSC1*. Wykrycie genów możliwe było dzięki zastosowaniu opisanych w niniejszej pracy strategii. Region poszukiwania genu *TSC1* obejmował fragment chromosomu 9 między markerami S149 a S114. W tej części chromosomu 9 zmapowano uprzednio geny układu ABO, a w części poprzedzającej badany region gen onkogenu *ABL*. Analiza komputerowa sugeruje, że w regionie tym występują jeszcze cztery geny *GR1*, *GR2*, *GR3* i *GR4* o niewyjaśnionej dotychczas funkcji. W najbliższej przyszłości struktura i funkcja tych genów zostanie z pewnością wyjaśniona. Literą M zaznaczono miejsca rozpoznawane przez enzym restrykcyjny MluI. Kolorem czerwonym oznaczono nowe geny wykryte w sąsiedztwie genu *TSC1*, a kolorem niebieskim geny poprzednio zmapowane w tym regionie. Na kolejnych poziomach przedstawiono schematycznie strukturę genów *TSC1*, *XPMC2H* i *RalGDS*.

LITERATURA

- [1] LOBBAN PE, KAISER AD. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J Mol Biol* 1973; **78**: 453–458.
- [2] JACKSON DA, SYMONS RH, BERG P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of *Simian virus 40*: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Natl Acad Sci* 1972; **69**: 29042–909
- [3] ANTEQUERA F, BIRD A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 11995–11999.
- [4] LARSEN F, GUNDERSEN G, LOPEZ R, PRYDZ H. Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome. *Genomics* 1992; **13**: 1095–1107.
- [5] CHURCH DM, STOTLER CJ, RUTTER JL, MURRELL JR, TROFFATER JA, BUKLER AJ. Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic DNA using exon amplification. *Nature Genetics* 1994; **6**: 98–105.
- [6] LOVETT M. Fishing for complements: finding genes by direct selection. *Trends Genet* 1994; **10**: 352–357.
- [7] XU Y, MURAL R, SHAH M, UBERBACHER E. Recognizing exons in genomic sequence using GRAILII. *Gene Eng Principles Methods* 1994; **16**: 241.

- [8] EUROPEAN TUBEROUS SCLEROSIS CONSORTIUM. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 1993; **75**: 1305–1313.
- [9] FRYER AE, CHALMERS A, CONNER JM, FRASER I, POVEY S, YATES AD, YATES JRW, OSBORNE JP. Evidence that the gene for tuberous sclerosis is on chromosome 9. *Lancet* 1987; **1**: 659–661.
- [10] CONNOR JM, PIRRIET LA, YATES JRW, FRYER AE, FERGUSON-SMITH MA. Linkage of the tuberous sclerosis locus to a DNA polymorphism detected by v-abl. *J Med Genet* 1987; **24**: 544–546.
- [11] HAINES JL, AMOS J, ATTWOOD J, BECH-HANSEN NT, BURLEY M, CONNEALY PM, CONNOR JM, FASHOLD R, FLODMAN P, FRYER AE, HALLEY DJJ, JEWELL A, JANSSEN LAJ, KANDTRS, NORTHRUP H, OSBORNE J, PERICAC-VANCEMA, POVEY S, SAMSON JR, SHORT MP, SMITH M, SPEER MC, TROFFATER JA, YATES JR. Genetic heterogeneity in tuberous sclerosis: Study of a large collaborative dataset. *Ann NY Acad Sci* 1991; **615**: 256–264.
- [12] HENSKE E, OZELIUS P, GUSSELLA J, HAINES J. A high resolution linkage map of human 9q34.1. *Genomics* 1993; **17**: 587–591.
- [13] HARRIS RM, CARTER NP, GRIFFITHS B, GOUDIE D, HAMPSON RM, YATES JRW, AFFARA NA, FERGUSON-SMITH MA. Physical mapping within the tuberous sclerosis linkage group i region 9q32-q34. *Genomics* 1993; **15**: 265–274.
- [14] POVEY S, ARMOUR J, FARNDON P, HAINES JL, KNOWLES M, OLOPADE F, PILZ A, WHITE JA, MEMBERS OF THE UTAH GENOM CENTRE GENETIC MARKER AND MAPPING GROUP, KWIATKOWSKI DJ. Report and abstracts of the Third International Workshop on chromosome 9. Cambridge, United Kingdom, 9–11 April, 1994. *Ann Hum Genet* 1994; **58**: 177–250.
- [15] KWIATKOWSKI DJ, ARMOUR J, BALE A, FOUNTAIN J, GOUDIE D, HAINES J, KNOWLES M, PILZ A, SLAUGENHAUPT S, POVEY S. Report on the second international workshop on human chromosome 9. *Cytogenet Cell Genet* 1993; **64**: 93–121.
- [16] PITIOT G, WAKSMAN G, BRAGADO-NILSSON E, JOBERT S, CORNELIS F, MALLET J. Linkage analysis places the TSC1 gene distal to D9S10. *Ann Hum Genet* 1994; **58**: 232–233.
- [17] NELLIST M, BROOK-CARTER PT, CONNOR JM, KWIATKOWSKI DJ, JOHNSON P, SAMPSON JR. Identification of markers flanking the tuberous sclerosis locus on chromosome 9 (TSC1). *J Med Genet* 1993; **30**: 224–227.
- [18] HORNIGOLD N, van SLEGTENHORST M, NAHMIA S, EKONG R, ROUSSEAU S, HERMANS C, HALLEY D, POVEY S, WOLFE J. A 1.7-megabase sequence - ready cosmid contig covering the TSC1 candidate region in 9q34. *Genomics* 1997; **41**: 385–389.
- [19] HUMPHREY D, KWIATKOWSKA J, HENSKE EP, HAINES JL, HALLEY D, VAN SLEGTENHORST M, KWIATKOWSKI DJ. Cloning and evaluation of RalGDS as a candidate for the tuberous sclerosis gene TSC1. *Ann Hum Genet* 1997; **61**: 299–305.
- [20] KWIATKOWSKA J, SŁOMSKI R, JÓZWIAK S, SHORT PM, KWIATKOWSKI DJ. Human XPMC2H: cDNA cloning, mapping to 9q34, genomic structure, and evaluation as TSC1. *Genomics* 1997; **44**: 350–354.
- [21] van SLEGTENHORST M, de HOOGT R, HERMANS C, NELLIST M, JANSSEN B, VERHOEF S, LINDHOUT D, van DEN OUWELAND A, HALLEY D, YOUNG J, BURLEY M, JEREMIAHS, WOODWARD K, NAHMIA S, FOX M, EKONG R, OSBORNE J, WOLFE J, POVEY S, SNELL RG, CHEADLE JP, JONES AC, TACHATAKI M, RAVINE D, SAMPSON JR, REEVE MP, RICHARDSON P, WILMER F, MUNRO C, HAWKINS TL, SEPP T, ALI JBM, WARD S, GREEN AJ, YATES JRW, KWIATKOWSKA J, HENSKE EP, SHORT MP, HAINES JH, JÓZWIAK S, KWIATKOWSKI DJ. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 1997; **277**: 805–808.

***BRCA1* i *BRCA2* – GENY DZIEDZICZNYCH FORM RAKA PIERSI**

BRCA1 and *BRCA2* – GENES OF HEREDITARY BREAST CANCER

Anna JASIŃSKA, Włodzimierz J. KRZYŻOSIAK

Pracownia Genetyki Nowotworów, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

Streszczenie: 5–10% dziedzicznych nowotworów sutka związanych jest z autosomalnymi dominującymi genami: *BRCA1* i *BRCA2*. Geny *BRCA* są dużymi genami supresorowymi kodującymi białka przypuszczalnie uczestniczące w naprawie DNA i regulacji cyklu komórkowego. Dotychczas zidentyfikowano około 500 różnych dziedzicznych mutacji genów *BRCA*, które zakłócają ich rolę w utrzymaniu integralności genomu. Mutacje w genie *BRCA1* zwiększają u nosicieli życiowe ryzyko raka sutka z 6,7% w populacji ogólnej do 73–87%, i ryzyko raka jajników z 1,8% w populacji ogólnej do 32–84% oraz podnoszą ryzyko raka okrężnicy i prostaty. Za podobne ryzyko raka sutka odpowiadają mutacje w genie *BRCA2*, które jednak nie predysponują tak silnie do nowotworów jajników, ale związane są z wyższym niż mutacje genu *BRCA1* ryzykiem raka sutka u mężczyzn, podnoszą też ryzyko raka trzustki, prostaty i jelita grubego.

Słowa kluczowe: *BRCA1*, *BRCA2*, rak piersi

Summary: 5–10% of all breast cancers are associated with autosomal dominant genes: *BRCA1* and *BRCA2*. *BRCA* genes are large suppressor genes encoding proteins that presumably take part in DNA repair and cell cycle regulation. To date about 500 different mutations in *BRCA* genes disturbing their role in maintaining genome integrity have been identified. *BRCA1* mutations increase the lifetime risk of breast cancer from 6,7% in general population to 73–87% in carriers and ovarian cancer from 1,8% in general population to 32–84% in carriers, they also increase the risk of colon and prostate cancer. Mutations in *BRCA2* gene account for the similar risk of breast cancer, but lower risk of ovarian cancer, they are also associated with higher risk of male breast cancer than *BRCA1* gene and increased risk of pancreatic, prostate and colon cancer.

Key words: *BRCA1*, *BRCA2*, breast cancer

Za 5–10% nowotworów piersi odpowiada dziedziczna predyspozycja związana z dwoma autosomalnymi dominującymi genami o wysokiej penetracji – *BRCA1* i *BRCA2*.

1. STRUKTURA GENÓW *BRCA*

Gen *BRCA1* zlokalizowany w chromosomie 17q21 wyizolowano w 1994 roku techniką klonowania pozycyjnego [21]. Sekwencja genomowa genu *BRCA1* długości 81 kpz zawiera 24 eksony o długościach od 41 pz – ekson 19 do 3426 – ekson 11. Charakterystyczną cechą genu *BRCA1* jest duża zawartość, ponad 40%, sekwencji Alu, podczas gdy inne sekwencje powtarzające się występują w niespełna 5%. Gen *BRCA1* zlokalizowany jest w układzie jak „głowa do głowy” względem genu 1A1-3B. Międzygenowy region 295 pz oraz końce 5' obu genów obejmuje tandemowa duplikacja 30 kpz zlokalizowana między sekwencjami Alu [4].

Gen *BRCA1* daje transkrypty różniące się pierwszym eksonem 1a lub 1b występujące w różnych stosunkach ilościowych w różnych tkankach. Ponadto u chorych na nowotwory sutka i jajników zidentyfikowano wiele różnych wariantów wynikających z alternatywnego składowania [50].

Gen *BRCA2* został zlokalizowany w 1994 roku w chromosomie 13q12-12, a w następnym roku sklonowany niezależnie przez dwa zespoły: brytyjski i amerykański [48,42]. W skład genu *BRCA2* wchodzi 27 eksonów rozmieszczonych na odcinku chromosomu długości 84 kpz. Obok wielu eksonów występujących w strukturze genu *BRCA2*, podobnie jak gen *BRCA1* zawiera on wyróżniający się wśród innych ekson 11 długości 4933 pz stanowiący blisko połowę sekwencji kodującej genu *BRCA2*.

2. FUNKCJE BIAŁEK *BRCA*

Białko *BRCA1* jest fosfoproteiną serynową o masie 220 kDa [6] składającą się z 1863 aminokwasów [21]. Nie wykazuje żadnych znacznych homologii do innych znanych białek, ale występują w nim specyficzne domeny przypuszczalnie o charakterze funkcjonalnym. Na końcu aminokwasowym zlokalizowany jest RING palca cynkowego obejmujący aminokwasy 24-64, charakterystyczny dla białek oddziałujących z DNA, w szczególności czynników transkrypcyjnych. Przy udziale sekwencji aminokwasów 758-1064 białko *BRCA1* ma zdolność wiązania się z białkiem naprawy DNA *RAD51* [33]. W sekwencji białka *BRCA1* kodowanej przez ekson 11 występuje: domena zamka leucynowego, którą tworzą aminokwasy 1209-1230 [41], nakładająca się częściowo z sekwencją 10 aminokwasów (1214-1223) charakterystyczną dla granin [16] oraz dwa sygnały lokalizacji jądrowej obejmujące sekwencje aminokwasowe 503-508 i 606-615 [5]. W C-końcowej części białka *BRCA1* w regionie aminokwasów 1750-1863 zidentyfikowano domenę aktywacji transkrypcji [23]. Białko *BRCA1* i naprawcze białko *BARD1* zawierają również w C-końcowej części domenę *BRCT* występującą w wielu białkach związanych

z naprawą DNA i regulacją cyklu komórkowego [18]. Funkcja domeny BRCT nie jest znana, wiadomo jednak, że ten region białka BRCA1 ma zdolność transaktywacji i supresji wzrostu komórkowego [23] oraz przypuszczalnie uczestniczy w interakcji białka BRCA1 z holoenzymem polimerazy II RNA [31].

Porównanie sekwencji ludzkiego białka BRCA1 z jego odpowiednikami innych gatunków, w celu zidentyfikowania zachowawczych ewolucyjnie regionów o przypuszczalnym znaczeniu funkcjonalnym, wykazało zaskakująco niską jak na białko supresorowe homologię. Mysie białko Brca1 jest identyczne z ludzkim białkiem BRCA1 zaledwie w 58%, z białkiem psa – 73,8% [41]. Stosunkowo wyższą identycznością międzygatunkową charakteryzują się tylko trzy specyficzne regiony białka BRCA1: C-końcowa domena 67 aminokwasów, motyw granin oraz przede wszystkim RING palca cynkowego [41].

Białko kodowane przez gen *BRCA2*, podobnie jak białko BRCA1, jest dużym białkiem składającym się z 3418 aminokwasów [42]. Podobnie jak w przypadku białka BRCA1 niski jest poziom identyczności mysiego białka Brca2 i jego ludzkiego odpowiednika, wynoszący 59% [8]. W białku BRCA2 nie stwierdzono także znaczących homologii z innymi znanymi białkami poza występującymi w eksonie 11 ośmioma powtórzeniami BRC każde długości 30–80 aminokwasów. Analiza porównawcza eksonu 11 pomiędzy człowiekiem i 6 innymi ssakami wykazała znaczną zachowawczość ewolucyjną motywów BRC, w przeciwieństwie do sekwencji interweniujących, wskazującą na znaczenie funkcjonalne tej domeny [3]. Ponadto w części C-końcowej sekwencji aminokwasowej BRCA2 zidentyfikowano motyw charakterystyczny dla granin, podobny do występującego w białku BRCA1 [16] oraz kodowany przez ekson 3 region homologiczny z domeną aktywacji transkrypcji c-Jun [22].

3. EKSPRESJA BIAŁEK BRCA

Geny *BRCA1* i *BRCA2* ulegają ekspresji w szerokim spektrum tkanek w mózgu, jądrach, oku, jajnikach, gruczole sutkowym, prostaty, okrężnicy, tarczycy, limfocytach krwi obwodowej. Ekspresja genów *BRCA1* i *BRCA2* jest skoordynowana w czasie proliferacji i różnicowania [28], przy czym poziom ekspresji genów *BRCA* w sutku zależy jednak od etapu rozwoju osobniczego. Jego znaczny wzrost występuje w okresie dojrzewania oraz w czasie ciąży [27]. Podobieństwo wzorów ekspresji mRNA Brca1 i Brca2 wskazuje na regulację przez podobne szlaki komórkowe [27]. Istnieją jednak znaczące różnice wynikające z regulacji przez hormony płciowe [27]. Poziom mRNA BRCA1 i BRCA2 w ludzkich liniach komórkowych z nowotworów sutka podnosi się pod wpływem, regulującego również ekspresję niektórych granin [16], estrogeny, który reguluje wzrost i różnicowanie się nabłonka

gruczołu sutkowego u człowieka. Estrogen zwiększa ekspresję genów *BRCA1* i *BRCA2* nie bezpośrednio przez oddziaływanie z sekwencją genu, ale w wyniku mitogenicznej aktywności estradiolu [20] albo przez indukcję syntezy nieznanego białka, które podnosi poziom ekspresji *BRCA1* i *BRCA2* [37]. Przypuszcza się, że hormonalna regulacja ekspresji genów *BRCA1* i *BRCA2*, może wpływać na zależne od płci różnice w fenotypie u nosicieli mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* [27].

4. ROLA KOMÓRKOWA BIAŁEK BRCA

Geny *BRCA1* i *BRCA2* są genami supresorowymi, na co wskazuje utrata funkcji obydwu alleli genu w rozwoju nowotworów dziedzicznych [7,15]. Mechanizm działania białek BRCA nie jest znany. Przypuszcza się jednak, że oba białka BRCA pełnią istotne funkcje w utrzymaniu integralności genomu. Na udział białek BRCA w naprawie DNA wskazują ich interakcje z białkami naprawy DNA i związanymi z rekombinacją mejozyczną.

Białko *BRCA1* w fazie S wraz z białkiem naprawy DNA *RAD51* [33] i białkiem *BARD1* występuje w formie skupisk, tworząc prawdopodobnie wraz z innymi białkami struktury dynamiczne, wrażliwe na czynniki genotoksyczne powodujące utratę integralności genomu. Zmiana ufosforylowania białka *BRCA1* towarzyszy opuszczaniu tych struktur przez białka *BRCA1*, *BARD1* i *RAD51*, które gromadzą się w regionie struktur replikacyjnych. Wskazuje to na wrażliwość kompleksów zawierających białko *BRCA1* na uszkodzenia DNA oraz udział w kontroli replikacji DNA [32]. Regulacja działania białka *BRCA1* w cyklu komórkowym związana jest prawdopodobnie z jego odwracalną fosforylacją [30]. Białko *BRCA1* ma stały konstytutywny stopień fosforylacji (hypofosforylacja), który zmienia się w hiperfosforylację w późnej fazie G1 i S [30]. W procesie fosforylacji uczestniczą nieznane dotychczas kinazy aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [32]. Na udział genu *BRCA1* w naprawie DNA wskazuje obecność w jego strukturze nie tylko regionu oddziałującego z białkiem *RAD51*, lecz również domeny interakcji z białkiem *p53* [18], bowiem oba białka *RAD51* i *p53*, odgrywające kluczową rolę w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, oddziałują ze sobą *in vivo* [49].

Na udział w naprawie DNA białka *BRCA2* wskazuje wrażliwość komórek mysich pozbawionych funkcji genu *brca2* na promieniowanie jonizujące [35] oraz oddziaływanie mysiego białka *Brca2* z białkiem *Rad51* [35]. Zdolność białek BRCA do oddziaływań z białkiem *RAD51* [33,35] wraz ze skoordynowaną ekspresją mRNA *BRCA1*, *BRCA2* i *RAD51*, która osiąga maksimum na granicy faz G1/S [28,45,44], wskazują na zależną od cyklu komórkowego regulację tworzenia kompleksów tych trzech białek oraz ich udział we wspólnym szlaku komórkowym naprawy DNA.

Szersza rola białek BRCA polega przypuszczalnie na uczestnictwie w regulacji cyklu komórkowego. Embryony mysie o uszkodzonym genie *brca1* lub *brca2* umierały we wczesnych stadiach embriogenezy. Bezpośrednim dowodem na supresorowy charakter białka BRCA1 jest zahamowanie wzrostu i neoplastycznego fenotypu przez wprowadzenie prawidłowego wariantu genu *BRCA1* do ludzkich komórek nowotworowych [29]. Białka BRCA pełnią przypuszczalnie bezpośrednią rolę we wzroście i supresji nowotworowej. Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* nie działają bezpośrednio, ale upośledzając naprawę DNA powodują akumulację mutacji prowadzących do rozwoju nowotworów [17]. Inaktywacja genów *BRCA* może hamować podziały komórkowe albo powodować proliferację. Hamujący wpływ na proliferację inaktywacji genów *brca* obserwowano u mysich embrionów. Zapobiega on przenoszeniu uszkodzeń DNA do komórek potomnych przez zatrzymanie podziałów komórkowych do czasu naprawy uszkodzeń DNA. Brak w komórce białka naprawczego może powodować całkowite zatrzymanie cyklu komórkowego lub śmierć komórki. Odwrotny efekt mutacji inaktywujących geny *BRCA1* i *BRCA2*, czyli proliferacja komórek, występuje w nowotworach sutka i jajników. Przypuszczalnie wynika ona z bardziej restrykcyjnego działania punktu kontrolnego u embrionów niż u dorosłych organizmów lub z inaktywacji genów punktu kontrolnego poprzedzającej rozwój nowotworu.

Mutacje genów *BRCA1* i *BRCA2* mogą przyczyniać się do powstawania nowotworów nie tylko przez upośledzenie naprawy DNA, lecz także przez aktywację transkrypcji [22]. Na udział białek w regulacji transkrypcji wskazuje fakt, że oba białka mają domeny aktywacji transkrypcji, ponadto białko BRCA1 stanowi komponent holoenzymu polimerazy RNA II [31]. Zdolność białka BRCA1 do negatywnej regulacji cyklu komórkowego w komórkach ssaczych, przez hamowanie wejścia w fazę S jest częściowo wynikiem zdolności białka BRCA1 do indukowania białka p21 [36]. Przypuszcza się, że C-końcowa domena aktywacji transkrypcji białka BRCA1 transaktywuje ekspresję białka p21 specyficznie wiążącego się z kompleksami cyklina-CDK, które jest uniwersalnym inhibitorem cyklu komórkowego [36]. Wzrost ekspresji genu *p21* powoduje również aktywacja genu *p53* wywoływana akumulacją uszkodzeń DNA spowodowanych utratą funkcji genu *Brca2* [9].

Różnice histologiczne między nowotworami związanymi z genami *BRCA1* i *BRCA2* dostarczają pewnych wskazówek co do roli tych genów i ich wpływu na predyspozycję do nowotworów. Fenotyp nosicieli mutacji genu *BRCA1* charakteryzuje się licznymi mitozami i znacznym pleomorfizmem, sugerując, że białko BRCA1 jest bezpośrednio związane z kontrolą proliferacji i utrzymaniem stabilności genomu. Odwrotnie fenotyp nosicieli mutacji genu *BRCA2*, charakteryzujący się spowolnionym tworzeniem tubul, wskazuje na zaburzenia w formowaniu architektury tkanki i nieprawidłowości dotyczących białek strukturalnych [2].

5. MUTACJE GENÓW *BRCA*

Aktualny przegląd mutacji genów *BRCA* znajduje się w bazie danych mutacji tych genów – *Breast Cancer Information Core* (BIC) pod internetowym adresem http://Lab_transfer/Bic/. Dotychczas w bazie zgromadzono ponad 1500 zgłoszeń mutacji, powszechnych polimorfizmów i rzadkich wariantów sekwencji. Liczba różnych zidentyfikowanych mutacji wynosi około 300 w genie *BRCA1*, a w genie *BRCA2* – blisko 200. Około 3/4 różnych mutacji w genach *BRCA* to mutacje prowadzące do zmiany długości białka. Blisko połowę mutacji w genie *BRCA1* stanowi 8 powtarzających się mutacji zgłoszonych do bazy co najmniej 10 razy. Obok mutacji genowych w genie *BRCA1* występują także rearanżacje związane z sekwencjami Alu.

W genach *BRCA* poza mutacjami o wysokiej penetracji zidentyfikowano też szereg powszechnych wariantów polimorficznych: 17 – w genie *BRCA1* i 7 – w genie *BRCA2*. Ich powszechność w populacji nie wyklucza, że niektóre z nich mogą modyfikować ryzyko raka sutka. Na przykład zwiększone ryzyko raka sutka zaobserwowano u nosicieli rzadszego allelu polimorfizmu Leu871Pro [11], natomiast niewielki efekt ochronny przed nowotworem sutka związany jest z rzadszym allelem polimorfizmu Gln356Arg [10].

Gen *BRCA1* daje także szereg wariantów transkryptu powstających w wyniku alternatywnego składania. Przypuszcza się, że występowanie takich wariantów może mieć związek z lokalizacją i funkcją komórkową polimorficznych form białka *BRCA1* [50]. Na przykład różne warianty transkryptu mogą spełniać odmienne role w regulacji wzrostu komórkowego [47].

6. RYZYKO NOWOTWORÓW ZWIĄZANE Z GENAMI *BRCA*

Mutacje dziedziczne w genie *BRCA1* podnoszą ryzyko zachorowania na raka sutka przed 70 rokiem życia z 6,7% w populacji ogólnej do 76–87% u nosicieli mutacji [48,14,12,46] i odpowiednio ryzyko zachorowania na raka jajników z 1,8% do 32–84% oraz 4-krotnie podwyższają ryzyko raka okrężnicy i u 3-krotnie ryzyko raka prostaty przed 70 rokiem życia [43,14,12,46]. Wartości te są zapewne trochę zawyżone, gdyż pochodzą z badań rodzin o bogatej historii nowotworowej, przez co nie uwzględniają frakcji nowotworów związanych z mutacjami u pacjentów bez lub z umiarkowaną historią rodzinną. Stwierdzono bowiem, że historii rodzinnej nowotworów sutka i jajników nie ma 26% nosicieli mutacji w genie *BRCA1* [39].

U nosicielek mutacji w genie *BRCA2* ryzyko raka sutka jest podobne jak u kobiet z mutacjami w genie *BRCA1* [13]. Jednak dziedziczne mutacje w *BRCA2*

związane są z mniejszą liczbą wczesnych nowotworów sutka [19]. U nosicielek mutacji w genie *BRCA2* również ryzyko raka jajników nie jest tak wysokie jak u nosicielek mutacji w genie *BRCA1*, ryzyko kumulatywne raka jajników wynosi 10–15% do 70 roku życia [13]. Gen *BRCA2* odpowiada natomiast za wyższe niż *BRCA1* ryzyko raka sutka u mężczyzn [43]. *BRCA2* jest także związany z ryzykiem raka jelita, prostaty i trzustki [43,14].

Kobiety noszące dziedziczne mutacje w genach *BRCA* zagrożone są wystąpieniem nowotworów w młodszym wieku oraz większym ryzykiem obustronnego nowotworu sutka i innych nowotworów, w tym przede wszystkim jajników. Analiza dystrybucji mutacji w genach *BRCA* nie wykazała związku lokalizacji mutacji ze specyficznym fenotypem. Stwierdzono jedynie, że mutacje w środkowej części genu *BRCA2* obciążają większym prawdopodobieństwem raka jajników [51].

W niektórych populacjach specyficzne mutacje występują stosunkowo częściej niż w populacji światowej. Nie jest to wynik obecności w genach *BRCA* gorących miejsc, lecz efekt założyciela. Występowanie w specyficznych populacjach mutacji o dużej częstości pozwala na analizę fenotypu związanego z poszczególnymi mutacjami i określenie ich penetracji. Charakterystyczne mutacje powtarzające się wielokrotnie w specyficznych populacjach zidentyfikowano w populacji austriackiej, szwedzkiej, islandzkiej oraz w populacji Żydów Aszkenazyjskich najszerzej obecnie zbadanej pod kątem częstości i penetracji mutacji w *BRCA*. W populacji Żydów Aszkenazyjskich występują 3 założycielskie mutacje znacznie częstsze niż w populacji światowej: 185delAG w genie *BRCA1* o częstości około 0,9% [38], 6174delT w *BRCA2* o częstości 0,9–1,5% oraz 5382insC o częstości 0,13% [24]. Łącznie mutacje 185delAG i 5382insC w genie *BRCA1* oraz 6174delT w genie *BRCA2* zidentyfikowano w 60% nowotworów jajników i 30% wczesnych form nowotworów sutka. Próba korelacji poszczególnych mutacji założycielskich z fenotypem wykazała, że mutacja 185delAG związana jest z wyższym ryzykiem raka sutka u młodych kobiet niż mutacja 6174delT [1], która natomiast występuje aż u 10% Żydów Aszkenazyjskich z nowotworami trzustki [25].

7. KIERUNKI BIEŻĄCYCH BADAŃ I PERSPEKTYWY

Identyfikacja poszczególnych mutacji predysponujących do nowotworów sutka oraz ich związek z ryzykiem nowotworów i charakterystyka populacyjna są pierwszym i koniecznym krokiem umożliwiającym polepszenie profilaktyki i leczenia. W tym celu planowane są rozległe badania populacyjne młodych kobiet o wysokim ryzyku raka piersi i innych nowotworów z powodu mutacji w genach *BRCA*. Pozwolą one na określenie ryzyka warunkowanego mutacjami w genach *BRCA* w kontekście

różnych czynników na przykład profilaktycznych zabiegów chirurgicznych czy czynnika reprodukcyjnego [51].

Wyniki analizy sprzężeń i mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* w rodzinach z nowotworami sutka wskazują na istnienie jeszcze co najmniej jednego genu silnie predysponującego do raka sutka [34]. Poszukiwania innych genów związanych z rakiem sutka koncentrują się na chromosomie 10, w którym już zidentyfikowano gen *PTEN* związany między innymi z nowotworami sutka oraz na chromosomie 8, w którym do dalszych badań wybrano już 3 regiony [51].

Określenie związku mutacji genu *BRCA1* z nowotworami wymaga także poznania roli czynników modyfikujących: innych genów i czynników środowiskowych, głównie dietetycznych. Przykładowo, zaobserwowano 2-krotnie wyższe ryzyko raka jajników u nosicielek mutacji w genie *BRCA1*, u których w mikrosatelitarnym locus *HRAS1* występuje rzadki allel [26]. Przepuszczalnie także penetracja mutacji w genie *BRCA2* jest modulowana przez inne czynniki genetyczne. Nowotwory sutka u mężczyzn noszących mutację w genie *BRCA2* występują częściej w określonych gałęziach niektórych rodzin. Wskazuje to na występowanie w nich zmian o modyfikującym wpływie na ryzyko raka sutka u mężczyzn [51].

LITERATURA

- [1] ABELIOVICH D, KADURI L, LERER I, WEIBERG N, AMIR G, SAGI M., ZLOTOGORA J, HECHING N, PERETZ T, The founder Mutations 185delAG and 5382insC in *BRCA1* and 6174delT in *BRCA2* appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 505–514.
- [2] BCLC, Pathology of familial breast cancers in carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations and sporadic cases. *Lancet* 349: 1505–1510.
- [3] BIGNELL G, MICKLEM G, STRATTON MR, ASHWORTH A, WOOSTER R, The BRC repeats are conserved mammalian *BRCA2* proteins. *Hum Mol Genet* 1997; **3**: 53–58.
- [4] BROWN MA, XU C-F, NICOLAI H, GRIFFITHS B, CHAMBERS JA, BLACK D, SOLOMONNE, The 5' end of the *BRCA1* gene lies within a duplicated region of human chromosome 17q21. *Oncogene* 1996; **12**: 2507–2513.
- [5] CHEN CF, LI S, CHEN Y, CHEN PL, SHARP ZD, LEE WH, The nuclear localization sequences of the *BRCA1* protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 32863–32868.
- [6] CHEN Y, FARMER AA, CHEN CF, JONES DC, CHEN PL, LEE WH, *BRCA1* is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Res* 1996; **56**: 3168–3172.
- [7] COLLINS N, McMANUS R, WOOSTER R, MANGION J, SEAL S, LAKHANI SR, ORMISTON W, DALY PA, FORD D, EASTON DF. Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the *BRCA2* gene on chromosome 13q12-13. *Oncogene* 1995; **10**: 1673–1675.
- [8] CONNOR F, SMITH A, WOOSTER R, STRATTON M, DIXON A, CAMPBELL E, TAIT TM, FREEMAN T, ASHWORTH A. Cloning chromosomal mapping and expression pattern of the mouse *Brc2* gene. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 291–300.

- [9] CONNOR F, BERTWISTLE D, MEE PJ, ROSS GM, SWIFT S, GRIGORIEVA E, TYBULEWICZ VL, ASHWORTH A. Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating *Bra2* mutation. *Nat Genet* 1997; **17**: 423–430.
- [10] DUNNING AM, CHIANO M., SMITH NR, DEARDEN J, GORE M, AOKES S, WILSON C, STRATTON M, PETO J, EASTON D, CLAYTON D, PONDER BAJ. Common *BRCA1* variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet* 1996; **6**: 285–289.
- [11] DUROCHER F, SHATTUCK-EIDENS D, McCLURE M, LABRIE F, SKOLNICK MH, GOLDFAR DE, SIMARD J. Comparison of *BRCA1* polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer population. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 835–842.
- [12] EASTON DF, FORD D, BISHOP DT. Breast and ovarian incidence in *BRCA1*-mutation carriers. *Am J Hum Genet* 1995; **8**: 8–18.
- [13] FORD D, EASTON DF. The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; **72**: 805–812.
- [14] FORD D, EASTON DF, BISHOP DT, NAROD SA, GOLDFAR DE. Risks of cancer in *BRCA1*-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 1994; **343**: 692–695.
- [15] GUDMUNDSSON J, JOHANNESDOTTIR G, BERGTHORSSON JT, ARASON A, INGVARSSON S, EGILSSON V, BARKARDOTTIR RB. Different tumor types from *BRCA2* carriers show wild-type chromosome deletions on 13q12–q13. *Cancer Res* 1995; **55**: 4830–4832.
- [16] JENSEN RA THOMPSON ME, JETTON TL, SZABO CI, VAN DER MEER R, HELOU B, TRONICK SR, PAGE DL, KING M-C, HOLT JT. *BRCA1* is secreted and exhibits properties of granin. *Nat Genet* 1996; **372**: 303–222.
- [17] KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; **386**: 761–763.
- [18] KOONIN VF, ALTSCHUL SF, BORK P. *BRCA1* protein products: functional motifs. *Nat Genet* 1996; **13**: 266–267.
- [19] KRAINER M, SILVA-ARRIETA S, FITZGERALD MG, SHIMADA A, ISHIOKA C, KANAMARU R, MACDONALD DJ, UNSAL H, FINKELSTEIN DM, BOWCOCK A, ISSELBACHER KJ, HABER DA. Differential contributions of *BRCA1* and *BRCA2* to early-onset breast cancer. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1416–1421.
- [20] MARKS JR, HUPER G, VAUGHN JP, DAVIS PL, NORRIS J, McDONNELL DP, WISEMAN RW, FUTREAL PA, IGLEHART JD. *BRCA1* expression is not directly responsive to estrogen. *Oncogene* 1997; **14**: 115–121.
- [21] MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, LIU Q, COCHRAN C, BENNETT LM, DING W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 1994; **266**: 66–71.
- [22] MILNER J, PONDER B, HUGHES-DAVIES L, SELTMANN M, KOUZARIDES T. Transcriptional activation functions in *BRCA2*. *Nature* 1997; **386**: 772–773.
- [23] MONTEIRO AN, AUGUST A, HANAFUSA H. Evidence for a transcriptional activation function of *BRCA1* C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13595–13599.
- [24] ODDOUX C, STRUEWING JP, CLAYTON CM, NEUHAUSEN S, BRODY LC, KABACK M, HAAS B, NORTON L, BORGEN P, JHANWAR S, GOLDFAR D, OSTREER H, OFFIT K. The carrier frequency of the *BRCA2* 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat Genet* 1996; **14**: 188–190.
- [25] ÖZCELİK H, SCHMOCKER B, DI NICOLA N, SHI X-H, LANGER B, MOORE M, TAYLOR BR, NAROD SA, DARLINGDTON G, ANDRULIS IL, GALLINGER S, REDSTON M. Germline *BRCA2* 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish pancreatic cancer patients. *Nat Genet* 1997; **16**: 17–18.
- [26] PHELAN CM, REBBECK TR, WEBER BL, DEVILEE P, RUTTLEDGE MH, LYNCH HT, LENOIR GM, STRATTON MR, EASTON DF, PONDER BA, CANNON-ALBRIGHT L,

- LARSSON C, GOLDBERG DE, NAROD SA. Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus. *Nat Genet* 1996; **12**: 309–311.
- [27] RAJAN JV, MARQUIS ST, GARDNER HP, CHODOSH LA. Developmental expression of Brca2 colocalizes with Brca1 and is associated with proliferation and differentiation in multiple tissues. *Developmental Biology* 1997; **184**: 356–401.
- [28] RAJAN JV, WANG M, MARQUIS ST, CHODOSH LA. Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13078–13083.
- [29] RAO VN, SHAO N, AHMAD M, REDDY ES. Antisense RNA to the putative tumor suppressor gene BRCA1 transforms mouse fibroblasts. *Oncogene* 1996; **12**: 523–528.
- [30] RUFFNER H, VERMA IM. BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7138–7143.
- [31] SCULLY R, ANDERSON SF, CHAO DM, WEI W, YEL, YOUNG RA, LIVINGSTON DM, PARVIN JD. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5605–5610.
- [32] SCULLY R, CHEN J, OCHS RL, KEEGAN K, HOEKSTRA M, FEUNTEUN J, LIVINGSTON DM. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 1997; **90**: 425–435.
- [33] SCULLY R, CHEN J, PLUG A, XIAO Y, WEAVER D, FEUNTEUN J, ASHLEY T, LIVINGSTON DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; **88**: 265–275.
- [34] SEROVA OM, MAZOYER S, PUGET N, DUBOIS V, TONIN P, SHUGART YY, GOLDBERG D, NAROD SA, LYNCH HT, LENOIR GM. Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 486–495.
- [35] SHARAN SK, MORIMATSU M, ALBRECHT U, LIM DS, REGEL E, DINH C, SANDS A, EICHELE G, HASTY P, BRADLEY A. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 1997; **386**: 804–810.
- [36] SOMASUNDARAM K, ZHANG H, ZENG Y-X, HOUVRAS Y, PENG Y, ZHANG H, WU GS, LICHT JD, WEBER BL, EL-DEIRY WS. Arrest of the cell cycle by the tumor-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. *Nature* 1997; **389**: 187–190.
- [37] SPILLMAN MA, BOWCOCK AM. BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen. *Oncogene* 1996; **13**: 1639–1645.
- [38] STRUEWING JP, ABELOVICH D, PEREZ T, AVISHAI N, KABACK MM, COLLINS FS, BRODY LC. The carriers frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet* 1995; **11**: 198–200.
- [39] STRUEWING JP, HARTGE P, WACHOLDER S, BAKER SM, BERLIN M, MCADAMS M, TIMMERMAN MM, BRODY LC, TUCKER MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1401–1408.
- [40] STURZBECHER HW, DONZELMANN B, HENNING W, KNIPPSCHILD U, BUCHHOPS. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J* 1996; **15**: 1992–2002.
- [41] SZABO CI, WAGNER LA, FRANCISCO LV, ROACH JC, ARGONZA R, KING M.-C, OSTRANDER EA. Human, canine, and murine BRCA1 genes: sequence comparison among species. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 1289–1298.
- [42] TAVTIGIAN SV, SIMARD J, ROMMENS J, COUCH F, SHATTUCK-EIDENS D, NEUHAUSEN S, MERAJVER S, THORLACIUS S, OFFIT K, STOPPA-LYONNET D, BELANGER C, BELL R, BERRY S, BOGDEN R, CHEN Q, DAVIS T, DUMONT M, FRYE C, HATTIER T, JAMMULAPATI S, JANECKI T, JIANG P, KEHRER R, LEBLANC JF,

- GOLDGAR DE. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 1996; **12**: 333–337.
- [43] THORLACIUS S, OLAFSDOTTIR G, TRYGGVADOTTIR L, NEUHAUSEN S, JONAS-SON JG, TAVTIGIAN SV, TULINIUS H, OGMUNDSDOTTIR HM, EYFJORD JE. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 1996: 117–119.
- [44] VOUGHN JP, DAVIS PL, JARBOE MD, HUPER G, EVANS AC, WISEMAN RW, BERCHUCK A, IGLEHART JD, FUTREAL PA, MARKS JR. BRCA1 expression is induced before DNA synthesis in both normal and tumor-derived breast cell. *Cell Growth Diff* 1996; **7**: 711–715.
- [45] WANG SC, LIN SH, SU LK, HUNG MC. Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **234**: 247–251.
- [46] WHITTEMORE AS, GONG G, INTYRE J. Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast cancer and ovarian cancer: results from three US population-based case-control studies of ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 496–504.
- [47] WILSON CA, PAYTON MN, ELLIOTT GS, BUAAS FW, CAJULIS EE, GROSSHANS D, RAMOS L, REESE DM, SLAMON DJ, CALZONE FJ. Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-11b. *Oncogene* 1997; **14**: 1–16.
- [48] WOOSTER R, BIGNELL G, LANCASTER J, SWIFT S, SEAL S, MANGION J, COLLINS N, GREGORY S, GUMBS C, MICKLEM G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; **378**: 789–792.
- [49] WOOSTER R, NEUHAUSEN SL, MANGION J, QUIRK Y, FORD D, COLLINS N, NGUYEN K, SEAL S, TRAN T, AVERILL D. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; **256**: 2088–2090.
- [50] XU C-F, CHAMBERS JA, NICOLAI H, BROWN MA, HUJEIRAT Y, MOHAMMED S, HODGSON S, KELSELL DP, SPURR NK, BISHOP DT, SOLOMON E. Mutations and alternative splicing of the BRCA1 gene in UK breast/ovarian cancer families. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1997; **18**: 102–110.

MUKOWISCYDOZA – MODELOWA CHOROBA DZIEDZICZNA*

CYSTIC FIBROSIS AS A MODEL OF HEREDITAL DISEASE

Jerzy BAL, Agnieszka SOBCZYŃSKA

Zakład Genetyki, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa

Streszczenie: Mukowiscydoza jest chorobą dziedziczną występującą w populacji kaukaskiej z częstością 1 na 2500 żywo urodzonych. Za wystąpienie choroby odpowiedzialne są mutacje w położonym na chromosomie 7 genie *CFTR*. Pod wieloma względami mukowiscydoza może być postrzegana jako choroba modelowa. Doświadczenie zdobyte przy identyfikacji genu *CFTR*, diagnostyce czy metodach terapii jest wykorzystywane w badaniach molekularnych innych chorób dziedzicznych.

Słowa kluczowe: mukowiscydoza, CF, analiza molekularna, terapia.

Summary: Cystic fibrosis is a very common autosomal recessive disease in Caucasian population. It results from mutation in *CFTR* gene which is localised on chromosome 7. For many reasons, cystic fibrosis, could be considered as a model of genetic disorder. The experience coming from the identification of the *CFTR* gene, mutations analysis and methods of therapy could be useful in treatment of other genetic diseases.

Key words: cystic fibrosis, molecular analysis, therapy.

Krew, pot i łzy – te trzy słowa kojarzące się niekiedy z nazwą głośnego kilka lat temu muzycznego zespołu rockowego (*Blood, Sweat and Tears*) wydają się być dobrą osnową do przedstawienia osiągnięć badawczych i terapeutycznych w mukowiscydozie (ang. *cystic fibrosis, CF*).

Mukowiscydoza powodowana mutacjami genu *CFTR* jest jedną z najczęstszych chorób dziedzicznych rasy białej. Dziedziczy się jako cecha autosomalnie recesywna i występuje z częstością 1 na 2500 żywo urodzonych. Częstość mukowiscydozy

*Praca częściowo finansowana w ramach projektu badawczego KBN 4 PO5E 066 10.

w populacjach orientalnych szacuje się na 1 na 40 tysięcy, a w Afryce 1 na 100 tysięcy.

Pod wieloma względami mukowiscydoza może być przedstawiana jako choroba modelowa. Gen *CFTR* został zidentyfikowany dzięki tzw. klonowaniu pozycyjnemu. Był jednym z pierwszych genów człowieka sklonowanych dzięki tej strategii. Podobnie diagnostyka preimplantacyjna mukowiscydozy była jedną z pierwszych molekularnych diagnostyk tego typu wykonanych dla choroby dziedzicznej. Pierwsze próby bezpośredniego zastosowania mikroprocesorów do diagnostyki molekularnej objęły identyfikację mutacji w genie *CFTR*. Stworzono również kilka zwierzęcych modeli mukowiscydozy oraz zwierzęta transgeniczne produkujące ludzkie białko CFTR. Również jedne z pierwszych zatwierdzonych i realizowanych prób klinicznych terapii genowej obejmowały mukowiscydozę.

1. POT

Słony pot jest jedną z najbardziej charakterystycznych cech klinicznych mukowiscydozy. Podwyższenie chlorków w pocie powodowane jest defektem błonowego białka komórek nabłonkowych dróg oddechowych i gruczołów wydzielania zewnętrznego. Białko CFTR (masa cząsteczkowa ok. 170 kDa) pełni bowiem w komórkach nabłonkowych rolę, aktywowanego przez cAMP, kanału chlorkowego. W swojej budowie białko CFTR zbliżone jest do innych białek transbłonowych zaliczanych do rodziny ABC.

Gen *CFTR* zlokalizowany jest na chromosomie 7. Zbudowany jest z 27 eksonów i jest jednym z większych genów człowieka (250 kb). Do końca 1997 w genie *CFTR* zmapowano ponad 700 różnych mutacji (por. <http://www.genet.sick-kids.on.ca>). Większość z nich to mutacje punktowe – mutacje zmiany sensu (ang. *missens*) i przedwczesne kodony stop (nonsens) stanowiące łącznie ok. 57% wszystkich typów mutacji i względnie małe delecje lub wstawki w sekwencji genu (25%). Dużą grupę mutacji stanowią również mutacje składania RNA (17%). Najczęstszą mutacją genu *CFTR* jest trójnukleotydowa delecja w eksonie 10 tzw. F508. W Europie częstość występowania tej mutacji układa się wzdłuż malejącego gradientu, poczynając od północno-zachodnich do południowo-wschodnich krańców kontynentu. Analiza haplotypów, markerów wewnątrzgenowych, charakteryzujących zmiany w tle genetycznym delecji F508 umożliwiła określenie czasu powstania tej mutacji. Szacuje się, że miało to miejsce około 60 000 lat temu.

2. KREW

W przypadku diagnostyki postnatalnej najczęstszym źródłem DNA są jądrzaste komórki krwi. Kilka mililitrów krwi wystarcza nie tylko na wykonanie wielu analiz, ale i na zbankowanie preparatu DNA. Możliwość wykonania pełnego badania techniką PCR umożliwiła również opracowanie i stosowanie w praktyce szeregu metod, w których źródłem DNA są np. złuszczone komórki nabłonka ust, komórki cebulki włosowej czy przesyłane do laboratorium, na bibule, plamy krwi. W diagnostyce prenatalnej DNA otrzymywany jest z trofoblastu lub z osadzonych po wirowaniu komórek płynu owodniowego. W nie mającej jeszcze rutynowego charakteru diagnostyce preimplantacyjnej, DNA otrzymywano z kilku komórek zarodkowych.

Zasadą diagnostyki molekularnej mukowiscydozy jest identyfikacja mutacji w genie *CFTR*. Wynik polegający na ustaleniu genotypu obu zmutowanych alleli jest podstawą weryfikacji rozpoznania klinicznego. Umożliwia również określanie nosicielstwa zmutowanego genu wśród krewnych probanta oraz diagnostykę prenatalną lub wręcz preimplantacyjną choroby.

Fakt, że defekt genu *CFTR* może być powodowany występowaniem jednej z kilkuset różnych mutacji, stwarza określone trudności diagnostyczne. Nawet możliwość sekwencjonowania wszystkich eksonów i otaczających je sekwencji intronowych nie daje gwarancji identyfikacji wszystkich defektów genu. Znanych jest bowiem szereg mutacji zlokalizowanych głęboko w intronach genu *CFTR*. Dodatkowym problemem jest zróżnicowana częstość występowania poszczególnych mutacji. Poza $\Delta F508$ i kilkoma mutacjami charakterystycznymi dla określonych populacji czy grup etnicznych większość z mutacji stanowią tzw. mutacje „prywatne” charakterystyczne tylko dla badanej rodziny.

Brak możliwości określenia pełnego genotypu CF powoduje, że w diagnostyce mukowiscydozy, śledzenie sposobu dziedziczenia się zmutowanego genu jest obok identyfikacji mutacji, często stosowaną metodą diagnostyczną. Pamiętać jednak należy, że ten typ postępowania diagnostycznego oparty na analizie markerów blisko położonych w stosunku do mutacji w genie *CFTR* wymaga po pierwsze przebadania obok chorego również jego rodziców, po drugie, że wynik analizy jest charakterystyczny tylko dla badanej rodziny i nie może być podstawą weryfikacji rozpoznania klinicznego i po trzecie, że może być on obciążony błędem wynikającym z możliwości zajścia rekombinacji pomiędzy *locus* markera a miejscem defektu genu *CFTR*.

Prowadzona na potrzeby badania rutynowego diagnostyka molekularna mukowiscydozy polega na identyfikacji mutacji występujących najczęściej w danej populacji. Powszechnie stosowane są handlowo dostępne zestawy diagnostyczne. Jednak spektrum mutacji proponowanych w zestawach, rzadko odpowiada rozkładowi częstości występowania tychże mutacji w określonej populacji. Mutacje

dobierane są bowiem na podstawie uśrednionej częstości występowania mutacji dla populacji kaukaskiej. Przykładowo, najlepszy na rynku, zestaw CF2 (*Innogenetics*) oferujący identyfikację 8 różnych mutacji nie obejmuje przynajmniej dwóch mutacji występujących w polskiej populacji z częstością większą niż pięć innych z zestawu (tab. 1).

W najbliższym czasie można się spodziewać nowych zestawów obejmujących większą liczbę mutacji. Wydaje się jednak, że rozwiązania problemów identyfikacji mutacji w genie *CFTR*, na rzecz diagnostyki medycznej, można oczekiwać od modelowych obecnie doświadczeń hybrydyzacji kwasów nukleinowych na mikroprocesorach (*gene chips*). Na powierzchni mikroprocesorów dokonuje się syntezy oligonukleotydów specyficznych dla poszczególnych mutacji. Jak się wydaje, synteza kilkuset czy kilku tysięcy takich sond nie jest problemem technicznym. Sondy te, wśród naniesionych na mikroprocesor, wyznakowanych fluorescencyjnie produktów PCR „wyłapują” zmienione w wyniku mutacji, charakterystyczne dla siebie sekwencje nukleotydów, a odpowiednia obróbka komputerowa umożliwi określenie typu mutacji.

Wszystkie znane mutacje w genie *CFTR* podzielono zasadniczo na dwie grupy: silne i słabe. Mutacje silne stanowią bezpośrednie zagrożenie życia. Zalicza się do nich głównie mutacje powodujące przedwczesną terminację (nonsens), przesunięcie ramki odczytu (*frameshift*) oraz mutacje składania mRNA. Mutacje te z reguły prowadzą do zablokowania, nieprawidłowej syntezy białka CFTR lub nieprawidłowej jego modyfikacji. Do grupy mutacji słabych zalicza się w przeważającej części mutacje zmiany sensu (*missens*), ale często również mutacje składania RNA, gdy nie są zlokalizowane w krytycznych dla funkcjonowania białka domenach (rys. 1). Mutacje tego typu odpowiedzialne są na ogół za zmianę przewodnictwa jonowego lub redukcję biosyntezy prawidłowego białka. W przypadku genotypu mutacje: silna/słaba, fenotyp określa mutacja słaba.

Nie udało się w mukowiscydozie w pełni określić ważnych z punktu widzenia klinicznego zależności między rodzajem mutacji a określoną cechą kliniczną. Jedynie w przypadku niewydolności sekrecyjnej trzustki wykazano zależność od genotypu mutacji silna/silna. W przypadku chorych z genotypami mutacje słaba/silna i słaba/słaba suplementacja trzustki nie jest konieczna.

Mukowiscydoza charakteryzuje się szerokim spektrum zmian patomorfologicznych i klinicznych. Wydaje się, że wiedza o strukturze genu *CFTR* i jego mutacjach w dużym stopniu ułatwia zrozumienie tej zmienności. Z jednej strony o fenotypie klinicznym decyduje różnorodność ponad 700 mutacji, z drugiej, wzajemne relacje pomiędzy zmutowanymi allelami. Jak się wydaje wpływ na funkcjonowanie białka, a pośrednio na fenotyp, mają niedoceniane do niedawna zmiany polimorficzne w genie *CFTR* oraz coraz częściej spotykane tzw. mutacje złożone, to jest występowanie w pojedynczym allelu dwóch różnych mutacji (pozycja *cis*). Różnorodność fenotypów CF może być powodowana również powstałymi na skutek mutacji

TABELA 1. Najczęstsze mutacje genu *CFTR* wśród chorych na mukowiscydozę w Polsce

Mutacja nazwa	lokalizacja	Częstość występowania (%)	
		w Polsce	w populacji kaukaskiej
ΔF508	ekson 10	53,9	66,0
G542X	ekson 11	2,7	2,4
1717-1G→A	intron 10	2,2	0,6
3849+10 kb*	intron 19	1,9	0,2
N1303K	ekson 21	1,9	1,3
R553X	ekson 11	1,2	0,7
2184insA*	ekson 13	1,0	0,1

* - mutacje nie uwzględnione w zestawie diagnostycznym CF2 (Innogenetics)

Typ mutacji	Klasa	Mechanizm działania
nonsens, framshift, składanie RNA	I	zablokowanie lub nieprawidłowa synteza białka
ΔF508, missens	II	zablokowanie prawidłowej modyfikacji białka
missens	III	zmiana regulacji białka
missens	IV	zmiana przewodnictwa jonowego
missens, składanie RNA	V	redukcja biosyntezy prawidłowego białka



* - Mutacje silne

Mutacje silne i słabe

Mutacje słabe

RYSUNEK 1. Klasyfikacja mutacji w genie *CFTR*

zmianami w nadrzędnej funkcji białka CFTR nad innymi kanałami chlorkowymi komórek nabłonkowych. Gromadzone są również dowody wskazujące, że wpływ na ekspresję genu *CFTR* mają geny z poza *locus CFTR*. Jeden z takich modyfikatorów zlokalizowano u człowieka w chromosomie 19.

Bezplodność jest cechą kliniczną ponad 95% mężczyzn chorych na mukowiscydozę. Fakt ten był impulsem do sprawdzenia w zespołach klinicznych mających pewne znamiona podobieństwa do mukowiscydozy, czy defekt molekularny nie polega również na mutacjach genu *CFTR*. Okazało się, że mutacje w tym genie są odpowiedzialne za szereg przebadanych chorób. Mutacje w genie *CFTR* wykazano między innymi w obu- i jednostronnej wrodzonej niedrożności przewodów nasiennych, przewlekłej chorobie oskrzelowo-płucnej czy polipach nosa. W chorobach tych z reguły na genotyp składają się mutacje łagodne lub mutacja silna i łagodna. Wykazano, że określone typy mutacji łagodnych występują w tych chorobach z częstością większą niż w populacji chorych na mukowiscydozę. W pełni uzasadnione wydaje się więc stwierdzenie, że szereg chorób o symptomatologii podobnej do mukowiscydozy można by, pod względem klasyfikacji molekularnej, zaliczyć do łagodnych form mukowiscydozy.

3. ŁZY

Średni czas przeżycia chorych na mukowiscydozę wynosi obecnie ok. 30 lat. W 1940 roku nie przekraczał jednego roku. Tak znaczne podwyższenie przeżywalności dokonało się jedynie w wyniku stosowania konwencjonalnych metod leczniczych.

Główną przyczyną śmierci chorych na mukowiscydozę jest wyniszczenie organizmu. Jest ono wynikiem nawracających obturacyjnych infekcji dróg oddechowych. Gromadzący się w oskrzelach i płucach śluz stanowi pożywkę dla rozwoju bakterii, z których przeważa najbardziej charakterystyczny dla mukowiscydozy *Pseudomonas aeruginosa*.

Postęp w leczeniu choroby osiągnięto głównie dzięki pojawieniu się antybiotyków, możliwości uzupełniania niedoboru enzymów trzustkowych oraz opracowaniu odpowiedniej diety wysokoenergetycznej. W leczeniu mukowiscydozy muszą być zaangażowani specjaliści z wielu dziedzin medycyny. Oprócz wspomnianego problemu żywienia ważna rola przypada np. fizykoterapii uczącej usuwania wydzieliny zalegającej drogi oddechowe. Jak się wydaje, nie ma i nie będzie jednej metody leczenia mukowiscydozy. Terapia musi mieć charakter kompleksowy. Duże jednak nadzieje wiąże się z nowymi strategiami leczenia. Spośród nich należy wymienić terapię genową, aktywację alternatywnych dróg transportu chlorków czy aktywację zmutowanych form białka CFTR.

Pierwsze badania kliniczne terapii genowej w mukowiscydozie rozpoczęto w 1993 r. W ciągu czterech kolejnych lat badaniu poddało się ponad 70, zdiagnozowanych molekularnie, chorych na mukowiscydozę. W jednym tylko 1995 r. aż 15 grup badawczych uczestniczyło w próbach klinicznych. W ogólnych zarysach strategia terapii przewidywała podawanie w postaci aerozolu, bezpośrednio do nabłonka dróg oddechowych bądź nabłonka nosa, cDNA genu *CFTR*. Nośnikiem „funkcjonalnego” genu były zmodyfikowane wektory adenowirusowe bądź liposomy. Wykazano, że w komórkach nabłonkowych cDNA ulega ekspresji zarówno do RNA, jak i białka. Ze względu na brak odpowiednich markerów nie ma jednak pewności, czy ekspresja genu następuje w odpowiednim dla terapii miejscu. Nie wykazano reakcji ubocznych, nawet przy wielokrotnym podawaniu dużych dawek zmodyfikowanego wirusa. Wektory okazały się „niewidoczne” dla systemu immunologicznego. W nabłonku nosa chorych poddanych próbom klinicznym stwierdzono korekcję potencjałów elektrofizjologicznych. Nie udało się jednak osiągnąć trwałej ekspresji transfekowanego genu. Wydaje się, że skuteczność terapii uzależniona jest od równomiernego rozłożenia w komórkach nabłonkowych ulegającego ekspresji genu. Nie wszystkie komórki muszą „pobrać” prawidłowy cDNA. Szacuje się, że efekt terapeutyczny może zostać osiągnięty, gdy korekcji zostanie podanych od 5 do 10% komórek nabłonkowych dróg oddechowych. Będzie to jednak możliwe dopiero po skonstruowaniu nowych generacji wektorów. Duże nadzieje wiąże się z użyciem jako wektora w terapii genowej całkowicie niepatogennego dla człowieka wirusa AAV. Wykazano, że w mięśniach gryzoni wektor ten jest stabilny przez ok. 19 miesięcy. Oprócz liposomów rozpatruje się również inne niewirusowe systemy transportu cDNA do komórek. Skuteczne mogą okazać się różnego typu kationowe polimery kondensujące DNA. DNA w takich kompleksach, utrzymywanych dzięki siłom elektrostatycznym i wzbogaconych o odpowiednie ligandy lub charakterystyczne przeciwciała, będzie ulegać ekspresji jedynie w docelowych dla terapii komórkach organizmu.

Lecznicznych efektów dla mukowiscydozy oczekuje się również od farmakologicznej regulacji transportu jonów przez błony komórkowe, względnie odbudowy defektywnego bilansu płynów i elektrolitów w komórce. Jedną z takich testowanych klinicznie prób jest podawanie amyloridu, który blokując reabsorpcję jonów Na^+ sprzyja biernej absorpcji wody. Amylorid jest niestety bardzo szybko usuwany z dróg oddechowych i terapia, aby była skuteczna, powinna być powtarzana 4 razy dziennie. Wykazano, że transportowi jonów Cl^- przez inne kanały chlorkowe obecne w komórkach nabłonkowych sprzyja podawanie np. UTP.

W przypadku pewnych typów mutacji zmiany sensu kodu genetycznego czy małych delecji możliwości terapii mukowiscydozy poszukuje się w aktywacji zmutowanych form białka *CFTR*. W wyniku np. mutacji ΔF508 defektywne białko nie jest zdolne do przejścia z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego, a następnie na powierzchnię komórki. Wykazano, że synteza *CFTR*- ΔF508 w ob-

nizonej temperaturze przywraca białku aktywność prawidłowego produktu. Podobny efekt można osiągnąć przy pomocy mutacji supresorowej. Szereg badań koncentruje się również nad możliwością przywrócenia pełnej aktywności zmutowanego białka przez zmianę jego fałdowania. Rolę modyfikacji struktury polipeptydu mogłyby odgrywać odpowiednio zmienione białka towarzyszące. Wykazano również, że aktywację białka CFTR- Δ F508 czy CFTR-G551D można osiągnąć wymuszając zwiększenie jego fosforylacji.

W terapii mukowiscydozy rozważa się również zastosowanie oligonukleotydów antysensownych. W wyniku mutacji 3849+10 kb C→T, w intronie 19, tworzy się dodatkowe miejsce składania RNA, a w dojrzałym produkcie genu *CFTR* obserwuje się 84-nukleotydową wstawkę. Zablokowanie powstałego w wyniku mutacji miejsca składania RNA eliminowałoby powstawanie w komórce zmutowanego produktu.

Jak zaznaczono, gromadzący się w drogach oddechowych chorych na mukowiscydozę śluz stanowi pożywkę dla rozwoju bakterii. Jednym ze składników tego śluzu jest DNA powstały z rozkładu tych bakterii. W badaniach klinicznych prowadzonych na całym świecie wykazano, że podawana w postaci aerozolu ludzka DNaza przyczynia się do rozluźnienia śluzu i zwiększa komfort chorych. Leczenie jest niestety bardzo drogie.

W 1983 r. wykonano po raz pierwszy u chorego na mukowiscydozę przeszczep płuc. Kilkunastoletnie doświadczenie wskazuje, że prognoza przy transplantacji płuc u dzieci z mukowiscydozą jest gorsza niż u osób dorosłych. Osiem lat przeżyło jedynie 33% poddanych transplantacji. Ten typ terapii będzie zapewne stosowany jedynie w wyjątkowych przypadkach.

„Krew, pot i łzy” nierozzerwalnie dotąd towarzyszyły mukowiscydozie. I tak już prawdopodobnie będzie. Istnieje jednak nadzieja, że przynajmniej w przypadku łez nie zawsze będą to łzy smutku.

PIŚMIENICTWO

- [1] BAL J, MACIEJKO D. Mukowiscydoza – od genu do terapii. *Kosmos* 1994; **43**: 419.
- [2] Eleventh Annual North American Cystic Fibrosis Conference. *Pediatric Pulmonology. Supl.* 14, 1997.
- [3] ESTIVILL X, BANCELLS C, RAMOS C. Biomed CF Analysis Consortium. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mut* 10, 135.
- [4] WITT M, BAL J, MACIEJKO D, MAZURCZAK T i wsp. Częstość występowania mutacji genu *CFTR* u chorych na mukowiscydozę w Polsce. *Ped Pol* 1997; **72**: 665.
- [5] ZIELENSKI J. Genetyczne determinanty zmienności fenotypowej mukowiscydozy. *Medycyna Wieku Rozwojowego*. 1997; **1**: 649.

MARKEROWE MAPY GENOMOWE I ICH WYKORZYSTANIE W HODOWLI ZWIERZĄT

MARKER GENOME MAPS AND THEIR USE IN ANIMAL BREEDING

Marek ŚWITOŃSKI

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza im. Augusta
Cieszkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Intensywny rozwój badań nad mapowaniem markerów genetycznych zwierząt domowych datuje się od początku lat dziewięćdziesiątych. Mapa genomu świni i bydła charakteryzuje się największym nasyceniem loci markerowych. Średnia odległość między sąsiednimi loci wynosi w przypadku mapy genomu świni 2,2 cM, a dla genomu bydła 2,5 cM. Zaawansowane są również prace nad utworzeniem mapy genomu kury, owcy, psa, kozy i konia. Markerowe mapy genomów są powszechnie wykorzystywane do identyfikacji loci genów kontrolujących cechy istotne z hodowlanego punktu widzenia. Przykłady takich cech omówione są w artykule.

Słowa kluczowe: mapa genomu, marker genetyczny, bydło, świnia, pies, owca, koza, koń

Summary: Marker genome maps of domestic animals have been intensively developed since early 90-ties. At present, the most advanced maps are those of pig and cattle genomes. An average interval between neighbour loci is 2.2 cM in the pig genome map and 2.5 cM in the cattle map. A significant progress was also achieved in mapping of chicken, sheep, dog and horse genomes. The maps are used for identification of gene loci controlling traits important from the breeding point of view. Representative examples of such traits are discussed.

Key words: marker genome maps, cattle, pig, dog, sheep, goat and horse genomes

Dynamiczny rozwój programów mapowania genomów zwierząt domowych datuje się od początku lat dziewięćdziesiątych, kiedy to utworzono pierwsze międzynarodowe programy, których celem było utworzenie markerowych map genomu świni (PiGMaP, 1991), bydła (BovMap, 1992) i psa (DogMap, 1993). Intensywne prace badawcze dotyczą również, oprócz wymienionych powyżej gatunków, genomu kury, owcy i konia. W ślad za programami międzynarodowymi uruchomiono w wielu

krajach również programy lokalne. Wspólnym celem tych przedsięwzięć jest stworzenie map zawierających równomiernie rozproszone markery genetyczne, które następnie mogą być wykorzystane do identyfikacji loci genów kontrolujących cechy ważne z hodowlanego punktu widzenia. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują geny odpowiedzialne za kształtowanie cech ilościowych (QTL – ang. *quantitative trait loci*), takich jak tempo wzrostu masy ciała, mięsność tuszy, wydajność mleka, plenność itp. Ponieważ cechy te są uwarunkowane poligenicznie, to praktycznie nie ma możliwości ustalania genotypu zwierząt w obrębie wszystkich loci, które wpływają na ich kształtowanie. Dlatego ocena genotypu zwierząt na potrzeby selekcji jest jedynie szacowana, jako tzw. wartość hodowlana, przy pomocy metod statystycznych. W ostatnim czasie odnotowano jednak istotny postęp w identyfikowaniu genów z dużymi efektami działania (tzw. geny główne), których udział w ogólnej zmienności genetycznej dla danej cechy jest na tyle duży, że może być uchwytny. Prace zmierzające do wykrycia takich genów prowadzone są przez wiele zespołów badawczych. W kręgu zainteresowań hodowców i genetyków są także, oprócz ilościowych cech produkcyjnych, wrodzone wady rozwojowe będące efektem mutacji genowych, cechy związane z jakością produktu czy odpornością na patogeny.

Szeroko zakrojone badania zmierzające do konstrukcji map genomów zwierząt przyniosły widoczny postęp. Szczególną rolę w tym procesie odgrywiają markery związane z polimorfizmem niekodujących sekwencji DNA, które są traktowane jako markery klasy II [16]. Równolegle rozwijane są dwie mapy dla każdego genomu:

(1) mapa fizyczna, inaczej cytogenetyczna, która wskazuje położenie markera na określonym chromosomie lub jeszcze dokładniej w określonym miejscu chromosomu oraz

(2) mapa genetyczna, która zawiera informacje o odległościach genetycznych, mierzonych w centymorganach (cM) oraz o kolejności loci w układach sprzężonych.

Szybko zwiększająca się liczba opisywanych markerów sprawia, że przedstawienie aktualnego stanu map genomowych poszczególnych gatunków zwierząt jest trudnym zadaniem. Ma na to wpływ także i to, że publikowane mapy, będące efektem pracy różnych zespołów badawczych, zazwyczaj nie obejmują wszystkich zgromadzonych do tej pory danych.

Wśród opracowań zbiorczych na szczególną uwagę zasługują prace dotyczące genomu bydła ($2n=60$) i świnii ($2n=38$). W 1995 roku opublikowano zintegrowaną mapę fizyczną i genetyczną genomu bydła, w której uwzględniono 877 loci, wśród których było 314 markerów klasy I, a 563 były markerami klasy II [6]. W 1997 roku ukazały się dwa zbiorcze opracowania dotyczące mapy genetycznej genomu bydła. W pierwszym z nich uwzględniono 746 loci polimorficznych sekwencji DNA – markery klasy II, spośród których 202 loci zlokalizowano metodami cytogenetycznymi na chromosomach. Mapa ta pokrywa aż 95% genomu, a przeciętna odległość między dowolnymi sąsiednimi markerami wynosi około 8 cM. Podobnie jak to obserwowano u innych gatunków, w tym człowieka i myszy, także długość genomu

była wyliczona na podstawie crossing over zachodzących w gametogenezie żeńskiej okazała się większa (3765 cM) niż wyliczona na podstawie rekombinacji podczas spermatogenezy (3567 cM). Całkowitą średnią długość genomu oszacowano na 3532 cM [3]. W drugiej publikacji wykorzystano informacje o dziedziczeniu 1250 markerów, wśród których było 627 markerów już znanych oraz 623 markery, które opisano po raz pierwszy. Średnia odległość genetyczna między nimi wyniosła 2,5 cM, a ogólna długość genomu okazała się jednak wyraźnie mniejsza niż w poprzednio omówionej pracy, bo wyniosła 2990 cM [10]. Trudno rozstrzygnąć, które oszacowanie całkowitej długości genomu była jest dokładniejsze. Warto jednak wspomnieć, że we wcześniejszych pracach wartość ta zawierała się w przedziale od 2800 do 3000 cM.

Zintegrowana mapa genomu świni obejmuje 1042 loci klasy II, wśród których 111 loci ma wskazaną lokalizację przy pomocy metody FISH [20]. Ogólną średnią długość genomu oszacowano na 2286 cM, co jest wartością znacznie mniejszą niż wyliczona dla genomu była, a średnia odległość między sąsiednimi loci wynosi tylko 2,2 cM. Ostatnio opublikowana mapa cytogenetyczna genomu świni obejmuje 436 loci, wśród których jest 160 genów (markery klasy I) oraz 276 markerów klasy II [29]. Warto wspomnieć, że w piśmiennictwie polskim jest praca przeglądowa, w której opisano mapę genomu świni według stanu wiedzy na koniec 1995 roku. Opracowanie to obejmuje 730 loci, w tym 191 markerów klasy I i 529 markerów klasy II [18].

Szybki postęp w mapowaniu genomu była i świni oraz towarzyszące temu problemy z połączeniem danych pochodzących z różnych ośrodków badawczych spowodowały, że coraz częściej podejmowane są inicjatywy, których celem jest opracowanie szczegółowych map poszczególnych chromosomów. Dobrym tego przykładem są dwa opracowania dotyczące zintegrowanej mapy chromosomu 6 [17] i chromosomu 7 [19] świni. Chromosomy te są szczególnie interesujące z racji występowania na nich locus genu *RYRI* – odpowiedzialnego za odporność na stres (chromosom 6) i głównego kompleksu zgodności tkankowej – SLA (chromosom 7).

Mapy genomowe innych gatunków są w różnym stopniu rozbudowane. Do znacząco zaawansowanych należy zaliczyć mapę genomu kury ($2n=78$), owcy ($2n=54$) i psa ($2n=78$). Na odnotowanie zasługują badania nad mapą genomu kozy ($2n=60$) i konia ($2n=64$). Porównawcza analiza organizacji genomów różnych kręgowców zamieszczona jest w pracy Anderssona i wsp. [1]. Można tam również znaleźć adresy internetowe, pod którymi zamieszczone są szczegółowe informacje o mapach genomów różnych kręgowców.

Nie będzie przesadne stwierdzenie, że w przypadku badań nad genomem była i świni osiągnięto już znacznie więcej niż zakładany na początku lat dziewięćdziesiątych cel, którym było utworzenie mapy o niskim nasyceniu (gęstości) loci markerowych. Na takiej mapie odległość między dwoma dowolnymi sąsiednimi

markerami miała być nie większa niż 20 cM, co oznacza, że dowolny gen położony jest o nie więcej niż 10 cM od jakiegoś markera genetycznego. Tymczasem średnia odległość między markerami w genomie świni i bydła wynosi, zgodnie z najnowszymi danymi, odpowiednio 2,2 cM [20] i 2,5 cM [10]. Można zatem uznać, że obie mapy charakteryzują się wysokim nasyceniem loci markerowych. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja markerów sprzężonych z loci dowolnych genów, a wskazanie sprzężonego markera jest pierwszym krokiem na drodze do identyfikacji poszukiwanego genu.

Poznanie genów wpływających znacząco na kształtowanie cech ilościowych jest zadaniem bardzo trudnym z racji ich poligenicznego uwarunkowania. Zadanie to można realizować zasadniczo na dwa sposoby. Po pierwsze, przez lokalizowanie markerów genetycznych sprzężonych z opisanym na podstawie obserwacji hodowlanych lub tylko domniemywanym genem o dużym efekcie działania, a następnie wybór genu-kandydata spośród loci znajdujących się w pobliżu zmapowanych markerów. Drugi sposób polega na wybraniu *a priori* genu-kandydata, a następnie poszukiwaniu zmutowanych alleli i testowaniu, czy któryś z nich jest w istotnym stopniu odpowiedzialny za kształtowanie się zmienności badanej cechy.

Na podstawie obserwacji i badań populacyjno-hodowlanych niejednokrotnie udawało się wykazać, że na cechę ilościową wpływa gen główny. Obserwacja zmienności i dziedziczenia cechy pozwalała zaproponować model dziedziczenia i przypisać efekty fenotypowe allelom takiego genu. Przykładem jest gen *Hal* (*RYR1*), który jest odpowiedzialny za odporność świń na stres, a w ślad za tym za jakość tuszy, tempo przyrostów masy ciała oraz inne cechy produkcyjne [11]. Gen receptora ryanodiny (*RYR1*) został zidentyfikowany jako odpowiedzialny za podatność na stres po 30 latach poszukiwań, w trakcie których opisano sposób identyfikacji homozygot recesywnych (osobniki podatne na stres) przy pomocy testu opartego na inhalacji halotanem, poznano sprzężone z nim markery genetyczne klasy I (loci grup krwi i polimorficznych białek krwi), zlokalizowano je na chromosomie 6 i wreszcie wskazano, że w tym obszarze chromosomu jest locus genu *RYR1*, który okazał się poszukiwanym genem kontrolującym reakcję na stres.

Trudniejsza sytuacja jest wówczas, gdy z dotychczasowych obserwacji nad zmiennością cechy nie można wyciągnąć wniosku o obecności genu o dużym efekcie działania. Wówczas, gdy dysponuje się markerową mapą genomu oraz tzw. rodzinami referencyjnymi, podejmowane są badania, których celem jest stwierdzenie, czy segregacji alleli markerowych o znanym położeniu na mapie genomu towarzyszy segregacja alleli jakiegoś nieznanego genu wpływającego w stopniu uchwytym na zmienność cechy ilościowej. W badaniach tego typu konieczne jest ustalenie genotypu, w możliwie dużej liczbie równomiernie rozproszonych loci markerowych, członków rodziny referencyjnej oraz obserwowanie zmienności analizowanych cech ilościowych. Tak zgromadzone informacje poddawane są opracowaniu statystycznemu – tzw. analizie segregacyjnej, której efektem może być wskazanie, w którym

regionie chromosomu można przewidywać obecność locus genu głównego. Jednym z pierwszych, tak uzyskanych wyników było ustalenie, że na chromosomie 4 świnia można się spodziewać loci kontrolujących m.in. cechę odtuszczenia tuszy [2]. Autorzy analizowali w 3-pokoleniowej rodzinie referencyjnej genotypy w 105 równomiernie rozproszonych loci na 15 autosomach, spośród 18 występujących w genomie tego gatunku. Pozwoliło to na wskazanie, że pomiędzy markerami S0001 i ATP1B1 prawdopodobnie znajduje (-ą?) się gen (-y?) wpływający na odkładanie tłuszczu. Oczywiście jest to dopiero pierwszy etap badań, który być może doprowadzi do wskazania konkretnego genu i opisanego jego alleli, które są odpowiedzialne za zmienność tej cechy.

Badania zmierzające do poznania genów wpływających na cechy opasowe, tuczne i rzeźne pokazały, że niektórym zmutowanym genomom można przypisać duży efekt działania, a w przypadku innych efekt taki jest prawdopodobny. Ten kierunek badań jest rozwijany przez wiele zespołów na całym świecie, a także w naszym kraju w ramach Polskiego Programu Mapowania Genomu Świnia [26]. Obecnie dwa geny wpływające na tego typu cechy są bardzo dobrze opisane pod względem molekularnym. Są to: wspomniany wcześniej gen receptora ryanodiny w genomie świnia oraz gen myostatyny bydła. W pierwszym przypadku, mutacja odpowiedzialna za powstanie niepożądanego allelu recesywnego (podatność na stres) polega na tranzykcji C→T w 1843 pozycji sekwencji genu receptora ryanodiny – *RYR1* [7]. Drugi przykład dotyczy allelu recesywnego, który w układzie homozygotycznym wywołuje pożądaną cechę hipertrofii mięśniowej u belgijskiego bydła błękitnego. Identyfikacja mutacji w genie myostatyny jako odpowiedzialnej za hipertrofię mięśniową (*mh* – ang. *muscular hypertrophy*) była możliwa dzięki szeroko zakrojonym badaniom, których celem było znalezienie markerów genetycznych ściśle sprzężonych z locus kontrolującym tę cechę. Późnym latem 1997 roku ukazały się prawie równocześnie trzy prace dotyczące wskazania genu-kandydata na chromosomie 2 bydła. Sonstegard i wsp. [23] dokonali szczegółowego porównania regionu w pobliżu centromeru chromosomu 2 bydła z regionem centromerowym ramienia długiego chromosomu 2 człowieka, ponieważ z wcześniejszych badań wynikało, że regiony te są wzajemnie korespondujące i właśnie tam prawdopodobnie występuje locus *mh*. Autorzy, analizując położenie loci siedmiu genów zmapowanych wcześniej na chromosomie 2 człowieka wskazali, że locus *mh* leży w pobliżu genu *PROC* (ang. *protein C*) lub *COL3A1* (ang. *collagen type III alpha-1*). Z kolei Smith i wsp. [22] zaproponowali, że gen myostatyny może być genem-kandydatem dla cechy hipertrofii mięśniowej. Sugestię tę sformułowano na podstawie analizy segregacji loci markerowych ściśle sprzężonych z locus *mh* oraz fizycznej lokalizacji sondy zawierającej fragment bydłeczego genu myostatyny w regionie przycentromerowym chromosomu 2. Równolegle Grobet i wsp. [8] wykazali, że 11-nukleotydowa delecja w genie myostatyny jest odpowiedzialna za powstanie recesywnego allelu, który w układzie homozygotycznym odpowiada za hipertrofię mięśniową u błękitnego bydła belgijskiego. Dla

kilku innych cech związanych z użytkowością tuczną bądź rzeźną znane są markery genetyczne sprzężone z genami głównymi dla tych cech. Aktualny przegląd informacji z tego zakresu zamieszczony jest w innych krajowych artykułach [12, 26].

Cechy związane z rozrodem mają podstawowe znaczenie dla efektywności produkcji zwierzęcej. Obserwacja zmienności cechy plenności u owiec rasy Booroola pokazała, że wielkość miotu zależy od locus *FecB*, w którym segregują dwa allele odpowiedzialne za liczbę owulujących komórek jajowych. Przez analizę segregacji zmapowanych markerów genetycznych locus genu *FecB* zlokalizowano na chromosomie 6 [15]. Do tej pory nie został wskazany jeszcze gen-kandydat, a przez to nieznane jest podłoże molekularne zmienności tej cechy. Wiadomo natomiast, że locus genu *FecB* leży między markerami BM1329 i OarAE101, które dzieli odległość 10 cM [13]. Z kolei u świń podjęto badania zmierzające do ustalenia czy gen receptora estrogenu (ESR) można uznać za gen główny dla cechy: liczebność miotu. Allel B tego genu, wykrywany przy pomocy trawienia zamplifikowanego fragmentu genu *ESR* enzymem restrykcyjnym *PvuII*, związany jest z wyższą plennością loch. Oszacowany efekt tego allelu dla pierwszego wyproszenia kształtuje się w zakresie od 0,7 [24] do 1,15 [21] prosiąt w miocie.

Rozpoznanie genetycznego podłoża odporności zwierząt na różne patogeny daje szansę na wykorzystanie tej wiedzy w selekcji. Postępy w tym zakresie nie są jeszcze zbyt duże. Na odnotowanie zasługują jednak prace zmierzające do lokalizacji w genomie świni genów receptorów dla patogennych szczepów *E. coli*, wywołujących biegunkę po urodzeniu, bądź odsadzeniu. Dowiedziono, że geny receptorów dla szczepów K88ab oraz K88ac są sprzężone z markerami, których loci występują na chromosomie 13 [5], a locus genu receptora dla szczepu F18 jest ściśle sprzężony z loci dwóch genów (*FUT1* oraz *FUT2*) kodujących (1,2) fukozylotransferazę, które są położone w pobliżu centromeru na ramieniu długim chromosomu 6 [14]. Wykryta przy pomocy trawienia enzymem restrykcyjnym *CfoI* mutacja w genie *FUT1* może być użyteczna w rozpoznawaniu zwierząt odpornych na infekcję szczepem F18.

W hodowli zwierząt duże znaczenie ma poznanie podłoża genetycznego wrodzonych wad rozwojowych. Znanych jest wiele chorób genetycznych uwarunkowanych monogenowo, ale tylko w nielicznych przypadkach znane są mutacje, które są czynnikiem sprawczym, lub markery, które są sprzężone z poszukiwanym genem. Przykładowo, u błękitnego bydła belgijskiego obserwuje się u wielu biało umaszczonych jałówek zaburzenia w wykształceniu żeńskich narządów płciowych (choroba białych jałowic – ang. *white heifer disease*). Z obserwacji wynika, że zaburzenia te mają złożone podłoże genetyczno-środowiskowe, w którym czołową rolę odgrywa mający plejotropowe działanie gen umaszczenia. Locus umaszczenia zmapowano na chromosomie 5 między markerami BP1 i ALGA293 oraz wskazano, że gen czynnika wzrostu komórek tucznych (ang. *mast cell growth factor*) jest genem -kandydatem [4]. W hodowli kóz istotnym problemem jest interseksualizm wy-

stępujący u bezroźnych samców. Samce takie mają układ chromosomów płci XX oraz nie występuje w ich genotypie locus *SRY*. Locus genu bezroźności został umiejscowiony w części dystalnej chromosomu 1 w pobliżu czterech loci: *BM3205*, *CSSM19*, *MAF46* i *BM148*. Markerem położonym najbliżej jest *CSSM19* – dzieli go odległość 5 cM od tego locus. Przypuszcza się, że gen bezroźności może mieć działanie plejotropowe, bądź jest ściśle sprzężony z autosomalnym genem zaangażowanym w determinację płci [28]. Tymczasem locus bezroźności bydła, który nie ma żadnego związku z rozwojem interseksualnym, został zlokalizowany również na chromosomie 1, ale w części proksymalnej i jest sprzężony m.in. z locus *INRA212* [9]. Ciekawe i zaskakujące jest to o tyle, że chromosomy bydła i kozy wykazują bardzo daleko idące podobieństwo. Można jednak z tego wyciągnąć wniosek, że bezroźność u kóz i bydła zależna jest od mutacji w różnych loci. W obu przypadkach nie wskazano jednak dotąd genów-kandydatów. Problem wrodzonych wad rozwojowych ma szczególny wymiar w hodowli psów, u których w wyniku prowadzenia kojarzeń krewniaczych przy tworzeniu ras dochodziło niejednokrotnie do utrwalenia w populacji recesywnych alleli, wywołujących choroby genetyczne. Ogólna liczba znanych chorób genetycznych u psów wynosi ponad 300, a wśród nich ponad 80% uwarunkowanych jest mutacją w pojedynczym locus. Z tego powodu prowadzone są bardzo intensywne prace nad utworzeniem mapy o możliwie dużej gęstości, która umożliwi lokalizację genów odpowiedzialnych za choroby genetyczne. Dotychczasowe osiągnięcia na tym polu wydają się bardzo obiecujące [25]. W badaniach nad fizycznym mapowaniem markerów na chromosomach psa, prowadzonych w ramach międzynarodowego programu DogMap, bardzo silnie zaangażowany jest zespół kierowany przez autora niniejszego artykułu [27].

Najbliższa przyszłość przyniesie niewątpliwie wiele nowych informacji o genach wpływających na cechy interesujące hodowców. Kontynuowane będą także prace nad mapowaniem kolejnych markerów genetycznych, bowiem od nasycenia mapy loci markerowymi zależy efektywność badań nad umiejscowieniem poszukiwanych genów na chromosomach.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSSON L, ARCHIBALD A, ASHBURNER M, AUDUN S, BARENDSE W, BITGOD J, BOTTEMA C, BROAD T, BROWN S, BURT D, CHARLIER C, COPELAND N, DAVIS S, DAVISSON M, EDWARDS J, EGGEN A, ELGAR G, EPPIG JT, FRANKLIN I, GREWE P, GILL III T, GRAVES JAM, HAWKEN R, HETZEL J, HILYARD A, JACOB H, JASWINSKA L, JENKINS N, KUNZ H, LEVAN G, LIE O, LYONS L, MACCARONE P, MELLERSH C, MONTGOMERY G, MOORE S, MORAN C, MORIZOT D, NEFF M, NICHOLAS F, O'BRIEN S, PARSONS Y, PETERS J, POSTLETHWAIT J, RAYMOND M, ROTHSCHILD M, SCHOOK L, SUGIMOTO Y, SZPIRER C, TATE M, TAYLOR J, VAN-

- DEBERG J, WAKEFIELD M, WIENBERG J, WOMACK J. Comparative genome organization of vertebrates. *Mammal Genome* 1996; **7**: 717–734.
- [2] ANDERSSON L, HALEY CS, ELLEGREN H, KNOTT SA, JOHANSSON M, ANDERSSON K, ANDERSSON-EKLUND L, EDFORS-LILJA I, FREDHOLM M, HANSSON I, HAKANSSON J, LUNDSTRÖM K. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 1994; **263**: 1771–1774.
- [3] BARENDSE W, VAIMAN D, KEMP SJ, SUGIMOTO Y, ARMITAGE SM, WILLIAMS JL, SUN HS, EGGEN A, AGABA M, ALEYASIN SA, BAND M, BISHOP MD, BUITKAMP J, BYRNE K, COLLINS F, COOPER L, COPPETTIERS W, DENYS B, DRINKWATER RD, EASTERDAY K, ELDUQUE C, ENNIS S, ERHARDT G, FERRETTI L, FLAVIN N, GAO Q, GEORGES M, GURUNG R, HARLIZIUS B, HAWKINS G, HETZEL J, HIRANO T, HULME D, JORGENSEN C, KESSLER M, KIRKPATRICK BW, KONFORTOV B, KOSTIA S, KUHN C, LENSTRA JA, LEVEZIEL H, LEWIN HA, LEYHE B, LIL L, MARTIN BURRIEL I, MCGRAW RA, MILLER JR, MOODY DE, MOORE SS, NAKANE S, NIJMAN IJ, OLSAKER I, POMP D, RANDO A, RON M, SHALOM A, TEALE AJ, THIEVEN U, URQUHART BGD, VAGE DI, VAN de WEGHE A, VARVIO S, VELMALA R, VILKKI J, WEIKARD R, WOODSIDE C, WOMACK JE, ZANOTTI M, ZARAGOZA P. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammal Genome* 1997; **8**: 21–28.
- [4] CHARLIER C, DENYS B, BELANCHE JI, COPPIETERS W, GROBET L, MNI M, WOMACK J, HANSET R, GEORGES M. Microsatellite mapping of the bovine roan locus: a major determinant of White Heifer Disease. *Mammal Genome* 1996; **7**: 138–142.
- [5] EDFORS-LILJA I, GUSTAFSSON U, DUVAL-IFLAH Y, ELLERGREN H, JOHANSSON M, JUNEJA R, MARKLUND L, ANDERSSON L. The porcine intestinal receptor for *Escherichia coli* K88ab, K88ac: regional localization on chromosome 13 and influence of IgG response to the K88 antigen. *Anim Genet* 1995; **26**: 237–242.
- [6] EGGEN A, FRIES R. An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Anim Genet* 1995; **26**: 215–236.
- [7] FUJII J, OTSU K, ZORZATO F, DE LEON S, KHANNA VK, WEILER JE, OBRIEN P, MACLENNAN DH. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 1991; **253**: 448–451.
- [8] GROBET L, MARTIN LJR, PONCELET D, PIROTTIN D, BROUWERS B, RIQUET J, SCHOEBERLEIN A, DUNNER S, MENISSIER F, MASSABANDA J, FRIES R, HANSET R, GEORGES M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics* 1997; **17**: 71–74.
- [9] HARLIZIUS B, TAMMEN I, EICHLER K, EGGEN A, HETZEL DJS. New markers on bovine chromosome 1 are closely linked to the polled gene in Simmental and Pinzgauer cattle. *Mammal Genome* 1997; **8**: 255–257.
- [10] KAPPES SM, KEELE JW, STONE RT, MCGRAW RA, SONSTEGARD TS, SMITH TPL, LOPEZ-CORRALES NL, BEATTIE CW. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 1997; **7**: 235–249.
- [11] KURYŁ J. Poprawa jakości mięsa i tuszy poprzez wprowadzenie do programów hodowli trzody chlewnej identyfikacji genotypu wrażliwości na stres. *Post Nauk Roln* 1996; **1**: 13–21.
- [12] KURYŁ J, PIERZCHAŁA M, KORWIN-KOSSAKOWSKA A, CYMEROWSKA-PROKOPCZYK I. Geny cech produkcyjnych u świń. *Przeł Hodow* 1997; **8**: 44–47.
- [13] LORD EA, DAVIS GH, DODDS KG, HENRY HM, LUMSDEN JM, MONTGOMERY GW. Identification of Booroola carriers using microsatellite markers. Proceedings of the 6th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production 1998; **27**: 19–22.
- [14] MEIJERINK E, FRIES R, VÖGELI P, MASABANDA J, WIGGER G, STRICKER C, NEUENSCHWANDER S, BERTSCHINGER H.U, STRANZINGER G. Two (1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and *Escherichia coli* F18 receptor (ECF18R) loci. *Mammal Genome* 1997; **8**: 736–741.

- [15] MONTGOMERY GW, LORD EA, PENTY JM, DODDS KG, BROAD TE, CAMBRIDGE L, SUNDEN SLF, STONE RT, CRAWFORD AM. The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics* 1994; **22**: 148–153.
- [16] O'BRIEN SJO, WOMACK JE, LYONS LA, MOORE KJ, JENKINS NA, COPELAND NG. Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genetics* 1993; **3**: 103–112.
- [17] PASZEK AA, SCHOOK LB, LOUIS CF, MICKELSON JR, FLICKINGER GH, MURTAGH J, MENDIOLA JR, JANZEN MA, BEATTIE C.W., ROHRER GA, ALEXANDER LJ, ANDERSSON L, ELLEGREN H, JOHANSSON M., MARIANI P, MARKLUND L, HOYHEIM B, DAVIES W, FREDHOLM M, ARCHIBALD AL, HALEY CS. First International Workshop on Porcine Chromosome 6. *Anim Genet* 1995; **26**: 377–401.
- [18] PIERZCHAŁA M. Mapa genomu świni (*Sus scrofa Domestica*). *Prace i Materiały Zootechniczne* 1996; **49**: 7–28.
- [19] ROHRER GA, ALEXANDER LJ, BEATTIE CW, WILKIE P, FLICKINGER GH, SCHOOK LB, PASZEK AA, ANDERSSON L, MARIANI P, MARKLUND L, FREDHOLM M, HOYHEIM B, ARCHIBALD AL, NIELSEN VII, MILAN D, GROENEN MAM. A consensus linkage map for swine chromosome 7. *Anim Genet* 1997; **28**: 223–229.
- [20] ROHRER GA, ALEXANDER LJ, HU Z, SMITH TPL, KEELE JW, BEATTIE CW. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research* 1996; **6**: 371–391.
- [21] ROTHSCCHILD MF, VASKE DA, TUGGLE CK, MESSER LA, McLAREN DG, SHORT TH, ECKARDT GR, MILEHAM AJ, PLASTOW GS. Estrogen receptor locus is a major gene for litter size in the pig. Book of Abstracts of the 46th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Prague 1995; 53.
- [22] SMITH TPL, LOPEZ-CORRALES NL, KAPPES SM, SONSTEGARD TS. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mammal Genome* 1997; **8**: 742–744.
- [23] SONSTEGARD TS, LOPEZ-CORRALES NL, KAPPES SM, BEATTIE C.W, SMITH TPL. Comparative mapping of human chromosome 2 identifies segments of conserved synteny near the bovine mh locus. *Mammal Genome* 1997; **8**: 751–755.
- [24] SOUTHWOOD OI, SHORT TH, PLASTOW GS. Genetic markers for litter size in commercial lines of pig. Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale (Australia) 1998; **26**: 453–456.
- [25] ŚWITOŃSKI M, ZAJĄC M. Mapowanie genomu nową możliwością badania chorób genetycznych psów. *Medycyna Wet* 1996; **52(11)**: 674–678.
- [26] ŚWITOŃSKI M, KURYŁ J. Poszukiwanie genów kontrolujących cechy tuczne, opasowe i rzeźne. *Prace i Materiały Zootechniczne* 1998 w druku; **52**: 000-000.
- [27] ŚWITOŃSKI M, ŁADON D, SCHELLING C, SCHLAPFER J, STRANZINGER G, DOLF G. Physical mapping of microsatellite markers on the dog (*Canis familiaris*) chromosomes. Proceedings of the 13th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals, Budapest, June 1–6, 1998; w druku.
- [28] VAIMAN D, KOUTITA O, OUSTRY A, ELSEJN JM, MANFREDIE, FELLOUS M, CRIBIU EP. Genetic mapping of the autosomal region involved in XX sex-reversal and horn development in goats. *Mammal Genome* 1996; **7**: 133–137.
- [29] YERLE M, LAHBIB-MANSAIS Y, PINTON P, ROBIC A, GOUREAU A, MILAN D, GELLIN J. The cytogenetic map of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Mammal Genome* 1997; **8**: 592–607.

CZYNNIK GENETYCZNY W RAKU KRTANI*

GENETIC FACTOR IN LARYNGEAL CANCER

Krzysztof SZYFTER¹, Renata JASKUŁA-SZTUL¹, Maciej KUJAWSKI¹,
Sebastian KITA², Małgorzata JARMUŻ¹, Piotr DĄBROWSKI²

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu;

²Klinika Otolaryngologii AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Rak krtani jest silnie uwarunkowany czynnikami egzogennymi, wśród których pierwszoplanową rolę pełni ekspozycja na dym tytoniowy. Jednakże indywidualną podatność na działanie związków kancerogennych obecnych w dymie tytoniowym wyznaczają czynniki osobnicze, a w tym predyspozycja genetyczna. Rola czynników genetycznych w raku krtani została wykazana na poziomie markerów molekularnych przez: (i) indywidualne różnicowanie w tkankach krtani poziomu adduktów DNA generowanych w warunkach porównywalnej ekspozycji na dym tytoniowy, (ii) niezależność tworzenia i usuwania alkilowych i aromatycznych adduktów DNA, (iii) wykazanie przy pomocy tzw. testu bleomycynowego wysokiej, indywidualnie zróżnicowanej niestabilności chromosomów w limfocytach chorych na raka krtani. Bezpośredni dowód roli czynnika genetycznego w raku krtani uzyskano w badaniach rozkładu genotypów enzymów detoksykacyjnych. Zwrócono uwagę na maskowanie czynnika genetycznego przez ekspozycję egzogenną oraz tendencję do koincydencji defektów genowych, co zwiększa ryzyko rozwoju raka krtani.

Słowa kluczowe: rak krtani, aberracje chromosomów, addukty DNA, genotypy enzymów detoksykacyjnych

Summary: Etiology of larynx cancer is strongly associated with exogenous exposure, primarily to tobacco smoke carcinogens. However, an individual sensitivity to carcinogens is genetically determined. A role of genetic factors in laryngeal cancer was demonstrated on molecular level by: (i) inter-individual variability of DNA adduct level formed under similar exposure conditions, (ii) independent capacity to form and to remove aromatic and alkylated DNA adducts and (iii) by different patterns of chromosome instability studied by „bleomycin test”. A direct proof of genetic determination of sensitivity to tobacco smoke carcinogens was obtained in the course of studies on distribution of genotypes of detoxifying

*Pracę finansowano z następujących grantów: 1) grant promotorski KBN nr 4 P05A 06910; 2) grant UICC International Cancer Technology Transfer Fellowship (ICRETT No 697)

enzymes. The study provided also an evidence for shielding of genetic factor by heavy smoking and a tendency of defected genes to coincide.

Key words: laryngeal cancer, chromosome aberrations, DNA adducts, detoxifying enzymes genotypes

Dane epidemiologiczne wskazują, że rak krtani w Polsce zajmuje trzecie miejsce po raku płuc i żołądka wśród chorób nowotworowych mężczyzn i znacznie odleglejszą pozycję w populacji kobiet [22]. Zapadalność na tę chorobę w populacji mężczyzn w Polsce stale rośnie od początku lat sześćdziesiątych i prowadzi do prawie 10 zgonów na 100 000 mężczyzn rocznie, co przewyższa wszelkie wskaźniki dotyczące krajów rozwiniętych [16]. Wysokiej umieralności towarzyszy niski wskaźnik pięcioletniego okresu przeżycia od chwili podjęcia leczenia, które w Polsce opiera się o chirurgię i radioterapię, a najczęściej o ich kombinację. Raka krtani (podobnie jak większość nowotworów głowy i szyi) cechuje niska podatność na działanie leków przeciwnowotworowych, co praktycznie eliminuje chemioterapię.

Etiologia raka krtani jest w zasadzie rozumiana jednoznacznie ze wskazaniem na palenie tytoniu jako pierwszoplanowy czynnik sprawczy. Zwrócono także uwagę na ko-kancerogenne działania silnych napojów alkoholowych, które mają szczególnie wyraźny wpływ na rozwój nowotworów górnego piętra krtani. W dalszej kolejności wymienia się ekspozycję na kancerogeny związaną z wykonywanym zajęciem (laskiarnictwo, praca z azbestem) i ogólne zanieczyszczenie środowiska naturalnego [23].

Jednakże nawet jednoznaczność wskazania czynnika sprawczego nie wyklucza roli komponenty genetycznej wpływającej na indywidualną podatność na działanie kancerogenów. Tylko u części palaczy tytoniu rozwija się jakakolwiek choroba nowotworowa i dotyczy to także osób intensywnie oddających się nałogowi palenia papierosów. Wykazanie roli czynnika genetycznego w raku krtani było przedmiotem pracy epidemiologicznej Coopera i wsp. [2], którzy badając ponad 600 chorych na nowotwory głowy i szyi stwierdzili 3,1-krotny wzrost ryzyka u krewnych pierwszego stopnia i ośmiokrotny wzrost ryzyka u rodzeństwa w porównaniu z osobami niespokrewnionymi.

Celem artykułu jest wykazanie na poziomie molekularnym roli czynnika genetycznego w modulacji wrażliwości na kancerogeny obecne w dymie tytoniowym. Badania własne w tym zakresie były prowadzone głównie technikami epidemiologii molekularnej, której celem jest określenie relacji między ekspozycją a ryzykiem rozwoju choroby [7]. W badaniach własnych można wyróżnić zarówno cykle doświadczeń, w których – często w sposób niezamierzony – wykazano udział komponenty genetycznej w procesie kancerogenezy oraz doświadczenia z założenia nakierowane na identyfikację określonych czynników genetycznych.

USZKODZENIA CHROMOSOMÓW W RAKU KRTANI

Zagadnienie opisane w tym rozdziale dotyczy ukrytej wrażliwości na uszkodzenia struktury chromosomów, których wysoka częstość występowania koreluje ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby nowotworowej. Ustalenie zależności między poziomem uszkodzeń chromosomów a stopniem ryzyka genetycznego ma charakter empiryczny i dotąd niemal wyłącznie ilościowy.

Niestabilność chromosomów w chorobach nowotworowych jest znana od długiego czasu [20]. Jednak dopiero pod koniec lat osiemdziesiątych Hsu i wsp. [10] opracowali standardową metodę pomiaru ukrytej niestabilności chromosomów w warunkach hodowli *in vitro* nazwaną testem bleomycynowym. Metoda ta jest oparta o założenie, że choroba nowotworowa jest chorobą całego organizmu, a specyfikę stanowi głównie typ i lokalizacja pierwotnego nowotworu. Dlatego niestabilność chromosomów w łatwych do pozyskania limfocytach krwi obwodowej hodowanych *in vitro* daje pogląd o patologii, której podlega organizm w trakcie choroby nowotworowej. Do medium hodowlanego dodaje się bleomycynę jako czynnik klastogenny, którego działanie na materiał genetyczny daje efekty zbliżone do skutków ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Wartością mierzalną jest liczba pęknięć chromatyd podawana w przeliczeniu na komórkę (*b/c* od ang. *breaks per cell*). Układ odniesienia stanowi poziom spontanicznych pęknięć chromatyd. Hsu [10] zaproponował, by wartość *b/c* < 0,8 traktować jako wyznacznik stabilności chromosomów, przedział *b/c* = 0,8–1,0 jako potencjalną niestabilność, a wartość *b/c* > 1,0 jako niestabilność chromosomową.

W doświadczeniach własnych [Dąbrowski i wsp., Otolaryngol. Pol., praca w druku] wykazano wzrost liczby pęknięć chromosomów po ekspozycji limfocytów na bleomycynę, przy czym był on znacząco większy w grupie 61 pacjentów z rakiem krtani niż w trzydziestoosobowej grupie kontrolnej (tab. 1). Przedział wartości *b/c* w grupie kontrolnej całkowicie mieścił się w zakresie stabilności chromosomowej według propozycji Hsu. Natomiast w grupie pacjentów z rakiem krtani część wyników mieściła się w przedziałach odpowiadających potencjalnej i rzeczywistej niestabilności chromosomów. Analiza rozkładu spontanicznych uszkodzeń wskazywała na normalność rozkładu w odróżnieniu od bimodalnego rozkładu uszkodzeń indukowanych bleomycyną. Zwłaszcza w grupie chorych na raka krtani uwidaczniała się niewielka grupa o szczególnie wysokim poziomie uszkodzeń. Nie podjęto próby wyjaśnienia odrębności tej grupy, ale zakłada się związek wysokiego poziomu uszkodzeń chromosomów z defektami naprawy DNA.

Dotychczasowe wyniki wskazują na znaczne zróżnicowanie populacji pod względem stabilności chromosomów. Zaznaczyć jednak należy, że niestabilność chromosomów wykrywana u pacjentów z chorobami nowotworowymi może być także wynikiem choroby. Tym samym wniosek o podwyższonym ryzyku wystąpienia choroby nowotworowej wraz ze wzrostem niestabilności chromosomów jest ro-

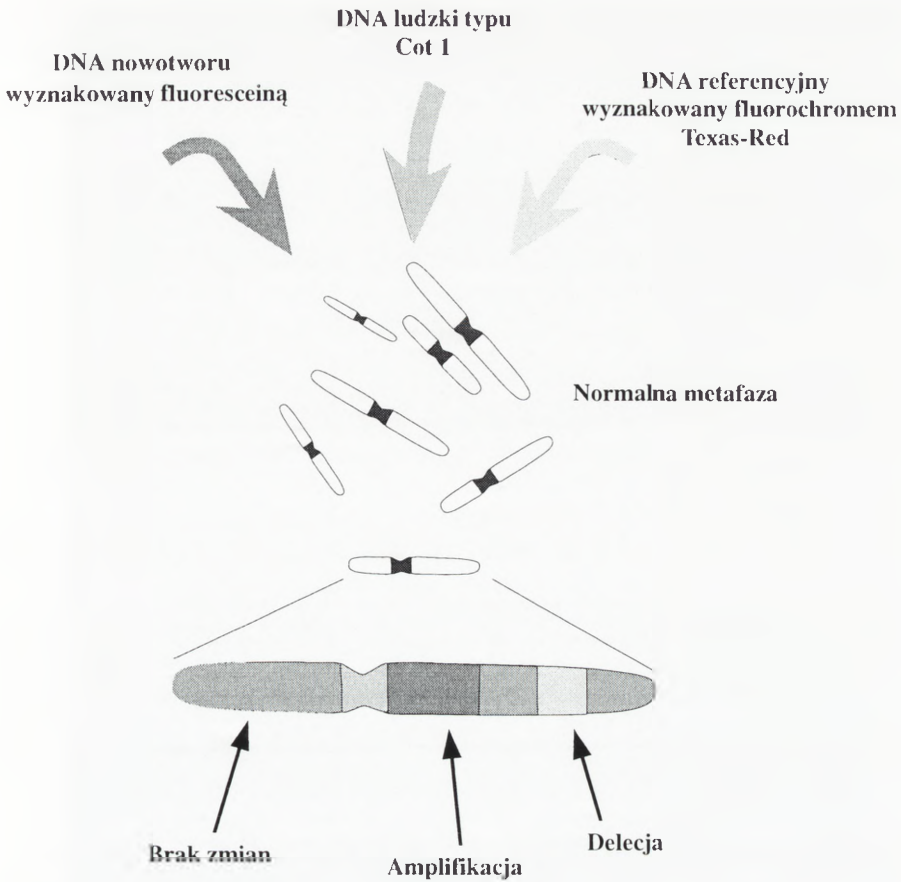
zumowaniem *ex post* i ma wyłącznie charakter hipotezy. Zakres przeprowadzonych badań własnych nie pozwala na spekulacje dotyczące możliwości występowania niestabilności chromosomowej wśród osób zdrowych, u których potencjalnie może rozwinąć się choroba nowotworowa. Niemniej, warto odwołać się tutaj do pracy Li i wsp. [15], którzy opisali podwyższone poziomy pęknięć chromosomów u zdrowych krewnych osób chorych na raka krtani, co sugeruje przynajmniej rodzinne (jeżeli nie genetyczne) uwarunkowanie występowanie niestabilności chromosomów.

Specyfika uszkodzeń w raku krtani stanowi odrębne zagadnienie w omawianej tematyce. W komórkach nowotworowych występują liczne uszkodzenia chromosomów obejmujące zarówno aberracje liczby, jak i struktury. Aberracje liczby polegają na zwielokrotnieniu liczby chromosomów (poliploidia) lub nadmiarze albo braku pojedynczych chromosomów (aneuploidia). Natomiast aberracje strukturalne są wynikiem przemieszczenia materiału genetycznego w obrębie chromosomu lub między chromosomami przy zachowaniu prawidłowej liczby chromosomów. W ostatnich latach uszkodzenia strukturalne skupiają wysiłek wielu laboratoriów dzięki rozwojowi cytogenetyki molekularnej, która spowodowała znaczący postęp w analizie struktury chromosomów. Zwłaszcza technika porównawczej hybrydyzacji genowej (ang. *comparative genome hybridization* – CGH) wykazała przydatność w cytogenetycznej analizie nowotworów [14]. Zasadą techniki jest izolacja DNA z komórek nowotworu i prawidłowych, fragmentacja i wyznakowanie obu typów DNA różnymi fluorochromami, a następnie równoczesna, kompetytywna hybrydyzacja do matrycowych chromosomów (rys. 1). Pozwala to na wizualizację regionów chromosomów, w których nastąpiła utrata lub amplifikacja genomowego DNA (rys. 2). Obraz uzyskany w ten sposób można zestawić z informacjami o lokalizacji genów znanych z udziału w procesie nowotworzenia (proto-onkogeny, geny przeciwnowotworowe, czynniki wzrostu).

Wiedza na temat uszkodzeń chromosomów w raku krtani nie jest jeszcze zadowalająca. Niemniej można już wskazać rejony chromosomów szczególnie często ulegające aberracjom [5]. Delecja krótkiego ramienia chromosomu 9, gdzie zlokalizowany jest gen p16 uchodzi za zjawisko typowe dla wczesnej kancerogenezy. Delecja krótkich ramion chromosomów 3 i 17 jest często wykrywana we wszystkich stadiach raka krtani. W przypadku delecji 17p eliminowane jest locus kodujące

TABELA 1. Liczba spontanicznych i indukowanych bleomycyną pęknięć chromosomów w limfocytach krwi obwodowej proliferujących *in vitro*

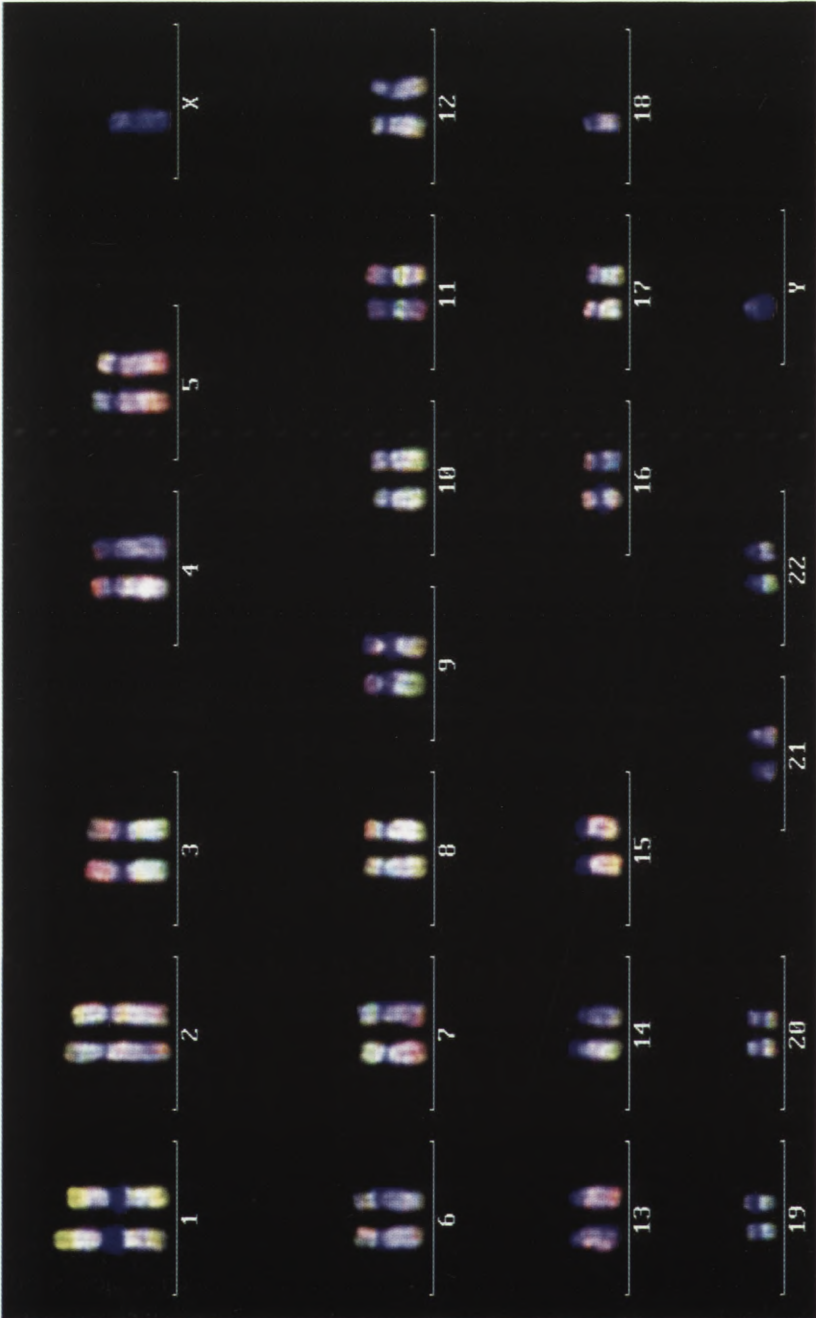
	Kontrola			Pacjenci z rakiem krtani		
	n	$\bar{x} \pm SD$	rozrzut	n	$\bar{x} \pm SD$	rozrzut
Spontaniczne	30	0,17 ± 0,06	0,06–0,30	61	0,20 ± 0,07	0,08–0,48
Indukowane bleomycyną	30	0,37 ± 0,16	0,17–0,78	61	0,68 ± 0,23	0,28–1,32



RYSUNEK 1. Zasada analizy chromosomów w komórkach nowotworowych techniką porównawczej hybrydizacji genomowej (CGH)

gen białka kontroli cyklu komórkowego p53. W zaawansowanych stadiach raka krtani często ma miejsce delecja 18q, gdzie zlokalizowano gen przeciwnowotworowy *DCC*. Odnotowano także częstą utratę chromosomu Y [13,21], co tłumaczono znaną wcześniej dezintegracją tego chromosomu w wieku starszym [13]. Niewykluczone jednak, że utrata chromosomu Y wiąże się także z nieproporcjonalnie częstą zachowalnością mężczyzn na raka krtani.

Własne, niepublikowane dane (M. Kujawski i wsp., manuskrypt w przygotowaniu) uzyskane techniką CGH na podstawie analizy materiału pochodzącego od 35 pacjentów z rakiem krtani wskazują na znaczną akumulację aberracji chromosomowych w komórkach nowotworowych. Ponadto zaobserwowano znaczącą akumulację delecji w materiale genetycznym w pierwotnych guzach krtani dających przerzuty



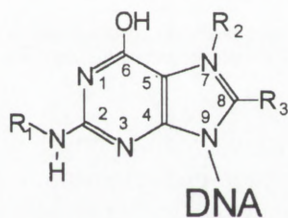
RYSUNEK 2. Wizualizacja aberracji chromosomów techniką CGH (kolor zielony – amplifikacja genomowego DNA, kolor czerwony – utrata DNA) w komórkach guza krtani (badania własne; M.Kujawski i wsp., manuskrypt w przygotowaniu)

do okolicznych węzłów chłonnych. Ustalenie to może być pomocne w diagnostyce ukrytych przerzutów.

Poszczególne obserwacje aberracji chromosomów zaczynają układać się w sekwencję wydarzeń charakterystycznych dla kolejnych etapów choroby nowotworowej. Rozpracowanie tej problematyki budzi duże zainteresowanie laryngologów, którzy oczekują dodatkowych markerów (w tym też chromosomowych) do wykorzystania w diagnostyce i prognozowaniu przebiegu choroby.

ZMIENNOŚĆ INDYWIDUALNA PROFILU USZKODZEŃ DNA POD WPLYWEM KANCEROGENÓW OBECNYCH W DYMIE TYTONIOWYM

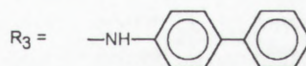
Kancerogeny oddziałują z DNA prowadząc do różnorodnych uszkodzeń strukturalnych. Kancerogeny chemiczne mogą wchodzić w reakcje chemiczne z zasadami azotowymi i po wytworzeniu wiązania kowalencyjnego tworzyć tzw. addukty kancerogen:DNA. Addukty DNA zmieniają strukturę DNA, zakłócają funkcjonowanie w procesach transkrypcji i replikacji, a nieusunięte w procesie naprawy DNA mogą zostać utrwalone w łańcuchu DNA w postaci mutacji [8]. W dymie tytoniowym występują przynajmniej trzy grupy związków chemicznych, które mają lub nabywają w wyniku aktywacji metabolicznej zdolność tworzenia adduktów DNA. Należą do nich policykliczne węglowodory aromatyczne (PWA), aminy aromatyczne i N-



PWA

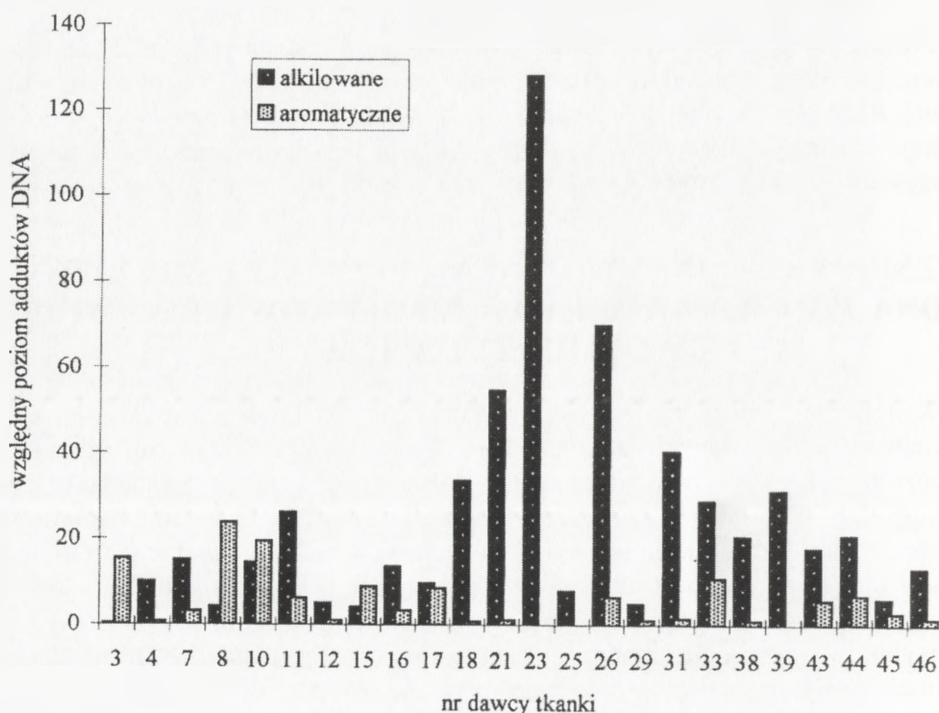


N-nitrozoaminy



aminy aromatyczne

RYSUNEK 3. Struktury podstawowych adduktów DNA tworzonych pod wpływem kancerogenów obecnych w dymie tytoniowym



RYSUNEK 4. Międzyosobnicze różnice poziomu aromatycznych i alkilowanych adduktów DNA w komórkach płaskonabłonkowego raka krtani

nitrozoaminy [11]. Dla wszystkich wymienionych grup związków preferencyjnym miejscem ataku elektrofilowego jest reszta guanozyny, a pierwszoplanowe miejsce wiązania kancerogenu przedstawione jest na ryunku 3, dodatkowo podając przykłady adduktów DNA reprezentatywnych dla wymienionych grup kancerogenów.

W badaniach własnych [18,19] opisano występowanie aromatycznych i alkilowanych adduktów DNA w tkance nowotworowej i nienowotworowej krtani oraz w leukocytach krwi obwodowej pacjentów z rakiem krtani. Poziom adduktów DNA wykazywał wysoką zmienność indywidualną. Wykazano, że pierwszoplanowy wpływ na poziom adduktów ma liczba wypalanych papierosów, co równało się wprost proporcjonalnej zależności dawka - efekt. Dalszymi czynnikami wpływającymi na poziom adduktów DNA były: wiek, płeć oraz stopień zaawansowania choroby nowotworowej.

Z punktu widzenia roli czynnika genetycznego najistotniejsze było stwierdzenie niskiego stopnia korelacji poziomów aromatycznych i alkilowanych adduktów DNA

w tkankach krtani. Ustalenie to dotyczy grupy chorych na raka krtani traktowanych jako umiarkowani palacze (ok. 20 papierosów dziennie). W warunkach zbliżonej ekspozycji na dym tytoniowy poziom aromatycznych adduktów DNA generowanych działaniem PWA praktycznie nie korelował z poziomem alkiłowanych adduktów DNA powstających w wyniku działania N-nitrozoamin (rys. 4). Współczynnik korelacji Pearsona wynosił $P = 0,28$ dla tkanki nowotworowej w grupie 26 pacjentów z rakiem krtani i $P = 0,30$ dla tkanki nienowotworowej dla 29 pacjentów. Wyniki te nie są zaskakujące, jeżeli weźmie się pod uwagę enzymy uczestniczące w metabolizmie kancerogenów [7,12]. Za aktywację metaboliczną PWA odpowiada enzym kodowany przez gen *CYP 1A1*, a aktywację N-nitrozoamin katalizują enzymy kodowane przez geny *CYP 2A6* i *CYP 2E1*. Detoksykacja aktywnych kancerogenów wydaje się przebiegać w sposób mało specyficzny. Natomiast naprawa aromatycznych i alkiłowanych adduktów DNA może przebiegać według różnych mechanizmów [6]. Aromatyczne addukty DNA są usuwane w trakcie procesu określanego jako wycinanie nukleotydu. W przypadku alkiłowanych adduktów DNA ma miejsce naprawa przez wycinanie zasady lub nawet bezpośrednie usunięcie grupy metylowej. Zatem całkowicie różne enzymy, kodowane przez inne loci genowe, są zaangażowane w tworzenie i usuwanie obu badanych grup adduktów DNA i tym samym ich genetycznie determinowana aktywność enzymatyczna moduluje indywidualny poziom adduktów DNA powstających w warunkach jednakowej ekspozycji.

ROLA ENZYMÓW DETOKSYKACYJNYCH W KSZTAŁTOWANIU RYZYKA WYSTĄPIENIA RAKA KRTANI

Wspomniane powyżej enzymy odpowiedzialne za metabolizm kancerogenów w komórkach ludzkich wydają się być właściwymi obiektami do poszukiwań genetycznej determinacji indywidualnej odpowiedzi na kancerogeny.

Metabolizm kancerogenów w ogólnym schemacie dzieli się na trzy etapy: aktywacji metabolicznej, detoksykacji aktywnych kancerogenów i naprawy uszkodzeń DNA [7]. Trój etapowość dotyczy tzw. kancerogenów pośrednich (do tej kategorii zalicza się większość znanych chemicznych związków kancerogennych), gdyż kancerogeny (mutageny) bezpośrednie nie wymagają aktywacji metabolicznej. Wyjściowo chemiczne kancerogeny pośrednie są hydrofobowe, apolarnie oraz nieaktywne (lub słabo aktywne) chemicznie. W ciągu enzymatycznych reakcji utleniania i hydroksylacji następuje zmiana właściwości fizykochemicznych kancerogenów. Reakcje aktywacji metabolicznej katalizuje grupa tzw. enzymów I fazy z rodziny cytochromu P450 wyspecjalizowanych w przemianach określonych xenobiotyków. Wynikiem aktywacji metabolicznej jest przyjęcie cech polarności, hydrofilowości i wysokiej reaktywności chemicznej. Ta ostatnia cecha manifestuje

się przez osiągnięcie charakteru czynnika elektrofilowego, co umożliwia reakcję z nukleofilowymi elementami struktury DNA. Jednakże podstawowy szlak metabolizmu kancerogenów jest nakierowany nie na reagowanie z DNA, lecz z enzymami II fazy, których zadaniem jest usunięcie aktywnych kancerogenów z komórki. Następuje to drogą sprzęgania aktywnych kancerogenów z glutationem, kwasem glukuronowym, octowym lub pewnymi aminokwasami i wydalenie związanego kancerogenu z moczem lub żółcią z organizmu. Do enzymów II fazy zalicza się S-transferazy glutationu, N-acetylotransferazy, glukoronidazy, sulfotransferazy i inne. Specyficzność tych enzymów jest prawdopodobnie znacznie ograniczona w porównaniu z enzymami fazy I. Nieusunięta część aktywnych kancerogenów może wejść w interakcję z cząsteczką DNA powodując jej uszkodzenia, co z kolei uruchamia proces naprawy DNA, którego mechanizm jest dostosowany do usuwania różnych typów uszkodzeń DNA. Najczęściej uszkodzenia są usuwane za pomocą naprawy przez wycinanie nukleotydu. Ocenia się, że wszystkie mechanizmy naprawy DNA przebiegają przy udziale ponad 100 enzymów.

Enzymy biorące udział w metabolizmie mutagenów wykazują specyficzność tkankową i zmienność indywidualną. Organem wyspecjalizowanym w przechwytywaniu i usuwaniu ksenobiotyków jest wątroba i tam właśnie enzymy aktywacyjne i detoksykacyjne osiągają najwyższe poziomy aktywności w porównaniu z innymi tkankami. Zmienność indywidualna jest w znacznej mierze wynikiem polimorfizmu genetycznego, który sprawia, że aktywność enzymatyczna w tych samych tkankach różnych osób jest zróżnicowana [12]. Najwyższe zróżnicowanie sięgające ponad tysiący razy odnotowano w grupie enzymów aktywacyjnych. Wśród enzymów detoksykacyjnych różnice nie przekraczają setek razy. Różnice aktywności enzymów uczestniczących w procesie naprawy DNA są zdecydowanie mniejsze. Ogromne zróżnicowanie aktywności enzymów aktywacyjnych spowodowało, że początkowo tutaj upatrywano główne źródło nierównomiernej podatności na działanie kancerogenów [4]. Jednym z wcześniej uzyskanych dowodów takiego związku jest analiza aktywności hydroksylazy węglowodorów aromatycznych (AHH) w grupie pacjentów z chorobami płuc. U wszystkich badanych chorych na raka płuc obserwowano wysokie poziomy aktywności AHH, a wśród osób z niską aktywnością AHH tylko sporadycznie występował rak płuc. Związek między aktywnością niektórych enzymów aktywacyjnych a ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej krtani badano technikami epidemiologii molekularnej, szukając korelacji między poziomem adduktów DNA a aktywnością wybranych enzymów aktywacyjnych. Degawa i wsp. [3] stwierdzili silną korelację między poziomem aromatycznych adduktów DNA a aktywnością następujących enzymów z rodziny cytochromu P450: CYP 1A1 (koduje AHH), CYP 2C, CYP 3A4, podczas gdy CYP 2E1 i 2A6 nie wykazywały badanej korelacji. Odkrycie to nie jest zaskakujące, bowiem (jak wspomniano wyżej) ostatnie dwa enzymy są odpowiedzialne za aktywację N-nitrozoamin i tym samym nie powinny wpływać na poziom aromatycznych adduktów DNA.

TABELA 2. Klasyfikacja i charakterystyka transferaz glutationowych

Nazwa	Lokalizacja komórkowa	Izoformy	Locus chromosomowe
GST A	cytozol	A1, A2	6p12
GST M	cytozol	M1 - M5	1p13
GST P	cytozol		11q13 (pseudogen 12)
GST T	cytozol	T1, T2	22
GST MIC	mikrosomy		

Jednakże w ostatnich latach uwaga badaczy skupia się bardziej na enzymach detoksykacyjnych, co wiąże się z faktem, że zdiagnozowana większość aktywnego nowotworu ulega usunięciu z komórki [9]. Założono zatem, że różnice aktywności enzymów detoksykacyjnych będą różnicować wrażliwość osobniczą w większym stopniu niż czynią to enzymy aktywacyjne. Pewnym ułatwieniem badań w tym kierunku było odkrycie, że rozkład aktywności enzymów aktywacyjnych i detoksykacyjnych jest niegausowski, lecz bi- lub trójmodalny, co odpowiada całkiem wyraźnemu podziałowi populacji ludzkiej na grupy charakteryzujące się wysoką, niską, a niekiedy pośrednią aktywnością enzymatyczną.

W grupie enzymów detoksykacyjnych najczęściej uwagi poświęcono S-transferazom glutationu (GST) z racji ich polimorficznego charakteru (tab. 2) oraz szerokiego spektrum substratowego, obejmującego pochodne epoksydowe PWA, aflatoksyny, α, β -nienasycone aldehydy i ketony oraz aromatyczne i alifatyczne chlorki. Różnorodność substratowa GST powoduje, że ta grupa enzymów uchodzi za jeden z ważniejszych systemów ochrony organizmu przed chemicznymi kancerogenami [17].

Najwięcej badań poświęcono roli GST jako czynnika ryzyka raka płuc [9]. Wykazano zarówno wzrost ryzyka u palaczy tytoniu mających uszkodzony gen określony jako *GST M1* „null”, jak też ochronne działanie wysokich aktywności *GST M1*

TABELA 3. Występowanie genotypów *risk* enzymów detoksykacyjnych u pacjentów z rakiem krtani

Genotyp	Pacjenci z rakiem krtani, n = 214			Grupa kontrolna, n = 240		
	n	%	OR (95% CI)	n	%	OR (95% CI)
GST M1 (-)	111	51,5	0,9(0,8-1,6)	132	55,0	1,0
GST M3 B/B	2	0,9	0,3(0,1-1,5)	7	2,9	1,0
GST T1 (-)	39	18,2	0,7(0,8-2,1)	55	22,9	1,0
GST P1 „slow”	31	14,5	1,3(0,7-1,4)	29	12,1	1,0
NAT2 „slow”	112	52,3	1,0(0,7-1,9)	128	53,3	1,0
EPHX1 „low”	102	47,8	1,3(0,8-1,9)	102	43,8	1,0

TABELA 4. Poziom aromatycznych adduktów DNA (wartości podane w tabeli oznaczają liczbę adduktów DNA na 10^8 normalnych nukleotydów) w tkankach krtani w zależności od krotności defektów genów enzymów detoksykacyjnych (*GST T1*, *GST P1*, *NAT2*, *EPHX1*)

Defekt genotypu	Nowotwór	Tkanka nienowotworowa
Brak	25,8±12,0	36,6±34,2
Pojedynczy	30,8±28,6	33,4±40,1
Podwójny	48,8±44,4	38,8±49,3
Potrójny	58,4±59,1	68,9±59,7

u osób ekspozowanych na azbest. Udział GST w modulacji ryzyka wystąpienia raka krtani u palaczy papierosów nie był wystarczająco udokumentowany [1], co stało się powodem podjęcia badań własnych. Posługując się techniką polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) porównano częstość występowania genotypów prawidłowych i uszkodzonych genów GST w odniesieniu do następujących izoenzymów. GST M1, GST M3, GST P1 i GST T1 oraz dodatkowo N-acetylotransferazy (NAT 2) i hydroksylazy epoksydowej (EH) w grupie ponad 200 pacjentów leczonych z powodu raka krtani i w grupie kontrolnej. Była to pierwsza próba ustalenia udziału uszkodzonych genów w populacji polskiej. Wyniki nie odbiegały od innych danych dotyczących populacji kaukaskiej. W grupie chorych jedynie w przypadku GST P1 stwierdzono nieznaczną nadreprezentatywność genotypu „risk”, wskazującego na wzrost ryzyka genetycznego (tab. 3). Nie stwierdzono silnej tendencji do koincydencji defektów detoksykacji sugerowanej przez niektórych autorów. Bardziej przejrzysty obraz uzyskano po uwzględnieniu danych o intensywności palenia papierosów. Najwyższy udział defektów genetycznych obserwowano w grupie osób niepalących, co dowodzi z jednej strony istotności roli defektu określonego enzymu detoksykacyjnego w warunkach niskiej ekspozycji, a z drugiej maskowania znaczenia czynnika genetycznego przez silną ekspozycję na dym tytoniowy.

Uzyskane wyniki zestawiono z danymi na temat poziomu aromatycznych adduktów DNA w tkankach krtani u tych samych chorych (K. Szyfter i wsp., Współczesna Onkol., w druku). Zarówno w komórkach nowotworu, jak też w prawidłowej tkance krtani stwierdzono wzrost poziomu adduktów DNA wraz z krotnością defektów genów enzymów detoksykacyjnych (tab. 4). Zatem można twierdzić, że niska specyficzność procesu detoksykacji kancerogenów daje komórkom możliwość korzystania z dróg alternatywnych wobec procesu sterowanego uszkodzonym enzymem. Dopiero jednoczesne zablokowanie kilku torów detoksykacji prowadzi do znaczących uszkodzeń materiału genetycznego i w konsekwencji podnosi ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej krtani.

Do badań włączono równocześnie materiał uzyskiwany od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. W przypadku tej choroby stwierdzono znaczącą nadreprezen-

tatywność uszkodzonych genów *GST P1* i *NAT 2* oraz statystycznie nieistotne podniesienie udziału *GST M1* „null”. Wydaje się, że lepiej wyrażone znaczenie czynnika genetycznego w raku pęcherza niż w raku krtani jest wynikiem różnicy ekspozycji miejscowej (krtani) i pośredniej (pęcherz).

Efekt genotoksyczny jest wypadkową ekspozycji i czynników osobniczych obejmujących także status genetyczny. Rola czynnika genetycznego zaznacza się w analizie markerów ekspozycji na kancerogeny, ale jest znacznie trudniejsza do wykazania w odniesieniu do ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej krtani. Enzymy detoksykacyjne nie wydają się być pierwszoplanowymi kandydatami do oceny ryzyka genetycznego raka krtani.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BONGERS V, SNOW GB, BRAAKHUIS BJM. The role of glutathione S-transferases in head and neck scc. *Oral Oncol* 1995; **31B**: 349–354.
- [2] COOPER MP, JOVANOVIĆ A, NAUTA JJP, BRAAKHUIS BJM, de VRIES N, van der WAAL I, SNOW GB. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; **121**: 157–160.
- [3] DEGAWA M, STERN SJ, MARTIN MV, GUENGERICH FP, FU PP, ILETT KF, KADERLIK RK, KADLUBAR FF. Metabolic activation and carcinogen-DNA adduct detection in human larynx. *Cancer Res* 1994; **54**: 4915–4919.
- [4] DERRICCO A, TAIOLI A, CHEN X, VINEIS P. Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of literature. *Biomarkers* 1996; **1**: 149–173.
- [5] FIELD JK. Genomic instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1996; **16**: 2421–2432.
- [6] FRIEDBERG EC. Relationships between DNA repair and transcription. *Ann Rev Biochem* 1996; **65**: 15–42.
- [7] HARRIS CC. Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for 1990s. *Cancer Res* 1990; **51** (suppl.): 5023–5044.
- [8] HEMMINKI K. DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis* 1993; **14**: 2007–2012.
- [9] HIRVONEN A. Combination of susceptible genotypes and individual responses to toxicants. *Environ Health Perspect* 1997; **105**: 755–758.
- [10] HSU TC. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity. *In vitro Cell Develop Biol* 1987; **23**: 591–603.
- [11] IARC. Tobacco smoking. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals toxic to humans. 1986; **38**. IARC, Lyon
- [12] JANOT F, MASSAD L, RIBRAG V, de WAZIERS I, BEAUNE Ph H, LUBOINSKI B, PARISE O jr., GOUYETTE A, CHABOT GG. Principal xenobiotic metabolizing enzyme systems in human head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 1993; **14**: 1279–1283.
- [13] JIN Ch, JIN Y, WENNERBERG J, AKERVALL JI, GRENTHE B, MANDAHL N, HEIM S, MITELMAN F, MERTENS F. Clonal chromosome aberrations accumulate with age in upper aerodigestive tract mucosa. *Mutat Res* 1997; **374**: 63–72.
- [14] KALIONIEMI A, KALIONIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITS D, GRAY JW, WALDMAN F, PINKEL D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; **258**: 818–821

- [15] LI AT, WANG TT, YANG RF, LUAN XY, WANG MYWANG. High sensitivity to mutagens in healthy blood relatives of laryngeal and hypolaryngeal cancer patients. [w:] Werner JA, Lippert BM, Rudert HH [red.] *Head and Neck Cancer - Advances in Basic Research.*, Elsevier, Amsterdam, 1996: 3–8.
- [16] LISOWSKA J, ZATOŃSKI W. Tumors of the larynx in Poland in comparison to other European countries. Etiological hypotheses. *Otolaryng Pol* 1992; **46**: 211–216.
- [17] SEIDEGARD J, EKSTROM E. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Env Health Perspectives* 1997; **105**, suppl 4: 791–798.
- [18] SZYFTER K, HEMMINKI K, SZYFTER W, SZMEJA Z, BANASZEWSKI J, YANG K. Aromatic DNA adducts in larynx cancer biopsies and leukocytes. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 2195–2199.
- [19] SZYFTER K, HEMMINKI K, SZYFTER W, SZMEJA Z, BANASZEWSKI J, PABISZCZAK M. Tobacco smoke-associated N7-alkylguanine in DNA of larynx tissue and leucocytes. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 501–506.
- [20] TLSTY TD., BRIOT A, GUALBERTO A, HALL I, HESS S, HIXON M, KUPPUSWAMY D, ROMANOV S, SAGE M, WHITE A. Genomic instability and cancer. *Mutat Res* 1995; **337**: 1–7.
- [21] WORSHAM M, BENNINGER MJ, ZARBO RJ, CAREY TE, van DYKE DL. Deletion 9p22pter and loss of Y as primary chromosome abnormalities in a squamous cell carcinoma of the vocal cord. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; **6**: 58–60.
- [22] WRONKOWSKI Z., ZWIERKO M. Nowotwory złośliwe w Polsce. [w:] Podręcznik onkologii klinicznej, International Union Against Cancer, PWN, Warszawa-Kraków, 1994, addendum.
- [23] ZATOŃSKI W, BECHER H, LISSOWSKA J, WAHRENDORF J. Tobacco, alcohol, and diet in the etiology of laryngeal cancer: A population-based case-control study. *Cancer Causes Control* 1991; **2**: 3–10.

ZASTOSOWANIE ANALIZY DNA W USTALANIU OJCOSTWA

APPLICATION OF DNA ANALYSIS IN PATERNITY TESTING

Ryszard SŁOMSKI^{1,2,3}, Jolanta KWIATKOWSKA¹, Barbara SIEMIENIAKO²,
Dobrawa NAPIERAŁA¹, Andrzej PŁAWSKI¹, Hanna CHLEBOWSKA¹,
Katarzyna DZIECHCIOWSKA³, Magdalena SŁOMSKA³

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań; ²Katedra Biochemii i Biotechnologii,
Akademia Rolnicza im A. Cieszkowskiego, Poznań; ³Laboratorium Genetyki
Molekularnej, Poznań

Streszczenie: W pracy przedstawiono możliwości zastosowania analizy polimorficznych sekwencji DNA człowieka do ustalania ojcostwa. Omówiono wykorzystanie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP) wykrywanego metodą hybrydyzacji oraz metodą PCR, a także polimorfizmu minisatelitarnego i mikrosatelitarnego DNA wykrywanego metodą PCR. Własne obserwacje z zastosowania analizy polimorficznych sekwencji minisatelitarnych i mikrosatelitarnych w sprawach dotyczących ustalania spornego ojcostwa przedstawiono na tle wyników piśmiennictwa. Krytycznie omówiono zalety i wady analizy multi locus i pojedynczego locus DNA.

Summary: The manuscript describes possibility of analysis of polymorphic DNA sequences in paternity testing. Analysis of restriction fragments length polymorphism (RFLP) detected by hybridisation with molecular probes or PCR and detection of polymorphic minisatellite and microsatellite DNA sequences by PCR is presented. Own observations from application of polymorphic minisatellite and microsatellite sequences in paternity disputes are presented. Critical discussion of multi locus and single locus analysis is described.

W połowie lat osiemdziesiątych pojawiły się doniesienia o możliwościach zastosowania analizy DNA do ustalania spornego ojcostwa. Pionierskie prace pochodzą z pracowni Aleca Jeffreysa z Uniwersytetu Leicester, który wykazał, że w genomie człowieka występują proste oligonukleotydowe sekwencje, które są charakterystyczne dla poszczególnych osobników w populacji, a metodę ich uwidocznienia przez hybrydyzację z sondą molekularną określił jako DNA *fingerprinting* przez ana-

logię do odcisków palców, które również wykazują specyficzną indywidualną [10,11]. Odkrycie Jeffreysa poprzedziły tak ważne wydarzenia, jak: wykrycie enzymów restrykcyjnych, opracowanie metod hybrydyzacji z sondami molekularnymi, sekwencjonowania DNA i syntezy oligonukleotydów, które w połączeniu umożliwiły praktyczne zastosowanie badań DNA. Stopniowo, badania DNA zaczęły zastępować badania cech grupowych krwi i polimorfizmu białek surowicy oraz badania układów grupowych enzymów erytrocytów. Obiekt badań z czynnika białkowego przesunął się w kierunku badań bezpośredniego materiału dziedziczenia – DNA. Odkrycie Jeffreysa, zajmującego się badaniami genetycznymi było szczególnie dużym skokiem dla środowiska medyczno-sądowego, zupełnie nie przygotowanego do podjęcia badań w tej dziedzinie, tym bardziej, że od odkrycia cech grupowych krwi AB0 w 1900 roku, badania markerów grupowych ulegały cały czas stopniowemu rozwojowi, osiągając w latach osiemdziesiątych bardzo wysoki poziom i homogenetyka miała wówczas do dyspozycji kilkadziesiąt układów, które mogły być wykorzystane w badaniach cech grupowych człowieka. Wyróżnić można badania dotyczące polimorfizmu antygenów krwinek czerwonych (AB, MN, Rh, Kell, Ss, Fy, Jk), badanie antygenów zgodności tkankowej HLA (A, B, C), badanie polimorfizmu białek surowicy (Gm, KM, Hp, Km, C3, PI, GC) i badanie enzymów erytrocytarnych (AcP, PGM, EsD, GLO, PGP, GPT, AK, ADA). Wartość praktyczna przeprowadzonych badań zależała od liczby analizowanych loci. W badaniu podstawowym obejmującym 11 układów: AB, MN, Rh, Kell, HP, Gm(1), AcP, PGM1, EsD, GLO, PGP szansa wykluczenia ojcostwa niesłusznie pozwanego mężczyzny wynosiła około 86%. Wykonanie dodatkowych badań innych układów, a głównie HLA zwiększyło szansę wykluczenia do 99%.

Analiza DNA wprowadziła do badań medyczno-sądowych nową jakość, ponieważ wynik analizy mógł prowadzić do sformułowania wniosku potwierdzającego lub wykluczającego ojcostwo. W naszym kraju badania DNA na potrzeby medyczno-sądowe zostały zainicjowane przez R. Słomskiego z Zakładu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu w 1991 roku. Wkrótce badania tego typu zostały podjęte przez zakłady medycyny sądowej we Wrocławiu i Lublinie. Obecnie analiza DNA wykonywana jest rutynowo w ponad 40 krajach, a w Polsce przez większość zakładów medycyny sądowej i dwa laboratoria prywatne. Rutynowe badania DNA wchodzi w skład diagnostyki molekularnej, która rozwija się w sposób bardzo dynamiczny. Autorzy niniejszej pracy przedstawili w minionych latach liczne artykuły o diagnostyce molekularnej z zastosowaniem DNA [21,26,27,28], a obecnie chcieliby zwrócić uwagę na możliwości praktycznego stosowania tego rodzaju analizy, na metodykę wykonywania badań, wyróżnić kierunki badań rutynowych oraz wskazać perspektywy ich dalszego wykorzystania w ustalaniu ojcostwa.

SATELITARNE, MINISATELITARNE I MIKROSATELITARNE POWTÓRZENIA DNA W GENOMIE CZŁOWIEKA

W badaniach klasycznych układów grupowych oznaczono fenotyp, natomiast w badaniach DNA efekt ekspresji genów jest pomijany, ponieważ określony jest wyłącznie genotyp i to zarówno dla sekwencji kodujących, jak i nie kodujących. Badaniem objęty jest szczególnie rodzaj DNA tzw. sekwencje powtórzone najczęściej nie kodujące, natomiast cechujące się olbrzymim polimorfizmem. Sekwencje powtórzone występujące w genomie człowieka można podzielić na dwie grupy: grupa I obejmuje duże powtórzenia, w których jednostki powtarzające się występują kolejno po sobie (satelitarne DNA), natomiast grupa II obejmuje sekwencje tworzące małe bloki zgrupowane lub rozproszone w genomie (minisatelitarne i mikrosatelitarne DNA) [33]. Właśnie analiza sekwencji minisatelitarnych i mikrosatelitarnych znalazła zastosowanie praktyczne. Nazwa satelitarne DNA pojawiła się, zanim wykazano, że ten rodzaj DNA zawiera powtórzenia sekwencji i wynikała z wyników wirowania preparatów DNA w gradiencie gęstości CsCl, gdzie sekwencje te tworzyły dodatkowe frakcje. Przez analogię do sekwencji satelitarnych, termin sekwencje minisatelitarne został wprowadzony przez Jeffreysa [10], po wykazaniu, że sekwencje minisatelitarne również należą do sekwencji występujących powszechnie w różnych genomach i że są najbardziej polimorficznymi sekwencjami w genomie człowieka [12,19]. Zdecydowało to o wdrożeniu badań minisatelitarnego DNA do diagnostyki molekularnej.

Wkrótce po doniesieniach Jeffreysa, Nakamura i wsp. [20] opisali dalsze sekwencje minisatelitarne i potwierdzili polimorfizm powtarzających się jednostek, jak również zaproponowali dla nich nazwę VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*) – zmienna liczba tandemowych powtórzeń. Sekwencje minisatelitarne różnią się od sekwencji satelitarnych stopniem powtarzalności, długością jednostki powtarzającej, są bardziej rozproszone w genomie, chociaż wykazują tendencje do grupowania się w regionach telomerowych chromosomów [23]. Prawdopodobnie w genomie człowieka występuje kilka tysięcy takich loci, przy czym różnią się one jednostkami rdzeniowymi. Każdy element powtarzający się złożony jest z 7 do 100 par zasad (pz). Jako pierwsze opisane sekwencje minisatelitarne należy wymienić koniec 5' genu insuliny [29], genu mieliny [2], region JH ciężkiego łańcucha immunoglobuliny [24], koniec 3' genu CH ras [4], gen alfa-globiny [9], gen kolagenu typ II [31] i gen apolipoproteiny B [14]. Jednym z najbardziej polimorficznych locus jest locus DIS7, którego allele o wielkości 1–23 kpz wykrywane są sondą MS1, przy czym prawie 99% osobników w populacji to heterozygoty. Jednostka powtarzająca złożona jest z 9 pz i należy przypuszczać, że w populacji występuje ponad 2000 alleli, które można wykryć tą sondą [13,29,33]. W wyniku

badań hybryzacyjnych z sondami molekularnymi rozpoznającymi jednocześnie kilkanaście loci otrzymuje się dla każdego osobnika charakterystyczny obraz fragmentów DNA, tzw. *fingerprint*. Do takich sond należą m.in wspomniane już wcześniej sondy 33.6 i 33.15.

Funkcja biologiczna minisatelitarnego DNA nie została dotychczas wyjaśniona. Zaobserwowano jednak, że sekwencje te występują w regionach chromosomów odpowiedzialnych za tworzenie homologicznych par i ewentualną rekombinację. Niektóre sekwencje powtórzone ulegają transkrypcji, lecz nie kodują one aminokwasów cząsteczki białkowej. Zakłada się, że minisatelitarny DNA może brać udział w procesach regulacji transkrypcji genów, określać trwałość transkryptu, a przede wszystkim w istotny sposób wpływać na strukturę poszczególnych chromosomów. Klasyfikacja sekwencji powtórzonych i ich charakterystyka została przedstawiona w artykułach przeglądowych autorów niniejszej pracy [16,17].

W DNA człowieka występują również powtórzenia mono-, di-, tri- i tetranukleotydowe. Litt i Luty [18] zaproponowali, aby te sekwencje w odróżnieniu od sekwencji satelitarnych i minisatelitarnych nazwać sekwencjami mikrosatelitami. W 1991 r. Edwards i wsp. [8] wprowadzili dodatkowo określenie STR (ang. *short tandem repeat*) – krótkie powtórzenia tandemowe. Wszystkie przebadane dotychczas sekwencje mikrosatelitarne od mononukleotydów do tetranukleotydów charakteryzują się polimorfizmem. Najwcześniej do badań diagnostycznych włączono sekwencje powtórzone (CA)_n. Inne mikrosatelity jak (A)_n i (AAAT)_n również charakteryzują się polimorfizmem i coraz częściej stosowane są w badaniach rutynowych [32]. Obecnie w diagnostyce molekularnej najbardziej przydatne są sekwencje tri- i tetranukleotydowe, które w porównaniu z sekwencjami (CA)_n wykazują dwie istotne zalety: łatwiejszy rozdział i identyfikację poszczególnych alleli oraz mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia artefaktów przy ich amplifikacji metodą PCR [16,17].

Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych znalazł zastosowanie w diagnostyce molekularnej chorób człowieka, głównie w tzw. diagnostyce pośredniej, w której nie identyfikuje się molekularnego podłoża choroby. Dziedziczenie zmutowanego genu można określić na podstawie dziedziczenia polimorficznego markera, jakim jest sekwencja mikrosatelitarna. W ostatnich latach podjęto starania, aby określić rozproszenie i częstotliwość mikrosatelitów w genomach różnych organizmów. Najczęstszym sposobem było przeszukiwanie istniejących banków genów. Tego typu podejście badawcze okazało się szczególnie ważne w przypadku powtórzeń trzech nukleotydów, gdyż kilka chorób genetycznych, np.: zespół łamliwego chromosomu X, choroba Huntingtona, dystrofia miotoniczna, powstaje w wyniku mutacji dynamicznych, w których dochodzi do zwiększenia liczby powtórzeń trzech nukleotydów [17].

W genomie człowieka występuje 50–100 tys. sekwencji powtórzonych (CA)_n, które pojawiają się średnio co 30 kpz w euchromatynie [30]. W 1989 r. trzy grupy

badawcze doniosły równocześnie o różnorodności sekwencji mikrosatelitarnych wykrytej w reakcji PCR [18,31,34]. Powtórzenia (CA)_n mogą być wyszukane w znanych sekwencjach genomu dzięki zastosowaniu programów komputerowych lub dzięki przeszukaniu bibliotek krótkich sekwencji sondami poli(dC:dA). Weissenbach i wsp. [35] obierając drugą strategię zidentyfikowali ponad 5000 mikrosatelitów w genomie człowieka, z czego 85% analizować można metodą PCR. Ponad 93% amplifikowanych markerów wykazuje polimorfizm. Druga grupa sekwencji mikrosatelitarnych obejmuje powtórzenia trzy- lub czteronukleotydowe. Rodziny powtarzających się czteronukleotydów (GATA)_n i (GACA)_n zostały zidentyfikowane i wyizolowane z satelitarnego DNA węża. Wkrótce okazało się, że tego typu powtórzenia występują u wszystkich Eukaryota i że są wysoce polimorficzne. Zaletą analizy powtórzeń czteronukleotydowych jest to, że nie muszą być rozdzielane na dużych żelach sekwencyjnych, co ma miejsce w przypadku powtórzeń (CA)_n. Trzy- i czteronukleotydowe powtórzenia występują co 300–500 tys. pz w chromosomie człowieka i są rozmieszczone równomiernie w całym genomie (około 10 000 loci) [8]. Ta grupa powtórzeń znalazła zastosowanie w praktyce, w diagnostyce molekularnej, a szczególnie w medycynie sądowej te sekwencje bardzo często poddaje się analizie, ponieważ charakteryzują się krótkimi i polimorficznymi allelami, co jest szczególnie ważne przy pracy z częściowo zdegradowanym DNA.

MATERIAŁ BADAWCZY

Materiałem wyjściowym do izolacji DNA na potrzeby diagnostyki molekularnej może być pełna krew obwodowa, a ponadto komórki płynu owodniowego (AFC), kosmówki (CVS), hodowle fibroblastów, komórki epitelialne, cebulki włosowe, plamy krwi, nasienia, fragmenty tkanek pobranych metodą biopsji cienkoigłowej i szpik kostny. Jak w każdym teście biologicznym jakość wyniku najbardziej zależy od jakości produktu początkowego. Szczególnym nadzorem należy otoczyć etapy pobrania materiału, prawidłowego oznaczenia próbki, transportu, przechowywania i izolacji DNA przy pomocy technik gwarantujących wysoką wydajność izolacji, jak i wysoki stopień czystości DNA.

Dla człowieka najlepszym materiałem wyjściowym przy ustalaniu ojcostwa jest i na pewno jeszcze przez długie lata pozostanie krew obwodowa. Do wykonania pełnych badań diagnostycznych wystarczy 1 ml krwi obwodowej pobranej na EDTA (100 µl 10% EDTA na 10 ml krwi). Inne antykoagulanty mogą być również stosowane pod warunkiem, że nie będą interferowały w następnych etapach pracy z DNA. Zauważono np., że heparyna inhibuje niektóre enzymy restrykcyjne. W przypadkach gdy wydajność preparatyki DNA jest niska, wskazane jest, aby część pobranego materiału przechowywać w -20°C . Coraz więcej uwagi poświęca się włosom jako

potencjalnemu materiałowi badawczemu szczególnie wtedy, gdy nie można pobrać krwi.

Izolacja DNA powinna być rozpoczęta zaraz po pobraniu materiału. Tkanki mogą być wprawdzie przechowywane w $+4^{\circ}\text{C}$ przez kilka dni bez widocznej degradacji DNA, jednak wskazane jest, aby materiał, który nie jest poddany izolacji DNA, w ciągu 48 godz. od pobrania zamrozić i przechowywać w -20°C do -80°C . Zarówno wydajność izolacji, jak i jakość DNA obniży się przy dłuższym przechowywaniu. Dobrym rozwiązaniem jest umieszczenie świeżo pobranych tkanek w buforze do lizy i ewentualne zamrożenie. Zapobiega to degradacji DNA. Materiał suchy (plamy) można przechowywać w kopertach w temp. pokojowej w suchym miejscu. W przypadku oparcia diagnostyki wyłącznie na reakcji PCR ilość materiału może być bardzo zredukowana nawet do ilości śladowych, np. do badań wystarczy wtedy 50 μl krwi lub 10 μl nasienia. Do reakcji PCR może być użyty materiał biologiczny pochodzący nie tylko ze świeżych, ale także z materiałów archiwalnych lub nawet muzealnych.

Szczególną uwagę należy zwrócić na zabezpieczenie materiału w czasie przewożenia i przechowywania. Jest to szczególnie ważne w badaniach medycno-sądowych, gdyż najczęściej jest to materiał unikatowy i jego ponowne uzyskanie jest niemożliwe. Jak zaznaczono DNA przechowywany jest w trzech postaciach:

- 1) jako zamrożona tkanka;
- 2) jako lizat umieszczony w buforze do lizy: 100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, 0,2% SDS pH 8,0;
- 3) jako wyekstrahowany oczyszczony preparat.

Tkanka może być przechowywana w temp. pokojowej, w 4°C , zamrożona w -20°C , -80°C , -195°C (ciekły azot) lub utrwalona w alkoholu. Lizaty (do 25 μg tkanki/ml) mogą być przechowywane w temp. 4°C przez kilka miesięcy lub w temp. pokojowej przez krótszy okres celem np. ewentualnej przesyłki. Oczyszczony preparat DNA można przesyłać w temp. pokojowej i przechowywać przez kilka miesięcy w 4°C . Nie zalecane jest częste zamrażanie i rozmrażanie preparatów DNA ze względu na możliwość rozerwania biopolimeru.

Głównym zadaniem izolacji jest uzyskanie maksymalnej wydajności dla wysoko-cząsteczkowego DNA przy jednoczesnym oczyszczeniu preparatu DNA od białek i inhibitorów enzymów, które stosowane są w następnych etapach pracy z DNA. Podczas izolacji DNA z krwi obwodowej w początkowym etapie lizy ulegają jej głównie komórki nie zawierające jąder i odrzucane są razem z surowicą. Leukocyty są zbierane, przemywane, a następnie lizowane. Odbiałczanie przebiega głównie przez ekstrakcję z fenolem i chloroformem lub wytrącanie białek NaCl lub LiCl. W końcowym etapie DNA wytrącany jest alkoholem z roztworu zawierającego monowalentne kationy. Komórki krwi, plamy nasienia i fragmenty tkanek (wątroba, mięśnie, CVS) można również poddać lizie, a następnie inkubować z proteinazą K. Odbiałczanie i wytrącanie DNA przebiegają podobnie jak dla pełnej krwi.

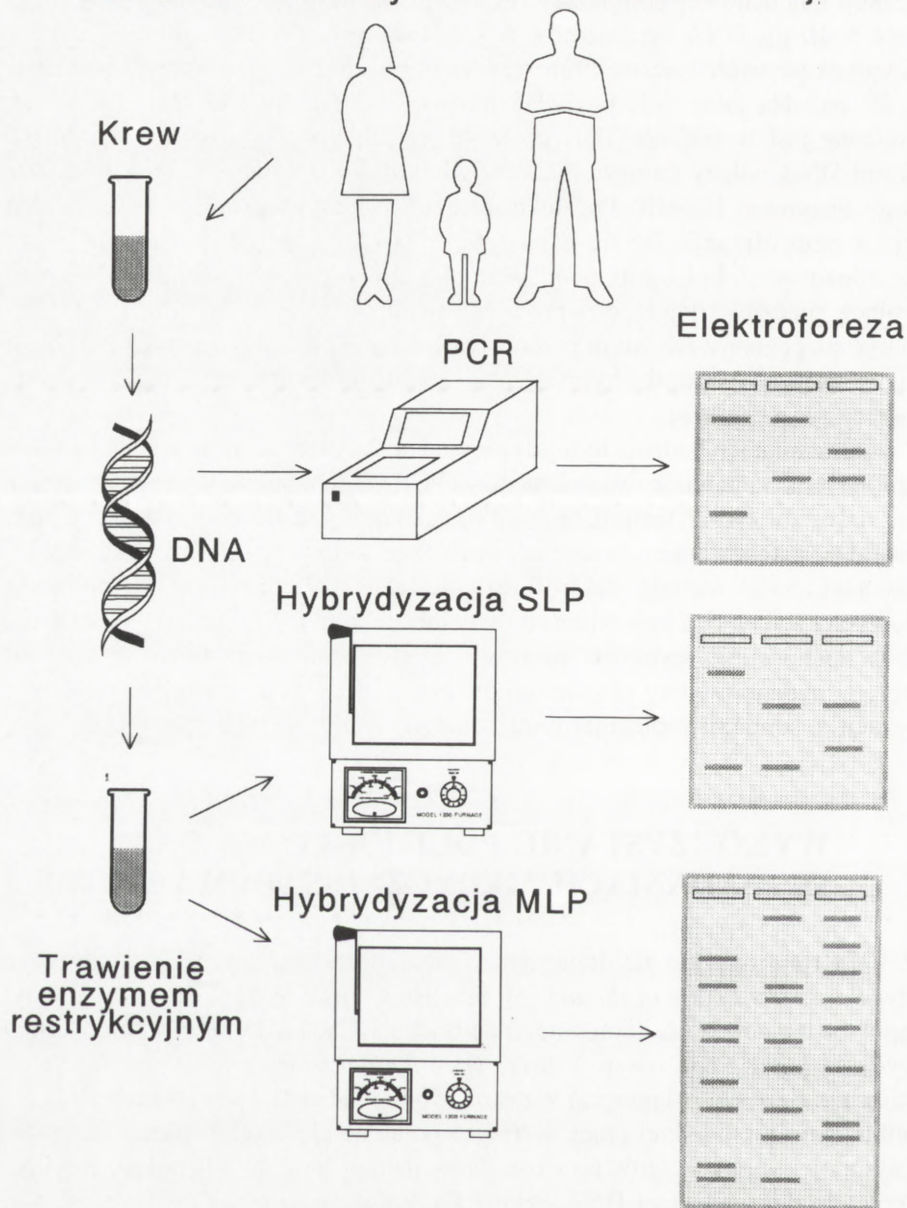
Dalsze badanie DNA może przebiegać z zastosowaniem analizy restrykcyjnej lub reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Do analizy restrykcyjnej należy przeznaczyć 5–10 µg DNA organizmów eukariotycznych. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym prowadzi się elektroforezę w 0,9% żelu agarozowym o wymiarach 20 × 20 cm. Na takie żełe nakładać można 17–20 próbek DNA. Elektroforeza prowadzona jest w buforze TBE przez 48 godzin pod napięciem 2 V/cm. Poza próbkami DNA należy nałożyć markery wielkości np. KBL lub DNA faga λ trawionego enzymem HindIII. Po elektroforezie wykonywana jest alkaliczna denaturacja i neutralizacja DNA, a następnie DNA ulega przeniesieniu na filtr nitrocelulozowy. Z kolei filtr poddawany jest hybrydyzacji z sondą molekularną zawierającą znacznik, najczęściej promieniotwórczy izotop (^{32}P) lub ligand, który może być rozpoznany swoistym przeciwciałem i reakcją kolorymetryczną. W miejscach, w których nastąpiła hybrydyzacja sondy molekularnej z DNA, powstają charakterystyczne prążki.

W ostatnich latach badania hybrydyzacyjne zostały uzupełnione i w dużej mierze zastąpione reakcją łańcuchową polimerazy (PCR). Technika PCR jest bez wątpienia jedną z najważniejszych technik biologii molekularnej, stąd zrozumiałe jest jej natychmiastowe zastosowanie w badaniach medyczno-sądowych [26,28]. Produkty PCR można analizować metodą elektroforezy w żelach agarozowych lub poliakrylamidowych i wybarwiać bromkiem etydyny lub srebrem [3]. Ogólny schemat analizy DNA w dochodzeniu spornego ojcostwa przedstawiono na rysunku 1, natomiast najczęściej badane regiony chromosomów człowieka z zastosowaniem metody hybrydyzacji z sondami molekularnymi i metody PCR ilustruje rysunek 2.

WYKORZYSTANIE POLIMORFIZMU DNA W BADANIACH MEDYCZNO-SĄDOWYCH

W 1974 roku ukazało się doniesienie Chakraborty'ego i wsp. *Exclusion of paternity: the current state of the art* [5], przedstawiające osiągnięcia hemogenetyki. Postęp w badaniach DNA doprowadził po blisko 20 latach dominacji hemogenetyki do wydania przez Penę i wsp. książki *DNA Fingerprinting: State of the Science* zbierającą najnowsze osiągnięcia z zastosowania badań DNA w praktyce [22]. Po opublikowaniu pionierskiej pracy Jeffreysa pojawiło się wiele doniesień o nowych sondach molekularnych zarówno z ośrodków naukowych, jak i firm komercyjnych. Równolegle, dla wielu loci DNA człowieka, klasyczna analiza restrykcyjna z hybrydyzacją wg Southerna została zastąpiona reakcją łańcuchową polimerazy – PCR. Doprowadziło to do wykształcenia się dwóch głównych kierunków badań, z których każdy ma swoich zwolenników i przeciwników. Badania DNA przez hybrydyzację można zasadniczo podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowi analiza po-

Schemat analizy DNA w ustalaniu ojcostwa



RYSUNEK 1. Schemat analizy DNA w ustalaniu ojcostwa

Polimorficzne markery genetyczne stosowane w badaniach medyczno-sądowych



D1S7 - MS1

D1S80

TH01 - Hydroksylaza tyrozynowa

D7S21 - MS31

ApoB - Apolipoproteina B

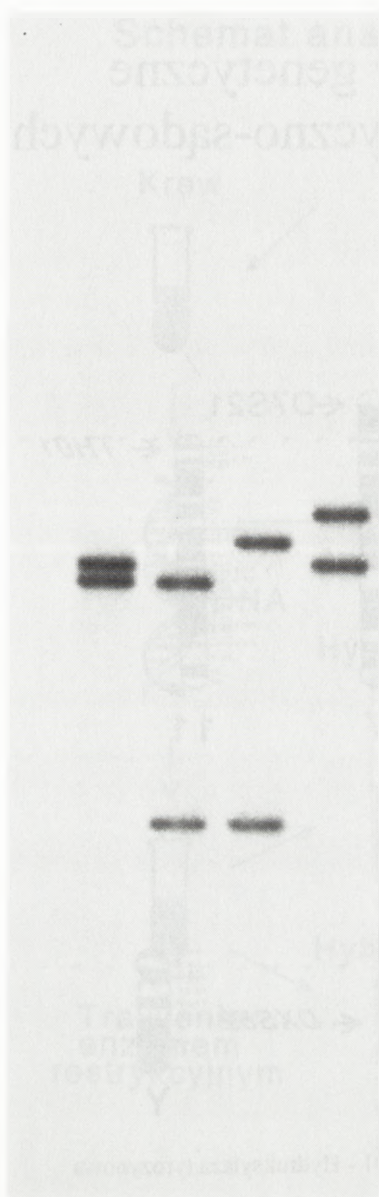
PLA2A1 - Fosfolipaza trzustkowa

D12S11 - MS43A

CYP - Cytochrom P-450

DXS52

RYSUNEK 2. Markery genetyczne najczęściej badane przy ustalaniu ojcostwa z zastosowaniem hybrydizacji z sondami molekularnymi i metody PCR: pismem normalnym zaznaczono markery oznaczane przez hybrydizację z sondami molekularnymi, a kursywą markery oznaczane metodą PCR



jedynczego locus (ang. *single locus system*, SLS), natomiast druga grupa obejmuje jednoczesną analizę wielu loci (ang. *multi locus system*, MLS). Wymienione grupy badań można określić jako analizę jednopunktową lub wielopunktową [25]. Wnioski co do identyfikacji lub pokrewieństwa badanych osób w sprawach o ustalenie ojcostwa formułowane są na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u badanych osób. Celem umożliwienia jednoznacznego wnioskowania na podstawie analizy jednopunktowej konieczne jest wykonanie badań dla co najmniej 4–6 niezależnych loci. Ocenę pokrewieństwa przeprowadza się z uwzględnieniem częstości występowania długości fragmentów DNA obserwowanych w toku badań populacyjnych. Właśnie w tej kwestii wywiązała się gorąca dyskusja naukowa, gdyż niektóre stosowane w praktyce sondy molekularne SLP (ang. *single locus probes*) wykrywają więcej niż 100 różnych fragmentów DNA i ocena częstości występowania w populacji każdego z tych wariantów nie jest możliwa. Wartość analizy jednopunktowej zależy więc od homogenności populacji i dla izolowanych grup etnicznych może być inna niż dla większej populacji. Przykłady analizy typu SLS z zastosowaniem metody hybrydyzacji z sondą molekularną przedstawiono na rysunku 3, natomiast analizę minisatelitarnego i mikrosatelitarnego DNA z zastosowaniem metody PCR – na rysunkach 4 i 5.

Alternatywnym podejściem badawczym jest analiza multi locus, analiza wielopunktowa. Jednym z najlepiej udokumentowanych badań z tej grupy jest jednoczesne wykrywanie wielu fragmentów DNA przy użyciu sondy MZ 1.3 lub (CAC)5 [22]. Wysokiej informatywności sondy towarzyszy skomplikowana

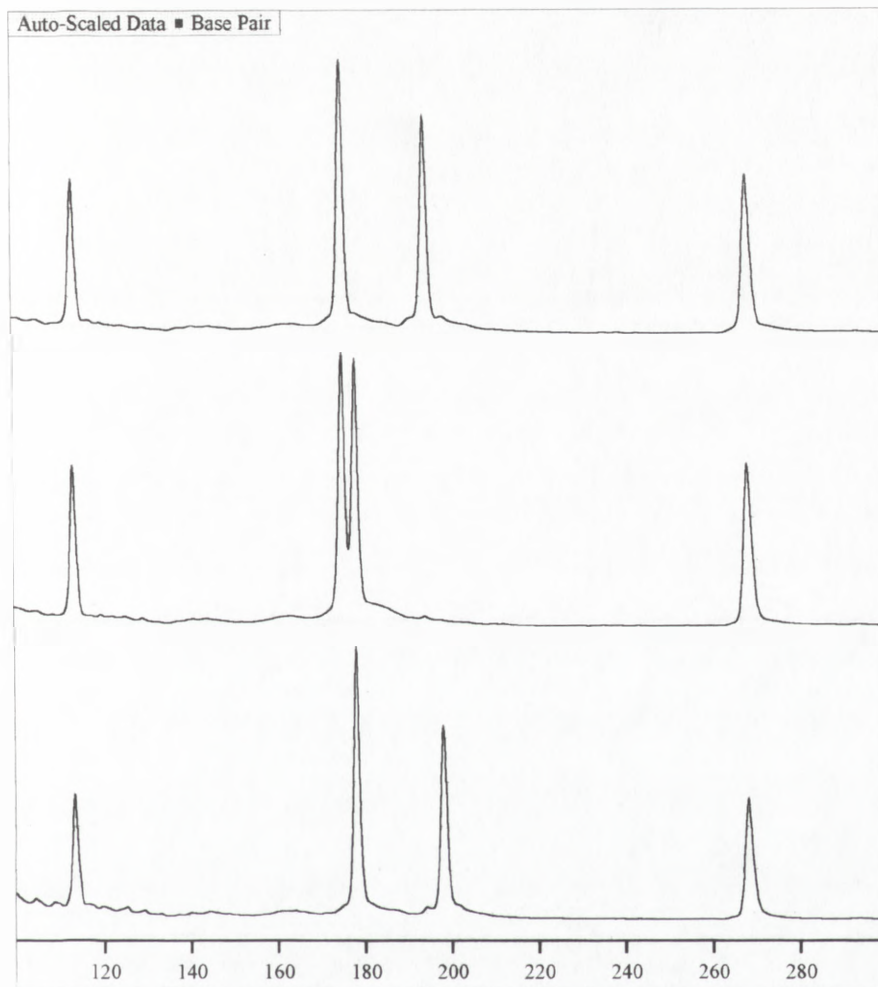
RYСУNEK 3. Ustalanie pokrewieństwa przez badanie minisatelitarnego DNA metodą hybrydyzacji z sondą molekularną (analiza SLS): DNA badanych osób: matka, dziecko, domniemany ojciec 1, domniemany ojciec 2; trawiono enzymem restrykcyjnym *Hinf*I, rozdzielono w żelu agarozowym, a następnie hybrydyzowano z sondą molekularną MS31 znakowaną 32 P i zakładano autoradiografię. Locus D7S21 wykazuje ogromny polimorfizm, prawdopodobnie w przedziale 2000–14000 pz występuje ponad 100 alleli. Większość badanych osób jest heterozygotami. Tor 1, matka; tor 2, dziecko; tor 3, domniemany ojciec 1; tor 4, domniemany ojciec 2. Zaobserwować można potwierdzenie ojcostwa domniemanego ojca 1 przy jednoczesnym wykluczeniu domniemanego ojca 2

04/May/98 12:31:32

Pharmacia DNA Fragment Manager V1.2

Page 1

D:\AMDATA\1998\DK980414.ALF



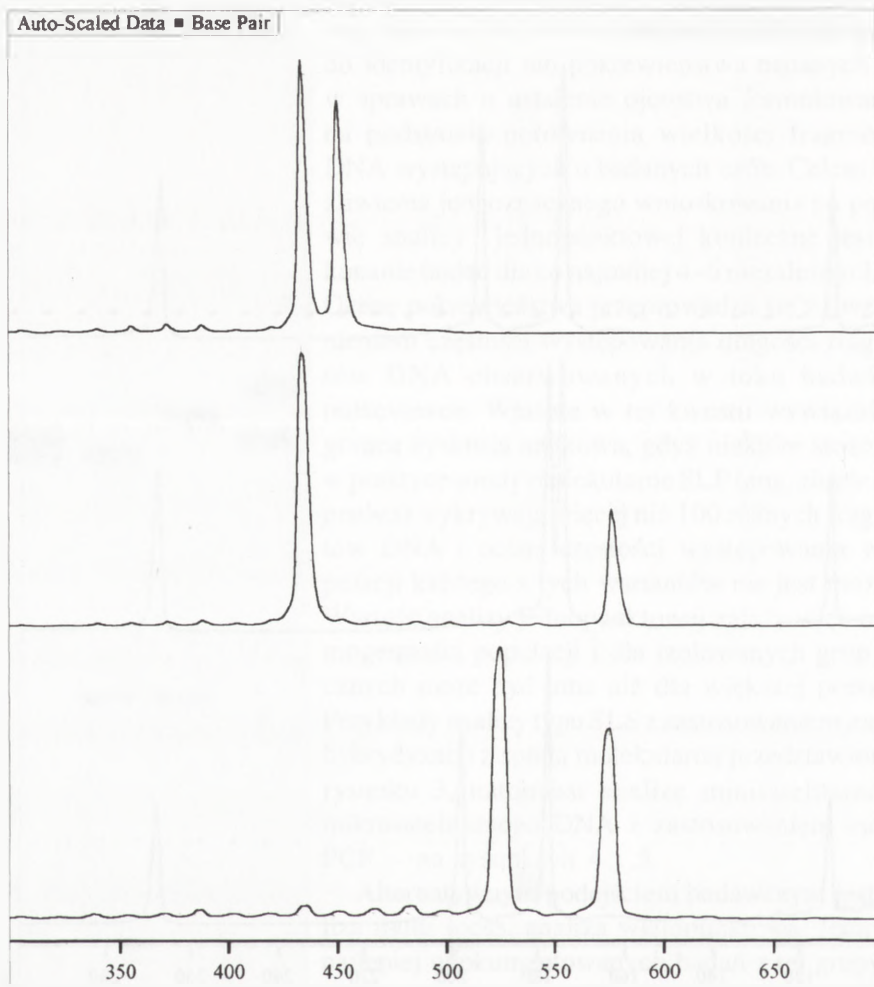
RYSUNEK 4. Ustalanie pokrewieństwa przez badanie minisatelitarnego DNA metodą PCR: Sekwencje minisatelitarne locus D1S80 w DNA matki, dziecka i domniemanego ojca amplifikowano metodą PCR, a następnie rozdzielano w żelu poliakrylamidowym z zastosowaniem laserowego zestawu ALFexpress. Pharmacia/Biotech;. Locus D1S80 wykazuje duży polimorfizm – występują w nim 32 allele o wielkości 430–814 pz. Zaobserwować można występowanie u dziecka tych samych alleli co u matki i domniemanego ojca. Tor górny – matka; tor środkowy – dziecko; tor dolny – domniemany ojciec

04/May/98 12:38:26

Pharmacia DNA Fragment Manager V1.2

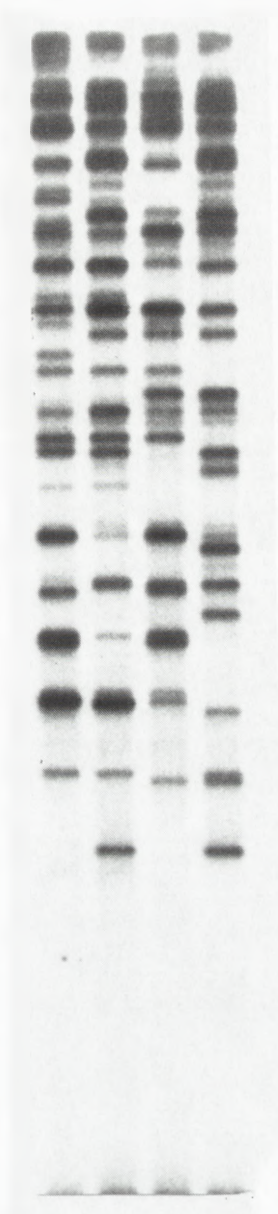
Page 1

D:\AMDATA\1998\DK980430.ALF



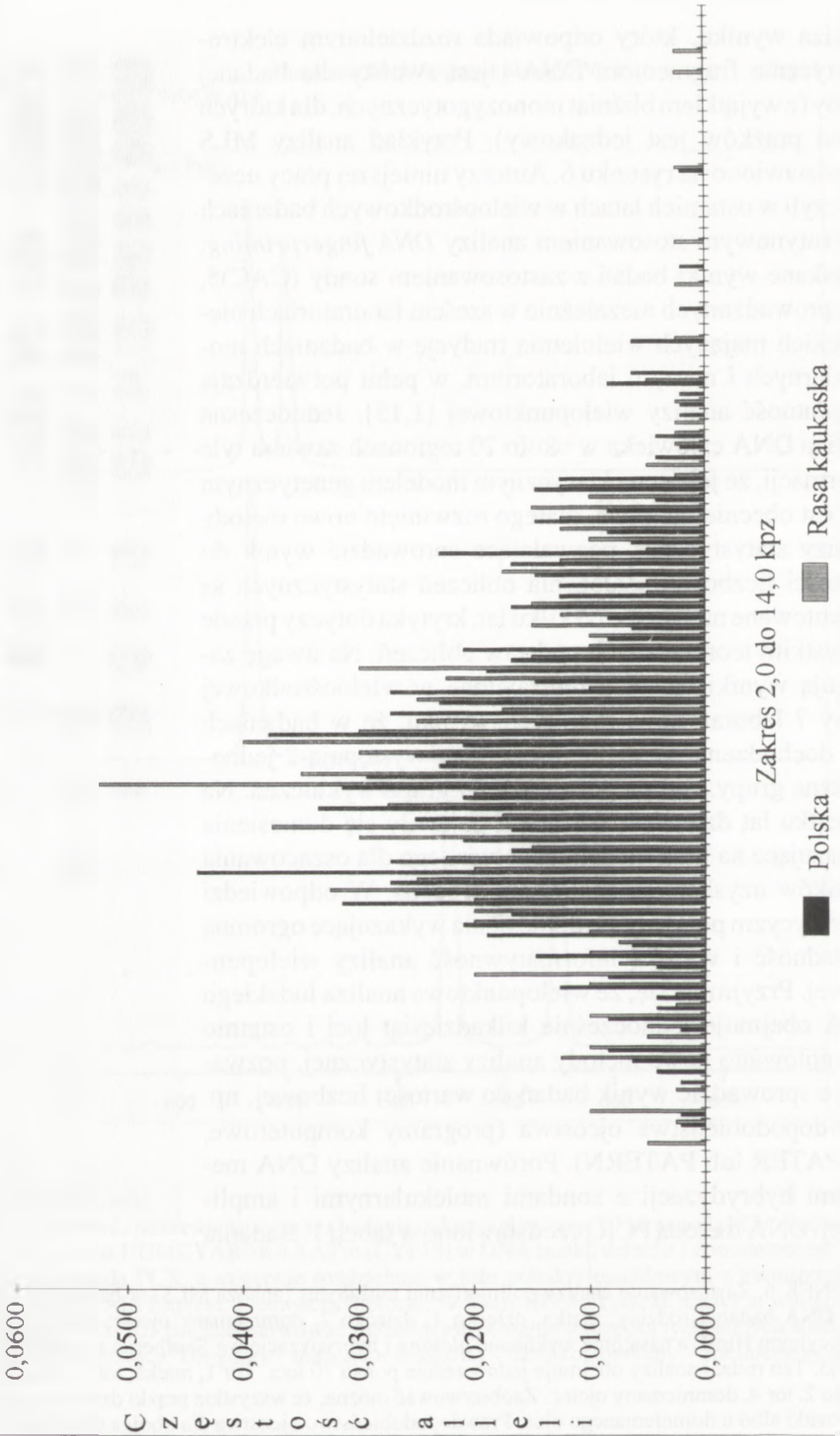
RYSUNEK 5. Ustalanie pokrewieństwa przez badanie mikrosatelitarnego DNA metodą PCR: Sekwencje mikrosatelitarne locus HUMCYAR04(AAAT)*n* (CYP19) w DNA matki, dziecka i domniemanego ojca amplifikowano metodą PCR, a następnie rozdzielano w żelu poliakryloamidowym z zastosowaniem laserowego zestawu ALFExpress. Pharmacia/Biotech;. W locus HUMCYAR04(AAAT)*n* występuje 8 alleli o wielkości 173–201 pz. Zaobserwować można występowanie u dziecka tych samych alleli co u matki i domniemanego ojca. Tor górny – matka; tor środkowy – dziecko; tor dolny – domniemany ojciec

analiza wyniku, który odpowiada rozdzielonym elektroforetycznie fragmentom DNA i jest swoisty dla badanej osoby (z wyjątkiem bliźniąt monozygotycznych, dla których układ prążków jest jednakowy). Przykład analizy MLS przedstawiono na rysunku 6. Autorzy niniejszej pracy uczestniczyli w ostatnich latach w wielośrodkowych badaniach nad rutynowym stosowaniem analizy *DNA fingerprinting*. Uzyskane wyniki badań z zastosowaniem sondy (CAC)5, przeprowadzonych niezależnie w sześciu laboratoriach niemieckich mających wieloletnią tradycję w badaniach molekularnych i naszym laboratorium, w pełni potwierdzają przydatność analizy wielopunktowej [1,15]. Jednoczesna analiza DNA człowieka w około 70 regionach zawiera tyle informacji, że jej ocena klasycznym modelem genetycznym nie jest obecnie możliwa, dlatego rozwinięto nowe metody analizy statystycznej, pozwalające sprowadzić wynik do wartości liczbowej. Założenia obliczeń statystycznych są dyskutowane na świecie od kilku lat, krytyka dotyczy przede wszystkim teoretycznych podstaw obliczeń. Na uwagę zasługują wyniki badań przedstawione w wielośrodkowej pracy 7 laboratoriów, z których wynika, że w badaniach nad dochodzeniem spornego ojcostwa występują 2 jednoznaczne grupy: grupa potwierżeń i grupa wykluczeń. Na początku lat dziewięćdziesiątych pojawiły się doniesienia wskazujące na brak modelu genetycznego dla oszacowania wyników uzyskanych analizą multi locus. W odpowiedzi na krytycyzm pojawiły się doniesienia wykazujące ogromną dokładność i wysoką informatywność analizy wielopunktowej. Przyjmuje się, że wielopunktowa analiza ludzkiego DNA obejmuje jednocześnie kilkadziesiąt loci i ostatnio przygotowano nowe metody analizy statystycznej, pozwalające sprowadzić wynik badań do wartości liczbowej, np. prawdopodobieństwa ojcostwa (programy komputerowe, np. PATER lub PATERN). Porównanie analizy DNA metodami hybrydyzacji z sondami molekularnymi i amplifikacji DNA metodą PCR przedstawiono w tabeli 1. Badania



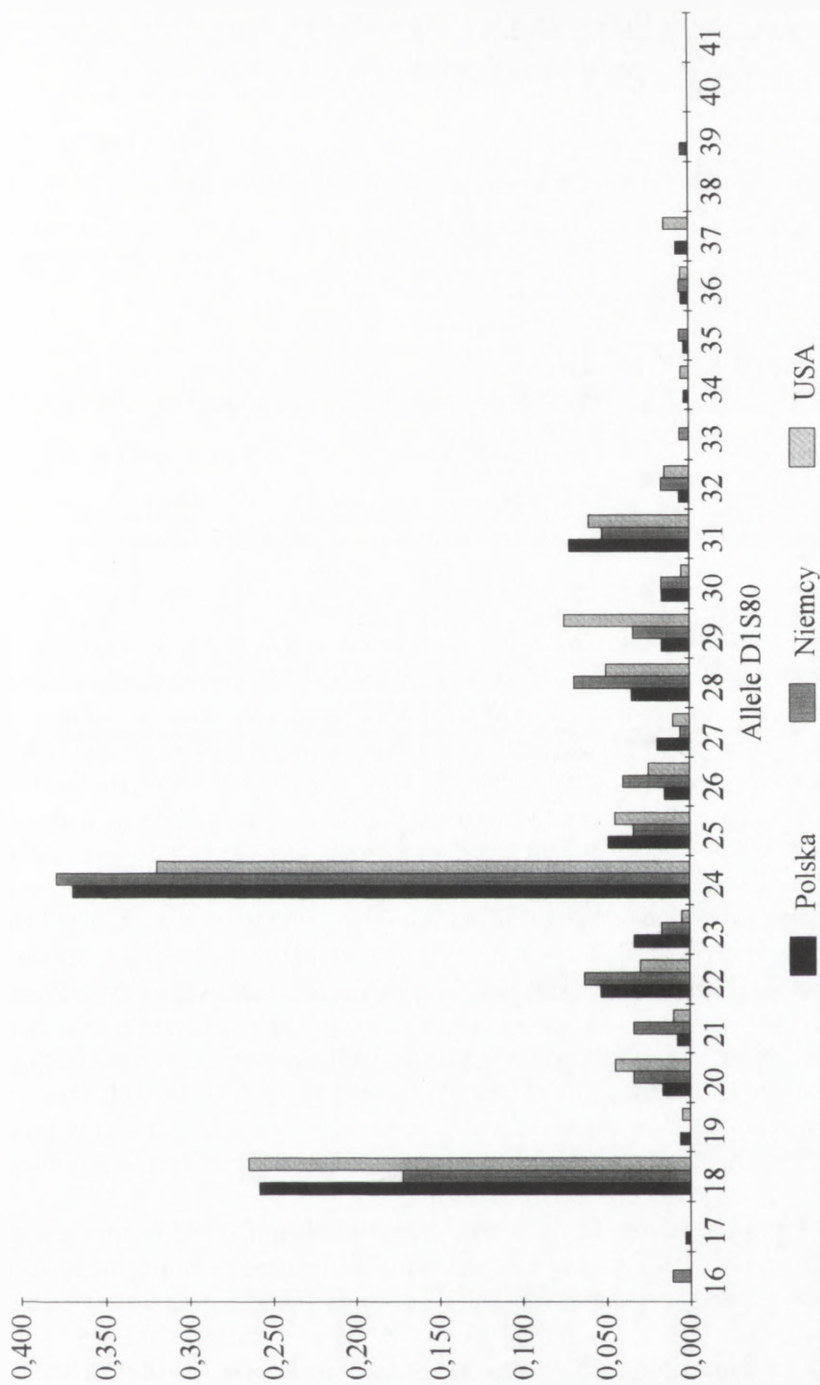
RYSUNEK 6. Zastosowanie analizy polimorfizmu multilocus (analiza MLS) w badaniach pokrewieństwa: DNA badanej rodziny: matka, dziecko 1, dziecko 2, domniemany ojciec; trawiono enzymem restrykcyjnym *Hinf*I, a następnie wykonano *blotting* i hybrydyzację wg Southerna z sondą molekularną (CAC)5. Ten rodzaj analizy obejmuje jednocześnie ponad 70 loci. Tor 1, matka; tor 2, dziecko 1; tor 3, dziecko 2, tor 4, domniemany ojciec. Zaobserwować można, że wszystkie prążki dzieci występują albo u matki albo u domniemanego ojca. Prawdopodobieństwo ojcostwa dla obojga dzieci obliczone programem PATERN wynosi 100,0000%

Częstość alleli D7S21 (MS31) w Polsce 477 chromosomów 7p22-pter



RYSUNEK 7. Częstość mnisatelitarnych alleli D7S21 (MS31) w populacji polskiej

Częstość alleli D1S80 w Polsce
6,58 chromosomów



RYSUNEK 8. Częstość minisatelitarnych alleli D1S80 w populacji polskiej

TABELA 1. Porównanie analizy hybrydizacyjnej z zastosowaniem sond molekularnych i metody PCR w dochodzeniu spornego ojcostwa

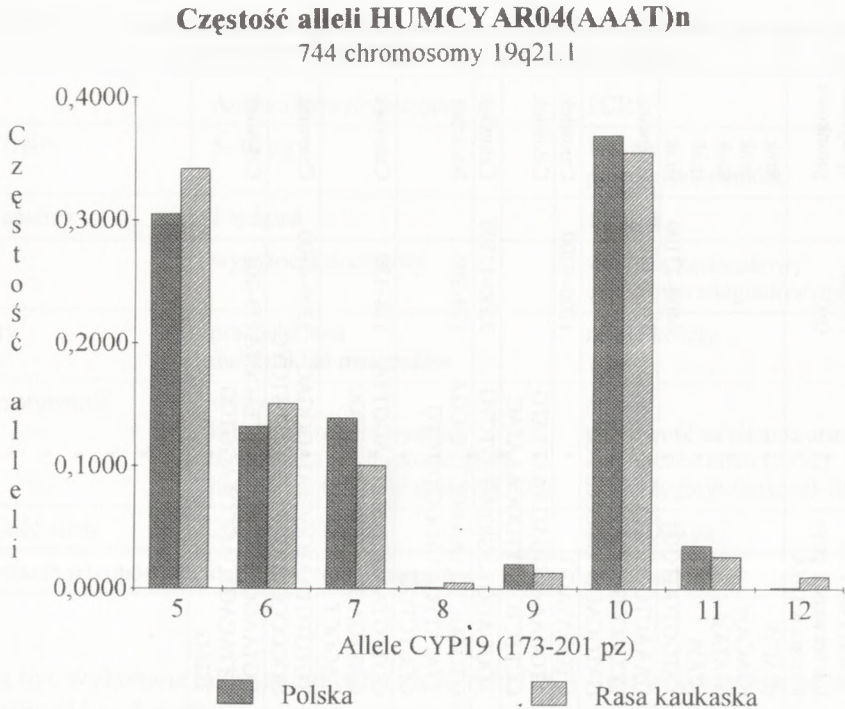
	Analiza hybrydizacyjna	PCR
Ilość DNA	5–10 µg	100 ng pojedyncze komórki
Czas analizy	1 tydzień	1 dzień
DNA	wysokocząsteczkowy	wysokocząsteczkowy częściowo zdegradowany
Koszty	pracochłonna duży nakład materiałów	niskie koszty
Informatywność	wysoka kompleksowości wyniku duża liczba alleli (ponad 100) heterozygotyczność powyżej 99%	niższa możliwość uzyskania artefaktów mała liczba alleli (5–32) heterozygotyczność 60–80%
Wielkość alleli	2000–20 000 pz	100–2000 pz
Stosowanie izotopów	izotopowo i nieizotopowo	nieizotopowo

mogą być wykonane także na mitochondrialnym DNA. Jest to korzystne ze względu na możliwość wykonania analizy w przypadkach, gdy materiał badawczy wykazuje zdegradowanie DNA i jądrowy DNA, który mógłby służyć do badań nie występuje w dostatecznej ilości. Mitochondrialny DNA nie może jednak służyć w badaniach nad dochodzeniem spornego ojcostwa, ponieważ dziedziczony jest wyłącznie od matki. Analiza mitochondrialnego DNA jest bardzo przydatna w badaniach materiałów z ekshumacji lub katastrof i może być stosowana zarówno w badaniach antropologicznych, jak i medyczno-sądowych. Wykaz najczęściej stosowanych w badaniach pokrewieństwa sond molekularnych i starterów w reakcji PCR oraz ich charakterystykę przedstawiono w tabeli 2. Jedynym istotnym ograniczeniem analizy multi locus jest konieczność stosowania wysokocząsteczkowego DNA. W badaniach spornego ojcostwa tego rodzaju ograniczenia nie występują ze względu na izolowanie DNA ze świeżo pobranej krwi. W badaniu śladów biologicznych może to stanowić bardzo istotny czynnik ograniczający i dlatego w tych badaniach coraz większe zastosowanie znajduje analiza pojedynczego locus, w szczególności w powiązaniu z reakcją PCR. Badania DNA umożliwiają również określenie pokrewieństwa w przypadkach spokrewnienia rodziców [6,7].

W naszym Laboratorium standardowa analiza obejmuje wykonanie zarówno analizy multi locus, jak i pojedynczego locus. W badaniach multi locus najczęściej stosowane są enzymy *HinfI* lub *HaeIII* i sonda (CAC)₅, natomiast w badaniach pojedynczego locus wykonywane są analizy hybrydizacyjne dla MS31 i MS43A oraz badania metodą PCR dla D1S80, ApoB, D17S30, DXS52, HUM-

TABELA 2. Przykłady polimorficznych loci DNA stosowanych w ustalaniu ojcostwa

Locus	Lokalizacja	Sonda, gen	Motyw	Allele (pz)	Heterozygacyjność (%)	Mutacje	Metoda badań	Startery dla PCR lub sekwencja powtórzona w DNA	Produkt (pz)	Specyficzność gatunkowa
Multilocus		(CAC)5	15				Hybryd.	(CAC)5		Brak
Multilocus		(GACA)4	16/23				Hybryd.	(GACA)4		Brak
Multilocus		(GATA)4	16/23				Hybryd.	(GATA)4		Brak
Multilocus		(CA)8	16				Hybryd.	(CA)8		Brak
Multilocus		F10	12		0,004		Hybryd.	TATGTTGGTGGT	4400-23100	Brak
DIS80	1p	pMCT118	16	31	84		PCR	GAACCTGGCCCTCCAAACACTG CCCGCGTCTTGTGGG GATGCACGTGCCCTTGC	430-814	Człowiek
DIS7	1p33-p35	MS1	9	>100	99	0,05	Hybryd.	GTGGAYAGG	1200-9200	Człowiek
APOB	2p24-p23	Apolipoproteina B	14				PCR	ATGGAACGGAGAAATTATG CCTTCTCACTTGGCAAATAC		Człowiek
D7S21	7p22-pter	MS31	21		97	0,054	Hybryd.	TGGGAGGTGGRYAGTGTCTG	3200-13300	Człowiek
HUMTH01	11p15,5	Hydroksylaza	4	8	79		PCR	GTGGCTGAAAAGCTCC CGA TTATATTCAAAGGTATCTG GGCTCTGG	179-203	Naczelne
HUMPLA2A	12q23-qter	Fosfolipaza	3	8	72-82		PCR	GGTTGAAGCTCCATGAGGTTA GATTGAGCACTTACTATGTGC CAGGCT	118-139	Człowiek
DIS11	12q24.3-qter	MS43A	45		96	0,002	Hybryd.	TGTCGTAAATGGGTATAGGGAG GGCCCCGGGAAGGGGTGTGYG	3300-4300	Człowiek
HUMCYR04	15q21.1	Cytoschrom P-450	4	8	57-78		PCR	GGTAAGCAGGTACTTAGTAGCTA GTTACAGTGAGCCCAAGGTCC TGAG	173-201	Człowiek



RYSUNEK 9. Częstość mikrosatelitarnych alleli HUMCYAR04(AAAT)_n (CYP19) w populacji polskiej

PLA2A1(AAT)_n, HUMTH01(AATG)_n, HUMCYAR04(AAAT)_n. Własne doświadczenie z ostatnich lat wskazuje, że najlepsze wyniki uzyskuje się po wykonaniu jednej analizy multi locus, dwóch analiz pojedynczego locus metodą hybrydyzacji i dwóch analiz pojedynczego locus metodą PCR.

W ostatnim czasie coraz więcej pracowni skupionych wokół instytutów badawczych lub laboratoriów prywatnych przystępuje do diagnostyki molekularnej. Uzyskiwane wyniki służą często w doborze terapii, mają potwierdzić lub wykluczyć nosicielstwo choroby, zidentyfikować uszkodzony gen, potwierdzić lub wykluczyć pokrewieństwo oraz określić patogen. Wzrost zainteresowań badaniami molekularnymi wiąże się przede wszystkim z możliwością uzyskania wyników metodą PCR. Rozwojowi badań diagnostycznych powinien towarzyszyć rozwój systemu atestacji i standaryzacji badań molekularnych. Dla przykładu w krajach Europy Zachodniej powstały instytucje nadzorujące w ciągły sposób jakość wykonywanych badań. Szczególnie wyraźnie zauważyć można działanie atestacyjne właśnie w badaniach z zakresu medycyny sądowej i kryminalistyki nadzorowane w Europie przez EDNAP, a w Niemczech przez GDNAP. Powstaje w ten sposób sieć laboratoriów wyko-

nujących badanie na najwyższym poziomie i ułatwiona jest również weryfikacja badań. Poszczególne allele oznaczane u człowieka mogą być określone liczbami, stąd w najbliższym czasie wynik badań obejmujących kilka loci zostanie opisany liczbą, która będzie charakterystyczna wyłącznie dla badanej osoby.

PIŚMIENICTWO

- [1] BOHMI I, KRAWCZAK M, NURNBERG P, HAMPE J, HUNDRIESER J, POCHE H, PETERS C, SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J, NAGY M, POPPERL A, EPPLER JT, SCHMIDTKE J. Paternity testing with oligonucleotide probe (CAC)₅/(GTG)₅ a multi-center study. *Forensic Science International* 1993; **59**: 101–107.
- [2] BOYLAN KBM, TAKAHASHI N, DIAMOND M, HOOD E, PRUSINER SB. DNA length polymorphism located 5' to the human myelin basic gene. *Am J Hum Genet* 1987; **40**: 387–400.
- [3] BUDOWLE B, CHAKRABORTY R, GIUSTI AM, EISENBERG AJ, ALLEN RRC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 137–144.
- [4] CAPON DJ, CHEN EY, LEVINSON AD, SEEBURG PH, GOEDDEL DV. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 1983; **302**: 33–37.
- [5] CHAKRABORTY R, SHOW M, SCHULL WJ. Exclusion of paternity: The current state of the art. *Am J Hum Genet* 1974; **26**: 477–488.
- [6] CZARNY M, JANISZEWSKA H, KWIATKOWSKA J, CHLEBOWSKA H, SIEMIENIAKO B, SŁOMSKI R. Czy analiza DNA jest zawsze skuteczna: Problemy w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadku bliskiego pokrewieństwa domniemych ojców. *Arch Med Sąd i Krym* 1995; **XLV**: 287–295.
- [7] CZARNY M, SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J, CHLEBOWSKA H. Skuteczność analizy DNA w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadkach bliskich pokrewieństw. *Arch Med Sąd i Krym* 1996; **XLVI**: 289–297.
- [8] EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND HA, CASKEY CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 746–756.
- [9] HIGGS DR, WAINSCOT JS, FLINT J, HILL AVS, THEIN SL, NICHOLS RD, TEAL H, AYYUB H, PETO TEA, FALUSI AG, JARMAN AP, CLEGG JB, WEATHERALL D. Analysis of the human globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 5165–5169.
- [10] JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SW. Hypervariable "minisatellite" region in human DNA. *Nature* 1985; **314**: 67–73.
- [11] JEFFREYS AJ, WILSON V, THIEN SW. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 1985; **316**: 76–79.
- [12] JEFFREYS AJ, NEUMANN R, WILSON V. Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell* 1990; **60**: 473–485.
- [13] JEFFREYS AJ, MACLEOD A, TAMAKI K, NEIL DL, MONCKTON DG. Minisatellite repeatcoding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 1991; **354**: 204–209.
- [14] KNOTT TJ, WALLIS SC, PEASE J, POWELL LM, SCOTT J. A hypervariable region 3' to the apolipoprotein B gene. *Nucl Acid Res* 1986; **14**: 9215–9216.
- [15] KRAWCZAK M, BOCKEL B. 1993; The formal analysis of multilocus DNA fingerprints. w DNA fingerprinting, Wyd. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys, Birhauser Verlag, 1992.

- [16]KWIATKOWSKA J, TRZECIAK T, SŁOMSKI R. Powtórzenia DNA. *Post Biochemii* 1995; **41**: 15–22.
- [17]KWIATKOWSKA J, SŁOMSKI R. Powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 19–29.
- [18]LITT M, LUTY JA. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 397–401.
- [19]NAKAMURA Y, JULIER C, WOLFF R, HOLM R, O'CONNELL P, LEPPERT M, WHITE R. Characterization of a human "midisatellite" sequence. *Nucleic Acids Res* 1987; **15**: 2537–2547.
- [20]NAKAMURA Y, CARLSON M, KRAPCHO K, KANAMORI M, WHITE R. New approach for isolation of VNTR markers. *Am J Hum Genet* 1988; **43**: 854–859.
- [21]NIEMAN-SEYDE S, SŁOMSKI R, RINISLAND F, ELLERMEYER U, KWIATKOWSKA J, REISS J. Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Genet* 1992; **90**: 65–70.
- [22]PENA SDJ, CHACRABORTY R, EPPLIN JT, JEFFREYS AJ. W DNA Fingerprinting, Wyd. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys, Birhauser Verlag, 1992.
- [23]ROYLE NJ, CLARKSON RE, WONG Z, JEFFREYS AJ. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosoms. *Genomics* 1988; **3**: 352–360.
- [24]SILVA AJ, JOHNSON JP, WHITE R. Characterization of a highly polymorphic region 5' to JH in the human immunoglobulin haevy chain. *Nucl Acid Res* 1987; **15**: 3845–3857.
- [25]SŁOMSKI R, JANISZEWSKA H, CHLEBOWSKA H, KWIATKOWSKA J. Jednopunktowa a wielopunktowa analiza DNA: Własne obserwacje z badań nad dochodzeniem spornego ojcostwa z zastosowaniem wielopunktowej analizy DNA. *Arch Med Sąd i Krym* 1994; **44**: 29–34.
- [26]SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J. Diagnostyka molekularna chorób genetycznych. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 27–40.
- [27]SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J. Diagnostyka molekularna: amplifikacja sekwencji czy wzmacnianie sygnału. *Post Biochem* 1995; **41**: 220–229.
- [28]SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J, CHLEBOWSKA H. Diagnostyka molekularna. Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie. Wyd. Sorus. tom 2, str 315–333, 1996.
- [29]SMITH JC, ANWAR R, RILEY J, JENNER D, MARKHAM AF, JEFFREYS AJ. Highly polymorphic minisatellite DNA probes. Further evaluation for individual identification and paternity testing. *J Forensic Soc* 1990; **30**: 19–32.
- [30]STALLINGS RL, FORD AF, NELSON D, TORNEY DC, HILDEBRAND CE, MOYZIS RK. Evolution and distribution of (GT)*n* repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 1990; **10**: 807–815.
- [31]STOKER NG, CHEAH KSE, GRIFFIN JR, POPE FM, SOLOMON E. A highly polymorphic region 3' to the human type II collagen gene. *Nucl Acid Res* 1985; **13**: 4613–4622.
- [32]TAUTZ D. Hypervariability of simple sequences as a general source of genetic variation. *Nucl Acid Res* 1989; **17**: 6463–6471.
- [33]VOGT P. Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on highly conserved "chromatin folding code". *Hum Genet* 1990; **84**: 301–336.
- [34]WEBER JL, MAY PE. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 388–396.
- [35]WEISSENBACH J, GYAPAY G, DIB C, VIGNAL A, MORISSETTE J, MILASSEAU P, VAYSSEIX G. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992; **359**: 794–801.
- [36]WONG Z, WILSON V, PATEL I, JEFFREYS AJ. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Annals Human Genetics* 1987; **51**: 269–288.

MOLEKULARNE ASPEKTY MIAŻDŻYCY

MOLECULAR ASPECTS OF ATHEROSCLEROSIS

Zenon SCHNEIDER

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza, Poznań

Streszczenie: Miażdżycy jest przyczyną wielu zgonów w uprzemysłowionych społeczeństwach. Również w Polsce więcej niż połowa zgonów jest wynikiem zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. Choroba ta postępuje przez wiele lat i w swojej końcowej fazie jest przyczyną znacznego ograniczenia i skrócenia aktywności zawodowej ludzi w stosunkowo wczesnym okresie ich życia. U znacznej grupy ludzi występują predyspozycje genetyczne, które zostały w ostatnich 20 latach uściśnione ze wskazaniem defektów określonych genów i defektów białek im odpowiadających. Opracowano różnorodne metody diagnostyczne. Proces powstawania blaszek miażdżycowych i czynniki wpływające na ich wzrost i starzenie się tętnic opisano szczegółowo.

Summary: Epidemiological studies suggest that atherosclerosis comprises very serious health problem in modern society. In Poland over half of death cases results from atherosclerosis. Disease develops for many years and affects people at the prime of their professional carrier. Large proportion of general population has genetic predisposition, which in last 20 years have been extensively studied and their DNA and protein defects described. Several diagnostic methods were developed. The process of sclerotic plaque formation and the factors having detrimental effect on aging of the arteries are described in detail.

WPROWADZENIE

Miażdżycy jest przyczyną wielu zgonów w uprzemysłowionych społeczeństwach. Również w Polsce więcej niż połowa zgonów jest wynikiem zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. Choroba ta, z początku niezauważalna, postępuje przez wiele lat i w swej końcowej fazie jest przyczyną znacznego ograniczenia i skrócenia aktywności zawodowej ludzi w stosunkowo wczesnym ich okresie życia. U znacznej grupy ludzi występują genetyczne predyspozycje do przedwczesnego starzenia się

naczyń krwionośnych. Zostały one w ostatnich 20 latach uściślone ze wskazaniem defektów określonych genów i defektów białek im odpowiadających. Zostały opracowane również różnorodne metody diagnostyczne, które umożliwiają precyzyjną charakterystykę patologii tego zjawiska.

W wielu przemysłowo rozwiniętych krajach rozpoczęto narodowe programy edukacji cholesterolowej. Akcje uświadamiania i prewencji podjęte w Stanach Zjednoczonych w latach osiemdziesiątych dały pozytywne wyniki i przyczyniły się do zmniejszenia o połowę liczby zgonów z powodu zawału serca. W Polsce, przy udziale Instytutu Żywności i Żywienia w Warszawie, uczelni akademickich i wyspecjalizowanych ośrodków medycznych, rozpoczęto szeroką akcję profilaktyczną i edukacyjną. Jak wynika z badań opublikowanych w 1988 roku, duży odsetek ludzi w Polsce wykazuje podwyższone poziomy cholesterolu i triglicerydów we krwi (tab. 1 i 2). Te dwa parametry oraz podwyższone ciśnienie krwi, palenie tytoniu i podwyższony poziom cukru są od wielu lat uważane za najbardziej znaczące czynniki ryzyka.

W warunkach agresywnej reklamy różnorodnej żywności trzeba poświęcić więcej uwagi wyborowi odpowiedniego, stosownie do predyspozycji swego organizmu, pożywienia. Niewątpliwie rodzaj żywności i często związane ze sposobem żywienia, praca zawodowa i styl życia ma największe znaczenie w prewencji miażdżycy. Konieczne jest również okresowe sprawdzanie poziomów cholesterolu i triglicerydów. Firmy ubezpieczeniowe w krajach zachodnich mają skłonność do oszczędzania na diagnostyce medycznej. W warunkach, gdy lekarz jest kontrolowany przez firmy ubezpieczeniowe, trzeba, aby potencjalny pacjent był lepiej poinformowany o metodach diagnostycznych, które może wykorzystać w ramach ubez-

TABELA 1. Występowanie stężeń cholesterolu i triglicerydów w populacji polskiej (na podstawie POL-MONICA, w monografii B. Cybulska i in.: *Leczenie hipertlipidemii w profilaktyce miażdżycy*. IŻŻ Warszawa 1994)

Lipidy	Mężczyźni, %	Kobiety, %
Cholesterol całkowity:		
5,2–6,5 mmol/l (200–249 mg/100 ml)	47,8	45,4
6,5–7,8 mmol/l (250–299 mg/100 ml)	15,5	23,5
≥7,8 mmol/l (≥300 mg/100 ml)	2,4	3,4
Triglicerydy:		
2,3–4,6 mmol/l (200–400 mg/100 ml)	16,5	8,5
≥4,6 mmol/l (≥400 mg/100 ml)	2,0	0,3
Cholesterol HDL:		
<1,0 mmol/l (<39 mg/100 ml)	10,4	2,3

TABELA 2. Stężenie lipidów a ryzyko choroby wieńcowej (wartości w mmol/l surowicy*)

Stężenie (C=cholesterol)	Pożądane (mmol/l)	Graniczne (mmol/l)	Nieprawidłowe (mmol/l)	O wysokim ryzyku (mmol/l)
Całkowity C	<5,2	5,2 – 6,5	>6,5	>7,8
LDL C	<4,0	4,0–5,0	>5,0	>5,0
HDL C	>1,0	0,9–1,0	<0,9	–
Triglicerydy (TG)	<0,2	2,0 –2,5	>2,5	–
Wskaźnik HDL/LDL	>0,25	0,2–0,25	<0,2	<0,2

*Stężenie triglicerydów (TG), 1 mmol TG/l = 80 mg TG/100 ml surowicy krwi; *Stężenie cholesterolu (C) 1 mmol C/l = 39 mg C /100 ml surowicy krwi

pieczenia, aby dowiedzieć się o stanie swego organizmu i o ewentualnych genetycznych predyspozycjach. Znaczny odsetek ludzi ma problemy z zaburzoną gospodarką lipidową w swoim organizmie i fakt ten dociera do nich najczęściej w okresie znacznego zaawansowania nieodwracalnych procesów starzenia się naczyń krwionośnych. Złe zaopatrywanie w tlen i materiały odżywcze organy i mało wydajnie odprowadzane z nich produkty metabolizmu przez niesprawny układ krwionośny są przyczyną przyśpieszonej degeneracji całego organizmu.

Wczesne podjęcie działań prewencyjnych zapewnia lepszą kondycję organizmu w podeszłym wieku i opłaci się nam i naszej rodzinie, na którą zazwyczaj spada obowiązek opiekowania się chorymi w starszym wieku. Gdy będą powszechnie znane wszystkie czynniki ryzyka tej choroby, łatwo już teraz przewidzieć, jak w przyszłości będzie oceniana przez rodzinę, przez pracodawców i firmy ubezpieczeniowe nasza wieloletnia niefrasobliwość w stosowaniu się do wskazań prewencyjnych. Trudniej też będzie o współczucie u naszych najbliższych.

OBRAZ BLASZKI MIAŻDŻYCOWEJ

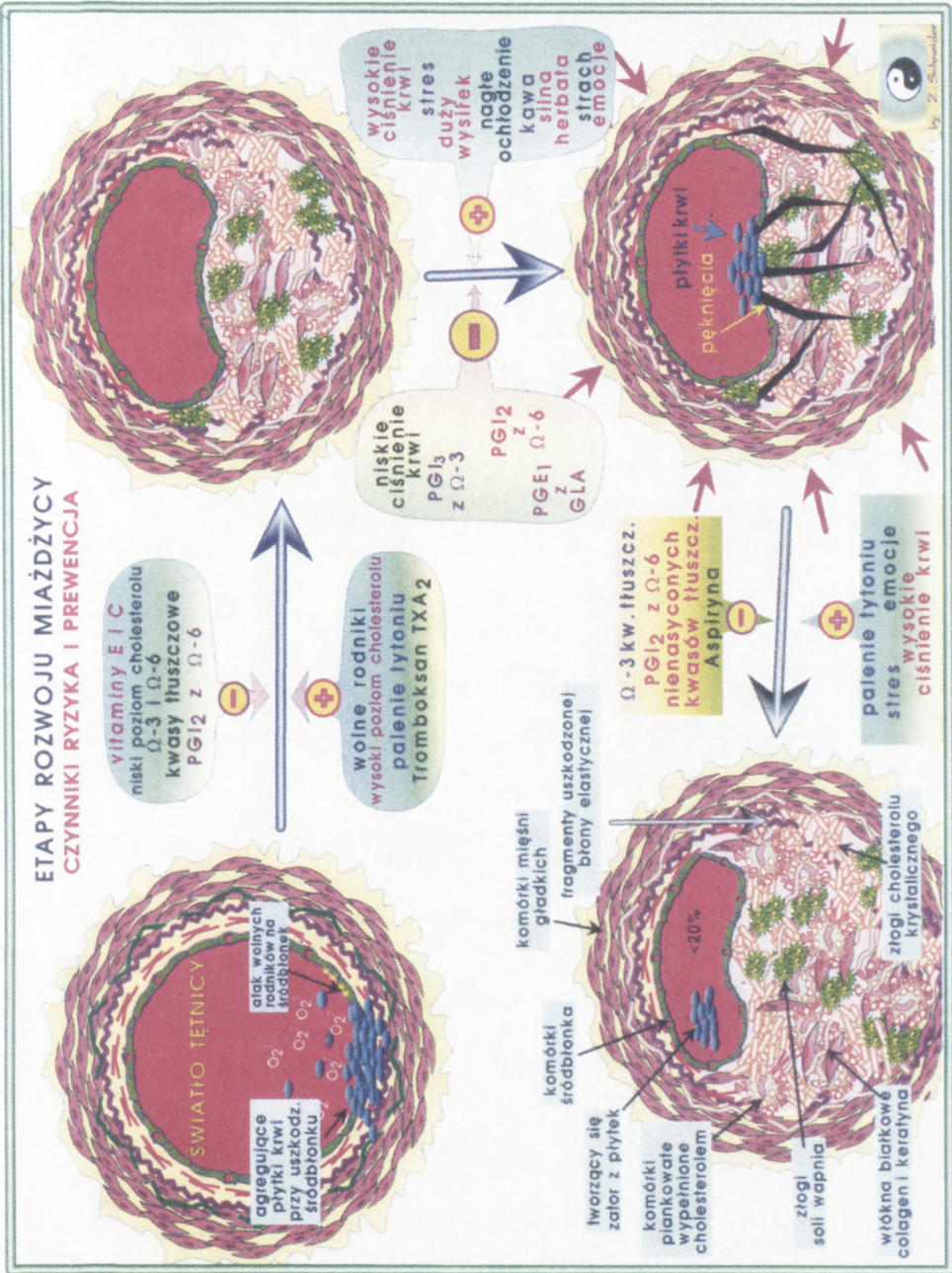
Zmniejszanie się światła naczyń krwionośnych w wyniku tworzenia się blaszek miażdżycowych ma wielorakie skutki. Ogranicza zdolność organizmu do zaopatrywania tkanek w substancje odżywcze i tlen, pogarsza odprowadzanie do nerek i wątroby toksycznych produktów metabolizmu oraz ogranicza sprawność systemów immunologicznych i gruczołów dokrewnych. Rezultatem tego jest narastające upośledzenie sprawności wszystkich organów i przyśpieszenie ich starzenia się. Towarzyszą temu również objawy neurologiczne i psychiczne. Najbardziej spektakularnym skutkiem miażdżycy są: choroba niedokrwienna serca i udary mózgu.

Blaszka jest wytworem współdziałania wielu klas komórek w ścianie tętnicy grubej i we krwi. Można ją uważać za formę narośla wytwarzanego w dłuższym okresie, bo od kilku do kilkudziesięciu lat. Blaszka miażdżycowa początkowo mająca

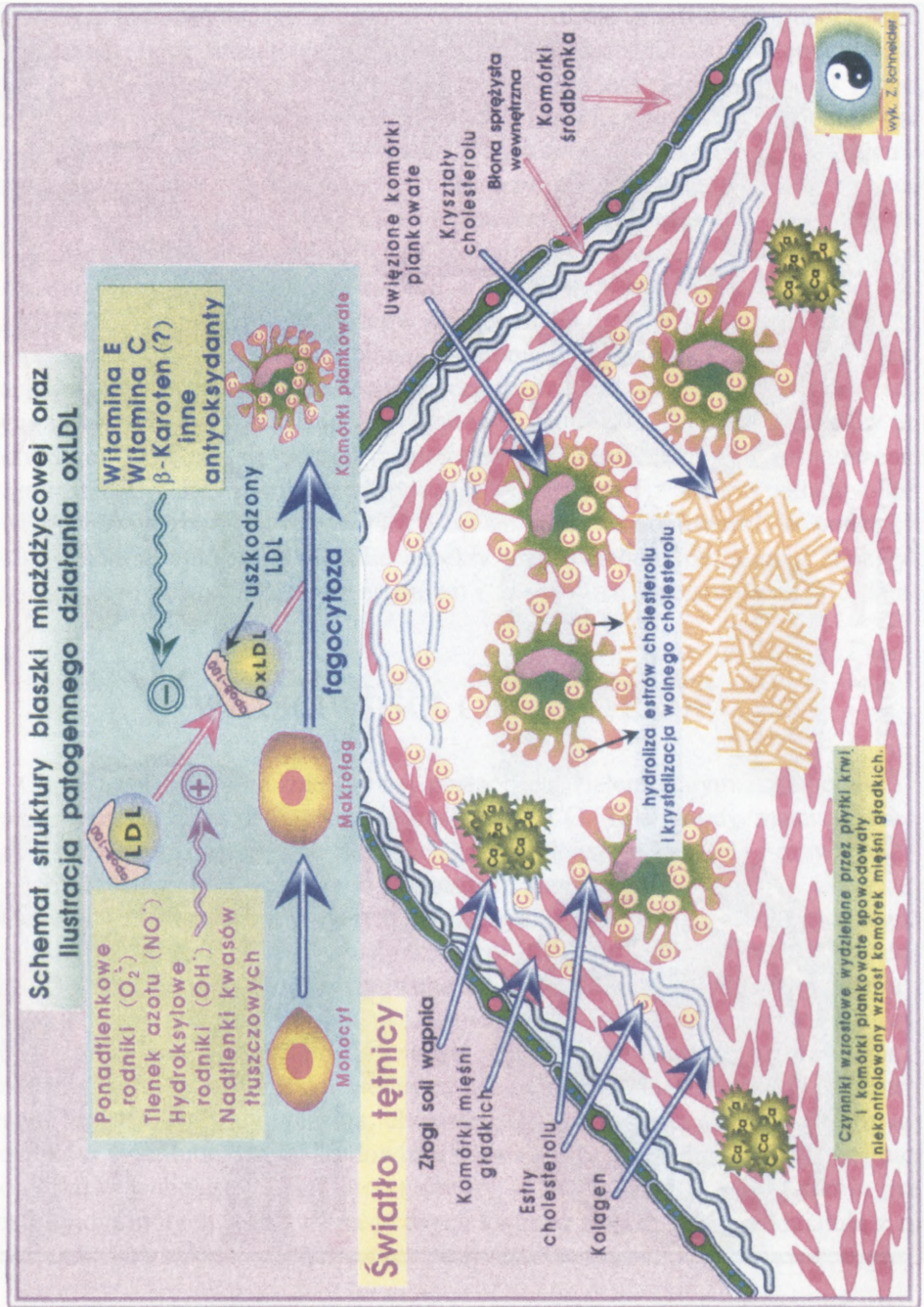
niewielkie rozmiary osiąga w zawansowanym stadium długość kilku centymetrów i rozrastając się w ścianie tętnicy może zmniejszyć lokalnie światło tętnicy w 80% (rys. 1). Skład rdzenia typowej blaszki przypomina „złomowisko” komórek różnego rodzaju i ich fragmentów zakonserwowanych w amorficznej masie złożonej z estrów cholesterolu, krystalicznego cholesterolu, fragmentów błony sprężystej, włókien kolagenu i kryształów soli wapnia (rys. 2). Rumowisko to ilustruje schemat na rysunku 2. Ściśle upakowana morfologicznie nie przedstawiająca sensownej tkanki struktura blaszki jest praktycznie niemożliwa do biologicznego zdegradowania w czasie, jaki pozostał do życia ludziom już zwykle w zaawansowanym wieku. Jak pokazano na rysunku 1, pod wpływem bodźców zewnętrznych może dojść do spękania blaszki miażdżycowej uszkodzenia śródbłonna i odsłonięcia jej wnętrza. Pogarsza to sytuację pacjenta, gdyż wyzwała procesy naprawcze z udziałem płytek krwi, komórek fagocytujących wywodzących się z monocytów i neutrofilii. Działanie procesów „naprawczych” kończy się powiększeniem blaszki miażdżycowej i zmniejszeniem światła tętnicy. Jak wynika z obserwacji klinicznych i z analizy składu blaszki miażdżycowej, znaczącą rolę w tym procesie odgrywa cholesterol. W poniższych paragrafach są omówione niektóre aspekty jego metabolizmu, a także niezwykle sposoby jego pozyskania przez organizm i mechanizm jego transportu do tkanek.

WŁAŚCIWOŚCI CHOLESTEROLU

Cholesterol w chemicznie czystej postaci jest ciałem stałym. Temperatura topnienia kryształów cholesterolu wynosi aż 149^oC. Tak twardy materiał obecny w blaszkach miażdżycowych może uciskać przylegające komórki i przyczynić się do ich uszkodzenia, zwłaszcza w momentach skurczu tętnicy (rys. 1). Cholesterol należy do grupy związków źle rozpuszczalnych w wodzie, co stwarza szczególne problemy w jego rozprowadzaniu do tkanek organizmów zwierząt i ludzi. Częsteczki tego związku muszą być utrzymywane w organizmie w pewnym oddaleniu od siebie, bowiem zespolone ze sobą tworzą twarde nierozpuszczalne kryształy, których organizm nie jest w stanie przeprowadzić w stan molekularnego rozproszenia. Na czas transportu w środowisku wodnym, a takim są układ krwionośny, przestrzeń międzykomórkowa i cytoplazma, cholesterol i inne związki sterydowe wymagają nośników wodolubnych. W środowisku niewodnym, np. w strefie lipidowej błony komórkowej, cholesterol jest utrzymywany w molekularnym rozproszeniu przez fosfolipidy, których reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych oddziałują z molekułami cholesterolu rozcieńczając ten związek.



RYSUNEK 1



RYSUNEK 2

ROLA WIELONIENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W TRANSPORCIE I MAGAZYNOWANIU CHOLESTEROLU

W lipoproteinach transportujących w jednej cząstce kilkaset molekuł cholesterolu jest w formie estru z *cis*-wielonienasyconym kwasem tłuszczowym, który dzięki swojej nieregularnej budowie jest szczególnie predysponowany do zapobiegania krystalizacji tej formy cholesterolu. *Cis*-wielonienasycony kwas tłuszczowy utrzymuje płynność lipidowego wnętrza micelli. Jest to podstawowy wymóg pobrania z micelli pojedynczych cząsteczek cholesterolu. Izomeryczne odpowiedniki *trans* tych kwasów tłuszczowych, spotykane w znaczących ilościach w margarynie i w olejach roślinnych poddanych rafinacji i utwardzaniu, mają temperaturę topnienia o ponad 20^o wyższą i tego wymogu nie spełniają. Specyficzny enzym (transacetylaza LCAT) przeprowadzający cholesterol na czas transportu w formę estrową umożliwia jego estryfikację właściwym kwasem tłuszczowym. Wybiórczość tego enzymu może być nie wystarczająca, gdy w naszym organizmie pojawiają się znaczne ilości wysoce niepożądanych izomerów *trans* wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Jest prawdopodobne, że kwasy te konkurując z ich naturalnymi odpowiednikami *cis* mogą zostać wbudowane do estrów cholesterolu lub blokować aktywność enzymu. *Cis* wielonienasycone kwasy tłuszczowe funkcjonują również w innych procesach związanych z metabolizmem cholesterolu i syntezą prostaglandyn omówionych poniżej (rys. 3). Tu wypada nadmienić, że organizmy zwierzęce nie potrafią syntetyzować kwasów tłuszczowych niezbędnych do transportu i magazynowania cholesterolu. Muszą one być dostarczane w żywności. Oleje roślinne, a także lecytyna pochodzenia roślinnego, fosfolipid zawierający cholinę, są dobrym źródłem tych kwasów tłuszczowych. Niedobór wielonienasyconych kwasów tłuszczowych u osobników, preferujących w diecie tłuszcze zwierzęce i margarynę bogatą w *trans*-nienasycone kwasy tłuszczowe, może prowadzić do upośledzenia tego procesu.

FUNKCJE BIOLOGICZNE CHOLESTEROLU

Błony cytoplazmatyczne zwierząt zawierają aż 30% cholesterolu. Związek ten wpływa w szczególności na właściwości reologiczne błony umożliwiając gwałtowną zmianę jej kształtu wraz ze zmianą kształtu komórki. Taka właściwość błony komórkowej jest pożądana przy poruszaniu się zwierząt lub ich organów (np. płuca, jelita, serce, struny głosowe). W tych krytycznych dla integralności błony momentach drastycznego odkształcania komórki cholesterol jest nieodzowny. Jego cząsteczki przenoszą się z jednej strony błony na drugą w ten sposób łagodząc naprężenia

odpowiednio ściskające wewnątrz łuku błony i rozciągające na jego zewnętrznej stronie. Jak pokazano na rysunku 4, w tym zjawisku nazwanym *flip-flop* dochodzi do zmiany orientacji grupy hydroksylowej cząsteczki cholesterolu. Cholesterol współdziałając z fosfolipidami zawierającymi cis-nienasycone kwasy tłuszczowe łagodzi drastyczne zmiany lepkości błony pod wpływem zmiany temperatury. W błonie pożądana jest określona lepkość. Zbyt duża lepkość spowalnia funkcję białek błonowych, natomiast mała lepkość może spowodować rozpad błony.

Cholesterol jest również materiałem wyjściowym do syntez hormonów sterydowych i witaminy D. W porównaniu z ilością cholesterolu w błonach komórkowych ilość cholesterolu wykorzystywanego do tych syntez jest znikoma.

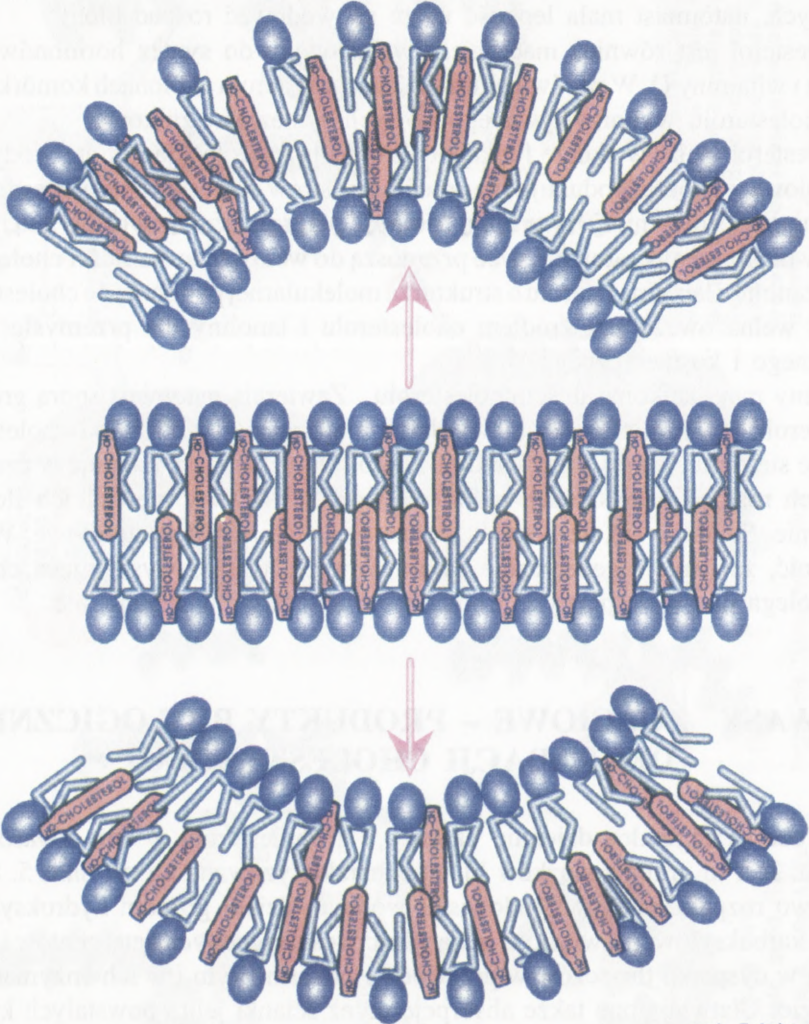
Cholesterol pełni w skórze funkcję ochronną przed infekcją i utratą wody. Gruczoły łojowe w skórze produkują znaczne ilości estrów cholesterolu z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Estry te mają zdolność pęcznienia wzdłuż włosów i są maziste nawet w niższej temperaturze. Owce przenoszą do wełny znaczne ilości cholesterolu w mieszaninie z lanoliną (sterolu o strukturze molekularnej podobnej do cholesterolu). Surowa wełna owcza jest źródłem cholesterolu i lanoliny dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego.

Rośliny mają znikome ilości cholesterolu. Zawierają natomiast sporą grupę innych steroli, których struktura molekularna nieznacznie różni się od cholesterolu. Jeden ze steroli tej grupy o nazwie β -sitosterol powszechnie występuje w częściach zielonych roślin i w nasionach roślin oleistych, a także w niewielkich ilościach w drewnie. Sugeruje się, że β -sitosterol ma działanie antycholesterolowe. Wypada nadmienić, że istnieje genetycznie uwarunkowana, rzadko występująca choroba, która polega na patologicznym gromadzeniu sitosteroli w organizmie.

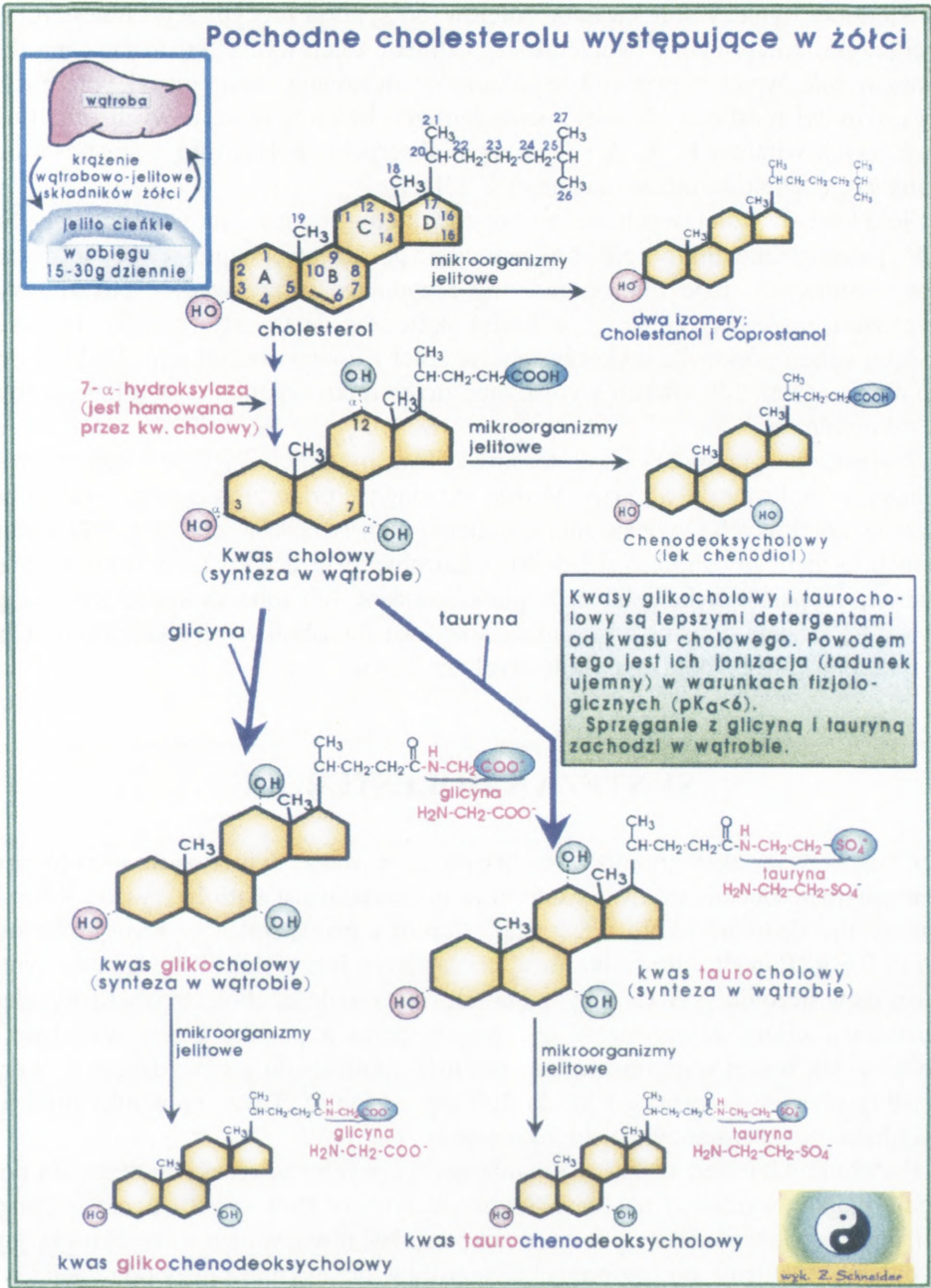
KWASY ŻÓŁCIOWE – PRODUKTY BIOLOGICZNEJ DEGRADACJI CHOLESTEROLU

Wątroba przekształca dziennie około 0,8 g cholesterolu w sole kwasów żółciowych. Jest to grupa związków bliżej scharakteryzowana na rysunku 5. Są one częściowo rozpuszczalne w środowisku wodnym dzięki grupom hydroksylowym i grupie karboksylowej. Związki te mają właściwości łagodnych detergentów i współdziałają w dyspersji tłuszczów w przewodzie pokarmowym i w ich enzymatycznej hydrolizie. Ułatwiają one także absorpcję przez ścianki jelita powstałych kwasów tłuszczowych i monoacylogliceroli. W skład micell wchodzi również inne związki tłuszczolubne w tym cholesterol i rozpuszczalne w tłuszczach witaminy. Sole kwasów żółciowych są również absorbowane w jelicie cienkim i transportowane przez albuminę we krwi wracają do wątroby. Z 20–30 g tych związków uwalnianych dziennie do dwunastnicy tylko około 0,6 g jest wydalana ze stolcem.

Ilustracja przemieszczania się cholesterolu między warstwami błony komórkowej w wyniku zmiany kształtu komórki (mechanizm flip-flop)



RYSUNEK 4



RYSUNEK 5

Niedobór syntezy soli kwasów żółciowych sprzyja precypitacji cholesterolu w pęcherzyku żółciowym i tworzeniu się kamieni żółciowych. Niedostateczna ilość kwasów żółciowych w przewodzie pokarmowym hamuje absorpcję tak potrzebnych organizmowi niezbędnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz tłuszczolubnych witamin E, K, A i D, a także absorpcję cholesterolu z żywności oraz reabsorpcję cholesterolu wydalanego z żółcią.

Sole kwasów żółciowych nie są obojętne dla mikroorganizmów jelitowych. Niektóre patologiczne mikroorganizmy przewodu pokarmowego giną w obecności kwasów żółciowych; inne mikroorganizmy rezydujące w przewodzie pokarmowym przekształcają kwasy żółciowe w mniej skuteczne detergenty (rys. 5). Te zaś są resorbowane i ponownie wykorzystane w żółci z gorszym skutkiem. Niektóre metabolity kwasów żółciowych wytwarzane przez mikroorganizmy w jelicie grubym są rakotwórcze.

Zwiększona przemiana cholesterolu do kwasów żółciowych jest sposobem na obniżenie cholesterolu we krwi. Można to osiągnąć przez zmniejszenie reabsorpcji kwasów żółciowych i zwiększenie wydalania tych związków ze stolcem. Naturalny sposób to dieta zawierająca składniki pokarmowe wiążące kwasy żółciowe i przyspieszające peristaltykę jelit, np. płatki owsiane lub inna żywność zawierająca owies. Są też leki doustne adsorbujące sole kwasów żółciowych (Kolestipol i Cholestyramina), które obniżają cholesterol we krwi.

SYNTEZA CHOLESTEROLU

Chociaż wszystkie komórki organizmu są w stanie syntetyzować cholesterol, centralnym producentem i dystrybutorem tego związku jest wątroba (rys. 6). Wątroba syntetyzuje dziennie około 0,8 g cholesterolu i przekształca w kwasy żółciowe około 0,6 g. Ponadto niewielka ilość cholesterolu jest wykorzystywana do syntez hormonów steroidowych (50 mg dziennie). Znaczne ilości cholesterolu są wydalane dziennie z żółcią, z tego część jest resorbowana, a ok. 0,6 g jest wydalane ze stolcem. Jak wyżej wspomniano pewna ilość cholesterolu jest wydalana w skórze (według różnych autorów od 85 do 300 mg dziennie). Także niewielka ilość jest wydalana w złączonym nabłonku jelita.

Podobnie jak inne związki w organizmach żywych cząsteczki cholesterolu podlegają ciągłej wymianie na inne. Szybkość syntezy cholesterolu przez organizm lub jego pozyskiwanie z żywności pozostaje w równowadze z szybkością jego wydalania. Ustalenie się poziomu cholesterolu w organizmie zależy od relacji szybkości tych procesów. Wydaje się jednak, że organizm ma trudności z wielostopniową regulacją utrzymania pożądanego poziomu cholesterolu. Zakres możliwości regulacji poziomu cholesterolu u ludzi różni się osobniczo i zmienia się z wiekiem. Wynika

z tego potrzeba okresowego kontrolowania poziomu cholesterolu we krwi. W wieku powyżej 40 lat ujawniają się defekty genetyczne u osobników mających upośledzony bądź nieaktywny gen w jednym spośród pary chromosomów. Wpływa to na ustalenie homeostazy cholesterolu na wyższym poziomie. Ukryte defekty genetyczne, ujawniają się często dopiero w starszym wieku. Dzięki postępom genetyki molekularnej będzie można je wykryć już nawet w okresie płodowym i zaplanować zawnazas odpowiednio swoją aktywność zawodową i tryb życia.

Naruszenie homeostazy cholesterolu ma swoje następstwa w obserwowanej patologii odkładania się cholesterolu w ściankach naczyń krwionośnych i tworzeniu blaszek miażdżycowych, a także jego złogów (żółtaki) w tkankach. W wymienionych stanach patologicznych często mamy do czynienia z krystalicznym cholesterolem trudnym do rozpuszczenia i usunięcia. Kryształy cholesterolu chociaż nieraz mikrometrowej średnicy są cementowane dodatkowo innymi produktami nieprawidłowego metabolizmu. Organizm nie ma niestety odpowiednich enzymów, ażeby taki polimorficzny materiał przeprowadzić w stan rozpuszczalny i wydalić.

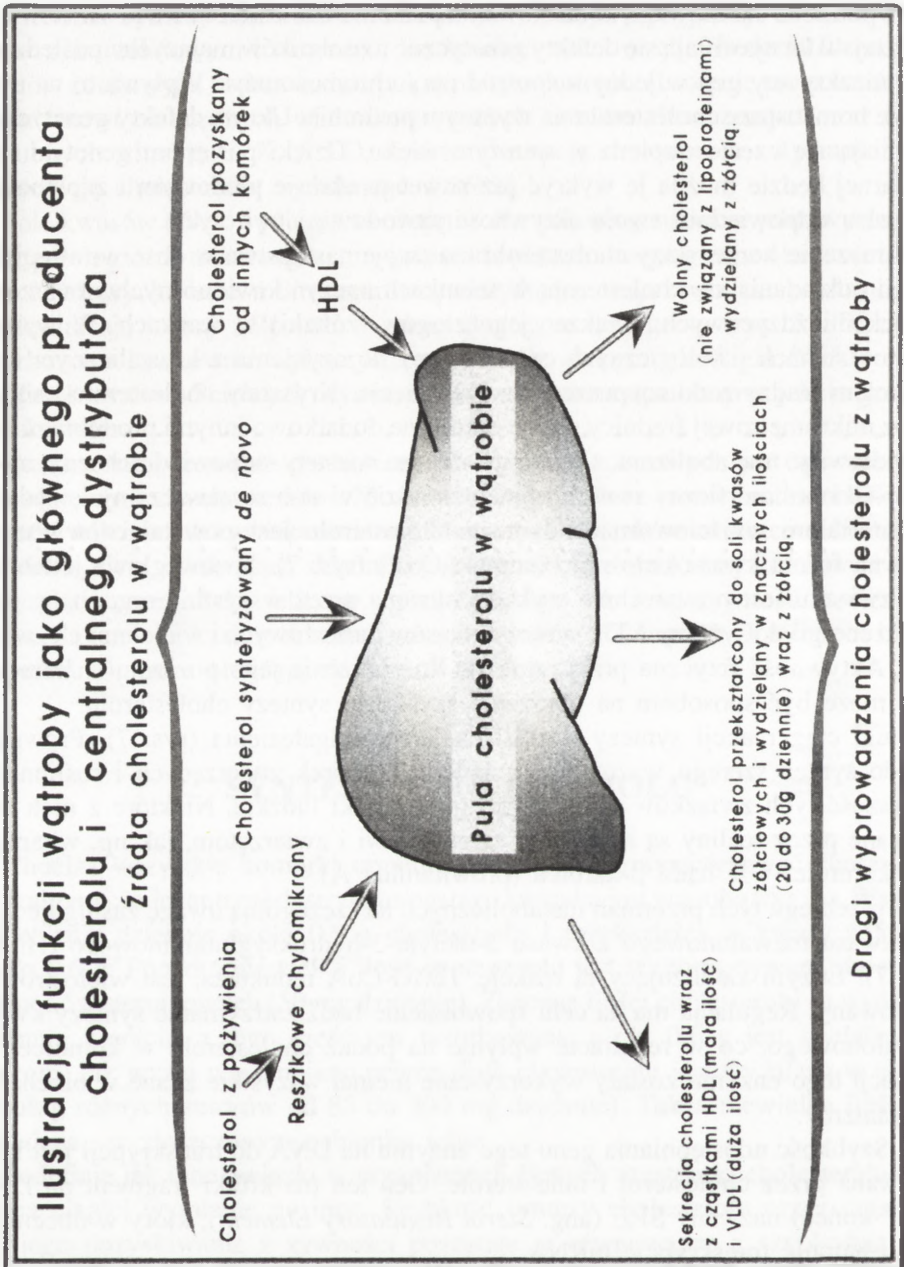
Materiałem wyjściowym do syntezy cholesterolu jest powstająca w ustroju aktywna forma kwasu octowego (acetylo-CoA) (rys. 7). Dwuwęglowa jednostka tego związku jest powszechnie wykorzystywana przez wszystkie organizmy jako źródło energii do syntezy ATP, syntezy kwasów tłuszczowych i wiele innych związków. Aktywność fizyczna przyczynia się do obniżenia jego poziomu w komórce – co może być sposobem na obniżenie szybkości syntezy cholesterolu.

Długi ciąg reakcji syntezy steroli ma liczne odgałęzienia (rys. 7). Prowadzą one do syntez szeregu ważnych składników komórek zwierzęcych i roślinnych. Większość tych związków nie wytwarzają komórki ludzkie. Niektóre z nich wytwarzane przez rośliny są niezbędne człowiekowi i zwierzętom, jak np. witaminy E (tokoferole) i K bądź β -karoten (prowitamina A).

W przebiegu tych przemian metabolicznych na szczególną uwagę zasługuje synteza kwasu mewalonowego z kwasu 3-metylo-3-hydroksyglutaminowego (HMG) (rys. 7). Enzym katalizujący tą reakcję, HMG-CoA reduktaza, jest wielostronnie regulowany. Regulacja ma na celu spowolnienie bądź zatrzymanie syntezy kwasu mewalonowego, co w rezultacie wpłynie na podaż cholesterolu w komórce. W regulacji tego enzymu zostały wykorzystane niemal wszystkie znane w biochemii mechanizmy.

1. Szybkość udostępniania genu tego enzymu na DNA do transkrypcji jest kontrolowana przez cholesterol i inne sterole. Gen ten ma krótki fragment na DNA (od 5' końca) nazwany SRE (ang. *Sterol Regulatory Element*), który w obecności steroli hamuje transkrypcję mRNA.

2. Szybkość translacji mRNA (tj. szybkości syntezy białka na matrycy kwasu nukleinowego) może być hamowana przez niesterolowe metabolity kwasu mewalonowego. Na tym etapie pojawia się możliwość farmakologicznej interwencji w syntezę cholesterolu przez użycie leków imitujących naturalne inhibitory translacji.



RYSUNEK 6

3. Enzymy podobnie jak wszystkie metabolity podlegają zarówno syntezie, jak i degradacji. Relacja szybkości tych dwóch procesów decyduje o aktualnej ilości enzymu w komórce. HMG-CoA reduktaza składa się z dwóch fragmentów: błonowego i cytozolowego. Błonowy fragment zakotwiczony w strefie błonowej, pod wpływem zwiększonego stężenia cholesterolu w błonie, wywołuje szybszą degradację enzymu. Kombinacja powyższych trzech mechanizmów może spowodować nawet 200-krotne zmniejszenie ilości enzymu i co za tym idzie drastyczne wstrzymanie syntezy cholesterolu.

4. Aktywności wielu enzymów są regulowane przez ich fosforylację. Przyłączenie do białka enzymatycznego silnie ujemnej reszty kwasu fosforowego powoduje zmianę konformacji enzymu i w rezultacie zmianę właściwości katalitycznych. Fosforylacja reduktazy HMG-CoA specyficzną kinazą białkową powoduje całkowite wyłączenie aktywności enzymu. Czynnikiem aktywującym enzym fosforylujący reduktazę jest podwyższone stężenie AMP w komórce, a to ma związek z zaopatrzeniem organizmu w materiał energetyczny (glukoza, tłuszcze).

5. W warunkach niedoboru glukozy w komórkach wątroby HMG-CoA jest przekształcany w związki ketonowe (acetoctan i 3-hydroksymaślan). Wątroba, która jest głównym producentem cholesterolu, nie potrafi związków tych metabolizować. Są one eksportowane z wątroby i metabolizowane w tkankach obwodowych (również w mózgu).

6. Warto tu nadmienić że pewne gatunki pleśni produkują bardzo silne inhibitory reduktazy HMG-CoA. Związki te zostały ostatnio wykorzystane w lekach, takich jak: Lovastatyna, Pravastatyna i Simvastatyna (rys. 7). Do wstrzymania syntezy cholesterolu o połowę wystarczy stężenie 10^{-9} -molowe tego inhibitora w komórce wątrobowej.

TRANSPORT CHOLESTEROLU ZA POŚREDNICTWEM LIPOPROTEIN

Utrzymanie optymalnych stężeń cholesterolu w różnych tkankach naszego organizmu wymaga stosunkowo złożonych mechanizmów, niespotykanych w przypadku innych wodolubnych związków. Przyczyną tego jest przede wszystkim bardzo mała rozpuszczalność cholesterolu.

Komórki obwodowe organizmów zwierzęcych i człowieka mimo posiadania zdolności syntezy cholesterolu (opisanej powyżej) korzystają raczej z cholesterolu produkowanego przez wątrobę. Hydrofobowy charakter tego związku wymusza jego transportowanie w specjalnie uformowanych małych drobinach o średnicach 10–100 nm (nanometrów) zwanych lipoproteinami (rys. 8). Zatem jak wynika ze schematu na rysunku 9, lipoproteina nie jest jedną cząsteczką chemiczną, jak sugeruje

to jej nazwa, lecz jest to cząstka precyzyjnie skonstruowana przez układy enzymatyczne w komórce z kilku tysięcy luźno związanych (siłami drugorzędowymi) molekuł. Wielkość i skład lipoprotein podlegają ciągłej ewolucji w trakcie ich funkcji we krwi (rys. 8).

Wirowanie osocza krwi w gradiencie sacharozy (rys. 10) pozwoliło wyodrębnić kilka frakcji lipoprotein różniących się gęstością. Różnice w gęstości tych frakcji wynikają z proporcji zawartości składników o małej gęstości (ok. 0,8 g/ml) zawartych we wnętrzu cząstki do składników o dużej gęstości w hydrofilnej powłoce (ok. 1,30 g/ml). Proporcje te zmieniają się na korzyść cięższej, hydrofilnej strefy w małych cząstkach, w wyniku czego odznaczają się one większą gęstością i odwrotnie duże cząstki będą miały mniejszą gęstość.

Ustalony we wczesnym okresie badań podział lipoprotein na klasy oparty na kryterium gęstości, parametru łatwego do wyznaczenia w każdym laboratorium diagnostycznym, był trafny. Okazało się, że frakcje różniące się gęstością i średnicą cząstek mają odrębne garnitury białkowe i wykonują zróżnicowane funkcje w transporcie cholesterolu, triacylogliceroli, a także fosfolipidów do tkanek obwodowych.

Funkcje tych cząstek opisano poniżej. Tu należy zaakcentować rolę wątroby jako centralnego dystrybutora cholesterolu pochodzącego z różnych źródeł (patrz tekst poniżej). Wątroba jest również miejscem syntezy dwóch rodzajów cząstek oraz protein, w które są wyposażone.

HDL – lipoproteiny o dużej gęstości (1,063–1,210 g/ml)

VLDL – lipoproteiny o bardzo małej gęstości (0,93–1,006 g/ml)

Cząstki te są wydzielane w drodze egzocytozy do krwi i tam podlegają różnym przemianom zilustrowanym na rysunku 8.

W jelitach jest syntetyzowana frakcja wyjątkowo dużych lipoprotein, o bardzo małej gęstości (ok. 0,93 g/ml), nazwanych chylomikronami. Zadaniem chylomikronów jest przeniesienie kwasów tłuszczowych via układ limfatyczny i krew do tkanek obwodowych ustroju. Chylomikrony dostarczają do wątroby cholesterol pokarmowy, jak również cholesterol wydzielany z żółcią.

Białka lipoprotein nazwano **apolipoproteinami** dla zaakcentowania ich odrębności chemicznej w złożonej z wielu innych molekuł cząstce (rys. 9). Nie wszystkie wyodrębnione apolipoproteiny scharakteryzowano. Wśród lepiej poznanych pod względem ich funkcji można wyróżnić trzy klasy.

Apolipoproteiny apoE, apoB-48 i apoB-100. Zadaniem tych białek jest rozpoznanie receptorów w błonach komórkowych wątroby oraz, w przypadku apoB-100, receptorów tkanek obwodowych. Białka te wbudowane do lipoprotein mają zdolność do tworzenia kompleksu z receptorem. Utworzenie kompleksu umożliwia endocytozę lipoproteiny to jest wprowadzenie jej do wnętrza komórki, jak zilustrowano na przykładzie cząstki LDL na rysunku 9.

Białko apoCII aktywuje lipazę lipoproteinową związaną z zewnętrzną stroną błon komórek nabłonka naczyń włosowatych, co umożliwia przekazanie kwasów tłuszczowych z lipoprotein do tkanek (rys. 8).

Białko apoA-1 aktywuje transacylazę, enzym estryfikujący cholesterol wielonienasyconym kwasem tłuszczowym. Procesowi temu towarzyszy przenoszenie cholesterolu z błon komórkowych tkanek obwodowych do HDL (rys. 8 i 11).

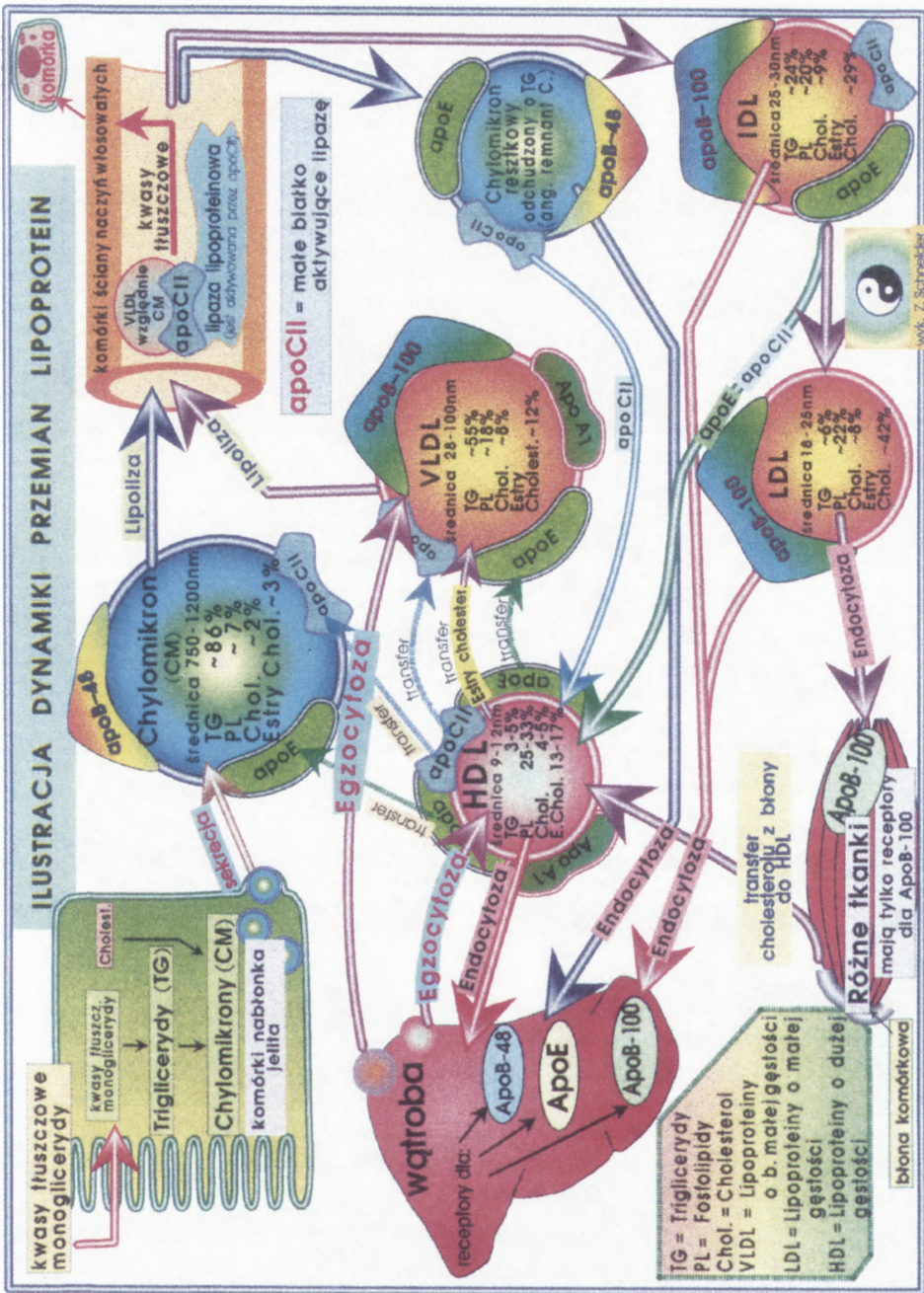
METABOLIZM HDL – LIPOPROTEIN O DUŻEJ GĘSTOŚCI

Cząstki HDL (ang. *High Density Lipoproteins*) są syntetyzowane w wątrobie i wydzielane przez egocytozę do krwiobiegu. W chwili wydzielenia mają one kształt dysków i są wyposażone w białka: apoA, apoE i apoCII; mają niewielką zawartość cholesterolu i fosfolipidów oraz dużą gęstość (rys. 8 i 11). HDL ma zdolność wyciągania wolnego cholesterolu z błon komórkowych tkanek obwodowych oraz z innych cyrkulujących lipoprotein z jego równoczesną estryfikacją nienasyconym kwasem tłuszczowym pochodzącym z fosfatydylocholicy (lecytyny) (rys. 11). Białko apoA-1 współdziała w tym procesie aktywując acylujący enzym LCAT (Lecytynowo:Cholesterolowa-Acylo-Transferaza) znajdujący się w osoczu.

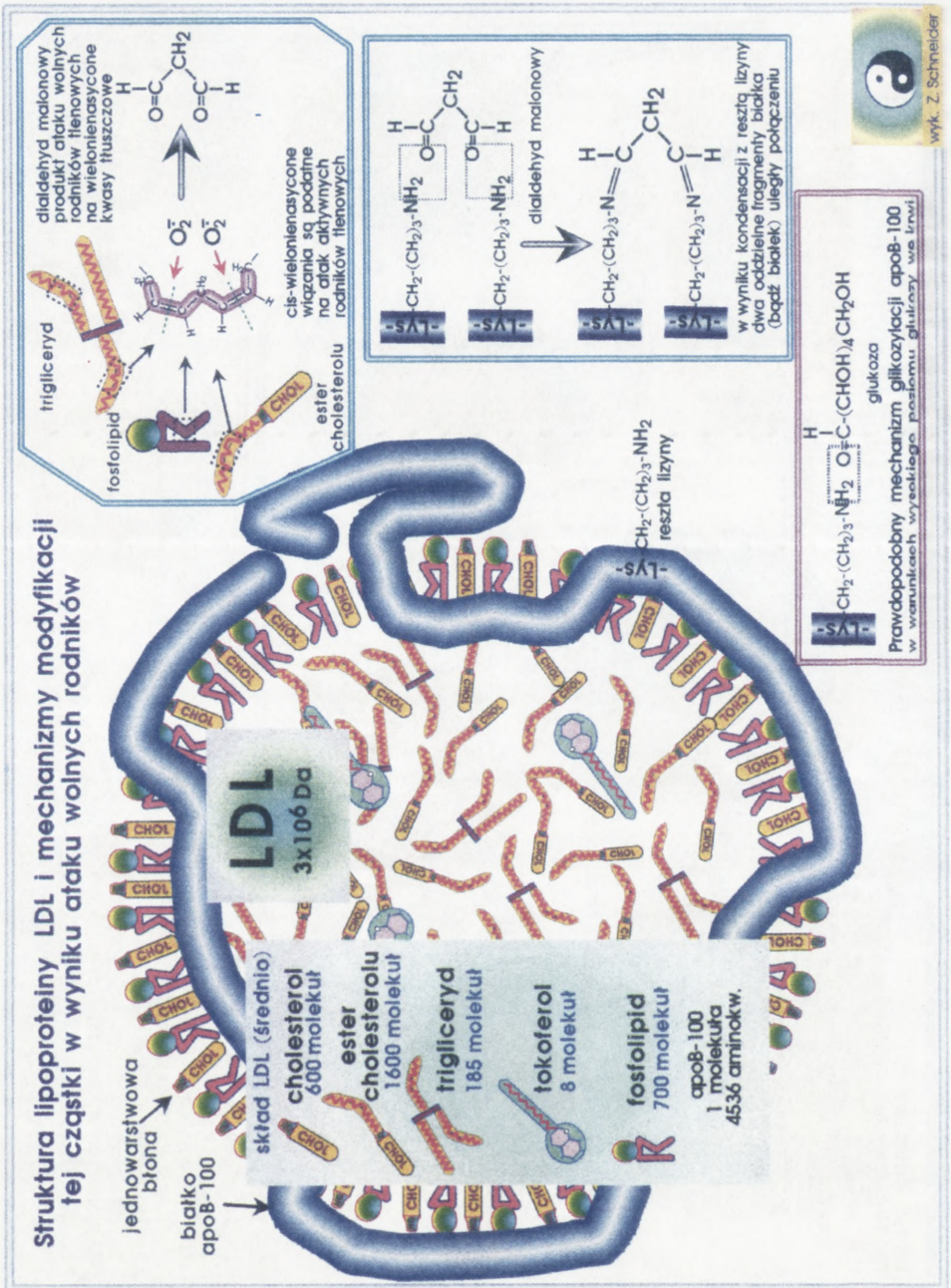
W miarę postępującego transferu estru cholesterolu do wnętrza cząstki HDL przyjmuje ona kształt kulisty i zmniejsza znacznie swoją gęstość ($HDL_3 \rightarrow HDL_2$) (rys. 10 i 11). Gęstość cząstek HDL jest najbardziej zróżnicowana (rys. 10). Wynika to z ich szczególnej funkcji pośrednika w przenoszeniu apolipoprotein z cząstek jednego rodzaju na inne, jak pokazano na rysunku 8. Młode, świeżo wydzielone cząstki o kształcie dysku (rys. 10 i 11) mają dużą gęstość (frakcja HDL_3), a w miarę wypełniania ich wnętrza estrami cholesterolu gęstość ich znacznie zmniejsza się (frakcja HDL_2). Jak wynika z rysunku 10, spektrum cząstek HDL różniących się gęstością jest bardzo duże i podział HDL na podfrakcje jest umowny. Ogólnie można powiedzieć, że te lżejsze są starsze.

Cząstki HDL przekazują estry cholesterolu do cząstek lipoproteiny VLDL w zamian otrzymując triglicerydy bądź lecytynę (rys. 8). Proces ten umożliwia białko CETP (*Cholesterol Ester Transfer Protein*). W tych wymianach preferencje mają te molekuly, które pozwolą wyrównać właściwy stosunek powierzchni hydrofilnej powłoki do hydrofobowego wnętrza. Proporcje te ulegają ciągłej zmianie w wyniku metabolizmu lipoprotein.

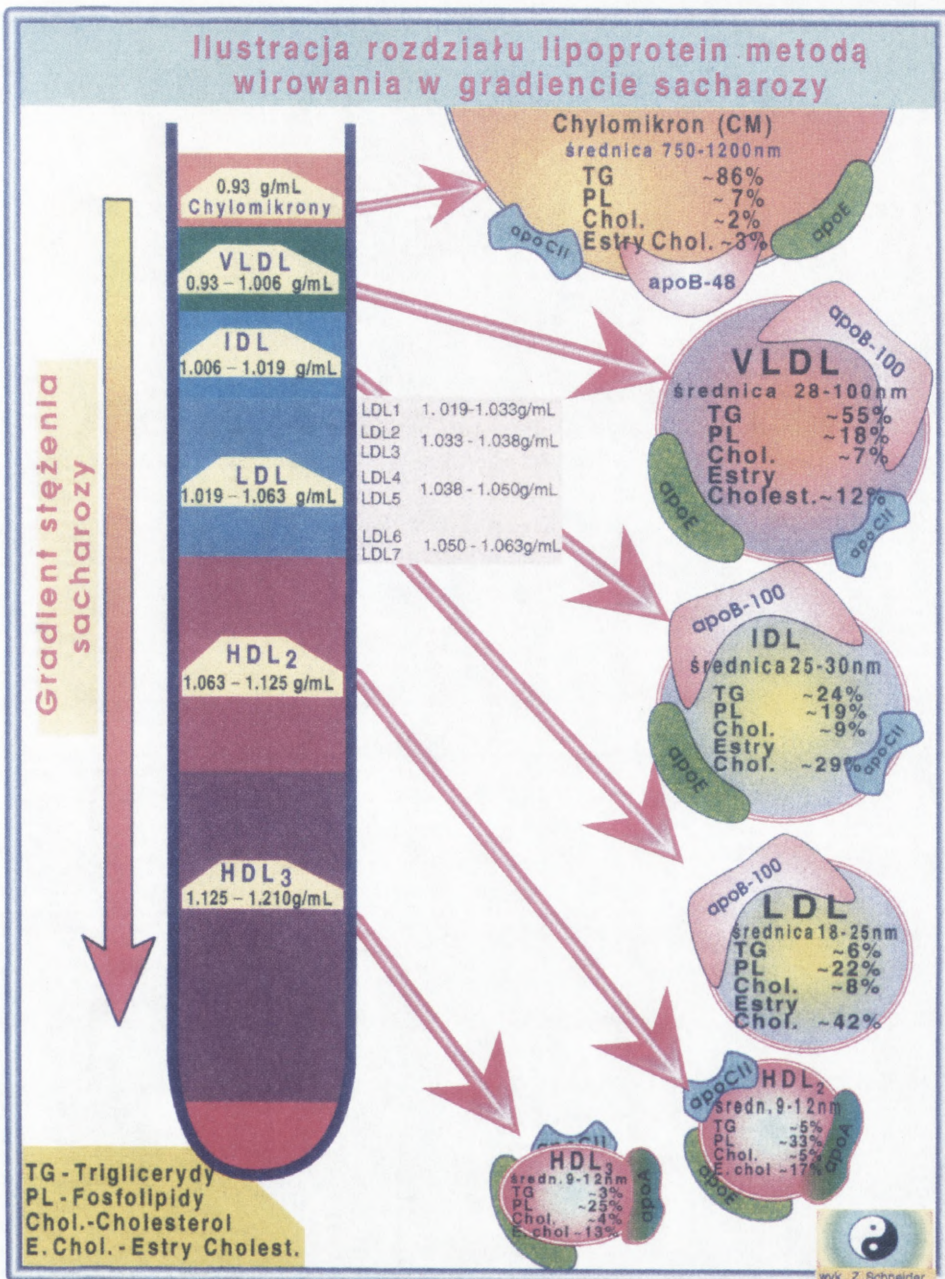
Cząstki HDL odzyskują białko apoCII od cząstek IDL i resztkowych chylomikronów i przenoszą to białko do VLDL oraz świeżo wydzielanych chylomikronów przez komórki nabłonka jelita (rys. 8). Białko apoCII jest niezbędne tym lipoproteinom do aktywacji lipazy lipoproteinowej w nabłonku naczyń włosowatych.



RYSUNEK 8



RYSUNEK 9



RYSUNEK 10

Cząstki HDL pośredniczą również w przekazywaniu białka apoE z cząstek IDL i resztkowych chylomikronów do świeżo wydzielanych przez wątrobę cząstek VLDL lub do nowopowstałych chylomikronów (rys. 6 i 8).

METABOLIZM VLDL – LIPOPROTEIN O BARDZO MAŁEJ GĘSTOŚCI

Lipoproteiny VLDL (ang. *Very Low Density Lipoproteins*) są wytwarzane w retikulum endoplazmatycznym i w aparacie Golgiego komórek wątroby. Są one wydalone z komórek do krwi w drodze egzocytozy. Cząstki VLDL są około trzykrotnie większe aniżeli cząstki HDL (rys. 8 i 10). Lipidowe wnętrze zawiera przeważnie triglicerydy, natomiast hydrofilna okrywa składa się z białka apoB-100 i fosfolipidu, głównie lecytyny oraz niewielkiej ilości cholesterolu (rys. 6 i 7). Cząstka VLDL pozyskuje białko CII od HDL.

Zadaniem VLDL jest przenoszenie z wątroby kwasów tłuszczowych (w formie tłuszczu - triglicerydów) do tkanek obwodowych. Hydroliza tłuszczu do kwasów tłuszczowych i glicerolu zachodzi przy udziale enzymu lipazy znajdującej się na błonie zewnętrznej naczyń włosowatych. Enzym ten jednak wymaga aktywacji przez białko apoCII. Zaburzony metabolizm wątroby objawiający się niedoborem syntezy VLDL bądź zmniejszeniem egzocytozy tych cząstek może być spowodowany alkoholizmem, zatruciem wątroby, chorobami wirusowymi lub defektami genetycznymi określonych białek. Kliniknym objawem tych zaburzeń jest otyśczenie wątroby. Towarzyszy temu nienormalnie niski poziom cholesterolu w osoczu. Natomiast defekt genetyczny białka **apoCII** wyrażający się w jego upośledzonym działaniu (niekoniecznie kompletną dysfunkcją) objawia się wysokim poziomem VLDL we krwi.

Cząstki VLDL otrzymują również od cząstek HDL białko apoE. Białko apoE umożliwia powrót do wątroby uszczuplonym w tłuszcz cząstkom nazwanym lipoproteinami o pośredniej gęstości – IDL (*Intermediate Density Lipoproteins*). Wyłącznie komórki wątroby mają receptory białka apoE w błonach komórkowych, które umożliwiają endocytozę IDL (rys. 8).

Znaczna część lipoprotein IDL jest przenoszona do komórek wątrobowych. Pozostała część tych lipoprotein jest dalej pozbawiana tłuszczu w tkankach obwodowych. W rezultacie tych przemian cząstki lipoprotein zmniejszają swoje wymiary, a gęstość wzrasta (rys. 8). Na powierzchni cząstki IDL znajduje się stosunkowo duże białko apoB-100. Jest ono silnie zakotwiczone w lipidowym obszarze tych cząstek (rys. 9). Zmniejszające swoje wymiary cząstki IDL nie mogą na powierzchni zmieścić pozostałych białek i dochodzi do transferu białek apoE i apoCII do cząstek HDL.

Zubożona o białka i kwasy tłuszczowe cząstka nazwana lipoproteina o małej gęstości albo LDL (*Low Density Lipoprotein*) ma tylko jedną cząsteczkę białka apoB-100 i procentowo zawiera więcej cholesterolu aniżeli cząstki IDL (patrz rys. 9). Apolipoproteina B-100 umożliwia endocytozę cząstki praktycznie do wszystkich tkanek, ale najwięcej LDL pobiera wątroba. Jest to możliwe dzięki receptorowi LDL w błonie komórkowej tkanek. Schemat przebiegu endocytozy LDL zobrażowano na rysunku 12. Szykość endocytozy LDL jest regulowana przez komórkę poprzez regulację ilości receptorów w błonie stosownie do zapotrzebowań komórek na cholesterol. Genetycznie uwarunkowane defekty receptora LDL zdarzają się dosyć często 1 na 500 osób. Są one przyczyną znacznie wyższego od normy stężenia frakcji LDL w osoczu. Tu warto nadmienić, że uszkodzone przez wolne rodniki LDL jest fagocytowane przez makrofagi (patrz akapit o patogenezie miażdżycy).

LIPOPROTEINA Lp(a)

Funkcja fizjologiczna tej lipoproteiny nie została bliżej poznana. Przypisuje się tej cząstce współdziałanie w genezie i rozroście blaszki miażdżycowej. Jest cząstką podobną do cząstki LDL. Lp(a) ma podobnie jak LDL białko apoB-100, które jednak zostało zmodyfikowane przez kowalencyjne połączenie z innym białkiem nazwanym apo(a). Białko to jest homologiczne z plazminogenem. Zmodyfikowane białko apoB-100 w tej lipoproteinie nie tworzy kompleksu z receptorem LDL, co uniemożliwia endocytozę Lp(a) za pośrednictwem tego receptora. Lipoproteina Lp(a) jest prawdopodobnie fagocytowana przy udziale receptorów rozpoznających zmodyfikowane bądź uszkodzone białka ze skutkiem dla wzrostu blaszki miażdżycowej jak opisano poniżej.

METABOLIZM CHYLOMIKRONÓW

Chylomikrony są syntetyzowane wyłącznie w komórkach nabłonka jelita. W komórkach tych absorbowane ze światła jelita kwasy tłuszczowe i monoacyloglicerole są przekształcane w tłuszcze oraz zachodzi estryfikacja cholesterolu kwasem tłuszczowym. Materiał ten wchodzi w skład hydrofobowego jądra chylomikronów. Natomiast hydrofilna powłoka tych cząstek składa się z fosfolipidów, niewielkiej ilości wolnego cholesterolu i cząsteczki proteiny apoB-48. Konstrukcja tych, olbrzymich w skali komórki cząstek odbywa się w szorstkim retikulum endoplazmatycznym (synteza części białkowej) i gładkim retikulum endoplazmatycznym (synteza fosfolipidów, tłuszczów i estrów cholesterolu). Ostateczny kształt otrzymują

chylomikrony w aparacie Golgiego skąd przekazywane są do egzocytozy poza komórke. Są one następnie transportowane via układ limfatyczny do krwioobiegu.

W odróżnieniu od pozostałych lipoprotein, chylomikrony są na tyle duże (średnica 750–1200 nm), że rozpraszają światło, co nadaje osoczu mętne, białawe, zabarwienie. Ich mniejsza od osocza gęstość (0,93 g/ml) sprawia, że osocze wirowane w próbówce bądź trzymane przez dłuższy czas bez wstrząsania pokryje się białym kożuszkiem.

Chylomikrony transportują kwasy tłuszczowe w formie triglicerydów do tkanek obwodowych. Tam są one enzymatycznie hydrolizowane do kwasów tłuszczowych i glicerolu podobnie jak to się dzieje w przypadku cząsteczek VLDL (rys. 8). Chylomikrony nie mają białka apoCII w chwili egzocytozy z komórek nabłonka jelita, lecz pozyskują je od HDL.

Chylomikrony są również zaopatrywane przez lipoproteiny HDL w białko apoE. Białko to umożliwia resztkowym chylomikronom, powstałym po oddaniu większości triglicerydów, przenieść się do komórek wątroby w drodze endocytozy. Przedtem jednak resztkowe chylomikrony przekazują cząstkom HDL niepotrzebne już białko apoCII (rys. 8).

PATOLOGICZNE ZJAWISKA METABOLIZMU LIPOPROTEIN

Grupę chorób związanych z zaburzeniami gospodarki lipidowej określa się terminem medycznym hiperlipidemią. Wyróżnia się tu dwie podgrupy.

Hipercholesterolemia odnosi się do podwyższonego poziomu cholesterolu w surowicy krwi.

Hipertriglicerydemia dotyczy podwyższonego stężenia tłuszczu, nazwanego językiem medycznym triglicerydem (TG), chociaż nazwa chemiczna to **triacyloglicerol**.

Nieprawidłowy poziom lipidów w surowicy wywodzi się z genetycznie uśledzonych funkcji lipoprotein VLDL, IDL, LDL, HDL i chylomikronów albo też jest wynikiem wywołania tych nieprawidłowości innymi chorobami, czynnikami środowiska albo żywieniem. Szczegółowe rozpoznanie choroby i postawienie diagnozy można obecnie rozpatrywać na poziomie białek i genów.

W przypadku dziedzicznej hipercholesterolemii znana jest jednostka chorobowa polegająca na genetycznie uwarunkowanym defekcie białka pełniącego funkcję receptora LDL. Receptory LDL umożliwiają wprowadzenie cząstki LDL do komórki przez endocytozę (rys. 12). Jeśli defekt receptora LDL jest wynikiem mutacji zapisu w genie znajdującym się tylko w jednym chromosomie (dziedzicznym od ojca

bądź od matki) jednostka chorobowa określona będzie jako **heterozygotyczna**. Jednak mimo posiadania przez komórkę jednego niezmutowanego genu w drugim chromosomie komórka produkuje mniej receptorów. Defekt ten ujawnia się, szczególnie u osobników po 40 roku życia w ponad dwukrotnie wyższym poziomie LDL w osoczu. Stwarza to wielokrotnie podwyższone ryzyko choroby niedokrwiennej serca. **Homozygotyczna** odmiana tej jednostki chorobowej jest ciężką postacią (bowiem wszystkie receptory są niesprawne), objawiającą się ponad 4-krotnym podwyższeniem cholesterolu w surowicy i kończącą się najczęściej zawałem serca ze skutkiem śmiertelnym już w wieku ok. 20 lat

Lista różnych znanych obecnie defektów dotyczy wszystkich omawianych powyżej apolipoprotein. W przypadku apoE odkryto aż cztery różne defekty (allele) powodujących różne nasilenie choroby. Defekty zdarzają się również u białek enzymatycznych znajdujących się w osoczu i w błonach komórkowych tkanek docelowych jak: lipaza lipoproteinowa, transacylaza LCAT i w enzymie hydrolizującym estry cholesterolu.

Precyzyjne określenie jednostki chorobowej, zwykle oparte najpierw na rozpoznaniu klinicznym, wymagającym nieraz obserwacji pod kontrolą w szpitalu, jest czynnością złożoną i wymagającą specjalistycznej wiedzy. Choroby wywołane defektami genetycznymi należą do grupy **hipercholesterolemii i hiperlipidemii pierwotnych**.

Zakłócenia funkcji prawidłowych lipoprotein bądź szybkości ich syntezy i degradacji mogą być spowodowane innymi przyczynami, takimi jak: niewłaściwe żywienie, trucizny, używki, działalność zawodowa i mała aktywność fizyczna. Hiperlipidemie wywołane tymi czynnikami nazwane są **hiperlipidemiami wtórnymi**. Odróżnienie tych form, zwłaszcza u pacjentów leczących cukrzycę, nerki, wątrobę i trzustkę, wykonują wyspecjalizowane jednostki służby zdrowia.

Hypercholesterolemie pierwotne występują z częstotliwością 1:500, natomiast pierwotne hipertriglicerydemie 1:100. Wtórne odmiany tych chorób dotyczą prawie połowy naszego społeczeństwa.

PATOGENEZA MIAŻDŻYCY I ŚRODKI ZARADCZE

Zmniejszanie się światła naczyń krwionośnych w wyniku tworzenia się blaszek miażdżycowych ma wielorakie skutki. Ogranicza zdolność organizmu do zaopatrywania tkanek w substancje odżywcze i tlen. Rezultatem tego jest narastające upośledzenie sprawności wszystkich organów i przyśpieszenie ich starzenia się. Największą śmiertelność spowodowaną miażdżycą naczyń krwionośnych notuje się w wyniku choroby niedokrwiennej serca i udaru mózgu.

Typowa blaszka miażdżycowa jest zlokalizowana najczęściej w tętnicy grubej i składa się z zewnętrznej pokrywy zbudowanej z komórek miocytów przerośniętych włóknami kolagenu oraz z amorficznych drobin estrów cholesterolu. Rdzeń blaszki zawiera komórki piankowe powstałe z transformowanych fagocytów i miocytów oraz kryształ cholesterolu (rys. 2). Na podstawie zastanej struktury trudno jest odtworzyć wieloletni przebieg jej formowania się. W literaturze wymienia się wiele hipotez genezy blaszek miażdżycowych. Można jednak wskazać na pewne mechanizmy, które są w to zaangażowane.

Znane są objawy odkładania w organizmie przez fagocyty substancji obcych w postaci złogów, niemożliwych do strawienia. Można tam znaleźć cząstki metali, barwniki, a także niektóre bakterie, np. trudne do zniszczenia bakterie gruźlicy. Takie złogi są również symptomatyczne dla niektórych chorób dziedzicznych, takich jak np. gangliozydozy, które polegają na utracie zdolności komórek do enzymatycznego rozkładu szczególnych produktów katabolizmu. W przypadku hipercholesterolemii odkładane są żółtaki, grudki krystalicznego cholesterolu na ścięgnach i w skórze (kurze łapki). Struktura złogów jest różna w różnych tkankach. Do procesu ich tworzenia włączają się w określonej kolejności różne komórki zdolne do przemieszczania się (chemotaksji), takie jak: monocyty torujące sobie drogę przez gąszcz włókien międzykomórkowych, fagocyty – komórki z nich transformowane i dostarczające cholesterol z pochłoniętych cząstek LDL, a także fibroblasty – komórki wytwarzające włókna do zamurowania granul. Szczególną rolę pełnią tu również płytki krwi, które stymulują chemicznie fibroblasty i inne komórki do podziału (rys. 13 i 14). Stymulowane czynnikami wzrostu fibroblasty zwiększają wydzielanie poza komórkę syntetyzowane w układzie Golgiego włókna. Krystaliczny cholesterol zdeponowany w fagocytach nie może być zdegradowany enzymatycznie ani odtransportowany. Jak wyżej już wspomniano, tylko wątroba ma odpowiednie enzymy zdolne przemieniać chemicznie ten związek w rozpuszczalne kwasy żółciowe wydalane z organizmu przez żółć i układ trawienny. Jednak nawet wątroba nie jest zdolna metabolizować agregowanego cholesterolu. Niewielkie zdolności rozpuszczania krystalicznego cholesterolu mają pochodne soli kwasów żółciowych (patrz chenodiol na rys. 9).

UDZIAŁ WOLNYCH RODNIKÓW W GENEZIE BLASZEK MIAŻDŻYCOWYCH

Badania ostatnich lat dostarczają dowodów na większy udział, aniżeli sądzono, wolnych rodników tlenowych i rodników generowanych wtórnie przez rodniki tlenowe w tworzeniu i rozroście blaszki miażdżycowej. Wśród tych ostatnich na pierwszy plan wysuwają się rodniki wywodzące się z nienasyconych kwasów

tłuszczowych i aktywne chemicznie związki powstające w wyniku działania wolnych rodników na wielonienasycone kwasy tłuszczowe, takie jak: dialdehyd malonowy, mające zdolność modyfikowania białek (rys. 9).

Powszechnie akceptuje się pogląd, że geneza blaszki miażdżycowej rozpoczyna się od uszkodzenia śródbłonka. Wśród sprawców na pierwszym miejscu wymienia się rodniki tlenowe, zwłaszcza anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- i rodnik hydroksylowy OH^\cdot . Są one generowane przez organizm w trakcie metabolizmu. Dalszy przebieg jest przedmiotem różnorodnych interpretacji. Dlatego też tu wymienione będą różne czynniki i wyzwalane przez nie procesy. Słuchaczowi tego kursu daje się sposobność wypracowania własnego scenariusza genezy miażdżycy.

Atak wolnych rodników na komórki śródbłonka wyzwała następujące procesy:

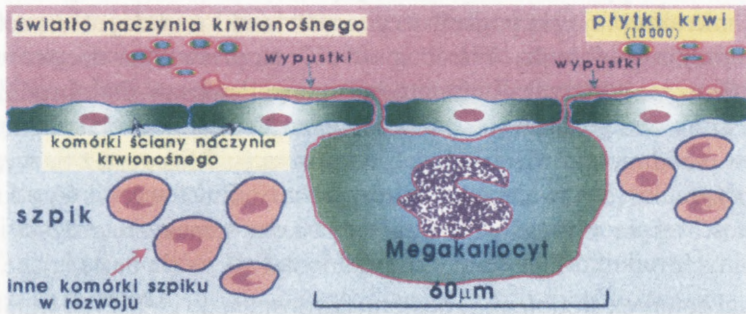
- rozpad komórek śródbłonka i odsłonięcie dostępu do głębszych warstw ściany tętnicy – błony środkowej (rys. 14),
- gromadzenie się płytek krwi w obrębie miejsca uszkodzenia i jego uszczelnienie przez agregację,
- sekrecja przez agregujące płytki czynników wzrostowych: (1) czynnika stymulującego proliferację komórek śródbłonka – PDECGF (rys. 13 i 14) oraz (2) czynnika stymulującego proliferację fibroblastów i miocytów – PDGF (rys. 13 i 14).

Proliferacja miocytów powoduje niekontrolowany i nieuporządkowany przestrzennie rozrost miocytów, wśród nich mogą powstać miocyty mające receptory umożliwiające niekontrolowaną fagocytozę oxLDL. Komórki te obciążone cholesterolem mogą się przekształcić w komórki piankowe spotykane w starszych blaszkach miażdżycowych (rys. 2, 9 i 14).

Nieuszkodzone komórki śródbłonka w strefie ataku wolnych rodników są stymulowane do wydzielenia atraktantów MCP-1 (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) przyciągających na zasadzie chemotaksii neutrofile i fagocytyjące makrofagi (rys. 14). Fagocyty gromadzą się w obrębie uszkodzenia. Szczególnie niebezpieczne dla komórek śródbłonka są minimalnie zmienione przez wolne rodniki cząstki LDL (mmLDL – ang. *minimally modified LDL*) (rys. 14). W cząstkach mmLDL białko apoB100 zachowało zdolność wiązania się z receptorem LDL (rys. 12). Cząstki te pełnią rolę konia trojańskiego wprowadzając do komórki produkty oksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych i utlenione formy cholesterolu. Związki te mobilizują komórki śródbłonka do syntez różnych białek receptorowych związanych z błonami, a także wydzielają poza komórkę białka, takie jak wyżej wymienione białko MCP-1 (rys. 14). Receptory umożliwiają adhezję monocytów do komórek, a białka wydzielane poza komórkę wywołują ogólny stan zapalny (cytokiny), niekontrolowaną proliferację miocytów i innych komórek ściany tętnicy (czynniki wzrostowe) i przyciągające komórki fagocytyjące (chemoatraktanty).

Fagocytyjące komórki w procesie fagocytozy generują wolne rodniki, które uszczuplają lokalny obszar w zasoby związków je neutralizujące.

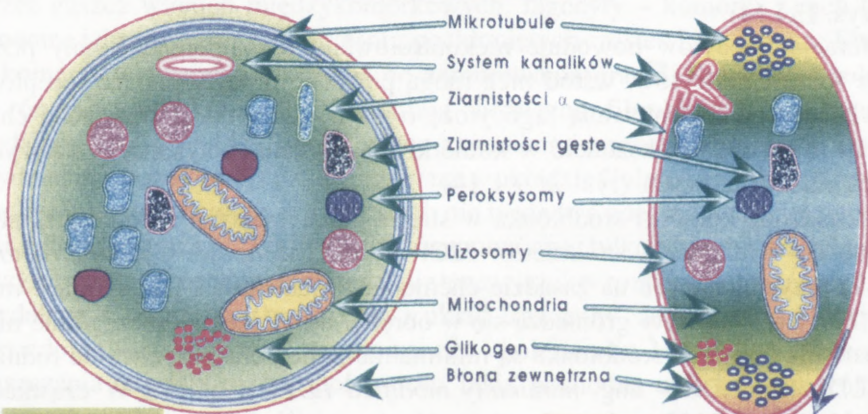
Ilustracja tworzenia płytek krwi z megakariocytu



Płytki krwi powstają z wypustek megakariocytu (w liczbie ok. 10000 z jednej komórki). Płytki nie mają jądra. Liczba płytek w krwi u osób zdrowych wynosi $150-400 \times 10^9 / L$ ($150\,000-400\,000$ w 1 mm^3). Czas życia 9-10 dni.

Płytki mają kształt dysku o średnicy 2-4 μm. Kształt dyskooidalny utrzymywany jest przez białka cytoszkieletu (aktyna, miozyna, mikrotubule).

Budowa płytek krwi



Ziarnistości α:

1. Czynniki płytkowy
2. Białka adhezyjne (fibronektyna, witronektyna)
3. Fibrynogen
4. Czynniki wzrostu PDGF (Platelet Derived Growth Factor)
5. Czynniki wzrostu komórek śródbłonna (PDECGF) (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor)

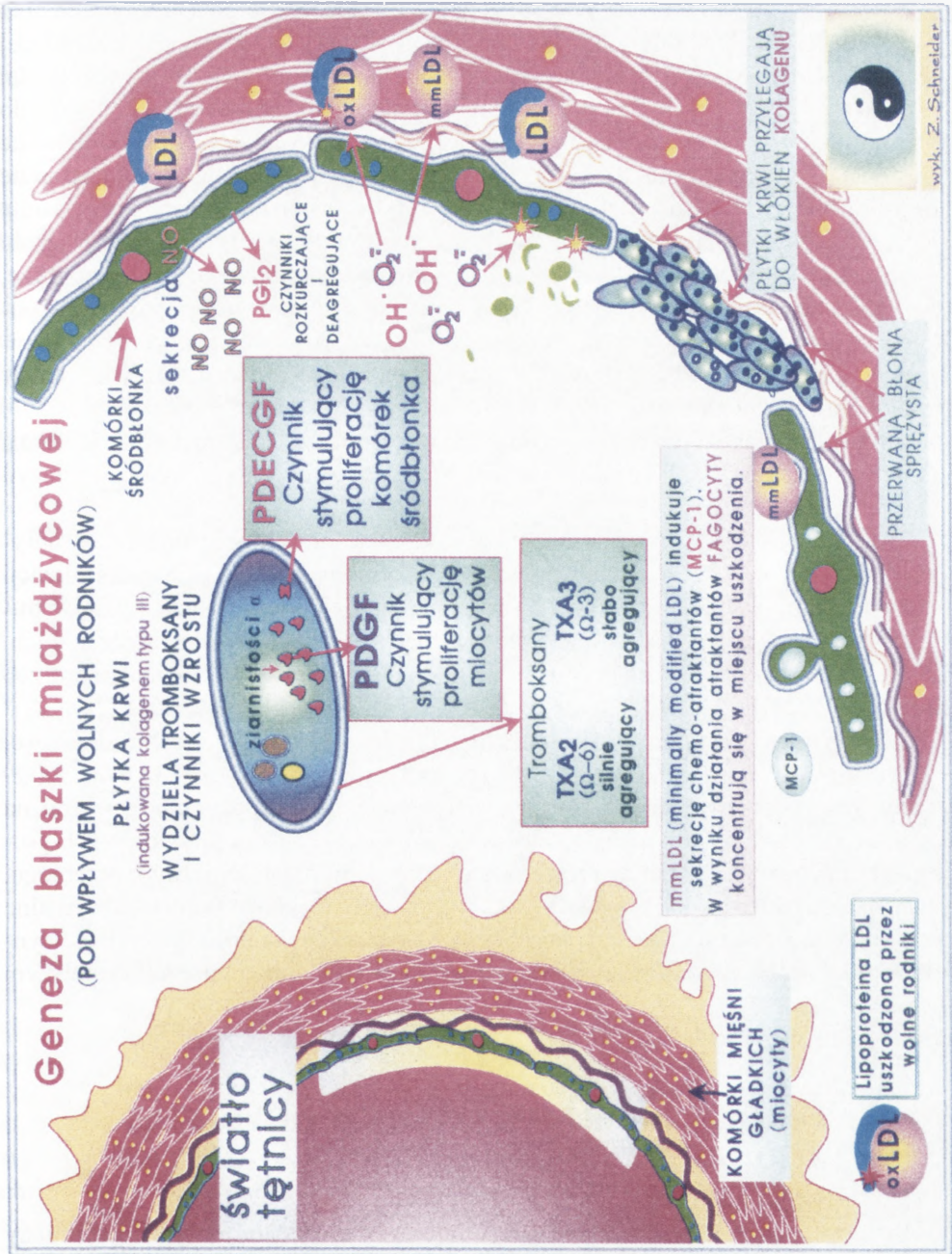
Tromboksany są syntetyzowane z udziałem fosfolipidów błony.

TXA₂ i TXA₃

Ziarnistości gęste:

ADP ATP GDP GTP Ca⁺⁺ Mg⁺⁺
serotonina, fosfoinozytole





RYSUNEK 14

Nienasycone kwasy tłuszczowe pochodzące z rozpadu komórek śródbłonka oraz te w pozbawionych osłony antyoksydantów cząstkach LDL ulegają daleko idącej oksydacji. Dochodzi do rozległego uszkodzenia białka apoB100. W szczególności zostają zmodyfikowane reszty lizyny w tym białku przez dialdehyd malonowy (do 15% zablokowanych reszt lizyny), jak to pokazano na rysunku 9. Silnie zmienione cząstki LDL (oznaczane jako oxLDL) nie mogą już wnikać do komórek na zasadzie kontrolowanej endocytozy (pokazanej na rys. 12), lecz są fagocytowane przy udziale receptorów fagocytujących. Utlenione formy kwasów tłuszczowych i cholesterolu wywołują w komórce fagocyta, a także w fagocytujących miocytach apoptozę, to jest kontrolowaną śmierć komórki. Zewnętrznym objawem apoptozy jest postępująca fragmentacja komórki. Można przyjąć, że obserwowane komórki piankowe w blaszkach miażdżycowych są rezultatem tego procesu zatrzymanym w fazie fragmentowania się.

W zaawansowanej miażdżycy czynnikiem wywołującym uszkodzenie śródbłonka może być pęknięcie blaszki miażdżycowej pod wpływem silnego skurczu naczyń bądź ciśnienia krwi (rys. 1).

Nasilenie powyższych procesów może być znacznie ograniczone przez antyoksydanty i wymiatacze wolnych rodników. Enzymy uczestniczące w neutralizacji wolnych rodników są również indukowane przez utlenione produkty kwasów tłuszczowych. Enzymy te zawierają takie mikroelementy, jak: cynk, miedź i selen. Pierwiastki te powinny się znaleźć w naszym organizmie w adekwatnych do potrzeb stężeniach.

Jak z powyższego wynika, mechanizm genezy i rozrostu blaszki miażdżycowej jest złożony i wieloczynnikowy. Tu należy zaakcentować, że liczba blaszek miażdżycowych jest niewielka zważywszy wieloletni okres ekspozycji organizmu na czynniki aterogenne. Można by z tego wnioskować, że liczba prawidłowych procesów naprawczych znacznie przeważa nad epizodami o patologicznym przebiegu. Utrzymanie w dobrej kondycji śródbłonka we wczesnym okresie życia i maksymalne spowolnienie rozrostu istniejącej blaszki przez zminimalizowanie ekspozycji na czynniki ryzyka i także właściwe żywienie pozostają w dalszym ciągu najważniejszym wskazaniem.

ATEROGENNE DZIAŁANIE HOMOCYSTEINY JAKO NIEZALEŻNEGO CZYNNIKA RYZYKA

Homocysteina jest niebiałkowym α -aminokwasem pochodzącym z przemiany metabolicznej metioniny. Aminokwas ten przedostaje się z komórek do osocza i łączy się z grupami aminowymi lizyny białka apoB100 w LDL. Okazuje się, że aterogenne działanie LDL objawia się również u tak zmodyfikowanej formy li-

poproteiny. Można założyć, że u niektórych osobników będzie się obserwować z tej przyczyny przyspieszony postęp miażdżycy mimo utrzymywania się poziomu lipoprotein w normie.

Niektóre laboratoria oznaczają poziom homocysteiny u pacjentów chorych na miażdżycę. Podwyższony poziom tego aminokwasu ($>16 \mu\text{g/ml}$) w osoczu obserwowano u 28–40% chorych. Ryzyko miażdżycy wzrasta wraz z poziomem homocysteiny w osoczu i jej stężenie w granicach $100 \mu\text{mol/l}$ uważa się jako stan bardzo niebezpieczny.

Homocysteina, aminokwas nie będący składnikiem białek jest przekształcany do metioniny przy udziale witaminy B_{12} i kwasu foliowego (rys. 15). Reakcja ta polega na metylacji tego aminokwasu. Jak wyżej wspomniano, metionina może być z powrotem odmetylowana do homocysteiny w innym szlaku metabolicznym. Metionina i cysteina są wspólnie cytowane w indeksie FAO jako egzogenne składniki białka w żywności. Większość podstawowych produktów żywnościowych jest źródłem tych aminokwasów (mięso, drób, ryby, mleko, jaja i pieczywo). W porównaniu z wzorcem FAO suma tych dwóch aminokwasów w wymienionych produktach jest w 50- do 100-procentowym nadmiarze. Wnioski z tego faktu nasuwają się same. Osobnicy, u których objawia się predyspozycja (być może genetyczna) do podwyższonego poziomu homocysteiny, powinni zasięgnąć porady u dietetyka i lekarza specjalisty. Witamina B_{12} , mało zauważana w ostatnich 15 latach w literaturze medycznej, okazała się ważnym czynnikiem w prewencji miażdżycy. Wprawdzie witamina B_{12} i kwas foliowy nie mogą wpłynąć na wysokość puli (sumy) metioniny i homocysteiny w komórce, mogą jednak kształtować stosunek stężeń tych aminokwasów na niekorzyść aterogenicznej homocysteiny.

UWAGI OGÓLNE

W odróżnieniu od innych ssaków ludzie mają genetyczną wadę wytwarzania słabo umięśnionych mięśniami gładkimi ścian naczyń krwionośnych. Ściana tętnicy składa się z wielu warstw mięśni gładkich. Z badań porównawczych wynika, że człowiek w porównaniu z innymi ssakami ma mniejszą liczbę warstw aniżeli zwierzęta. Liczba tych warstw u ludzi nie jest adekwatna do skutecznego przeciwstawienia się ciśnieniu krwi, które rozpieiera te naczynia, jak również do stymulowanego hormonami skurczu i rozkurczu mięśni naczyń krwionośnych. Dochodzi do przeciążenia pracą komórek tych mięśni. Tam, gdzie doliczono się u zwierząt 50 warstw komórek, w odnośnym miejscu tętnicy ludzkiej jest zaledwie 28 (patrz literatura *Internal Medicine* str. 149). Ta grupa komórek, w odróżnieniu od komórek innych tkanek, jest wyjątkowo słabo zaopatrywana w tlen i substancje odżywcze. Jest to wynikiem rzadko rozmieszczonych naczyń włosowatych, z których

Hormony wywodzące się z $\Omega-6$ kwasów tłuszczowych



KWAS LINOLOWY
18:2 (9,12)
($\Omega-6$ kwas tłuszczowy)

Elongacja i desaturacja
(w organizmie zwierząt kwas tłuszczowy zostaje wydłużony o 2 atomy C i są wprowadzane dwa wiązania podwójne)



Kwas arachidonowy
20:4 (5,8,11,14)
bezpośredni substrat do syntezy prostaglandyn i tromboksanów jest pozyskiwany z błony komórki.

Substrat do syntezy prostaglandyn (PG), tromboksanów (TX) i leukotrienów (LT)

Aspiryna jest nieodwracalnym inhibitorem tej przemiany

$\Omega-3$ kwasy tłuszczowe hamują w płytkach krwi przemianę kwasu arachidonowego do tromboksanów TXA_2 .

PGH₂

Cyklooksygenazy

5-Lipoksygenazy

Tromboksan
 TXA_2

Prostaglandyny

Leukotrieny (LT)

Produkowany przez płytki krwi - działa agregująco.

PGI_2
 PGD_2
 PGE_2
 PGF_2

Prostaglandyny produkowane przez komórki nabłonka hamują agregację płytek krwi.

wyk. Z. Schneider

Hormony wywodzące się z $\Omega-3$ kwasów tłuszczowych



KWAS LINOLENOWY 18:3 (9,12,15)
($\Omega-3$ kwas tłuszczowy)
(występ: oleje lniane, rzepakowy i glony morskie)

Elongacja i desaturacja
(w organizmie zwierząt kwas tłuszczowy zostaje wydłużony o 2 atomy C i są wprowadzane dwa wiązania podwójne)

Substrat do syntezy prostaglandyn (PG), tromboksanów (TX) i leukotrienów (LT)

EPA znajduje się w znacznych ilościach (ok. 20%) w tłuszczu tych ryb morskich, które zjadają glony pochodzące z zimnych mórz.

Cyklooksygenazy

5-Lipoksygenazy

PGH₃

TXA_3

Wytwarzany przez płytki krwi. Działa słabo agregująco.

PGI_3
 PGD_3
 PGE_3

Ikozo-penta-enowy kwas
20:5 (5,8,11,14,17)
(ang. Eicosapentaenoic acid - EPA)

Leukotrieny (LT)

Prostaglandyny wytwarzane przez komórki nabłonka. Hamują silnie agregację płytek krwi.

wyk. Z. Schneider

TABELA 3. Klasyfikacja hiperlipoproteinemii

Feno- typ	Zwiększone stężenie		Częstość występowania (w %)
	lipoprotein	lipidów	
I	Chylomikrony	TG	<1
IIa	LDL	cholesterol	10
IIb	LDL + VLDL	TG + cholesterol	40
III	IDL	TG + cholesterol	<1
IV	VLDL	TG ± cholesterol	45
V	VLDL + chylomikrony	TG ± cholesterol	5

TG – triglicerydy, IDL – lipoproteiny o gęstości pośredniej

dyfundują te składniki do komórek. Podczas gdy w innych tkankach średni dystans dzielący komórkę od zaopatrującej ją włóściczki wynosi około 50 μm , u komórek mięśni gładkich wynosi on aż 300–600 μm . Powolny dopływ, w drodze fizycznej dyfuzji, pokarmu i tlenu zmusza przepracowane komórki do patologicznego metabolizmu i może być przyczyną ich śmierci. Uwięzione w blaszkach miażdżycowych komórki praktycznie są odcięte od zaopatrzenia i są skazane na śmierć. Produkty uszkodzenia lub rozkładu komórek mogą wyzwolić mechanizmy, wyżej wymienionych procesów naprawczych, prowadzące do rozrostu blaszek miażdżycowych (rys. 1 i 2).

Badania epidemiologiczne wykazały, że nadciśnienie ma nadrzędny, synergistyczny wpływ na powstanie blaszek miażdżycowych. Z tego wynikają praktyczne wskazania. Przy zaawansowanej miażdżycy mięśnie kurcząc się uciskają twardymi kryształami cholesterolu komórki mięśniowe i tętniczki zasilające te mięśnie. Dochodzi do pęknięcia blaszki i do krwawienia z zerwanych naczyń zasilających ścianę naczynia krwionośnego, a to włącza wyżej opisane niepożądane procesy naprawcze i wzmacnia rozrastanie się blaszki miażdżycowej (rys. 14).

W pogarszaniu stanu naczyń krwionośnych w sytuacji zaawansowanej miażdżycy mają też swój udział krótkożyjące (sekundy) hormony syntetyzowane z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (rys. 16). Hormony: prostaglandyny, tromboksany i leukotrieny wpływają na skurcz i rozkurcz naczyń krwionośnych i uruchamiają mechanizmy tworzenia zakrzepów bądź ich rozpuszczania. Rozróżnia się dwie grupy tych hormonów (rys. 16):

- wywodzących się z Ω -6 nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz
- wywodzących się z Ω -3 nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Podczas gdy w pierwszej grupie przeważają hormony sprzyjające skurczom naczyń krwionośnych i zakrzepom, w drugiej grupie przeważają hormony o działaniu antagonistycznym. Jak wynika z badań i obserwacji, określony stosunek w żywności Ω -6/ Ω -3 nienasyconych kwasów tłuszczowych ma kluczowe znaczenie w prewencji powstania bądź zatrzymania rozwoju miażdżycy naczyń krwionośnych. Stosunek powinien zawierać się w granicach 3–5. W tabeli 4 są podane wartości stosunku

TABELA 4. Stosunek nienasyconych kwasów tłuszczowych Ω -6/ Ω -3 w niektórych produktach żywnościowych

Pożywienie	% tłuszczu	Stosunek Ω -6/ Ω -3	Pożywienie	% tłuszczu	Stosunek Ω -6/ Ω -3
Mąka			Mięso		
Żytania	2,2	7,3	Kurczak	10	6,0
Pszenna	2,0	10,0	Jagnię	16	4,8
Owsiana	5,4	18,5	Baranina	22	4,8
			Wołowina	11	6,3
			Bekon	29	12,7
Warzywa			Ryby		
Ziemniak	0,1	0,75	Makrela	20	0,13
Kalafior	0,2	0,16	Śledź	15	0,08
Kapusta	0,2	0,37	Halibut	16	0,11
Marchew	0,2	7,0	Łosoś	9	0,05
			Dorsz	0,3	0,11
Owoce			Tłuszcze		
Truskawka	0,2	1,12	Smalec wieprzowy	100	4,5
Śliwka	0,2	2,0	Tłuszcz kaczki	100	12,7
Jabłko	0,2	4,8	Tłuszcz kury	100	16,0
Gruszka	0,4	3,0	Margaryna (soja)	81	6,9
			Margaryna (Słoneczna)	82	25,0
Nabiał			Oleje		
Masło	81	4,8	Oliwkowy	100	2,2
Mleko	3,8	1,0	Sojowy	100	7,7
Ser tłusty	27	4,7	Kukurydziany	100	45,0
Jajka	11	4,9	Słonecznikowy	100	200
			Rzepakowy (bezerukowy)	100	1,9
			Lniany (zimnotłoczony)	100	0,5

Na podstawie *National Nutrition Council's Food Table of 1988* oraz *Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe*. PWN, 1991.

Ω -6/ Ω -3 dla niektórych produktów spożywczych. Poleca się też utrzymać następującą proporcję kwasów tłuszczowych w żywności:

33% wielonienasyconych kwasów tłuszczowych Ω -6 + Ω -3 (np oleje: rzepakowy, lniany i słonecznikowy oraz tłuste ryby z mórz północnych),

33% jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (olej z oliwek, olej sojowy),

33% nasyconych kwasów tłuszczowych, preferencyjnie kwas stearynowy.

Jak zaznaczono na rysunku 16, wielonienasycone kwasy tłuszczowe Ω -3 hamują syntezę tromboksanów TXA₂, hormonu stymulującego agregację płytek krwi, procesu niebezpiecznego w zaawansowanej miażdżycy. Kwasy Ω -3 są materiałem wyjściowym do syntezy hormonu TXA₃ wpływającego w słabszym stopniu na agregację płytek krwi (rys. 16). Synteza tych hormonów może być również zaburzona

obecnością trans nienasyconych kwasów tłuszczowych. Jak zilustrowano na rysunku 3, trans-nienasycone kwasy tłuszczowe mogą zablokować aktywność delta-6 desaturazy jednego z enzymów w wieloetapowej przemianie Ω -6 kwasu tłuszczowego do prostaglandyn.

Jednak zbyt duża podaż nienasyconych kwasów tłuszczowych w żywności, przy równoczesnym niedoborze witamin E i C pełniących rolę antyoksydantów i chroniących te kwasy przed atakiem wolnych rodników może z powodów wyżej wymienionych przyspieszyć aterosogenezę.

LITERATURA

- [1] JASIŃSKI K. (red.) Choroba niedokrwiennc serca. PZWL Warszawa 1987
- [2] CYBULSKA B, SZOSTAK WB, KŁOSIEWICZ-LATOSZEK L. Leczenie hiperlipidemii w profilaktyce miażdżycy. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 1994.
- [3] KELLEY WN i inni (ed.) Internal Medicine. Wyd. J. B. Lippincott Co., Philadelphia 1989.
- [4] GIOTTO AM i inni. Hiperlipidemie. PZWL, Warszawa 1994.
- [5] ENSMINGER AM i inni. The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition. CRC-Press Inc. London 1995.
- [6] STRYER L. Biochemia. PWN Warszawa 1996.
- [7] CHAMPE PC, HARVEY RA. Biochemistry. Wyd. J. B. Lippincott Co., Philadelphia USA 1995.
- [8] ZIEMLAŃSKI Z, BUDZINSKA J. Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe. PWN, Warszawa 1991.
- [9] BARTNIKOWSKA E, OBIEDZIŃSKI MW. Działanie nienasyconych kwasów tłuszczowych o konfiguracji trans w organizmie. *Czynniki Rzyzka*, grudzień 1996.
- [10] STEINBERG D. Low density lipoprotein oxydation and its pathobiological significance. *Minireview Compendium z JBC* 1997; **272**: 20963–20966.
- [12] HAJJAR DP, HABERLAND ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells. *Minireview Compendium z JBC* 1997; **272**: 22975–22978.
- [13] DOMAGAŁA B, SANAK M, CZACHÓR R, SZCZEKLIK A. Hiperhomocysteinemia i jej związek z miażdżycą tętnic. *Pol Arch Med Wewn* 1997; **98**: 153.

REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY (PCR) W BADANIACH NAUKOWYCH I DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) IN RESEARCH AND MOLECULAR DIAGNOSTICS

Ryszard SŁOMSKI^{1,2,3}, DobraWA NAPIERAŁA¹, Jolanta KWIATKOWSKA¹

¹Zakład Genetyki Człowieka, PAN, Poznań; ²Katedra Biochemii
i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im A. Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: Opracowane w ostatnich latach metody badań DNA owocują coraz szerszym wprowadzaniem analiz DNA do badań diagnostycznych. Można przyjąć, że lata dziewięćdziesiąte przejdą do historii jako okres rozpowszechnienia diagnostyki molekularnej i dołączenia badań DNA do zaakceptowanych technik diagnostycznych. Szersze zastosowanie technologii badań DNA w diagnostyce molekularnej rozpoczęło się po wprowadzeniu metody PCR i obecnie diagnostyka molekularna przebiega głównie przez amplifikację DNA. PCR jest również metodą wyjściową dla większości innych analiz molekularnych, które mogą prowadzić do wykrycia obecności defektu molekularnego i podania dokładnej jego charakterystyki.

Summary: The recently established methods of DNA analyses have resulted in the ever broader use of DNA analysis in diagnostics. It can be assumed that the 90s will be remembered in history as the period of popularising molecular diagnostics and including DNA analysis into the group of commonly accepted diagnostic techniques. Broader use of DNA based technologies in molecular diagnostics started with the development of PCR technique. Currently, molecular diagnostics is conducted mainly with the use of DNA amplification. PCR is also the first step of most other molecular analyses which can lead to the detection of a molecular defect and allow its precise characterisation.

I. WSTĘP

Minęło już 10 lat od opracowania przez grupę naukowców z Cetus Corporation w USA reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Wkrótce po pierwszych doniesieniach

z 1987 roku okazało się, że metoda PCR może w zdecydowany sposób przyspieszyć uzyskiwanie wyników w pracach nad poznaniem struktury i funkcji genów. W 1993 roku Kary Mullis otrzymał za metodę PCR nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Autor niniejszej pracy miał okazję już w kilka tygodni po ogłoszeniu prac amerykańskich wykonać podobne badania nad amplifikacją *in vitro* genu insuliny człowieka w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN. Należy podkreślić, że w tamtym okresie nie było urządzeń umożliwiających przeprowadzenie syntez starterów i wykonanie samej reakcji PCR, a wszystkie procedury wykonywane były sposobem manualnym. Wkrótce powstała pierwsza w Polsce praca doktorska, w której w badaniach mikrośladów zastosowano tę metodę [50]. Jakże inna jest obecna sytuacja; odnotować można ogromny postęp nie tylko w przygotowaniu aparatury, lecz również w uproszczeniu procedur. Prawie wszystkie firmy liczące się na rynku badań DNA oferują sprzęt i odczynniki do pracy metodą PCR. Autorzy niniejszej pracy przedstawili w minionych latach szereg artykułów o tematyce PCR [49,104,106,107]. Obecnie chcielibyśmy omówić możliwości praktycznego stosowania metody PCR i zwrócić uwagę na te elementy pracy badawczej i diagnostycznej, które rzutują na jakość wyników uzyskiwanych metodą PCR.

II. OPIS METODY

1. Założenia

Metoda PCR umożliwia amplifikację *in vitro* wybranych odcinków DNA i RNA przepisanych na cDNA. Obejmuje ona około 30 powtarzających się cyklicznie denaturacji, wiązań starterów i syntez z zastosowaniem termostabilnej polimerazy. Mieszanina reakcyjna zawiera matrycę DNA lub RNA, dwa startery komplementarne do matrycy i ograniczające długość syntetyzowanego łańcucha, dNTP będące substratami reakcji i dostarczające energii do jej przebiegu, termostabilną polimerazę, kationy Mg^{2+} oraz bufor. Metoda PCR odzwierciedla w pewnym sensie naturalny proces replikacji DNA, ponieważ dochodzi w niej do syntezy komplementarnych nici DNA, ograniczonych położeniem starterów reakcji [70,71,94]. W każdym cyklu dochodzi do podwojenia wyjściowej liczby matryc, stąd łatwo obliczyć, że po 30 cyklach reakcji liczba matryc wyniesie $2^{30}=107\ 374\ 824$. Wykładniczy przyrost ilości produktu stanowi najważniejszą zaletę metody PCR [4,6].

Materiałem wyjściowym do amplifikacji może być DNA lub RNA izolowany z materiału świeżego: krwi [31], plemników [64, mocz [69], kału [100], pojedynczych włosów [36], komórek hodowanych *in vitro*, DNA izolowany z materiału przechowywanego [43,66,67,98] lub pochodzący z wykopalisk [80]. Najczęściej w 20 μ l reakcji stosuje się 10–100 ng matrycy, 15 pmoli starterów, 7,5 nmoli dNTP, $MgCl_2$ w stężeniu 1,5–2,5 mM i 1–2 jednostki polimerazy. Objętość mie-

szaniny może być zwiększona do 100 μ l w zależności od tego, czy produkt reakcji będzie dalej wykorzystywany np. do sekwencjonowania. Reakcja przebiega w termocyklach (termoblokach), przy czym denaturacja odbywa się przy 90–95°C przez 30–60 s, wiązanie starterów w 50–65°C przez 30–60 s, a synteza w 68°–72° przez 60–120 s. Przy dużej różnorodności sprzętu dostępnego na rynku najważniejsze jest zwrócenie uwagi na szybkość podnoszenia temperatury, jak i chłodzenia, która powinna wynosić 2–3°C/s. Dużo uwagi poświęca się modyfikacjom sprzętu tak, aby czas reakcji z 2–4 godzin skrócić do kilkudziesięciu minut, jak również obniżaniu objętości mieszaniny reakcyjnej [4,6].

Od kilku lat trwają prace nad opracowaniem alternatywnych metod amplifikacji DNA *in vitro*, jednak nie zyskują one szerszego zastosowania w praktyce, poza LCR (ang. *ligase chain reaction*), na podstawie której opracowano kilka zestawów diagnostycznych [116].

2. Polimerazy

Enzymy syntetyzujące DNA pełnią w metodzie PCR kluczową funkcję. Słynny badacz Khorana już w 1974 roku zakładał, że w przyszłości można będzie stosować polimerazy do syntez kwasów nukleinowych. Polimerazy obecnie stosowane różnią się wydajnością, dokładnością, jak i zdolnością sprawdzania (ang. *proof reading*) syntetyzowanych fragmentów DNA [29]. Różnice, które występują między polimerazami, mogą być znaczące, np. błąd wbudowania niekomplementarnego nukleotydu może wynosić 1/10 000–1/100 000 nukleotydów. Dla analiz wielkości produktu PCR dokładność polimerazy nie ma większego znaczenia, jednak istotne jest w badaniach obejmujących wykrywanie mutacji punktowych. W tych badaniach zaleca się:

- 1) powtarzanie amplifikacji każdej próbki,
- 2) stosowanie polimeraz z różnych źródeł,
- 3) klonowanie produktów PCR i ich sekwencjonowanie.

Innymi zabiegami wpływającymi na obniżenie błędu są zmniejszenie liczby cykli reakcji, jak i stosowanie minimalnej liczby matryc wyjściowych powyżej 10^3 [23,58] oraz doświadczalne dobranie ilości dNTP. Należy pamiętać, że półokres aktywności polimeraz zależy od temperatury i wynosi w temp. 92,5°C ok. 2 godz., w temp. 95,0°C maleje do 40 min, a w temp. 97,5°C ograniczony jest do 5 min [37].

3. Startery

Specyficzność reakcji warunkują komplementarne do amplifikowanej sekwencji, pojedynczoniowe startery o długości 20 nukleotydów. Ostatnio przy doborze starterów coraz częściej korzysta się z programów komputerowych, które analizują wiele istotnych parametrów starterów, takich jak: 1) struktura drugorzędowa, 2)

powstawanie dimerów starterów, 3) temperatura topnienia, 4) specyficzność. Najważniejsza jest jednak pełna homologia końców 3' starterów z matrycą [92]. Dużym ułatwieniem jest strategia, z którą autorzy mieli możliwość zapoznać się w Harvard Medical School w USA, która polegała na tym, że przy doborze starterów jako główny parametr przyjmowano temperaturę topnienia. Umożliwia to stosowanie tych samych warunków PCR dla amplifikacji różnych genów i stąd lepsze wykorzystanie sprzętu.

4. Błędy metody PCR

Liczba prawidłowych sekwencji powstających w metodzie PCR może być opisana wzorem:

$$F(n) = f^n = [1 - k \exp(-mL)]^n / (k+1)^n$$

gdzie F oznacza liczbę prawidłowych sekwencji, n – liczbę cykli, k – wydajność amplifikacji, m – częstość błędu polimerazy w przeliczeniu na nukleotyd, a L – długość amplifikowanego fragmentu.

Najczęstszym błędem laboratoryjnym jest wykonywanie zbyt wielu cykli reakcji. Autor metody Kary Mullis uważa, że przy braku produktu reakcji po 35 cyklach nie należy wydłużać reakcji, lecz poprawić jej wydajność. Duże znaczenie ma również stosowanie odpowiedniej ilości polimerazy. Powstawanie niespecyficznych produktów może być skutkiem stosowania nadmiaru polimerazy DNA, z kolei niedobór polimerazy objawia się brakiem produktu.

Istotnym problemem przy amplifikacji DNA metodą PCR jest możliwość uzyskania fałszywie pozytywnych [60,93] i fałszywie negatywnych wyników [18,85]. Takie wyniki z pewnością uzyskał każdy, kto często wykonuje tę reakcję do badań genów nie w pełni scharakteryzowanych. Również autorzy pracy wielokrotnie mieli możliwość obserwowania takich artefaktów i to zarówno we własnych pracowniach, jak i renomowanych ośrodkach zagranicznych w Niemczech i USA. Przede wszystkim na uzyskiwanie artefaktów może wpłynąć zanieczyszczenie wyjściowych matryc klonami (produktami PCR). Ich powstawanie można ograniczyć przez:

- 1) naświetlanie mieszaniny reakcyjnej (bez matrycy i starterów) światłem UV,
- 2) trawienie matryc enzymami restrykcyjnymi nie rozpoznającymi sekwencji DNA w odcinkach DNA, które zamierza się amplifikować [96],
- 3) inkubację z psoralenem i naświetlanie promieniami UV [48].

Nie bez znaczenia jest stosowanie rękawic ochronnych i autoklawowanych probówek. Wskazane jest także fizyczne oddzielenie izolacji DNA od późniejszej amplifikacji. Łatwiej i skuteczniej można ingerować przez usieciowanie produktów PCR izopsoralenem, działanie na mieszaninę PCR uracylo-N-glikozylazą tuż przed samą reakcją (wtedy gdy do reakcji stosowany jest dUTP w miejsce dNTP) oraz przeprowadzenie hydrolizy alkalicznej starterów oligorybonukleotydowych stosowanych zamiast oligodezoksyrybonukleotydów.

Innym, nie mniej ważnym zjawiskiem jest uzyskiwanie fałszywie negatywnych wyników. Decydująca jest jakość matrycy i ewentualne występowanie inhibitorów reakcji. Najprostszym rozwiązaniem jest 100-krotne rozcieńczenie matrycy i koamplifikacja badanej matrycy z matrycą standardową.

5. Warianty PCR

W literaturze można znaleźć opisy wielu wariantów PCR, jednak tylko nieliczne znalazły szersze zastosowanie w praktyce. Najprostszym zastosowaniem metody PCR jest wykazanie obecności lub braku specyficznego fragmentu DNA. To podejście wykorzystywane jest w licznych testach na obecność patogenów chorobotwórczych oraz w wykrywaniu delecji powodujących występowanie chorób dziedzicznych u hemizygotycznych pacjentów, np. z dystrofią mięśniową Duchennea lub Beckera. Na potrzeby diagnostyki klinicznej do wykrywania delecji opracowano wariant PCR – multipleks umożliwiający jednoczesną amplifikację kilku fragmentów DNA [13,14,113]. Zaletą tego podejścia jest wewnętrzna kontrola – przy braku jednego z amplifikowanych fragmentów, obecność pozostałych wskazuje na prawidłowy przebieg reakcji. Trudność może stanowić takie dobranie warunków reakcji, aby uzyskać dobrą jakość wszystkich amplifikowanych fragmentów.

Najważniejszym zastosowaniem PCR jest uzyskanie zwiększonej ilości fragmentu DNA, w którym występuje mutacja lub polimorfizm, a następnie jego dalsza analiza z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych (PCR-RFLP) lub technik elektroforetycznych (PCR-HD, PCR-SSCP). Technika PCR-RFLP [88] zastępuje często klasyczną metodę RFLP z wykorzystaniem transferu Southerna i hybrydyzacji z sondami molekularnymi, ponieważ jest znacznie mniej czasochłonna i nie wymaga stosowania radioaktywnych izotopów [24,28,84]. PCR-RFLP można zastosować również w badaniach, w których sztucznie wprowadza się miejsce restrykcyjne w celu zidentyfikowania mutacji. Ten rodzaj RFLP może być wykonany wyłącznie w połączeniu z reakcją PCR.

Powstały również warianty PCR umożliwiające rozróżnienie alleli badanego fragmentu. W metodzie ASA-PCR (ang. *allele specific amplification*) startery do reakcji charakteryzują się specyficznością dla DNA typu dzikiego lub zmutowanego, co pozwala na wybiórczą amplifikację określonego allelu. Z kolei w metodzie PCR-ASO amplifikuje się wszystkie allele, a ich rozróżnienie odbywa się przez hybrydyzację sond specyficznych dla alleli z produktem PCR.

Metoda PCR dała również początek kilku wariantom umożliwiającym amplifikację fragmentów o nieznannej sekwencji. Przykładem może być tzw. odwrócona PCR (ang. *inverted PCR*), w której badany fragment DNA łączy się z fragmentem znanym lub wklonowanym w wektor, a startery są specyficzne dla znanego odcinka DNA.

Innym wariantem jest wewnętrzny PCR (ang. *nested PCR*), w którym korzysta się z dwóch par starterów, przy czym druga para umieszczona jest wewnętrznie

TABELA 1. Najczęściej stosowane warianty metody PCR, obecna diagnostyka molekularna przebiega głównie przez amplifikację DNA metodą PCR, która stanowi metodę wyjściową dla innych analiz molekularnych

Metoda	Opis	Zalety	Wady	Zastosowanie
PCR	Bezpośrednia amplifikacja <i>in vitro</i> określonych fragmentów DNA	Prosta, szybka, wykrywa obecność danej sekwencji	Wynik fałszywie dodatni	Analiza bezpośrednia i pośrednia. Wykrywanie obecności specyficznych fragmentów DNA. Wykrywanie delecji i insercji.
MCC	Wykrywanie niesparowań w heterodupleksach DNA:DNA metodą chemiczną	Heterodupleks ulega fragmentacji, a powstałe fragmenty wykrywane są w badaniu elektroforetycznym	Wymaga potwierdzenia innymi metodami	Analiza pośrednia, wykrywanie mutantów w znanym fragmencie DNA
Mikrosatelity	Wykrywanie 1–6 nukleotydowych powtórzeń w DNA	Prosta, szybka, wykrywa polimorficzne allele	Stosowanie izotopów lub sekwencjonerów DNA	Analiza pośrednia
Minisatelity	Wykrywanie 7–100 nukleotydowych powtórzeń w DNA	Prosta, szybka, wykrywa polimorficzne allele	Czułość maleje wraz ze zwiększeniem różnicy wielkości między allelemi	Analiza pośrednia
PCR-ASA	Amplifikacja alleli z zastosowaniem starterów dla allelu dzikiego i zmutowanego	Startery rozpoznają allel dziki lub zmutowany	Wymaga znajomości mutacji w genach	Analiza bezpośrednia, wykrywanie mutacji punktowych w znanym fragmencie DNA
PCR-ASO	Hybrydyzacja oligonukleotydów specyficznych dla allelu z produktem PCR	Oligonukleotydy (sondy molekularne) rozpoznają allel dziki lub zmutowany	Może prowadzić do wyników fałszywie pozytywnych	Analiza bezpośrednia, wykrywanie mutacji punktowych
PCR-DGGE	Obserwacja denaturacji dwuniciowego DNA we wzrastającym gradiencie czynnika denaturującego podczas rozdziatu elektroforetycznego	Umożliwia wykrycie nieznanych mutacji	Wymaga potwierdzenia innymi metodami	Analiza pośrednia, wykrywanie mutantów w znanym fragmencie DNA
PCR-HD	Wykrywanie heterodupleksów DNA:DNA między zmutowanym DNA a DNA typu dzikiego	Niesparowania opóźniają migrację w żelach poliakrylamidowych, wykrywa nieznane mutacje	Wymaga potwierdzenia inną metodą	Analiza pośrednia, wykrywanie mutantów w znanym fragmencie DNA

Tabela 1 cd.

Metoda	Opis	Zalety	Wady	Zastosowanie
PCR-RFLP	Trawienie produktu PCR enzymem restrykcyjnym	Szybkość, weryfikacja specyficzności	Zależność od dostępności enzymu i występowania miejsca restrykcyjnego	Analiza pośrednia i bezpośrednia, zwiększenie specyficzności reakcji
PCR-SSCP	Obserwacja konformerów ssDNA	Umożliwia wykrycie nieznanymi mutacji	Wymaga stosowania różnych warunków doświadczalnych i potwierdzenia innymi metodami	Analiza pośrednia, wykrywanie mutantów w znanym fragmencie DNA
Sekwencjonowanie	Określenie sekwencji nukleotydów	Najdokładniejsza metoda wykrywania mutacji	Pracochłonna, stosowanie izotopów lub sekwentorów	Analiza bezpośrednia

w stosunku do pierwszej pary [52,65,111]. Przez amplifikację z pierwszą parą starterów, w której zalecane jest, aby amplifikowano duże fragmenty (1000–2000 pz), a następnie drugą amplifikację znacznie mniejszych fragmentów, uzyskać można podwyższenie specyficzności reakcji przy jednoczesnym wyeliminowaniu fragmentów niespecyficznych.

Technologie oparte na metodzie PCR można podzielić na bardzo czułe i specyficzne oraz takie, które określa się mianem przesiewowych, np. PCR-SSCP (analiza polimorfizmu pojedynczoniciowych fragmentów DNA) [78], PCR-HD (analiza heterodupleksów), PCR-DGGE (analiza elektroforetyczna w gradiencie czynnika denaturującego) [108]. Porównanie najczęstszych wariantów PCR przedstawiono w tabeli 1.

III. PCR W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ

Metoda PCR znajduje szerokie zastosowanie w badaniach diagnostycznych. Wy różnić można trzy najważniejsze grupy zastosowań: 1) wykrywanie patogenów infekcyjnych (bakterii, wirusów, pasożytów), 2) wykrywanie zmian w genomowym DNA w chorobach genetycznych, predyspozycji do chorób nowotworowych, monitorowaniu i wykrywaniu nowotworów, 3) wykrywanie polimorficznych sekwencji DNA na potrzeby identyfikacji indywidualnej. W przypadku wykrywania patogenów metoda PCR stosowana jest do namnażania charakterystycznych sekwencji DNA/RNA patogenu, po czym ostateczny wynik uzyskuje się po hybrydyzacji pun-

ktowej lub hybrydyzacji metodą Southerna z sondą molekularną celem weryfikacji wyników. Nieco inny przebieg ma stosowanie metody PCR do wykrywania zmian w DNA. Również tutaj konieczna jest weryfikacja uzyskanego wyniku, jednak przebiega ona najczęściej z zastosowaniem analizy RFLP, hybrydyzacji ASO lub sekwencjonowania.

1. Bakterie

Obecnie ponad 100 szczepów bakteryjnych można wykrywać i różnicować technikami biologii molekularnej (tab. 2). Metoda PCR jest szeroko stosowana do szybkiego wykrywania patogenów, szczególnie takich, których hodowla *in vitro* jest trudna lub długotrwała [34,39]. Ważnym osiągnięciem stało się opracowanie testów diagnostycznych dla *Mycobacterium tuberculosis*. Metodą PCR dla antygeny B i MPB64 mikroorganizm można wykryć w kilka godzin, podczas gdy konwencjonalna technika hodowli potrzebuje około 6 tygodni [102]. Pośród innych czynników etiologicznych wykrywanych metodą PCR wymienić można wykrywanie *Borrelia burgdorferi* w przewodzie pokarmowym kleszcza *Ixodes dammini* [69]. Podobnie diagnostyka kiły przebiega obecnie przy udziale PCR dla konserwatywnego regionu DNA *Treponema pallidum* kodującego powierzchniowy antygen o wielkości 47 kDa. Jest to szczególnie ważne, ponieważ patogen ten nie wzrasta na syntetycznych pożywkach [77]. Amplifikacja odcinka genomu warunkującego adhezję umożliwia diagnostykę i różnicuje cztery szczepy *Mycoplasma genitalium* [103]. Zastosowanie metody PCR-RFLP pozwala ponadto na rozróżnienie wariantów geograficznych patogenów.

W porównaniu z techniką ELISA (ang. *enzyme linked immunosorbent assay*) i formowania łyseinek (ang. *plague assays*), technika PCR oferuje istotną przewagę w wykrywaniu patogenów. Do wykonania badania metodą PCR nie jest konieczny materiał świeżo pobrany, metoda jest bardziej czuła i ponadto do analizy można zastosować rozmazy i bloczki parafinowe. Można również wykonać znaczną część badań w standardowym laboratorium bez konieczności transportu materiału zakaźnego.

Naturalnym krokiem zrobionym w diagnostyce molekularnej bakterii, wynikającym z doświadczeń genetyki człowieka jest opracowanie testów multipleks, w których jednocześnie wykrywa się kilka szczepów bakteryjnych. Niewielka próbka kału może być zastosowana do jednoczesnego wykrywania enterotoksyn *Escherichia coli* i *Shigella* [7,8,61,114]. Przez bezpośrednią amplifikację genu kodującego toksynę A rozróżnić można również toksyczne *Clostridium diffiralle* od szczepów nie toksycznych, przy czym czułość detekcji jest znacznie większa niż dla metod polegających na ocenie struktury komórkowej [55,119]. Amplifikacja genu MOMP umożliwia detekcję *Chlamydia trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* w ho-

TABELA 2. Diagnostyka molekularna zakażeń bakteryjnych

Bakteria	Choroba	Metoda
<i>Borrelia recurrentis</i>	dur powrotny	PCR
<i>Clostridium difficile</i>	biegunka, zapalenie jelit	D-PCR
<i>Clostridium tetani</i>	tężec	D-PCR
<i>Legionella pneumophila</i>	zapalenie płuc	PCR
<i>Shigella flexneri</i>	czerwonka bakteryjna	D-PCR
<i>Treponema pallidum</i>	kiła	PCR-ASO
<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	choroba tsutsugamushi	PCR
<i>Chlamydia trachomatis</i>	chlamydia	D-PCR
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	gruźlica	PCR-ASO
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	atypowe zapalenie płuc	PCR-ASO
<i>Listeria meningitis</i>	listerioza	PCR-ASO
<i>Mycobacterium leprae</i>	trąd	D-PCR
<i>Rickettsia typhi</i>	dur wysypkowy	D-PCR
<i>Bordetella pertussis</i>	krztusiec	D-PCR
<i>Escherichia coli</i>	biegunka niemowląt	D-PCR

dowlach komórkowych lub jak w przypadku *Chlamydia trachomatis*, w próbkach pochodzących bezpośrednio od chorych [10,38,86].

2. Pasożyty

Metoda PCR znalazła zastosowanie do wykrywania pasożytów przez bezpośrednią amplifikację DNA pasożyta. Materiałem wyjściowym może być DNA uzyskany z płynów ustrojowych człowieka, jak i pośrednich gospodarzy pasożyta np. moskitów. Wykrywanie metodą PCR jest bardzo szybkie i umożliwia identyfikację zakażonych chorych, jak i określenie regionów geograficznych, na których występują owady przenoszące pasożyty. Bardzo dobrym przykładem jest wykrywanie *Plasmodium falciparum* u muchy tse-tse, a także wykrywanie *Trichomonas vaginalis* [87]. Przykłady zastosowania reakcji PCR do wykrywania pasożytów przedstawiono w tabeli 3 [110,115,118].

3. Wirusy

Zarówno wirusy DNA, RNA i retrowirusy będące czynnikami etiologicznymi w białaczkach, limfomach, mięsakach i karcinoma mogą być wykryte metodą PCR. Infekcje wirusowe występują również w chorobach autoimmunizacyjnych, jak reumatoidalne zapalenie stawów i toczeń układowy oraz w cytopatiach prowadzących do anemii i stanów niedoborów immunologicznych. Dla infekcji retrowirusowych charakterystyczne jest częste występowanie stanu latencji wirusa. Klasycznym przykładem zastosowania PCR w wirusologii jest wykrywanie patogenu przed wystąpieniem objawów klinicznych. Przykłady zastosowania reakcji PCR do wykrywania

TABELA 3. Diagnostyka molekularna chorób pasożytniczych

Pasożyt	Choroba	Metoda
<i>Leishmania tropica</i>	leiszmanioza	PCR-ASO
<i>Trypanosoma cruzi</i>	choroba Chagasa	PCR
<i>Toxoplasma gondi</i>	toksoplazmoza	PCR, Southern
<i>Plasmodium falciparum</i>	malaria tropikalna	D-PCR
<i>Trichomonas vaginalis</i>	rzęsistkowica	D-PCR
<i>Pneumocystis carinii</i>	zapalenie płuc	D-PCR
<i>Entamoeba histolytica</i>	czerwonka pełzakowa	D-PCR
<i>Onchocerca volvulus</i>	onchocerkozą	D-PCR
<i>Giardia duodenalis</i>	lamblioza	D-PCR

wirusów przedstawiono w tabeli 4. Najdobitniej zaobserwować można to na przykładzie wirusa HIV, który może być wykryty na wiele lat przed wystąpieniem objawów AIDS [72,83,91]. Metoda PCR umożliwiła badania epidemiologiczne, których wynikiem było zidentyfikowanie wielu wirusów w populacji ogólnej, np. wirusów HTLV-1 [33,74], HTLV-II [35,111], HN, HPV [56] i HBV [98].

Częstym materiałem wyjściowym do badań zakażeń wirusowych jest kał. Metodą PCR wykrywać można obecne w nim adenowirusy i rotawirusy [1,27]. Szczególnie w przypadku rotawirusów metoda PCR znacznie przyspieszyła diagnostykę i usunęła trudności wynikające z niskiego miana wirusa i zróżnicowania serologicznego.

W przypadku cytomegalowirusów (CMV) skuteczne okazało się połączenie metod PCR i RFLP dla regionu DNA o dużej zmienności, co umożliwiło zarówno wykrycie, jak i określenie szczepu wirusa [11,31]. Wśród wirusów wykrywanych metodą PCR należy wymienić również wirusa EBV, którego obecność wykazano w limfocytach lub materiale biopsyjnym w zespole Sjogrena i chłoniaku Hodgkina [9]. Zastosowanie specyficznych starterów umożliwia rozróżnienie ponad 20 typów wirusów papilloma (HPV) zasocjowanych z występowaniem chorób, również chorób nowotworowych oraz ponad 60 serotypów enterowirusa (EV), będącego częstą przyczyną chorób w dzieciństwie [90]. Sukcesem zakończyły się również badania zmierzające do wykrywania wirusów herpes. W tej grupie, ze względu na bardzo częste występowanie zakażeń skoncentrowano wysiłki na takim dobraniu starterów, aby możliwa była analiza różnych płynów ustrojowych i tkanek przy jednoczesnym rozróżnieniu szczepów wirusa i wykryciu form latencyjnych [97].

Identyfikacja wirusa B zapalenia wątroby metodami klasycznymi polegała na wykrywaniu charakterystycznych antygenów wirusowych metodą radioimmunologiczną (RIA) lub kolorymetrią (ELISA). Jednakże w wielu przypadkach DNA wirusa HBV nie można wykryć w surowicy z powodu niskiego poziomu [54,56,99]. Metoda PCR zwiększyła czułość wykrywania wirusa ponad 10 razy. Skutecznie wykrywać można metodą PCR również wirusy HCV [19] i HDV [22,62].

TABELA 4. Diagnostyka molekularna zakażeń wirusowych

Wirus	Choroba	Metoda
Adenowirus	nieżyt jelit	PCR
Cytomegalowirus	AIDS	RT-PCR
Cytomegalowirus	AIDS	PCR, ISH
Cytomegalowirus	AIDS	PCR-ASO
Cytomegalowirus	cytomegalia	PCR
Cytomegalowirus	transplantacja szpiku	PCR
Cytomegalowirus	zmiany w siatkówce	PCR-ASO
Epstein-Barr	chłoniak	PCR-ASO
Hepatitis B	rak wątrobowo-komórkowy	PCR
Hepatitis B	zapalenie wątroby typu B	PCR-ASO
Hepatitis C	przewlekłe zapalenie wątroby	PCR
Hepatitis D	przewlekłe zapalenie wątroby	PCR
Herpes simiae (B)	opryszczka	PCR-ASO
Herpes simplex	opryszczka zwykła	PCR-Agaroza
Herpes simplex 4,6	opryszczka zwykła	PCR-ASO
Herpes simplex 6	opryszczka zwykła	PCR-PAGE
Herpes simplex keratitis	opryszczka zwykła rogówki	PCR-ASO
HIV-1	brak odporności immunologicznej	PCR-PAGE
HTLV-I	białaczka limfocytów T	PCR
HTLV-II	białaczka limfocytów T	PCR, H
Junin		PCR
Papilloma	brodawczak	PCR-RFLP
Papilloma 16,18	brodawczak	PCR-ASO
Papilloma 16,18	brodawczak	PCR, Southern, ISH
Parvovirus B-19		PCR-ASO
Wirus wścieklizny	wścieklizna	PCR

W wielu przypadkach udało się podnieść czułość wykrywania wirusów prawie 100 razy w porównaniu z metodą Southerna lub hybrydyzacją typu *dot blot*. Przy wykrywaniu retrowirusów często korzysta się z odwrotnej transkrypcji, a następnie wykonuje się dwie reakcje PCR. Ze względu na dużą liczbę cykli PCR zachodzi ogromne niebezpieczeństwo uzyskania artefaktów, głównie wyników fałszywie pozytywnych. Zaleceniem autorów niniejszej pracy jest uczestniczenie w testach wielośrodkowych i korzystanie z wzorców o znanym mianie, zgodnie ze wskazówkami VQC (*Virus Quality Control*).

4. Nowotwory

Wykrywanie genów uczestniczących w onkogenezie jest jednym z głównych zastosowań metody PCR. W ostatnich latach dla kilkudziesięciu genów, dla których

TABELA 5. Diagnostyka molekularna chorób nowotworowych

Choroba	Gen	Metoda
Białaczka limfatyczna ostra	<i>ras</i> , <i>BCR/ABL</i>	RT-PCR, ASA-PCR, PCR-RFLP
Białaczka limfatyczna przewlekła	IgG	PCR, HPLC, SN-PCR
Białaczka ostra limfoblastyczna	translokacja t(1;19)(q23;p13)	PCR
Białaczka szpikowa chroniczna	chromosom Ph	PCR
Białaczka szpikowa ostra	<i>N-ras</i>	PCR-ASO
Białaczka T		PCR-ASO
Chłoniak B	JH-IgG	PCR
Chłoniak złośliwy		PCR
Podatność na nowotwory	cytochrom P450	PCR
Rak okrężnicy	<i>APC</i> , <i>p53</i> , <i>K-ras</i> , <i>DCC</i>	PCR-SSCP
Rak płuca	<i>p53</i> , <i>ras</i> , HPV	PCR
Rak pęcherza moczowego	<i>H-ras</i>	PCR-RFLP
Rak prostaty		RT-PCR
Rak sutka	<i>p53</i> , <i>Her-2/Neu</i>	PCR, PCR-SSCP, sekwencjonowanie
Rak trzustki	<i>CEA</i> , <i>ras</i>	PCR

wykazano występowanie zmian w DNA komórek nowotworowych opracowano testy diagnostyczne umożliwiające wykrycie mutacji. Występują jednak zasadnicze różnice w diagnostyce chorób nowotworowych w porównaniu z innymi działami diagnostyki molekularnej. Przede wszystkim różnica dotyczy postępowania z materiałem badawczym, w którym DNA komórek nowotworowych występuje w danym organizmie razem z prawidłowym DNA. Bardzo istotna jest zatem wstępna selekcja i wyodrębnienie obydwu typów komórek. Ilość DNA wyizolowana z komórek nowotworowych jest zwykle niewielka i nie wystarcza do wykonania badań metodą hybrydyzacji wg Southerna, dlatego metodą z wyboru jest PCR. W wyniku podjętego leczenia liczba komórek nowotworowych u chorych może ulegać zmianie, dlatego wstępna selekcja komórek wydaje się szczególnie ważna. W badaniach DNA komórek nowotworowych należy uwzględnić również to, że zmiany DNA mogą dotyczyć dużych odcinków DNA – translokacji, delecji i rearanzacji, jak i niewielkich zmian w postaci mikrodelecji i mutacji punktowych [12]. W badaniach translokacji w białaczkach limfocytów B i T stosuje się startery PCR specyficzne dla różnych chromosomów, stąd uzyskanie pozytywnego wyniku charakterystyczne jest wyłącznie dla translokacji. Z kolei delecje mogą być wykryte dopiero po analizie produktów PCR metodą elektroforezy i porównaniu z wielkością prawidłowych produktów PCR [2]. Mikrodelecje w DNA komórek nowotworowych dotyczą przede wszystkim zmiany w sekwencjach mikrosatelitarnych i obejmują powtórzenia dwu- i trójnukleotydów [59]. Ocena zmian w sekwencjach mikrosatelitarnych będących wynikiem niestabilności genomu może służyć jako marker predyspozycji [25].

Badanie diagnostyczne można zastosować dla identyfikacji osób z ryzykiem zachorowania na określony typ nowotworu. Mutacje punktowe w nowotworach mogą być wykrywane za pomocą metod przedstawionych w tabeli 5. Wyróżnić można dwa typy analizy mutacji punktowych, takie które dotyczą znanych miejsc, np. w onkogenie *ras* w kodonie 12, 13 lub 61 [47] oraz takie, które są bardzo różnorodne i występują w genach supresorowych *p53* [3,21,41], *APC* [73,81], *DCC* [101], *MCC* [112]. Dzięki metodzie PCR mutacje w tych genach mogą być wykryte nawet wtedy, gdy ich częstość występowania jest bardzo niska. Wiele mutacji w DNA komórek nowotworowych może służyć jako markery. Przykładem może być rodzinna polipowatość jelita grubego (FAP) wykazana u krewnych I⁰, u których wystąpiło przekazanie zmutowanego genu *APC* [81].

5. Choroby genetyczne

Początki diagnostyki molekularnej związane są z badaniami chorób genetycznych człowieka. Pierwsze badania diagnostyczne z zastosowaniem analizy DNA zostały przeprowadzone w 1978 roku przez Kana i Dozy'ego [53] i niezależnie przez Orkina i wsp. [79]. Były to badania oparte na hybrydyzacji z sondą molekularną i dotyczyły wykrycia mutacji w 6 kodonie β globiny (tranzycji A \rightarrow T) prowadzącej do wystąpienia anemii sierpowatej. Obecnie kilkaset chorób genetycznych można diagnozować stosując techniki molekularne (tab. 6). W pierwszych latach dominowały badania hybrydyzacyjne z zastosowaniem sond molekularnych, obecnie zostały one prawie całkowicie zastąpione przez PCR [75]. Materiałem stosowanym w badaniach diagnostycznych są najczęściej limfocyty krwi obwodowej, dlatego nie występuje ograniczenie materiałowe, ponieważ do wykonania badań i dalszego przechowywania DNA potrzebna jest jedynie niewielka objętość krwi (ok. 5 ml).

Intensywne wdrażanie technologii badań DNA w diagnostyce molekularnej chorób genetycznych rozpoczęło się po wprowadzenia metody amplifikacji DNA *in vitro* przez Saiki i wsp. w 1985 roku [94]. Uzyskali oni ponad 200.000-krotną amplifikację fragmentu genu β globiny stosując parę starterów komplementarnych do fragmentu tego genu i flankujących region amplifikacji oraz fragment Klenowa polimerazy I z *E. coli*.

Porównanie diagnostyki molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a i mukowiscydozy jest dobrym przykładem zastosowania różnych wariantów metody PCR przy wykrywaniu mutacji w dużych genach. Dystrofia mięśniowa Duchenne'a wywoływana jest mutacjami w genie *DMD*. Najczęstszymi mutacjami tego genu są duże delecje, które obejmują często kilka eksonów. Gen *DMD* jest największym genem człowieka, stąd niemożliwa jest analiza całego genu. Okazuje się jednak, że badanie 20 regionów genu metodą PCR-multipleks umożliwia szybkie wykrycie blisko 100% wszystkich delecji [5]. Olbrzymi rozmiar genu *DMD* spowodował wzrost zainteresowania badaniem transkryptów genu dystrofiny [15], jak również

TABELA 6. Diagnostyka molekularna chorób genetycznych

Choroba	Gen	Metoda
Anemia sierpowata	β -globina	PCR-RFLP
Choroba Alzheimerera	amyloid	PCR
Choroba Alzheimerera	apolipoproteina E	PCR-ASO
Choroba Gauchera	kwaśna β -glukozydaza	PCR
Choroba Schindlera	α -N-acetylogalaktozaminidaza	PCR
Choroba Tay-Sachsa	heksozaminidaza A	PCR
Choroba von Willebrandta	czynnik von Willebrandta	PCR
Cukrzyca insulinozależna	insulina	PCR
Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	<i>DMD</i>	PCR
Gorączka złośliwa		PCR-RFLP
Hemofilia A	czynnik VIII krzepnięcia	PCR
Hemofilia B	czynnik IX krzepnięcia	PCR
Hemoglobinopatie	β -globina	PCR
Hypercholesterolemia	receptor LDL	PCR
Hyperoksaluria typ I	aminotransferaza alaniny	PCR
Mukowiscydoza	<i>CFTR</i>	PCR-ASO
Niedobór α -1-antytrypsyny	α -1-antytrypsyna	PCR
Pląsawica Huntingtona	<i>IT15</i>	PCR
Porfiria	syntaza HMB	PCR-RFLP
Trisomia 12	chromosom 12	PCR
Trisomia 21	chromosom 21	PCR
Typowanie dawców	antygeny HLA	PCR
Zespół Lesh-Nyhana	<i>HPRT</i>	PCR

rozwinięciem pośrednich metod wykrywania zmutowanych genów, np. przez określenie polimorfizmu (CA)_n [17]. Z kolei mukowiscydoza uwarunkowana jest mutacjami w genie *CFTR*, wśród których przeważają mutacje punktowe. Do końca 1996 roku opisano ponad 500 mutacji tego genu o bardzo zróżnicowanej częstości występowania. Najczęstszą mutacją genu *CFTR* jest mutacja $\Delta F508$, która w populacji europejskiej występuje z częstością około 70% [117]. Częstość kilku innych mutacji (G551D, R553X, G542X, 1717-1G-A, S549R) szacuje się na 1–3%, natomiast pozostałe mutacje występują bardzo rzadko. W rutynowej diagnostyce molekularnej objęcie analizą wszystkich poznanych mutacji w genie *CFTR* jest na razie niemożliwe. Okazuje się jednak, że wykonanie badań PCR-RFLP dla sześciu najczęstszych mutacji zwiększa wykrywalność do 85–90%, w zależności od badanej populacji. Dla kilku populacji np. duńskiej lub Żydów askenazyjskich, gdzie heterogenność mutacji jest mała, wykrywalność przekracza 95%.

Metoda PCR znalazła również zastosowanie w prenatalnej [76] i preimplantacyjnej diagnostyce chorób genetycznych, która rozwinęła się wraz z szerokim stosowaniem zapłodnienia *in vitro*. Diagnostyka preimplantacyjna jest właściwie konsekwencją zapłodnienia *in vitro* i możliwości badania DNA pojedynczych komórek przez PCR. Badania preimplantacyjne są już wykonywane w Wielkiej Brytanii i w 1991 r. umożliwiły urodzenie kilkunastu zdrowych dzieci w rodzinach z wysokim ryzykiem wystąpienia ciężkich chorób genetycznych [16]. Z rozwijającego się *in vitro* embrionu pobiera się pojedynczą komórkę w stadium 6–8-komórkowego blastomeru. Metoda umożliwia w następstwie selektywny transfer prawidłowych embrionów prowadząc do uniknięcia późniejszego przerwania ciąży i postawienia rodziny przed tym samym ryzykiem wystąpienia choroby u dziecka. Badania preimplantacyjne mogą być wykonane wyłącznie metodą PCR [20,63,120].

6. Wykrywanie uszkodzeń DNA spowodowanych czynnikami środowiskowymi

Można przyjąć, że wykrycie mutacji w onkogenach i genach supresorowych nowotworów ma prowadzić do identyfikacji czynnika zagrożenia. Dobrym przykładem może być występowanie mutacji w genie *p53*, w miejscach gorących po ekspozycji na aflatoksynę B1. Najczęściej ekspozycja prowadzi do mutacji w kodonie 24 genu *p53* [3]. Innym przykładem może być występowanie u palaczy charakterystycznych mutacji w raku płuc zarówno w genie *p53*, jak i kodonie 12 onkogenu *K-ras* [42,44,51]. Ta druga mutacja jest również charakterystyczna dla osób narażonych na azbest. Najczęściej badanie jest jednak bezpośrednią asocjacją między ekspozycją na czynniki środowiskowe a mutacjami. Przykładem mogą być mutacje w raku okrężnicy [89,109].

7. Badania medyczno-sądowe

W 1985 roku Jeffreys doniósł o nowej metodzie identyfikacji indywidualnej opartej o zjawisko polimorfizmu DNA [45,46]. Metoda Jeffreys'a znalazła natychmiastowe zastosowanie w praktyce i pod nazwą DNA *fingerprinting* jest obecnie szeroko stosowana w badaniach pokrewieństwa, którego ustalenie konieczne jest nie tylko w sprawach sądowych, lecz również niezbędne jest dla potrzeb medycznych w poradnictwie genetycznym, diagnostyce prenatalnej i transplantologii. Badania DNA *fingerprinting* są wykonywane rutynowo w ponad 40 krajach [82]. Prawdopodobnie w genomie człowieka występuje kilka tysięcy minisatelitarnych loci, przy czym różnią się jednostkami rdzeniowymi. Każdy element powtarzający się złożony jest z 7 do 100 par zasad. Inna grupa sekwencji mikrosatelitarnych obejmuje powtórzenia 3 lub 4 nukleotydów, tzw. STR (ang. *short tandem repeats*). Tego typu powtórzenia występują u wszystkich *Eukaryota*, wykazują polimorfizm i mogą być

analizowane metodą PCR. Dodatkową zaletą tych powtórzeń jest to, że po amplifikacji nie trzeba ich rozdzielać na dużych żelach sekwencyjnych, jak to jest w przypadku powtórzeń (CA)_n. W diagnostyce molekularnej, a szczególnie w medycynie sądowej te sekwencje bardzo często poddaje się analizie, ponieważ charakteryzują się krótkimi, lecz polimorficznymi allelami, co jest bardzo ważne, gdy analizowany jest częściowo zdegradowany DNA.

IV. PERSPEKTYWY DALSZEGO ROZWOJU

Współczesna diagnostyka wielu chorób uwzględnia wyniki badań klinicznych, biochemicznych i molekularnych. W wielu krajach badania molekularne są już wykonywane w sposób rutynowy, w naszym kraju rutynowe badania molekularne wykonywane są zaledwie w kilkunastu placówkach. Na początku lat dziewięćdziesiątych zaobserwować można było, szczególnie w krajach zachodnich, podejmowanie przez ośrodki genetyczne wielokierunkowej diagnostyki obejmującej liczne choroby. Obecnie zauważyć można tendencje specjalizacyjne, np. w Wielkiej Brytanii i Niemczech, gdzie diagnostyka molekularna chorób genetycznych jest na bardzo wysokim poziomie, poszczególne ośrodki specjalizują się w diagnostyce określonych chorób.

W najbliższej przyszłości oczekiwać można dalszego rozszerzenia diagnostyki molekularnej. Autorzy zakładają, że postęp obejmował będzie zarówno dobór materiału badawczego, jak i zwiększenie czułości metod oraz automatyzację procedur analitycznych. W etapie wstępnym przygotowania materiału do badań występuje na pewno opóźnienie metodyczne i sprzętowe w stosunku do samej strategii badań DNA, która umożliwi wykrycie zmian pojedynczych nukleotydów. Etap przygotowania DNA do badań jest jednak najważniejszy, gdyż rzutuje na wykonywane analizy. Dla przykładu obecność inhibitorów enzymów w preparatach DNA uniemożliwia badanie DNA lub powoduje powstanie artefaktów. Jest to szczególnie niebezpieczne przy stosowaniu badań opartych wyłącznie o enzymatyczną amplifikację DNA *in vitro*. Może dochodzić tu do wybiórczej amplifikacji niektórych alleli z pominięciem innych. Z kolei postęp w samych badaniach DNA jest ogromny i możliwe jest badanie bardzo małych ilości DNA, nawet z pojedynczych komórek. W przypadkach materiału przeznaczonego do badań medyczno-sądowych częstym zjawiskiem jest zdegradowanie DNA. Badania DNA mogą dać wtedy wynik fałszywie negatywny, dlatego wszelkie badania DNA przez jego amplifikację powinny przebiegać w obecności kontroli doświadczenia.

Zwiększenie czułości metod obejmować będzie coraz szersze wprowadzanie chemiluminiscencji i kolorymetrii do detekcji DNA, co w przyszłości zaowocować

ma zautomatyzowaniem badania DNA na poziomie rozdziálu elektroforetycznego i detekcji wyniku.

Badania DNA mogą być obecnie prowadzone retrospektywnie. Spektakularnym doniesieniem było np. wykazanie transwersji A→T w kodonie 227 genu p53 u zmarłego w 1978 r. wiceprezydenta USA H.H. Humphreya. Mutacja prowadziła do zmiany w dojrzewaniu mRNA – uaktywnienia kryptycznego miejsca składania w eksonie 7 genu p53. W wyniku mutacji białko p53 pozbawione było kilku aminokwasów. Cytowane badania wykonano na materiale pobranym w 1967 r. przed wykryciem nowotworu [40]. W 1997 r. doniesiono o amplifikacji DNA metodą PCR z fragmentu kości człowieka neandertalskiego i wykazaniu, że współczesny człowiek nie pochodzi od niego. Tego rodzaju doniesienia będą pojawiały się obecnie często i dotyczyć będą nie tylko człowieka, lecz również zwierząt i roślin.

Rozwój informatyki umożliwi przygotowanie specjalistycznych baz danych, jednak z tym zagadnieniem bardzo silnie wiąże się standaryzacja badań wykonywanych przez różne placówki czy kraje. Problem ten na pewno nie ulegnie rozwiązaniu w najbliższej przyszłości, gdyż metody biologii molekularnej, a w szczególności PCR uwarunkowane są wieloma parametrami i ich standaryzacja nie jest obecnie możliwa. Największa możliwość popełnienia błędu diagnostycznego występuje przy wykrywaniu wirusów i stanowi jednocześnie najtrudniejsze zadanie do standaryzacji.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLARD A, BIRONES R, JUTO P. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 2659.
- [2] ALLIERI MA, FABREGA S, OZSAHIN H. Detection of BCR/ABL translocation by polymerase chain reaction in leukemic progenitor cell (ALL-CFU) from patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Exp Hematol* 1992; **20**: 312–314.
- [3] AQUILAR F, HUSSAIN SP, CERRUTI P. Aflatoxin B 1 induces the transversion of G→T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8586–8590.
- [4] ARNHEIM N, ERLICH H. Polymerase chain reaction strategy. *Ann Rev Biochem* 1992; **61**: 131–56.
- [5] BEGGS AH, KOENIG M, BOYCE FM, KUNKEL LM. Detection of 98 % of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; **86**: 45–48.
- [6] BEJ AK, MAHBUBANI MH, ATLAS RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction and other methods and their application. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; **26**: 301–334.
- [7] BEJ AK, McCARTY SC, ATLAS RM. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: Comparison with defined substrate and planting methods for water quality monitoring. *Appl Environ Microbiol* 1991; **57**: 2429–2432.
- [8] BEJ AK, STEFFAN RJ, DICESARE J. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol* 1990; **56**: 307–314.

- [9] BIGNON Y, BERNARD D, CURE H. Detection of Epstein-Barr viral genomes in lymph nodes of Hodgkins disease patients. *Mol Carcinog* 1990; **3**: 9.
- [10] BIRKELUND S. The molecular biology and diagnostics of *Chlamydia trachomatis*. *Dan Med Bull* 1992; **39**: 304–320.
- [11] BISWAS J, MAYR AJ, MARTIN WJ et al. Detection of human cytomegalovirus in ocular tissue by polymerase chain reaction and *in situ* DNA hybridization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993; **231**: 66–70.
- [12] CHA RS, ZARBL H, KEOHAVONG P et al. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl* 1992; **2**: 14–20.
- [13] CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, NGUYEN PN, CASKEY CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 11141–11156.
- [14] CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, CASKEY CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. [w] Innis M, Gelfand D, Sninski J, White T [red] PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press 1989, 272–281.
- [15] CHELLY J, CONCORDET JP, KAPLAN JC, KAHN A. Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2617–2621.
- [16] CHONG SS, KRISTJANSSON K, COTA J. Preimplantation prevention of X-linked disease: reliable and rapid sex determination of single human cells by restriction analysis of simultaneously amplified ZFX and ZFY sequences. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1187–1191.
- [17] CLEMENS PR, FENWICK RG, CHAMBERLAIN JS et al. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 951–960.
- [18] CONE RW, HOBSON AC, HUANG ML. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 3185–3189.
- [19] CRISTIANO K, DI BISCEGLIE AM, HOOFNAGLE JH et al. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis: Detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. *Arch Virol Suppl* 1992; **4**: 172–178.
- [20] CUI KH, WARNES GM, JEFFREY R et al. Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet* 1994; **343**: 79–82.
- [21] DAMICO D, CARBONE D, MITSUDOMI T et al. High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene* 1992; **7**: 339–346.
- [22] DENY P, LECOT C, JEANTILS V et al. Polymerase chain reaction-based detection of hepatitis D virus genome in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 1993; **39**: 214–218.
- [23] DUNNING AM, TALMUD P, HUMPHRIES SE. Errors in the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 10393.
- [24] EIKEN HG, ODLAND E, BOMAN H et al. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 1427–1430.
- [25] EPPLEN JT, MELMER G, SCHMIDT P et al. On the potential of simple repetitive DNA for fingerprinting in clinical, forensic, and evolutionary dynamic studies. *Clin Investig* 1992; **70**: 1043–1051.
- [26] FORREST SM, DAHL HH, HOWELLS DW et al. Mutation detection in phenylketonuria by using chemical cleavage of mismatch. Importance of using probes from both normal and patient samples. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 175–183.
- [27] FRANKLEL G, GIRON JA, VALLMASSOI et al. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. *Mol Microbiol* 1989; **3**: 1729.
- [28] GANLY PS, JARAD N, RUDD RM et al. PCR-based RFLP analysis allows genotyping of the short arm of chromosome 3 in small biopsies from patients with lung cancer. *Genomics* 1992; **12**: 221–228.

- [29] GELFAND DH, WHILE TJ. Thermostable DNA Polymerases. [w] Innis M, Gelfand D, Sninski J, White T [red] PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press 1989, 129.
- [30] GOLDBERG YP, ANDREW SE, CLARKE LA et al. A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in Huntington disease. *Hum Mol Genet* 1993; **2** : 635–636.
- [31] GOZLAN J, SALORD JM, CHOUAID C et al. Human cytomegalovirus (HCMV) late-mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: Diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1943–1945.
- [32] GROMPE M. Rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet* 1993; **5**: 111–117.
- [33] HARRINGTON WJ, MILLER GA, KEMPER RR et al. HTLV-I associated leukemia/lymphoma in South Florida. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; **4**: 284–289.
- [34] HARTSKEERI RA, DE WIT MYL, LIATSER PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol* 1989; **135**: 2357.
- [35] HENEINE W, KHABBAZ RF, LAL RB et al. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II seropositive individuals. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 1605–1607.
- [36] HIGUCHI R, VON BEROLDINGER H, SENSABAUGH GF et al. DNA typing from single hairs. *Nature* 1988; **7**: 332.
- [37] HOELZEL R. The trouble with PCR machines. *Trends Genet* 1990; **6**: 237.
- [38] HOLLAND SM, GAYDOS CA, QUINN TC et al. Detection and differentiation of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification. *J Infect Dis* 1990; **162**: 984.
- [39] HOUARD S, HACKEL C, HERZOG C et al. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1989; **140**: 477.
- [40] HRUBAN R, VAN DER RIET H, EROZAN YS, SIDRANSKY D. Molecular biology and the early detection of carcinoma of the bladder – the case of Hubert H. Humphrey. *N Engl J Med* 1994; **330**: 1276–1278.
- [41] HSU IC, METCALF RA, SUN T et al. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; **350**: 427–428.
- [42] HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, HACKMAN P, RIDANPAA M et al. K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: Association with smoking and occupational exposure to asbestos. *Int J Cancer* 1993; **53**: 250–256.
- [43] INGHIRAMI G, SZABOLCS MJ, YEE HT et al. Detection of immunoglobulin gene rearrangements of B cell non-Hodgins lymphomas and leukemias in fresh unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1993; **68**: 746–757.
- [44] JACOBY RF, LLOR X, TONG BB et al. Mutation in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 1991; **87**: 624–630.
- [45] JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SW. Hypervariable „minisatellite” region in human DNA. *Nature* 1985; **314**: 67–73.
- [46] JEFFREYS AJ, WILSON V, THIEN SW. Individual-specific „fingerprints” of human DNA. *Nature* 1985; **316**: 76–79.
- [47] JIANG W, KAHN S, GUILLEM J et al. Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal and gastric cancer. *Oncogene* 1989; **4**: 923–928.
- [48] JINNO Y, YOSHIURA K, NIIKAWA N et al. Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 6739.
- [49] JUNGERMAN M, SŁOMSKI R. Enzymatyczna amplifikacja in vitro specyficznych sekwencji DNA. *Post Biochem* 1990; **36**: 14–21.
- [50] JUNGERMAN M. Zastosowanie mikrometod izolacji i amplifikacji DNA w badaniach chorób genetycznych i identyfikacji osób. Praca doktorska. Akademia Medyczna w Poznaniu, 1988.

- [51] KAHN SM, JIANG W, CULBERTSON TA et al. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via enriched PCR amplification. *Oncogene* 1991; **6**: 1079–1083.
- [52] KAMOLVARIN N, TIRAWATNPONG T, RATTANASIWAMOKE R et al. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J Infect Dis* 1993; **167**: 207–210.
- [53] KAN YW, DOZY AM. Antenatal diagnosis of sickle cell anemia by DNA analysis of amniotic fluid cells. *Lancet* 1978; **2**: 910–912.
- [54] KANEKO S, MILLER RH, DI BISCEGLIE AM et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction: Application for clinical diagnosis. *Gastroenterology* 1990; **99**: 799–804.
- [55] KATO N, OU C-Y, DATO H et al. Identification of toxigenic *Clostridium defficile* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 33.
- [56] KINOSHITA M, SHIN S, AONO T. A sensitive and quantitative method for the determination of number of HPV 16 DNA copies by using the competitive polymerase chain reaction. *Genet Anal Tech Appl* 1993; **10**: 116–121.
- [57] KOENIG M, HOFFMAN EP, BERTELSON CJ, MONACO AP, FEENER C, KUNKEL LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; **50**: 509–517.
- [58] KRAWCZAK M, REISS J, SCHMIDTKE J et al. Polymerase chain reaction: replication errors and reliability of gene diagnosis. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 6.
- [59] KWIATKOWSKA J, TRZECIAK T, SŁOMSKI R. Powtórzenia DNA. *Post Biochem* 1995; **41**: 5–22.
- [60] KWOK S, HIGUCHI RG. Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; 339–237.
- [61] LAMPEL KA, JAGOW JA, TRUCKSESS et al. Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. *Appl Environ Microbiol* 1990; **56**: 1536.
- [62] LECOT C, JEANTILS V, OVAGUIMIAN L et al. Polymerase chain reaction-based detection of hepatitis D virus RNA in patients infected with human immunodeficiency virus. *Prog Clin Biol Res* 1993; **382**: 329–335.
- [63] LEVINSON G, FIELDS RA, HARTON GL et al. Reliable gender screening for human preimplantation embryos, using multiple DNA target-sequences. *Hum Reprod* 1992; **7**: 1304–1313.
- [64] LI HH, GYLLENSTEN UB, CUI XF et al. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 1988; 335–414.
- [65] LIANG R, CHAN V, CHAN TK et al. Detection of immunoglobulin gene rearrangement in lymphoid malignancies of B-cell lineage by seminested polymerase chain reaction gene amplification. *Am J Hemtol* 1993; **43**: 24–28.
- [66] LUBBERT M, JONAS D, MILLER CW et al. Retrospective analysis of ras gene activation in myeloid leukemic cells. *Oncogene* 1990; **5**: 583–587.
- [67] LUPPI M, MARASCA R, BAROZZI P et al. Frequent detection of human herpes virus-6 sequences by polymerase chain reaction in paraffin-embedded lymph nodes from patient with angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Leuk Res* 1993; **17**: 1003–1011.
- [68] MAXAM AM, GILBERT W. A new method for sequencing DNA. *Proc Acad Sci USA* 1977; **74**: 560.
- [69] MCGUIRE BS, CHANDLER FW, FELZ MW et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* in human blood and urine using the polymerase chain reaction. *Pathobiology* 1992; **60**: 163–167.
- [70] MULLIS KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; April: 56–65.
- [71] MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**: 335–350
- [72] MURAKAWA GJ, ZAIA JA, SPALLONE PA et al. Direct detection of HIV-I RNA from AIDS and ARC patient samples. *DNA* 1988; **7**: 287.

- [73] NAKAMURA Y, NISHISHO I, KINZLER KW et al. Mutations of the adenomatous polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takematsu Symp* 1991; **22**: 185–292.
- [74] NAMBA Y, OKA S, SHIMADA K et al. Post-mortem diagnosis of human T-lymphotrophic virus type-I (HTLV-I) associated myelopathy by detection of HTLV-I DNA in the spinal cord of a patient with post-transfusional myelopathy. *Mol Cell Probes* 1991; **5**: 381–384.
- [75] NEWTON CR, KALSHEKER N, GRAHAM A et al. Diagnosis of alpha 1-antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 8233–8243.
- [76] NICHOLS WC, PADILLA LM, BENSON MD. Prenatal detection of a gene for hereditary amyloidosis. *Am J Med Genet* 1989; **34**: 520–524.
- [77] NORGDARD MV, RADOLF JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29–62.
- [78] ORITA M, SUZUKI Y, SEKIYA T et al. Rapid and sensitive detection point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; **5**: 874–879.
- [79] ORKIN SH, ALTER BP, ALTAY C. Direct detection of common mutations with synthetic DNA probes. *N Engl J Med* 1978; **299**: 166–172.
- [80] PAABOO S, GIFFORD JA, WILSON AC. Mitochondria DNA sequences from a 7000-year-old brain. *Nucleic Acids Res* 1988; 16–20.
- [81] PAWLAK AL, PŁAWSKI A, SMOCKIEWICZ P, KWIATKOWSKA J, MEISSNER W, KROKOWICZ P, WEST SP. Familial polyposis coli – inducing mutations in APC gene in Poland. *J Appl Genet* 1997; **38**: 77–85.
- [82] PENA SDJ, CHAKRABORTY R, EPPLEN JT, JEFFREYS AJ. DNA Fingerprinting: State of the Science, Birkhauser Verlag, Basel, 1992.
- [83] PIATAK M, LUK KC, WILLIAMS B et al. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* 1993; **14**: 70–81.
- [84] POURZAND C, CERRUTTI P. Genotypic mutation analysis by PFLP/PCR. *Mut Res* 1993; **288**: 113–121.
- [85] PRINCE AM, ANDRUS L. PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques* 1992; **12**: 358–360.
- [86] RATTI G, MORONI A, CEVENINI et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in patients with non-gonococcal urethritis using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1992; **45**: 92.
- [87] RILEY DE, ROBERTS MC, TAKAYAM T et al. Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 1605–1607.
- [88] ROBERTS RG, COLE CG, HART KA, BOBROW M, BENTLEY DR. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 811.
- [89] RONAI Z, LUO FC, GRADIA S et al. Detection of K-ras mutation in normal and malignant colonic tissues by an enriched PCR method. *Int J Oncol* 1994; **4**: 391–396.
- [90] ROTBART HA (1990). PCR amplification of enteroviruses. [w] Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T [red] PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press 1989, 372.
- [91] RUDIN C, SENN HP, BERGER R et al. Repeated polymerase chain reaction complementary to other conventional methods for early detection of HIV infection in infants born to HIV-infected mothers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; **10**: 146–156.
- [92] RYCHLIK W, RHODS RE. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 8543.

- [93] RYS PN, PERSING DH. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2356–2360.
- [94] SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 1985; **230**: 1350–1354.
- [95] SALEEBA JA, RAMUA SJ, COTTON RGHL. Complete mutation detection using unlabeled chemical cleavage. *Hum Mut* 1992; **1**: 63–69.
- [96] SARKAR G, SOMMER SS. Shedding light on PCR contamination. *Nature* 1990; **343**: 27.
- [97] SCINICARIELLO F, EBERLE R, HILLIARD JK. Rapid detection of B virus (herpesvirus simiae) DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1993; **168**: 747–750.
- [98] SHIBATA D, JOHN MARTIN W, ARNHEIM N. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin embedded thin-tissue sections: A bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Res* 1988; **48**: 4564.
- [99] SHIBATA H, YAMASHITA K, OTSUKA N. Detection and identification of HBV DNA and DNA subtypes of Hbs-antigen by the use of the polymerase chain reaction and non-radioactive probes. *Kansenshogaku Zasshi* 1993; **67**: 609–614.
- [100] SIDRANSKY D, TOKINO T, HAMILTON SR. Identification of ras oncogene mutation in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; **256**: 102–105.
- [101] SIMON B, WEINEL R, HOHNE M. Frequent alterations of the tumor suppressor genes p53 and DCC in human pancreatic carcinoma. *Gastroenterology* 1994; **106**: 1645–1651.
- [102] SJOBRING U, MECKLENBURG M, ANDERSON AB. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 2200.
- [103] SKOV JJ, ULDUM SA, SONDERGARD-ANDERSON J. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1990; **29**: 46.
- [104] SŁOMSKI R, CHLEBOWSKA H, REISS J. Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w diagnostyce klinicznej. *Post Biochem* 1992; **38**: 75–80.
- [105] SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J. Diagnostyka molekularna chorób genetycznych. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 27–40.
- [106] SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J. Diagnostyka molekularna: amplifikacja sekwencji czy wzmacnianie sygnału. *Post Biochem* 1995; **41**: 220–229.
- [108] SMITH-SORENSEN B, GEBHARDT MC, KLOEN P. Screening for TP53 mutations in osteosarcomas using constant denaturant gel electrophoresis (CDGE). *Hum Mutat* 1993; **2**: 274–285.
- [109] STEGEMEIER BL, GILLET NA, ROBAR AH. The molecular progression of plutonium 239-induced rat lung carcinogenesis. K-ras expression and inactivation. *Mol Carcinogen* 1991; **4**: 43–51.
- [110] TASSANAKAJON A, BOONSAENG V, WILAIPT P. Polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* in mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; **87**: 273–275.
- [111] TUKE PW, LUTON P, GARSON JA. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of nested PCR products. *J Virol Methods* 1992; **40**: 163–173.
- [112] van LEEUWEN C, TOPS C, BREUKEL H. CA repeat polymorphism within the MCC (mutated in colorectal cancer) gene. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 5805.
- [113] VANDENVELDE C, VERSTRAETE M, Van BEERS D. Fast multiplex polymerase chain reaction on boiled clinical samples for rapid viral diagnosis. *J Virol Methods* 1990; **30**: 214–227.
- [114] VICTOR T, DU TOIT R, VANZYL J. Improved method for the routine identification of toxigenic *Escherichia coli* by DNA amplification of a conserved region of the heat labile toxin a subunit. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 158.
- [115] WATAYA Y, KUBOCHI F, MIZUKOSHIC. DNA diagnosis of falciparum malaria. *Nucleic Acids Symp Ser* 1991; 155–156.

- [116] WIEDMANN M, WILSON WJ, CZAJKA J. Ligase chain reaction (LCR) – overview and applications. *PCR Methods Appl* 1994; **3**: S51–64.
- [117] WILLIAMS C, WILLIAMSON R, COUELLE C, LOEFFLER F, SMITH J, IVINSON A. Same-day, first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification. *Lancet* 1988; **ii**: 102–103.
- [118] WOODEN J, GOULD EE, PAULLAT et al. *Plasmodium falciparum*. A simple polymerase chain reaction method for differentiating strains. *Exp Parasitol* 1992; **75**: 207–212.
- [119] WREN B, CLAYTON C, TABAQCHALI S. Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reactions. *Lancet* 1990; **1**: 423.
- [120] YANO T. Sexing of *in vitro*-fertilized preimplantation mouse embryos by the PCR method. *Jpn J Hum Genet* 1993; **38**: 277–288.

SEKWENCJONOWANIE DNA – TEORIA, PRAKTYKA, PROBLEMY

DNA SEQUENCING – THEORY, PRACTICE, PROBLEMS

Przemysław NUC¹, Katarzyna NUC¹, Ryszard SŁOMSKI^{1,2}

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu; ²Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Streszczenie: Uplłynęło prawie 21 lat od czasu, kiedy F. Sanger opracował metodę dideoksy, najpopularniejszą obecnie metodę sekwencjonowania DNA. W tym czasie opracowano techniki pozwalające na sekwencjonowanie różnych matryc, od produktów PCR, po genomowy DNA, a także fragmenty DNA zawierające motywy palindromowe i bogate w pary GC. Na potrzeby sekwencjonowania zastosowano i zmodyfikowano wiele różnych polimeraz DNA. Ulepszono również techniki elektroforezy i detekcji produktów sekwencjonowania, które ewoluowały od prostej autoradiografii żelu do automatycznej detekcji i pomiaru ilości fluorescencyjnie znakowanych produktów. Wzrastająca ilość danych sekwencyjnych zmusza do ich komputerowego ewidencjonowania i analizy oraz czyni mapowanie genomów oraz klonowanie nakładających się sekwencji najistotniejszym czynnikiem, od którego rozwoju zależy tempo realizacji projektów sekwencyjnych.

Słowa kluczowe: DNA, elektroforeza, polimerazy, sekwencjonowanie.

Summary: It is almost 21 years since F. Sanger has developed the dideoxy method of DNA sequence determination, the most popular one in use today. During this period, techniques for sequencing of different templates were developed, from PCR products to genomic DNA, including those containing palindromes and GC rich motifs. Different DNA polymerases were employed and modified for use in this technique. The electrophoresis and product detection techniques were improved and evolved from a simple gel autoradiography to automation of fluorescently labelled products detection and quantitation. The increasing amounts of sequencing data raises the necessity of their computer based storage and analysis, and makes mapping of genomes and overlapping DNA fragments cloning to be the most important step to be developed to fasten the sequencing projects.

Keywords: DNA, sequencing, electrophoresis, polymerases.

1. WPROWADZENIE

Poznanie sekwencji nukleotydowej DNA stanowi najlepszy sposób budowania podstaw pełnego zrozumienia molekularnych mechanizmów funkcjonowania i ewolucji organizmów. Ponieważ skomplikowane i kosztowne procedury wyszukiwania genów o nowej lub znanej już u innych organizmów funkcji, wymagają znacznego nakładu pracy i czasu, nawet w wyspecjalizowanych pracowniach, również kosztowne, lecz technicznie nietrudne sekwencjonowanie całych genomów wydaje się atrakcyjną alternatywą w przypadku genomów organellowych i prokariotycznych oraz cennym uzupełnieniem w badaniach jądrowych genomów *Eucarya*. Efektem 20 lat doskonalenia technik oczyszczania, frakcjonowania, detekcji i klonowania DNA oraz badań i modyfikacji polimeraz DNA, które upłynęły od opracowania metod sekwencjonowania, jest poznanie pełnej sekwencji genomu drożdży (*S. cerevisiae*), ośmiu przedstawicieli *Eubacteria* i trzech *Archea* [19]. Sekwencjonowanie całych genomów kolejnych 12 gatunków *Eubacteria* zakończy się w ciągu najbliższych dwóch lat, a w roku 2005 powinien się zakończyć piętnastoletni projekt sekwencjonowania 3 mld par zasad genomu człowieka [18, 19]. W ciągu ostatnich lat określono pełne sekwencje ponad 70 genomów mitochondrialnych, w tym przedstawicieli: *Chordata* – 42, *Arthropoda* – 7, *Fungi* – 5, *Alveolata* – 5, *Echinodermata* – 4, *Mollusca* – 3, *Nematoda* – 3, *Charophyta* – 3, *Chlorophyta* – 3, *Rhodophyta* – 1, *Euglenozoa* – 1, *Annelida* – 1 i *Reclinomonas americana* [14] oraz 12 genomów chloroplastowych gatunków: *Marchantia polymorpha*, *Epifagus virginiana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Pinus thunbergiana*, *Nicotiana tabacum*, *Chlorella vulgaris*, *Porphyra purpurea*, *Euglena gracilis*, *Odontella sinensis*, *Cyanophora paradoxa* i *Toxoplasma gondii* [15]. Dzięki automatyzacji sekwencjonowania DNA już w 1995 roku, określenie pełnej sekwencji genomu *Mycoplasma genitalium* (580 070 pz) wymagające przeprowadzenia 96 000 reakcji sekwencyjnych, zakończonych odczytaniem średnio 450 pz z jednej reakcji, wykonanych przez pięć osób, z wykorzystaniem ośmiu aparatów do automatycznego odczytu sekwencji zajęło zaledwie 8 tygodni efektywnej pracy [11]. Dostęp do informacji o pełnych sekwencjach genomów i banków klonów obejmujących całe genomy stwarza nowe możliwości planowania badań struktury i funkcji wybranych genów [16, 36]. Pełne dane o strukturach genomów ułatwiają identyfikację produktów i badanie ekspresji określonych, pojedynczych genów *in vivo* [35], ułatwią badania różnicowania komórek oraz potencjału adaptacyjnego organizmów i mechanizmów ewolucji, a także transferu informacji genetycznej [41].

2. PRZEŁOM W 1977 R.

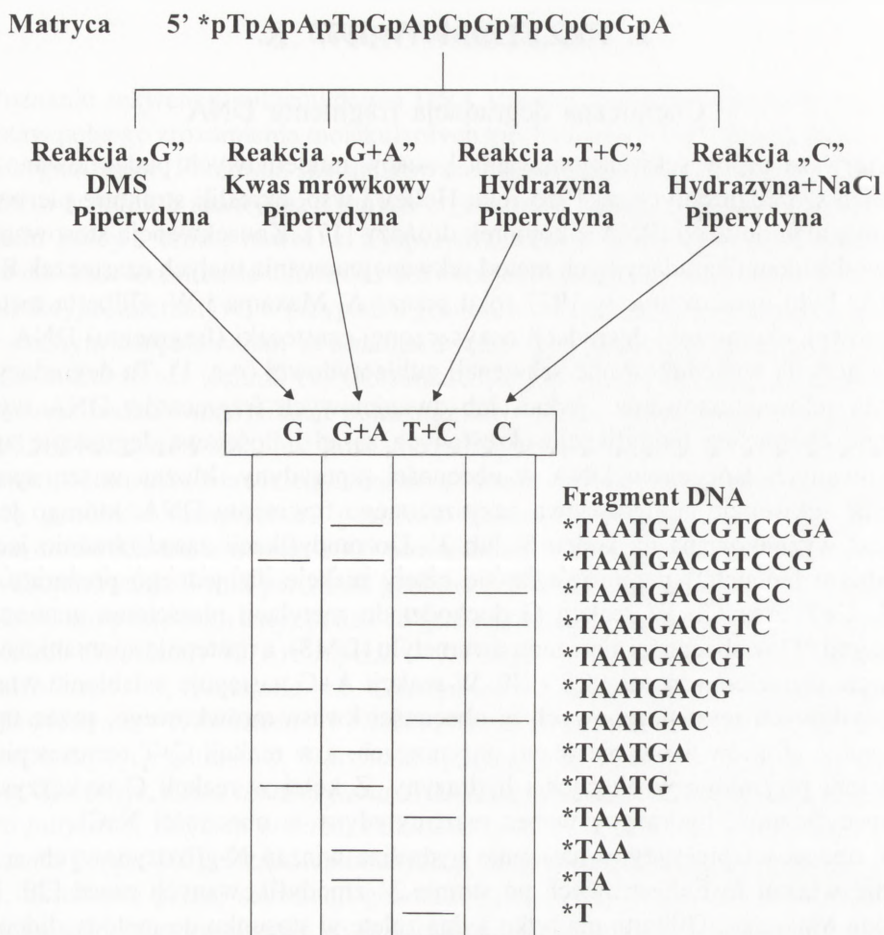
Chemiczna degradacja fragmentu DNA

Pierwsze próby sekwencjonowania kwasów nukleinowych podejmowano już w latach sześćdziesiątych, w 1965 roku Holley i wsp. określili strukturę pierwszorzędową alaninowego tRNA z komórek drożdży [17]. Konsekwencją stosowanych z powodzeniem degradacyjnych metod sekwencjonowania małych cząsteczek RNA (tRNA) było opracowanie w 1977 roku przez A. Maxama i W. Gilberta metody częściowej, chemicznej degradacji oczyszczonej cząsteczki (fragmentu) DNA, pozwalającej na wydedukowanie sekwencji nukleotydowej (rys. 1). Ta degradacyjna metoda sekwencjonowania jedno- lub dwuniciowych fragmentów DNA wykorzystuje chemiczną modyfikację określonych zasad i ilościową degradację zmodyfikowanych łańcuchów DNA w obecności piperydyny. Można w ten sposób określić sekwencję nukleotydową oczyszczonego fragmentu DNA, którego jedna nić jest wyznakowana na końcu 5' lub 3'. Do modyfikacji zasad (średnio jednej w jednym łańcuchu) przeprowadza się cztery reakcje dla jednego preparatu (G, A+G, C+T oraz C). W reakcji G dochodzi do metylacji pierścienia guanozyny w pozycji N7 w obecności siarczanu dwumetylu (DMS), a następnie spontanicznego otwarcia pierścienia między C8 i N9. W reakcji A+G następuje osłabienie wiązań glikozydowych reszt purynowych w obecności kwasu mrówkowego, przez uprotowanie atomów azotu pierścieni purynowych, a w reakcji C+T rozszczepienie pierścieni pirymidyn w obecności hydrazyny. Z kolei w reakcji C wykorzystuje się specyficzność hydrazyny wobec reszt cytydyny w obecności NaCl.

W obecności piperydyny następuje hydroliza wiązań N-glikozydowych, a następnie wiązań fosfodiestrowych po stronie 3' zmodyfikowanych zasad [29, 30]. Metoda Maxama i Gilberta ma tylko jedną zaletę w stosunku do metody dideoksy Sangera [37] – jest bezpośrednią metodą chemiczną, niewrażliwą na sekwencje trudne do przepisania przez polimerazy DNA, jak np. bogate w pary GC sekwencje palindromowe czy homopolimeryczne odcinki DNA. Pracochłonność metody chemicznej, w kontekście zapotrzebowania na szybkie uzyskiwanie sekwencji DNA, spowodowała, że niemal całkowicie ustąpiła metodzie Sangera, co istotnie przyczyniło się do rozwoju badań nad polimerazami DNA.

Kopiowanie łańcucha DNA

Pierwszym enzymem zastosowanym do określania sekwencji nukleotydów była replikaza faga Q β , kopiująca jednoniciowy RNA. Opracowana w pracowni C. Wiesmanna, metoda pulsacyjnego znakowania syntetyzowanego łańcucha pozwalała na określenie jego sekwencji [7]. W 1963 roku P. Berg, H. Fanher i M. Chamberlin opracowali metodę replikacji łańcucha DNA, rozpoczynającej się od oligonukleo-



Autoradiogram żelu sekwencyjnego

RYSUNEK 1. Schemat sekwencjonowania metodą chemiczną A. Maxama i W. Gilberta (* – znakowany nukleotydyd)

tydowego startera, w warunkach sprzyjających inkorporacji przez DNA polimerazy I do syntetyzowanego łańcucha, trzech dNTP i jednego trifosforanu rybonukleozydu. Analizowano produkty, które uprzednio poddane alkalicznej hydrolizie, pękały w miejscach wbudowanego rybonukleotydu [6]. Opracowana przez F. Sangera, metoda „plus minus” polegała na dodaniu do mieszaniny dNTP jednego z trifosforanów w bardzo niskim stężeniu, znakowanego ^{32}P w pozycji α , co powodowało częstą terminację replikacji przed miejscem jego inkorporacji [40]. Metoda „plus minus” pozwoliła na określenie niemal pełnej sekwencji nukleotydowej faga ΦX174 , o długości 5386 nt [39]. W końcu 1977 roku F. Sanger i A. Coulson, opracowali

TABELA 1. Porównanie procesywności różnych polimeraz DNA oraz szybkości wbudowywania przez nie dNMP [37]

Enzym	Procesywność, nt	Szybkość wbudowywania nt/s
Fragment Klenowa polimerazy DNA I	10–50	45
Sekwenaza	~ 2000	
Sekwenaza 2.0	~ 3000	300
Polimeraza Taq	> 7600	35–100

ksylowej w pozycji 3' rybozy, co uniemożliwia włączenie do syntetyzowanego łańcucha DNA następnego nukleotydu. Współautor niniejszej pracy (R. S.) miał możliwość wysłuchania autorskiego przedstawienia nowej metody przez F. Sangera na Uniwersytecie Chicago, gdzie największa sala audytoryjna nie mogła pomieścić wszystkich zainteresowanych, doceniających znaczenie nowej metody sekwencjonowania. Metoda dideoksy, Sangera albo enzymatycznej syntezy polega na enzymatycznej replikacji jednoniciowej (zdenaturowanej) matrycy rozpoczynającej się od jednego startera, a kończącej wbudowaniem dideoksynukleotydu do nowopowstałego łańcucha DNA (rys. 2). Reakcję prowadzi się w czterech oddzielnych próbkach A, C, G, T. Każda z nich zawiera tę samą matrycę, starter, mieszaninę czterech trifosforanów deoksynukleozydów, odpowiedni bufor, polimerazę DNA oraz jeden z ddNTP, odpowiednio: ddATP, ddCTP, ddGTP lub ddTTP. Zdenaturowane produkty rozdziela się elektroforetycznie w czterech oddzielnych ścieżkach 6–8% żelu poliakrylamidowego, zawierającego 7 M mocznik, w temperaturze 55–70°C. Dzięki wprowadzeniu do reakcji nukleotydu wyznakowanego w pozycji α , radioizotopem [^{32}P] lub [^{35}S] dNTP albo użyciu startera, wyznakowanego na końcu 5', prążki odpowiadające poszczególnym produktom terminacji (ddNTP) można uwidocznić na kliszy rentgenowskiej po autoradiografii żelu.

3. POLIMERAZY DNA

Pierwotnie, do sekwencjonowania DNA stosowano polimerazę DNA I z komórek *E. coli*. Uzyskiwane sekwencje charakteryzowały się jednak wysokim stosunkiem tła do sygnału. Przyczyną tego zjawiska była aktywność egzonukleazowa enzymu, w kierunku 5' → 3', która powodowała częściową degradację startera przyłączonego do matrycy [25]. W 1970 roku, M. Klenow i J. Henningsen usunęli aktywność egzonukleazową 5' → 3' z polimerazy DNA I bez naruszenia jej aktywności polimerazowej. Zmodyfikowaną wersję enzymu nazwano od nazwiska jednego z badaczy fragmentem Klenowa polimerazy DNA I. Początkowo enzym był przygotowywany

TABELA 2. Porównanie wydajności inkorporacji dNMP w stosunku do ddNMP [48]

Enzym	Wydajność wbudowywania dNMP w stosunku do ddNMP			
	A	C	G	T
Polimeraza DNA Taq	4700	2600	1400	4500
Polimeraza DNA <i>E. coli</i>	720	250	140	1100
Polimeraza DNA T7	3,3	3,7	3,2	2,8
Termosekwenaza	0,71	0,72	0,41	0,93

przez hydrolizę holoenzymu polimerazy DNA I w obecności subtilizyny – endopeptydazy serynowej izolowanej z *Bacillus subtilis* [23]. Obecnie stosowany fragment Klenowa to zrekombinowane białko pozbawione 323 reszt aminokwasowych N-końcowej części łańcucha polipeptydowego [24]. Fragment Klenowa jest enzymem mało stabilnym i wykazuje niską procesywność (tab.1). W wyniku łatwej dysocjacji enzymu od matrycy, dochodzi do niespecyficznego terminacji łańcuchów DNA, niezależnej od inkorporacji ddNMP, czego efektem jest stosunkowo wysokie tło. Maksymalna długość sekwencji nukleotydowej, jaką można odczytać w wyniku jednostopniowej reakcji z zastosowaniem fragmentu Klenowa, wynosi około 200 nukleotydów. Sekwencje dłuższe (300 nt) można odczytać tylko w przypadku sekwencjonowania dwustopniowego [44]. Ze względu na niskie temperaturowe optimum aktywności fragment Klenowa polimerazy DNA I nie jest w stanie wiernie przepisać sekwencji palindromowych, bogatych w pary GC [13]. Obecnie do sekwencjonowania DNA, najczęściej stosuje się pochodne dwóch polimeraz DNA: polimerazę Taq, występującą w komórkach *Thermus aquaticus* i polimerazę DNA faga T7 z komórek *E. coli*. Polimeraza DNA bakteriofaga T7 charakteryzuje się bardzo wysoką procesywnością (tab. 1) dając produkty pozwalające na odczytanie długich sekwencji (powyżej 600 nt). Polimeraza DNA faga T7 jest kompleksem dwóch ściśle związanych białek, o stałej dysocjacji równej 5×10^{-9} M [20]. Kompleks składa się z produktu ekspresji genu 5 bakteriofaga T7 (80 kDa) i tioredoksyny (12 kDa) – produktu genu *trxA* *E. coli*. Produkt genu 5 wykazuje aktywność polimerazy, o niskiej procesywności oraz egzonukleazy 3'→5' pozwalającej na usuwanie błędnie wbudowanych nukleotydów. Bakteryjna tioredoksyna zapewnia wysoką procesywność kompleksu [47]. Naturalna polimeraza DNA T7 nie ma aktywności egzonukleazowej w kierunku 5' → 3'. Powszechnie stosuje się dwie pochodne polimerazy DNA bakteriofaga T7 – sekwenzęTM – enzym modyfikowany chemicznie, o zmniejszonej aktywności egzonukleazy 3'→5' oraz sekwenzę 2.0 – produkt zmutowanego genu, całkowicie pozbawiony tej aktywności. W reakcji wymagającej cząsteczkowego tlenu, czynnika redukującego oraz soli żelaza w stężeniu molowym niższym lub równym stężeniu enzymu udało się selektywnie obniżyć aktywność egzonukleazową 3'→5' polimerazy T7 o około 5000 razy [51]. Produkt

ekspresji genu 5 bakteriofaga T7 w swoim karboksylowym regionie ma zlokalizowaną domenę odpowiedzialną za oddziaływanie z DNA oraz aktywność polimerazy DNA, natomiast w regionie aminowym białka znajduje się aktywność egzonukleazowa 3'→5'. Sekwenaza 2.0 to pochodna polimerazy DNA T7 całkowicie pozbawiona aktywności egzonukleazowej, powstała w wyniku usunięcia 28 reszt aminokwasowych z aminowego końca białka [50], która charakteryzuje się dużą stabilnością i wyższą specyficznością od wersji modyfikowanej chemicznie. Obie sekwenazy wykazują wysoką tolerancję w stosunku do wbudowywania analogów dNTP, takich jak: ddNTP, dITP oraz 7-deaza-dGTP. Stosowanie w mieszaninie reakcyjnej dITP czy 7-deaza-dGTP umożliwia odczytanie sekwencji bogatych w GC, ponieważ inozyna i 7-deaza-guanozyna tworzą słabsze wiązania z cytozyną [46].

Optimum temperaturowe polimerazy DNA z *Thermus aquaticus* (polimerazy Taq) mieści się w zakresie od 50 do 75°C, co pozwala na sekwencjonowanie matryc bogatych w pary GC [9,21]. Stabilność polimerazy Taq w wysokiej temperaturze (do 95°C) pozwala oprócz prowadzenia reakcji izotermicznej (70–72°C), na tzw. sekwencjonowanie cykliczne [28, 34]. Liczba cykli, w przedziale od 20 do 30, zależy od ilości matrycy, a każdy cykl obejmuje termiczną denaturację matrycy, przyłączanie i wydłużanie startera. Ze względu na obecność jednego startera ilość syntetyzowanych łańcuchów DNA wzrasta liniowo. Sekwencjonowanie cykliczne jest bardzo przydatne, gdy dysponuje się niewielkimi ilościami matrycy (ilości femtomolowe) i umożliwia bezpośrednie sekwencjonowanie prób DNA, pobranych z pojedynczej kolonii bakteryjnej czy łysinki fagowej [3]. Dwie obecnie stosowane pochodne polimerazy DNA z *Thermus aquaticus* to polimeraza Δ Taq i termosekwenaza (*Thermo Sequenase*). Polimeraza Δ Taq pozbawiona jest całkowicie aktywności egzonukleazowej w kierunku 5'→3', ta wersja enzymu powstała w wyniku usunięcia z aminowego końca polimerazy DNA Taq fragmentu łańcucha polipeptydowego o długości 235 aminokwasów – domeny odpowiedzialnej za tę aktywność [4,27]. Tak samo jak w przypadku fragmentu Klenowa, usunięcie domeny odpowiedzialnej za aktywność egzonukleazową 5'→3' nie zaburza aktywności polimerazowej enzymu. Polimeraza Δ Taq nie wykazuje dyskryminacji wobec dITP czy 7-deaza-dGTP, natomiast z powodu gorszego wbudowywania ddNTP należy w mieszaninie reakcyjnej stosować znaczny ich nadmiar w stosunku do dNTP. Tabor i Richardson prowadząc badania nad różnymi polimerazami DNA porównywali ich sekwencję aminokwasową i analizowali centra aktywne. Przygotowali wiele mutantów zarówno polimerazy DNA bakteriofaga T7, która nie dyskryminuje ddNTP, jak i dwóch polimeraz, które wbudowują ddNTP z około 1000-krotnie mniejszą wydajnością, tj. polimerazy DNA I i polimerazy DNA Taq (tab. 2). W wyniku tych badań stwierdzili, że za dyskryminację ddNTP odpowiedzialna jest reszta fenyloalaniny znajdująca się w tzw. pętli „0” enzymów [8]. Zamiana fenyloalaniny na tyrozynę w tym miejscu w strukturze pierwszorzędowej polimerazy DNA Taq znosi dyskryminację enzymu wobec ddNTP. Tak przygotowaną wersję

Polimeraza DNA T7	<i>RDNAKTFIYGFLY G</i>
Polimeraza DNA I z <i>E. coli</i>	<i>RRSAKAINFGLIY G</i>
Polimeraza DNA Taq z <i>Thermus aquaticus</i>	<i>RRAAKTINFGVLY G</i>

RYSUNEK 3. Porównanie sekwencji aminokwasowej pętli „O” polimeraz DNA (pogrubiono aminokwasy istotne dla wydajności wbudowywania ddNTP [48]; kursywą zaznaczono aminokwasy homologiczne)

enzymu, pozbawioną również domeny odpowiedzialnej za aktywność egzonukleazową w kierunku 5'→3', nazwano termostabilną sekwenazą (*Thermo Sequenase* – Amersham) [49].

4. PRZYGOTOWANIE MATRYC I DOBÓR WARUNKÓW REAKCJI

Metodą dideoksy można sekwencjonować fragmenty DNA sklonowane w wektorach fagowych kosmidowych, plazmidowych oraz produkty PCR i bezpośrednio, unikatowe sekwencje genomowego DNA [4, 26]. Badana matryca powinna: być pojedynczym klonem, homogennym produktem PCR, a w przypadku prób genomowego DNA – przynajmniej pochodzić od pojedynczego organizmu. DNA powinien być odbiałczony i nie zawierać RNA. Usunięcie RNA jest szczególnie istotne w przypadku stosowania polimerazy typu Taq lub fragmentu Klenowa DNA polimerazy I, ponieważ fragmenty RNA, zdolne do hybrydyzacji z badanym DNA mogą być dla obydwu polimeraz efektywnymi starterami [4].

Opracowany przez J. Messinga, system klonowania DNA w bakteriofagu M13, pozwala na uzyskiwanie metodą Sangera sekwencji o najlepszej dotąd jakości [31, 52]. Stosowanie jednoniciowej matrycy (nici (+) bakteriofaga M13) jest jednak niekorzystne z dwóch powodów. Po pierwsze, sklonowany fragment DNA może być bezpośrednio sekwencjonowany tylko w jednym kierunku [43]. Po drugie, fragmenty DNA klonowane w tego typu wektorach ulegają znacznie częściej zmianom rekombinacyjnym bądź delecjom niż klonowane w wektorach plazmidowych.

Bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR wymaga ich oczyszczenia od pozostałych w mieszaninie reakcyjnej trifosforanów nukleozydów i starterów, co można osiągnąć przez elektroforezę i ekstrakcję określonego prążka z żelu. Homogenne produkty PCR można również oczyścić enzymatycznie, w obecności dwóch termolabilnych enzymów: egzonukleazy I dla usunięcia pozostałych starterów oraz alkalicznej fosfatazy z kryła arktycznego dla usunięcia dNTP. Hydrolizę oligonukleotydów i dNTP można zakończyć przez 15-minutową inkubację prób w temp.

80°C, uzyskując preparat nadający się do sekwencjonowania [1]. Powyższy sposób enzymatycznego oczyszczania produktów PCR jest również łatwym sposobem ich przygotowania do klonowania w wektorach plazmidowych. Sklonowane produkty PCR można sekwencjonować stosując uniwersalne startery, co wydaje się ekonomiczne w wypadku stosowania starterów znakowanych fluorescencyjnie, pomimo że w takiej sytuacji należy sekwencjonować przynajmniej 10 klonów. Taka strategia jest najdogodniejsza w przypadku sekwencjonowania produktów RAPD czy AP-PCR, kiedy nie wiadomo, które z mieszaniny kilku starterów stanowią końce badanego produktu.

Warunki bezpośredniego sekwencjonowania określonego, unikalnego rejonu genomowego DNA, bez jego uprzedniej amplifikacji można stosunkowo łatwo zoptymalizować w warunkach cyklicznego sekwencjonowania w obecności dwóch polimeraz DNA: termosekwenazy i polimerazy Taq. Stosuje się dwa startery, z których tylko jeden jest znakowany, oraz niskie stężenie ddNTP – odpowiednie dla termosekwenazy. W takich warunkach polimeraza Taq praktycznie tylko amplifikuje DNA, a terminacji replikacji zależnej od ddNTP ulegają niemal wyłącznie łańcuchy syntetyzowane przez termosekwenazę [26].

Istotnym czynnikiem, decydującym o dobrej jakości uzyskiwanych wyników sekwencjonowania DNA metodą Sangera, jest maksymalna wybiórczość i duża wydajność hybrydyzacji stosowanego startera z badanym DNA. Optymalny molowy stosunek startera do jednoniciowej matrycy wynosi 1:1, w przypadku matryc dwuniciowych stosuje się już dwukrotny nadmiar startera, ze względu na niższą wydajność hybrydyzacji (konkurencyjna renaturacja komplementarnych nici matrycy), lecz zwiększanie stężenia startera, powyżej stosunku 5:1, może już prowadzić do niespecyficznych hybrydyzacji, dając dodatkowe, słabsze sygnały. Wyższy stosunek startera do matrycy stosuje się tylko w trakcie sekwencjonowania produktów PCR (20:1) [2].

Kolejnym czynnikiem ważnym dla jakości wyniku sekwencjonowania jest integralność zsyntetyzowanych, łańcuchów DNA zakończonych ddNMP. Degradacja produktów sekwencjonowania może zachodzić w wyniku nukleofilowego ataku H₂O lub PP_i na ich 3'-końcowe wiązanie fosfodiesterowe. Atak H₂O wynika z egzonukleazowej aktywności 3'→5' polimeraz DNA, jego produktem są monofosforany nukleozydów serii deoksy lub dideoksy. Pirofosforoliza jest natomiast odwróceniem polimeryzacji, a jej produktami są dNTP lub ddNTP. Pirofosforolizę można ograniczyć utrzymując w mieszaninie reakcyjnej wysokie stężenie dNTP (pirofosforolizę skutecznie blokuje tylko dNTP komplementarny do kolejnej zasady, replikowanej matrycy) lub prowadzenie syntezy w obecności pirofosfatazy [48].

Komórkowe polimerazy DNA, uczestniczące w jego naprawie, rozróżniają dNTP i ddNTP, wbudowując te ostatnie z około 1000 razy niższą wydajnością aniżeli dNTP (tab. 2). Dodatkowo stopień powyższej wybiórczości zależy od sekwencji replikowanej matrycy (kontekstu). Jeśli fagowa polimeraza DNA (T7), średnio tylko

4-krotnie słabiej inkorporuje ddNMP niż dNMP, a różnice w intensywności sąsiednich prążków na żelu sekwencyjnym mogą być 10-krotne, to w przypadku polimeraz bakteryjnych – nawet 50-krotne. Wybiórczość polimeraz DNA wobec dNTP zmusza do stosowania wysokich stężeń ddNTP, co w przypadku fluorescencyjnie znakowanych terminatorów (ddNTP) podnosi poziom tła. Uzyskiwane zależnie od sekwencji nukleotydowej matrycy, duże różnice w ilości poszczególnych produktów sekwencjonowania również utrudniają automatyczny odczyt sekwencji. Rozwiązanie powyższych problemów przyniosły badania S. Tabora i C. Richardsona nad polimerazami T7 i Taq, których efektem jest zastosowanie do sekwencjonowania DNA delecyjnej pochodnej polimerazy DNA faga T7 tzw. Sekwenazy 2.0, która w obecności jonów Mn^{2+} z równą praktycznie wydajnością wbudowuje do syntetyzowanego łańcucha DNA dNMP i ddNMP oraz wspomnianej już polimerazy Taq, tzw. termosekwenazy (powyżej), wykazującej podobne właściwości w obecności jonów Mg^{2+} [49].

Poważnym i często występującym utrudnieniem w odczytaniu sekwencji DNA są prążki we wszystkich czterech ścieżkach, zazwyczaj pojawiające się przy sekwencjonowaniu dwuniciowego DNA plazmidu tzw. BAFL (ang. *bands across four lanes*). Zmiana warunków elektroforezy nie ma żadnego wpływu na taki efekt. Jego przyczyną są drugorzędowe struktury matrycy, powodujące przedwczesne oddysocjowanie polimerazy i w konsekwencji, niezależnie od ddNTP, zakończenie syntezy łańcucha DNA. Efekt BAFL można znacznie zredukować przez:

- a) podniesienie temperatury reakcji, czyli stosowanie termostabilnych polimeraz DNA;
- b) wiązanie ze zdenaturowaną matrycą białek stabilizujących jednoniciowy DNA (SSB) z *E. coli*;
- c) stosowanie w mieszaninie reakcyjnej związków obniżających temperaturę topnienia DNA, np. DMSO lub formamidu (do 10% v/v);
- d) linearyzacja plazmidu;
- e) wydłużenie uzyskanych produktów sekwencjonowania w obecności terminalnej transferazy, przy wysokim stężeniu dNTP.

Wydłużeniu i przesunięciu w górę żelu ulegną tylko łańcuchy, których synteza zakończyła się niezależnie od inkorporacji 3'-końcowego dideoksynukleotydu, odsłaniając uprzednio nieczytelną sekwencję w rejonie tzw. BAFL [10].

5. FRAKCJONOWANIE PRODUKTÓW SEKWENCJONOWANIA I ICH DETEKCJA

Warunki elektroforezy

Optymalizacja warunków sekwencjonowania DNA oraz stosowanie w tym celu udoskonalonych form polimeraz DNA pozwala już na odczytywanie sekwencji zna-

cznie dłuższych niż 500 nt. Standardowe sekwencyjne żele poliakrylamidowe pozwalają na odczytanie maksymalnie 250 nt z jednego rozdziału. Zastosowanie żeli gradientowych pod względem grubości żelu, siły jonowej czy wartości pH pozwala na odczytanie z pojedynczego naniesienia prób do 350 pz, na skutek spowolnienia migracji krótszych łańcuchów DNA, a w przypadku żeli typu HydroLink do 600 nt [12]. Ze względu jednak na właściwości mechaniczne żelu HydroLink, stosowanie go do ręcznego sekwencjonowania, wymagającego płukania, suszenia i autoradiografii żelu, nie wydaje się atrakcyjne. Automatyczny odczyt sekwencji w stałej odległości od miejsca naniesienia próby (zazwyczaj 20 cm) pozwala na odczytanie do 650 nt z pojedynczej reakcji, jeśli produkty są rozdzielane w standardowym 6% żelu poliakrylamidowym i do 900 nt w żelu typu HydroLink.

Najczęściej do błędnej interpretacji wyników sekwencjonowania dochodzi z powodu tzw. kompresji. Te elektroforetyczne artefakty powstają, kiedy produkty sekwencjonowania tworzą struktury II-rzędowe, stabilne w 7 M moczniku. Fragment jednoniciowego DNA zakończony strukturą spinki do włosów migruje szybciej i może się pokrywać z prążkiem odpowiadającym krótszemu fragmentowi. Zazwyczaj obserwuje się nienormalnie zwiększoną odległość między prążkiem wynikającym z kompresji a prążkiem odpowiadającym pierwszemu z dłuższych, jednoniciowych produktów sekwencjonowania. W niektórych przypadkach jedynym sposobem wykrycia kompresji jest sekwencjonowanie obydwu nici badanego fragmentu DNA, gdyż produkty sekwencjonowania komplementarnych nici zazwyczaj nie dają kompresji w tych samych rejonach, a objawem występowania kompresji są ewidentne różnice dwóch uzyskanych sekwencji.

Do sposobów eliminacji kompresji, uniwersalnych dla metod Sangera oraz Maxama i Gilberta należą:

a) podniesienie temperatury żelu, w którym prowadzi się elektroforezę (do 70–85°C), co z kolei przyspiesza dyfuzję prążków;

b) przeprowadzenie elektroforezy w żelu zawierającym formamid zamiast mocznika;

c) deaminacyjna modyfikacja reszt cytozyny sekwencjonowanej matrycy.

W sekwencjonowaniu metodą Sangera pojawiają się dodatkowe możliwości eliminacji kompresji: (a) stosowanie w mieszaninie dNTP 5'-trifosforanu deoksyinozyny pozwala otrzymać produkty o mniej stabilnych strukturach II-rzędowych; jednak przedwczesna, niespecyficzna terminacja syntetyzowanego łańcucha DNA, zwłaszcza w przypadku stosowania pochodnych polimerazy DNA faga T7 nieefektywnie wbudowujących dIMP wymaga równoczesnego przeprowadzenia sekwencjonowania z zastosowaniem klasycznej mieszaniny dNTP; (b) stosowanie w mieszaninie dNTP 5'-trifosforanu deoksy 7 deaza-2' guanozyny (grupa metinowa w pozycji N7 guanozyny), która chociaż mniej efektywnie eliminuje kompresję, jest łatwiej niż 5'-trifosforan deoksyinozyny, wbudowywana do syntetyzowanych łańcuchów DNA.

Radioizotopowa detekcja produktów sekwencjonowania

Włączenie do mieszaniny dNTP, trifosforanu deoksynukleozydu znakowanego w pozycji α radioizotopem ^{32}P , ^{33}P lub ^{35}S jest najłatwiejszym sposobem znakowania produktów ręcznego sekwencjonowania i pozwala na stosunkowo szybkie uzyskanie autoradiogramu. Ten prosty system piętnowania produktów sekwencjonowania ma jednak dwie wady. Po pierwsze, inkorporacja radioizotopu jest proporcjonalna do długości uzyskanych łańcuchów DNA, co często zmusza do dwukrotnej autoradiografii żelu, oddzielnie w rejonie krótszych i dłuższych łańcuchów. Po drugie, na skutek pęknięć (relaksacji) dwuniciowej matrycy czy też jej zanieczyszczenia nawet niewielkimi ilościami RNA (w przypadku stosowania polimerazy Taq lub fragmentu Klenowa), może dochodzić do niespecyficznego (niezależnego od używanego startera) inicjacji replikacji, a w konsekwencji pojawienia się tła, czyli zazwyczaj słabych, dodatkowych prążków utrudniających interpretację wyniku. Powyższe niedogodności można usunąć, stosując startery znakowane fosforanem ^{32}P lub ^{33}P na końcu 5', w obecności kinazy polinukleotydomowej faga T4, co jednak wydłuża czas autoradiografii żelu i zwiększa pracochłonność, ponieważ wymaga uprzedniego znakowania starterów.

Fluorescencyjna detekcja produktów sekwencjonowania

Automatyczny odczyt sekwencji DNA z zastosowaniem zestawu typu ALFexpress polega na fluorometrycznej detekcji światła emitowanego przez fluorochrom Cy5, pod wpływem wiązki światła laserowego, o długości 643 nm. Wiązka lasera przechodzi przez szklaną przekładkę i żel poliakryloamidowy wzbudzając Cy5 do emisji światła o długości fali 667 nm. Sygnały zbierane są przez fotokomórki umieszczone za szklaną płytą. W celu uniknięcia rozproszenia wiązki powierzchni, przez które przechodzi, powinny być wolne od drobin kurzu i innych zanieczyszczeń. Wszystkie uzyskane produkty są wyznakowane na końcu 5' tym samym fluorochromem Cy5. Żel, w którym rozdzielane będą produkty sekwencjonowania, powinien być poddany preelektroforezie w celu usunięcia pozostałości nadsiarczanu amonu, który utlenia Cy5. Dzięki zautomatyzowaniu odczytu wyników reakcji sekwencjonowania unika się radioizotopów (bezpieczniejsza praca, trwałe znaczniki, szybsza detekcja), długiej i kłopotliwej obróbki żeli poliakryloamidowych oraz ich autoradiografii. Ponadto, odczytuje się dłuższe sekwencje, a uzyskane wyniki pozbawione błędów wynikających z ręcznego odczytu można bezpośrednio eksportować do specjalistycznych programów komputerowych celem ich składania, porównywania i dalszej analizy.

6. STRATEGIE SEKWENCJONOWANIA GENOMÓW

Sekwencjonowanie genomów organelowych (kilkanaście do kilkuset kpz) lub genomów organizmów prokariotycznych (0,5 do 5 Mpz) przeprowadza się z powodzeniem metodą losową (*shot-gun*), klonując do wektorów plazmidowych wycięte z żelu agarozowego fragmenty badanego DNA o długości około 2 kpz, uzyskane w wyniku mechanicznej i egzonukleolitycznej degradacji [11]. Ponad 99% klonów takiej biblioteki plazmidowej powinno zawierać pojedyncze inserty. Uzyskanie tym sposobem pełnej sekwencji genomu wymaga odczytania łącznie około pięciokrotnie dłuższej sekwencji analizowanych klonów [11]. Chociaż do klonowania DNA chromosomów drożdży stosowano wektory kosmidowe, obecnie do mapowania i sekwencjonowania większych genomów eukariotycznych stosuje się kilka innych systemów, pozwalających klonować dłuższe odcinki DNA. System klonowania w sztucznych chromosomach drożdżowych (YAC) pozwala klonować fragmenty DNA przynajmniej 10-krotnie dłuższe niż w wektorach fagowych i kosmidowych i poza łatwiejszym mapowaniem genomów pozwala na badania funkcji *in vivo* rozległych i złożonych genów [33]. Powyższy system, pomimo iż szeroko stosowany w badaniach genomów myszy, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* i człowieka, jest z kilku względów niedogodny. Niektóre klony są niestabilne, co można przynajmniej częściowo przezwyciężyć stosując do przygotowania biblioteki genomowej szczepy *S. cerevisiae* o uszkodzonym systemie rekombinacji DNA. Kolejną wadą systemu YAC jest wysoki odsetek klonów chimerycznych (40–60%) otrzymywanych zwłaszcza w trakcie przygotowywania bibliotek genomowych człowieka [32], co wymaga weryfikacji integralności klonów przez hybrydyzacje typu FISH. Ponadto w celu subklonowania insertu YAC konieczne jest wyodrębnienie zrekombinowanego wektora przez elektroforezę w pulsującym polu elektrycznym (PFGE) lub subklonowanie fragmentów całkowitego DNA klonu (komórek drożdży) oraz eliminacja sekwencji drożdżowych z uzyskanej podbiblioteki. W związku z powyższymi trudnościami opracowano i stosuje się obecnie kilka alternatywnych systemów do klonowania długich fragmentów DNA w komórkach bakterii.

Systemy P1 [45], BAC [42] i PAC [22] mają szereg zalet w stosunku do sztucznych chromosomów drożdżowych: rekombinanty są stabilniejsze i rzadziej otrzymuje się chimeryczne inserty. Łatwiej oczyścić insert sklonowanego DNA. System do klonowania w bakteriofagu P1 pozwala na klonowanie fragmentów o długości od 60 do 100 kpz. Wymaga upakowania *in vitro* wektora z insertem w otoczki i infekowania komórek *E. coli* o uszkodzonym systemie restrykcji metylowanego DNA (*mcr*⁻). Wektor zawiera gen odporności na kanamycynę i replikon plazmidu P1, który utrzymuje jedną kopię wektora w komórce, co zwiększa stabilność sklonowanego DNA, pozwalając jednak na amplifikację wektora przed jego izolacją. Innym systemem do klonowania DNA w komórkach *E. coli*, opartym na czynniku

F, są sztuczne chromosomy bakteryjne (BAC). Zrekombinowany plazmid z insertem o długości 100–300 kbp jest utrzymywany w niskiej liczbie kopii i może być wprowadzany do komórek *E. coli* przez elektroporację. Opracowano również sztuczne chromosomy bakteryjne oparte na bakteriofagu P1, zdolne do przenoszenia insertów o podobnej długości jak wektory BAC również wprowadzane do komórek przez elektroporację.

7. KOMPUTEROWA ANALIZA SEKWENCJI NUKLEOTYDOWEJ DNA

Automatyzacja i wzrastająca łatwość sekwencjonowania, stąd również wzrastająca w logarytmicznym postępie ilość danych o sekwencjach DNA, wymusza coraz sprawniejszą analizę uzyskiwanych wyników. Pojawia się konieczność szybkiego ewidencjonowania i analizy generowanych klonów, mutantów czy zrekonstruowanych genów. Wzrastająca na rynku liczba pakietów oprogramowania do analizy sekwencji DNA, jak GenQuest, GCG, DNASIS, Intelligenetics, Genepro, LaserGene i wiele innych, umożliwia stosunkowo łatwe ewidencjonowanie i analizę uzyskanych sekwencji oraz planowanie dalszych eksperymentów. Większość z takich pakietów pozwala na porównywanie i składanie sekwencji, wyszukiwanie określonych motywów, jak miejsca restrykcyjne, sekwencje promotorowe, potencjalne miejsca wiązania białek czy proste lub odwrócone powtórzenia, tłumaczenie uzyskanych sekwencji na RNA, wyszukiwanie potencjalnych intronów czy przewidywanie struktur II-rzędowych oraz miejsc zszywania eksonów w przypadku sekwencji cDNA. Funkcje wyszukiwania otwartych ramek odczytu i translacji otrzymanej sekwencji DNA oraz analizy przypuszczalnej sekwencji aminokwasowej, znacznie ułatwiają planowanie eksperymentów związanych z badaniem struktury i funkcji kodowanego białka. Wysoka cena oprogramowania wymusza jednak na słabiej rozwiniętych pracowniach korzystanie z programów i baz danych dostępnych w sieci Internet. Poniżej przedstawiono krótką, przykładową listę internetowych baz danych sekwencyjnych i programów pozwalających na wykonanie prostych porównań i analizy uzyskiwanych sekwencji DNA.

Bazy danych dotyczące sekwencjonowania genomów i już uzyskanych pełnych sekwencji:

TIGR: <http://www.tigr.org/tdb/tdb.html>

MIPS: <http://speedy.mips.biochem.mpg.de/mips/yeast/>

HUGO: http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/

Drosophila: <http://www.fruitfly.berkeley.edu/BDGP/genomic-info.html>

Sekwencje genomów prokariotów

TIGR: <http://www.tigr.org/tdb/tdb.html>

Pełne sekwencje genomów organelowych:

Mitochondria:

gopher://megasun.bch.umontreal.ca:70/11/Organelles/Genomes/mitochondria

Chloroplasty:

gopher://megasun.bch.umontreal.ca:70/11/Organelles/Genomes/plastids

Plazmidy mitochondrialne:

gopher://megasun.bch.umontreal.ca:70/11/Organelles/Genomes/plasmids

Lista i znanych sekwencji DNA, RNA i białek wybranego gatunku:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html>

Bazy danych sekwencji określonych cząsteczek:

5S rRNA i 5S rDNA: <http://rose.man.poznan.pl/5SData/5SRNA.html>

Rybonukleaza P: <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/RNaseP/home.html>

RDP – Ribosomal Database Project – <http://rdpwww.life.uiuc.edu/>

Rybosomalne RNA dużej podjednostki – <http://rrna.uia.ac.be/lsu>

Rybosomalne RNA małej podjednostki – <http://rrna.uia.ac.be/ssu>

Analiza uzyskanej sekwencji DNA w internecie:

Wyszukiwanie miejsc restrykcyjnych: <http://www.ccsi.com/firstmarket/cutter/>

Porównanie otrzymanej sekwencji ze znanymi sekwencjami wszystkich lub wybranych grup taksonomicznych: <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>

Szukanie ORF, tłumaczenie na sekwencję aminokwasów, z wyborem kodu genetycznego (standardowy i Candida): <http://alces.med.umn.edu/cuse.html>

Porównanie otrzymanej sekwencji aminokwasowej ze znanymi sekwencjami białek i wydedukowanymi na podstawie sekwencji cDNA:

<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/ppDoPred.html>

Wyszukiwanie określonych motywów w obrębie sekwencji nukleotydowej, np.: promotorów RNA polimerazy II i miejsc inicjacji transkrypcji, potencjalnych eks-onów, miejsc składania: <http://genomic.sanger.ac.uk/gf.html>

Wyszukiwanie promotorów RNA polimerazy II:

<http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/proscan/>

LITERATURA

- [1] ADAMCZYK JJ. Treatment of PCR products with shrimp alkaline phosphatase and exonuclease I: a reliable and fast method for obtaining DNA suitable for manual sequencing. *Editorial Comments* 1995; **22**: 36–49 (Amersham Life Sciences)
- [2] AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMANN JG, SMITH JA, STRUHL K. Current protocols in Molecular Biology, 6.4.1. –6.4.10, John Wiley & Sons, Inc. 1987.
- [3] BARNES WM. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* 1992; **112**: 29–35.
- [4] BARREL BG, ANDERSON S, BANKIER AT, DE BRUJIN MHL, CHEN A, COULSON AR, DROUIN J, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHREIER PH, SMITH JH, STADEN R, YOUNG YG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; **290**: 457–465.
- [5] BERG P, FANCHER H, CHAMBERLIN M. Informational macromolecules. Academic Press, New York, 1963; pp. 467–483.
- [6] BILLETER MA, DAHLBERG JE, GOODMA NHM, HINDLEY J, WIESSMANN C. Sequence of the first 175 nucleotides from the 5' terminus of Qbeta RNA synthesized *in vitro*. *Nature* 1969; **224**: 1083–1086.
- [7] BLANCO L, BERNARD A, BLASKO MA, SALAS M. A general structure for DNA – dependent DNA polymerases. *Gene* 1991; **100**: 27–38.
- [8] CHIEN A, EDGAR DB, TRELA JM. *J Bacteriol* 1976; **127**: 1550.
- [9] FAWCET TW, BARTLETT SG. An effective method for eliminating "artifact banding" when sequencing double-stranded DNA templates. *Biotechniques* 1990; **9**: 46–49.
- [10] FRASER CM et al. The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 1995; **270**: 397–403.
- [11] GELFI C, CANALI A, RIGHETTI PC, SMITH C, MELLON M, JAIN T, SHORR R. DNA sequencing in HydroLink matrices : extension of reading ability to 600 nucleotides. *Electrophoresis* 1990; **11**: 595–600.
- [12] GOMER R, FIRTEL R. Sequencing homopolymer regions. *Bethesda Res Lab Focus* 1985; **7**: 6.
- [13] [gopher://megasun.bch.umontreal.ca:70/11/Organelles/Genomes/mitochondria](http://megasun.bch.umontreal.ca:70/11/Organelles/Genomes/mitochondria)
- [14] [gopher://megasun.bch.umontreal.ca:70/11/Organelles/Genomes/plasmids](http://megasun.bch.umontreal.ca:70/11/Organelles/Genomes/plasmids)
- [15] HANI J., FELDMAN H. tRNA Genes and Retroelements in the Yeast Genome. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 689–696.
- [16] HOLLEY RW, APGAR J, EVERETT GA, MADISON JT, MARQUISEE M, MERRILL SH, PENSWICK JR, ZAMIR A. Structure of a Ribonucleic Acid. *Science* 1965; **146**: 1462–1465.
- [17] http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/
- [18] <http://www.tigr.org/tdb.html>
- [19] HUBER HE, RUSSEL M, MODEL P, RICHARDSON CC. *J Biol Chem* 1986; **261**: 15006–15012.
- [20] INNIS M, MYAMBO K, GELFAND D, BROWN M. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9436–9440.
- [21] IOANNOU PA, AMEMIYA CT, GARNES J, KROISEL PM, SHIZUYA H, CHEN C, BATZER MA, DE JONG PJ. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* 1994; Jan; **6**(1): 84–89.
- [22] JACOBSEN H, KLENOW M, OVARGAAARD-HANSEN. The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur J Biochem* 1974; **45**: 623–627.

- [23] JOYCE CM, GRINDLEY NDF. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 1830–1834.
- [24] KLENOW M, HENNINGSEN J. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; **65**: 168–175.
- [25] KLIGER C, PAABO S. Direct DNA sequence determination from total genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 2032–2034.
- [26] LAWEYER FC, STOFFEL S, SAIKI RK, CHANG SY, LANDRE PA, ABRAMSON RD, GELFAND DH. High-level expression, purification and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl* 1993; **2**: 274–287
- [27] LEE JS. Alternative dideoxy sequencing of double -stranded DNA by cyclic reactions using Taq polymerase DNA. *Cell Biol* 1991; **1**: 67–73; *Curr Prot In Mol Biol*.
- [28] MAXAM A, GILBERT W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1977; **74**: 560–564.
- [29] MAXAM A, GILBERT W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* 1980; **65**: 499–560.
- [30] MESSING J. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymol* 1984; **101**:
- [31] MONACO AP, LARIN Z. YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *TIBTECH* 1994; **12**: 280–286.
- [32] MURRAY A, SZOSTAK J. Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* 1983; **305**: 189–193.
- [33] MURRAY V. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 8889.
- [34] ONG WC, IBRAHIM M, TOWN M, JOHNSON JD. Functional differences among the six *Saccharomyces cerevisiae* tRNA Trp genes. *Yeast* 1997; **14**: 1357–1362.
- [35] PERCUDANI R, PAVESI A, OTTONELLO S. Transfer RNA gene redundancy and translational selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 1997; **268**: 322–330.
- [36] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual; 2nd edn. CSHL Press 1989;
- [37] SANGER F. Determination of Nucleotide Sequences in DNA. *Science* 1981; **214**: 1205–1210.
- [38] SANGER F, AIR GM, BARREL BG, BROWN NL, FIDDES JC, HUTCHINSON CA, SLOCOMBE PM, SMITH M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977; **265**: 687–695.
- [39] SANGER F, COULSON AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; **94**: 441–448.
- [40] SHIBA K, MOTEGI H, SCHIMMEL P. Maintaining Genetic Code Through Adaptations of tRNA Synthetases to Taxonomic Domains. *TIBS* 1997; **22**: 453–457.
- [41] SHIZUYA H, BIRREN B, KIM UJ, MANCINO V, SLEPAK T, TACHIIRI Y, SIMON M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8794–8797.
- [42] SMITH V, CHEE M. A simple method for sequencing the complementary strand of ssDNA from M13 clones. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 6957.
- [43] STAMBAUGH H, BLAKESLEY R. Extended DNA sequencing with Klenow fragment: The kilobase sequencing™ system. *Bethesda Res Lab Focus* 1988; **10**: 29.
- [44] STERNBERG N. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 103–107.
- [45] TABOR S, RICHARDSON CC. DNA Sequence Analysis With a Modified Bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 4767–4771.

- [46] TABOR S, RICHARSON CC. Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4076–4080.
- [47] TABOR S, RICHARSON CC. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA Polymerase. *J Biol Chem* 1990; **265**: 8322–8328.
- [48] TABOR S, RICHARSON CC. A single residue in DNA polymerases of the *E. coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 6339–6343.
- [49] TABOR S, RICHARDSON CC. Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by *in vitro* mutagenesis. *J Biol Chem* 1989; **264**(11): 6447–6458.
- [50] TABOR S, RICHARDSON CC. Selective Oxidation of the Exonuclease Domain of Bacteriophage T7 DNA Polymerase. *J Biol Chem* 1987; **262**: 15330–15333.
- [51] YANISH-PERON C, VIEIRA J, MESSING J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985; **33**: 103–119.

ANALOGI OLIGONUKLEOTYDÓW W TERAPII ANTYSENSOWEJ

OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES ADDRESSED FOR ANTISENSE THERAPY

Adam KRASZEWSKI, Barbara IMIOŁCZYK

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

Streszczenie: W pracy opisano kilka wybranych typów analogów oligonukleotydów adresowanych do tzw. terapii antysensowej. W skrócie omówiono te właściwości chemiczne i biologiczne, które decydowały o wyborze tych analogów jako potencjalnych chemoterapeutyków.

Słowa kluczowe: oligonukleotydy, analogi oligonukleotydów, oligonukleotydy antysensowe, terapia antysensowa

Summary: Several types of oligonucleotide analogues addressed for antisense therapy are presented. Their chemical and biological properties which favour those compounds as a potential drugs in chemotherapy are briefly described and discussed.

Key words: oligonucleotides, oligonucleotide analogues, antisense oligonucleotides, antisense therapy.

Niezwykle dynamiczny rozwój biologii molekularnej w ostatnich dziesięcioleciach pozwolił na poznanie na poziomie molekularnym mechanizmów związanych z podstawowymi procesami zachodzącymi w materii żywej. Dotyczy to między innymi procesów replikacji, biosyntezy biologicznie czynnych makromolekuł oraz wielu przemian metabolicznych zachodzących w komórkach zarówno prokariotów, jak i eukariotów. Jedną z ważniejszych dla medycyny implikacji tego faktu jest możliwość projektowania bio-leków, których wybór i działanie oparte jest na racjonalnych przesłankach w przeciwieństwie do podejść klasycznych, w których leki często dobierano metodą „prób i błędów”. Jednym z typowych przykładów leków nowej generacji mogą być analogi nukleozydów, acyklowir lub AZT, które stosuje się do zwalczania wirusów (HIV, HPV). Działanie tych leków polega na progra-

mowanym hamowaniu procesu replikacji, co uniemożliwia namnażanie mikroorganizmów. Niestety, większość wirusów okazała się odporna (lub uodporniła się) na te chemoterapeutyki.

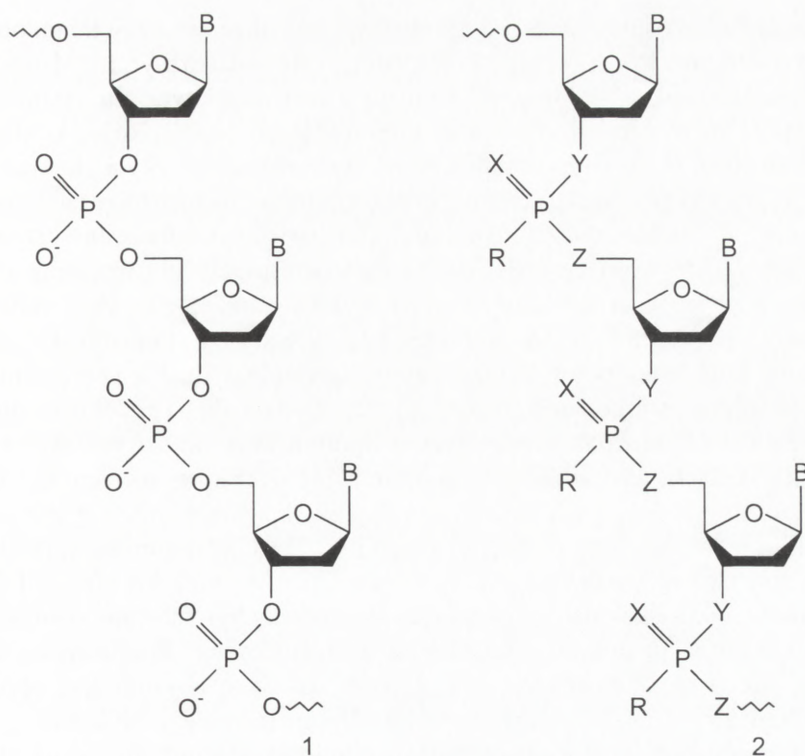
Zamecnik P. C. i Stephenson M. L. [14,15] pierwsi próbowali zastosować syntetyczne oligonukleotydy do inhibicji replikacji wirusa RSV. Zakładano, że syntetyczny oligonukleotyd (oligonukleotyd antysensowy) będzie tworzył na tyle trwałą hybrydę z RNA (lub w dalszych stadiach replikacji z DNA) wirusa, że zablokuje jego replikację. Wyniki eksperymentu *in vitro* zweryfikowały założenia jednoznacznie i pozytywnie. Jednakże szybko okazało się, że naturalne oligonukleotydy nie mogą być stosowane do celów terapeutycznych, ponieważ po wprowadzeniu do żywej komórki są one szybko rozkładane przez enzymy nukleolityczne, co znacznie ogranicza lub całkowicie wyklucza ich działanie w trakcie długotrwałej terapii. Zrozumienie tego faktu wyzwoliło niezwykle dynamiczne badania nad syntezą analogów oligonukleotydów, które byłyby dostatecznie trwałe w środowisku komórki i pozwoliłyby skutecznie oddziaływać z komplementarnymi sekwencjami DNA lub RNA. Antysensowy oligonukleotyd przeznaczony do celów terapeutycznych musi spełniać następujące warunki:

- powinien być możliwie trwały w środowisku komórki,
- powinien tworzyć z sekwencjami komplementarnymi hybrydy (dupleksy lub trypleksy) tak samo lub bardziej trwałe niż oligonukleotyd niemodyfikowany,
- antysensowy oligomer powinien możliwie łatwo wnikać do komórki,
- antysensowy analog oligonukleotydu lub jego metabolity nie mogą być toksyczne.

Ze względu na fakt, że w tworzenie hybrydu DNA-DNA czy DNA-RNA bezpośrednio zaangażowane są zasady azotowe, prace nad otrzymywaniem odpowiednich analogów antysensowych koncentrują się na modyfikacjach reszt cukrowych lub fosforanowych oligonukleotydów a także takich, w których resztę fosforanową zastąpiono pochodną zawierającą szkielet węglowy lub krzemowy. W niniejszym przeglądzie omówiono tylko te analogi oligonukleotydów (schemat 1), nad którymi prace syntetyczne i badania biologiczne są najbardziej zaawansowane.

TIO- I DITIOFOSFORANOWE ANALOGI OLIGONUKLEOTYDÓW 2a i 2b

W kontekście kryteriów „idealnego” antysensowego oligonukleotydu, wybór tiofosforowych analogów nie był przypadkowy. Chodzi o to, że w układzie okresowym w grupie VI siarka jest pierwiastkiem najbliższym tlenowi. Przypuszczano więc, że wprowadzenie atomu siarki w miejsce tlenu do reszty fosforanowej nie spowoduje



- 2a, $R = O^-$, $Y = Z = O$, $X = S$
 2b, $Y = Z = O$, $X = S$, $R = S^-$
 2c, $X = Y = Z = O$, $R = BH_3^-$
 2d, $R = X = Z = O$, $Y = N$
 2e, $X = Y = Z = O$, $R = CH_3$
 2f, $X = Y = Z = O$, $R = OC_2H_5$
 2g, $X = Y = Z = O$, $R = NR_1R_2$
 2h, $X = Y = Z = O$, $R = NH(CH_2)_nNH_3^+$

RYSUNEK 1. Antysensowe analogi oligonukleotydów

znaczących zmian właściwości fizykochemicznych analogów typu **2a** w porównaniu z oligonukleotydami niemodyfikowanymi typu **1**. Jednocześnie zakładano, że podstawienie siarki w miejsce tlenu na tyle zmieni właściwości substratów oligomerów tio- lub ditiofosforanowych, że nie będą one hydrolizowane przez komórkowe nukleazy.

Jak dotąd, tio- i ditiofosforanowe analogi oligonukleotydów otrzymywane są głównie w drodze chemicznej syntezy, która po okresie kilkunastoletnich prac metodycznych oferuje efektywne metody syntezy tiofosforanowych analogów [6,10,11,13]

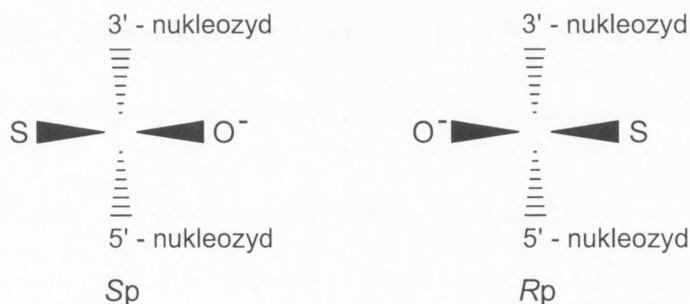
zapewniające ich stosunkowo łatwą dostępność. Jednakże, ze względu na obecność chiralnego centrum fosforowego związanego z czterema różnymi podstawnikami (O, S, 3'-nukleozyd, 5'-nukleozyd), tiofosforowe analogi typu **2a** są mieszaniną 2^n diastereoizomerów (n = liczba wiązań internukleotydydowych). Różna konfiguracja na atomie fosforu nie zmienia zasadniczo właściwości chemicznych, natomiast stereoizomery *Rp* i *Sp* (schemat 2) cechuje różna odporność na hydrolizę enzymatyczną [12]. I tak 3'-5' dinukleozydo tiofosforan *Rp* jest łatwo hydrolizowany przez fosfodiesterazę z jadu węża (svPDE), ale nie jest substratem dla nukleazy P1. Stereoizomer o przeciwnej konfiguracji (*Sp*) wykazuje przeciwstawne właściwości substratowe i jest hydrolizowany nukleazą P1, a nie svPDE. Ponadto stwierdzono, że trwałość dupletu *Sp*-tiofosforanowego oligonukleotydu i komplementarnego niemodyfikowanego oligomeru jest znacząco różna od trwałości podobnego dupletu utworzonego z oligomerem zawierającym ugrupowania tiofosforanowe o konfiguracji *Rp*. Badania prowadzone na komplementarnych oligomerach T₁₂ i A₁₂ i ich tiofosforowych analogach ukazały, że duplet *Sp*-d(Aps)₁₁A/T₁₂ jest bardziej stabilny ($T_m = 34^\circ\text{C}$) niż *Rp*-d(Aps)₁₁A/T₁₂ ($T_m = 29^\circ\text{C}$). Natomiast, w przypadku, gdy duplety tworzyły odpowiednio *Sp*-(Tps)₁₁T i dA₁₂ oraz *Rp*-(Tps)₁₁T i dA₁₂, otrzymano wynik zaskakujący, gdyż ten drugi duplet był znacznie trwalszy [12]. Zgodnie z informacją autorów, prace nad wyjaśnieniem tego fenomenu są w toku. Jednakże, już w tym momencie jest oczywiste, że po to aby uzyskać optymalny efekt biologiczny działania antysensownego oligomeru, należy stosować tiofosforanowe oligonukleotydy o jednoznacznie zdefiniowanej konfiguracji na atomach fosforu.

Jak dotąd znana jest tylko jedna, niedawno opracowana przez W. J. Steca i wsp., [11] metoda stereokontrolowanej chemicznej syntezy PS-oligonukleotydów, która jest na tyle efektywna, że może być z powodzeniem stosowana w automatycznych syntetyzerach. Dostępność PS-analogów oligonukleotydów umożliwiła badania *in vitro*, a także w systemach komórkowych, w których stwierdzono, że

- (i) tworzą one hybrydy równie lub bardziej trwałe niż oligomery niemodyfikowane,
- (ii) odznaczają się znaczną odpornością na nukleazy komórkowe,
- (iii) w duplesie PS-oligo/RNA aktywują komórkową RNazę H,
- (iv) stosunkowo łatwo ulegają internalizacji i mogą docierać do celów wewnątrz komórki,
- (v) stosowane w stężeniach zapewniających efekt biologiczny nie są toksyczne.

Tak więc, tiofosforanowe analogi oligonukleotydów typu **2a** wydają się spełniać podstawowe kryteria potencjalnych leków antysensownych.

Otrzymywane wyłącznie w drodze chemicznej syntezy ditiofosforanowe analogi oligonukleotydów (PS₂-oligo) typu **2b** mają nieco inne właściwości. Centra fosforanowe są achiralne, a obecność dwóch atomów siarki w pozycjach niemostrkowych czyni związki te całkowicie odporne na działanie svPDE i nukleazy P1 [2]. Dość nieoczekiwanie PS₂-oligonukleotydy są stosunkowo łatwo (porównywalnie

RYSUNEK 2. *Sp* i *Rp* stereoisomery 3'-5' dinukleozydo tiofosforanu

jak oligonukleotydy niemodyfikowane typu **1**) hydrolizowane przez niektóre egzonukleazy (np. DNaza I) i są nietrwałe w ekstraktach komórkowych (zarówno cytoplazmatycznych, jak i jądrowych). W porównaniu z PO- czy PS-oligonukleotydami analogi PS₂ tworzą z DNA i RNA hybrydy wyraźnie słabsze i z mniejszą specyficnością, co być może tłumaczy także słabszą aktywację RNazy H (zarówno *E. coli*, jak i człowieka). Przy okazji badań nad PS₂-oligonukleotydami dość często porusza się nie wyjaśnioną sprawę wiązania przez nie jonów metali, który to kompleks może być źródłem toksyczności w systemach komórkowych. Podsumowując powyższe można wnioskować, że wbrew oczekiwaniom, PS₂-oligonukleotydy typu **2b** nie mają właściwości, które wyróżniałyby te analogi jako potencjalne leki antysensowe.

BORANOFOSFORANY OLIGONUKLEOTYDÓW **2c**

Stosunkowo niedawno opracowano metodę syntezy innego typu polianionowych analogów oligonukleotydów – boranofosforanów oligonukleotydów (**2c**) [9], które to analogi wydają się być bardzo obiecujące w strategii antysensowej [10]. Boranofosforanowe oligonukleotydy otrzymano przez zastąpienie ujemnego atomu tlenu reszty fosforanowej grupą BH₃⁻. Analogi **2c** są szczególnie trwale chemicznie (w środowisku zasadowym i kwaśnym) i jednocześnie są odporne na działanie nukleaz. Ponadto, 5'-trifosforany deoksynukleozydów, w których reszta α-fosforanowa zastąpiona jest boranofosforanową, okazały się dobrymi substratami T7 polimerazy DNA, co umożliwi enzymatyczną syntezę modyfikowanych oligonukleotydów typu **2c** o znacznej, nieosiągalnej metodami chemicznymi długości. Badania nad boranofosforanami oligonukleotydów są w toku (sprawa chiralności, trwałość hybrydów itd.) i w niedługim czasie należy spodziewać się dalszych wyników, które pozwolą określić zakres ich zastosowań w terapii antysensowej.

N3'→P5' FOSFOROAMIDY OLIGONUKLEOTYDÓW **2d**

Innym typem polianionowych antysensowych analogów to tzw. N3'-P5' fosforoamidowe oligonukleotydy **2d**, w których atom tlenu wiązania 3'-fosforoestrowego zastąpiono atomem azotu [3,4]. Takie achiralne analogi są trwałe w warunkach fizjologicznych i jednocześnie wykazują znaczną odporność na nukleazy. W eksperymentach hybrydyzacyjnych dowiedziono, że w porównaniu z oligonukleotydami niemodyfikowanymi **1**, oligomery **2d** tworzą znacznie trwalsze dupleksy z DNA, a szczególnie z RNA (dla 12-meru **2d**/DNA T_m była o 11,7°C, a dla 12-meru **2d**/RNA T_m o 22,9°C wyższa niż dla analogicznych dupleksów z 12-merem typu **1**). W odróżnieniu od natywnych oligomerów, N3'-P5' oligonukleotydy typu **2d** o tej samej długości i sekwencji tworzą trwałe trypleksy z dwuniciowym DNA (dla dekameru T_m 32°C, w tych samych warunkach dekamer niemodyfikowany nie tworzy struktur trójniciowych). Te wyniki wskazują, że N3'-P5' oligonukleotydy typu **2d** mogą znaleźć zastosowania w terapii antysensowej jako inhibitory zarówno transkrypcji, jak i translacji. Mając na uwadze intensywność prowadzonych badań, także i w tym przypadku należy oczekiwać szybkiej weryfikacji aplikacji terapeutycznych N3'-P5' analogów oligonukleotydów.

P-METYLOWE (METANOFOSFORANOWE) OLIGONUKLEOTYDY **2e**

Następnym typem antysensowych oligonukleotydów to P-metylowe (metanofosforanowe) analogi **2e**, w których ujemny atom tlenu reszty fosforanowej zastąpiono obojętną grupą alkilową [7,8]. W efekcie P-metylo oligomer **2e**, w przeciwieństwie do polianionowych oligomerów **1** czy **2a-d**, jest cząsteczką obojętną. Podobnie jak analogi PS typu **2a** czy boranofosforany **2c**, P-metylo oligonukleotydy zawierają chiralne centra fosforowe, co determinuje ich właściwości. P-Metylo oligomery *Rp/Sp* jako produkty niekontrolowanej stereochemicznie syntezy wiążą się słabiej z komplementarnym DNA czy RNA w porównaniu z oligomerami niemodyfikowanymi typu **1**. Z kolei czyste P-metylo stereoisomery *Rp* tworzą silniejsze hybrydy z DNA niż te o konfiguracji *Sp*. Dlatego też, z tych samych powodów jak w przypadku chiralnych antysensowych oligonukleotydów typu **2a**, także w laboratorium W. J. Steca i wsp., [6] opracowano metodę stereokontrolowanej syntezy oligomerów typu **2e**, co jak można przypuszczać, umożliwi ocenę zastosowań P-metylo oligonukleotydów jako potencjalnych leków antysensowych.

Analogi **2e** są odporne na działanie egzo- i endonukleaz komórkowych, ale w kompleksie RNA/**2e** nie aktywują RNazy H, co w zasadzie wyklucza ich stosowanie jako inhibitorów translacji lub replikacji wirusów RNA. Ten ostatni problem roz-

wiązано przez zastosowanie hybrydowego oligonukleotydu, w którym 3' i 5' periferyjne jednostki nukleotydowe są P-metylowane (ochrona przed nukleazami), natomiast centralne zawierają reszty fosforanowe. Dopiero taki, częściowo modyfikowany oligomer tworzy z RNA dupleks aktywujący RNazę H. Wydaje się więc, że odpowiednio przygotowane metanofosforowe oligomery typu **2e** mogą spełniać kryteria stawiane oligonukleotydom antysensowym.

FOSFOROTRIESTRÓWE ANALOGI OLIGONUKLEOTYDÓW **2f**

Innym typem obojętnych oligonukleotydów to oligomery **2f** z internukleotydowymi resztami metylo- lub etylofosfortriestrowymi [8]. Więcej uwagi poświęcono analogom etylowym, gdyż pochodne metylowe okazały się w warunkach fizjologicznych nietrwałe. Fosfortriestrowe oligonukleotydy **2f** są odporne na nukleazy i tworzą trwałe (trwalsze niż oligomery niemodyfikowane typu **1**) kompleksy z DNA i RNA. Jednym z czynników ograniczających ich potencjalne zastosowania to stosunkowo słaba rozpuszczalność w wodzie związana z lipofilowym charakterem alkilowych fosfortriestrow. To ostatnie oraz jak dotąd fragmentarycznie rozeznane problemy związane z chiralnością centrów fosforowych ugrupowań fosfortriestrowych, nie pozwalają na pełną ocenę przydatności analogów oligonukleotydów typu **2f** w terapii antysensowej.

FOSFORANOAMIDY OLIGONUKLEOTYDÓW **2g**

Fosforoamidy oligonukleotydów typu **2g**, w których w miejsce reszt fosforanowych występują ugrupowania fosforoamidowe, są następnym przykładem obojętnych antysensowych analogów. Decydujące o ich właściwościach wiązanie P-N, występuje w pozycjach niemostrkowych z zachowaniem naturalnego wiązania 3'-5' fosfordiestrowego [8,10]. Obecność wiązania fosforoamidowego czyni analogi **2g** całkowicie odporne na działanie komórkowych nukleaz i dostatecznie trwale chemicznie w warunkach fizjologicznych. Pośród badanych pochodnych, najbardziej odpowiadające kryteriom oligonukleotydów antysensowych okazały się analogi niosące reszty morfolino- lub metoksyetylenofosforoamidowe, gdyż w systemach komórkowych (embryony *Xenopus laevis*) nawet przy długotrwałych eksperymentach zachowywały niezmienną strukturę. Fosforoamidy oligonukleotydów typu **2g** w porównaniu z oligomerami natywnymi tworzą słabsze dupleksy (zarówno z DNA, jak i RNA) i hybryd antysensowy oligo/RNA nie aktywuje komórkowej RNazy

H. Niewątpliwie ich ciekawą właściwością jest tworzenie nadspodziewanie trwałych trypleksów z dwuniciowym DNA. To ostatnie wyróżnia analogi oligonukleotydów **2g** jako obiekty badań nad inhibicją ekspresji genów na poziomie transkrypcji. Właściwości analogów typu **2g** w zależności od chiralności atomów fosforu nie są do końca rozpracowane, jednakże dotychczasowe wyniki wyraźnie wskazują, że trwałość dupleksów oligo/DNA czy RNA zależy od konfiguracji na atomach fosforu. Tak więc i w tym przypadku opracowanie metod efektywnej, stereokontrolowanej syntezy może okazać się konieczne.

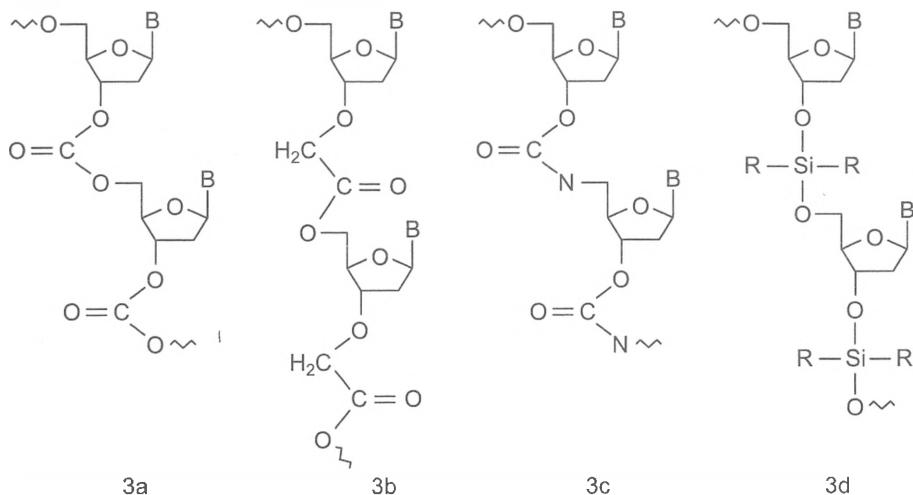
POLIKATIONOWE FOSFORANOAMIDY OLIGONUKLEOTYDÓW **2h**

Pośród fosforoamidowych oligonukleotydów ciekawą grupę stanowią analogi aminoalkilofosforoamidowe **2h**[1,5]. W przeciwieństwie do omawianych powyżej anionowych czy obojętnych oligomerów, pochodne typu **2h** są w warunkach fizjologicznych polikationami, co determinuje ich właściwości chemiczne i biologiczne. Polikationowe oligonukleotydy **2h** w oddziaływaniach z polianionowymi naturalnymi oligomerami tworzą trwalsze dwu- lub trójniciowe kompleksy antysens-oligo/DNA lub RNA czy antysens-oligo/dupleks DNA w porównaniu z oligomerami natywnymi lub innymi analogami oligonukleotydów. Także i w tym przypadku trwałość hybrydowych dupleksów silnie zależała od konfiguracji centrów fosforowych. Jeden (nie zdefiniowany) stereoizomer i co ważne także ich mieszanina tworzyły w komplementarnym DNA o wiele trwalsze dupleksy w porównaniu z oligonukleotydem niemodyfikowanym (T_m odpowiednio 58°C i 40°C vs 22°C). Jest to o tyle ważne, że w przypadku jeśli mieszanina stereoizomerów wywoła zamierzony skutek fizjologiczny, to stereokontrolowana synteza analogów **2g** nie będzie konieczna, co może znacznie uprościć sprawę ich dostępności.

ANTYSENSOWE ANALOGI OLIGONUKLEOTYDÓW NIE ZAWIERAJĄCE SZKIELETU FOSFORANOWEGO **3a-d**

Odrębną grupę antyenesowych oligonukleotydów stanowią analogi **3a-d** nie mające szkieletu fosforanowego [8].

Wiodącym dla tych analogów było założenie, że będą one całkowicie odporne na nukleazy komórkowe, a ponadto wprowadzenie innych reszt w miejsce fosforanowych spowoduje zmiany w strukturze oligomeru, które nie zaburzą procesu hybrydyzacji. Już w pierwszej fazie prac nad tymi związkami natrafiono na spore



RYSUNEK 3. Antysensowe analogi oligonukleotydów nie zawierające reszt fosforanowych

trudności związane z ich otrzymaniem, a także trwałością zarówno w trakcie syntezy, jak i w późniejszych testach biologicznych. Innym poważnym mankamentem to fakt wynikający z niejonowego, lipofilowego charakteru niesfosforowych analogów **3a-d**. Chodzi o to, że z wyjątkiem analogów karboamidowych **3c** związki te są bardzo słabo rozpuszczalne w roztworach wodnych, co praktycznie uniemożliwiało zbadanie ich właściwości biologicznych tzn. odporności na nukleazy czy oddziaływań z sekwencjami komplementarnymi w testach hybrydazyjnych. Pomimo tych trudności analogi typu **3** są i z pewnością będą obiektem dalszych badań, gdyż jest wielce prawdopodobne, że prace te dostarczą nowych pochodnych, które spełnią kryteria stawiane antysensowym oligonukleotydów.

INTERNALIZACJA ANTYSENSOWYCH OLIGONUKLEOTYDÓW

Z aplikacjami antysensowych oligonukleotydów wiąże się problem transfekcji i kontroli stężenia oligomeru w komórce. Tiofosforanowe typu **2a-b** i P-alkilofosfonianowe typu **2e** analogi oligonukleotydów wnikają do komórek według różnych mechanizmów. Anionowe oligonukleotydy tiofosforanowe przenoszone są ze środowiska do komórek przez oddziaływanie z jak dotąd, niezbyt precyzyjnie określonymi receptorami błonowymi. Natomiast obojętne oligonukleotydy z resztami P-alkilofosfonianowymi dyfundują do komórek do momentu wyrównania stężeń oligomeru w komórce i w medium hodowlanym. Szczególnie w przypadku P-alkil-

kilowych analogów, trudno jest wyobrazić sobie możliwość kontroli stężenia antysensownego oligonukleotydu w komórkach, zakładając, że zostaje on podany przez iniekcję do krwi. Z pewną dozą ryzyka można przyjąć, że każdy z powyższych mechanizmów internalizacji oligonukleotydów antysensownych jest reprezentatywny dla oligomerów polianionowych typu **2a-d** (kontrolowana endocytoza z udziałem receptorów błonowych) lub dla obojętnych typu **2e-g** (niekontrolowana dyfuzja). Protonowane w warunkach fizjologicznych aminoalkilowe oligonukleotydy typu **2h** są przykładem racjonalnie zaplanowanej struktury w kontekście internalizacji. Zakłada się, że polikationowy oligomer w oddziaływaniach z ujemnie naładowaną błoną komórkową ułatwia inicjację procesu internalizacji. Na drugim etapie transportu do komórki, lipofilowym łańcuchom alkilowym reszt aminolakilowych przypisuje się korzystne oddziaływania z także lipofilowymi strukturami błonowymi, co może sprzyjać integracji i transportowi oligonukleotydu przez błonę komórkową. Tak więc, elementy struktury kationowych antysensownych analogów oligonukleotydów typu **2h** mają spełniać dwojaką rolę – ułatwić jego internalizację oraz dotrzeć do celu i osiągnąć skutek fizjologiczny. Te, jak dotąd tylko częściowo potwierdzone doświadczenia, założenia wpływu elementów struktury antysensownego oligomeru na efektywność działania odróżniają kationowe oligonukleotydy typu **2h** od pozostałych.

UWAGI KOŃCOWE

Jak dotąd, nie udało się zaproponować typu antysensownych oligonukleotydów i metod ich otrzymywania, które w pełni spełniałyby wszystkie warunki stawiane chemoterapeutynom. Potrzeba takich badań jest dzisiaj tak samo aktualna jak w momencie opublikowania przez Zamecnika w 1978 r. pierwszych prac o inhibicji translacji RNA wirusa RSV syntetycznymi oligodeoksynukleotydami. O randze sprawy niech świadczy fakt, że oprócz wielu znakomitych placówek naukowych, zagadnieniem antysensownych oligonukleotydów zajmuje się także wiele dużych firm farmaceutycznych (ISIS, Lynx, Chiron) desygnując na badania bardzo duże środki finansowe. Bez większego ryzyka można założyć, że tak znaczna koncentracja wysiłków i środków przyniesie w krótkim czasie nową generację racjonalnie zaprojektowanych, skutecznych leków, nie bez racji określanych mianem leków XXI wieku.

LITERATURA

- [1] CHATURVEDI S, HORN T, LETSINGER RL. Stabilization of Triple-Stranded Oligonucleotide Complex: Use of Probes Containing Alternating Phosphotriester and Stereo-Uniform Cationic Phosphoramidate Linkages. *Nucl Acids Res* 1996; **24**(12): 2318–2323.
- [2] GHOSH MK, GHOSH K, DAHL O, COHEN JS. Evaluation of some properties of a phosphorodithioate oligonucleotide for antisense application. *Nucl Acids Res* 1993; **21**(24): 5761–5766.
- [3] GRYAZNOV S, CHEN J-K. Oligodeoxyribonucleotide N3'→5'P Phosphoramidates: Synthesis and Hybridization Properties. *J Am Chem Soc* 1994; **116**: 3143–3144.
- [4] GRYAZNOV S, SKORSKI T, CUCCO C, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, CHIU CY, CHEN J-K, KOZIOŁKIEWICZ M, CALABRETTA B. Oligonucleotide N3'→5'P phosphoramidates as antisense agents. *Nucl Acids Res* 1996; **24**(8): 1508–1514.
- [5] HORN T, CHATURVEDI S, BALASUBRAMANIAM TN, LETSINGER RL. Oligonucleotides with Alternating Anionic and Cationic Phosphoramidate Linkages: Synthesis and Hybridization of Stereo-uniform Isomers. *Tetrahedron Lett* 1996; **37**(6), 743–746.
- [6] LEŚNIKOWSKI ZJ. Stereocontrolled Synthesis of P-Chiral Analogues of Oligonucleotides. *Bioorg Chem* 1993; **21**: 127–155.
- [7] MILLER PS. Oligonucleotide Methylphosphonates as Antisense Reagents. *BioTechnology* 1991; **9**: 358–362.
- [8] MILLER PS. Non-ionic Antisense Oligonucleotides in Oligonucleotides. (W:) Cohen J S. (ed.) *Topics in Molecular Biology. Vol 12. Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*. London, The Macmillan Press Ltd. 1989: 79–95.
- [9] SOOD A, SHAW BR, SPIELVOGEL BF. Boron-containing Nucleic Acids. 2. Synthesis and oligodeoxynucleoside boranophosphates. *J Am Chem Soc* 1990; **112**: 9000–9001.
- [10] SPROAT BS. Chemistry and Applications of Oligonucleotide Analogues. *J Biotechnology* 1995; **41**: 221–238.
- [11] STEC WJ, GRAJKOWSKI A, KOZIOŁKIEWICZ M, UZNAŃSKI B. Novel Route to Oligo(deoxyribonucleoside phosphorothioates). Stereocontrolled Synthesis of P-chiral Oligo(deoxyribonucleoside Phosphorothioates). *Nucl Acids Res* 1991; **19**(21): 5883–5888.
- [12] STEC WJ, GUGA P. Perspectives for Medical Applications of Synthetic Oligonucleotides: Antisense Technology. *Biotechnologia* 1996; **4**(35): 91–107.
- [13] STEIN CA, COHEN JS. Phosphorothioate Oligonucleotide Analogues. (W:) Cohen JS. (ed.) *Topics in Molecular and Structural Biology. Vol 12. Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*. London, The Macmillan Press Ltd. 1989: 97–117.
- [14] ZAMECNIK PC, STEPHENSON ML. Inhibition of *Rous sarcoma* virus replication and cell transformation by a specific oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**(1): 280–284.
- [15] ZAMECNIK PC, STEPHENSON ML. Inhibition of *Rous sarcoma* viral RNA translation by a specific oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**(1): 285–288.

GENY SUPRESOROWE NOWOTWORÓW*

TUMOR SUPPRESSOR GENES

Andrzej PŁAWSKI¹, Ryszard SŁOMSKI^{1,2}

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań ; ² Katedra Biochemii i Biotechnologii
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: Nowotwór jest chorobą występującą w wyniku kumulacji mutacji, które promują komórkę w selekcji klonalnej. Wiele różnych genów związanych jest z inicjacją i progresją nowotworu. Jedną z najważniejszych grup tych genów stanowią geny supresorowe nowotworów. Charakteryzują się one zdolnością do hamowania fenotypu nowotworowego, jeśli prawidłowa sekwencja tego genu zostanie wprowadzona do stransformowanej linii komórkowej. Produkty białkowe genów supresorowych mogą inhibować rozwój nowotworu, a utrata funkcji w tych genach prowadzi do nowotworzenia. Około 1% wszystkich nowotworów rozwija się u osobników z wrodzonymi predyspozycjami. Ponad 20 różnych genów jest zawiązanych z określonymi zespołami predyspozycji do wystąpienia choroby nowotworowej. Większość tych genów to geny supresorowe nowotworów.

Słowa kluczowe: geny supresorowe nowotworów, mutacje, nowotwór, FAP, gen APC, gen ATM, gen RB1.

Summary: Cancer disease are caused by an accumulation of mutations that promote clonal selection of cell. Many different genes are involved in tumor initiation and progression. One most important group of these genes are tumor suppressor genes. Tumor suppressor genes are characterized by ability to inhibit malignant phenotype after incorporation of wild type gene by transformed cell line. The products of tumor suppressor genes inhibit stages of tumor progression and loss of function of these genes leads to malignancy. About 1% of all cancers arises in individuals with a hereditary cancer predisposition. Mutations in more than 20 different genes are involved in initiation defined inherited cancer syndromes. Most of genes have been identified as tumor suppressor genes.

Key words: tumor suppressor genes, cancer, FAP, APC gene, ATM gene, RB1 gene.

Zjawisko selekcji naturalnej można rozpatrywać na poziomie całych organizmów, jak i pojedynczych komórek. W wyniku selekcji naturalnej może dojść do dominacji

*Praca finansowana z grantu nr 4P05A 014 14.

organizmu lub określonej grupy komórek w środowisku. W wyniku selekcji niektóre organizmy mogą ulegać znacznej ekspansji przez eliminacje konkurencyjnych organizmów. Zjawisko to można zaobserwować zarówno u *Procarvota*, np. bakterii, które mogą osiągnąć przewagę w wyniku szybkiej proliferacji, jak również u *Eucaryota*, np. grzybów, gdzie podobny efekt może być uzyskany przez wydzielanie toksycznych metabolitów. U wyższych *Eucaryota* współdziałanie komórek w organizmie determinowane jest realizacją informacji genetycznej zawartej w poszczególnych komórkach. Współpraca komórek organizmu wielokomórkowego możliwa jest tylko wtedy, gdy nie powstają klony komórek zdolnych do ekspansji w środowisku, jakim w tym przypadku jest organizm. W końcowym efekcie rozrostu klonalnego może dojść do opanowania innych tkanek i śmierci organizmu. Również nowotwory można rozpatrywać w aspekcie naturalnej selekcji komórek somatycznych wynikającym z utraty przez komórkę zdolności do egzystowania jako część złożonego organizmu. Można założyć, że nowotwór jest nieuchronnym końcowym etapem rozwoju organizmu wielokomórkowego, który żyje wystarczająco długo i w którym ciągle dochodzi do podziałów komórek. W rozwoju ewolucyjnym organizmy wyższe wykształciły złożony wielopoziomowy system zabezpieczeń przed niekontrolowanym wzrostem, a tym samym powstrzymywania naturalnej tendencji komórek do ekspansji w środowisku. Obecnie dominuje pogląd, że jedną z kluczowych ról w tym systemie odgrywają geny supresorowe nowotworów, które zabezpieczają komórki przed przejściem w stan niekontrolowanej proliferacji. Również ograniczenie liczby podziałów komórek somatycznych zabezpiecza organizm przed wejściem w fazę nieśmiertelności, którą należy rozpatrywać jako stan patologiczny na poziomie komórek, jak i całego organizmu. Innym mechanizmem jest proces apoptozy, w trakcie której możliwe jest uruchomienie przez komórkę programu śmierci. Jest zatem przykładem bardzo rygorystycznego sposobu zmuszenia komórki do współpracy w układzie całego organizmu. Powstanie nowotworu warunkowane jest utratą funkcjonalności w kilku niezależnych systemach kontroli wzrostu. Częstość mutacji w organizmie człowieka wynosi 10^{-5} – 10^{-7} na gen na generację. Sądzi się, że dla rozwoju nowotworu inwazyjnego potrzeba 6 lub 7 mutacji. Szansa, że w pojedynczej komórce może dojść do spontanicznego wystąpienia jednocześnie kilku mutacji, jest bardzo niska tym bardziej, że wyspecjalizowane systemy naprawcze usuwają większość mutacji spontanicznych. Występowanie nowotworu może być spowodowane zwiększeniem proliferacji komórki, co spowoduje, że powstały klon może być bardziej podatny na kolejne mutacje naruszające stabilność genomu. Genami, które zaangażowane są w takie procesy, są zmutowane: protoonkogeny, geny supresorowe i geny mutatorowe.

ONKOGENY

Onkogeny stanowią grupę genów, których białkowe produkty zwiększają proliferację komórek. Heterozygotyczne mutacje tych genów z reguły prowadzą do zmiany fenotypu komórki. Zmutowane onkogeny są jednak bardzo rzadko dziedziczne, nie zmutowane ich odpowiedniki, protoonkogeny, pełnią w organizmach istotne funkcje, np. czynników wzrostu, receptorów powierzchniowych, komponentów systemów transdukcji sygnału, czynników transkrypcji, kinaz i inhibitorów kinaz. Uaktywnienie protoonkogenów cechuje się zmianą aktywności ich produktów, przy czym mogą to być zmiany ilościowe, tj. zwiększenie ilości niezmienionego produktu białkowego lub jakościowe i wtedy powstać mogą białka zmutowane o zmienionej funkcji, jak również białka chimeryczne powstałe w wyniku rearanżacji chromosomów. Duże znaczenie w aktywacji protoonkogenów przypisuje się wirusom, które same mogą zawierać onkogeny. Adenowirusy transformują komórki, jeśli wystąpiła nieprawidłowa integracja z genomem gospodarza lub doszło do infekcji organizmu niespecyficznego. Nie dochodzi wtedy do lizy komórki, lecz jej proliferacji w wyniku przeniesienia sygnału aktywacji transkrypcji lub replikacji do genomu gospodarza. Z kolei retrowirusy nie zawierające sekwencji onkogenu mają ograniczoną zdolność transformacji komórki, a w przypadku retrowirusów o ostrym działaniu onkogenym zauważyć można występowanie w ich genomie sekwencji onkogenów komórek eukariotycznych. Takie wirusy charakteryzują się wysoką wydajnością transformacji komórek gospodarza.

GENY MUTATOROWE

Drugą grupę genów o funkcji istotnej dla cyklu życiowego i stabilności genomu stanowią geny mutatorowe. Uszkodzenie tego rodzaju genów w przeciwieństwie do okogenów i genów supresorów nie prowadzi bezpośrednio do zwiększonej proliferacji lecz ich uszkodzenie wpływa na prawidłowość replikacji lub naprawy uszkodzeń DNA. Przykładem takiego genu jest gen *ATM* zlokalizowany na chromosomie 11. Gen ten zbudowany z 66 eksonów i obejmuje około 150 kbp genomowego DNA, przy czym dwa pierwsze eksony zaangażowane są w alternatywne składanie genu [2, 21]. Gen *ATM* odpowiedzialny jest za wystąpienie ataxii telangiectasji, która cechuje się: utratą koordynacji, powiększeniem naczyń krwionośnych, podwyższoną wrażliwością na promieniowanie jonizujące, obniżeniem odporności, obniżeniem poziomu IgA, IgG, IgM, zaburzeniami wzrostu, bezpłodnością i silnymi skłonnościami do powstawania nowotworów. Ryzyko wystąpienia nowotworu u heterozygot jest 6,1 razy większe niż w populacji, a ryzyko wystąpienia raka piersi u kobiet heterozygot pod względem mutacji tego genu jest 3,9 razy większe niż

w populacji ogólnej [13, 17]. W warunkach hodowli *in vitro* komórki AT charakteryzują się występowaniem złamań i translokacji chromosomów. Komórki te są bardzo wrażliwe na promieniowanie jonizujące i niezwykle odporne na zahamowanie syntezy DNA promieniowaniem jonizującym. Białko genu ATM należy do rodziny 3-kinaz fosfotydoinozytolu [5]. Główną funkcją przypisaną temu genowi jest aktywacja genu *TP53* i układu wymiany chromatyd siostrzanych [7]. Brak prawidłowego białka AT powoduje obniżenie poziomu białka p53 mimo uszkodzeń DNA i w ten sposób nie następuje zahamowanie cyklu komórkowego [9]. Nie zadziałanie punktu kontroli cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G1-S pomimo uszkodzeń DNA jest przyczyną powstawania nowotworu. Zaobserwowano, że częstość nowotworów wzrasta w przypadku, gdy mutacje współwystępują w genie *p53* [10]. Kolejną przyczyną powstawania nowotworów AT jest aktywacja onkogenów w wyniku złamań lub translokacji chromosomów, np. onkogen *TCL1*, który położony jest w regionie złamania chromosomu 14q32.3 i może być aktywowany w wyniku inwersji lub translokacji, ponieważ kolejny punkt złamania znajduje się w regionie 14q11.2, gdzie położona jest podjednostka alfa receptora antygeny komórek T, onkogen *TCL1* może być włączony pod promotor receptora antygeny komórek T [19].

GENY SUPRESOROWE NOWOTWORÓW

Charakterystyce genów supresorowych poświęca się wiele uwagi i literatura przynosi informacje o licznej grupie genów tworzących tę rodzinę. Za gen supresorowy uznaje się taki gen, który w warunkach doświadczalnych odpowiedzialny jest za hamowanie fenotypu nowotworowego. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że niektóre geny supresorowe pełnią ważną funkcję w kontaktowym hamowaniu proliferacji, a inne pełnią funkcje związane z kompleksową kontrolą cyklu komórkowego głównie jako jego inhibitory. Geny supresorowe należące do obydwu grup odgrywają zasadniczą rolę w utrzymywaniu liczby komórek na stałym poziomie i to zarówno o charakterze ilościowym, jak i jakościowym. Zaburzenia w tych mechanizmach z reguły prowadzą do zwiększenia częstości podziałów komórkowych, jak również obserwowany jest wzrost liczby błędów powstających podczas podziału. Powodzą to gromadzenia zmian w materiale genetycznym i wyselekcjonowania nieśmiertelnego klonu o bardzo częstych podziałach komórkowych i zdolnego zasiedlać inne tkanki. Geny supresorowe biorą udział zarówno w inicjacji klonu komórek nowotworowych, jak również w kolejnych fazach rozwoju nowotworu.

NOWOTWORY RODZINNE WARUNKOWANE DZIEDZICZNYMI MUTACJAMI W GENACH SUPRESOROWYCH

Mutacje genów supresorowych przekazywane potomstwu są przyczynami większości dziedzicznych form chorób nowotworowych. Mutacje te mają charakter recesywny, jednak u nosicieli zmutowanego allelu występuje wzrost predyspozycji do wystąpienia choroby nowotworowej. W tabeli 1 przedstawiono wybrane geny supresorowe i zespoły chorobowe warunkowane mutacjami w tych genach. Charakterystyczną cechą dla tej grupy nowotworów dziedzicznych jest tendencja do zachorowania w młodym wieku, wieloogniskowość i występowanie obustronne w narządach parzystych. Wprawdzie mutacje występują we wszystkich komórkach organizmu jednak obserwuje się tkankowo specyficzne występowanie nowotworów. Spowodowane jest to pełnieniem funkcji w procesie kontroli proliferacji w tych tkankach. Według Knudsona dla inicjacji zmiany komórki normalnej w komórkę nowotworową potrzebne są dwie mutacje w obrębie tego samego locus [11]. Prawdopodobieństwo wystąpienia pojedynczej mutacji wynosi 10^{-5} . W przypadku wystąpienia sporadycznego nowotworu dla spełnienia postulatów Knudsona dwie mutacje mogą wystąpić w tym samym locii w 1 komórce raz na 10^{10} , natomiast w przypadku odziedziczonego jednego zmutowanego allelu genu supresorowego mutacja w drugim allelu wystąpi z częstością 1 na 10^5 . Utrata heterozygotyczności w genie supresorowym jest pierwszym etapem zwiększenia proliferacji komórek. Najlepiej poznanym przykładem mutacji genu supresorowego jest rodzinna polipowatość jelita grubego, która warunkowana jest utratą heterozygotyczności w genie supresorowym *APC* (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*). Z kolei uszkodzenie genu *MCC* (ang. *Mutated in Colorectal Cancer*) prowadzi do powstania dysplazji i w dalszym etapie powstania gruczolaka stopnia pierwszego. Wzrost tempa podziałów komórek powoduje dalsze gromadzenie błędów genetycznych, w wyniku czego następuje aktywacja protonkogenów i delecja *DCC* (ang. *Deleted in Colorectal Cancer*). Kolejnym etapem rozwoju nowotworu jest utrata funkcjonalności produktu genu *TP53*, co prowadzi do powstania gruczolakoraka, a dalsze gromadzenie błędów do powstania nowotworu inwazyjnego. Zauważyć można, że geny supresorowe związane z rozwojem nowotworu w rodzinnej polipowatości jelita zaangażowane są również w powstawaniu sporadycznego nowotworu jelita grubego, jak również dziedzicznego nowotworu jelita grubego bez polipowatości *HNPC* (ang. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*). W sporadycznych nowotworach jelita grubego uszkodzeniu ulegają obydwa allele genu *APC*. Według teorii Fearona i Vogelshteina w przypadkach rodzinnego nowotworu jelita grubego wystąpienie mutacji w genach *APC*, *K-ras*, *DCC*, *TP53* przyspiesza mutatorowe działanie genów *MSH1*, *MSH2*. Charakterystyczne dla genów supresorowych jest uczestniczenie jako

TABELA 1. Geny supresorowe nowotworów związane z rodzinnym występowaniem nowotworów

Gen	Locus	Nowotwór	Funkcja białka
<i>APC</i>	5q21	Rodzinna Polipowatość Jelita Grubego Zespół Turkota Zespół Gardnera	Białko adhezyjne
<i>BRCA</i>	213q12-q22	Wczesna postać raka piersi	Czynnik transkrypcji
<i>BRCA</i>	117q21	Rak piersi i jajnika	Aktywacja transkrypcji
<i>CDKN2 (MTS1)</i>	9p21	Dziedziczny czerniak złośliwy	Inhibicja cyklinozależnej kinazy CDK4
<i>DAN</i>	1p36.13-p36.11	Neuroblastoma	?
<i>NF1</i>	17q12-q22	Neurofibromatoza typ 1	Białko aktywujące GTPazy
<i>NF2</i>	22q12.2	Neurofibromatoza typ 2	Białko cytoszkieletu
<i>RBI</i>	13q14	Siatkówczak, Kostniakomięśniak	Kontrola cyklu komórkowego inaktywacja E2F
<i>RCA 1</i>	3p14,2	Familial renal cell carcinoma	?
<i>TP53</i>	17p13	Zespół Li-Fraumeni	Regulacja przebiegu cyklu komórkowego czynnik transkrypcji
<i>TSC 1</i>	9p34	Stwardnienie guzowate, Dziedziczny nowotwór nerki	Regulator wzrostu ?
<i>TSC 2</i>	16p13.3	Stwardnienie guzowate Zaburzenia umysłowe, Dziedziczny nowotwór nerki,	Aktywacja GTPaz z rodziny ras

czynnik podatności w rodzinnym przypadku choroby nowotworowej, jak również ich udział w rozwoju przypadków sporadycznych. Często geny supresorowe związane są z rozwojem wielu typów nowotworów rodzinnych, jak i sporadycznych. Jedną z najczęstszych mutacji są mutacje genu *TP53*, które występują w większości obserwowanych nowotworów. Zaobserwowano również i w tym przypadku dziedziczne mutacje prowadzące do występowania zespołu Li-Fraumeni.

FUNKCJE GENÓW SUPRESOROWYCH

Działanie białkowych produktów genów supresorowych polega zasadniczo na hamowaniu proliferacji. W tabeli 1 przedstawiono funkcje produktów białkowych wybranych genów supresorowych. Dotychczas zidentyfikowane geny supresorowe nowotworów związane są zasadniczo z dwoma systemami kontroli proliferacji – kontrolą cyklu komórkowego i układem kontaktowego hamowania wzrostu. Wię-

kszość opisanych genów supresorowych wykazuje aktywność związaną z kontrolą cyklu komórkowego. Układ kontroli cyklu komórkowego jest podstawowym mechanizmem zabezpieczającym komórkę przed powielaniem błędów genetycznych. W czasie kolejnych faz w przypadku nieprawidłowości komórka podejmuje decyzję, czy zatrzymać przejście w kolejną fazę cyklu w celu naprawienia uszkodzeń DNA czy rozpocząć proces apoptozy. Jednym z genów związanych z kontrolą cyklu komórkowego jest gen *RBI* (ang. *Retinoblastoma*). Produkt genu *RBI* jest białkiem jądrowym i inhibuje przejście komórki z fazy G1 do S. Białko to inaktywuje grupę czynników transkrypcji E2F. W formie dzikiej jest ono inaktywowane przez fosforylację i aktywowane przez defosforylację. Na dwie godziny przed wejściem przez komórkę w fazę S białko RB1 jest fosforylowane i uwalnia związane czynniki transkrypcji E2F, co pozwala przejście komórce w fazę S. Fosforylacja białka RB1 jest związana z działaniem wielu cyklin, cyklino-zależnych kinaz i inhibitorów cyklino-zależnych kinaz, w związku z tym wydaje się być bardzo ważnym punktem kontroli cyklu komórkowego [20]. W przypadku utraty funkcjonalności białka RB1 w wyniku mutacji komórka stale jest pobudzana do proliferacji [1]. Działanie tego białka może być także inhibowane produktem onkogenu *MDM2* (amplifikowanym w sarkomach) lub niektórymi onkoproteinami wirusowymi, np. antygenem T SV40 lub białkiem E1A adenowirusa [22].

Z kompleksem kontaktowego hamowania wzrostu związany jest występujący na chromosomie 5 gen *APC*. Gen *APC* ulega tkankowo specyficznej ekspresji [8]. W komórkach śluzówki jelita grubego produkt genu *APC* o masie 300 kDa uczestniczy w kontaktowym hamowaniu wzrostu komórek. Zaobserwowano, że białko APC oddziałuje z α -kateniną i β -kateniną. Oba te białka wiążą się z białkiem adhezyjnym E-kadheryną. Fearon na podstawie badań nowotworów dziedzicznych zaproponował model, w którym białko APC bierze udział w transdukcji sygnału i przez degradację β -kateniny wpływa na aktywność czynnika transkrypcji Tcf4 (ang. *T-cell transcription factor 4*). Kolejnym białkiem związanym z tworzeniem kompleksu białka APC z β -kateniną jest kinaza białkowa ZW3/GSK3. Fosforylacja białka APC aktywuje wiązanie β -kateniny. Białko APC z kinazą ZW3/GSK3 ma zdolność inhibowania transkrypcji indukowanej przez β -kateninę. W przypadku utraty funkcjonalności produktu genu *APC* lub β -kateniny następuje aktywacja czynnika transkrypcji Tcf4 [4]. Komórka jest pobudzona do proliferacji, w wyniku czego obserwujemy dysplazję w pierwszym etapie rozwoju polipa.

STRUKTURA GENÓW SUPRESOROWYCH

Geny supresorowe stanowią bardzo zróżnicowaną grupę genów (tab. 2). Występują w tej grupie geny bardzo małe, jak też takie, które mogą uchodzić za bardzo duże.

TABELA 2. Lokalizacja i struktura genów supresorowych nowotworów

Gen	Lokalizacja	Liczba eksonów	Wielkość mRNA i białka
<i>APC</i>	5q21	21	8529 pz / 300 kDa
<i>BRCA2</i>	13q12-q22	27	10254 pz
<i>BRCA1</i>	17q21	24	5589 pz / 190 kDa
<i>CDKN1A (CCP1)</i>	6p21.2	–	24 kDa
<i>CDKN2(MTS1)</i>	9p21	3	442 pz / 16 kDa
<i>DCC</i>	18q21	29	4254 pz / 153-170 kDa
<i>MCC</i>	5q21	–	2487 pz / 90 kDa
<i>MTS 1</i>	9q21	3	450 pz / 16 kDa
<i>MTS 2</i>	q21	2	393 pz / 15 kDa
<i>NF 1</i>	17q12-q22	60	7455 pz
<i>NF 2</i>	22q12.2	18	–
<i>RB 1</i>	3p14.2	27	2784 pz
<i>RCA 1</i>	3p14.2	16	–
<i>TNFR</i>	1p36.3,p36.2	10	–
<i>TP 53</i>	17p13	11	1179 pz / 53 kDa
<i>TP 73</i>	1p36	–	73 kDa
<i>TSC 1</i>	9p34	23	3738 pz / 130 kDa
<i>TSC 2</i>	16p13.3	41	5500 pz / 180 kDa
<i>TSG 101</i>	11p15,2p15,1	–	1143 pz / 42,8kDa
<i>WT 1</i>	11p13	10	–

Gen *DCC* położony na chromosomie 18 w regionie q21 zajmuje 1.4 Mbp genomowego DNA i jest uważany za największy poznany gen supresorowy [3]. Z kolei najmniejszym genem jest gen *MTS2*, który składa się z dwóch eksonów i koduje białko o masie 15 kDa. Największą liczbę eksonów obserwuje się w genie *NF1*, gdzie 59 eksonów tego genu zajmuje 350 kbp genomowego DNA [5]. Na komplementarnej nici intronu 26 genu *NF1*, który obejmuje około 40 kbp znajdują się trzy inne geny. Występowanie genów w obrębie innego genu jest u organizmów eukariotycznych rzadkością. Wielkość produktów białkowych genów supresorowych jest zróżnicowana i waha się od 15 do 380 kDa. Największe białka powstają w wyniku ekspresji genów *BRCA2* i *APC* (380–300 kDa)

MUTACJE GENÓW SUPRESOROWYCH

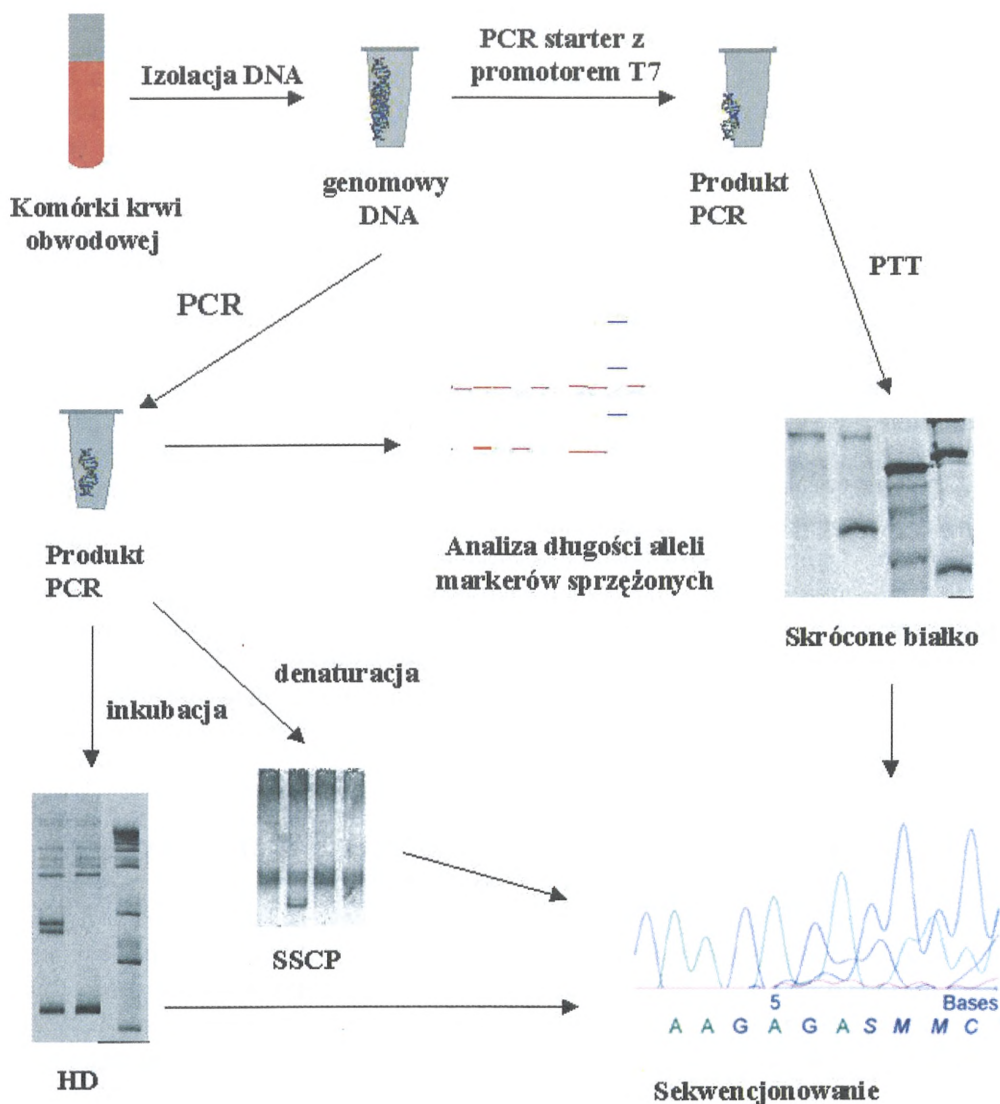
Do najczęstszych mutacji w genach supresorowych nowotworów należą mutacje obejmujące kilka nukleotydów. Są to małe delecje lub insercje kilku par zasad oraz substytucje – tranzycje i transwersje. Zmiany tego typu występują w większości genów związanych z dziedzicznie warunkowanymi nowotworami. Delecje lub in-

serczie innej liczby par zasad niż krotność trzech są zawsze mutacjami nonsesownymi prowadzącymi do przedwczesnej terminacji translacji. Substytucje (tranzycje lub transwersje) mogą być mutacjami zmiany sensu, jeżeli nie generują kodonu Stop lub nonsensownymi w przypadku generowania takiego sygnału. Mutacje nonsensowne prowadzą do unieczynnienia produktu białkowego genu. Mutacje zmiany sensu mogą unieczynić produkt genu, jeśli w ich wyniku nastąpi zamiana aminokwasu w rejonie istotnym dla jego aktywności np. w centrum aktywnym. Mutacje sensowne stanowią niski procent mutacji w genach supresorowych. W genie *TP53* blisko 8% mutacji to mutacje sensowne, w genie *APC* ponad 9% mutacji nie jest mutacjami terminującymi translację [6]. Niektóre geny supresorowe są unieczynniane w wyniku aberracji chromosomowych. Do genów tych należą *MTS1*, *TSC2* i *DCC*. Aberracje chromosomowe występują w wyższych fazach rozwoju nowotworów i ulegają im geny, które tracą aktywność w czasie zaawansowania rozwoju nowotworu. Do genów takich należy gen *DCC*. Gen ten ulega delecji podczas rozwoju nowotworów jelit [16]. Gen *TP53* występuje jako czynnik genetyczny warunkujący zespół Li-Fraumeni, w genie występują wtedy mutacje punktowe, ulega on także inaktywacji w czasie rozwoju innych nowotworów [18]. Przyczyną inaktywacji tego genu są duże delecje na chromosomie 17 [14]. Dla pełnej inaktywacji produktu genu supresorowego niezbędne jest uszkodzenie obydwu alleli genu. W układzie heterozygotycznym mutacje genów supresorowych są recesywne, niezmutowany drugi allel genu maskuje fenotyp mutacji. W rodzinnych przypadkach nowotworów utrata heterozygotyczności LOH (ang. *loss of heterozygosity*) prowadzi do zapoczątkowania procesu nowotworowego [12].

DIAGNOSTYKA W DZIEDZICZNYCH CHOROBYCH NOWOTWOROWYCH

Podatność na wystąpienie nowotworu u osoby ze zmutowanym genem supresorowym narzuca konieczność przedobjawowego rozpoznania nosicieli mutacji w tym genie. Jest to bardzo ważne dla profilaktyki stosowanej u osoby obciążonej ryzykiem choroby nowotworowej, jak również daje możliwość uniknięcia nieuzasadnionego stresu u osób nie obciążonych. Genetyczne podłoże dziedzicznych nowotworów pozwala na wykrycie nosicieli zmutowanego genu na podstawie badań DNA. W przypadku genów, w których występują *hot-spots*, można prowadzić analizę bezpośrednią, a w przypadku dużych genów, gdzie mutacje mają charakter heterogenny, wykonuje się wstępne badanie przesiewowe, dla poszczególnych eks-onów lub fragmentów genu, przez analizę pośrednią, a następnie analizę bezpośrednią celem określenia charakteru zmiany w materiale genetycznym (rys. 1). W analizie pośredniej bardzo przydatne są metody PCR-SSCP (ang. *single strand conformation polymorphism*) i PCR HD (ang. *heteroduplex analysis*). Kolejną metodą poszu-

Diagnostyka molekularna FAP



RYSUNEK 1. Diagnostyka molekularna FAP (przykłady wyników pochodzą z badań własnych)

kiwania mutacji jest test przedwczesnej terminacji translacji PTT (ang. *protein truncation test*). Test ten może być stosowany tylko w przypadkach genów zawierających duże eksony i pozwala na wykrycie tylko mutacji typu nonsense. Z zastosowaniem tych metod można określić region wystąpienia mutacji z bardzo dużą dokładnością i ten region poddawany jest analizie bezpośredniej. Występowanie u osób z podwyższonym ryzykiem pojawienia się nowotworu mutacji w układzie heterozygoty-

cznym sprawia trudności podczas wykonywania analizy bezpośredniej. Zbadanie sekwencji zmutowanego allelu genu supresorowego bez stosowania techniki klonowania wymaga dużej wprawy i doświadczenia. Znaczne ułatwienie przeprowadzenia takiej analizy można uzyskać stosując wysoce specjalistyczny zestaw do automatycznego sekwencjonowania DNA, np. AlfExpress® (Pharmacia Biotech). W przypadku, gdy nie wykryto mutacji, lub w przypadku bardzo dużych genów stosuje się analizę typu pośredniego, badając współdziedziczenie markerów sprzężonych. Markerami dla takich analiz są wysoce polimorficzne loci zawierające krótkie sekwencje powtórzone, np. (CA)_n. Na rysunku 1 przedstawiono schemat diagnostyki stosowanej dla badania dziedziczenia zmutowanego allelu genu APC w przypadkach rodzinnej polipowatości jelita.

UZUPEŁNIENIE

Informacje na temat badań genów supresorowych są dostępne w internecie. Jedną z największych i na bieżąco aktualizowanych jest baza danych jest *Online Mendelian Inheritance in Man* prowadzona przez *National Center for Biotechnology Information*. Można tam zasięgać informacji na temat interesującego tematu przeszukując bazy danych według słów kluczowych pod adresem:

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html>,

można także posługiwać się numerem przypisanym jednostce chorobowej lub określoneemu genowi. Poniżej podano numery i nazwy genów supresorowych.

101000 NEUROFIBROMATOSIS, TYPE II; NF2

103280 ADULT SKELETAL MUSCLE GENE

113705 BREAST CANCER, TYPE I; BRCA1

113721 BREAST CANCER-RELATED REGULATOR OF TP53; BCPR

116899 CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1A; CDKN1A

116948 CELL DIVISION CYCLE 34; CDC34

120470 DELETED IN COLORECTAL CARCINOMA; DCC

123829 CYCLIN-DEPENDENT KINASE 4; CDK4

131100 MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA, TYPE I; MEN1

133700 EXOSTOSES, MULTIPLE, TYPE I; EXT1

133701 EXOSTOSES, MULTIPLE, TYPE II; EXT2

134651 FATTY ACID BINDING PROTEIN 3, MUSCLE AND HEART; FABP3

139185 GROWTH ARREST-SPECIFIC GENE-1; GAS1

144700 RENAL CARCINOMA, FAMILIAL, ASSOCIATED 1; RCA1

147280 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 2 RECEPTOR; IGF2R

147380 INHIBIN, ALPHA; INHA

147575 INTERFERON REGULATORY FACTOR-1; IRF1

153550 5q-@MINUS SYNDROME

154280 MALIGNANT TRANSFORMATION SUPPRESSION-1; MTS1

154790 PROTEASE INHIBITOR 5; PI5
156490 NON-METASTATIC CELLS 1, PROTEIN EXPRESSED IN; NME1
156491 NON-METASTATIC CELLS 2, PROTEIN EXPRESSED IN; NME2
156540 METHYLTHIOADENOSINE PHOSPHORYLASE; MTAP
157145 MICROSEMINOPROTEIN, BETA; MSMB
162200 NEUROFIBROMATOSIS, TYPE I; NF1
175100 ADENOMATOUS POLYPOSIS OF THE COLON; APC
176807 PROSTATE CANCER; PRCA1
176875 PROTEIN PHOSPHATASE 1, ALPHA SUBUNIT; PPP1A
176886 PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE, RECEPTOR TYPE,
GAMMA; PTPRG
176915 PROTEIN PHOSPHATASE 2A, CATALYTIC SUBUNIT, ALPHA
ISOFORM; PPP2CA
179590 PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE, RECEPTOR TYPE,
F POLYPEPTIDE; PTPRF
180200 RETINOBLASTOMA; RB1
182280 SMALL-CELL CANCER OF THE LUNG; SCCL
188825 TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE-2; TIMP2
191092 TUBEROUS SCLEROSIS-2; TSC2
191100 TUBEROUS SCLEROSIS-1; TSC1
191170 TUMOR PROTEIN p53; TP53
191181 SUPPRESSOR OF TUMORIGENICITY-3; ST3
192090 CADHERIN 1; CDH1
193300 VON HIPPEL-LINDAU SYNDROME; VHL
194070 WILMS TUMOR; WT1
208900 ATAXIA-TELANGIECTASIA; AT
600020 MAX INTERACTING PROTEIN 1; MXI1
600021 MAD PROTEIN; MAD
600040 BCL2-ASSOCIATED X PROTEIN; BAX
600079 PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE, NONRECEPTOR TYPE, 12;
PTPN12
600160 CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2A; CDKN2A
600185 BREAST CANCER 2, EARLY-ONSET; BRCA2
600277 INHIBITOR OF DNA BINDING 3, DOMINANT NEGATIVE; ID3
600372 NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY
DOWN-REGULATED 1; EDD1
600431 CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2B; CDKN2B
600548 HEAT SHOCK 70-KD PROTEIN 9; HSPA9
600597 PHOSPHOLIPASE C, EPSILON; PLCE
600613 NEUROBLASTOMA TUMOR SUPPRESSOR GENE DAN; D1S1733E
600623 KANGAI 1; KAI1

600639 NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 2; EDD2
 600786 TRANSCRIPTION ELONGATION FACTOR B (SIII), POLYPEPTIDE 3; TCEB3
 600856 CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1C; CDKN1C
 600966 LETHAL GIANT LARVAE (DROSOPHILA) HOMOLOG 1; LLGL1
 600993 MOTHERS AGAINST DECAPENTAPLEGIC, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 4; MADH4
 601014 DISCS, LARGE, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 1; DLG1
 601267 CHEMOKINE (C-C) RECEPTOR 2; CMKBR2
 601273 CLATHRIN, HEAVY CHAIN D
 601284 ACTIVIN A RECEPTOR, TYPE II-LIKE KINASE 1; ACVRL1
 601308 MYELOID LEUKEMIA-RELATED GENE
 601309 PATCHED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF; PTCH
 601365 DISHEVELLED 1; DVL1
 601366 MOTHERS AGAINST DECAPENTAPLEGIC, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 2; MADH2
 601387 TUMOR SUSCEPTIBILITY GENE 101; TSG101
 601398 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B; VEGFB
 601566 INHIBITOR OF GROWTH 1; INGI
 601583 WILMS TUMOR SUPPRESSOR LOCUS, CHROMOSOME 7
 601797 ABSENT IN MELANOMA 1; AIM1
 601969 DELETED IN MALIGNANT BRAIN TUMORS 1
 601990 TUMOR PROTEIN p73; TP73

LITERATURA

- [1] BIA B, BOWELL JK. Independent constitutional germline mutations occurring in the RB1 gene in cousins with bilateral retinoblastoma. *Oncogene* 1995; **11**: 977–979.
- [2] BROWN KD, ZIV Y, SADANANDAN SN, CHESSA L, COLLINS FS, SHILOH Y, TAGLE DA. The ataxia-telangiectasia gene product a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proc Nat Acad Sci* 1997; **94**: 1840–1845.
- [3] CHO KR, OLINER JD, SIMONS JW, HEDRICK L, FEARON ER, PREISINGER AC, HEDGE P, SILVERMAN GA, VOGELSTEIN B. The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 1994; **19**: 525–531.
- [4] FEARON ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; **278**: 1043–1050.
- [5] HARI KL, SANTERRE A, SEKELSKY JJ, MCKIM KS, BOYD JB, HAWLEY RS. The mei-41 gene of *D. melanogaster* is a structural and functional homolog of the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* 1995; **82**: 815–821.
- [6] HARRIS CC, HOLLSTEIN M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Eng J Med* 1993; **329**: 1318–1327.

- [7] HAWLEY RS, FRIEND SH. Strange bedfellows in even stranger places: the role of ATM in meiotic cells lymphocytes tumors and its functional links to p53. *Genes Dev* 1996; **10**: 2383–2388.
- [8] HAWLEY A, NAKATSURU S, ICHII S, NAGASE H, NAKAMURA Y. Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression. *Hum Molec Genet* 1993; **2**: 283–287.
- [9] KASTAN MB, ONYEKWERE O, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, CRAIG RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; **51**: 6304–6311.
- [10] KASTAN MB, ZHAN Q, EL-DEIRY WS, CARRIER F, JACKS T, WALSH WV, PLUNKETT BS, VOGELSTEIN B, FORNACE AJ. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992; **71**: 587–597.
- [11] KNUDSON AJR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci* 1971; **68**: 820–823.
- [12] MALKIN D, JOLLY KW, BARBIER N, LOOK AT, FRIEND SH, GEBHARDT MC, ANDERSEN TI, BORRESEN AL, LI F P, GARBER J, STRONG LC. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. *New Eng J Med* 1992; **326**: 1309–1315.
- [13] MORRELL D, CHASE CL, SWIFT M. Cancers in 44 families with ataxia-telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **50**: 119–123.
- [14] ROMANO JW, EHRHART JC, DUTHU, KIM CM, APPELLA E, MAY P. A mutation in the p53 gene of a human osteosarcoma cell line. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: A32.
- [15] SHEN MH, HARPER PS, UPADHYAYA M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet* 1996; **33**: 2–17.
- [16] SHIBATA D, REALE MA, LAVIN P, SILVERMAN M, FEARON ER, STEELE GJR, JESSUP JM, LODA M, SUMMERHAYES IC. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *New Eng J Med* 1996; **335**: 1727–1732.
- [17] SWIFT M, REITNAUER PJ, MORRELL D, CHASE CL. Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *New Eng J Med* 1987; **316**: 1289–1294.
- [18] TOGUCHIDA J, YAMAGUCHI T, DAYTON SH, BEAUCHAMP RL, HERRERA GE, ISHIZAKI K, YAMAMURO T, MEYERS PA, LITTLE JB, SASAKIMS, WEICHSELBAUM RR, YANDELL DW. Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. *New Eng J Med* 1992; **326**: 1301–1308.
- [19] UZIEL T, SAVITSKY K, PLATZER M, ZIV Y, HELBITZ T, NEHLS M, BOEHM T, ROSENTHAL A, SHILOH Y, ROTMAN G. Genomic organization of the ATM gene. *Genomics* 1996; **33**: 317–320.
- [20] WEINBERG RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; **81**: 323–330.
- [21] WHYTE P, BUCHKOVICH KJ, HOROWITZ JM, FRIEND SH, RAYBUCK M, WEINBERG RA, HARLOW E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; **334**: 124–129.
- [21] YING KL, DECOTEAU WE. Cytogenetic anomalies in a patient with ataxia immune deficiency and high alpha-fetoprotein in the absence of telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1981; **4**: 311–317.

NOWE METODY W CYTOGENETYCE MOLEKULARNEJ*

NEW METHODS IN MOLECULAR CYTOGENETICS

Mariola ZAWADA

Zakład Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

Streszczenie: Analiza kariotypu na podstawie chromosomów z wzorem prążkowym jest standardową metodą stosowaną w celu identyfikacji liczbowych i strukturalnych aberracji chromosomowych w pre- i postnatalnej diagnostyce cytogenetycznej. Jednakże w przypadku niektórych aberracji chromosomowych (np. chromosomy markerowe, subtelne translokacje, złożone aberracje chromosomowe) często występują duże trudności diagnostyczne z użyciem tradycyjnych technik cytogenetycznych. Obecnie dysponujemy różnorodnymi technikami, dzięki którym możliwe jest przeprowadzanie badań przesiewowych całego genomu na poziomie chromosomów. Należą do nich techniki cytogenetyki molekularnej: jedno- i wielokolorowa fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), COD-FISH, PRINS i CGH. Techniki molekularnej cytogenetyki pozwalają na badanie liczby kopii określonych sekwencji DNA w genomie i dostarczają informacji o lokalizacji regionów chromosomowych, w których nastąpiła zmiana w prawidłowej strukturze.

Słowa kluczowe: aberracje chromosomowe, cytogenetyka molekularna, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Summary: Karyotype analysis by chromosome banding is the standard method for identifying numerical and structural chromosomal aberrations in pre- and postnatal cytogenetic diagnosis. However, some chromosomal abnormalities (i.e. marker chromosomes, subtle translocations, complex chromosomal rearrangements) are usually difficult to identify by routine cytogenetic techniques. A variety of techniques are now available for genome screening of alterations at chromosome level. The methods include following molecular cytogenetic techniques: single-colour and multi-colour fluorescence *in situ* hybridization (FISH), COD-FISH, PRINS and CGH. In general, the molecular cytogenetic techniques allow screening for DNA sequences copy-number and provide a map of those chromosomal regions that have been changed as compared to normal structure.

Key words: chromosomal aberrations, molecular cytogenetics, fluorescence *in situ* hybridization.

*Praca częściowo sfinansowana przez Komitet Badań Naukowych (KBN) – projekt grantowy Nr 4P05A08113.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat obserwujemy dynamiczny rozwój genetyki dzięki nowym koncepcjom z jednej i nowoczesnym, często rewolucyjnym technikom badawczym z drugiej strony. Rozwój genetyki dokonywał się jednak w różnym tempie w poszczególnych jej dziedzinach. W cytogenetyce stosunkowo długo, bo aż do późnych lat siedemdziesiątych, nie wprowadzono żadnej nowoczesnej techniki. Badania materiału genetycznego na poziomie chromosomów metafazowych przebiegały prawie wyłącznie z użyciem tradycyjnych technik prążkowych, których rozdzielczość pozwala na wykrywanie regionu objętego aberracją chromosomową o wielkości przekraczającej 4 Mb. Symptodem zmian, jakie miały wkrótce nastąpić w cytogenetyce, było przekroczenie dotychczasowej granicy wykrywalności zmian w strukturze chromosomów z użyciem klasycznych technik cytogenetycznych przez wprowadzenie techniki otrzymywania chromosomów prometafazowych (HRBT–*high resolution banding technique*) [15]. Chromosomy uzyskane tą metodą, charakteryzują się mniejszym stopniem kondensacji chromosomowego DNA w porównaniu z chromosomami metafazowymi, a rozdzielczość klasycznych technik w ich przypadku wynosi 1–3 Mb. Wzrastało także zainteresowanie chromatyną interfazową, praktycznie niewykorzystaną dotychczas w badaniach, choć rozdzielczość niektórych metod cytogenetycznych na tym poziomie kondensacji DNA oszacowano na ok. 2 Mb. Konieczne zatem było wprowadzenie zupełnie nowych technik do badań cytogenetycznych, których rozdzielczość pozwoliłaby zaobserwować bardzo subtelne zmiany w materiale badawczym, a ich czułość i specyficzność umożliwiłaby także prowadzenie badań chromatyny jądra interfazowego. Z drugiej strony, przebiegający równocześnie intensywny rozwój metod biologii molekularnej spowodował przenikanie nowoczesnych technik molekularnych do tradycyjnej cytogenetyki. Trzeba przyznać, że skojarzenie obu dziedzin stało się dla cytogenetyki momentem przełomowym i w zasadniczy sposób wpłynęło na kierunek dalszego jej rozwoju. Szybko okazało się, że cytogenetyka jest rozległą, stwarzającą wielkie możliwości badawcze dziedziną nauki, a obserwowane od lat chromosomy z wzorami prążkowymi były i są ważnym wstępem do badań na poziomie cytogenetycznym, które można dalej prowadzić na poziomie molekularnym.

Rewolucyjną metodą, która na zawsze zmieniła cytogenetykę, była fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH. Metoda ta została rozwinięta na bazie wcześniej znanych, ale mających duże ograniczenia w zastosowaniu, hybrydyzacji *in situ*: barwnej (z peroksydazą i nadtlenkiem wodoru) oraz izotopowej. Metoda FISH stała się jednym z ważniejszych narzędzi badawczych współczesnej genetyki, przede wszystkim z powodu swej dużej specyficzności, czułości oraz szybkości w uzyskaniu wyniku badania. Jednakże wysoki koszt zarówno samej procedury FISH, jak i konieczność posiadania wysokiej klasy oprzyrządowania sprawia, że liczba ośrodków, w których prowadzone są badania z użyciem FISH, jest ograniczona.

Cytogenetyka, w wyniku wprowadzenia fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do badań, rozwinęła się w kilku kierunkach. Badania z udziałem FISH lub jej

modyfikacji prowadzone na chromosomach metafazowych, prometafazowych, chromatynie jąder interfazowych lub rozluźnionych włóknach chromatynowych nazwano cytogenetyką molekularną, a w przypadku chromatyny jąder interfazowych, dodatkowo cytogenetyką interfazową [6,28].

W zasadzie każda hybrydyzacja *in situ* i jej odmiany przebiegają według podobnego schematu obejmującego:

- przygotowanie preparatów cytogenetycznych oraz sond molekularnych,
- hybrydyzację,
- detekcję związanej sondy.

Różnice istniejące między poszczególnymi modyfikacjami FISH mogą dotyczyć rodzaju użytych sond, znaczników sond, systemów detekcji i analizy obrazu mikroskopowego.

RODZAJE STOSOWANYCH SOND DNA

Najczęściej stosowanymi w diagnostyce cytogenetycznej sondami DNA są: sondy malujące chromosomy (WCPs – *whole chromosome composite painting probes*), stanowiące mieszaninę fragmentów DNA o różnej wielkości i charakterze (powtarzalne i unikalne sekwencje DNA) oraz sondy komplementarne do sekwencji centromerowych określonych chromosomów [31].

Rzadziej w badaniach cytogenetycznych stosowane są sondy specyficzne dla danego fragmentu chromosomu, zwykle obejmujące ramiona poszczególnych chromosomów (CAPs – *chromosome arm painting probes*) oraz sondy stanowiące całkowity genomowy DNA, cDNA czy też syntetyczne oligonukleotydy [28].

ŹRÓDŁA SOND DNA

W ogólnych zarysach sondy malujące chromosomy uzyskuje się przez wyodrębnienie z całego zestawu chromosomów jednej, określonej ich pary, a następnie poddanie reakcji z enzymami restrykcyjnymi w celu utworzenia mieszaniny fragmentów DNA o różnej wielkości i charakterze (krótkie sekwencje specyficzne typu *single copy*, sekwencje średnio i wysokopowtarzalne). Następnie do uzyskanych fragmentów DNA chromosomowego wprowadzane są nukleotydy sprzężone z określonym znacznikiem: biotyną, digoksygeniną lub fluorochromem.

W innej metodzie tworzenie sond malujących całe chromosomy oraz ich poszczególne ramiona polega na wyizolowaniu z płytek metafazowych, z użyciem mikroigły lub lasera, kilkunastu do kilkudziesięciu kopii danego chromosomu i

przeprowadzeniu reakcji DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction*) [29]. Tworzenie sondy zgodnie z procedurą DOP-PCR powoduje, że wyeliminowane są z niej sekwencje repetytywne, które występują w sondach generowanych metodą selekcji chromosomów i cięcia ich enzymami restrykcyjnymi [4]. Ponadto, w literaturze opisano zastosoownie metody PCR w tworzeniu sond DNA o charakterze repetytywnym [7].

Interesująco wygląda proces tworzenia sondy DNA opisany w technice PRINS (*PRimed In Situ labelling*). W trakcie doświadczenia sonda powstaje bezpośrednio w badanym materiale jako komplementarny fragment określonego regionu chromosomowego (np. sekwencji centromerowej), a warunkiem jej tworzenia są odpowiednio dobrane startery oligonukleotydowe, nukleotydy sprzężone ze znacznikiem oraz polimeraza [13].

ZNACZNIKI SOND

Znacznikami sond DNA są nukleotydy sprzężone z biotyną, digoksygeniną, a ostatnio także z różnymi fluorochromami (znanymi pod nazwami handlowymi: FITC, Texas Red, Cy3, Cy5), wprowadzane do fragmentów DNA metodą „*nick translacji*” przy użyciu DNazy I i polimerazy DNA I [24], metodą z użyciem enzymu Klenowa [8], metodą PCR [18] lub techniką PRINS [13].

DETEKCJA ZHYBRYDYZOWANYCH SOND DNA

System detekcji, dzięki któremu możliwa jest obserwacja związanej sondy, zależy od rodzaju znacznika, z jakim była ona związana. W przypadku sond, do których zostały wprowadzone nukleotydy sprzężone z biotyną lub digoksygeniną, system detekcyjny obejmuje 3 przeciwciała, z których zwykle pierwsze i ostatnie związane jest z określonym fluorochromem (FITC, Texas Red). W przypadku sond wyznakowanych bezpośrednio fluorochromem, system detekcji jest zbędny, chyba że zhybrydyzowana sonda DNA ma charakter *single copy*, a sygnał pochodzący z miejsca jej związania wymaga wzmocnienia.

1. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (Fluorescence In Situ Hybridization)

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* jest obecnie najczęściej stosowaną cytogenetyczną metodą diagnostyczną oraz badawczą. FISH pozwala na wykrywanie specyficznych sekwencji DNA (lub rzadziej RNA) w preparacie cytogenetycznym lub materiale tkankowym. Metoda charakteryzuje się większą dokładnością i specyficznością, w porównaniu z klasycznymi technikami cytogenetycznymi. Osza-

cowano, że rozdzielczość FISH w chromosomach metafazowych wynosi 1–3 Mb, w jądrach interfazowych od 100 kb do 1 Mb, a w przypadku najnowszego osiągnięcia cytogenetyki molekularnej, którym jest technika FISH stosowana wobec rozluźnionych włókien chromatynowych, istnieje możliwość badania DNA chromatynowego o wielkości poniżej 100 kb.

Wśród sond stosowanych w technice FISH są zarówno specyficzne fragmenty DNA typu *single copy* hybrydujące z regionem chromosomu zawierającym określony gen, jak również różnego rodzaju mieszaniny fragmentów DNA, łączące się z całym chromosomem lub ich poszczególnymi ramionami, sekwencjami okołocentromerowymi oraz telomerowymi odcinkami chromosomów.

1.1. „Malowanie” chromosomów metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* - jednokolorowa FISH

W końcu lat osiemdziesiątych do diagnostyki cytogenetycznej wprowadzono fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* do całych chromosomów, znaną jako „malowanie” chromosomów. Nazwa techniki pochodzi od obrazu pohybrydyzacyjnego, jaki obserwuje się w mikroskopie fluorescencyjnym. Zastosowany w detekcji sondy jeden rodzaj fluorochromu sprawia, że cały chromosom pokryty zhybrydyzowanymi fragmentami sondy ma inną barwę niż pozostałe chromosomy (np. żółto-zieloną pochodzącą od fluoresceiny). Skontrastowanie tak zabarwionego badanego chromosomu z czerwonym kolorem pozostałych chromosomów (pochodzącym od związanego z ich DNA jodkiem propidynowym) sprawia, że uzyskany obraz mikroskopowy przypomina bardziej dzieło artystyczne niż wynik pracy naukowej.

W jednokolorowej FISH, w czasie pojedynczego doświadczenia, można obserwować jeden chromosom lub jego fragment, co w przypadku prostych zmian chromosomowych jest metodą w pełni wystarczającą. Jednak w przypadku złożonych aberracji chromosomowych jednokolorowa FISH staje się nieprzydatna, a przeprowadzanie pojedynczych hybrydyzacji mających na celu pełną diagnostykę aberracji jest bardzo czasochłonne i kosztowne.

1.2. Wielokolorowa fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Multicolor - FISH)

Od blisko 10 lat prowadzone są badania nad możliwością jednoczesnego wykrywania więcej niż jednej sekwencji DNA w materiale genetycznym. Zaowocowały one rozwojem tzw. wielokolorowej FISH, w której detekcja większej liczby różnych sekwencji DNA polega na kolorystycznym zróżnicowaniu sygnałów pohybrydyzacyjnych [22]. W celu uwidocznienia sygnałów w wielokolorowej FISH stosowane są różne fluorochromy, które pobudzone światłem UV, fluoryzują w określonych zakresach barw. Jednakże, aby uwidocznić jednocześnie różne sekwencje DNA, niezbędna jest odpowiednio duża liczba fluorochromów, które są odległe spektralnie, a ich fale emisji nie ulegają wzajemnemu nakładaniu.

Postęp w innych dziedzinach nauki pozwolił zgromadzić niezbędną liczbę fluorochromów, co zapoczątkowało bezpośrednie znakowanie kwasów nukleinowych różnymi fluorochromami przez sprzężenie ich z nukleotydami bądź z przeciwciałami

wchodzącymi w skład systemu detekcji sond. Trzeba zaznaczyć, że lista fluorochromów możliwych do wykorzystania w wielokolorowej FISH stale wzrasta.

Niezależnie od ilości dostępnych fluorochromów prowadzone są doświadczenia mające na celu zwiększenie liczby różnych kolorów, przez kombinacyjne znakowanie sond oraz zastosowanie różnego współczynnika znakowania sond [17]. W pierwszym przypadku mamy do czynienia z określoną kombinacją fluorochromów dla różnych sond DNA (dwie sondy są wyznakowane różnymi fluorochromami, trzecia z nich zawiera kombinację tych fluorochromów). Liczba możliwych kombinacji kolorystycznych, a tym samym liczba wykrywanych obiektów, dla n fluorochromów wynosi $2^n - 1$. Tak więc możemy uzyskać 7 kombinacji dla 3 fluorochromów, 15 kombinacji dla 4 fluorochromów itd.

W przypadku różnego współczynnika znakowania sond DNA istotne jest występowanie w nich fluorochromów w zmiennych proporcjach.

Stałe poszerzanie detekcyjnych możliwości FISH doprowadziło do wielokolorowej wizualizacji wszystkich chromosomów człowieka. Jest to niewątpliwie bardzo istotne osiągnięcie z punktu widzenia zwiększenia użyteczności FISH zarówno w medycynie, jak i naukach podstawowych. Pamiętać należy, że wiele wcześniejszych badań, przeprowadzonych metodą jednokolorowej FISH, było opóźnianych przez konieczność przeprowadzania szeregu eksperymentów, których ostateczny efekt jest równy temu, jaki otrzymujemy stosując wielokolorową FISH. Poza tym często zdarza się, że mamy do czynienia z ograniczonym dostępem do materiału badawczego, a więc także ograniczoną ilość próbek badawczych.

Wysoka rozdzielczość i duża czułość zarówno jedno-, jak i wielokolorowej FISH pozwala na cytogenetyczną detekcję aberracji struktury chromosomów, nieuchwytnych metodami klasycznej cytogenetyki. Jednak w przypadku niektórych aberracji chromosomowych (np. inwersji) FISH przeprowadzona z użyciem sond hybrydujących z całymi chromosomami lub regionami okołowcentromerowymi chromosomów nie wnosi informacji ułatwiających diagnostykę. Aby identyfikacja inwersji stała się możliwa do przeprowadzenia, konieczne było wprowadzenie do zestawu badań techniki, która umożliwiłaby odróżnienie fragmentu DNA odwróconego o 180° od reszty chromosomu.

2. COD-FISH

(Chromosome Orientation and Direction Fluorescence In Situ Hybridization)

Zmiany w strukturze chromosomów mogą mieć charakter asymetryczny i wtedy łatwo je zaobserwować na chromosomach z wzorem prążkowym. Jeżeli jednak zmiany w chromosomie mają charakter symetryczny, to ich wykrycie jest bardzo trudne nie tylko przy użyciu klasycznych technik cytogenetycznych, ale także metodą FISH z rutynowo stosowanymi sondami. Trudności diagnostyczne dotyczące aberracji symetrycznych widoczne są przede wszystkim w przypadku inwersji pericentrycznych, które często mogą być nierozpoznane, a w konsekwencji diagnostyka cytogenetyczna pozostaje niekompletna. Techniczna możliwość wykrywania inwer-

sji, oszacowania częstości ich występowania oraz określenia prawdopodobnych konsekwencji klinicznych jest niewielka. Wiele inwersji, mających być może istotne znaczenie biologiczne, zostaje prawdopodobnie przeoczonych.

Przez wiele lat inwersje były wykrywane wyłącznie na podstawie rutynowych technik prążkowych. Jednakże niektóre regiony chromosomów z wzorem prążkowym wykazują charakter homogenny, co znacznie ogranicza wykrywalność inwersji paracentrycznych, gdy punkty pęknięć leżą w obrębie tego samego jasnego lub ciemnego prążka lub inwersji pericentrycznych, obejmujących stosunkowo homogenny region okołocentromerowy chromosomu. Wydaje się więc, że CO-FISH (*chromosome orientation FISH*), która jest zmodyfikowaną standardową fluorescencyjną hybrydyzacją *in situ* może odegrać zasadniczą rolę w wykrywaniu inwersji. Metoda ta została po raz pierwszy opisana w 1993 roku, a następnie rozszerzona do wersji COD-FISH (*chromosome orientation and direction fluorescence in situ hybridization*) [za: 1].

COD-FISH pozwala na kontrolowaną enzymatyczną reakcję trawienia jednej nici DNA w nowo powstającej chromatydzie. Zasadniczym elementem metody jest obecność w DNA zsyntetyzowanych chromatyd siostrzanych bromodeoksyurydyny (BrdU), podanej we wczesnej fazie S. Pod wpływem światła UV nici DNA z wbudowaną BrdU są preferencyjnie degradowane. Powstałe uszkodzenia w nici DNA stanowią substrat dla 3'-5' egzonukleolitycznej aktywności ExoIII. Trawienie tym enzymem powoduje, że badany chromosomowy DNA staje się jednoniciowy i do takiej postaci DNA następuje hybrydyzacja także jednoniciowych sond DNA. Sygnał pojawia się wyłącznie na jednej chromatydzie siostrzanej [1].

Metoda COD-FISH może być użyta do określenia kierunku sekwencji badanego DNA, a zatem w przypadku inwersji, która związana jest z odwróceniem określonego fragmentu chromosomu (sekwencji DNA) o 180°, możliwe jest stwierdzenie jej wystąpienia. Wykrycie inwersji w chromosomie metodą COD-FISH polega na wykryciu zmiany położenia sygnałów pochodzących od jednoniciowej sondy, która zhybrydyzowała tylko z jedną chromatydą. W rezultacie wystąpienia tej aberracji struktury dochodzi do zmiany położenia sygnału („przełączenia” sygnału) z jednej chromatydzie na drugą.

3. PRINS (*Primed In Situ Labeling*)

Technika PRINS (*PRimed In Situ labelling lub Primed In Situ DNA synthesis*) stanowi metodę alternatywną do FISH i polega na wykrywaniu klasycznych sekwencji satelitarnych DNA typu I, II i III przez reakcję z użyciem starterów oligonukleotydowych, nukleotydów sprzężonych z określonym znacznikiem, wolnych nukleotydów i polimerazy Taq DNA. Cała reakcja przebiega w materiale biologicznym (chromosomy i jądra interfazowe) na szkiełku podstawowym umieszczonym w urządzeniu, w którym możliwa jest pełna kontrola temperatury na poszczególnych etapach reakcji [27].

Technika PRINS ma wiele zalet. Jedną z nich jest krótki okres detekcji (do 2 godzin) klasycznego satelitarnego i alfa satelitarnego DNA. Opisano także możliwość skrócenia czasu reakcji w technice PRINS do 15–20 minut dla sekwencji o średniej i wysokiej liczbie powtórzeń, a dla sekwencji występujących w wysokiej liczbie kopii nawet do 2–3 minut [14].

4. CGH (*Comparative Genomic Hybridization*)

Metoda CGH polega na ko-hybrydyzacji nowotworowego i prawidłowego genomowego DNA do prawidłowych chromosomów metafazowych. Zarówno DNA nowotworowe, jak i DNA referencyjne wyznakowane są w różny sposób; najczęściej zawierają nukleotydy sprzężone z dwoma różnymi fluorochromami. W takim przypadku system detekcji zhybrydowanych genomowych sond jest zbędny. W przypadku zastosowania jako znaczniki sond biotyny lub digoksygeniny detekcyjna reakcja immunocytochemiczna z użyciem przeciwciał jest niezbędna.

Efektem końcowym CGH jest emisja fluorescencji pochodzącej od prawidłowego i nowotworowego DNA, a ta zależy od intensywności fluorescencji pochodzącej od materiału genetycznego tkanki nowotworowej i DNA referencyjnego (np. barwy zielonej pochodzącej od FITC i czerwonej pochodzącej od Texas Red). Stosunkowo łatwo można zaobserwować nadmiar lub niedobór materiału genetycznego w badanym DNA, gdyż widoczne będą w takich przypadkach zmiany w intensywności obu fluorescencji [2].

ANALIZA OBRAZÓW MIKROSKOPOWYCH

Zastosowanie fluorochromów w cytogenetyce molekularnej spowodowało rozwój mikroskopii epifluorescencyjnej oraz systemów cyfrowej analizy obrazu mikroskopowego.

Wśród najczęściej stosowanych fluorochromów opisywanych w literaturze znalazły się: FITC (fluoresceina), Texas Red (czerwień teksasowa), DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindol), Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy7 (barwniki cyjaninowe). Dla poszczególnych fluorochromów określono zakresy ich absorpcji i emisji, a następnie dostosowano do nich odpowiednie filtry. Zastosowanie w badaniu jednocześnie kilku fluorochromów wymaga użycia systemu cyfrowej analizy obrazu mikroskopowego, w którym określone kolory (pseudokolory) przypisane są poszczególnym fluorochromom.

Wyniki badań przeprowadzonych za pomocą FISH, w których występuje tylko jeden fluorochrom, są z reguły analizowane bezpośrednio pod mikroskopem. Fluorescencja pochodząca z miejsca związania sondy oraz czerwona barwa DNA chromosomów i jąder interfazowych możliwe są do zaobserwowania pod jednym filtrem i bez konieczności użycia systemu komputerowego.

Inaczej jest w przypadku wielokolorowej FISH, w której stosuje się kilka odległych spektralnie fluorochromów. Konieczność użycia różnych filtrów sprawia, że cyfrowa analiza obrazu mikroskopowego staje się w takich przypadkach wręcz niezbędna. Procedura komputerowej analizy obrazu obserwowanego w mikroskopie polega na zachowaniu obrazów oddzielnych dla każdego fluorochromu. Umożliwia to kamera video wysokiej rozdzielczości (CCD), za pośrednictwem której obrazy mikroskopowe są przesyłane do komputera, a następnie ich analiza odbywa się z wykorzystaniem odpowiedniego oprogramowania. Poszczególne obrazy przetwarzane są ostatecznie w złożony obraz, w którym każdy interesujący obiekt charakteryzuje się określonym pseudokolorem, związanym z jego fluorochromową kompozycją.

Dzięki wielofluorochromowym hybrydyzacjaom *in situ* oraz komputerowemu systemowi cyfrowej analizy obrazu mikroskopowego dotychczas udało się wykryć jednocześnie aż 27 różnych obiektów chromosomowych [17].

ZASTOSOWANIE NOWOCZESNYCH TECHNIK CYTOGENETYKI MOLEKULARNEJ

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* stała się idealnym uzupełnieniem rutynowo stosowanych technik cytogenetycznych. FISH wkroczyła zarówno do badań diagnostycznych, jak i nauki eksperymentalnej. Badania, w których zastosowano tę metodę, obejmują zarówno pre-, jak i postnatalną diagnostykę aberracji chromosomowych.

W diagnostyce prenatalnej badania cytogenetyczne prowadzone są z wykorzystaniem komórek owodniowych lub trofoblastu oraz krwi pępowinowej. Zasadniczo w celu przeprowadzenia analizy cytogenetycznej chromosomów płodu wykonuje się długo- lub krótkoterminowe hodowle pobranego materiału płodowego. Jednakże ze względu na konieczność szybkiego uzyskania informacji o kariotypie płodu często stosowane są preparaty bezpośrednie, w których materiał genetyczny występuje w stadium interfazy. W tak przygotowanym materiale badawczym niemożliwe jest jednak zastosowanie tradycyjnych technik cytogenetycznych, a jedynymi metodami umożliwiającymi identyfikację aberracji liczby i struktury chromosomów są FISH i PRINS [5,19]. Obie metody są nieocenione w diagnostyce płci u embrionów preimplantacyjnych i w przypadkach podejrzenia choroby związanej z chromosomem X. Poza tym pozwalają one na detekcję w chromatynie jądra interfazowego sekwencji centromerowych poszczególnych chromosomów i określenie liczby ich kopii, co jest istotne ze względu na możliwość wystąpienia zespołów związanych z trisomią określonego chromosomu (np. zespoły: Downa, Edwardsa).

Jeszcze szersze zastosowanie technik cytogenetyki molekularnej obserwujemy w cytogenetycznej diagnostyce postanalnej. Dzięki FISH stała się możliwa identyfikacja punktów pęknięć chromosomów w trudnych diagnostycznie przypadkach i wykrywanie submikroskopowych aberracji chromosomowych [12, 31]. Metoda FISH z użyciem sond komplementarnych do całych chromosomów jest także niezastąpiona w przypadku identyfikacji chromosomów markerowych [3, 31]. Ponieważ kolejne hybrydyzacje z pojedynczymi sondami „malującymi” chromosomy, mające na celu ustalenie pochodzenia dodatkowego chromosomu są długotrwałe i pracochłonne, to także w tym zakresie dokonano postępu. Niektóre firmy oferują już zestawy sond hybrydujących jednocześnie z poszczególnymi chromosomami, a całość doświadczenia przebiega na tym samym szkiełku podstawowym, podzielonym na sektory, których liczba zgodna jest z liczbą sond. Przeprowadzając zatem jedną hybrydyzację *in situ* można ustalić, z którego chromosomu pochodzi chromosom markerowy. W przypadku obecności w kariotypie chromosomu markerowego o wielkości znajdującej się powyżej granicy rozdzielczości metody CGH, również i ta metoda może być zastosowana do identyfikacji dodatkowych chromosomów [16]. Także wielokolorowa FISH daje szansę szybkiej identyfikacji chromosomu markerowego przez jednoczesną hybrydyzację z wszystkimi sondami komplementarnymi do poszczególnych chromosomów. Sondy do „malowania” chromosomów są jednak często niewystarczające do detekcji subtelnych zmian chromosomowych, a w konsekwencji tego małe regiony obejmujące przegrupowany materiał mogą być niezauważone. Dla takich właśnie trudnych diagnostycznie przypadków utworzono zestaw sond DNA, które hybrydują do niewielkich fragmentów (subregionów) chromosomu.

Wielokolorowa FISH staje się także podręczną metodą w diagnostyce onkologicznej z powodu: genomowej niestabilności i klonalnej heterogenności tkanki nowotworowej, co utrudnia w znacznym stopniu interpretację wyników uzyskanych metodami klasycznej cytogenetyki oraz ograniczonej dostępności do materiału badawczego i trudności w uzyskaniu chromosomów komórek nowotworowych metodą hodowli. Wykrywanie amplifikacji onkogenów, identyfikacja kompleksu przegrupowań chromosomowych, a zwłaszcza translokacji zrównoważonych charakterystycznych dla nowotworów są idealnym obiektem badań z użyciem wielokolorowej FISH [26].

Równie cenną i często stosowaną w diagnostyce nowotworów jest metoda CGH, która zaistniała już w badaniach ponad 1500 nowotworów. Analiza cytogenetyczna tkanek nowotworowych metodą CGH obejmuje detekcję nie tylko nadmiaru lub braku materiału genetycznego, ale także określenie tzw. „gorących punktów” charakterystycznych dla nowotworowej niezrównoważonej zmiany materiału genomowego, identyfikację nowych genów zaangażowanych w powstawanie nowotworów (np. amplifikacja regionów związanych z obecnością protoonkogenów), analizę progresji i klonalnej ewolucji nowotworu, subklasyfikację i prognostyczną ocenę no-

wotworu [10, 30]. Metoda ma jednak pewne ograniczenia z powodu swojej rozdzielczości. Teoretyczna granica wykrywalności zmian chromosomowych w metodzie CGH wynosi 5–10 Mb [10], choć niektórzy autorzy podają wartość 10–20 Mb w przypadku delecji. Poza tym czułość metody CGH w regionach telomerowych znacznie zmniejsza się [16]. Metodą CGH można wykryć wyłącznie zmiany materiału genetycznego o charakterze niezrównoważonym, a więc aberracje zrównoważone (translokacje zrównoważone, translokacje robertsonowskie, inwersje) nie będą wykryte tą metodą. Dlatego też idealnym obiektem do badań metodą CGH są guzy lite, w których występuje nagromadzenie niezrównoważonych zmian materiału genomowego. Ważne jest jednak, aby badaniu metodą CGH zostały poddane wyłącznie komórki nowotworowe wchodzące w skład guza.

W przypadku niektórych zrównoważonych aberracji chromosomowych (zrównoważonych translokacji) odwołanie się do tradycyjnej FISH jest słuszne. Natomiast w przypadku inwersji jedyną metodą, która może wnieść rozstrzygające informacje, jest COD-FISH.

Zupełnie nowych możliwości w diagnostyce cytogenetycznej dostarcza technika FISH stosowana do rozluźnionych włókien chromatynowych; w tym przypadku granica rozdzielczości zostaje przesunięta nawet poniżej 100 kb [9]. Przy tak znacznie zwiększonej rozdzielczości FISH możliwe jest badanie bardzo subtelnych aberracji chromosomowych, takich jak np. duplikacja wielkości 1,5 Mb charakterystycznej dla choroby Charcot-Marie-Tooth 1A lub innych chorób związanych z aberracjami chromosomowymi o równie niewielkich rozmiarach (mikrodelecje, mikroduplikacje).

FISH jest doskonałą metodą prowadzenia analizy struktury jądra komórkowego. Zgodnie z założeniami cytogenetyki interfazowej poszczególne chromosomy zajmują określone miejsce w jądrze interfazowym. Przypuszcza się, że przestrzenna organizacja chromosomów w jądrze eukariotycznym, określony stopień kondensacji poszczególnych chromosomów i zajmowane przez nie miejsca w jądrze interfazowym, specyficzne tkankowo interakcje pomiędzy matriks jądrową, błoną jądrową, oraz sekwencjami chromosomowego DNA (tzw. architektura lub topografia jądrowa), mogą wpływać zasadniczo na morfologię jądra [25].

Wielokolorowe sondy „malujące” chromosomy zostały wykorzystane w badaniach ewolucjonizmu porównawczego. Prowadzono badania chromosomowej ewolucji pomiędzy spokrewnionymi gatunkami [25]. W czasie prowadzonych badań dotyczących podobieństw morfologii chromosomów człowieka oraz gatunków często bardzo odległych ewolucyjnie okazało się, że niektóre regiony chromosomowe (np. telomery) mają charakter konserwatywny, a zatem wykazują silną stabilność ewolucyjną [21].

FISH zastosowano także do badania męskiej mejozy. Dzięki tej metodzie można nie tylko zaobserwować chromosom Y w postaci zdekondensowanej, ocenić częstość występowania chiasm, ale także w uzupełnieniu o metodę PRINS – zanalizować segregację chromosomów w plemnikach mężczyzn, u których w badaniu cyto-

genetycznym limfocytów krwi obwodowej stwierdzono obecność translokacji [11, 20, 23].

PERSPEKTYWY W CYTOGENETYCE MOLEKULARNEJ

Ponieważ zarówno techniki prążkowe, jak i fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* są nadal niezbędne do prawidłowej analizy cytogenetycznej, powstała interesująca koncepcja uzyskiwania wzoru prążkowego alternatywnego w stosunku do tradycyjnych technik prążkowych. Założono, że przeprowadzając kohybrydyzację DNA chromosomów człowieka z ludzkim *Alu* DNA, a następnie wykrywając miejsca związania obu kwasów nukleinowych w reakcji z fluorochromem, można uzyskać specyficzny wzór prążkowy, wyraźnie podobny do wzoru prążkowego typu R.

W innej koncepcji nowego wzoru prążkowego zasadniczym elementem jest zestaw sond DNA hybrydujących z subregionami chromosomowymi. Uszeregowanie sond i uwidocznienie ich miejsc hybrydyzacyjnych przez odpowiednie wybarwienie prowadzi do utworzenia specyficznego układu pasków chromosomowych, zwanych chromosomowymi paskami kodującymi (*chromosomal bar coding*). Zestawy sond byłyby precyzyjnie dostosowane do potrzeb diagnostycznych i eksperymentalnych. Z dobrze zaplanowanym zestawem sond można wykryć szereg aberracji chromosomowych, w tym inwersje, przez zanalizowanie całego zestawu chromosomów lub tylko wybranych regionów związanych z określoną chorobą. Wiadomo, że w rodzinach z niewytłumaczonym upośledzeniem umysłowym lub cechami dysmorfii występuje niespodziewanie duża częstość ukrytych translokacji i delecji obejmujących prążki telomerowe i subtelomerowe. W takich przypadkach odpowiednie zestawy sond pozwolą na różnicowe znakowanie wszystkich regionów telomerowych człowieka (z wyjątkiem krótkiego ramienia chromosomów akrocentrycznych zawierających repetytywny rDNA) i detekcję translokacji czy delecji telomerowych w komórkach metafazowych.

Wszystko wskazuje na to, że nowy sposób diagnostyki cytogenetycznej z użyciem specyficznego układu prążków uzyskanych metodą FISH stanie się ważnym narzędziem badawczym w postnatalnej diagnostyce przesiewowej rodzin z określonymi cechami klinicznymi oraz w przypadkach powtarzających się poronień samoistnych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAILEY SM, MEYNE J, CORNFORTH MN, MCCONNELL TS, GOODWIN EH. A new method for detecting pericentric inversions using COD-FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **75**: 248–253.
- [2] BENTZ M, BERGERHEIM USR, LI C, JOOS S, WERNER CA, BAUDIS M, GNARRA J, MERINO MJ, ZBAR B, LINEHAN WM I LICHTER P. Chromosome imbalances in papillary

- renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **75**: 17–21.
- [3] BLENNOW E, ANNEREN G, BUI T-H, BERGGREN E, ASADI E, NORDENSKJOLD M. Characterization of supernumerary ring marker chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1993; **53**: 433–442.
- [4] CRAIG JM, KRAUS J, CREMER T. Removal of repetitive sequences from FISH using PCR-assisted affinity chromatography. *Hum Genet* 1997; **100**: 472–476.
- [5] CHRISTENSEN B, BRYNDORF T, PHILIP J, LUNDSTEEN C, HANSEN W. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* 1992; **12**: 241–250.
- [6] CREMER T, CREMER C, SCHNEIDER T, BAUMANN H, HENS L, KIRSCH-VOLDERS M. Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of chinese hamster cells by laser-uv-microirradiation experiments. *Hum Genet* 1982; **62**: 201–209.
- [7] 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.
- [8] FEINBERG AP, VOGELSTEIN B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; **132**: 6–13.
- [9] FLORIJN RJ, BONDEN LA, VROLIJK H, WIEGANT J, VAANDRAGER JW, BAAS F, DEN DUNNEN JT, TANKE HJ, VAN OMMEN GJ, RAAP AK. High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet* 1995; **5**: 831–836.
- [10] FOROZAN F, KARHU R, KONONEN J, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI O-P. Genome screening by comparative genomic hybridization. *TIG* 1997; **10**: 405–409.
- [11] GOLDMAN ASH, HULTEN MA. Chromosome *in situ* suppression hybridization in human male meiosis. *J Med Genet* 1992; **29**: 98–102.
- [12] GOODSHIP J, CURTIS A, CROSS I, BROWN J, EMSLIE J, WOLSTENHOLME J, BHATTACHAYA S, BURN J. A submicroscopic translocation t(4;10), responsible for recurrent Wolf-Hirschorn syndrome identified by allele loss and fluorescence *in situ* hybridization. *J Med Genet* 1992; **29**: 451–454.
- [13] GOSDEN CJ, LAWSON D. Rapid chromosome identification by oligonucleotide-primed *in situ* DNA synthesis (PRINS). *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 931–936.
- [14] GOSDEN CJ, LAWSON D. Instant PRINS: a rapid method for chromosome identification by detecting repeated sequences *in situ*. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **68**: 57–60.
- [15] LATOS-BIELEŃSKA A, HAMEISTER H, VOGEL W. Detection of BrdUrd incorporation in mammalian chromosomes by a BrdUrd antibody. III. Demonstration of replication patterns in highly resolved chromosomes. *Hum Genet* 1987; **76**: 293–295.
- [16] LEVY B, GERSSHIN IF, DESNICK RJ, BABU A, GELB BD, HIRSCHHORN K, COTTER PD. Characterization of a *de novo* unbalanced chromosome rearrangement by comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **76**: 68–71.
- [17] LICHTER P. Multicolor FISHing: whats the catch? *TIG* 1997; **12**: 475–479.
- [18] LION T, HAAS OA. Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Tagung der Gesellschaft für Humangenetik* 1990, Bonn 28–31.03.1990.
- [19] MCLEAN S, STANLEY W, STERN H, FONDA-ALLEN J, DEVINE G, ELLINGHAM T, ROSENBAUM K. Prenatal diagnosis of Pallister-Kilian syndrome: resolution of cytogenetic ambiguity by use of fluorescent *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* 1992; **12**: 985–991.
- [20] MOHANDAS TK, SPEED RM, PASSAGE MB, YEN PH, CHANDLEY AC, SHAPIRO LJ. Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *Am J Hum Genet* 1992; **51**: 526–533.
- [21] MOYZIS RK. The human telomere. *Sci Am* 1991; **2**: 34–41.

- [22] NEDERLOF PM, ROBINSON D, ABUKNESHA R, WIEGANT J, HOPMAN AHN, TANKE HJ, RAAP AK. Three-color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 1989; **10**: 20–27.
- [23] PELLESTOR F, GIRARDET A, COIGNET L, ANDREO B, LEFORT G, CHARLIEU JP. Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and humster techniques. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **78**: 202–208.
- [24] RIED T, MAHLER V, VOGT P, BLONDEN L, VAN OMMEN GJB, CREMER T, CREMER M. Direct carrier detection by *in situ* suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum Genet* 1990; **85**: 581–586.
- [25] SANCHEZ JA, KARNI RJ, WANGH LJ. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis of the relationship between chromosome location and nuclear morphology in human neutrophils. *Chromosoma* 1997; **106**: 168–177.
- [26] SPEICHER MR, BALLARD SG, WARD DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 1996; **12**: 368–375.
- [27] THERKELSEN AJ, NIELSEN A, KOLVRAA S. Localisation of the classical DNA satellites on human chromosomes as determined by primed *in situ* labelling (PRINS). *Hum Genet* 1997; **100**: 322–326.
- [28] TRASK B, VAN DER ENGH G, PINKEL D, MULLIKIN J, WALDMAN F, VAN DEKKEN H, GRAY J. Fluorescence *in situ* hybridization to interphase cell nuclei in suspension allows flow cytometric analysis of chromosome content and microscopic analysis of nuclear organization. *Hum Genet* 1988; **78**: 251–259.
- [29] XIAO Y, DARROUDI F, KUIPERS AGJ, DE JONG H, DE BOER P AND NATARAJAN AT. Generation of mouse chromosome painting probes by DOP-PCR amplification of microdissected meiotic chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **75**: 63–66.
- [30] WETERMAN MAJ, WILBRINK M, JANSSEN I, JANSSEN HAP, VAN DEN BERG E, FISHER SE, CRAIG I, GEURTS VAN KESSEL A. Molecular cloning of the papillary renal cell carcinoma-associated translocation (X;1)(p11;q21) breakpoint. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **75**: 2–6.
- [31] ZAWADA M. Identyfikacja chromosomów markerowych pochodzenia autosomalnego i diagnostyka aberracji struktury metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Praca doktorska. Zakład Genetyki Człowieka PAN, Akademia Medyczna w Poznaniu, 1996.

PRIONY – NOWA KLASA CZĄSTEK INFEKCYJNYCH

PRIONS – A NEW CLASS OF INFECTIOUS PARTICLES

Urszula SZYBIAK-STRÓŻYCKA, Artur OLESZENKIEWICZ

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: Choroby prionowe – zakaźne gąbczaste encefalopatie, są grupą chorób degenerujących CUN ludzi i zwierząt, przenoszonych wśród ssaków przez inokulację lub kontakt z zakażoną tkanką. Chorobom towarzyszy pojawianie się w mózгах wirulentnej izoformy glikoproteiny, kodowanej przez gospodarza, tzw. białka prionowego – PrP^{Sc}. Białko to wydaje się jedynym składnikiem czynnika zakażającego – prionu. PrP^{Sc} powstaje wskutek zmiany konformacji „zdrowej” izoformy komórkowej, tzw. PrP^C, drogą bezpośredniego oddziaływania: białko-białko. Ludzkie choroby prionowe występują w trzech formach: sporadycznej, rodzinnej oraz nabytej. Istnieje niebezpieczeństwo pokonywania przez priony bariery gatunkowej; udowodniono przypadki odzwierzęcych zakażeń ludzi gąbczastą encefalopatią bydła.

Summary: Prion diseases – bovine spongiform encephalopathies (BSE) are among most notable central nervous system degenerative disorders caused in mammals by transmissible particles or contact with infected tissue. Occurrence of disease-causing virulent isoform PrP^{Sc} of normal cellular prion protein PrP^C are specific in brains of affected persons is characteristic for disease. PrP^{Sc} protein seems to be the only particle responsible for the disease and results from conversion of normal PrP^C protein via direct protein-protein interaction. Human prion diseases may present as a sporadic, genetic, or infectious illness. There is now considerable concern that bovine prions may have been passed to humans, resulting in a new form of bovine spongiform encephalopathy.

1. WSTĘP

Badania tajemniczej choroby *kuru** plemienia Fore (Papua – Nowa Gwinea), zapoczątkowane w połowie lat pięćdziesiątych przez Daniela Carletona Gajduska,

*W narzeczu Fore: drżenie, trzęsienie się.

doprowadziły do odkrycia nowej klasy przewlekłych, śmiertelnych infekcji centralnego układu nerwowego (CUN) ludzi i zwierząt, zwanych obecnie *chorobami prionowymi* i zaowocowały kolejnym przewrotem w biologii i medycynie. Odkrywcę uhonorowano Nagrodą Nobla w roku 1976.

Choroby prionowe określane również terminami zakaźnych gąbczastych encefalopatii (zwyrodnień mózgu) lub zakaźnych amyloidoz mózgowych, wywołuje nowa, nieznana dotąd klasa czynników infekcyjnych, tak zwanych *prionów*. Kwestia natury i mechanizmu replikacji tych czynników stała się ostatnio jednym z najbardziej kontrowersyjnych problemów biologii molekularnej.

Obecnie wśród uczonych przeważa pogląd, że *priony są specyficznymi zmodyfikowanymi białkami*, ściślej, ich cukrowcowymi pochodnymi – glikoproteinami in. amyloidami.

Laureat ubiegłorocznej Nagrody Nobla, Stanley Prusiner sformułował w roku 1982 hipotezę, według której głównym i jedynym składnikiem czynnika infekcyjnego jest tzw. *białko prionowe* – PrP (ang. *prion protein*) nie zawierające kwasu nukleinowego. Hipoteza Prusiner'a wywołała początkowo wielką falę sceptycyzmu i została potraktowana jako herezja naukowa. Dzisiaj wprawdzie świat nauki oswoił się z myślą o odstąpieniu od kolejnego dogmatu biologii molekularnej, według którego przenośnikami chorób zakaźnych może być wyłącznie czynnik zawierający materiał genetyczny: DNA lub RNA, ale mimo to nie zaprzestano poszukiwania w materiale infekcyjnym towarzyszących białku kwasów nukleinowych, wirusów, wiroidów itp. Koncepcja białkowych prionów, potwierdzana coraz silniejszymi dowodami eksperymentalnymi, wydaje się trudna do podważenia, mimo to jednak nie uzyskała akceptacji ogółu uczonych. Niektórzy z nich uważają przyznanie Nagrody teorii Prusiner'a za co najmniej przedwczesne, inni z kolei sądzą, że w tej fascynującej dziedzinie jest jeszcze miejsce na niejednego Nobla.

2. CHOROBY PRIONOWE LUDZI I ZWIERZĄT

U ludzi zidentyfikowano dotychczas cztery choroby prionowe (tab. 1).

Wszystkie charakteryzują się niezwykle długim okresem inkubacji: od kilku miesięcy do kilkudziesięciu (!) lat. Okres rozwijania się choroby jest jednak krótki: od momentu pojawienia się pierwszych objawów do nieuchronnej śmierci mija zwykle od kilku tygodni do 1–2 lat. Nie ma przypadków wyleczeń czy też cofnięcia się choroby. Brak jakiegokolwiek odpowiedzi ze strony układu immunologicznego, nie występuje stan zapalny ani gorączka, nie podnosi się poziom leukocytów.

W okresie objawowym obserwuje się zmiany charakterystyczne dla gwałtownie postępującej degradacji mózgu. W przypadku **kuru** oraz **zespołu GSS** początkowe osłabienie i drgawki przechodzą stopniowo w sztywnienie kończyn, ataksję (brak

TABELA 1. Choroby prionowe ludzi

Choroba	Przyczyna zakażenia	Występowanie
Kuru	rytualny kanibalizm	Papua-Nowa Gwinea - Plemię Fore ok. 3000 przypadków w populacji liczącej 35 000 osób
Choroba Creutzfelda-Jakoba <i>Creutzfeld-Jakob Disease (CJD)</i>	<i>forma sporadyczna</i> mutacja somatyczna? autokonwersja $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{SC}}$ <i>forma rodzinna</i> odziedziczenie mutacji genu PRNP <i>forma jatrogenna</i> „neokanibalizm” medyczny; zakażenia odzwierzęce	na wszystkich kontynentach; 1 przypadek na milion mieszkańców ponad 100 rodzin z wieloma przypadkami choroby ok. 100 przypadków ofiar działań medycznych, 20 przypadków infekcji BSE, generujących nv CJD
Zespół Gerstmana- Sträusslera-Scheinkera (GSS)	odziedziczenie mutacji w genie <i>PRNP</i>	ok. 50 rodzin z wieloma przypadkami choroby
Śmiertelna rodzinna bezsenność <i>Fatal Familial Insomnia (FFI)</i>	odziedziczenie mutacji genu <i>PRNP</i>	kilkanaście rodzin z wieloma przypadkami choroby

koordynacji ruchowej), aż do utraty zdolności chodzenia, stania i siadania. Towarzyszy temu chwiejność emocjonalna, prowadząca czasem do patologicznych wybuchów śmiechu, stąd wzięło się, zresztą nieszczęsne określenie choroby - śmiejąca się śmierć. Obserwuje się łagodne otępienie, rzadko jednak dochodzi do całkowitej demencji. W końcowym okresie wskutek dysfagii chory cierpi z głodu i pragnienia.

Choroba CJD objawia się przede wszystkim gwałtownie postępującą demencją, później dopiero dochodzi do dysfunkcji motorycznej i wyniszczenia organizmu.

Chorzy na **śmiertelną rodzinną bezsenność (FFI)** po okresie trudności w zasypianiu doświadczają całkowitej bezsenności i postępującego otępienia.

We wszystkich przypadkach obserwuje się *post mortem* charakterystyczne zmiany histopatologiczne tkanki mózgowej: *status spongiosus* (zgąbczenie) oraz rozległy zanik neuronów istoty szarej, będący wynikiem zaburzeń w formowaniu błon plazmatycznych neuronów, a także rozległej *wakuolizacji* neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Zmianom neuronów towarzyszy *hipertrofia* (przerost) odżywiających je komórek glejowych, często obserwuje się występowanie charakterystycznych *płytek amyloidowych*. Pod mikroskopem elektronowym ujawniają się

włókienka amyloidowe, tzw. *scrapie associated fibrils*, w skrócie SAF, o długości 100–200 nm i średnicy 10–20 nm, zbudowane z takich samych białek jak płytki.

Złogi płytek amyloidowych występują często w normalnych, starzejących się mózgach oraz w przypadku choroby Alzheimera; ich skład oraz sekwencja aminokwasów jest jednak zupełnie odmienna od występujących w płytkach prionów.

U zwierząt rozpoznaje się około dziesięciu chorób prionowych (tab. 2), w tym najpospolitszą z nich, znaną od wieków *scrapie* (trzęsawkę) owiec i kóz.

Postępująca demencja mózgu wywołuje u zainfekowanych zwierząt stopniową utratę koordynacji ruchowej i drgawki, w końcowej fazie – niemożliwość poruszania się oraz objawy ogólnego wyniszczenia. Chore osobniki wykazują nadmierną pobudliwość i agresywność (stąd popularne określenie BSE „choroba szalonych krów”), czasem jednak obserwuje się objawy przeciwne: nadmierną lękliwość i apatię. Zwierzęta odczuwają dotkliwe swędzenie, pocierają pyskiem i całym ciałem o ogrodzenie pastwisk, pnie drzew itp. Często dochodzi przy tym do wyszarpywania sierści wraz z kawałkami skóry – stąd zresztą pochodzi angielska nazwa choroby (ang. *to scrape* – drapać, ocierać się).

W mózgach padłych zwierząt obserwuje się zwakalizowane neurony, zgąbczenie tkanki nerwowej, czasem – płytki amyloidowe. Badania ultramikroskopowe wykazują zmiany strukturalne błon komórkowych neuronów oraz obecność fibrylli białkowych czynnika *scrapie* (SAF).

Zwierzęta zakażają się jedno od drugiego najczęściej podczas walki (ugryzienia, zadrapania). Ponadto czochranie się chorych osobników powoduje u nich rozległe uszkodzenia skóry, często nawet głębokie rany. Bezpośredni kontakt może doprowadzić do przeniesienia choroby. Odnotowano zakażenia zdrowych zwierząt, które zajęły pastwiska po stadach padłych na *scrapie*. Znany jest przypadek wyginięcia 18-tysięcznego stada owiec irlandzkich, któremu wstrzyknięto szczepionkę przeciwwirusową, produkowaną w mózgach owiec, które okazały się zarażone *scrapie*. Dochodzi też prawdopodobnie do zakażenia drogą pokarmową, przez spożywanie paszy zawierającej szczątki padłych zwierząt. Sugeruje się, że w ten sposób nastąpiło przeniesienie *scrapie* na bydło domowe (generując BSE), norki (SME),

TABELA 2. Choroby prionowe zwierząt

Nazwa angielska	Nazwa polska
Scrapie	Trzęsawka (kołowacizna)
Spongiform mink encephalopathy (SME)	Gąbczasta encefalopatia norek
Chronic wasting disease of captive mule deer and elk (ChWD)	Przewlekła wyniszczająca choroba jeleni i łosi
Feline spongiform encephalopathy (FSE)	Gąbczasta encefalopatia kotów
Nyala and Kudu spongiform encephalopathy	Gąbczasta encefalopatia antylop nyala i kudu
Bovine spongiform encephalopathy (BSE)	Gąbczasta encefalopatia bydła

koty (FSE), czy też hodowane w niewoli łośie, jelenie i antylopy (ChWD). Znamy nawet przypadek tygrysa zakażonego karmą w brytyjskim ZOO !

Wszystkie wymienione choroby udało się przenieść eksperymentalnie na zwierzęta laboratoryjne. Już w 1966 r. dokonano zakażenia szympansov wyciągami z mózgow ofiar *kuru*, w 1968 r. małpy te zakażono *CJD*. Trudniej było przenieść czynnik infekcyjny na gryzonie: dopiero w 1976 r. powiodło się zakażenie *CJD* chomików i świnek morskich, jeszcze później (w latach osiemdziesiątych) wywołano chorobę prionową u myszy.

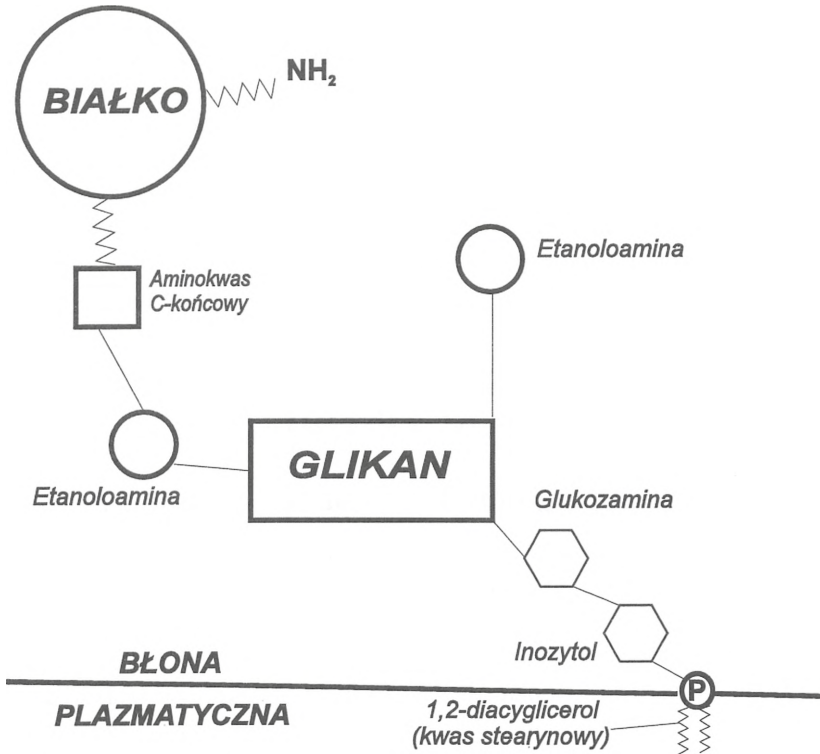
3. MOLEKULARNA NATURA CZYNNIKÓW INFEKCYJNYCH

3.1 Gen PRNP i jego produkt – białko prionowe PrP^C

W roku 1980 Stanley Prusiner oczyścił ponad 1000-krotnie czynnik *scrapie*, zapoczątkowując w ten sposób badania molekularne prionów. Do tej pory oznaczono sekwencję aminokwasów białka prionowego występującego w każdej ze znanych chorób. Metodami inżynierii genetycznej, po skonstruowaniu odpowiednich sond molekularnych, zidentyfikowano kodujący je gen, który określono terminem *PRNP*. Gen prionu, który ma długość ok. 750 pz występuje zawsze w postaci jednej kopii i składa się z dwóch eksonów i jednego, dużego intronu. Stanowi naturalny składnik ludzkiego i zwierzęcego genomu, bynajmniej nie występuje w prionach, lecz w określonych chromosomach badanych gatunków, np. w chromosomie 20 człowieka, czy chromosomie 2 myszy, niezależnie od tego czy są one chore, czy zdrowe!

Gen *PRNP* ulega naturalnej ekspresji przede wszystkim w tkance nerwowej, ale także w śledzionie, grasicy, jelitach, sercu i płucach. Produkowane jest wówczas w komórkach „zdrowe” białko o m. cz. 33–37 kd, zbudowane z około 250 aminokwasów, wykazujące bardzo wysoką homologię sekwencji u różnych organizmów od człowieka po myszy (rys. 1).

Białko o podobnej sekwencji wykryto również w drożdżach (tzw. Ure 2p). Tak zaskakująca stałość sekwencyjna charakteryzuje zwykle białka stare ewolucyjnie, spełniające kluczowe funkcje metaboliczne. Nie udało się, jak dotąd, określić roli PrP^C. Co więcej, przykład myszy transgenicznych, którym usunięto gen *PRNP*, a więc niezdolnych do syntezy PrP^C, a które mimo to rozwijają się prawidłowo sugeruje, że PrP^C nie jest istotne dla normalnego funkcjonowania organizmu. Jednakże ostatnie doniesienia z prowadzącej te eksperymenty pracowni Charlesa Weissmanna wykazują, że u myszy stwierdza się zaburzenia przewodzenia nerwowego wraz z objawami zaburzeń snu typowymi dla FFI, eliminowanymi wprowadzeniem do genomu mysiego (bez *PRNP*) kilku kopii ludzkiego *PRNP* !



RYSUNEK 1. Białko prionowe PrP^C przyłączone (zewnętrznie) do błony w obrębie komórki przez kompleks glikan - fosfatydyloinozytol

3.2. Polimeryzacja zjadliwej izoformy PrP^{SC}

Nie wywołujący choroby, naturalny produkt genu *PRNP* nazwano *komórkowym białkiem prionowym* (ang. *cellular prion protein*) w skrócie PrP^C. W odróżnieniu od niego formę infekcyjną prionu przyjęto oznaczać *scrapie* PrP, czyli PrP^{SC}. Białko PrP^C nie powoduje żadnych zmian patologicznych i w przeciwieństwie do PrP^{SC} jest dobrze rozpuszczalne i łatwo poddaje się działaniu proteaz. Czynnikiem *scrapie* (PrP^{SC}) natomiast jest odporny na działanie komórkowych enzymów proteolitycznych. Częściowe trawienie włókienek PrP^{SC} możliwe było dopiero po jego uprzedniej solubilizacji silnym detergentem, np. 0,5% SDS.

Ekstrakty zdrowej tkanki mózgowej zawierają PrP^C, które nie agregują w fibrylle białkowe. W ekstraktach tkanek zakażonych *scrapie* znaczna część PrP^{SC} występuje w postaci nierozpuszczalnych włókienek SAF. Silny detergent powoduje dysocjację SAF do polipeptydów 33–35 kd, poddających się już proteolizie. Dysocjacja SAF wykazuje, że monomery białkowe PrP^{SC} nie są połączone wiązaniami kowalencyjnymi. Przypuszcza się, że zdolność do polimeryzacji może być wynikiem okre-

ślonych *modyfikacji posttranslacyjnych* PrP^{SC}, np. glikozylacji, fosforylacji i (lub) cięć proteolitycznych. Przede wszystkim jednak za polimeryzację wydaje się odpowiadać odmienna niż u komórkowego PrP^C struktura II- i III-rzędowa, czyli *konformacja* infekcyjnego PrP^{SC}. Wiadomo, że białko PrP^C występuje w znacznych fragmentach w postaci *helisy alfa*, natomiast u formy PrP^{SC} fragmenty te mają postać *nici beta*, tworzących tzw. *strukturę harmonijkową*, zwaną też strukturą pofałdowanej kartki.

Uważa się, że *konformacja beta*, jaką przybiera PrP^{SC}, ułatwia jego polimeryzację i wytrącanie się w postaci nierozpuszczalnych fibryli SAF. Polimeryzacja* następuje spontanicznie, a zapoczątkowuje ją pojedyncza cząsteczka PrP^{SC} lub włókiemko SAF, stanowiące swoisty *czynnik (auto)katalityczny*, zwany też jądrem kryształizacji (ang. *nucleating agent*).

Proces polimeryzacji PrP jest, jak się wydaje, bezpośrednią przyczyną degeneracji komórek nerwowych. Nie wiadomo jednak na pewno, jak tego typu zmiany czynnika zakaźnego (PrP^{SC}) miałyby się przekładać na zmiany w mózgu. Podczas doświadczeń *in vitro* włókna PrP^{SC} gromadzą się w lizosomach neuronów. Być może *in vivo* wypełnione białkiem lizosomy pękają, uszkadzając komórki i powodując ubytki tkanki nerwowej, przejawiające się jej zgałbczeniem. Uwolnione z komórek priony mogłyby zakażać kolejne neurony, rozprzestrzeniając infekcję na cały mózg.

Włókna PrP^{SC} ulegają ciągłej syntezie i rozpadowi: fragmenty tego białka czasem krystalizują i gromadzą się w mózgu jako charakterystyczne płytki widoczne pod mikroskopem świetlnym.

4. PODSTAWY MOLEKULARNE DZIAŁANIA PRIONÓW

4.1 Replikacja białek prionowych

Istotą infekcyjnych encefalopatii nie jest wyłącznie zdolność polimeryzacji PrP^{SC}. Molekularne mechanizmy działania prionów są znacznie ciekawsze i znacznie bardziej złożone. Wydaje się bowiem, że po wnikięciu do neuronu produkującego „zdrowe” białko komórkowe PrP^C następuje *namnażanie się czynnika PrP^{SC}* w absolutnie unikalny sposób: PrP^{SC} powiela się, przekształcając „zdrowe” PrP^C w formę infekcyjną. Dzieje się to prawdopodobnie w wyniku wymuszonej przez PrP^{SC} *zmiany konformacji białek PrP^C*: charakterystyczna dla nich helisa α w nieznanym

*Nasuwa się tu nieodparcie podobieństwo do procesu polimeryzacji (krystalizacji) innego białka: kolagenu w tropokolagen, wymagającego jako czynnika zapoczątkowującego *swoistego szablonu* – gotowego oligomeru bądź fibryli tropokolagenu. Rozpoczęta reakcja przebiega dalej spontanicznie, z odwzorowywaniem się powstającej cząsteczki na już istniejącej. Co więcej: szablon może sterować *kopolimeryzacją* innego składnika, np. glikanu, znacznie modyfikując morfologię powstającej cząstki (fibryli).

sposób rozciąga się w nić β , nadając normalnemu białku właściwości cząstek infekcyjnych !

Powielanie się PrP^{SC} następuje kosztem puli komórkowego PrP^{C} , mamy tu więc do czynienia nie tyle z autoreplikacją*, co raczej z *autopaterningiem* – *samoodwzorowaniem zjadliwej konformacji β na matrycy prionu PrP^{SC}* .

Proces ten jest szybki, a konwersja pierwszej cząstki PrP^{C} wywołuje *efekt domina*: nowo przekształcone białko transformuje kolejne cząstki PrP^{C} , te z kolei jeszcze następne, itd. Wydaje się, że komórkowe PrP^{C} , normalnie zasocjowane z błonami wewnątrzkomórkowymi, po przejściu w „zjadliwą” formę PrP^{SC} odkładają się w pęcherzykach lizosomów. Infekcja rozprzestrzenia się wskutek rozpadu porażonych komórek.

Przedstawiony schemat replikacji prionów sugeruje, że czynnik zakaźny, niezależnie od tego czy pochodzi z zewnątrz, czy też jest generowany w określonej komórce, za każdym razem powstaje *de novo*. Wydaje się, że czasem może dochodzić do spontanicznego pojawienia się prionu, bez udziału czynnika zewnętrznego. Następuje to na przykład wskutek *somatycznej mutacji (najczęściej punktowej) genu PRNP w określonej, pojedynczej komórce organizmu.* (rys. 2). Mutacja prawdopodobnie ułatwia przyszłą konwersję konformacji α białka PrP^{C} . Białko „chętniejsze” do przybrania struktury β rozprzestrzenia się stopniowo na inne komórki, wskutek nieznanego impulsu przechodzi w PrP^{SC} . Rozważa się też możliwość spontanicznej konwersji $\alpha \rightarrow \beta$ ($\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{SC}}$) na poziomie białka, bez konieczności wystąpienia mutacji genu.

4.2. Unikalne własności prionów

Charakterystyczna struktura PrP^{SC} determinuje jego niezwykłą odporność na czynniki fizykochemiczne. Prionu nie da się zniszczyć konwencjonalnymi metodami sterylizacji. Zachowuje on swą infekcyjność nawet poddany działaniu promieniowania UV, γ i jonizującego. Jest odporny na działanie formaldehydu, H_2O_2 , chloroformu i etanolu, wytrzymuje gotowanie i tradycyjne autoklawowanie. Do inaktywacji dochodzi dopiero w 5% nadchloranie sodu, 0,1 N NaOH lub w wyniku długotrwałego autoklawowania pod wysokim ciśnieniem.

5. ZRÓŻNICOWANIE CHOROÓB PRIONOWYCH

Z uwagi na przyczynę powstawania i sposób przekazywania infekcji oraz ze względu na możliwe drogi rozprzestrzeniania się zakażenia, wyróżniamy trzy zasadnicze typy ludzkich chorób prionowych: *sporadyczną, rodzinną oraz nabytą.*

*Potwierdzono to wprowadzając „zjadliwe” PrP^{SC} myszom pozbawionym genu *PRNP*, pozbawionym więc zdolności syntezy komórkowego PrP^{C} . Wprowadzenie prionów *nie spowodowało wystąpienia scrapie!* Nie wykazano żadnych form ich replikacji!

5.1 Forma sporadyczna

Znakomita większość (ponad 80%) przypadków pojawia się *samoistnie* jako tzw. typ *sporadycznego CJD*. Nie stwierdza się żadnego kontaktu z zewnętrznym zarazkiem, nie zachodzi też mutacja genu *PRNP* w obrębie zainfekowanego organizmu. Sporadyczne CJD występuje na wszystkich kontynentach, rocznie zapada na nie średnio jedna osoba na milion, a więc co roku ponad 5000 mieszkańców Ziemi. Etiologia tej postaci choroby nie jest znana, wiadomo tylko, że większość opisanych przypadków dotyczy osób homozygotycznych względem *miejsca polimorficznego 129 (kodonu 129 → Met) genu PRNP* (porównaj rys. 2). Być może dochodzi tu do *somatycznej mutacji* genu *PRNP* lub też do spontanicznej, losowej *konwersji białka PrP^C w PrP^{SC}*.

5.2 Forma rodzinna

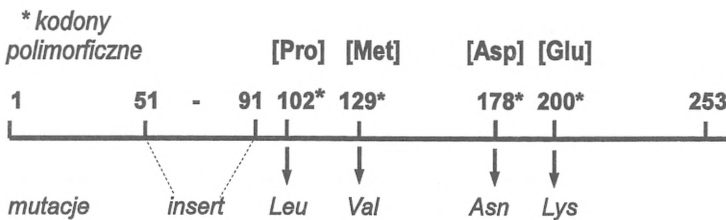
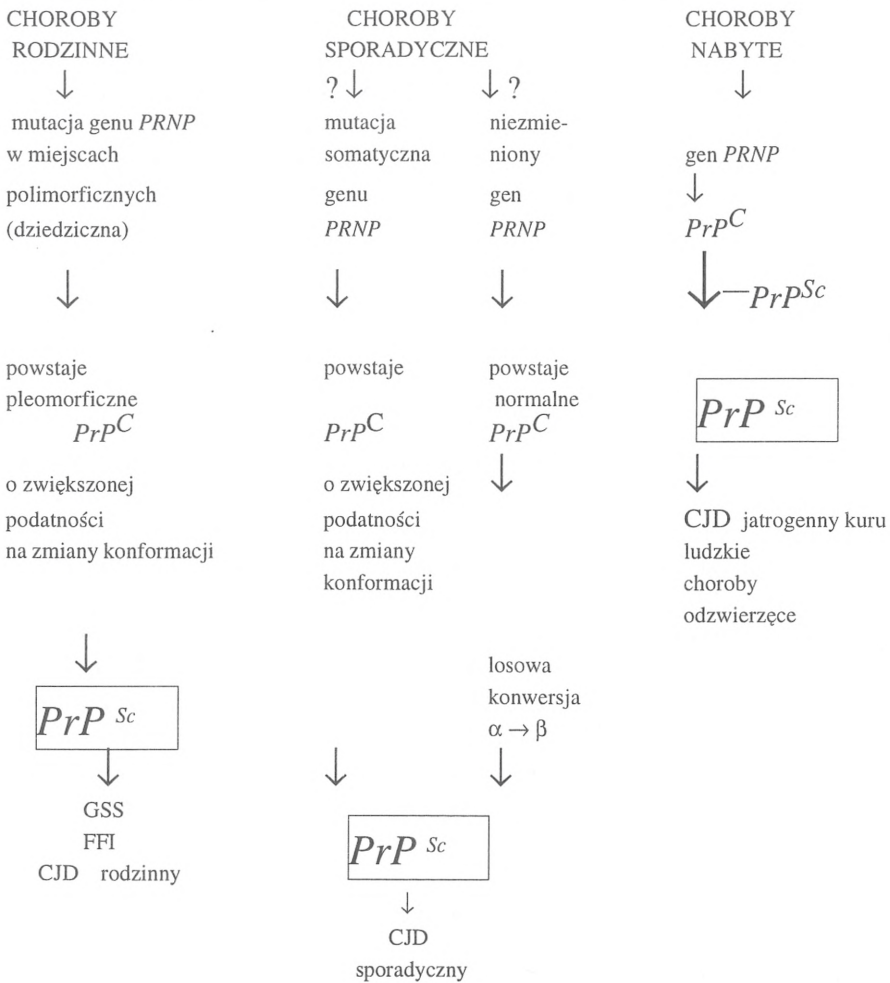
Okolo 15% przypadków choroby stanowi jej odmiana rodzinna, zwana czasem, nieściśle, formą dziedziczną. Zidentyfikowano ponad 100 rodzin z licznymi przypadkami choroby, w obrębie których stwierdza się *zwiększoną podatność na CJD, GSS lub śmiertelną bezsenność* związaną z określonymi mutacjami genu *PRNP* zwiększającymi prawdopodobieństwo konwersji PrP^C w PrP^{SC}. Rodzinne przypadki CJD, kontrolowane przez pojedynczy, dominujący gen *PRNP* stanowią *pierwszy przykład choroby zakaźnej człowieka, w której podatność na czynnik infekcyjny i rozwój zakażenia wiąże się z ekspresją jednego genu*. Obecnie szczegółowo rozpatruje się przypadki wszelkich rodzinnych demencji, również tych, które nie są uważane za infekcyjne, jak np. choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane, a nawet ... schizofrenia. Być może występuje tu podobny schemat kontroli genetycznej.

5.3 Forma nabyta*

W przypadku tej odmiany czynnik zakaźny pochodzi z zewnątrz; źródło zakażenia stanowi tkanka nerwowa innego osobnika, na ogół należącego do tego samego gatunku, choć zdarzają się wypadki infekcji międzygatunkowych. Taka postać choroby występowała w przypadku *kuru*: członkowie plemienia Fore zakażali się w wyniku rytualnego kanibalizmu. Chcąc wyrazić hołd swoim wybitnym zmarłym zjadali ich mózgi. Wydaje się, że do infekcji dochodziło jednak nie drogą pokarmową,

*Forma nabyta jest często błędnie nazywana formą zakaźną. W istocie *zakaźne* są wszystkie postaci chorób prionowych (tzn. można się nimi zarazić od chorego osobnika, niezależnie od formy, w jakiej występują).

TABELA 3. Molekularne podstawy zróżnicowania ludzkich chorób prionowych



RYSUNEK 2. Schemat genu *PRNP* z najczęściej występującymi mutacjami kodonów polimorficznych

lecz wskutek bezpośredniego kontaktu skóry, śluzówki czy rogówki z zakażoną tkanką. Epidemia ustąpiła po zaniechaniu praktyk kanibalistycznych.

Podobną etiologię wykazuje tzw. *jatrogenna postać CJD*. Wszystkie opublikowane infekcje (ok. 100) dotyczą – jak utrzymuje Gajdusek – „współczesnego neokanibalizmu medycznego”.

Źródłami zakażeń okazały się:

- iniekcje hormonu wzrostu oraz gonadotropiny pochodzące z pobieranych ze zwłok ludzkich przysadek mózgowych, obecnie, na szczęście, hormony te są produkowane przez bakterie, zawierające odpowiednie ludzkie geny,
- operacje okulistyczne, najczęściej implantacje rogówki,
- implantacje do mózgów pacjentów leczonych neurologicznie, np. epileptyków, elektrod uprzednio stosowanych u pacjentów z CJD,
- źle wysterylizowane narzędzia (neuro)chirurgiczne, także igły, zwłaszcza dokanałowe,
- operacje neurologiczne, autopsje etc.; zakażają się lekarze oraz personel medyczny,
- leczenie kanałów zębów – opisano zakażenie dentysty od pacjenta z CJD,
- potencjalne ryzyko zakażenia podczas wszelkich transplantacji narządów, transfuzji krwi, operacji chirurgicznych, a nawet podczas tatuowania ciała, czy też przekłuwania uszu i nosa.

5.4. Ryzyko zakażeń odzwierzęcych

Wydaje się, niestety, że priony mogą pokonywać bariery międzygatunkowe. Od lat przenosi się laboratoryjnie choroby ludzkie na zwierzęta. *Nie ma żadnych podstaw do wykluczenia odzwierzęcych zakażeń ludzi*. Mamy zresztą prawo podejrzewać, że do takich zakażeń od dawna już dochodzi.

W latach osiemdziesiątych została zidentyfikowana w Izraelu *mikroepidemia CJD* wśród Żydów pochodzenia libijskiego. Źródło zakażenia stanowiły prawdopodobnie gałki oczne spożywanymi owiec. Takie zwyczaje kulinarne nieznane były Żydom pochodzącym z Europy, dlatego u nich nie wystąpił wzrost zachorowań.

W ciągu ostatnich 3-4 lat szczególnie głośne stają się przypadki zachorowań ludzi, którzy spożyli mięso krów, zakażonych BSE. Opisano też śmierć z powodu CJD dwóch właścicieli stad bydła porażonego BSE. Szczególnie groźny wydaje się fakt, że transmisja prionu BSE generuje u człowieka nową odmianę CJD - *nv CJD* (z ang. *new variant*). Choroba ta, w przeciwieństwie do „klasycznego” CJD, atakuje ludzi młodych: 20- i 30-latków; „klasyczny” CJD występuje przeważnie u ludzi po sześćdziesiątce.

Laboratoryjnemu przeniesieniu choroby prionowej na inny gatunek towarzyszy zwykle wydłużenie okresu inkubacji. W przedstawionych zakażeniach obserwowano jednak przyspieszony (czasem galopujący) rozwój choroby. W CJD opisano, jak dotąd, u 20 osób; żadna z nich już nie żyje.

5.5 Podstawy molekularne różnicowania chorób prionowych

Z molekularnego punktu widzenia nv CJD różni się od znanych odmian tej choroby, przypomina zaś BSE przeniesione na inne gatunki (małpy, koty, myszy). Postuluje się w związku z tym, że prion BSE *mógłby określać obraz choroby* np. wskutek specyficznych modyfikacji ludzkiego PrP^C. Powstanie różnych odmian CJD byłoby więc „kodowane” nie przez sekwencję aminokwasów (→ nukleotydów), lecz przez kombinację *zmian konformacji i np. glikozylacji prionu*. Dzisiaj znamy tylko dwa typy konformacji PrP. Teoretycznie jednak mogą istnieć formy przestrzenne zwinięte inaczej, np. wskutek postranslacyjnych glikozylacji czy proteolizy. Zmiany takie mogłyby być „wymuszone” przez czynnik zakażający.

Postuluje się, że w ten sposób mogłyby być „kodowana” specyficzność danego PrP określająca np. jego powinowactwo względem ściśle określonej grupy neuronów. Różne typy PrP specyficzne wobec określonych obszarów mózgu czy nerwów obwodowych wywoływałyby odmienne objawy chorobowe.

Przedstawiony poniżej schemat stanowi próbę ukazania mechanizmów molekularnych warunkujących wystąpienie różnych form CJD, niewykluczone, że można go uogólnić na wszystkie choroby prionowe.

6. DYSKUSJA: PROPOZYCJA NOWEGO MODELU REPLIKACJI I DZIAŁANIA PRIONÓW

6.1. Koncepcja białkowych prionów

Jak już wspomniano, koncepcja białkowych prionów (tzw. *protein only hypothesis*) wydaje się obecnie trudna do podważenia. Sądzymy, że mimo to uprawnione są rozważania innych modeli działania prionów, odmiennych od zaproponowanej interakcji typu: białko-białko. *Czynnik infekcyjny (PrP^{SC} pochodzący z zewnątrz lub powstały spontanicznie) mógłby, na przykład, oddziaływać na sekwencje promotora lub enhancera genu PRNP, wywołując jego wzmożoną ekspresję**.

Produkowana w wyniku nadekspresji genu PRNP znacznie zwiększona ilość PrP^C mogłaby łatwiej wymuszać własne zmiany konformacyjne. A może nadmierna

*Nasuwa się tu analogia z białkowymi transaktywatorami – produktami genów retrowirusów transaktywujących, które, jak np. produkt genu *tax* u HTLV wywołują nadekspresję komórkowych onkogenów i prowadzą do transformacji nowotworowych.

ilość PrP^C odkładana w lizosomach, inicjowałaby reakcję łańcuchową, prowadzącą do krystalizacji włókien prionowych? Spontaniczne mutacje genu *PRNP* mogłyby dodatkowo przyspieszać efekty działania prionów – *domniemanych aktywatorów PRNP*. Przedstawiony model tłumaczyłby dodatkowo występowanie różnych odmian chorób prionowych, wywołanych przez jedno białko, np. *tkankową specyficznością aktywatora* oraz różne tempo rozwoju choroby (od galopującego po niezmiernie wolne), np. *efektywnością aktywatora**.

6.2. Mechanizm zmiany konformacji

Z kolei mechanizm zmiany konformacji PrP^C → PrP^{SC} mógłby być tłumaczony niestabilnością określonego obszaru w trzeciorzędowej strukturze białek PrP^C, destabilizowanej dodatkowo charakterystycznymi mutacjami genu *PRNP*.

Istnienie w cząsteczce białka oddziaływań niekorzystnych energetycznie (niestabilnych) może wynikać ze sposobu, w jaki powstający polipeptyd zwija się używając strukturę I-, II- i III-rzędową. Zwijanie się białek jest procesem nieprzypadkowym i przebiega wskutek postępującej stabilizacji form pośrednich. Teoretycznie białko składające się ze stu reszt aminokwasowych przybierałoby właściwą konformację – drogą prób i błędów – $1,6 \times 10^{27}$ lat. W rzeczywistości proces zachodzi często w ułamku sekundy. Sposobem na rozwiązanie tego dylematu (tzw. paradoksu Lewinthal) jest uwzględnienie mechanizmów doboru kumulatywnego, dzięki któremu w przyrodzie utrwalają się w czasie ewolucji zjawiska korzystne, choć nie zawsze optymalne dla organizmu. W odniesieniu do białka prionowego pojawienie się określonej sekwencji aminokwasów mogło być bardzo korzystne z uwagi na funkcję, jaką to białko spełnia w komórce, ale mniej sprzyjające stabilności jego struktury. Domniemane korzyści wiązałyby się np. z elastycznością prionu, łatwością jego przechodzenia przez błony komórkowe, na pewno jednak nie dotyczyłyby usuwania prionów z komórki. W tym kontekście powstanie genu *PRNP* kodującego niestabilne białko PrP^C wydawałoby się się „błędem” ewolucji. Przejście PrP^C w PrP^{SC} prowadzi przeciw do wykształcenia konformacji odpornej na działanie proteaz komórkowych. Organizm nie potrafi pozbyć się inwazyjnej formy białka.

W neuronach przeważająca część sekwencji PrP^C występuje w postaci helisy alfa, podczas gdy w białku PrP^{SC} regiony te występują głównie jako nić beta, w której szkielet aminokwasowy jest w pełni rozciągnięty (powstaje tzw. kartka beta). Wiadomo, że do tworzenia helisy alfa przyczyniają się reszty kwasu glutaminowego, leucyny i alaniny, natomiast reszty waliny i izoleucyny sprzyjają strukturze beta. Z kolei glicyna, asparagina i prolina mają tendencję do tworzenia

*Przedstawioną hipotezę wydają się potwierdzać ostatnie doniesienia z pracowni Prusiner. U starszych, transgenicznych myszy, zawierających wiele kopii genu *PRNP* i produkujących nadmierną ilość PrP^C występowały objawy przypominające chorobę prionową !!!

zwrotów beta, w których łańcuch polipeptydowy gwałtownie zmienia kierunek o 180° . Zakładając obecność wymienionych aminokwasów implikujących powstawanie regionów, które destabilizują natywną strukturę komórkowego PrP można przyjąć, że nawet niewielkie zakłócenia wartości termodynamicznych określających III-rzędową strukturę białka PrP^C mogą prowadzić do całkowitej zmiany konformacji cząsteczki (tu: do powstania formy PrP^{SC} – rys. 2).

Zidentyfikowano kilkanaście mutacji punktowych genu PRNP związanych z występowaniem sporadycznych chorób prionowych. Jedną z nich polega na zmianie w kodonie 102, wskutek której w białku ludzkiego PrP^C zamiast leucyny pojawia się prolina. W tym wypadku aminokwas przyczyniający się do tworzenia helisy alfa zostaje zastąpiony przez aminokwas powodujący zwroty beta. Pojawienie się mutacji w PRNP nie oznacza, że po translacji powstają od razu białka PrP^{SC}. Syntetyzowane są cząsteczki PrP^C, ale mają one znacznie większą tendencję do spontanicznego przejścia w formę zjadliwą. U ludzi i zwierząt ze zmutowanym genem PRNP choroby prionowe pojawiają się częściej i wcześniej.

Wspomniano, że zakładane oddziaływania między PrP^C a PrP^{SC} powinny zachodzić w ściśle określonym miejscu. Według Prusiner'a może się okazać, że przy przełamaniu bariery międzygatunkowej pewne regiony cząsteczek PrP odgrywają ważniejszą rolę niż inne. Jeśli tak jest naprawdę i jeśli krowi PrP^C w takich krytycznych rejonach jest bardzo podobny do ludzkiego PrP^C, to realne niebezpieczeństwo zainfekowania może okazać się znacznie wyższe niż by to sugerowało porównanie całej sekwencji aminokwasów.

Być może regiony, o których wspomina Prusiner, zawierają postulowane, niestabilne reszty aminokwasowe. Wydaje się, że oddziaływania PrP^{SC} na PrP^C powinny zachodzić w takim obszarze bryły białka prawidłowego, aby rozkład sił działających na atomy pozwalał na przełamanie bariery energetycznej przejścia PrP^C w PrP^{SC}. Struktura tego miejsca powinna być wysoce homologiczna w przypadku prionów pochodzących z różnych gatunków zwierząt.

Po przeprowadzeniu badań nad myszami, które miały hybrydowy gen PRNP (środek – gen ludzki, brzegi – fragmenty genu mysiego), Prusiner stwierdził: „wyniki świadczą, że identyczność w centralnym regionie może być bardziej istotna niż w innych rejonach genów”.

Powyższe założenia wydają się potwierdzać doniesienia Lyne Regan i wsp. dotyczące badań białek B-1 (prawie w całości kartka beta) oraz Rop (kilka helis alfa). W tym wypadku udało się określić, które aminokwasy odgrywają kluczową rolę w tworzeniu poszczególnych struktur. Z białka B-1 usunięto krótkie sekwencje aminokwasów odpowiadające za tworzenie struktury beta i zastąpiono je fragmentami Rop. Powstałe w ten sposób hybrydowe białko Janus zawierało połowę sekwencji B-1, ale przyjęło helikalną strukturę Rop. Co więcej, udało się otrzymać białko Janus II zawierające aż 61% aminokwasów z B-1, z zachowaną strukturą

helikalną Rop. Według Regan nie wolno traktować wszystkich aminokwasów jednakowo. Tylko niektóre z nich decydują o końcowej strukturze.

Jak to się ma do niestabilności PrP^C? Niewykluczone, że sekwencja w pewnych rejonach trzeciorzędowej struktury PrP^C powoduje, że jest ono zawieszona na krańdzi równowagi między strukturą alfa i beta i – jak w przypadku białka Janus – decydują o tym tylko niektóre aminokwasy. Mutacyjne zmiany genu *PRNP* powodują, że równowaga zostaje przesunięta w kierunku struktury beta. Niższa jest wówczas bariera energetyczna przejścia PrP^C w PrP^{SC}, a co za tym idzie, osobniki z mutacją chorują częściej na sporadyczną formę np. CJD. Dla nosicieli mutacji spada także krytyczna liczba cząsteczek PrP^{SC}, która wywołuje chorobę.

LITERATURA

- [1] GAJDUSEK DC, ZIGAS V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. *N Engl J Med* 1957; **257**: 974–978.
- [2] GAJDUSEK DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 1977; **197**: 943–960.
- [3] PRUSINER SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; **216**: 136–144.
- [4] MERZ PA, SOMERVILLE RA, WIŚNEWSKI HM, MANUELIDIS L, MANUELIDIS EE. Scrapie associated fibrils in CJD. *Nature* 1983; **306**: 474–476.
- [5] OESCH B, WESTAWAY D, WÄLCHLI M et al. A cellular gene encodes scrapie PrP²⁷⁻³⁰ protein. *Cell* 1985; **40**: 735–746.
- [6] WELLS GAH, SCOTT AC, JOHNSON CT et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 1987; **121**: 419–420.
- [7] GAJDUSEK DC. Subacute spongiform encephalopathies. Virology, B.N. Fields (ed.) Raven Press, New York; 1990; 2289–2324.
- [8] CHESEBRO B. Encephalopathies: the transmissible agent. Ibidem 1990; 2325–2336.
- [9] PRUSINER SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; **252**: 1515–1522.
- [10] PRUSINER SB, COLLINGE J, POWELL J, ANDERTON B. (ed.) Prion diseases of humans and animals. Ellis Horwood, London 1992.
- [11] COHEN FE, PAN KM, PRUSINER SB. Structural clues to prion replication. *Science* 1994; **264**: 530–531.
- [12] PRUSINER SB. Choroby prionowe. *Świat Nauki* Marzec; 1995; 46–54.
- [13] COLLINGE J, SIDLE KCL, MEADS J et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of new variant CJD. *Nature* 1996; **383**: 685–690.
- [14] RAYMOND GJ, HOPE J, KOCISKO DA, PRIOLA SA, RAYMOND LD, BOSSERS A, IRONSIDE J, WILL RG, CHEN SG, PETERSEN R, GAMBETTI P, RUBENSTEIN R, SMITS MA, LANSBURY PT, CAUGHEY B. Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 1997; **388**: 285–288.

ODDZIAŁYWANIE BODŹCÓW I STRESU NA CZŁOWIEKA I ZWIERZĘTA: ZAŁOŻENIA TEORETYCZNE I WYNIKI EMPIRYCZNE

THE ROLE OF STIMULUS AND STRESS IN HUMAN
AND ANIMALS: THEORETICAL AND EMPIRIC ASSUMPTIONS

Piotr GRONEK¹, Ryszard SŁOMSKI^{2, 3}

¹Katedra Hodowli i Produkcji Trzody Chlewej, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, Poznań; ²Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, Poznań; ³Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Streszczenie: Każdy bodziec oddziałujący na organizm wywołuje jego reakcję. Dla wyjaśnienia jego oddziaływania opracowano następujący algorytm reakcji organizmu na bodziec: bodziec → pole świadomości → przestrzeń mentalna (pole intelektu lub pole wyobraźni) → przestrzeń emocjonalna → przestrzeń fizyczna. Bodziec może oddziaływać na wszystkie wymienione przestrzenie (mentalną, emocjonalną, fizyczną) organizmu lub tylko na jedną z nich powodując określone zmiany organizmu. W niektórych przypadkach może wystąpić upośledzenie reakcji na bodziec (stres) mający podłoże molekularne (mutacje w genie *RYR1*). Silny stres może prowadzić do uwolnienia wolnych rodników, które mogą oddziaływać mutagennie na DNA. Zatem silny bodziec w postaci stresu może w efekcie złożonego procesu reakcji organizmu powodować zmiany na poziomie DNA.

Słowa kluczowe: bodziec, algorytm reakcji na bodziec, przestrzeń wewnętrzna, endorfiny, gen *RYR1*

Summary: Each stimulus which affects to individual causes reaction of organism. We suggest that algorithm of individual reaction would be as follows: stimulus → consciousness field → mental field (intellect or imagination field) → emotional field → physical field. The stimulus can influence to all mentioned field (menthal, emotional, physical) or to the only one causing changes which are necessary for the individual. In some cases the molecular defect of reaction to stimulus (stress) may occur (mutations in *RYR1* gene). Oxidative stress might cause an increase of free radicals in cells, which can play a major role in DNA oxidation, mutation, and damage.

Key words: stimulus, algorithm of the reaction, inner space, endorphins, *RYR1* gene

WSTĘP

Procesy poznawcze, takie jak uczenie się i pamięć, umiejętność rozwiązywania problemów, pomysłowość, predykcja, intencje i podejmowanie decyzji, w istotny sposób wpływają na zachowanie się człowieka i zwierząt [17]. Organizmy te są złożonymi strukturami, które charakteryzuje łączność i wzajemne relacje pomiędzy poszczególnymi elementami, a których istnienie przejawia się zarówno na płaszczyźnie fizycznej, jak i psychicznej. Jednym z procesów pozwalających zaobserwować wzajemne zależności poszczególnych elementów organizmu jest reakcja na bodziec (informację), czego skutkiem jest stan wzbudzenia. Zanik bodźców może powodować zaburzenia procesów myślenia, prowadzić do wystąpienia halucynacji, a najprawdopodobniej nawet w skrajnych przypadkach do śmierci osobnika [40]. W klasycznym doświadczeniu Hebba nad skutkami poważnej deprywacji sensorycznej, ochotnicy, którzy zgodzili się za wysoką opłatą pozostawać w warunkach eksperymentalnych (tj. bez możliwości odbierania jakichkolwiek bodźców) tak długo, jak będzie to tylko dla nich możliwe, nie wytrzymywali nawet siedmiu dni [26]. Bodziec można zatem traktować jako czynnik niezbędny organizmowi do życia, przy czym pod pojęciem bodziec należy rozumieć zespół różnorodnych zauważalnych i uświadomionych informacji oraz, jak to jest w przypadku zdecydowanej większości zdarzeń, sygnałów (informacji) nieuświadomionych. Bodźce mogą manifestować się w przestrzeni fizycznej (stymulacja w organizmie odpowiednich procesów np. wydzielanie β -endorfin), emocjonalnej (wywoływanie określonych stanów: agresja, lęk, zadowolenie) lub też oddziaływać przez przestrzeń mentalną (stymulowanie odpowiednich procesów myślowych, formułowanie idei). Każdy bodziec oddziałujący na organizm powoduje jego reakcję, a więc w istocie wywołuje w nim określone zmiany. Niektóre czynniki powodujące szczególnie istotne zmiany i do tego odczuwalne przez organizm negatywnie określa się jako czynniki stresujące¹. Wiele z nich, takich jak hałas, choroba, czy nawet egzamin, w istocie pobudzają organizm do działania, a więc stymulują w nim zmiany, które mogą być obserwowane zarówno na płaszczyźnie zachowania, jak i na płaszczyźnie biochemicznej. Bodziec można utożsamiać z problemem, jaki musi zostać rozwiązany przez organizm.

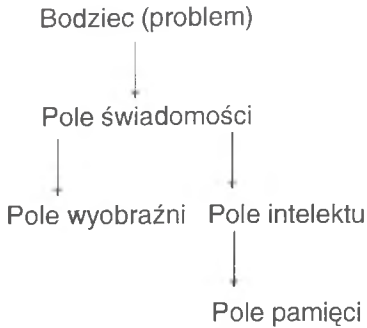
Zrozumienie roli bodźca (problemu) jest jednym z kluczowych zagadnień w wyjaśnianiu funkcjonowania organizmu jako całości, jego relacji ze środowiskiem zewnętrznym oraz głębokiego sensu i potrzeby pokonywania coraz trudniejszych problemów przez jednostkę.

¹Według Hansa Selyego stres jest nieswoistą reakcją organizmu na wszelkie stawiane mu „żądania” (H. Selye *Stress without stress* 1974). Stres definiuje się także jako fizjologiczne, biochemiczne oraz psychologiczne zaburzenia homeostazy, które mogą być związane ze zmianami w funkcjonowaniu układu odpornościowego (Tecoma i Huey *Life Science* 1985; 46: 1233–1240).

ALGORYTM REAKCJI NA BODZIEC

Na rysunku 1 przedstawiono symbolicznie algorytm reakcji na bodziec. Informacja (sygnał), która pojawia się w obszarze rejestrowanym przez narządy zmysłu, zostaje przyjęta i w miarę możliwości rozpoznana. W tym też momencie zostaje zainicjowana w organizmie reakcja na bodziec. Organizm w pierwszej kolejności musi sobie uświadomić zaistnienie bodźca. Na kolejnym etapie wyłania się możliwość wyboru jednej z dwóch możliwości. Człowiek zwykle korzysta z efektywnego i sprawnie działającego intelektu, od którego problem odbija się jak od lustra i dociera do pola pamięci, będącego mapą wspomnień. Intelekt działa efektywnie i szybko. Jego podstawą jest aktywny czynnik dzielący zaistniały problem na części i poddający go analizie. Obszar pola intelektu jest relatywnie mały, ale to sprawia, że jest on niezwykle mobilny i ma możliwość szybkiego przemieszczania się w pamięci i w konsekwencji intensywnie oddziałuje na świadomość, która była przedmiotem licznych badań, chociaż nie udało się jej zlokalizować, a także nie istnieje jednoznaczna jej definicja [4, 5, 34, 41, 42, 53, 54]. Intelekt przemieszczając się w obszarze pamięci poszukuje już istniejącego przypadku, który mógłby wykorzystać do rozwiązania zaistniałego problemu. Znaleziony przypadek może być „wydobyty na powierzchnię”, podobnie jak wysuwa się z półki znaleziona, właściwą książkę. Gdy mija czas pracy segregacyjnej intelektu, przychodzi czas na pracę analityczną w zakresie zaistniałych faktów.

Zdarzają się jednak sytuacje (bodźce) całkowicie nowe, których intelekt mimo swej precyzyjności nie odnajdzie w pamięci, bo ich tam po prostu jeszcze nie ma. To oczywisty dodatkowy kłopot, gdyż organizm musi uporać się z sytuacją, z którą wcześniej nie miał nigdy do czynienia. W takim przypadku algorytm reakcji na bodziec może podążyć drugą z możliwych ścieżek w obszar pola wyobraźni. Wyobraźnia w odróżnieniu od pola intelektu jest otwartą i „przewiewną” przestrzenią przepełnioną irracjonalizmem i obrazowością, w której nie występują sztywne reguły, a reakcje nie są, przynajmniej na pierwszy rzut oka, hamowane. Najbardziej charakterystyczną i niezwykłą (z racjonalnego punktu widzenia) cechą pola wyobraźni jest to, że materiał ją tworzący może powstać z niej samej. Wspomniana wyżej cecha nadaje polu wyobraźni właściwość unikalną i jedyną w swoim rodzaju, jakiej najprawdopodobniej nie mają inne pola psychiki. O ile pracę intelektu można przyrównać do pracy rzemieślnika, który potrafi rozwiązać dowolną funkcję, np. $y = Xb + Zs + Wd + e$, pod warunkiem, że zna prawa matematyczne i zmienne występujące w równaniu, o tyle wyobraźnia potrafi rozwiązać powyższe równanie bez znajomości zarówno praw matematycznych, jak i zmiennych występujących w równaniu. Jednak wyobraźnia nie jest tak efektywna jak intelekt, skutkiem czego jej „włączenie” ma drugorzędny charakter. Niemniej odgrywa szczególnie istotną rolę zwłaszcza tam, gdzie możliwości intelektualne są ograniczone przez świadomość



RYСУNEK 1. Początkowa faza reakcji na bodziec rozpoznawany przez świadomość

zbiorową. Wyższą funkcją wyobraźni jest intuicja. Jej znaczenie zwłaszcza w nauce jest trudne do określenia, gdyż badacze zasadniczo bardziej ufają pierwiastkowi racjonalnemu. W tym kontekście dosyć prowokująco przedstawia się definicja teorii naukowej według Poppera, która jego zdaniem jest inwencją, aktem twórczym, opartym bardziej na intuicji uczonego aniżeli na istniejącym uprzednio zespole danych empirycznych [28]. Także inni wybitni naukowcy, w tym przedstawiciele nauk ścisłych jak np. Roald

Hoffmann, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie chemii w 1981 roku, zwracają szczególną uwagę na intuicję, będącą ważnym elementem psychiki [14, 27].

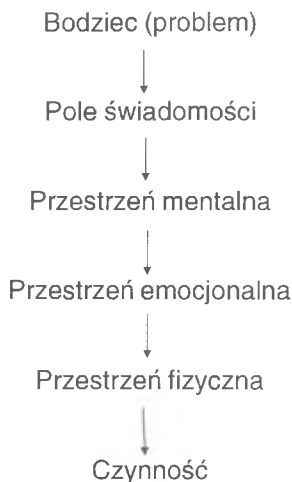
Zamiast klasycznego określenia „psychika” obecnie niekiedy używa się pojęcia przestrzeni wewnętrznej (ang. *inner space*) [18]. Przestrzeń wewnętrzna, przez którą należy rozumieć cały świat psychiki człowieka, ma swój wymiar, kształt i swoje odległości [18]. Wymiary przestrzeni wewnętrznej nie są oczywiście materialne w rozumieniu fizycznym, ale są realne (i mające kształt) w kategoriach materii psychologicznej. Jednym z najważniejszych elementów przestrzeni wewnętrznej jest świadomość. Można ją określić jako „oko” przestrzeni wewnętrznej, którym przestrzeń wewnętrzna może oberwować zarówno otoczenie, jak i samą siebie [35].

Ograniczenia

Każdy z wymienionych elementów przestrzeni wewnętrznej, można by rzec pól, tj. pole pamięci, pole wyobraźni oraz pole intelektu, składa się z elementu aktywnego i biernego. W przypadku pola pamięci jego element pasywny można symbolicznie przyrównać do wspomnianej już wyżej „biblioteki”, którą wypełniają wspomnienia i doświadczenia niczym książki wypełniające długie regały [19]. Większości wspomnień i doświadczeń nie pamięta się, podobnie jak nie pamięta się przeczytanych wcześniej książek. Mimo to, wszystkie one znajdują się w pamięci, podobnie jak przeżyte doświadczenia, składając się na sumę przeżyć, które, mimo iż nie można ich w całości odtworzyć, oddziałują na organizm swoją pasywną masą. Taki stan rzeczy jest fundamentem algorytmu rozwiązywania problemu. Można więc stwierdzić, że pamięć pasywna w tym punkcie przestrzeni wewnętrznej staje się aktywnym i nieuświadomionym czynnikiem decydującym o metodzie i taktyce rozwiązania problemu.

Zatem w pierwszej kolejności organizm uświadamia sobie zaistniały bodziec, to powoduje stymulację swoistych myśli, które wywołują w organizmie reakcję emocjonalną zakończoną określoną czynnością (rys. 2). Zarówno pole świadomości, jak i pole mentalne oraz pole emocjonalne stanowią elementy przestrzeni wewnętrznej.

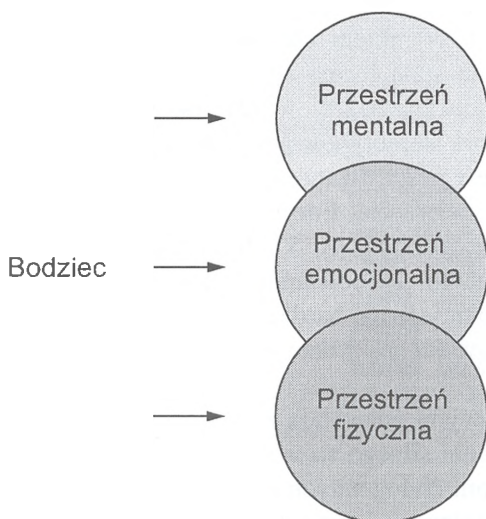
Czas reakcji na bodziec często nie przekracza 1 s. W takich sytuacjach można przyjąć, że reakcja organizmu jest automatyczna i zdeterminowana. Rysunki 1 i 2 pozwalają określić wzajemne zależności między przestrzenią mentalną, emocjonalną i fizyczną (rys. 3). Jak można zauważyć, przestrzeń mentalna nie łączy się bezpośrednio z przestrzenią fizyczną, ale za pośrednictwem przestrzeni emocjonalnej.



RYSUNEK 2. Algorytm reakcji na bodziec

Bodziec w przestrzeni mentalnej

Poziom świadomości jest podstawowym ograniczeniem tego, co człowiek może dostrzec i analizować, przy czym możliwości analizy są pochodną rozumienia. Na przestrzeń mentalną oddziałuje szereg bodźców, a niektóre z nich można nawet zaliczyć do bodźców o charakterze silnych stresorów. Przykładem może być nowa idea (informacja), np. przedstawiona przez Kopernika w jego *De revolutionibus orbium coelestium*, która może oddziaływać na przestrzeń mentalną podobnie jak ostre dłuto na twardy nawet materiał [6]. Efektem silnego wstrząsu w przestrzeni mentalnej może być odczucie bólu mentalnego. W tego typu sytuacjach zasadniczo istnieją tylko dwie możliwe reakcje: organizm może starać się poradzić sobie z bodźcem (problemem) albo próbować go odsunąć na plan dalszy. Zdecydowanie częściej odruchową reakcją jest ucieczka (fیزی-



RYSUNEK 3. Zależność między bodźcem a procesami fizycznymi, emocjonalnymi oraz mentalnymi

czna, mentalna, emocjonalna). Tego typu reakcja wynika z faktu, że dwoma podstawowymi i podświadomymi motywami działania człowieka są: potrzeba poczucia bezpieczeństwa (fizycznego, emocjonalnego, mentalnego) oraz potrzeba przyjemności (doznań estetycznych, uczuciowych, mentalnych, erotycznych, fizycznych etc.). Z psychologicznego punktu widzenia, konsekwencją bodźca w postaci nowej idei (informacji) docierającej poprzez pole świadomości do przestrzeni mentalnej jest utrata poczucia bezpieczeństwa mentalnego, np. osoba pojmująca świat geocentrycznie otrzymuje informację o jego heliocentryczności. Należy podkreślić, że to poziom świadomości stanowi główną przeszkodę w dopuszczeniu potencjalnej możliwości innego postrzegania i rozumowania.

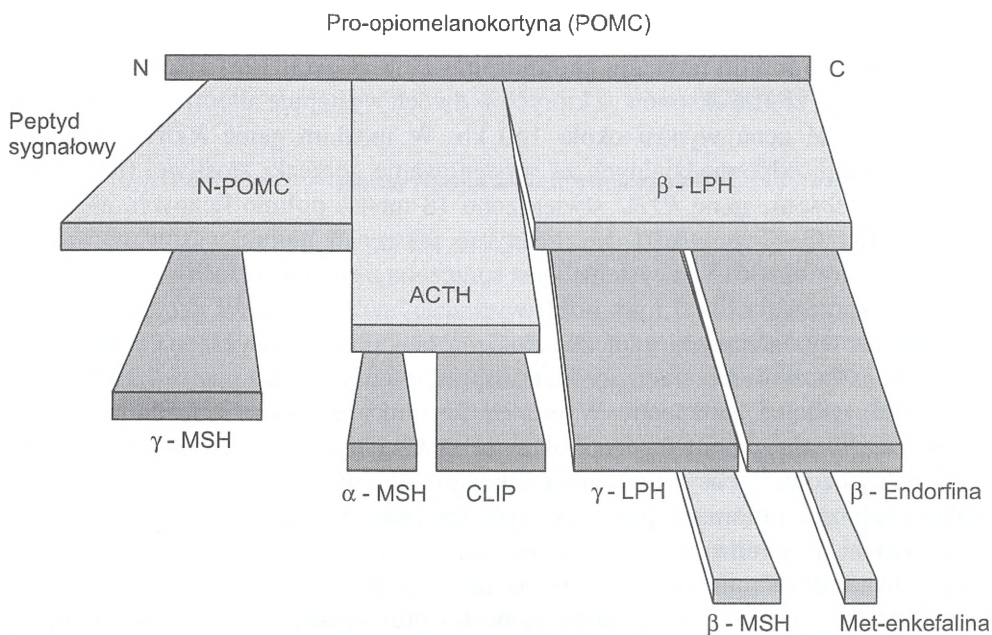
Bodziec w przestrzeni emocjonalnej

Człowiek mniej lub bardziej świadomie stwarza nie tylko sam sobie sytuacje stresowe. Robi to w odniesieniu do innych osób, a także zwierząt, choć istnieją przesłanki, że zwierzęta mogą być wrażliwe nawet na stany psychiczne innych osobników [55]. W niektórych krajach europejskich (np. Dania, Holandia) istnieje tendencja w hodowli do utrzymywania loch na uwięzi. Zwierzęta stoją w kojcach. Są przepasane rodzajem szelek mających za zadanie zminimalizowanie ich ruchu. Pomijając niewątpliwie korzyści ekonomiczne, konsekwencją takiej nienaturalnej sytuacji, która nie pozwala zwierzętom kontaktować się z innymi członkami stada ani poznawać i badać otoczenia, jest szereg zmian w ich psychice i zachowaniu. Lochy mogą jedynie czekać na pokarm i wodę oraz załatwiać się na część legowiskową. Ta głęboka i długotrwała ingerencja antropogeniczna wpływa na powstanie nowych form zachowań będących wynikiem chronicznego stresu [61]. Charakteryzują się one powtarzalnością lub stałą formą co do częstości trwania i kolejności, brakiem określonego celu (widoczna bezcelowość) oraz przyzwyczajeniem [61]. Przykładem takiego zachowania stereotypowego może być żucie łańcucha, żucie „łańcucha”, pomimo że ryj jest pusty, lizanie koryta, ponowne żucie łańcucha. Nie są to zwyczajne czynności zwierzęcia. Forma i zakres zachowania stereotypowego jest charakterystyczny dla osobnika [8, 57, 60]. Znamienny jest fakt, iż istnieje związek między powstającymi zachowaniami stereotypowymi a wydzielaniem β -endorfin [9, 33]. Być może jeszcze bardziej intrygujące jest, że zmieniony poziom osoczowej β -endorfiny występuje także u dzieci autystycznych [59].

Opioidy łącząc się z receptorami opiatowymi pozwalają zmniejszyć i złagodzić odczucie bólu powstające w wyniku działania silnego stresora, redukują także powstawanie negatywnych emocji [20] Poziom endogennych opioidów zwiększa się zarówno podczas stresu emocjonalnego, jak i zjawisk, którym towarzyszy odczuwanie bólu u ludzi i zwierząt, np. podczas uboju świń [21, 22]. Na przykład poskramianie koni przy pomocy dutki, tj. pętli zaciśniętej na górnej wardze, powoduje wzrost

poziomu osoczkowej β -endorfiny (około 81%) w ciągu trzech minut od zabiegu [36]. Większość peptydów opioidowych to produkty genu pro-opiomelanokortyny (POMC) [38, 50] (rys. 4). Gen *POMC* zbudowany jest u ssaków z trzech eksonów i dwóch względnie dużych intronów [2]. Pierwszy z eksonów koduje region nie ulegający translacji, drugi ekson koduje peptyd sygnałowy i fragment N-końcowy, natomiast ekson 3 koduje tę część polipeptydową POMC, która warunkuje aktywność biologiczną. Produkt translacji mRNA jest następnie glikozylowany i ulega posttranslacyjnemu działaniu peptydaz. Gen *POMC* jest genem występującym w pojedynczej kopii [32]. Produkty transkrypcji tego genu znajdowane są między innymi w przysadce mózgowej, gdzie z powstałego tam prekursora proopiomelanokortyny „wydzielane” są następnie mniejsze fragmenty tworzące odpowiednio ACTH, MSH, Met-enkefalinę, Leu-enkefalinę bądź α -, β - i γ -endorfiny.

Podanie substancji blokującej działanie endorfin powoduje wstrzymanie czynności stereotypowych (ale nie wyeliminowanie takiego zachowania) na pewien okres [9]. Średnio czas zachowania stereotypowego skraca się w ten sposób o 88%, natomiast wydłuża się zachowanie beczynne oraz ataki mające na celu uwolnienie się [9]. W takich sytuacjach często dochodzi do samookaleczeń, a nawet do śmierci próbującego się uwolnić zwierzęcia. Ciekawe, że u osobników starszych reakcja na substancję blokującą β -endorfiny (naloxon) jest słabsza, co pozwala przypuszczać,

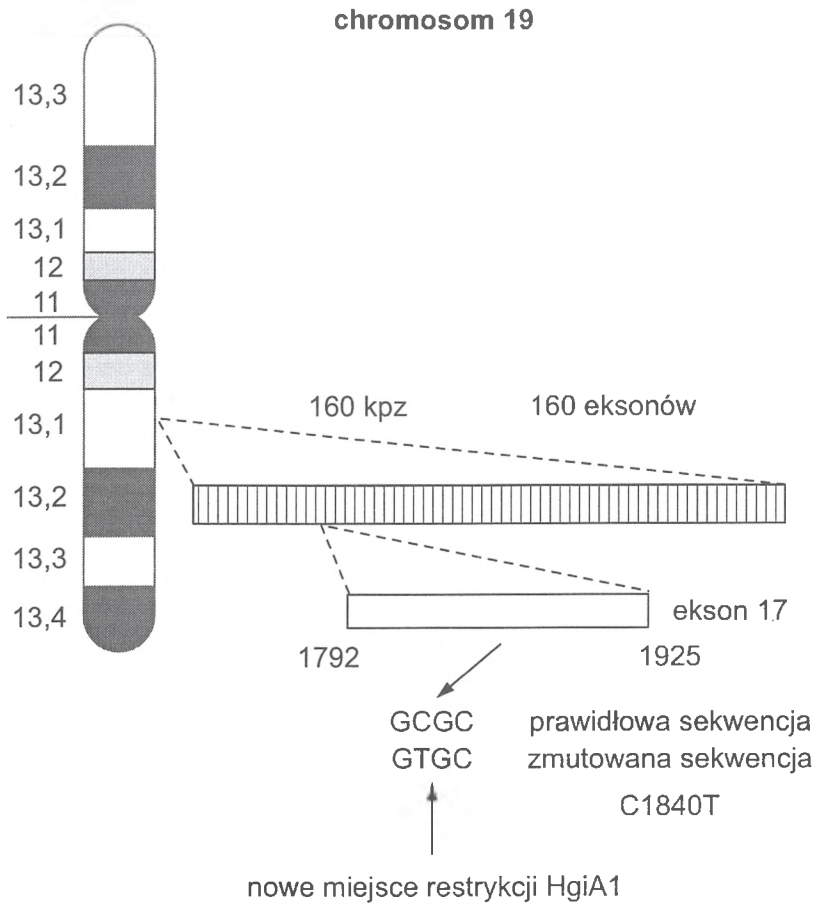


RYSUNEK 4. Pośrednie oraz końcowe produkty POMC powstające w przysadce mózgowej

że ich organizm mógł stać się bardziej tolerancyjny na endorfiny i u takich osobników zachowanie stereotypowe jest silniejsze [9]. Zachowanie stereotypowe może także wystąpić u osób przebywających przymusowo w ciasnych, zamkniętych pomieszczeniach, w obozach koncentracyjnych, więzieniach. Powstające zachowania stereotypowe mogą być zatem swoistą ucieczką od bolesnych doświadczeń świata realnego w głąb świata wewnętrznego, z jednoczesnym maksymalnym wyłączeniem świadomości, co najprawdopodobniej pozwala zrealizować fundamentalną potrzebę przeżycia.

Bodziec w przestrzeni fizycznej

Oddziaływanie bodźca na organizm było przedmiotem wielu szczegółowych badań, których omawianie w tym miejscu nie wydaje się konieczne. Warto jednak zwrócić uwagę na możliwość molekularnego upośledzenia reakcji organizmu na stres. Jest to oczywista duża niedogodność dla osobnika. Tego typu sytuacja występuje u osobników chorych na gorączkę złośliwą (*malignant hyperthermia*) [12, 23, 24, 45]. Choroba ta jest spowodowana u człowieka transycją 1840C→T w 18 eksonie genu receptora ryanodiny (*RYR1*). Mutacja 1840C→T powoduje zmianę konformacji receptora mieszczącego się w kanale wapniowym w błonie reticulum sarkoplazmatycznego. W przypadku narkozy bądź innego silnego stresu następuje nieprawidłowy wypływ Ca^{2+} z retikulum sarkoplazmatycznego do cytozolu, co u homozygot allelu zmutowanego prowadzi do śmierci. U człowieka gen *RYR1* znajduje się na długim ramieniu chromosomu 19 w pozycji 19q13.1 (rys. 5). Zbudowany jest on ze 106 eksonów, z których w dwóch występuje alternatywny splicing [45]. Wielkość genu wynosi około 160 kb. W ludzkim genie *RYR1* występuje osiem mutacji, odpowiedzialnych za występowanie gorączki złośliwej (tab. 1). U świń w 17 eksonie genu *RYR1* stwierdzono 18 miejsc polimorficznych, ale tylko mutacja 1843C→T prowadzi do zmiany w sekwencji aminokwasów w wyniku substytucji argininy 615 na cysteinę i jest sprzężona z gorączką złośliwą przy współczynniku sprężenia dla $\theta_{max} = 0,0$ wynoszącym 102 [45]. W przypadku świń, czynnikami wywołującymi gorączkę złośliwą mogą być podwyższona temperatura otoczenia, stłoczenie zwierząt, poród, transport, intensywne ich przepędzanie, bicie, straszenie, narkoza halotanem. W efekcie czynniki te mogą spowodować hiperwentylację kanału wapniowego retikulum sarkoplazmatycznego i gwałtowny wypływ Ca^{2+} do cytozolu, intensywny rozpad glikogenu do kwasu mlekowego (beztlenowa glikogenoliza) w mięśniach, przy znacznym obniżeniu poziomu ATP i fosfokreatyny. Klinicznymi objawami są: podwyższona temperatura ciała, arytmia serca, szybkie i gwałtowne oddychanie, sinoczerwone zabarwienie skóry w postaci plam w okolicach uszu i podbrzusza oraz sztywnienie kończyn prowadzące do zejść śmiertelnych. Interesujące jest, że zmiany patologiczne w komórce osobników chorych występują



RYSUNEK 5. Mutacja C1840T w ludzkim genie RYR1 prowadzi do upośledzenia reakcji na stres

podczas narkozy (sztucznego wyłączenia świadomości), zatem w sytuacji, w której organizm nie odbiera żadnych bodźców, w tym także czynników stresujących.

Silny stres może prowadzić do uwolnienia wolnych rodników rozkładanych w sytuacji niedokrwienia mózgu przez dysmutazę nadtlenkową, katalazę, kwas moczowy i kwas askorbinowy [37]. Zmutowana forma dysmutazy prowadzi do śmierci komórek neuronowych na drodze stresu oksydacyjnego u ludzi i myszy [39].

Wolne rodniki wydają się odgrywać kluczową rolę w wielu chorobach, takich jak choroba Alzheimera [7], dystrofia mięśniowa Duchennea [25], uzależnieniu alkoholowym [58], uzależnieniu od palenia tytoniu [30], chorobie Parkinsona [11, 13], schizofrenii [49]. Wydaje się, że H_2O_2 jest ważnym czynnikiem utleniającym DNA i powodującym powstawanie uszkodzeń [1] oraz mutacji [51], przyczyniając się w rezultacie do powstania zmian nowotworowych [46]. Szczególnie podatny

TABELA 1. Mutacje w genie *RYR1* sprzężone z gorączką złośliwą (MH) oraz miopatią wrodzoną (CCD)

Substytucja aminokwasu	Substytucja nukleotydu	Ekson	Sprzężenie z	Autor
Arg ¹⁶³ →Cys	C487→T	6	MH, CCD	Quane i in. (1993)
Gly ²⁴⁸ →Arg	G742→A	9	MH	Gillard i in. (1992)
Gly ³⁴¹ →Arg	G1021→A	11	MH	Quane i in. (1994)
Ile ⁴⁰³ →Met	C1209→G	12	MH, CCD	Quane i in. (1993)
Tyr ⁵²² →Ser	A1565→C	14	MH, CCD	Quane i in. (1994)
Arg ⁶¹⁴ →Cys	C1840→T	18	MH	Gillard i in. (1991)
Arg ⁶¹⁵ →Cys (świnia)	C1843→T	17	MH, PSS	Fujii i in. (1991)
Gly ²⁴³⁴ →Arg	G3700→A	45	MH	Keating i in. (1994)
				Phillips i in. (1994)
Arg ²⁴³⁵ →His	G7304→A	45	MH, CCD	Zhang i in. (1993)

MH – *Malignant hyperthermia* (gorączka złośliwa)

CCD – *Central Core Disease* (miopatia wrodzona)

PSS – *Porcine Stress Syndrome* (zespół wrodzonej stresowości u świń)

na oddziaływanie wolnych rodników jest mtDNA, a w obszarach mózgu, które są szczególnie ekspozowane na działanie wolnych rodników, obserwuje się akumulowanie wyższych poziomów delecji mtDNA4977 [56]. Poziom skróconego o 4977 pz mtDNA wzrasta wraz z wiekiem w wielu tkankach [56]. H₂O₂ jest także potencjalną neurotoksyną wywołującą stres oksydacyjny, podobnie jak apoptotyczną śmierć neuronów [29]. Ciekawe jest także niekorzystne oddziaływanie wolnych rodników na miejsce telomerowe w chorobie Downa i schizofrenii [43].

Zatem stres stymuluje produkcję wolnych rodników, które z kolei mają właściwości mutagenne i karcenogenne. Podkreślić trzeba jednak wyraźnie, że w tym podrozdziale mowa jest tylko o stresorach o charakterze fizycznym bądź chemicznym.

Niektórzy onkolodzy intuicyjnie skłaniają się ku badaniom wpływu na występowanie i rozwój choroby nowotworowej czynników osobowości i związanej z tym podatności na stres emocjonalny [3, 10]. Zakłada się, że czynniki psychologiczne, do których można zaliczyć podatność na stres, nerwowość, depresyjność etc., mogą odgrywać istotną rolę szczególnie w raku sutka, jednak wyniki badań nie są jednak w tym zakresie jednoznaczne [3]. Dużą trudność stanowi poprawność metodyczna tego typu analiz, co wyraźnie ujawniło się w badaniach przeprowadzonych w Holandii. Kobietom powyżej 43 roku życia przesyłano formularze dotyczące takich cech ich osobowości, jak: wyrozumiałość, optymizm, umiejętność kontroli emocji, nerwowość, złość, podatność na depresję, racjonalność. Paradoksalnie, całkowitym nieporozumieniem i błędem metodycznym było wypełnianie tego typu formularzy przez same osoby zainteresowane, gdyż z założenia niemożliwa jest obiektywna ocena samego siebie. Jednak badania prowadzone w tym kierunku

są nie tylko ciekawe, ale mogą, jeśli je przeprowadzić poprawnie, dostarczyć przydatnych i praktycznych informacji także w dziedzinie onkologii.

W niniejszej pracy wykazano, że bodziec może oddziaływać na wszystkie przesłanie organizmu (mentalną, emocjonalną, fizyczną) oraz stwierdzono, że to oddziaływanie jest organizmowi niezbędne do życia. Brak możliwości odbierania bodźców (informacji) powoduje wystąpienie w ustroju niekorzystnych zmian, które w skrajnych przypadkach mogą nawet prowadzić do śmierci osobnika. Stresor jest szczególnie przypadkiem silnego bodźca.

Niekiedy może wystąpić w organizmie upośledzenie reakcji na stres o podłożu molekularnym, np. mutacje w genie *RYR1*. Silny stres oksydacyjny może prowadzić do uwolnienia się wolnych rodników, które mogą następnie oddziaływać mutagennie na DNA. Zatem silny bodziec w postaci stresu może w efekcie złożonego procesu reakcji organizmu powodować zmiany na poziomie molekularnym.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABU-SHAKRA A, ZEIGER E. Formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine following treatment of 2-deoxyguanosine or DNA by hydrogen peroxide or glutathione. *Mutat Res Toxicol Environ Mutag* 1997; **390**(1-2): 45–50.
- [2] AUTELITANO DJ, LUNDBLAD JR, BLUM M, ROBERTS L. Hormonal regulation of POMC gene expression. *Ann Rev Physiol* 1989; **51**: 715–726.
- [3] BLEIKER EMA, VAN DER PLOEG HM, HENDRIKS JHCL, ADER HJ. Personality and breast cancer development: a perspective longitudinal study. *J National Cancer Institute* 1996; **88**(20): 1478–1482.
- [4] BLOCK N. Consciousness and accessibility. *Behav Brain Sci* 1990; **13**(4): 596–598.
- [5] BRENNEIS CB. Memory system and the psychoanalytic retrieval of memories of trauma. *J Am Psychoan Ass* 1996; **44**(4): 1165–1187.
- [6] BURKE J. Tworzywa rewolucji, *Świat Nauki* 1997; **5**: 104–105.
- [7] BUTTERFIELD DA, HENSLEY K, COLE P, SUBRAMANIAM R, AKSENOV M, AKSENOVA M, BUMMER PM, HALEY BE, CARNEY JM. Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimers disease. *J Neurochem* 1997; **68**(6): 2451–2457.
- [8] CRONIN GM. The development and significance of abnormal stereotyped behavior in tethered sows. PhD Thesis, Agricultural University Wageningen, 1985.
- [9] CRONING G, WIEPKEMA PR, VAN REE JM. Endorphins implicated in stereotypies of tethered sows. *Experientia* 1986; **42**: 198–199.
- [10] CUIR J. Psychisme et cancer. *Cathiers Oncol* 1996; **5**(11): 360–361.
- [11] FALLON J, MATTHEWS RT, HYMAN BT, BEALT MF, FREESE A. MPP+ produces progressive degeneration which is mediated by oxidative stress. Gene therapy for Parkinsons disease: rationale prospects, and limitations. *Exp Neurol* 1997; **144**(1): 193–198.
- [12] FUJII J, OTSU K, ZORZATO F, DE LEON S, KHANNA VK, WEILER JE, O'BRIEN PJ, MACLENNAN DH. Identification of a point mutation in pocine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 1991; **253**: 448–451.

- [13] GASSEN M, YODIM MBH. The potential role of iron chelators in the treatment of Parkinsons disease and related neurological disorders. *Pharmacol Toxicol* 1997; **80**(4): 159–166.
- [14] EVANS AB, MILLER R. Jules Verne – wizjoner nie zrozumiał. *Świat Nauki* 1997; **6**: 70–75.
- [15] GILLARD EF, OTSU K, FUJII J, KHANNA VK, DE LEON S, DERDEMIZI J, BRITT BA, DUFF CL, WORTON RG, MACLENNAN DH. A substitution of Cysteine for Arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* 1991; **11**: 751–755.
- [16] GILLARD EF, OTSU K, FUJII J, DUFF CL, DE LEON S, KHANNA VK, BRITT BA, WORTON RG, MACLENNAN DH. Polymorphism and deduced amino acid substitutions and the coding sequence of the ryanodine receptor (RYR1) gene in the individuals with malignant hyperthermia. *Genomics* 1992; **13**: 1247–1254.
- [17] GRIFFIN DR. Myślenie zwierząt. *Świat Nauki* 1992; **2**: 105.
- [18] GROF S. Beyond the brain: birth, and transcendence in psychotherapy. State University of New York, Albany, 1985; str. 92–137.
- [19] GRONEK P. Znaczenie i konsekwencje percepcji bólu. *Przeg Hod* 1996a; **6**: 32–33.
- [20] GRONEK P. Endogenne związki opioidowe. *Med Wet* 1996b; **52**(9): 566–569.
- [21] GRONEK P, STANISŁAWSKI D, ROMANOWICZ K, SZLANDROWICZ S, ZABOROWSKI T. Wpływ płci, genotypu i elektronarkozy na poziom β -endorfiny u świń. *RoczAR Pozn* 1996c; **48**: cz. II: 129–136.
- [22] GRONEK P, SZLANDROWICZ S, STANISŁAWSKI D, ZABOROWSKI T. β -endorphine level after electric anaesthesia. 1996d; Int. Vet. Congr. Bolonia 7–10 June.
- [23] GRONEK P, SŁOMSKI R. Molecular basis of malignant hyperthermia. *J Appl Genet* 1997; **38**(3): 309–317.
- [24] GRONEK P, SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J. Molekularne podłoże podwyższonej wrażliwości świń na czynniki stresowe. *Med Wet* 1998; **4**(1): 29–32.
- [25] HAYCOCK JW, MACNEIL S, JONES P, HARIS JB, MANTLE D. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroraport* 1996; **8**(1): 357–361.
- [26] HERON W. The pathology of Boredom, *Sci Am* 1957; **1**: 25–29.
- [27] HOFFMANN R. Gdzie chemicy powinni szukać inspiracji? *Świat Nauki* 1993; **4**: 42–51.
- [28] HOGAN J. Myśliciel walczący: sylwetka Karla R. Poppera. *Świat Nauki* 1993; **1**: 15–17.
- [29] HOYT KR, GALLAGHER AJ, HASTINGS TG, REYNOLDS IJ. Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons. *Neurochem Res* 1997; **22**(3): 333–340.
- [30] KACMAZ M, SERDAR-OZTURK H, CETE S, KAVUTSU M, DURAK I. The effects of smoking on antioxidant defence system and membrane free fatty acid content of erythrocytes and plasma lipid parameters: protective role of antioxidant vitamins. *Nutr Res New York-NY* 1997; **17**(6): 931–940.
- [31] KEATING EK, QUANTE KA, MANNING MB, LEHANE M, HARTUNG E, CENSIER K, URWYLER A, KLAUSNITZER M, MULLER CR, HEFRON JJA, MCCARTHY TV. Detection of a novel RYR1 mutation in four malignant hyperthermia pedigrees. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1855–1858.
- [32] KEIGHTLEY M.C., FUNDER JW, FULLER PJ. Molecular cloning and sequencing of a guinea-pig pro-opiomelanocortin cDNA. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **82**: 89–98.
- [33] KENNES D, ODBERG FO, BOUQUET Y, DE RYCKE PH. Changes in naloxone and haloperidol effects during the development of captivity-induced jumping stereotypy in bank voles. *Eur J Pharmacol* 1988; **153**: 19–24.
- [34] KROLL J, FISZDON J, CROSBY RD. Childhood abuse and three measures of altered states of consciousness (dissociation, absorption, and mysticism) in female outpatient sample. *J Person Dis* 1996; **10**(4): 345–354.
- [35] KUCZYK R. 1998; (informacja ustna).

- [36] LAGERWEIJ E., NELIS P.C. The twitch in horses: a variant of acupuncture. *Science* 1984; **225**: 1172–1174.
- [37] MAENISHI O, ITO H, SUZUKU T. Acceleration of hypertensive cerebral injury by the inhibition of xantine-xantine oxidase system in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1997; **19**(4): 461–477.
- [38] MAINS RS, EIPPER B, LING N. Common precursor to corticotropin and β -endorphin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 3014–3018.
- [39] MENA MA, KHAN U, TOGASAKI DM, SULZER D, EPSTEIN CJ, PRZEDBORSKI S. Effects of wild-type and mutated copper/zinc superoxide dismutase on neuronal survival and L-DOPA-induced toxicity in postnatal midbrain culture. *J Neurochem* 1997; **69**(1): 21–33.
- [40] MILNER PM. Umysł według Donalda O. Hebba. *Świat Nauki* 1993; **3**: 64–70.
- [41] NELKIN N. Propositional attitudes and consciousness. *Philos Phenomen Res* 1989; **49**: 413–430.
- [42] NELKIN N. What is consciousness? *Philos Sci* 1993; **60**: 419–434.
- [43] OEXLE EK, ZWIRNER A. Advanced telomere shortening in respiratory chain disorders. *Hum Mol Genet* 1997; **6**(6): 905–908.
- [44] PHILLIPS MS, KHANNA VK, DE LEON S, FRODIS W, BRITT BA, MACLENNAN DH. The substitution of Arg for Gly2433 in the human skeletal muscle ryanodine receptors is associated with malignant hyperthermia. *Hum Mol Genet* 1994; **3**(12): 2181–2186.
- [45] PHILLIPS MS, FUJII J, KHANNA V K, DELEON S, YOKOBATA K, DE JONG P J, MACLENNAN DH. The structural organization of the human skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Genomics* 1996; **34**: 24–41.
- [46] PORTA C, MORONI M, GUALLINI P, TORI C, MARZATICO F. Antioxidant enzymatic system and free radicals pathway in two different human cancer cell lines. *Anticancer Res* 1996; **16**(5A): 2741–2747.
- [47] QUANE KA, HEALY JMS, KEATING KE, MANNING BM, COUCH FJ, PALMUCCI LM, DORIGUZZI C, FAGERLUND TH, BERG K, ORDING H, BENDIXEN D, MORTIER W, LINZ U, MULLER C, MCCARTHY TV. Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia. *Nature Genet* 1993; **5**: 51–55.
- [48] QUANE KA, HEALY JMS, KEATING KE, MANNING BM, COUCH FJ, PALMUCCI LM, DORIGUZZI C, FAGERLUND TH, BERG K, ORDING H, BENDIXEN D, MORTIER W, LINZ U, MULLER C, MCCARTHY TV. Mutation screening of the RYR1 gene malignant hyperthermia: detection of the novel Tyr to Ser mutation in a pedigree with associated central cores. *Genomics* 1994; **23**: 236–239.
- [49] REDDY RD, YAO JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostag Leukotr Ess* 1996; **55**(1-2): 33–43.
- [50] ROBERTS JL, HERBERT E. Characterization of a common precursor to corticotropin and β -lipotropin: identification of β -lipotropin peptides and their arrangement relative to corticotropin in the precursor synthesized in a cell free system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 5300–5304.
- [51] RUSTING RL. Dlaczego się starzejemy. *Świat Nauki* 1993; **2**: 84–95.
- [52] SEARLE JR. Consciousness, unconsciousness, and intentionality. *Philos Topics* 1989; **17**: 193–209.
- [53] SEARLE JR. Consciousness, explanatory inversion, and cognitive science. *Behav Brain Sci* 1990; **13**: 585–642.
- [54] SEARLE JR. Consciousness, attention and the connection principle. *Behav Brain Sci* 1993; **16**: 198–203.
- [55] SEYFARTH M, CHENEY DL. Czy mały myśla? *Świat Nauki* 1993; **2**: 52–59.
- [56] SOONG NW, DANG MH, HINTON DR, ARNHEIM N. Mitochondrial DNA deletions are rare in the free radical-rich retinal environment. *Neurobiol Aging* 1996; **17**(6): 827–831.

- [57] STOLBA A, BAKER N, WOOD-GUSH DGM. The characterization of stereotyped behavior in stalled sows by information redundancy. *Behaviour* 1983; **87**: 157–182.
- [58] THOME J, ZHANG J, DAVIDS E, FOLEY P, WEIJERS HG, WIESBECK GA, BONING J, RIEDERER P, GERLACH M. Evidence for increased oxidative stress in alcohol-dependent patients provided by quantification of *in vivo* salicylate hydroxylation products. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; **21**(1): 82–85.
- [59] WEIZMAN R, WEIZMAN A, TYANO S, SZEKELY G, WEISSMAN BA, SARYNE Y. Humoral-endorphin blood levels in autistic, schizophrenic and healthy subjects. *Psychopharmacol* 1984; **82**: 368–370.
- [60] WIEPKEMA PR. Developmental aspects of motivated behavior in domestic animals. *J Anim Sci* 1987; **65**: 1220–1227.
- [61] WIEPKEMA PR, SCHOUTEN WGP. Stereotypies in sows during chronic stress. *Psychother Psychosom* 1992; **57**: 194–199.
- [62] ZHANG Y, CHEN HS, KHANNA VK, DE LEON S, PHILLIPS MS, SCAPPERT K, BROTT BA, BROWNELL AKW, MACLENNAN DH. A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease. *Nature Genet* 1993; **5**: 46–50.

SWOISTE ODDZIAŁYWANIA PEPTYDOWYCH PALCÓW CYNKOWYCH Z KWASAMI NUKLEINOWYMI

SPECIFIC INTERACTION OF PEPTIDE ZINC FINGERS WITH NUCLEIC ACIDS

Małgorzata GIEL-PIETRASZUK, Mirosława Z. BARCISZEWSKA*

Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, Poznań

Streszczenie: W pracy przedstawiono aktualny postęp badań w dziedzinie domen białkowych określonych mianem palców cynkowych, obecnie wyróżniono dziesięć ich różnych typów. Przedyskutowano ich strukturę przestrzenną oraz analizowano mechanizm oddziaływań z kwasami nukleinowymi.

Słowa kluczowe: palce cynkowe, kod rozpoznawania białko-DNA

Summary: In the review the current progress in investigation of protein domains, called zinc fingers, is presented. There are ten different classes of zinc domains. Their tertiary structure and interaction with DNA and RNA is discussed.

Key words: zinc finger, protein-nucleic acids recognition code

1. WSTĘP

Podstawą wielu procesów biochemicznych jest oddziaływanie i swoiste rozpoznawanie białek z kwasami nukleinowymi. Badanie struktury białek pozwoliło na wyodrębnienie peptydów o charakterystycznej budowie domen odpowiedzialnych za wiązanie DNA [30,37,51]. Analiza natywnych białek oraz syntetycznych peptydów miała i ma na celu znalezienie ogólnych reguł rozpoznawania białko-DNA, ale jak dotąd kodu takiego nie znaleziono [12]. Na początku lat osiemdziesiątych wydawało się, że motywem dominującym w białkach wiążących DNA jest helisa-

skręt-helisa. Obecnie wiadomo już, że domeną nie mniej rozpowszechnioną są palce cynkowe. Oszacowano, że w organizmach ssaków ok. 1% białek ma palce cynkowe [42].

2. KLASYFIKACJA PALCÓW CYNKOWYCH

Badanie domen cynkowych zaczęło się w 1983 r., kiedy to zauważono, że czynnik transkrypcyjny polimerazy III (TFIIIA) z komórek jajowych żaby afrykańskiej *Xenopus laevis* o m. cz. 40 kDa katalizujący transkrypcję genów 5S rRNA i jednocześnie wiążący 5S rRNA, zawiera atomy cynku warunkujące jego aktywność [28]. Nieco później stwierdzono, że w sekwencji tego białka występuje 9 trzydziestoaminokwasowych odcinków (domen) z charakterystycznym układem dwóch reszt cysteiny i histydyny rozdzielonych 12–13 dowolnymi aminokwasami [9,25,38,48]. Ten powtarzający się fragment ma następującą sekwencję aminokwasową:

(Tyr, Phe)-X-Cys-X₂₋₄-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X_{3,4}-His-X₂₋₆ .

Wykazano, że kompleksy TFIIIA z 5S rRNA (7S RNP, ang. *ribonucleoprotein particle*) wyizolowane z komórek jajowych *Xenopus laevis* bez obecności czynników kompleksujących w buforze ekstrakcyjnym, zawierają 7–11 jonów cynkowych [44,67]. Dwóch z nich nie można usunąć z kompleksu ani przy pomocy EDTA ani fenantroliny ($K_a 10^{-9}$). Łatwo je natomiast uwolnić z TFIIIA niezwiązanego z 5S rRNA. Powinowactwo jonów metali do TFIIIA maleje w następującym szeregu: Zn>Cu>Hg>Cd>Co>Ni>Mn [44,67]. Niemniej jednak do rekonstrukcji cząsteczki 7S RNP niezbędna jest obecność cynku [28]. Na podstawie wszechstronnych badań zaproponowano hipotezę, wg której dwie reszty cysteinowe (C₂) i dwie histydynowe (H₂) wiążą jon cynku, tworząc charakterystyczną strukturę „palca cynkowego” [38].

Najbardziej interesującą właściwością palców cynkowych jest ich bezpośrednie zaangażowanie w specyficzne oddziaływanie i rozpoznawanie DNA. W niniejszej pracy omówione zostaną podstawowe zasady rozpoznawania DNA przez białka mające w swej strukturze palce cynkowe.

Pierwsze próby skonstruowania przestrzennego modelu palca cynkowego znajdującego w TFIIIA polegały na wykorzystaniu algorytmów oraz danych krystalograficznych zgromadzonych w bankach danych. Analizowano struktury białek zawierających sekwencje aminokwasów: Cys-X₂₋₄Cys oraz His-X₃-His mające potencjalne właściwości wiązania jonów metali. Wyselekcjonowano cztery białka, z których transkarbamylaza asparaginowa z *Escherichia coli* zawierająca sekwencję Leu-Lys-Cys-Lys-Tyr-Cys-Glu-Lys-Glu-Phe oraz rubredoksyna z *Clostridium pastorianum* z sekwencją Tyr-Thr-Cys-Thr-Val-Cys-Gly-Tyr-Ile-Tyr zawierały anty-

równoległą strukturę daszkową z dwoma resztami cysteiny wiążącymi cynk. Dwa następne białka termolizyna o sekwencji Val-Val-Ala-His-Glu-Leu-Thr-His oraz hemerytryna z *Thermiste dyscritum* o sekwencji Tyr-Ala-Glu-His-Lys-Lys-Ala-His zawierały helisę α z dwoma resztami histydyny koordynującymi jon metalu. Powyższe struktury cząstkowe zawierające fragmenty z dwoma resztami cysteinowymi i dwoma resztami histydynowymi połączono w celu otrzymania domeny palca cynkowego. Budowa palca cynkowego określona na podstawie badań NMR zawierająca strukturę β , helisę α oraz chiralne centrum metalu jest prawie identyczna z teoretycznie przewidywaną. Jedyną różnicą dotyczyła miejsca połączenia struktury β oraz helisy α [40]. Od momentu znalezienia pierwszego palca cynkowego (C_2H_2) pojawiło się szereg doniesień identyfikujących tę domenę w wielu innych białkach. Nie zawsze przypominają one swój pierwowzór. Ich cechą wspólną jest jednak koordynacja jonu cynkowego przez kombinacje reszt cysteinowych i histydynowych.

Ten bardzo zróżnicowany bank domen wiążących cynk nazywanych ogólnie palcami cynkowymi podzielono na 10 klas (tab. 1) (rys. 1) [5,62,64].

TABELA 1. Przykłady białek zawierających palce cynkowe

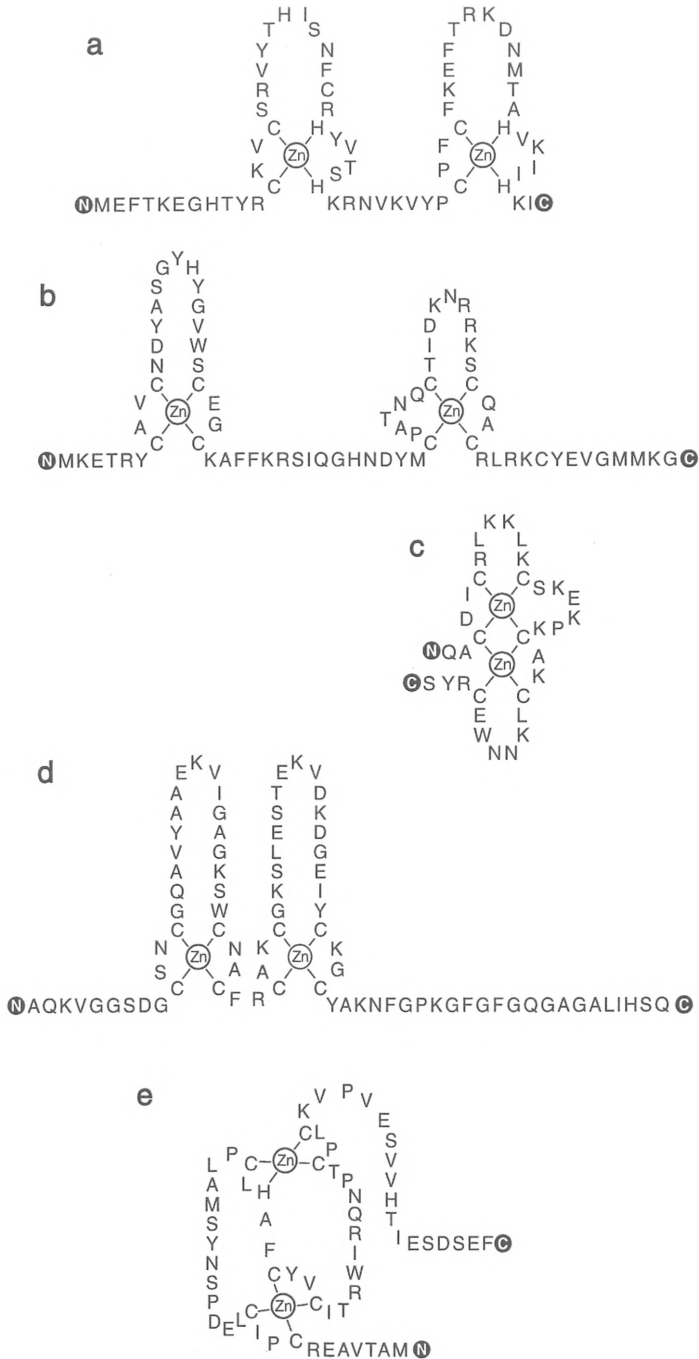
Typ palca cynkowego	Białko	Funkcja	Opis klasy
Cys ₂ His ₂	TFIIIA	Czynnik transkrypcyjny biorący udział w transkrypcji genów 5S rRNA (9 palców cynkowych)	Szczegółowy opis tej klasy palców zawarto w tekście [rys. 1a]. Inni przedstawiciele tej grupy to: ADRI-regulacja syntezy dehydrogenazy alkoholowej u drożdży (2 palce cynkowe); Evi1-produkt protoonkogenu (10 palców cynkowych); hunchback-produkt genu <i>hunchback</i> , regulującego segmentację u <i>Drosophila</i> ; Krüppel-produkt genu <i>Krüppel</i> regulującego segmentację u <i>Drosophila</i> ; Krox-20-produkt genu wczesnej odpowiedzi na sygnały mitogenne i stymulujące różnicowanie (3 palce cynkowe); Sp1-czynnik transkrypcyjny wiążący sekwencje bogate w G (3 palce cynkowe)
Cys ₂ Cys ₂	GR ER	Receptor glukokortykoidu Receptor estrogenu	Palec typu C ₂ C ₂ . Domenę ta znajduje się w receptorze glukokortykoidowym. Charakteryzuje się tym, że jon cynku (II) koordynowany jest przez cztery reszty cysteinowe (rys. 1b) [29,65]. Dwie cysteiny znajdują się na początku pętli, a dwie następne w helisie α . Całkowitą strukturę domeny wiążącej można przedstawić jako dwukrotne powtórzenie motywu pętla-helisa [63]. Białka zawierające domeny pętla-cynk-helisa wiążą się do DNA jako dimery, a o specyficzności wiązania decydują reszty aminokwasowe znajdujące się blisko końca aminowego pierwszej helisy, natomiast w tworzeniu dimeru uczestniczą aminokwasy znajdujące się na początku drugiej pętli. Helisa α receptora glukokortykoidowego w kompleksie z operatorem leży w dużej bruzdzie DNA, a łańcuchy boczne z jej drugiego i trzeciego skreću oddziałują z zasadami DNA [17,41,43, 73, 75]

Tabela 1 cd.

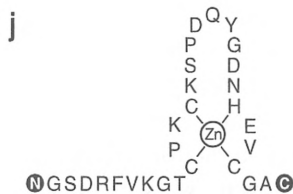
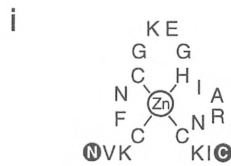
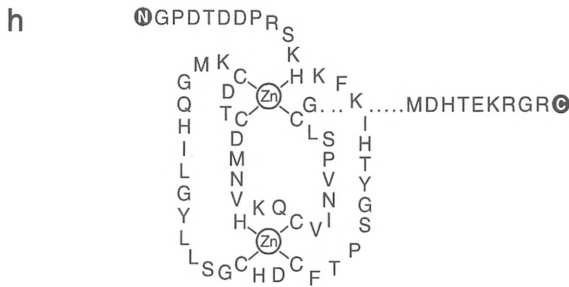
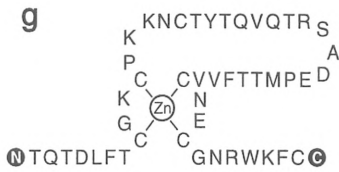
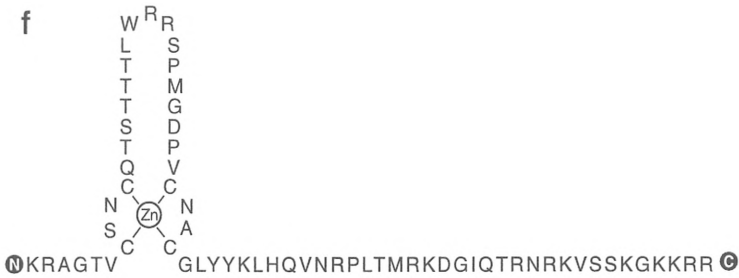
Typ palca cynkowego	Białko	Funkcja	Opis klasy
Cys ₆	GAL-4	Czynnik regulujący ekspresję genów kodujących enzymy metabolizujące galaktozę w drożdżach	Palec typu C ₂ C ₂ C ₂ występuje w czynniku transkrypcyjnym GAL-4 z drożdży. Sekwencja tej domeny jest następująca: CX ₂ CX ₆ CX ₆ CX ₂ CX ₆ C. Koordynuje ona dwa jony cynku tworząc kompleks przedstawiony na rys. 1c [45]. Analiza danych NMR wykazała, że każdy jon cynku wiązany jest przez 4 cysteiny [10,35,52]. GAL-4 wiąże się do DNA jako dimer, domeny cynkowe oddziałują w dużej bruździe. Helisy α pochodzące z dwóch monomerów usytuowane są równoległe względem siebie i oddziałują przez tzw. zamek leucynowy [35] usytuowany nad małą bruźdą DNA prostopadle do jego osi. Fragment głównego łańcucha białkowego łączący element rozpoznający z zamkiem leucynowym jest ułożony równoległe do szkieletu fosforanowego helisy DNA, z którym oddziałuje.
Cys ₄	GATA-1	Czynnik transkrypcyjny erytrocytów	Palec określony jako GATA-1 znaleziony został w czynniku transkrypcyjnym z erytrocytów [1]. Sekwencja w DNA (A/T)GATA(A/G) rozpoznawana przez to białko znajduje się w elemencie <i>cis</i> -regulatorowym wszystkich genów globiny. Palec cynkowy charakterystyczny dla tej grupy białek ma następującą sekwencję: CX ₂ CX ₁₇ CX ₂ C. Z uwagi na obecność 4 reszt cysteinowych można go porównać do palca znalezionego w receptorach glukokortykoidowych, niemniej jednak struktura przestrzenna tego motywu jest inna [50]. Specyficzną cechą kompleksu GATA-1/DNA jest krótka sekwencja (8 nukleotydów) rozpoznawana przez białko, z której tylko 6 par zasad uwikłanych jest w tworzenie wiązań z pojedynczym palcem [rys. 1f] [49].
LIM Cys ₂ His Cys-Cys ₄	isl-1, mec-3	Białko wiążące sekwencję enhancerową genu insuliny I u szczurów. Białko biorące udział w różnicowaniu neuronów u <i>C. elegans</i>	Palce typu LIM, nazwa pochodzi od trzech pierwszych liter nazw przedstawicieli tej rodziny – białek <u>L</u> in11 [24], <u>I</u> sl8 [36], <u>M</u> ec3 [76]. Polipetydy te charakteryzują się obecnością jednego lub trzech powtórzeń segmentu złożonego z 52 aminokwasów zawierającego dwa sąsiadujące palce cynkowe, o następującej sekwencji: [CX ₂ CX ₁₇ HX ₂ C]-X ₂ -[CX ₂ CX ₁₇ CX ₂ C/H/D]. Brak jak dotąd dowodów, że domena LIM bierze udział w rozpoznawaniu DNA. Stwierdzono natomiast, że obecność tej sekwencji jest niezbędna do dimeryzacji ludzkiego białka bogatego w reszty cysteiny (ang. <i>human cysteine rich protein</i> , <i>hCRP</i>) [rys. 1d] [23].

Tabela 1 cd.

RING	COP1	Produkt genu COPI <i>A. thaliana</i> odpowiedzialny za fotomorfogenezę	Palec typu RING, nazwa utworzona od skrótu <i>really interesting new</i> gen obejmuje następujące sekwencje: CX ₂ -pętla I-CXHX ₂ CX ₂ C-pętla II-CX ₂ C, stwierdzone w wielu białkach regulatorowych zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych (rys. 1e) [1]
Cys ₂ Cys ₂	TFIIS	Ludzki czynnik transkrypcyjny	Palec typu TFIIS stanowi motyw charakterystyczny dla ludzkiego czynnika transkrypcyjnego. Jego sekwencja odpowiada palcowi typu C ₂ C ₂ . Model przestrzenny tej domeny wyznaczony na podstawie badań NMR wykazuje istnienie struktury β złożonej z trzech antyrównoległych nici, jon cynku koordynowany jest przez reszty cysteinowe, z których dwie znajdują się w N-końcowej części domeny dwie pozostałe w pętli łączącej kolejne nici struktury β. Do tej pory wykazano zdolność wiązania tego białka do DNA, jak i hybrydu DNA-RNA. Mechanizm oddziaływania nie został jednak wyjaśniony (rys. 1g) [58].
Cys ₂ His Cys Cys ₃ His Cys ₄	bmi-1, NCP	Produkt genu bmi-1 Molony Murine Leukemia, białko nukleokapsydu wirusa	W białku gag o m. cz. 55 kDa z wirusów HIV oraz białkach Mo-MuLeV stwierdzono występowanie pojedynczej sekwencji aminokwasów CX ₂ -CX ₄ -HX ₄ -C [27,70]. Brak jednak jednoznacznych dowodów na obecność cynku w strukturze tych białek. Istnieją jednakże pewne przesłanki, że bierze ona udział w rozpoznawaniu RNA [26]. Badania kompleksu domeny cynkowej z wirusa HIV z fragmentem ACGCC wykazały zdolność tego białka do wiązania jednoniciowego RNA (rys. 1i) [69].
Cys ₄ lub Cys ₃ His	MetRS	Syntetaza metioniny-tRNA <i>E. coli</i> i <i>T. thermophilus</i>	Domene wiążącą cynk znaleziono także w syntetazie metioniny-tRNA, jej sekwencja jest następująca CX ₂ -CX ₉ -CX ₂ -C dla <i>E.coli</i> oraz CX ₂ -CX ₁₃ -CX ₃ -H dla <i>T. thermophilus</i> (rys. 1j) [39]. Wykazano, że obecność cynku ma istotne znaczenie dla zachowania właściwości katalitycznych tego enzymu. Brak jednak jak dotąd przekonujących dowodów, że ta domena cynkowa zaangażowana jest w rozpoznawanie kwasów nukleinowych.
Cys ₆ His ₂	PKC	Kinaza białkowa C bierze udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych	Palec C ₆ H ₂ , występuje w kinazie białkowej (PKC). Każdy z dwóch jonów cynku koordynowany jest za pomocą trzech reszt cysteinowych i jednej histydynowej. Budowa przestrzenna tej domeny przypomina palec typu RING. Można ją przedstawić jako układ zbudowany z dwóch struktur β złożonych z trzech i dwóch nici, spięty na końcach jonami cynku. Obie struktury mają charakter hydrofobowy od wewnątrz i hydrofilowy na zewnątrz. Ogólny wzór tej domeny można zapisać następująco: H-X ₁₂ -CX ₂ -CX ₁₀₋₁₄ -CX ₂ -CX ₄ -HX ₂ -CX ₇ -C (rys. 1h) [32].



RYSUNEK 1. Zestawienie znanych typów palców cynkowych występujących w: a) czynnika transkrypcyjnym IIIA *X. laevis* (C_2H_2), b) fragmencie receptora estrogenowego (C_2C_2), c) domena typu $C_2C_2C_2$ z czynnika transkrypcyjnego GAL-4, d) domena LIM; e) palec typu RING,



RYSUNEK 1 cd. Zestawienie znanych typów palców cynkowych występujących w: f) domena czynnika transkrypcyjnego GATA-1, g) palec występujący w czynniku transkrypcyjnym IIS, h) C₆-H₂ – domena kinazy białkowej, i) domena wiążąca w białku płaszczka wirusa HIV, j) metionilo tRNA^{Met} syntetaza (MetRS)

3. MECHANIZM ODDZIAŁYWANIA BIAŁEK ZAWIERAJĄCYCH PALCE CYNKOWE Z DNA

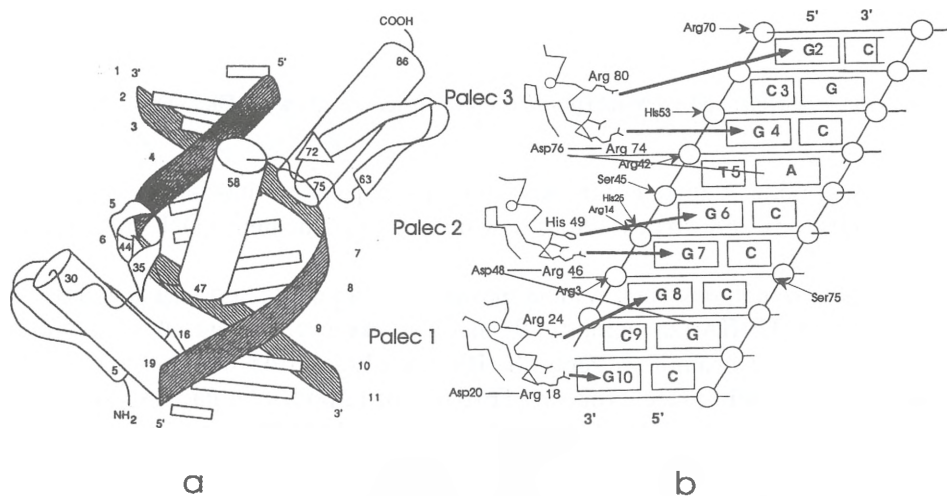
Liczba palców cynkowych w różnych białkach jest różna i może się wahać od 1 do 37 [6,60]. Elementy te mogą występować pojedynczo lub w grupach. Wyniki badań czynników transkrypcyjnych (jak np. TFIIIA i SP1) sugerowały, że właśnie palce cynkowe decydują o swoistości wiązania DNA przez białka.

Mechanizm specyficznego rozpoznawania DNA przez białka zawierające palce cynkowe omówimy na przykładzie kompleksu czynnika transkrypcyjnego Zif268 z DNA (Zif268-DNA) [53]. Polipeptyd Zif268 z myszy zawierający trzy palce cynkowe oraz DNA o długości 12 par zasad wykrystalizowano, a następnie rozwiązano jego strukturę z rozdzielczością 2.1 Å i 1.6 Å [21,53]. W eksperymencie użyto DNA o sekwencji (5') GCGTGGGCG (3') oraz petydu Zif268, którego pojedynczą domenę można przedstawić następująco: X-(Thr,Phe)-X-Cys-X₂-Cys-X₃-Phe-X-Arg(13)-X-Asp-Glu/His(16)-Leu-X-Arg/Thr(19)-His-X₃-His. Każdy palec cynkowy rozpoznaje 3 pary zasad w DNA. Aminokwas znajdujący się bezpośrednio przed helisą α oraz aminokwasy drugi, trzeci i szósty tworzące helisę wydają się być kluczowe dla oddziaływania z DNA. Palce 1 i 3 mają w tych pozycjach argininę (R), kwas asparaginowy (D), glutaminę (L), argininę (R) podczas gdy palec 2 argininę, kwas asparaginowy, histydyne (H) i treoninę (T). Zif268 wiąże się do DNA w dużej bruździe (rys. 2a).

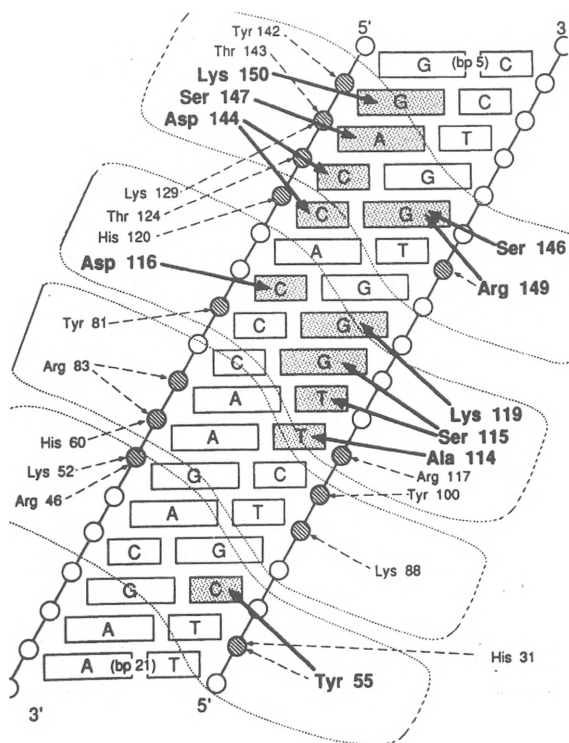
W strukturze krystalicznej kompleksu Zif268-DNA stwierdzono 17 wiązań wodorowych z tego 6 bezpośrednio z zasadami (rys. 2b). Aminokwasy zaangażowane w rozpoznawanie znajdują się w pozycjach 13, 16, 19 każdej domeny. Palce pierwszy i trzeci zawierają Arg(13), Glu(16), Arg(19) i oddziałują z sekwencją GCG, podczas gdy drugi palec zawierający Arg(13), His(16) i Thr(19) oddziałuje z sekwencją TGG. Na rysunku zaznaczono wiązania między Arg18(P1), Arg46(P2), Arg74(P3), Arg24(P1) i Arg80(P3) a rozpoznawanymi przez nie resztami guanozynowymi w pozycjach odpowiednio 10, 8, 7, 4 i 2 oraz His49 i G6. Kwas asparaginowy w pozycji 20, 48 i 76 tworzy wiązania z łańcuchami bocznymi arginin oraz oddziałuje z A10', C7' i A4' za pośrednictwem cząsteczki wody. Ponadto zauważono wiązania wodorowe pomiędzy aminokwasami a grupami fosforanowymi szkieletu DNA (rys. 2b). Ludzki czynnik transkrypcyjny (SP1) zawiera także trzy palce cynkowe i rozpoznaje sekwencję GGGGCGGGG. Jednakże białko Hunchback z *Drosophila* rozpoznaje sekwencję AAAAAA, ludzkie białko glioblastoma (GLI) swoiście wiąże TGGTGGTC, a regulator transkrypcji genu *fushi tarazu* z *Drosophila* – tramtrack (TTK) sekwencję AAGGAT. Struktury krystalograficzne kompleksów tych białek z DNA wykazały, że sposób oddziaływań w tych przypadkach jest nieco inny niż dla Zif268 [22,54]. Białko GLI mające 5 palców cynkowych rozpoznaje DNA za pośrednictwem czterech, z których tylko 4 i 5 decydują o specyficzności od-

działania tworząc wiązania z zasadami w dużej bruzdzie (Lys150-G, Ser147-A, Asp144-C, Ser146-G, Arg149-G, Asp116-C, Lys119-G, Ser115-G/T, Ala114-T). Palce 2 i 3 oddziałują z grupami fosforanowymi, natomiast palec 1 z palcem 2, a nie helisą DNA [54] [rys. 3]. Palce 4 i 5 także tworzą wiązania ze szkieletem. Jak zatem widać, w sposobie rozpoznawania DNA przez oba te białka istnieją pewne podobieństwa (białko oplata DNA wzdłuż dużej bruzdy) w szczegółach jednak dają się zauważyć dość istotne różnice. Parametry struktury DNA w tym kompleksie, poza obszarem wiązania 15-21 pz nie odbiegają od charakterystycznych dla formy B. Zaobserwowano tylko nieznaczne przemieszczenie położenia zasad i pogłębienie dużej bruzdy. Region obejmujący nukleotydy 7-15, a zatem zaangażowany w wiązanie wykazuje strukturę pośrednią między formą A i B. W tym fragmencie duża bruzda jest wyjątkowo głęboka, a mała bruzda szeroka. Region obejmujący zasady 2-7 ma cechy C-DNA, duża bruzda jest płytka, a średnica DNA mała [54]. Struktura palców w GLI jest bardzo podobna do obserwowanej w Zif268. Nieznaczne różnice dotyczą tylko odległości między histydynami, która wynosi 3 aminokwasy dla palców 2 i 3 oraz 4 dla palców 1, 4 i 5. Palec 1 nie biorący udziału w rozpoznawaniu DNA tworzy wiązania typu białko-białko z palcem 2. Konformacje sekwencji łączących poszczególne palce w GLI również nie odbiegają od analogicznych w Zif268. Z powyższych rozważań wynika, że w kompleksie Zif268-DNA każdy z palców wnosi taki sam wkład do wiązania, podczas gdy w GLI-DNA palce pozostają nierównocenne.

W kompleksie TTK-DNA (ang. *tramtrack*, *TTK*) stwierdzono, że w rozpoznawaniu udział bierze reszta seryny tworząca wiązanie z tyminą. Znajduje się



RYSUNEK 2. a – Struktura przestrzenna kompleksu Zif268-DNA, polipeptyd zawierający palce cynkowe układa się wzdłuż dużej bruzdy DNA; b – schemat oddziaływań poszczególnych palców cynkowych Zif268 z zasadami w dużej bruzdzie DNA [21,52]

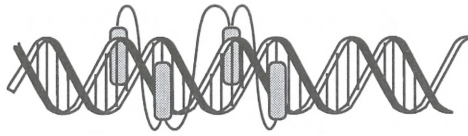


RYSUNEK 3. Schemat oddziaływania poszczególnych palców cynkowych GLI z DNA [54]

ona w innej pozycji aniżeli aminokwasy rozpoznające w omawianych wyżej przykładach GLI i Zif268, co powoduje, że w trakcie wiązania helisa DNA ulega zgięciu o ok. 20° [22].

Powyższe dane pozwalają wysnuć pewne wnioski co do sposobu wiązania całej cząsteczki np. TFIIIA (zawierającej 9 palców cynkowych), która jak wiadomo rozpoznaje fragment promotora genu 5S rRNA o długości 45 nukleotydów. W proponowanym modelu palce cynkowe TFIIIA można podzielić na trzy grupy: palce 1-3 i 7-9 oddziałują z DNA w sposób podobny do Zif268, natomiast fragment zawierający palce 4-6 jest nieco bardziej wydłużony i układa się równolegle wzdłuż cząsteczki DNA [31]. Z analiz biochemicznych wiadomo, że palce 1-3 oddziałują z fragmentem obejmującym nukleotydy 81-96 (box C), palce 7-9 z nukleotydami 42-61 (box A), natomiast palce 4-6 oddziałują z nukleotydem 74 nici kodującej

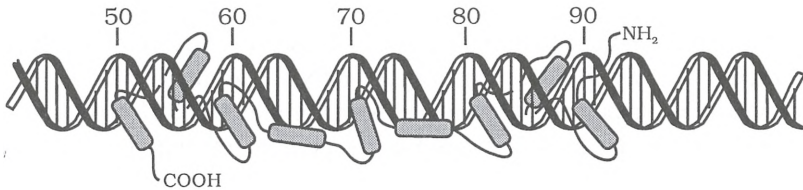
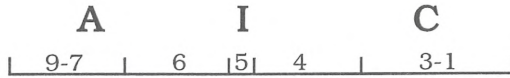
Model I



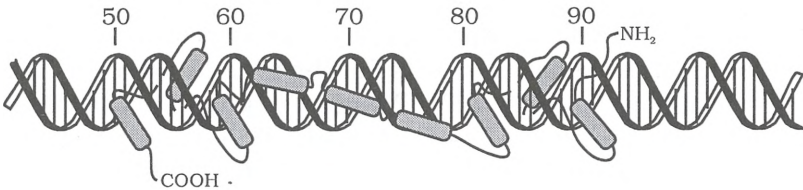
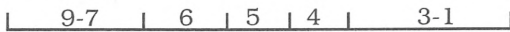
Model II



Model III



Model IV



RYSUNEK 4. Modele oddziaływań w kompleksie TFIIIA-DNA: model I zakłada, że TFIIIA oplata helisę DNA wzdłuż dużej bruzdy podobnie jak w kompleksie Zif268-DNA; w modelu II – cząsteczka TFIIIA leży po jednej stronie DNA, a poszczególne palce wnikają w dużą bruzdę; modele III i IV różnią się położeniem palca 5, w modelu III oddziałuje w dużej bruzdzie DNA, a w modelu IV ułożony jest równoległe do osi helisy [3,4,74]

i 69 niekodującej (rys. 4) [7,31,46,55,57,74]. Według innego modelu palec 5 nie jest ułożony równoległe do osi helisy, ale układa się w dużej bruzdzie oddziałując z nukleotydami 69-71 (rys. 4) [15].

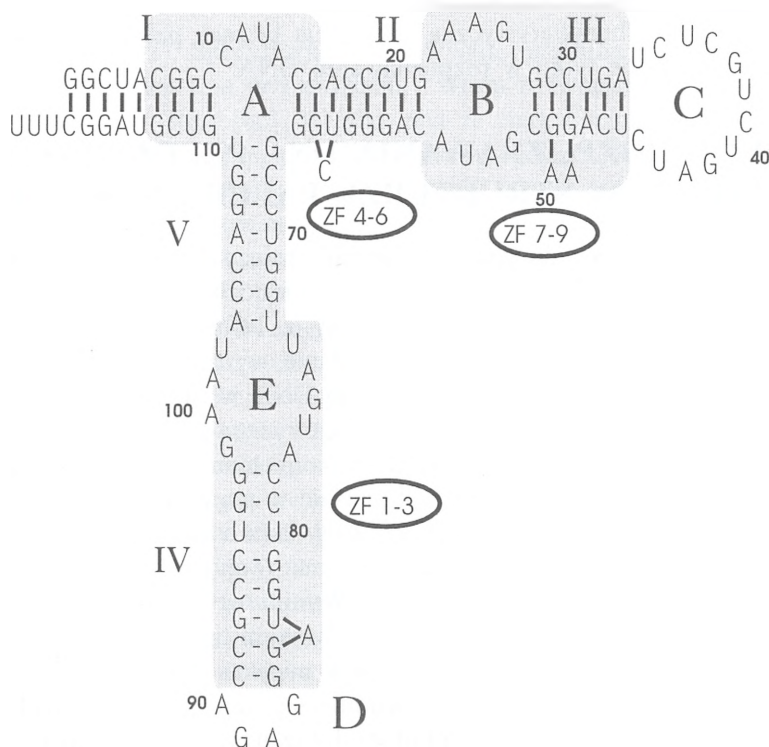
4. KOMPLEKSY BIAŁEK ZAWIERAJĄCYCH PALCE CYNKOWE Z KWASAMI RYBONUKLEINOWYMI

Wśród białek zawierających palce cynkowe i rozpoznających RNA bez wątpienia najlepiej poznanym pozostaje czynnik transkrypcyjny IIIA z *X. laevis*. W poprzednim rozdziale omówiono sposób oddziaływania TFIIIA z DNA, w którym kluczową rolę spełniają palce 1-3 od N-końca [8,14,18]. W przypadku 5S rRNA najistotniejsze dla prawidłowego rozpoznawania są palce 4-7 [16]. Szczegółowa analiza kompleksu 5S rRNA z TFIIIA jak również jego fragmentami pozwoliła na wyznaczenie miejsca wiązania poszczególnych palców do cząsteczki RNA (rys. 5).

Stwierdzono mianowicie, że palce 1-3 oddziałują z pętlą D i helisą IV, palec 4 z pętlą E, p5 z helisą V, p6 z pętlą A, p7 z helisą II a p8-9 z pętlami B i C oraz helisą II. Z badań wynika również szczególne znaczenie palca 6 w rozpoznawaniu 5S rRNA, który jako jedyny tworzy kompleks przy wysokim stężeniu jonów Mg^{2+} w buforze. W jego sekwencji znaleziono tryptofan w pozycji 177 i tyrozynę w 180, co jest cechą unikalną wśród domen cynkowych [72]. Najkrótszy fragment zachowujący zdolność wiązania 5S rRNA obejmuje palce 4, 5 i 6. Na podstawie wyników eksperymentów mapowania kompleksu 5S rRNA z fragmentem TFIIIA zawierającym palce 4-6 wiadomo, że peptyd ten wiąże się do helisy II i V oraz pętli A.

Wykazano również, że mutacje w następujących regionach 5S rRNA: 10-13, 16-21, 57-62, G66C, 71-72, 73-76, 99-101, 105-108 U109C w znacznym stopniu zmniejszają zdolność oddziaływania z TFIIIA jak i polipeptydem zawierającym palce 4-7. Mutacje: w pozycjach 41-44, 103-104 obniżają powinowactwo 5S rRNA do całej cząsteczki TFIIIA ale nie wpływają na wiązanie z peptydem 4-7. Natomiast zmiany w sekwencji w regionie 14-15, 14-15/64-65, 22-26, 64-65, 67-70, 78-81, 96-101 wywołują efekt odwrotny [47]. Wymiana pojedynczych nukleotydów w pozycjach: C19→G, C57→G, A58→C, A58→U, G59→U, G59→C, G60→C, G61→A, C63→G, G64→U, G65→C, G71→C, U76→G, A77→C, A101→C, G108→U oraz insercje i delecje nukleotydu w pozycji 66 powodują utratę zdolności wiązania TFIIIA przez 5S rRNA [56]. Mutacje w pętli A szczególnie w pozycji A13 jak również G66 i U109 powodują 4-10-krotne obniżenie stałej dysocjacji kompleksu [2]. Bez większego wpływu na tworzenie kompleksu natomiast pozostawały mutacje w helisie IV i pętli D, co wskazuje, że palce 1-3 tworzą wiązania ze szkieletem fosforanowym. Istotne natomiast dla wiązania okazały się mutacje w pętli E [59]. Podobnie jak delecja czterech (6789) lub pięciu palców (56789) od końca aminowego lub pięciu palców (12345) od końca karboksylowego TFIIIA [56]. Hydroliza cząsteczki 7S RNP [72] oraz kompleksu otrzymanego w wyniku podstawienia 5S rRNA otrzymanego techniką *in vitro* [56] za pomocą RNazy VI

dały podobne wyniki z wyjątkiem danych dla helisy IV w okolicy nukleotydu 80, gdzie obserwowano dodatkowe ochranianie [56]. Usunięcie trzech pierwszych palców od końca aminowego (-123) powodowało wzrost wrażliwości na hydrolizę za pomocą V1 w helisie IV, natomiast eliminacja palców -789 spowodowała wzrost podatności na hydrolizę helisy III. Na tej podstawie wyciągnięto wnioski, że palce N123C wiążą się do helisy IV a palce N789C do helisy III natomiast palce N456C do fragmentu obejmującego helisy II i V oraz pętlę A. Nieco inny model rozmieszczenia palców na powierzchni cząsteczki 5S rRNA zaproponowano na podstawie badań wiązania peptydu zawierającego cztery środkowe palce N4567C [2]. Wyznaczono, że ten peptyd ochrania przed hydrolizą helisy II, IV i V oraz pętlę A, E i 3'-końcową część pętli B. Na podstawie danych eksperymentalnych stwierdzono, że palce 1-3 oddziałują z pętlą D i częścią helisy IV, a palce 8 i 9 z fragmentem pętli B i C oraz helisą III. Zgodnie z tym modelem palec 4 wiąże się do pętli E, 5 do helisy V, 6 do pętli A, a 7 do helisy II i części pętli B [47]. Brak jak dotąd eksperymentalnych danych świadczących o specyficznym rozpoznawaniu zasad przez białko.



RYSUNEK 5. Struktura drugorzędowa cząsteczki 5S rRNA, z *X. laevis* : zaciemniono obszar cząsteczki zaangażowany w oddziaływanie z TFIIIA, z boku cyframi podano numer kolejnego palca oddziałującego w danym miejscu

W analizie oddziaływania TFI_{IIA} z 5S rRNA wykonano również hydrolizę kompleksu za pomocą chemicznych nukleaz. Wyniki uzyskane w tym eksperymencie wskazują, że fragment 5S rRNA chroniony przed hydrolizą za pomocą wolnych rodników w kompleksie obejmuje nukleotydy: 5-9, 16-24, 31-35, 43-46, 49-54, 58-106. Nie osłaniane pozostają nukleotydy pętli A (10-13) w pętli B (25, 26, 55-57) i C (36-41) oraz we fragmentach helikalnych: 27-30, 47,48, 62, 63. Modyfikacje w pozycjach 73-77 i 98-107 przeszkadzają w tworzeniu kompleksu. Wyniki te doprowadziły autorów do wniosku, że pętla A nie jest elementem krytycznym dla wiązania TFI_{IIA} warunkuje jednak właściwą konformację dwóch ramion cząsteczki, szczególnie domeny γ , która pozostaje w ścisłym kontakcie z cząsteczką białka [19].

Drugim białkiem wiążącym specyficznie 5S rRNA, mającym również 9 palców cynkowych typu TFI_{IIA} jest p43. Wykazuje ono 33% homologii do TFI_{IIA} i nie wiąże DNA [34]. Sposób oddziaływania z 5S rRNA jest dla obu tych białek bardzo podobny. Różnica polega tylko na tym, że palce ważne dla rozpoznawania 5S rRNA w TFI_{IIA} znajdują się bliżej końca karboksylowego natomiast w p43 aminowego. Porównanie sekwencji obu tych fragmentów nie wykazało istotnych podobieństw [18,61]. Charakterystyczna sekwencja łącząca palce 1 i 2 wydaje się mieć istotne znaczenie tylko w rozpoznawaniu DNA.

5. KOD ROZPOZNAWANIA DNA PRZEZ BIAŁKA MAJĄCE W STRUKTURZE PALCE CYNKOWE

Na podstawie analizy sekwencji białek zawierających palce cynkowe [33,53] oraz badań krystalograficznych stwierdzono, że kluczowymi dla wiązania DNA są aminokwasy w pozycjach -1, +3 i +6 helisy α . Informacja ta stanowiła punkt wyjścia dla dalszych badań mających za zadanie wyznaczenie korelacji między strukturą pierwszorzędową białka a sekwencją DNA w miejscu rozpoznawanym. W tym celu przygotowano bibliotekę kombinatoryczną palców cynkowych o sekwencji odpowiadającej białku Zif268 umieszczonych na powierzchni bakteriofaga fd. Palce te miały przypadkowe mutacje właśnie w pozycjach -1, +3 i +6 helisy. Tak przygotowane fagi wiązanie z oligonukleotydami o sekwencji odpowiadającej miejscu wiązania Zif268, w którym kolejno mutowano pozycje trypletu rozpoznawanego przez analizowany palec [11,12]. Wyniki tego eksperymentu wskazują, że najczęściej występującą zasadą w rozpoznawanym tryplecie jest guanina, jeśli znajduje się ona w pozycji 5' lub 3', wtedy w miejscu +6 lub -1 helisy α palca znajduje się arginina. Jeśli natomiast znajduje się ona w środku trypletu, to w pozycji +3 występuje histydyna. Argininie -1 towarzyszy kwas asparaginowy w pozycji +2. Adenina przy końcu 3' rozpoznawana jest przez glutaminę, której towarzyszy alanina +2. Tryplet z adeniną w środku wiązany był przez palec z asparaginą

TABELA 2. Zestawienie aminokwasów znajdujących się w helisie α preferencyjnie rozpoznających określone nukleotydy

Nukleotydy	Pozycja w tryplecie		
	5'	środkowy	3'
G	Arg6 Ser6/Asp2* Thr6/Asp2*	His3	Arg-1/Asp2
A		Asn3	Gln-1/Ala2
T	Ser6/Asp2* Thr6/Asp2*	Ala3 Ser3 Val3	Asn-1 Gln-1/Ser2
C		Asp3 Leu3 Thr3 Val3	Asp-1

*- oznacza aminokwas z sąsiedniego palca cynkowego wspomagający wiązanie.

w pozycji +3 (tab. 2). Specyficzne oddziaływania arginina - guanina oraz asparagina/glutamina z adeniną przewidziano, zanim rozwiązano pierwszą strukturę kompleksu białko - DNA [66]. Wynika ona ze stereochemicznego dopasowania obu składników, jeśli znajdują się one w tej samej płaszczyźnie [66]. Kod zawarty w tabeli 2 przedstawia preferencje w tworzeniu wiązania między aminokwasami a zasadami, jakie zaobserwowano w opisanym powyżej eksperymencie. Nie oznacza to jednak, że każda kombinacja będzie tworzyć wiązania z jednakowym powinowactwem, trzeba bowiem pamiętać, że pozycje -1, +3 i +6 nie znajdują się w tej samej odległości od DNA, zatem środkowy aminokwas powinien mieć krótszy łańcuch boczny aniżeli pozostałe. Jeśli ten warunek nie jest spełniony, to może tworzyć się więcej wiązań i sekwencja rozpoznawana przez jeden palec może być dłuższa [12]. Opisane powyżej zasady otwierają nowe możliwości projektowania palców cynkowych o określonej specyficzności [13,20]. Ostatnio także zarówno wśród palców występujących naturalnie, jak i otrzymanych sztucznie znaleziono takie, które wiążą hybrydy RNA-DNA; w wielu przypadkach z większym powinowactwem aniżeli DNA [68]. Inną ciekawą własnością palców cynkowych jest możliwość uczestniczenia w wiązaniu białko - białko, co zaobserwowano dla białka będącego produktem genu *Ikaros*. Białko to ma 6 palców typu TFIIIA, z których 4 pierwsze oddziałują z DNA, a dwa pozostałe zaangażowane są w tworzenie dimeru [71].

6. UWAGI KOŃCOWE

Kod rozpoznawania DNA przez białka został zaproponowany do tej pory jedynie dla białek zawierających palce cynkowe typu TFIIIA. Być może wynika to faktu, że białka te wiążą się do DNA jako monomery, a powtarzające się domeny cynkowe, przez które następuje wiązanie, mają zachowawczą strukturę trzeciorzędową i mogą „odczytywać” sekwencję DNA wzdłuż dużej bruzdy. Palec cynkowy jest tak usytuowany, że oddziaływanie między łańcuchami bocznymi aminokwasów a nukleotydami opiera się na prostej zasadzie komplementarności, co przypomina sposób wiązania trzeciej nici DNA w trypleksie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ARNIM AG, DENG X-W, Ring finger motif of *Arabidopsis thaliana* COP1 defines a new class of zinc-binding domain. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19626–19631.
- [2] BAUDIN F, ROMANIUK PJ, ROMBY P, BRUMEL C, WESTHOF E, EHRESMANN B, EHRESMANN C. Involvement of „hinge” nucleotides of *Xenopus laevis* 5 S rRNA in the RNA structural organization and in the binding of transcription factor TFIIIA. *J Mol Biol* 1991; **218**: 69–81.
- [3] BERG JM. Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 99–102.
- [4] BERG JM. Zinc finger domains: From predictions to design. *Acc Chem Res* 1995; **28**: 14–19.
- [5] BERG JM, SHI Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 1996; **271**: 1081–1085.
- [6] BALDARELLI RM, MAHONEY PA, SALAS F, GUSTAVSON E, BOYER PD, CHANG R-F, ROARK M, LENGYEL JA. Transcripts of the *Drosophila* blastoderm-specific locus, terminus, are concentrated posteriorly and encode a potential DNA-binding finger. *Dev Biol* 1988; **135**: 85–95.
- [7] BAZETT-JONES DP, BROWN ML. Electron Microscopy reveals that transcription factor TFIIIA bends 5S DNA. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 336–341.
- [8] BOGENHAGEN DF. Proteolytic footprinting of transcription factor TFIIIA reveals different tightly binding sites for 5S RNA and 5S DNA. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 5149–5158.
- [9] BROWN RS, SANDER C, ARGOS P. The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Letters* 1985; **186**: 271–274.
- [10] CAREY M, KAKIDANI H, LEATHERWOOD J, MOSTASHARI F, PTASHNE M. An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer. *J Mol Biol* 1989; **209**: 423–432.
- [11] CHOO Y, KLUG A. Toward a code for interactions of zinc fingers with DNA: Selection of randomized fingers displayed on phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11163–11167.
- [12] CHOO Y, KLUG A. Physical basis of a protein recognition code. *Curr. Opin Struct Biol* 1997; **7**: 117–125.
- [13] CHOO Y, SANCHEZ-GARCIA I, KLUG A. *In vivo* repression by site - specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature* 1994; **372**: 642–645.
- [14] CHRISTIANSEN JH, HANSEN PK, LILLELUND O, THOGERSEN HC. Sequence-specific binding of the N-terminal three-finger fragment of *Xenopus* transcription factor IIIA to the internal control region of a 5S RNA gene. *FEBS Letters* 1991; **281**: 181–184.

- [15] CLEMENS KR, LIAO X, VOLF V, WRIGHT PE, GOTTESFELD JM. Definition of the binding sites of individual zinc fingers in the transcription factor IIIA-5S RNA gene complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10822–10826.
- [16] CLEMENS KR, WOLF V, MC BRYANT SJ, ZHANG P, LIAO XB, WRIGHT PE, GOTTESFELD JM. Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein. *Science* 1993; **260**: 530–533
- [17] DANIELSON M, HINCK L, RINGOLD GM Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* 1987; **57**: 1131–1138.
- [18] DARBY MK, JOHO KE, Differential binding of zinc fingers from *Xenopus* TFIIIA and p43 to 5S RNA and the 5S RNA gene. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 3155–3164.
- [19] DARSILLO P, HUBER PW. The use of chemical nucleases to analyze RNA-protein interactions. The TFIIIA-5 S rRNA complex. *J Biol Chem* 1991; **266**: 21075–21082.
- [20] DESJARLAIS JR, BERG JM. Use of a zinc finger consensus sequence framework and the specificity rules to design specific DNA - binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2256–2260.
- [21] ELROD-ERICKSON M, ROULD MA, NEKLUDOVA L, PABO CO. Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger - DNA interactions. *Structure* 1996; **4**: 1171–1180.
- [22] FAIRALL L, SCHWABE JWR, CHAPMAN L, FINCH JT, RHODES D. The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature* 1993; **366**: 483–487.
- [23] FEUERSTEIN R, WANG X, SONG D, COOKE NE, LIEBHABER SA. The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10655–10659.
- [24] FREYD G, KIM SK, HORVITZ HR. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene lin-11. *Nature* 1990; **344**: 876–879.
- [25] GINSBERG AM, KING BO, ROEDER RG. *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell* 1984; **39**: 479–289.
- [26] GORELICK RJ, HENDERSON LE, HANSER JP, REIN A. Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a „zinc finger-like” protein sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8420–8424.
- [27] GREEN LM, BERG JM. A retroviral Cys-Xaa2-Cys-Xaa4-His-Xaa4-Cys peptide binds metal ions: spectroscopic studies and a proposed three-dimensional structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4047–4051.
- [28] HANAS JS, HAZUDA DJ, BOGENHAGEN DF, WU FY-H, WU C-W. *Xenopus* transcription factor A requires zinc for binding to the 5S RNA gene. *J Biol Chem* 1983; **258**: 14120–14124.
- [29] HARD T, KELLENBACH E, BOELEN S, MALER BA, DAHLMAN K, FREEDMAN LP, CARLSTED-DUKE J, YAMAMOTO KR, GUSTAFSSON JA, KAPTEIN R. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 1990; **249**: 157–160.
- [30] HARRISON SC. A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 1991; **353**: 715–719.
- [31] HAYES J, TULLIUS TD. Structure of the TFIIIA-5S DNA complex. *J Mol Biol* 1992; **227**: 407–417.
- [32] HOMMEL U, ZURINI M, LUYTEN M. Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Nat Struct Bio* 1994; **1**: 383–387.
- [33] JACOBS GH. Determination of the base recognition positions of zinc fingers from sequence analysis. *EMBO J* 1992; **11**: 4507–4517.
- [34] JOHO KE, DARBY MK, CRAWFORD ET, BROWN DD. A finger protein structurally similar to TFIIIA that binds exclusively to 5S RNA in *Xenopus*. *Cell* 1990; **61**: 293–300.

- [35] JONES N. Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell* 1990; **61**: 9–11.
- [36] KARLSSON O, THOR S, NORBERG T, OHLSSON H, EDLUND T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 1990; **344**: 879–882.
- [37] KLUG A. Protein designs for the specific recognition of DNA. *Gene* 1993; **135**: 83–92.
- [38] KLUG A, RHODES D. Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1987; vol **LII**: 473–482.
- [39] LANDRO JA, SCHIMMEL P. Metal-binding site in a class I tRNA synthetase localized to a cysteine cluster inserted into nucleotide-binding fold. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1993; **90**: 2261–2265.
- [40] LEE MS, GIPPERT GP, SOMAN KV, CASE DA, WRIGHT PE. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* 1989; **245**: 635–637.
- [41] LUISI BF, XU WX, OTWINOWSKI Z, FREEDMAN LP, YAMAMOTO KR, SIGLER PB. Crystallographic analysis of the interaction of glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991; **352**: 497–505.
- [42] MACKAY JP, CROSSLEY M. Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem Chem* 1998; **23**: 1–4.
- [43] MADER S, KUMAR V, DEVERNEUIL H, CHAMBON P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish on oestrogen from glucocorticoid responsive element. *Nature* 1989; **338**: 271–274.
- [44] MAKOWSKI GS, SUNDERMANN JR FW. The interactions of zinc nickel and cadmium with *Xenopus* transcription factor IIIA, assessed by equilibrium dialysis. *J Inorg Chem* 1992; **48**: 107–119.
- [45] MARMORSTEIN R, CAREY M, PTASHNE M, HARRISON SC. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 1992; **356**: 408–414.
- [46] McBRYANT SJ, GEDULIN B, CLEMENS KR, WRIGHT PE, GOTTESFELD JM. Assessment of major and minor groove DNA interactions by the zinc fingers of *Xenopus* transcription factor IIIA. *Nucleic Acid Res* 1996; **24**: 2567–2574.
- [47] McBRYANT SJ, VELDHOFEN N, GEDULIN B, LERESCHE A, FOSTER MP, WRIGHT PE, ROMANIUK PJ, GOTTESFELD JM. Interaction of the RNA binding fingers of *Xenopus* transcription factor IIIA with specific regions of 5 S ribosomal RNA. *J Mol Biol* 1995; **248**: 44–57.
- [48] MILLER J, MCLACHAN AD, KLUG A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1985; **4**: 1609–1614.
- [49] OMICHINSKI JG, CLORE GM, SHAAD O, FALSENFELD G, TRAINOR C, APPELLA E, STANE SJ, GRONENBORN AM. NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* 1993; **261**: 438–446.
- [50] OMICHINSKI JG, TRAINOR C, EVANS T, GRONENBORN AM, CLORE GM, FALSENFELD G. A small single-„finger” peptide from the erythroid transcription factor GATA-1 binds specifically to DNA as a zinc or iron complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1676–1680.
- [51] PABO CO, SAUER RT. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 1992; **61**: 1053–1095.
- [52] PAN T, COLEMAN JE. GAL4 transcription factor is not a „zinc finger” but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; **87**: 2077–2081.
- [53] PAVLETICH NP, PABO CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 1991; **252**: 809–817.
- [54] PAVLETICH NP, PABO CO. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* 1993; **261**: 1701–1707.
- [55] PIELER T, APPEL B, OEI SL, MENTZEL H, ERDMANN VA. Point mutational analysis of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter. *EMBO J* 1985; **4**: 1847–1853.

- [56] PIELER T, ERDMANN VA. Isolation and characterization of a 7 S RNP particle from mature *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* 1983; **157**: 283–287.
- [57] PIELER T, OEI SL, HAMM J, ENGELKE U, ERDMANN VA. Functional domains of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter. *EMBO J* 1985; **4**: 3751–3756.
- [58] QIAN X, GOZANI SN, YOON HS, JEON CHJ, AGARWAL K, WEISS MA. Novel zinc finger motif in the basal transcriptional machinery: three-dimensional NMR studies of the nucleic acid binding domain of transcriptional elongation factor TFIIS. *Biochemistry* 1993; **32**: 9944–9959.
- [59] RAWLINGS SL, MATT GD, HUBER PW. Analysis of the binding of *Xenopus* transcription factor IIIA to oocyte 5S rRNA and to the 5S rRNA gene. *J Biol Chem* 1996; **2**: 869–877.
- [60] RUIZ I ALTABA A, PERRY-O'KEEFE H, MELTON A Xfin: an embryonic gene encoding a multifingered protein in *Xenopus*. *EMBO J* 1987; **6**: 3065–3070.
- [61] SANDS MS, BOGENHAGEN DF. Two zinc finger proteins from *Xenopus laevis* bind the same region of 5S rRNA but with different nuclease protection pattern. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 1797–1803.
- [62] SCHMIEDESKAMP M, KLEVIT RE. Zinc finger diversity. *Curr Opinion Struct Biol* 1994; **4**: 28–35.
- [63] SCHROTH GP, GOTTESFELD JM, BRADBURY EM. TFIIA induced DNA bending: effect of low ionic strength electrophoresis buffer conditions. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 511–516.
- [64] SCHWABE JWR, KLUG A. Zinc mining for protein domains. *Nature Struct Biol* 1994; **1**: 345–349.
- [65] SCHWABE JW, NEUHAUS D, RHODES D. Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 1990; **348**: 458461.
- [66] SEEMAN ND, ROSENBERG JM, RICH A. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; **73**: 804–808.
- [67] SHANG Z, LIAO Y-D, WU F Y-H, WU C-W. Zinc release from *Xenopus* transcription factor IIIA induced by chemical modifications. *Biochemistry* 1989; **28**: 9790–9795.
- [68] SHI Y, BERG JM. Specific DNA-RNA hybrid binding by zinc finger proteins. *Science* 1995; **268**: 282–284.
- [69] SOUTH TL, SUMMERS MF. Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC. *Protein Sci* 1993; **2**: 3–19.
- [70] SUMMERS MF, SOUTH TL, KIM B, HARE DR. High-resolution structure of an HIV zinc fingerlike domain via a new NMR-based distance geometry approach. *Biochemistry* 1990; **29**: 329–340.
- [71] SUN L, LIU A, GEORGOPOULOS K. Zinc finger mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J* 1996; **15**: 5358–5369.
- [72] THEUNISSEN O, RUDT F, GUDDAT V, MENTZEL H, PIELER T. RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIA. *Cell* 1992; **71**: 679–690.
- [73] TRAINOR CD, EVANS T, FALSSENFELD G, BOGUSKI MS. Structure and evolution of a human erythroid transcription factor. *Nature* 1990; **343**: 92–96.
- [74] VELDHUEN N, YOU QM, SETZER DR, ROMANIUK PJ. Contribution of individual base pairs to the interaction of TFIIA with the *Xenopus* 5S RNA gene. *Biochemistry* 1994; **33**: 7568–7576.
- [75] UMESONO K, EVANS RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989; **57**: 1139–1146.
- [76] WAY JC, CHALFIE M. mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* 1988; **54**: 5–16.

Amersham Life Science Ltd.
for all your sequencing needs

Thermo Sequenase enzyme
 cycle sequencing kits

Non-cycle sequencing of PCR products with T7 Sequenase v 2.0

Fluorescent sequencing on ABI sequencers
 Thermosequenase DYEnamic ET Primers
 DYEnamic Direct cycle sequencing kits
 DYE terminator cycle sequencing kits

Acrylamide gel solutions

Amersham - Ten years of commitment to advances in
 DNA sequencing

Technical information:

Orders:

Amersham Buchler GmbH & Co. KG
Amersham Warsaw Office
Al. Wyzwolenia 2/36
00-570 Warszawa
tel./fax 621 08 37, 621 51 01

BIKER Ltd.
ul. Sękocińska 3 m 2
02-313 Warszawa
tel./fax 823 32 69, 658 14 44,
658 25 55

amersham pharmacia biotech

RAK PŁUCA. TKANKOWO-SPECYFICZNE ODDZIAŁYWANIA MIĘDZY GENAMI SUPRESOROWYMI, ONKOGENAMI ORAZ GENAMI WARUNKUJĄCYMI GENETYCZNĄ PODATNOŚĆ NA NOWOTWÓR

LUNG CANCER. TISSUE-SPECIFIC INTERACTION
BETWEEN THE TUMOR SUPPRESSOR GENES, ONCOGENES
AND THE GENES DETERMINING SUSCEPTIBILITY TO CANCER

Andrzej L. PAWLAK¹ i Elżbieta RADZIKOWSKA²

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań; ²Instytut Gruźlicy, Warszawa

Streszczenie: Głównym czynnikiem w etiologii raka płuca jest działanie kancerogenów wziewnych. W procesie transformacji nowotworowej obserwuje się dwa typy mutacji somatycznych dotyczące różnych genów i prowadzące albo (1) do utraty funkcji przez geny supresory nowotworzenia, albo (2) do aktywacji genów stymulujących proliferację (onkogenów). W płucach najczęściej zmienione geny supresorowe to *p53*, *Rb* i *p16*, natomiast spośród onkogenów aktywacji najczęściej podlegają *K-ras* w raku niedrobnokomórkowym oraz *myc* w raku drobnokomórkowym. Kancerogeny wziewne przeważnie są prokancerogenami i ich działanie zależy od bilansu metabolicznej aktywacji i inaktywacji. Spośród licznych znanych loci genowych uczestniczących w procesach aktywacji i inaktywacji kancerogenów płucnych kilkanaście cechuje się zróżnicowaniem genetycznym wpływającym na ryzyko powstania nowotworu. W populacji obserwuje się więc znaczące, międzyosobnicze, genetycznie uwarunkowane różnice wrażliwości na kancerogenne czynniki pobudzające nowotworzenie w płucu. U osób krańcowo różniących się względem kombinacji alleli wielu polimorficznych genów obserwuje się wielokrotnione różnice podatności na raka płuca. Przykładem takiej interakcji jest zwiększona podatność osób o wysokiej aktywności *P4501A1* i niskiej *GSTM*. Ogólną cechą genetycznych podatności na raka płuca jest ich wielogenowe dziedziczenie.

Słowa kluczowe: rak płuca, zmiany chromosomowe, geny supresory nowotworów, onkogeny; geny: *p53*, *Rb*, *p16*, *bcl2*, *CYP1A1*, *CYP2D6*, *AHR*, *NAT2*, *MPO*, *PLCD1*, *FHIT*.

Summary: Airborne carcinogens are considered to be the main factor in etiology of lung cancer. Two types of somatic mutations are recognized to cooperate in the process of neoplastic transformation. They

are leading either to 1. loss of function of tumor suppressor genes or 2. gain of function of the proliferation-enhancing genes (oncogenes). In lung a specific set of genes is involved, including the tumor suppressors: *p53*, *Rb* and *p16*, and the oncogenes: *K-ras* in non-small cell lung cancer and *myc* in small cell lung cancer. Airborne carcinogens are in most cases promutagens. They require metabolic activation to become active and they depend on metabolic inactivation before they are excreted. A number of genes participates in these processes, but at least several of them display genetic polymorphisms in the activity which influences the risk of lung cancer among the carcinogen-exposed persons. Some combinations of alleles at these polymorphic loci are leading to phenotypes of either the extreme sensitivity or the extreme resistance. A documented example of such interaction is high risk of lung cancer in persons with high activity of P4501A1 and low activity of GSTM. General feature of genetic susceptibility to lung cancer is that it is inherited as a polygenic trait.

Key words: lung cancer, chromosomal lesions, tumor suppressor genes, oncogenes; genes: *p53*, *Rb*, *p16*, *bcl2*, *CYP1A1*, *CYP2D6*, *AHR*, *NAT2*, *MPO*, *PLCD1*, *FHIT*.

1. WSTĘP

W procesie nowotworzenia uczestniczą liczne geny, które w większości można zaliczyć do dwóch klas:

- 1) genów supresorów tego procesu, których utrata pobudza rozwój nowotworu;
- 2) onkogenów, których aktywacja pobudza transformację nowotworową.

Rozróżnienie powyższe pozostaje przydatne od szeregu lat w klasyfikacji genów uczestniczących w transformacji nowotworowej. Cechą wspólną dla genów supresorowych i onkogenów jest ich znaczący udział w procesach różnicowania komórek i tkanek. Mutacyjne tory transformacji nowotworowej obejmują sekwencję zmian molekularnych, w której mutacje genów supresorowych występują naprzemiennie z mutacjami onkogenów, przy czym sekwencja zmian wydaje się specyficzna zarówno dla tkanki, w której występuje, jak dla typu nowotworu [31].

Niniejszy przegląd skupia się na nowszych obserwacjach wykazujących specyficzne dla raka płuca interakcje pomiędzy genami supresorami a onkogenami i genami wpływającymi na wrażliwość na działanie kancerogenów środowiskowych.

Ocena kombinacji zmian molekularnych występujących w poszczególnych nowotworach jest rozpatrywana jako potencjalne uzupełnienie klasycznych metod klasyfikacji nowotworów na podstawie obrazu mikroskopowego. Opracowano metody umożliwiające charakteryzowanie wybranych guzów pod kątem wzrostu ekspresji onkogenów oraz utraty ekspresji genów supresorowych i zastosowano je do scharakteryzowania powszechnie występujących typów nowotworów. Postuluje się dużą przydatność opisanego typu informacji dla charakteryzowania i klasyfikowania guzów cechujących się zmianami wrażliwości na hormony sterydowe i wykazujących silną asocjacje ryzyka nowotworu z płcią. Na przykład zmiany profilu amplifikowanych onkogenów były wysoce specyficzne w rakach przełyku, wątroby i piersi

[34]. Badania efektów obniżenia lub pobudzenia ekspresji badanych genów w guzach rozstrzygają również w sprawie hipotetycznych funkcji supresorowych tych genów.

2. ZMIANY CYTOGENETYCZNE SPECYFICZNE DLA RÓŻNYCH TYPÓW RAKA PŁUCA

Zmiany chromosomowe, najczęściej występujące w rakach płuca, to złamania w miejscach chromosomów odpowiadających loci genowym Rb (13p14), p53 (17p13) i p16 (9p21). Złamania te prowadzą do wyłączenia wymienionych genów supresorowych. Wraz z aktywacją miejsc łamliwych na chromosomie 3 złamania są ważnymi cytogenetycznymi markerami transformacji nowotworowej w płucu [50]. Główne typy raka płuca różnią się profilem zmian cytogenetycznych: w raku drobnokomórkowym (SCLC) przeważają zmiany w chromosomie 17p, ale częste są również delecje 3p, 5q i Rb (13p14), natomiast w rakach niedrobnokomórkowych (NSCLC) częste są mutacje w chromosomach 9 i 13, ale także delecje 3p i dodatkowe chromosomy 7 [34, 52].

W bezpośrednim sąsiedztwie delecji 3p22-p21.3 typowej dla raków płuca i nerek zmapowano gen *PLCD1* kodujący fosfolipazę C, enzym, który hydrolizuje fosfolipidy inozytoli z wytworzeniem dwóch substancji sygnałowych: diacyloglicerolu i trójfosforanu inozytoli. Wymienione substancje inicjują kaskady zmian metabolicznych, co może wiązać się z hipotetyczną funkcją supresorową genu *PLCD1* [30]. W raku jelita grubego zaobserwowano obniżenie ekspresji genu *PLCD1*, co potwierdza powyższą tezę w odniesieniu do tej tkanki. Z drugiej strony efektu obniżenia ekspresji nie zaobserwowano w raku płuca.

Czynnikiem usposabiającym do raka płuca jest prawdopodobnie zmiana strukturalna chromatyny powodująca powstanie w obrębie genu *FHIT* w chromosomie 3p14.2 miejsca łamliwego FRA3B [19,51]. W miejscu tym stwierdza się złamania w nowotworach przewodu pokarmowego i uczestniczy ono w translokacjach t(3;8) w raku nerki [42]. Udział genu *FHIT* w rozwoju raka płuca pozostaje nie określony. Delecje obejmujące gen *FHIT* (chromosom 3p14.2) stwierdza się w raku płuca często: nieprawidłowe transkrypty genu *FHIT* zaobserwowano w 45% przypadków NSCLC oraz w 88% linii komórkowych wywodzących się z tego typu raka płuca, a także w 100% badanych linii komórkowych wywodzących się z drobnokomórkowego raka płuca. Pomimo tego gen *FHIT* nie zachowuje się jak typowy supresor onkogenezy. Obserwowane delecje w genie *FHIT* najczęściej obejmują całe eksony, przy czym delecję eksonu 8 zaobserwowano również w prawidłowym płucu. Tylko w pojedynczych przypadkach mutacje miały charakter zmian punktowych. Nie obserwowano również utraty ekspresji genu w guzach płuca [51]. Tym samym, istotny

wpływ na transformację nowotworową w płucu mają zmiany aktywujące miejsce łamliwe FRA3B, a nie utrata aktywności enzymatycznej białka FHIT.

3. ZMIANY MOLEKULARNE SPECYFICZNE DLA RÓŻNYCH TYPÓW RAKA PŁUCA

Oprócz wyżej omawianych regionów genomu objętych zmianami cytogenetycznymi, w transformacji nowotworowej w płucach uczestniczą geny supresorowe i onkogeny, których inaktywacja lub (odpowiednio) aktywacja następują w drodze mutacji punktowych lub submikroskopowych. Przykładem mogą być punktowe mutacje aktywujące w genie *K-ras* charakterystyczne dla niedrobnokomórkowego raka płuca [53] i amplifikacje *myc* w raku drobnokomórkowym [4].

Odrębne geny wydają się czynne z jednej strony w kontroli powstawania guza pierwotnego i, z drugiej strony, wzrostu przerzutów raka płuca. Jednym z białek wpływających na te procesy jest plazminogen. Mysz pozbawiona genu plazminogenu cechuje się obniżoną dynamiką wzrostu przeszczepionych guzów, chociaż liczba guzów nie odbiegała od liczby obserwowanej u myszy kontrolnych (z zachowanym genem plazminogenu) obciążonych taką samą dawką komórek nowotworowych. Może to być spowodowane niedoborem plazminy, która jako proteaza o szerokiej specyficzności substratowej może rozkładać szereg struktur zębów zawierających fibrynogen. Prawidłowo uczestniczy ona w procesach migracji komórek i transformacji tkanek [6, 7].

3.1. Gen *p53*

Gen *p53* mieści się na krótkim ramieniu chromosomu 17 i koduje białko jądrowe czynne w hamowaniu progresji cyklu komórkowego i pobudzające procesy różnicowania oraz apoptozy. Białko *p53* określane jest jako strażnik genomu, ponieważ hamując proliferację przyczynia się albo do naprawy uszkodzeń DNA, albo eliminacji komórek wykazujących obecność tych uszkodzeń lub nadmierną aktywację onkogenów. Wymienione zmiany osiągane są przez aktywację genów *GADD45* i *WAF1(CIP1)*. Pierwszy z tych genów hamuje proliferację w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, drugi hamuje zależne od cyklin kinazy niezbędne w procesie podziału komórki. [24].

Wyłączenie funkcji białka *p53* obserwuje się w większości nowotworów i stanowi ono istotny etap transformacji nowotworowej. Utrata funkcji tego białka najczęściej jest spowodowana przez mutacje somatyczne prowadzące do utraty obu prawidłowych genów. Liczne obserwacje struktury zmutowanych genów najczęściej wykazują zmiany w eksonach 8 oraz 5–7 [2, 18, 41]. Widmo mutacji somatycznych

obserwowanych w genie *p53* zależy zarówno od typu nowotworu, jak od czynnika wywołującego mutację [25]. Typowo zmiany te obserwuje się na etapie rozrostu nowotworu. Lokalizacja mutacji w miejscach podatnych genu *p53* sprawia, że wykrywanie ich w wydzielinach bądź w wydalinach może być testem na obecność komórek nowotworowych [26].

Na etapie inicjacji procesu nowotworowego mutacja genu *p53* występuje stosunkowo rzadko. Sytuacja taka zachodzi w zespole Li-Fraumeni spowodowanym germinálną mutacją genu *p53*. Chorzy są heterozygotami patologicznego allele *p53* i są obciążeni wysokim ryzykiem wystąpienia mutacji somatycznych pozostałego prawidłowego allele *p53*.

U myszy *p53* ^{-/-} nie obserwuje się zaburzeń embriogenezy tylko zwiększoną podatność na nowotwory [13]. Ponadto stwierdzono zwiększoną częstość duplikacji centrosomu, co może wskazywać na mechanizm obniżenia stabilności chromosomów w guzach pod wpływem mutacji *p53* [22].

Efekt braku aktywności białka *p53* może zależeć od funkcji genów kooperujących z tym białkiem. Delecje genu *atm*, podobnie jak genu *p53*, hamują reakcję apoptozy w komórkach limfoidalnych po ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Paradoksalnie, po wyłączeniu obu tych genów, komórki *atm*^{-/-}*p53*^{-/-} odzyskują „prawidłową” reakcję na takie uszkodzenie [3, 54].

W odwracalnym hamowaniu proliferacji białko *p53* współdziała z białkiem *p21*, co udowodniono na liniach komórkowych z wyłączoną ekspresją tego ostatniego (*p21* ^{-/-}). W komórkach tych podanie białka *p53* powoduje śmierć komórki, podczas gdy w komórkach *p21* ^{+/+} ta sama dawka białka *p53* prowadzi do bloku proliferacji (bez śmierci) [44].

Na szczególną rolę mutacji somatycznych genu *p53* w raku płuca, a także na nowy mechanizm genetycznej podatności na nowotwory wskazują obserwacje dokonane w przypadku wielokrotnych guzów pierwotnych w płucu wykazujących tę samą mutację genu *p53* (transwersja w kodonie 245). Taką samą mutację stwierdzono w 7/10 badanych prób prawidłowego nabłonka oskrzelowego pobranego z różnych części badanych płuc, co wskazuje na rozprzestrzenienie się mutacji somatycznej determinującej podatność na raka w obrębie jednego narządu i uzasadnia model „pola podatności” na nowotwór u osób z taką mutacją [20]. Potwierdzeniem znaczenia mutacji genu *p53* w progresji raka płuca jest wykazanie, że wypadnięcie jego funkcji łączy się z gorszym rokowaniem [12]. W przypadkach wieloogniskowego raka płuca mutacje *p53* obserwowane w poszczególnych guzach często były identyczne, co tłumaczono klonalnym rozwojem tych guzów [16].

3.2. Korekta niedoboru genu *p53* jako strategia genowej terapii nowotworów

Najważniejszym mechanizmem regulacji funkcji białka *p53* jest wpływanie na jego podaż [33]. Ponieważ białko *p53* tworzy kompleks z polimerazą poliADPrybozy

(PARP), sugeruje się aktywację PARP przez takie czynniki, jak nadmierna podaż tlenu, jako mechanizm posttranslacyjnej aktywacji białka p53 [1]. Ponadto, za pośrednictwem PARP białko p53 może oddziaływać na proces rekombinacji DNA [40].

Po podaniu wektora zawierającego gen *p53* wykazywano w ludzkich komórkach nowotworowych hodowanych pod skórą myszy z niedoborem immunologicznym transgeniczne pobudzenie produkcji białka p53. Badano linie raka piersi [21], a także komórki płaskokomórkowego raka głowy i szyi [10]. Czynnikiem w sposób istotny obniżającym efekty transgenicznego białka p53 jest jego rozkład. Szczególnie szybki rozkład tego białka zaobserwowano w obecności wirusów.

Dążąc do lepszych efektów transgenicznej terapii genem p53 wytworzono gen chimeryczny *CTS1* (*chimeric tumor supresor 1*), który jest pozbawiony jest sekwencji aktywnej w procesie specyficznej degradacji p53, przy czym białko CTS1 zachowuje istotne funkcje białka p53. Gen *CTS1* zawiera ponadto inne modyfikacje, wprowadzone w celu eliminacji procesów hamujących pożądane funkcje p53. Białko CTS1: jest niewrażliwe na inaktywację przez zmutowane formy białka p53 i takie białka, jak MDM2 czy E6. W wyniku tego *in vitro* uzyskano zwiększone hamowanie proliferacji komórek i indukcję apoptozy, a ponadto zaobserwowano zwiększoną ekspresję CST1 (w porównaniu z efektem podania p53). Oczekuje się, że w terapii genowej, w postępowaniu opartym na podawaniu i ekspresji *in vivo*, chimeryczny gen *CST1* wytworzony w wyniku modyfikacji genu *p53* może być skuteczniejszy od genu *p53* [11].

3.3. Gen *Rb*

Aktywność supresorowa genu *Rb* jest jest związana z hamowaniem cyklu komórkowego na etapie G1 i jest regulowana procesami fosforylacji z udziałem cyklin D oraz E. Po fosforylacji białka Rb (pRb) zwiększa się jego stabilność, natomiast efekty supresorowe białka Rb są hamowane. Oznacza to, że aktywność supresorowa pRb nie jest proporcjonalna do jego stężenia. Tłumaczy to obserwację, że antysensowe RNA cykliny D1 obniżając fosforylację i stężenie pRb w komórkach nowotworu jednocześnie hamuje ich wzrost *in vitro* [14]. W rakach płuca typu drobno komórkowego (należących do klasy Kreyberg II) w 90% przypadków obserwuje się albo obniżenie funkcji supresorowych genu *Rb*, albo aktywację genu cykliny D1 [39]. Pod wpływem antysensowego RNA cykliny D1, które prowadzi do obniżenia ekspresji genu *Rb*, zwiększa się podatność komórek raka płuca na apoptozę. Obserwowany efekt zależy od obniżenia aktywności cykliny D1, co obniża zależną od tej cykliny fosforylację i stabilność białka Rb, ale jednocześnie pobudza jego funkcję supresorową. Sprawdzona *in vitro* strategia podawania antysensowego RNA cykliny D1 może być skuteczna również *in vivo*. Postuluje się, że uzyskanie tego efektu *in vivo* może przyczynić się do zahamowania wzrostu guza [14].

3.4. Gen *bcl2*

Gen ten hamuje apoptozę i wpływa na tworzenie naczyń krwionośnych. Na podstawie mutacji *bcl2* obserwowanych w białaczkach został on pierwotnie zaliczony do onkogenów, czyli genów, których nadmierna ekspresja prowadzi do nowotworów.

Antysensowe RNA *bcl2* indukuje apoptozę *in vitro* w raku drobnokomórkowym [56], co wskazuje na możliwości terapii genowej opartej na wyłączeniu ekspresji *bcl2*. Z drugiej strony wyłączenie funkcji genu *bcl2* może pobudzać ukrwienie guza. W guzach cechujących się wysoką ekspresją onkogenu *c-erbB2* obserwowano silne pobudzenie transformacji i wzrostu raka płuca w związku z utratą genu *bcl2* [35]. W tych przypadkach działanie genu *bcl2* w płucach jest zbliżone do funkcji genów supresorowych.

4. POLIMORFICZNE GENY KSZTAŁTUJĄCE WRAŻLIWOŚĆ NA CZYNNIKI RAKOTWÓRCZE W POWIETRZU

Ryzyko powstania raka płuca wiąże się z ekspozycją na kancerogeny wziewne. Zróżnicowanie genetyczne wśród osób ekspozowanych w zakresie enzymów warunkujących metaboliczną aktywację prokancerogenów i inaktywację kancerogenów w sposób istotny wpływa na ryzyko zachorowania na raka płuca. Zróżnicowanie ryzyka w największym stopniu dotyczy umiarkowanych palaczy (< 30 paczek/rok) [15]. Wzrost liczby wypalonych papierosów powoduje liniowy wzrost częstości wszystkich typów raka płuca, jednak najsilniej indukowanym przez ten czynnik typem jest, niezależnie od płci chorych, rak płaskonabłonkowy [45].

W populacji japońskiej ok. 20% osób to nosiciele mutacji genu *CYP1A1* 4889A→G (allel m2), sprzężonej ze zmianami wykrywanymi metodą RFLP. Allel m2 genu *CYP 1A1* powodujący wyższą zachorowalność na raka płuca powoduje również skrócenie czasu przeżycia chorych z nowotworem (w porównaniu do osób nie obciążonych tym allelem) [23]. Również w Japonii zidentyfikowano nosicieli rzadko występujących alleli genu *CYP1A1* stwierdzając, że osoby z niekorzystną kombinacją tych markerów cechują się około 4-krotnym wzrostem ryzyka raka płuca [29]. W populacji europejskiej allel m2 genu *CYP1A1* występuje b. rzadko, a stwierdzane w tym genie polimorfizmy (m4) nie wpływają na zachorowania na raka płuca [9, 28].

Wczesne obserwacje wskazujące na wrażliwość na raka płuca osób z niedoborem *GSTM1* [27, 49] nie zostały potwierdzone przez innych autorów [5, 55]. W Japonii podwyższone ryzyko raka płuca zaobserwowano u nosicieli rzadkich alleli genu *CYP1A1* i *GSTM*, co wskazuje na znaczenie kombinacji tych odmian.

Genetycznie uwarunkowana wysoka aktywność N-acetylotransferazy arylaminowej (NAT2) nie jest znamienne wyższa u chorych z rakiem płuca. Analiza genotypów w locus NAT2 metodą PCR-RFLP wykazała jednak, że homozygoty allele NAT2 *4/*4 odznaczają się 3-krotnie wyższym ryzykiem raka płuca [8].

Locus CYP2D6 stanowi interesujący przykład silnego zróżnicowania genetycznego przy zachowaniu prawidłowych funkcji organizmu. Opisano odmiany tego genu (allele) cechujące się całkowitym brakiem aktywności, jak również genotypy, w których duplikacja genu prowadzi do znacznie podwyższonej aktywności kodowanych białek. W locus CYP2D6 znanych jest 16 alleli. Wymienione właściwości sprawiają, że różne odmiany genu *CYP2D6* oddziałują w sposób przeciwstawny na ryzyko zachorowania na raka płuca. W tabeli 1 przedstawiono związane z tymi allelami fenotypy i częstość alleli CYP2D6 w populacji niemieckiej (najpełniejsze dostępne badanie). Homozygoty tych alleli różnią się aktywnością hydroksylazy debrizoquiny/sparteiny w zakresie od całkowitego braku aktywności do aktywności wielokrotnie przekraczającej przeciętną w populacji. Fenotyp wolnego metabolizmu (PM – *poor metabolizer*) występuje w populacji niemieckiej z częstością 7% i w grupie badanych osób zaobserwowano 5 różnych mutacji [48] (tab. 1). Fenotypy szybkiego metabolizmu (EM – *extensive metabolizer*) i pośredniego metabolizmu (IM – *intermediate metabolizer*) rozróżnia się głównie ze względu na osobniczą zmienność wrażliwości na leki, a nie ze względu na ryzyko raka płuca. Wśród osób zakwalifikowanych na podstawie badania DNA do grupy szybko metabolizujących zaobserwowano nieznaczny wzrost ryzyka raka płuca [28]. Gen *CYP2D6* cechuje się b. niską ekspresją w płucach [32]. Stąd prawdopodobnie nie wpływa on na metabolizm prokancerogenów w płucach

Innym markerem związanym z obniżoną wrażliwością na raka płuca jest polimorfizm genetyczny aktywności mieloperoksydazy (MPO). W regionie promotora genu *MPO* w pozycji (-463) substytucja G→A łączy się z obniżoną ekspresją genu oraz zmianą miejsca cięcia enzymu restrykcyjnego AciI. Substytucja G→A mieści się w odcinku sekwencji Ału poprzedzających gen *MPO* i kodujących miejsce wiązania kwasu retinowego. Zmniejsza ona kilkukrotnie stymulację transkrypcji po podaniu kwasu retinowego. Zmieniony przez substytucję gen *MPO* cechuje się również kilkukrotnie obniżonym wiązaniem czynnika transkrypcyjnego AP1. W grupie kontrolnej rasy kaukaskiej heterozygoty allele A stanowili 12,8%, co odpowiada częstości genu ok. 0,38. Wśród homozygot allele A genu *MPO* rasy kaukaskiej stwierdzono ponad trzykrotne obniżenie częstości zachorowań na raka płuca [37]. Jako mechanizm opisanej asocjacji wymienia się możliwą zmianę funkcji elementu regulacyjnego SP1 wrażliwego na hormon tarczycy i kwas retinowy [43].

Syntetyczne uwzględnianie zmienności osobniczej w większej liczbie polimorficznych loci wydaje się bardzo obiecującym podejściem do tematu. Biorąc pod uwagę zmienność w zakresie 4 loci wpływających na metabolizm premutagenów: *CYP2D6*, *CYP2E1*, *GSTM1* i *GSTT1* stwierdzono, że wybrane kombinacje alleli

TABELA 1. Allele CYP2D6, związane z nimi cechy fenotypu i ryzyko raka płuca u homozygot

Allel CYP2D6/ fenotyp homozygoty ^x	Częstość ^{xx}	Aktywność hydroksylazy debrizoquiny	Ryzyko raka płuca
Aktywność prawidłowa lub obniżona w sposób umiarkowany			
*1/EM	0,364	szybki metabolizm	nieznacznie podwyższone
*2/IM	0,324	niewielkie obniżenie	bz
*9, *10/IM	0,018, 0,015	umiarkowane obniżenie	bz
Mutacje aktywujące (duplikacje)			
*1x2/EM	0,005	znamienny wzrost	podwyższone
*2x2/EM	0,013	znamienny wzrost	podwyższone
*4x2	0,001	obniżona	brak danych
Duplikacje, mutacje inaktywujące			
*4/PM	0,207	brak aktywności ^{xxx}	obniżone
*3, *5/PM	0,020	PM	brak danych
*6/PM	0,009	PM	brak danych
*7, *15, *16/PM	0,001	PM	brak danych

^xEM – *extensive metabolizer*; IM – *intermediate metabolizer*; PM – *poor metabolizer*; ^{xx} w populacji niemieckiej za Sachse i wsp. [48], ^{xxx} mutacja miejsca składania G1934A

zwiększających ryzyko tego nowotworu mogą wcale nie zmieniać ryzyka nowotworu, podczas gdy inne mogą 14-krotnie zwiększać całkowite ryzyko raka płuca [15].

4.1. Komponenta metaboliczna w dziedzicznej podatności na raka gruczołowego płuc

Spośród raków płuca, typ gruczołowy (Kreyberg I) należy do najmniej związanych z paleniem. Z drugiej strony, komponenta genetyczna tego raka jest znaczna i ma charakter wielogenowy. Oznacza to interakcję licznych czynników genetycznych w powstawaniu wrażliwego fenotypu [38]. Na udział metabolizmu w kształtowaniu podatności na ten typ raka płuca wskazują doniesienia na temat wzrostu ryzyka raka płuca typu Kreyberg I związanego z określonymi allelami genów *CYP1A1*, *CYP2b6* i *CYP2E1* [16].

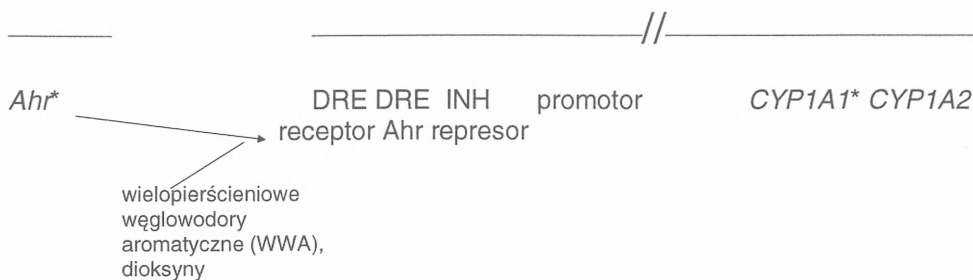
Test antypirynowy pierwotnie wybrano jako potencjalny wskaźnik genetycznych różnic w indukowalności rodziny genów *CYP1A* przez receptor Ahr (rys. 1). Spośród badanych chorych z rakiem płuca znamiennie większe przyspieszenie eliminacji antypiryny zaobserwowano jednak wśród chorych z rakiem gruczołowym (typ Kreyberg I) w porównaniu do niewielkiego przyspieszenia obserwowanego u chorych z zależnymi od palenia rakami typu Kreyberg II [46]. Stwierdzenie, że również krewni pierwszego stopnia chorych z rakiem gruczołowym cechują się znamiennie przyspieszoną eliminacją antypiryny [47] wskazuje na genetyczny mechanizm obserwowanych różnic.

Gen regula-
torowy (trans)

Sekwencje regulatorowe (cis)

Geny struktururowe

odległość od kodonu startowego – 1000 pz –800–400 pz

RYSUNEK 1. Geny *Ahr* i *CYP1A* oraz związane z nimi genetyczne polimorfizmy (*)

Testem w sposób syntetyczny oceniającym osobniczą podatność na raka płuca wydaje się być kinetyka metabolizmu antypiryny. W eliminacji antypiryny udział biorą białka z co najmniej 4 rodzin P450: 1A2, 2B6, 2C i 3A4 [17]. W związku z tym test antypirynowy nie spełnia warunków specyficzności wobec określonego cytochromu P450. Nie wyklucza to jednak przydatności testu antypirynowego do identyfikacji osób z genetyczną podatnością na rakogenne efekty endogennych i egzogennych mutagenów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AGARWAL ML, AGARWAL A, TAYLOR WR, WANG ZQ, WAGNER EF, STARK GR. Defective induction but normal activation and function of p53 in mouse cells lacking poly-ADP-ribose polymerase. *Oncogene* 1997; **15**: 1035–1041.
- [2] AHUJA H, BAR-ELI M, ADVANI SH, BENCHIMOL S, CLINE MJ. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6783–6787.
- [3] BARLOW C, LIYANAGE M, MOENS PB, DENG CX, RIED T, WYNshaw-BORIS-A. Partial rescue of the prophase I defects of *Atm*-deficient mice by p53 and p21 null alleles. *Nat Genet* 1997 Dec; **17**(4): 462–466.
- [4] BARR LF, CAMPBELL SE, BAYLIN SB. Protein kinase C-beta 2 inhibits cycling and decreases c-myc-induced apoptosis in small cell lung cancer cells. *Cell Growth Differ* 1997; **8**: 381–392.
- [5] BROCKMOLLER J, KERB R, DRAKOULIS N, NITZ M, ROOTS I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class mu isoenzymes mu and psi in lung cancer patients and controls. *Cancer Res* 1993; **53**: 1004–1011.

- [6] BUGGE TH, FLICK MJ, DAUGHERTY CC, DEGEN JL. Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes Dev* 1995; **9**: 794.
- [7] BUGGE TH, KOMBRINCK KW, XIAO Q, HOLMBACK K, DAUGHERTY CC, WITTE DP, DEGEN JL. Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen-deficient mice. *Blood* 1997; **90**: 4522–4531.
- [8] CASCORBI I, BROCKMOLLER J, MROZIKIEWICZ PM, BAUER S, LODDENKEMPER R, ROOTS I. Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res* 1996; **56**: 3961–3966.
- [9] CASCORBI I, BROCKMOLLER J, ROOTS I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 1996; **56**: 4965–4969.
- [10] CLAYMAN GL, EL-NAGGAR-AK, ROTH JA, ZHANG WW, GOEPFERT H, TAYLOR DL, LIU TJ. *In vivo* molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 1995; **55**:
- [11] CONSEILLER E, DEBUSSCHE L, LANDAIS D, VENOT-C; MARATRAT M, SIERRA V, TOCQUEB, BRACCOL. CTS1: a p53-derived chimeric tumor suppressor gene with enhanced *in vitro* apoptotic properties. *J Clin Invest*. 1998; **1,101**: 120–127.
- [12] de ANTA JM, JASSEM E, ROSELL R, MARTINEZ-ROCA M, JASSEM J, MARTINEZ-LOPEZ E, MONZO M, SANCHEZ-HERNANDEZ JJ, MORENO I, SANCHEZ-CESPEDES M. TP53 mutational pattern in Spanish and Polish non-small cell lung cancer patients: null mutations are associated with poor prognosis. *Oncogene* 1997; **15**: 2951–2958.
- [13] DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, MCARTHUR MJ, MONTGOMERY CA JR, BUTEL JS, BRADLEY A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; **356**: 215–221.
- [14] DRISCOLL B, WU L, BUCKLEY S, HALL FL, ANDERSON KD, WARBURTON D. Cyclin D1 antisense RNA destabilizes pRb and retards lung cancer cell growth. *Am J Physiol* 1997; **273**: L941–949.
- [15] EL-ZEIN R, CONFORTI-FROES N, AU WW. Interactions between genetic predisposition and environmental toxicants for development of lung cancer. *Environ Mol Mutagen* 1997; **30**: 196–204.
- [16] EL-ZEIN RA, ZWISCHENBERGER JB, ABDEL-RAHMAN SZ, SANKAR-AB, AU-WW. Polymorphism of metabolizing genes and lung cancer histology: prevalence of CYP2E1 in adenocarcinoma. *Cancer Lett* 1997; **112**: 71–78.
- [17] ENGEL G, HOFMANN U, HEIDEMANN H, COSME J, EICHELBAUM M. Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin Pharmacol Ther* 1996; **59**: 613–623.
- [18] FEINSTEIN E, CIMINO G, GALE RP, ALIMENA G, BERTHIER R, KISHI K, GOLDMAN J, ZACCARIA A, BERREBI A, CANAANI E. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6293–6297.
- [19] FONG KM, BIESTERVELD EJ, VIRMANI A, WISTUBA I, SEKIDO Y, BADER SA, AHMADIAN M, ONG ST, RASSOOL FV, ZIMMERMAN PV, GIACCONE G, GAZDAR AF, MINNA JD. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 1997; **57**: 2256–2267.
- [20] FRANKLIN WA, GAZDAR AF, HANEY J, WISTUBA II, LA-ROSA FG, KENNEDY T, RITCHEY DM, MILLER YE. Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2133–2137.

- [21] FUJIWARA T, CAI DW, GEORGES RN, MUKHOPADHYAY T, GRIMM EA, ROTH JA. Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**: 1458–1462.
- [22] FUKASAWA K, WIENER F, VANDE-WOUDE GF, MAI S. Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* 1997; **15**: 1295–1302.
- [23] GOTO I, YONEDA S, YAMAMOTO M, KAWAJIRI K. Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1996; **56**: 3725–3730.
- [24] GOTTLIEB TM, OREN M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1287**: 77–102.
- [25] HARRIS CC. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993; **262**: 1980–1981.
- [26] HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, HARRIS CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; **253**: 49–53.
- [27] HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTTILA S, VAINIO H. The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 1993; **14**: 1479–1481.
- [28] HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTTILA S, KARJALAINEN A, VAINIO H. Polymorphism in CYP1A1 and CYP2D6 genes: possible association with susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1993; **101** Suppl 3: 109–112.
- [29] ISHIBEN, WIENCKE JK, ZUO ZF, MCMILLAN A, SPITZ M, KELSEY KT. Susceptibility to lung cancer in light smokers associated with CYP1A1 polymorphisms in Mexican- and African-Americans. *Cancer Mol Biomarkers Prev* 1997; **6**: 1075–1080.
- [30] ISHIKAWA S, TAKAHASHI T, OGAWA M, NAKAMURA Y. Genomic structure of the human PLCD1 (phospholipase C delta 1) locus on 3p22–p21.3. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **78**: 58–60.
- [31] KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; **87**: 159–170.
- [32] KIVISTO KT, GRIESE EU, STUVEN T, FRITZ P, FRIEDEL G, KROEMER HK, ZANGER UM. Analysis of CYP2D6 expression in human lung: implications for the association between CYP2D6 activity and susceptibility to lung cancer. *Pharmacogenetics* 1997; **7**: 295–302.
- [33] KOBAYASHI M, WATANABE H, AJIOKA Y, YOSHIDA M, HITOMI J, ASAKURA H. Correlation of p53 protein expression with apoptotic incidence in colorectal neoplasia. *Virchows Arch* 1995; **427**: 27–32.
- [34] KODAMA M, MURAKAMI M, KODAMA T. Differential implications of the oncogene-tumor suppressor gene complex in the geneses of 19 human neoplasias. *Anticancer Res* 1997; **17**: 2285–2292.
- [35] KOUKOURAKIS MI, GIATROMANOLAKIA, O'BYRNE KJ, COMLEY M, WHITEHOUSE RM, TALBOT DC, GATTER KC, HARRIS AL. Platelet-derived endothelial cell growth factor expression correlates with tumour angiogenesis and prognosis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1997; **75**: 477–481.
- [36] LAU DH, YANG B, HU R, BENFIELD JR. Clonal origin of multiple lung cancers: K-ras and p53 mutations determined by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Diagn Mol Pathol* 1997; **6**: 179–184.
- [37] LONDON SJ, LEHMAN TA, TAYLOR JA. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res* 1997; **57**: 5001–5003.
- [38] MANENTI G, GARIBOLDI M, FIORINO A, ZANESI N, PIEROTTI MA, DRAGANI TA. Genetic mapping of lung cancer modifier loci specifically affecting tumor initiation and progression. *Cancer Res* 1997; **57**(19): 4164–4166.
- [39] MARCHETTI A, DOGLIONI C, BARBARESCHI M, BUTTITTA F, PELLEGRINI S, GAETA P, LA-ROCCA R, MERLO G, CHELLA A, ANGELETTI CA, DALLA-PALMA P,

- BEVILACQUA G. Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; **75**: 187–192.
- [40] MORRISON C, SMITH GC, STINGL L, JACKSON SP, WAGNER EF, WANG-ZQ. Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis. *Nat Genet* 1997; **17**: 479–482.
- [41] NAKAI H, MISAWA S, TOGUCHIDA J, YANDELL DW, ISHIZAKI K. Frequent p53 gene mutations in blast crisis of chronic myelogenous leukemia, especially in myeloid crisis harboring loss of a chromosome 17p. *Cancer Res* 1992; **52**: 6588–6593.
- [42] OHTA M, INOUE H, COTTICELLI MG, KASTURY K, BAFFA R, PALAZZO J, SIPRASH-VILI Z, MORI M, McCUE, DRUCK T et-al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14. fragile site and renal-carcinoma-associated t (3;8)breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; **84**: 587–597.
- [43] PIEDRAFITA FJ, MOLLANDER @B, VANSANT G, ORLOVA EA, PFAHL M AND REYNOLDS WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996; **271**: 14412–14420.
- [44] POLYAK K, XIA Y, ZWEIER JL, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; **389**: 300–205.
- [45] PRESCOTT E, OSLER M, HEIN HO, BORCH-JOHNSEN K, LANGE P, SCHNOHR P, VESTBO J. Gender and smoking-related risk of lung cancer. The Copenhagen Center for Prospective Population Studies. *Epidemiology* 1998; **9**: 79–83.
- [46] RADZIKOWSKA E, GAZDZIK W, ROWINSKA-ZAKRZEWSKA E. Antipyrine metabolism in lung cancer patients and their relatives. *Rocz Akad Med Białymst* 1997; **42** Suppl 1: 297–308.
- [47] RADZIKOWSKA E, PAWLAK AL, ROWIŃSKA E, GAŻDZIK W, PAWLAK M. The high rates of antipyrine elimination occur both in patients with lung adenocarcinoma and in their healthy relatives. *Europ J Clin Invest* 1998; **28**, suppl.1: A20.
- [48] SACHSE C, BROCKMOLLER J, BAUER S, ROOTS I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 284–295.
- [49] SEIDEGARD J, PERO RW, MARKOWITZ MM, ROUSH G, MILLER DG, BEATTIE EJ. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis* 1990; **11**: 33–36.
- [50] SHIMIZU E, SONE S. Tumor suppressor genes in human lung cancer. *J Med Invest* 1997; **44**: 15–24.
- [51] SOZZI G, VERONESE ML, NEGRINI M, BAFFA R, COTTINELLI MG;INOUE H, TORNIELLI S, PILOTTI S, DE GREGORIO L, PASTORINO U PIEROTTI MA OHTA M, HUEBNER K, CROCE CM. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1996; **85**: 17–26.
- [52] TESTA JR, LIU Z, FEDER M, BELL DW, BALSARA B, CHENG JQ, TAGUCHI T. Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; **95**: 20–32.
- [53] VACHTENHEIM J. Occurrence of ras mutations in human lung cancer. Minireview. *Neoplasma* 1997; **44**: 145–149.
- [54] WESTPHAL CH, ROWAN S, SCHMALTZ C, ELSON A, FISHER DE, LEDER P. atm and p53 cooperate in apoptosis and suppression of tumorigenesis, but not in resistance to acute radiation toxicity. *Nat Genet* 1997; **16**: 397–401.
- [55] ZHONG S, HOWIE AF, KETTERER B, TAYLOR J, HAYES JD, BECKETT GJ, WATHEN CG, WOLF CR, SPURR NK. Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1991; **12** : 1533–1537.

- [56] ZIEGLER A, LUEDKE GH, FABBRO D, ALTMANN KH; STAHEL RA, ZANGEMEISTER-WITTKÉ U. Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence. *J Natl Cancer Inst* 1997; **16, 89**: 1027–1036.

KOMUNIKAT

Komisja Biologii Starzenia PAN zaprasza do udziału w konferencji

Komórkowe i molekularne mechanizmy starzenia się

Konferencja odbędzie się w budynku Zakładów Teoretycznych Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, w sobotę 17 października br. w godz. 11:15–15:00. Udział w konferencji jest bezpłatny, nie jest wymagane wcześniejsze zgłoszenie się. Dodatkowe informacje można uzyskać pod adresem:

Komisja Biologii Starzenia PAN, Katedra Histologii i Immunologii AM
w Gdańsku, ul. Dębinki 1, tel. (58) 3491430, fax (58) 3023673;
e-mail: zkmiec@amedec.amg.gda.pl

Program Konferencji:

1. Prof. Claudio **Franceschi**: *Immunology and genetics of human longevity*
2. Dr Ewa **Sikora**: *Regulacja podziału komórki a jej starzenie się*
3. Prof. Ryszard **Oliński**: *Oksydacyjne uszkodzenie DNA związane z rozwojem stanów patologicznych i starzeniem się*
4. Prof. Grzegorz **Bartosz**: *Obrona antyoksydacyjna w procesie starzenia się komórek i organizmu*
5. Dr hab. Jacek **Witkowski**: *Komórkowe procesy proteolityczne a starzenie się limfocytów*

Sekretarz

dr hab. med. Zbigniew Kmiec
prof. nadzw. AMG

Przewodniczący

Komisji Biologii Starzenia PAN
Prof. dr hab. Andrzej Myśliwski

LISTY DO REDAKCJI

Prof. dr Mieczysław Chorąży (Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, 44-100 Gliwice) nadesłał list z następującą informacją o poprawnym zapisie nazw genów i białek. Podstawowe reguły:

- geny wirusów, bakterii, roślin, zwierząt (oprócz człowieka) powinny być pisane małymi literami i kursywą, np. *bcl-2*, *agrB*, *env*;
- geny ludzkie zapisujemy dużymi literami i kursywą, np. *N-MYC*, *BCL-2*, *RAS*;
- białka zwierząt – pierwsza litera symbolu duża, pismo proste, np. Myc, Fos, Ras;
- białka ludzkie – symbol dużymi literami, pismo proste, np. RAS, TNF, IL-1.

Redakcja „Postępów” uprzejmie prosi Autorów o przestrzeganie reguł proponowanych przez Autora listu.

XXVIII Konferencja szkoleniowa z zakresu biologii komórki

Uprzejmie zawiadamiamy, że Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików, Redakcja Postępów Biologii Komórki oraz prof. dr hab. L. Kaczmarek z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego organizują doroczną konferencję szkoleniową na temat: „Neurodegeneracja”, która odbędzie się 5 grudnia 1998 (sobota) w Warszawie, w sali wykładowej im. L. Paszkiewicza w Anatomicum Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5. Początek obrad o godz 10.00. Opłata za uczestnictwo 5 zł płatna na miejscu obrad. W ramach opłaty uczestnicy otrzymają suplement 11/98 PBK zawierający materiały konferencji.

Program:

Maria Barcikowska

Instytut-Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa
„Choroba Alzheimera jako przykład schorzenia neurodegeneracyjnego”

Bożena Kamińska

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa
„Biologia molekularna apoptozy”

Jacek Kuźnicki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa
„Wapń a apoptoza”

Ewa M. Urbańska, Waldemar A. Turski

Katedra i Zakład Farmakologii, Akademia Medyczna, Lublin
Zakład Toksykologii Klinicznej, Instytut Medycyny Wsi, Lublin
„Toksyny mitochondrialne - neurodegeneracja i drgawki”

Izabela Figiel

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa
„Apoptoza neuronów w hodowli in vitro”

Leszek Kaczmarek - Podsumowanie

Uczestnikom konferencji zostaną udostępnione po niższej cenie zeszyty PBK.

Warszawa, czerwiec 1998.

MERCK

⇒ODCZYNNIKI DO BIOCHEMII I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

- ◆ agarozy
- ◆ akrylamid/bisakrylamid
- ◆ bufory biologiczne
- ◆ detergenty
- ◆ barwniki/roztwory barwiące
- ◆ odczynniki do hybrydyzacji kwasów nukleinowych
- ◆ standardy do elektroforezy
- ◆ odczynniki pomocnicze: DTT, DTE, nietoksyczny substytut DEPC, PMSF, formamid, glicyna, mocznik, 2-merkaptoetanol, EDTA, EGTA, proteinaza K itd.
- ◆ bioperełki do izolacji DNA

⇒ODCZYNNIKI CHEMICZNE (RÓŻNEJ CZYSTOŚCI)

- ◆ do analiz podstawowych
- ◆ do analiz specjalnych (HPLC, AAS, GC)
- ◆ rozpuszczalniki do spektroskopii
- ◆ bufory
- ◆ i wiele innych

⇒SPRZĘT LABORATORYJNY

- ◆ akcesoria szklane i z tworzyw sztucznych
- ◆ mieszadła, homogenizatory, wytrząsarki
- ◆ łaźnie wodne, inkubatory, sterylizatory
- ◆ oraz inne

MERCK Sp. z o.o.
ul. Banderii 4
01-164 Warszawa
tel. 0-(22)-367117, 367209
fax. 0-(22)-363516, 368203

Startery... Amplifikacja DNA



MOLBIOL

Synteza oligonukleotydów do badań naukowych:

- standardowa skala syntezy 0.2 μmol (ilość wystarczająca do przeprowadzenia ok. 2000 amplifikacji)
- wysoka jakość produktów – wyłączone stosowanie odczynników z atestem ISO 9001
- oczyszczanie metodą filtracji na żelu, chromatograficzna analiza czystości oraz spektrofotometryczne oznaczenie ilości produktu
- dokładny opis wartości termodynamicznych i biochemicznych każdego produktu
- dostawa w postaci liofilizowanej
- zachowanie przez 2 lata próby referencyjnej
- możliwe chromatograficzne oczyszczenie produktów, znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi, zdegenerowane pozycje i inne modyfikacje

Zamówienia i informacje: Tel./Fax
061/8534647
 Tel. 0602/250895
 Tel. 0602/285416

GENUA · POZNAN · BERLIN

TIB MOLBIOL Sp. z o.o. · ul. Krakowska 13/9 · 61-889 Poznań

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. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wystania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki na s. 482) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna być w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy 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 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 doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik na s. 482.

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu,

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została
tabel i rycin. **tak** **nie** wysłana do innej redakcji. **tak** **nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak** **nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-
kowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak** **nie** pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak** **nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność reda-
kcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **tak** **nie** Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn. **tak** **nie**

podpis

TREŚĆ

Program	1
SŁOMSKI R.: Przedmowa	5
SŁOMSKI R., SIEMIENIAKO B., KWIATKOWSKA J., NAPIERAŁA D., GRONEK P.: Diagnostyka molekularna	9
MIKOŁAJCZYK K., BARCISZEWSKI J.: Struktura i funkcja białek zlokalizowanych w centrum katalitycznym rybosomu	29
GRAJEK W., MARECIK R.: Metody zwiększania produkcji barwników przez roślinne kultury tkankowe	45
NOWAK J.: Terapia genowa stan obecny i perspektywy rozwoju	67
KWIATKOWSKA J., KWIATKOWSKI D. J., SŁOMSKI R.: Strategie poszukiwania nowych genów na przykładzie genów <i>RalGDS</i> , <i>XPMC2H</i> i <i>TSC1</i> człowieka	81
JASIŃSKA A., KRZYŻOSIAK W. J.: <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> – geny dziedzicznych form raka piersi	93
BAL J., SOBCZYŃSKA A.: Mukowiscydoza – modelowa choroba dziedziczna	105
ŚWITOŃSKI M.: Markerowe mapy genomowe i ich wykorzystanie w hodowli zwierząt	113
SZYFTER K., JASKUŁA-SZTUL R., KUJAWSKI M. KITA S., JARMUŻ M., DĄBROWSKI P.: Czynniki genetyczne w raku krtani	123
SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J., SIEMIENIAKO B., NAPIERAŁA D., PŁAWSKI A., CHLEBOWSKA H., DZIECHCIEWSKA K., SŁOMSKA M.: Zastosowanie analizy DNA w ustalaniu ojcostwa	137
SCHNEIDER Z.: Molekularne aspekty miażdżycy	157
SŁOMSKI R., NAPIERAŁA D., KWIATKOWSKA J.: Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) w badaniach naukowych i diagnostyce molekularnej	195
NUC P., NUC K., SŁOMSKI R.: Sekwencjonowanie DNA – teoria, praktyka, problemy	219
KRASZEWSKI A., IMIOŁCZYK B.: Analogi oligonukleotydów w terapii antysensowej	239
PŁAWSKI A., SŁOMSKI R.: Geny supresorowe nowotworów	251
ZAWADA M.: Nowe metody w cytogenetyce molekularnej	265
SZYBIAK-STROŻYCKA U., OLESIENKIEWICZ A.: Priony – nowa klasa cząstek infekcyjnych	279
GRONEK P., SŁOMSKI R.: Oddziaływanie bodźców i stresu na człowieka i zwierzęta: założenia teoretyczne i wyniki empiryczne	295
GIEL-PIETRASZUK M., BARCISZEWSKA M. Z.: Swoiste oddziaływania peptydowych palców cynkowych z kwasami nukleinowymi	309
PAWŁAK A. L., RADZIKOWSKA E.: Rak płuca. tkankowo-specyficzne oddziaływania między genami supresorowymi, onkogenami oraz genami warunkującymi genetyczną podatność na nowotwór	329
Komunikat i List do Redakcji	343

Indeks 369705