

Podstawy strategii antysensu i możliwości zastosowań

Beata Madej-Dudzińska

Tomasz Twardowski

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polska Akademia Nauk

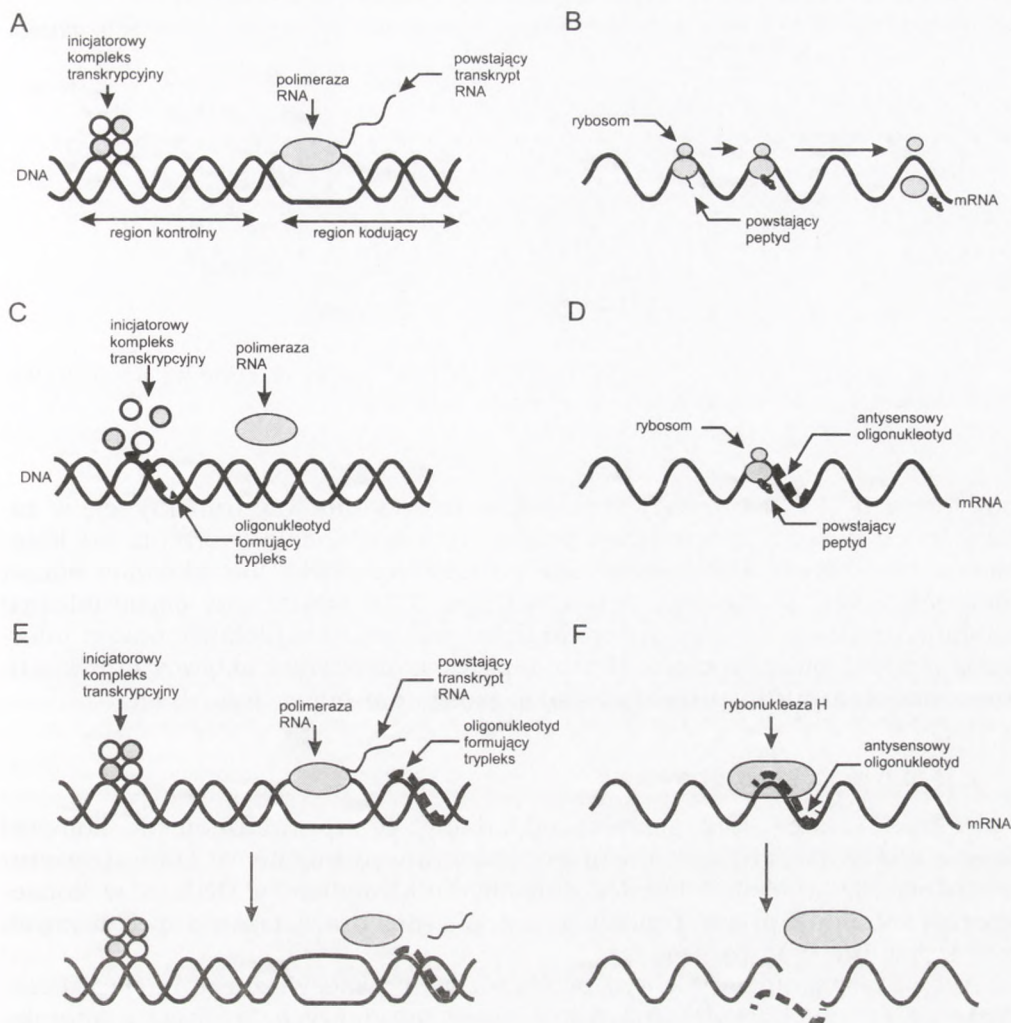
Poznań

1. Wstęp

Wdobie rozwoju biologii molekularnej odkrywane są nowe i coraz doskonalsze metody umożliwiające postęp w medycynie i agrobiotechnologii. Jedną z metod jest wprowadzanie do układu biologicznego krótkich łańcuchów DNA o sekwencji komplementarnej do wybranego fragmentu DNA lub mRNA. Krótkie oligonukleotydy, tworzące kompleks z kwasami nukleinowymi, na których przebiega proces biosyntezy białka, mają strukturę przeciwbieżną do sekwencji sensowej, właśnie dlatego przyjęto nazywać je „antysensowymi oligonukleotydami” (aDNA). Hybrydyzacja aDNA do wybranego fragmentu DNA lub mRNA powoduje zahamowanie procesu replikacji, transkrypcji lub translacji. W zależności od regulowanego etapu biosyntezy mówimy o „strategii antygenowej” lub „strategii antysensowej”.

Oprócz aDNA, w strategii antysensowej mogą być wykorzystane również rybozomy — cząsteczki RNA katalizujące reakcje przecięcia wiązania fosfodiesterowego w docelowym RNA. Rybozomy mogą być wykorzystane jako sekwencyjnie zależne terapeutyki, stosowane do blokowania ekspresji genów. Rybozym musi najpierw utworzyć komplementarny kompleks, na podobnej zasadzie jak w strategii antygeny i antysensu — czyli poprzez parowanie, z wybranym fragmentem RNA, a następnie zachodzi degradacja substratu (por. rys. 1).

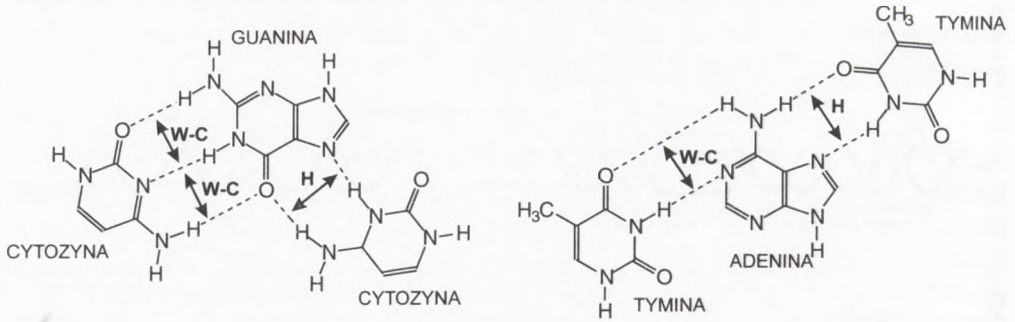
Antysensowe oligonukleotydy są przedmiotem bardzo intensywnych prac badawczych, zapewne znajdą szerokie zastosowanie zarówno jako terapeutyki (przynajmniej sześć jest obecnie w różnych fazach badań klinicznych), jak również jako narzędzie służące modyfikacji genomu roślin uprawnych (1,2 i prace tam cytowane).



Rys. 1. Możliwości zastosowań antysensowych oligonukleotydów: A — prawidłowy proces transkrypcji; B — prawidłowy proces translacji; C — inhibicja transkrypcji poprzez tworzący się trypleks między oligo i regionem kontrolnym DNA uniemożliwiający utworzenie kompleksu inicjującego DNA-polimeraza i rozplecenie DNA; D — zablokowanie translacji spowodowane hybrydyzacją oligo do mRNA, a w konsekwencji uniemożliwienie odczytu mRNA przez rybosom; E — inhibicja transkrypcji poprzez tworzący się trypleks między oligo a regionem kodującym DNA i zablokowanie odczytu informacji z DNA; F — inhibicja translacji spowodowana przecięciem mRNA przez RNazęH.

2. Strategia antygenowa i antysensowa

Antysensowe oligonukleotydy to łańcuchy o przeciwbieżnej sekwencji zasad do konkretnej sensowej sekwencji oligomeru kwasu nukleinowego, które są zdolne do utworzenia stabilnego trypleksu lub dupleksu. W strategii antyge-



Rys. 2. Schemat parowania zasad w trypleksie: W-C — parowanie zasad wg schematu Watsona-Cricka; H — parowanie zasad wg schematu Hoogstena.

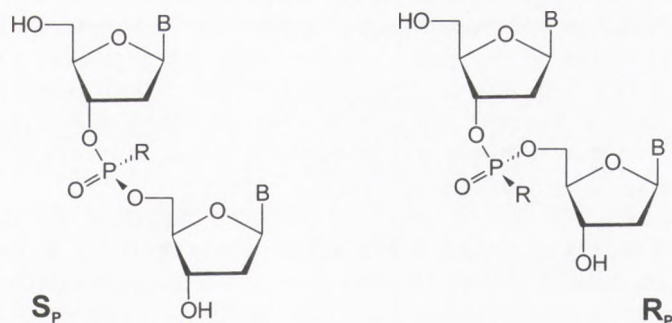
nowej (rys. 1 C i E) tworzący się trypleks może inhibować transkrypcję w zależności od miejsca hybrydacji poprzez uniemożliwienie tworzenia się kompleksu inicjującego DNA-polimeraza i rozplecenie DNA lub blokując odczyt informacji DNA. W strategii antysensu (rys. 1 D) przyłączony oligonukleotyd inhibuje translację tworząc heterodupleks, jednocześnie blokując odczyt informacji z mRNA przez rybosom. Heterodupleks może również aktywować RNazęH, która przecina mRNA, uniemożliwiając biosyntezę białka (rys. 1 F).

2.1. Strategia antygenowa

W myśl strategii antygenowej zakładamy, że wprowadzenie do komórki oligonukleotydu komplementarnego do wybranego fragmentu DNA spowoduje utworzenie trypleksu między tym oligonukleotydem a DNA, a w konsekwencji zahamuje proces replikacji i transkrypcji oraz wiązanie specyficznych białek regulujących te procesy.

Antysensowy oligonukleotyd przyłącza się do specyficznego miejsca DNA, gdzie jedna z nici zbudowana jest z zasad purynowych, a druga z komplementarnych zasad pirymidynowych (3). Takie ułożenie zasad powoduje zwiększenie rozmiarów dużej bruzdy co umożliwi wbudowanie się trzeciej nici. Stabilizacja trypleksu następuje w wyniku wytworzenia się wiązań wodorowych między zasadami trzeciej nici a zasadami purynowymi, tzw. wiązań Hoogstena.

Istnieją dwie możliwości położenia oligomeru: równoległe i antyrównoległe w stosunku do nici purynowej DNA. W przypadku ułożenia antyrównoległego, wiązania Hoogstena określa się jako odwrócone i jest to najbardziej efektywny układ wiązań dla par GxG i AxA (x-wiązania Hoogstena). Natomiast dla układu oligonukleotyd-DNA, gdzie wiązania Hoogstena tworzą się między AxT i GxC najkorzystniejsze jest położenie równoległe, w którym układ wiązań Hoogstena określa się jako normalny (3). Stabilność trypleksu zależy od regularności docelowej sekwencji (dopuszczalne są tylko pojedyncze, punktowe odstępstwa od układu, gdzie jedna z nici jest purynowa, a druga — piry-



Rys. 3. Analogi oligonukleotydów: R = S⁻ (tiofosforan) lub CH₃ (metanofosfonian) o konformacji na atomie fosforu S_p (lewoskrętna) i R_p (prawoskrętna). B = zasada (adenina, guanina, cytozyna lub tymina).

midynowa) oraz od warunków środowiska reakcji. Wysoka siła jonowa, poliaminy obecne w środowisku, niskie pH i obecność jonów Mg⁺² stabilizują trypleks.

2.2. Strategia antysensu

Kontrola biosyntezy białka na poziomie translacji jest możliwa poprzez tworzenie dupleksów pomiędzy egzogennymi oligonukleotydami a fragmentami mRNA. Inhibicja biosyntezy białka może być wynikiem blokowania procesu przez przyłączony antysensowy oligomer. aDNA zhybrydowany do mRNA uniemożliwia odczyt informacji (kolejnego kodonu) z nici mRNA.

Innym czynnikiem powodującym inhibicję translacji jest aktywacja RNazyH, która jest wywołana heteroduplexem [aDNA-mRNA]. RNazaH przecina RNA, usuwając obszar dwuniciowy uniemożliwiając syntezę określonego białka (4). Jednakże taka właściwość oligodeoksynukleotydów może być również uważana za niepożądaną, ponieważ kompleksy mRNA/aDNA, które nie aktywują RNazyH, są w wielu przypadkach skutecznymi inhibitorami biosyntezy białka (1).

Jedną z istotnych trudności w pracy z antysensowymi oligonukleotydami jest ich podatność na trawienie nukleazami, szczególnie w układzie komórkowym. Odporność na działanie nukleaz uzyskuje się poprzez modyfikacje w budowie aDNA w porównaniu z naturalnym DNA. Najkorzystniejsze, jak się wydaje, są modyfikacje w otoczeniu atomu fosforu w pozycjach niemostrkowanych. Zamianie ulegają atomy tlenu (jeden lub dwa przy tym samym atomie fosforu) na atom siarki (pochodne tiofosforanowe) lub grupę metylową (pochodne metanofosfonianowe) (rys. 3).

W niektórych przypadkach, mimo tej samej sekwencji, analogi tiofosforanowe oligonukleotydów spełniają rolę inhibitorów biosyntezy białka, podczas gdy fosfodiesterowe oligonukleotydy nie wykazują takiej aktywności (5). Przykładem mogą być PS oligonukleotydy hamujące biosyntezę inhibitora aktywatorów plazminogenu typu I (PAI-1) (5-7). PAI-1 jest glikoproteiną neutralizującą czynne

cząsteczki tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i aktywatora typu urakinażowego (u-PA) (5). Stany patologiczne, takie jak zapalenie mięśnia sercowego, zakrzepica czy miażdżyca (8) objawiają się wysokim poziomem PAI-1 we krwi; zahamowanie ekspresji tego białka poprzez blokadę antysensową ekspresji genu może ułatwić aktywację plazminogenu, a zatem podwyższy poziom plazminy we krwi, która z kolei degraduje zakrzepy.

Analogi tiofosforanowe lub ditiofosforanowe aktywują działanie RNazyH w przeciwieństwie do analogów metanofosfonianowych (9). Odporność oligonukleotydów na nukleazy jest bardzo ważną cechą ze względu na ich obecność w przestrzeni komórkowej i osoczu podczas transportu aDNA do docelowego fragmentu kwasu nukleinowego. Nukleazy obecne zarówno w osoczu jak i w ekstraktach komórkowych wyraźnie wolniej hydrolizują tiofosforany. Określono okres półtrwania oligonukleotydów tiofosforanowych w warunkach *in vivo*, który wynosi od 12 do 24 godzin (10). Wymiana jednego atomu tlenu na atom siarki powoduje także odporność takich analogów na nukleazy, jedynie nieznacznie obniżając ich zdolność do hybrydyzacji. Udowodniono również, że niektóre nukleazy wykazują stereospecyficzność wobec tiofosforanowych analogów, przykładem są R_p specyficzne nukleazy: fosfodiesteraza jadu węża oraz endonukleaza z *Serratia marcescens* (11), S_p specyficzne nukleazy: nukleaza S1 oraz P1 (12). Stereospecyficzne działanie nukleaz powoduje różną trwałość izomerów optycznych oligomerów w warunkach fizjologicznych. W badaniach prowadzonych na aDNA hamujących biosyntezę PAI-1 wykazano, że najtrwalsze są izomery zawierające wyłącznie wiązania o konfiguracji S_p , natomiast najszybciej ulegają degradacji izomery o konfiguracji wiązań wyłącznie R_p (6). Aktywność biologiczna oligomerów uwarunkowana ich stereospecyficznością stwarza podstawy do oczekiwania szczególnych zastosowań, zwłaszcza w odniesieniu do aplikacji medycznych.

3. Rybozomy jako narzędzie blokujące ekspresję genów

W 1982 r. Cech i wsp. odkryli, że niektóre cząsteczki RNA, wykazują właściwości katalityczne. Przykładowo: intron genu 26S rRNA *Tetrahymena thermophila* samodzielnie wycina się z pre-rRNA (13) podobnie jak aktywny składnik RNazyP (14). W ciągu kolejnych lat wzbogaciła się nasza wiedza na temat rybozymów, co spowodowało wyróżnienie kilku odrębnych klas.

3.1. Rybozomy, które są intronami zdolnymi do samodzielnego wycinania się z pre-RNA (*self-splicing ribozymes*)

3.1.1. Introny grupy I (*introns group I*)

Należą do nich m.in. mitochondrialne mRNA i rRNA pierwotniaków, bakterii, grzybów, chloroplastowe geny tRNA roślin wyższych. Mimo różnic w sekwencjach tych rybozymów stwierdzono występowanie podobnego fragmentu

— regionu rdzenia, w strukturze II-rzędowej, złożonego z około 70 nukleotydów, odpowiedzialnego za funkcję katalityczną rybozomu. Reszta nukleotydów tworzy długie, otwarte ramki odczytu, uformowane w helisy i pętle. Proces samowycinania, dwuetapowa transestryfikacja, przebiega w obecności jonów magnezu oraz guanozyny lub jej fosforanów (GTP, GDP, GMP). W pierwszym etapie następuje atak nukleofilowy grupy 3'OH wolnego GTP na wiązanie fosfodiesterowe znajdujące się na końcu 5' intronu, dochodzi do rozrwania tego wiązania i jednocześnie utworzenie wiązania między guanozyną i 3' końcem intronu. Kolejnym etapem jest ponowny atak nukleofilowy grupy 3'OH urydyny, uwolnionej w pierwszym etapie, na wiązanie na 3' końcu intronu. Reakcja kończy się połączeniem eksonów i utworzeniem dojrzałego RNA oraz intronu, który dalej ulega cyklizacji i specyficznym hydrolizom dając jako ostateczny produkt liniowy intron, pomniejszony o 19 końcowych nukleotydów (15).

3.1.2. Introny grupy II (*introns group II*)

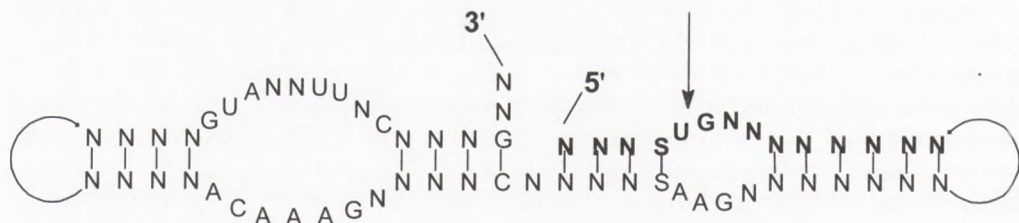
Do tej grupy zalicza się głównie introny genów mitochondrialnych grzybów niższych i roślin oraz genów chloroplastowych roślin i pierwotniaków (16); mają sekwencje długie — około 700 nukleotydów o skomplikowanej strukturze drugorzędowej, składającej się z sześciu domen położonych peryferyjnie oraz jednoniciowy fragment centralny. Samowycinanie zachodzi bez udziału wolnych nukleotydów, wymaga jednak obecności spermidyny, która prawdopodobnie stabilizuje konformację aktywną RNA (17). Mechanizm reakcji zbliżony jest do składania jądrowego pre-mRNA, a w pierwszym etapie konieczna jest hybrydyzacja sekwencji IBS1 (*intron binding sequence*) i EBS1 (*exon binding sequence*); następnie grupa 2'OH adenozy — położonej 7-8 nukleotydów od końca 3', atakuje nukleofilowo wiązanie fosfodiesterowe położone na końcu 5'. Powstaje tzw. *lasso*, czyli pętla utworzona przez dodatkowe wiązanie 2'5'- fosfodiesterowe. Kolejnym etapem reakcji transestryfikacji jest atak nukleofilowy grupy 3'OH eksonu 5' na koniec 3' intronu. W efekcie eksony łączą się, a intron zostaje uwolniony.

3.2. Rybozomy samotnące się na monomery (*self-cleaving*)

Do tej grupy należą małe, patogenne jednoniciowe RNA roślinne i zwierzęce, np. sTRSV — satelitarny RNA wirusa pierścieniowatej plamistości tytoniu, HDV — RNA wirusa żółtaczkii delta, ASBV — wiroid skazy słonecznej awokado.

3.2.1. Rybozomy typu „szpilki do włosów” (*hairpin*)

Aktywna domena katalityczna o kształcie szpilki do włosów znajduje się w nici (-) sTRSV (18), VS RNA izolowanym z mitochondriów *Neurospora* (19). Część katalityczna rybozomu składa się z 50 nukleotydów, a RNA substratowe z 14 nukleotydów; obie części tworzą dwie helisy i małą wewnętrzną



Rys. 4. Schemat budowy rybozemu typu „szpilki do włosów” (*hairpin*). Strzałka wskazuje miejsce przecięcia substratu; N — dowolna zasada; S — zasada C lub G; wytłuszczoną czcionką zaznaczono substrat.

pętlę, z sekwencją substratową AGUC, gdzie między G i U następuje cięcie (rys. 4).

Mechanizm reakcji opiera się na jednoetapowej transestryfikacji, katalizowanej przez jony Mg^{2+} . Grupa 2'OH atakuje najbliższe wiązanie fosfodiestrowe przy grupie 3'OH, w rezultacie powstaje cykliczny 2'3'-fosforan na końcu 3' i grupa hydroksylowa na końcu 5'. Hybrydyzacja substratu do rybozemu zachodzi w helisach: na końcu 5', gdzie ogranicza się do czterech nukleotydów i na końcu 3', gdzie liczba nukleotydów jest zmienna.

3.2.2. Rybozym HDV (wirus żółtaczkowy, *Hepatitis delta virus*)

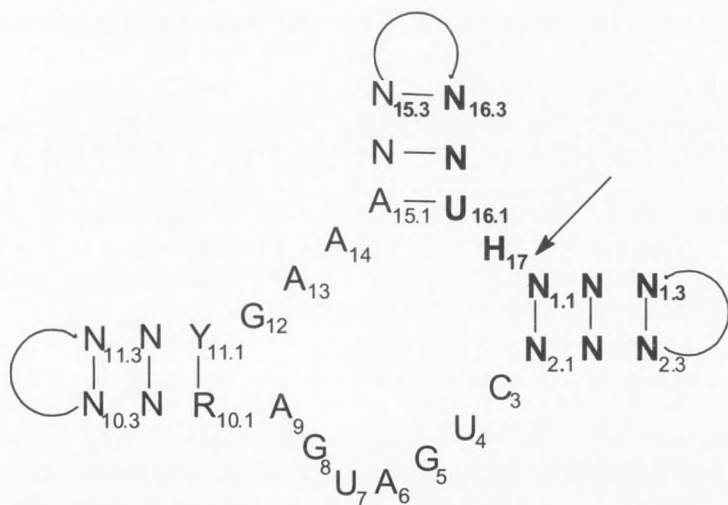
Struktura tego rybozemu jest odmienna od struktury rybozymów typu *hairpin* czy *hammerhead* i bardziej złożona. Najkrótszy fragment o właściwościach katalitycznych składa się z 70 nukleotydów. Produkty reakcji są takie same w całej klasie rybozymów *self-cleaving*, tutaj również powstają: cykliczny 2'3'-fosforan na końcu 3' i grupa hydroksylowa na końcu 5'.

3.2.3. Rybozemy typu „głowa młotka” (*hammerhead*)

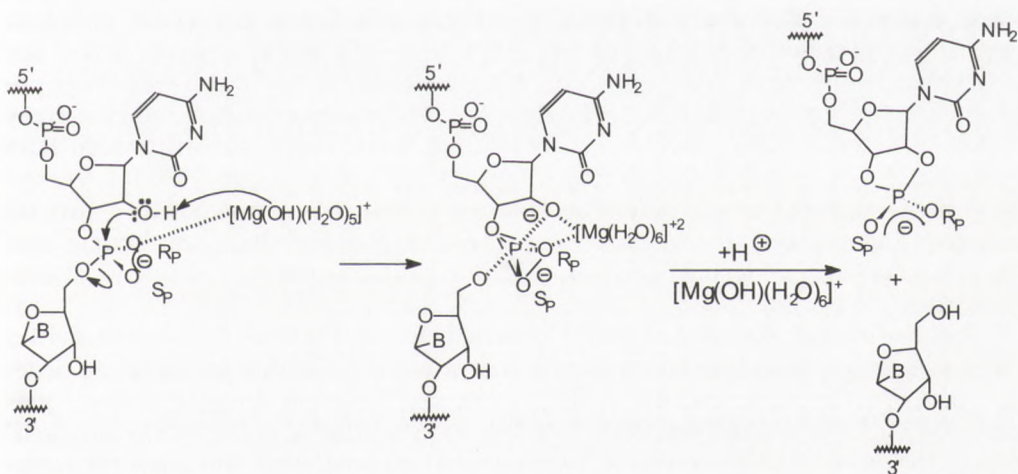
Domena katalityczna jest identyczna dla całej grupy rybozymów tego typu: 3 helisy ułożone wokół fragmentu jednoniciowego — rdzenia w kształcie główki młotka, zawierającego 11 stałych zasad. Około 40 nukleotydów rybozemu hybrydyzuje z substratem tworząc 2 helisy, a cięcie następuje w rdzeniu za sekwencją GUH (H=C, A, U) (rys. 5).

Na przykładzie rybozymów typu *hammerhead* starano się interpretować mechanizm reakcji samocięcia (rys. 6).

Magnez, który jest niezbędny do zajścia reakcji, występuje w środowisku reakcji w postaci związku kompleksowego z cząsteczkami wody: $[Mg(H_2O)_6]^{+2}$. W badaniach rentgenograficznych kryształów rybozemu wykazano bliskie położenie nukleotydów części katalitycznej i sekwencji GUH (20). W związku z tym zaproponowano dwa miejsca przyłączenia związku kompleksowego magnezu do rybozemu (21):



Rys. 5. Schemat budowy rybozymu typu *hammerhead*. Strzałka wskazuje miejsce przecięcia substratu; N — dowolna zasada; H — zasada C, U lub A; R_{10.1}, Y_{11.1} oznaczają najczęściej modyfikowane nukleotydy; G i C; wytłuszczoną czcionką zaznaczono substrat.



Rys. 6. Mechanizm reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego katalizowany przez rybozymy typu *hammerhead*.

1. $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_5]^{+2}$ przyłącza się do tlenu w pozycji pro-S 5' fosforanu nukleotydu A9, jednocześnie asocjując z nukleotydami G8, G10.1, G12 (rys. 5).

2. Jednakże bardziej prawdopodobny jest model, w którym $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{+2}$ przyłącza się najpierw do nukleotydu C3, a później do H₁₇ (22) (rys. 5). Przyłączony magnez powoduje deprotonację grupy 2'OH na H₁₇, co aktywuje atak nukleofilowy grupy 2'OH na fosfor 5' nukleotydu N1.1. Produktami reakcji jednoetapowej transestryfikacji są, jak w poprzednich przykładach, cykliczny 2'3'-fosforan na końcu 3' i grupa hydroksylowa na końcu 5' (rys. 6). Stosunkowo małe rozmiary rybozomu typu *hammerhead* stwarzają możliwości syntezy oraz modyfikacji chemicznych.

Użycie rybozymów typu *hammerhead* w inhibicji genów i w kontroli ekspresji genów, jak się wydaje, jest najbardziej logiczne ze względu na ich stosunkowo prostą budowę i małą liczbę nukleotydów. Jednakże rybozym z każdej z wymienionych klas rybozymów ma szansę stać się efektywnym terapeutycznym. Skuteczne zablokowanie ekspresji genów w znanym środowisku komórkowym i temperaturze uzależnione jest przede wszystkim od: stężenia rybozomu użytego do reakcji, modyfikacji wprowadzanych do łańcucha RNA na drodze syntezy chemicznej, długości i sekwencji nukleotydów, które utworzą helisę między rybozymem a substratem oraz oczywiście typu zastosowanego rybozomu. Najwięcej trudności wiąże się z transportem rybozomu do wnętrza komórki i do odpowiedniego substratu oraz ze zmianą kinetyki reakcji cięcia substratu przez rybozym po jego modyfikacjach chemicznych. Oprócz tego rybozym musi być także selektywny w stosunku do wybranej sekwencji i trwały w środowisku komórki. Minimalna efektywność oznacza, że hybrydyzacja i cięcie katalizowane przez rybozym musi następować w czasie krótszym niż wynosi czas połowicznej degradacji mRNA. Jednakże zakłada się enzymatyczny charakter tej reakcji, a zatem jedna cząsteczka rybozomu ma trawić wiele docelowych RNA. Kolejną trudnością związaną z zastosowaniem rybozymów w kontroli ekspresji genów *in vivo* jest wybranie miejsca cięcia na substracie. Cząsteczki RNA w środowisku komórkowym istnieją w różnych stanach funkcjonalnych i w konsekwencji posiadają wiele form strukturalnych. Jest bardzo prawdopodobne, że rybozomy dokonują cięcia tylko przy pewnej określonej konformacji substratowego RNA połączonej z ekspozycją określonego elementu strukturalnego. Jeżeli RNA występuje w żądanej konformacji w małym stosunku w porównaniu z innymi stanami tego kwasu rybonukleinowego, to efektywność rybozomu będzie bardzo mała, nawet przy jego dużym stężeniu i długim okresie aktywności biologicznej.

Bardzo ważne dla optymalizacji i specyficzności reakcji cięcia jest również długość helisy tworzącej się między substratem a rybozymem. Mimo że oczekiwany jest wzrost szybkości reakcji wraz ze wzrostem długości helisy, jednak zbyt długa helisa powstała między rybozymem a substratem strukturalnie przeważa nad budową reszty rybozomu co powoduje zmniejszenie szybkości reakcji, a w konsekwencji ograniczone i wolniejsze uwalnianie rybozomu po cięciu. Prawdopodobna jest także niewłaściwa hybrydyzacja z błędnym dopasowaniem nawet kilku nukleotydów przy zbyt długiej sekwencji helisy.

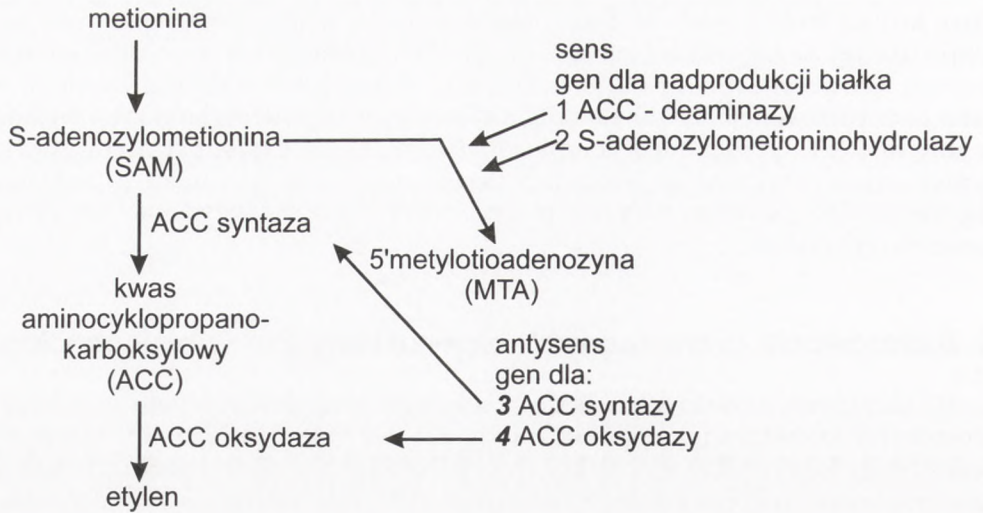
Zbyt krótka helisa jest również niekorzystna ze względu na możliwość wystąpienia tej samej sekwencji w innych RNA obecnych w komórce, co spowoduje niespecyficzne działanie rybozomu. Z analizy baz danych wynika, że taka sama sekwencja 11 do 12 nukleotydów jest niepowtarzalna i nie wystąpi w innym RNA. Oprócz tego kompleks utworzony między substratem a rybozymem może zbyt szybko rozpadać się, a wtedy reakcja zajdzie z małą wydajnością. Do pewnego stopnia można temu zapobiec używając większego stężenia rybozomu.

4. Zastosowanie antysensowych oligonukleotydów w biotechnologii

W idealnym modelu obu metod: strategii antygenowej i antysensowej, stosowane syntetyczne oligonukleotydy nie są toksyczne, a ich transport przez błony komórkowe jest efektywny i przebiega bez oddziaływań z białkami komórkowymi, rozpoznawanie docelowego DNA lub mRNA jest szybkie i specyficzne, a ewentualne produkty degradacji wykorzystane do syntezy *de novo* DNA nie mogą powodować mutacji genetycznych (1).

Transport oligonukleotydów do wnętrza komórek jest trudną do rozwiązania kwestią. W celu ułatwienia wnikania aDNA przez błony komórkowe stosuje się modyfikacje ich struktury związkami lipofilowymi, np. cholesterolem lub alkoholami z długimi łańcuchami alifatycznymi (23,24). Proponowano również połączenia oligonukleotydów z dodatnio naładowanymi cząsteczkami, np. polilizyną, aby ułatwić to kontakt aDNA z ujemnie naładowaną błoną komórkową (24,25). Dodawanie do hodowli komórkowych oligonukleotydów zamkniętych w liposomach ułatwia znacznie ich transport do wnętrza komórki, a jednocześnie ochrania przed działaniem nukleaz (26,27). Jednakże zagadnienie „transportu” musi być każdorazowo rozwiązywane w uzależnieniu od konkretnych warunków, przede wszystkim struktury rybozomu, właściwości komórki oraz zaplanowanego efektu biologicznego.

Strategie antysensowe znajdują liczne zastosowanie w agrobiotechnologii. Zastosowanie tej konkretnie technologii związane jest nie tylko z zaletami, czysto technicznymi, ale również z ...odbiorem społecznym żywności modyfikowanej technikami inżynierii genetycznej. Strategie antysensu prowadzą do obniżenia aktywności biologicznej jakiegoś enzymu, a jednocześnie pozwalają uniknąć wprowadzenia nowego np. bakteryjnego lub zwierzęcego [czyli obcego dla systemu danej rośliny] układu ekspresyjnego. W ten sposób stwarza się możliwość rezygnacji z wprowadzenia do układu białka z innego gatunku. Doskonałą ilustracją tej drogi postępowania są transgeniczne pomidory, w których modyfikacji podlega tak istotna cecha technologiczna jak szybkość dojrzewania i mięknięcia, a co za tym idzie „okres życia półkowego”. Na szybkość dojrzewania owoców generalnie (nie tylko pomidorów) zasadniczy wpływ mają dwa procesy. Po pierwsze, dojrzewanie, które jest katalizowane przez fitohormon — etylen. Po drugie, szybkość mięknięcia, czyli trawienie pektyny przez poligalaktourynazę, która jest podstawowym składnikiem skórki wielu owoców, odpowiedzialnym za jej jędrność.



Rys. 7. Uproszczony schemat biosyntezy etylenu. Wskazane są etapy intensyfikacji i opóźnienia szlaku metabolicznego. Obniżenie efektywności biosyntezy etylenu można uzyskać przez wprowadzenie (nowych) kopii genu dla 1 i 2 lub antysensu dla 3 i 4.

Odmiana pomidorów Flavr SavrTM została wprowadzona na rynek amerykański już w 1994 r. (28). Był to pierwszy transgeniczny owoc wprowadzony do powszechnej komercjalizacji i bardzo pozytywnie przyjęty przez społeczeństwo USA i Kanady. Odmiana Flavr SavrTM została z przyczyn ekonomicznych już wycofana z rynku (nieopłacalna produkcja). To miejsce zajęły odmiany o obniżonej produkcji etylenu. Ku zaskoczeniu wielu naukowców „żywe” pomidory transgeniczne nie zostały dopuszczone na rynek Unii Europejskiej, a jedynie półprodukty, jak np. „Tomato Puree” produkowane przez amerykańską firmę Safeway na rynek brytyjski. Dokonana modyfikacja Flavr SavrTM polegała na wprowadzeniu w orientacji antysensowej fragmentu genu poligalaktourynazy, co spowodowało obniżenie aktywności tego enzymu w pomidorach o 95%, a w konsekwencji spowolnienie degradacji skórki, a zatem zachowanie jędrności owocu. Druga droga spowalniania procesu dojrzewania polega na regulacji stężenia etylenu. Uproszczony schemat biosyntezy etylenu zilustrowany jest na rysunku 7.

Ilość produkowanego przez komórkę preparatu może być modulowana np. przez zablokowanie lub zwiększenie liczby genów kodujących enzymy istotne dla tego procesu lub przez zintensyfikowanie ekspresji produktów ubocznych. Na prezentowanym schemacie wprowadzenie antysensu w stosunku do syntazy lub oksydazy kwasu aminocyklopropanokarboksylowego (ACC) powoduje obniżenie biosyntezy etylenu, w dalszej konsekwencji — spowolnienie dojrzewania. W ten sposób otrzymano w firmach DNA Plant Technology i Monsanto pomidory znane pod nazwą Endless SummerTM (produkt firmy DNA Plant Technology). Natomiast spowodowanie nadprodukcji

enzymów ACC-deaminazy lub S-adenozylometioninohydrolazy w wyniku zwiększenia liczby kopii odpowiednich genów spowoduje uaktywnienie bocznego szlaku metabolicznego prowadzącego do 5'metylotioadenozyny (MTA). Taka metodyka również prowadzi do obniżenia stężenia etylenu, a zatem podobnego efektu końcowego (spowolnienia dojrzewania).

Podobne strategie prac eksperymentalnych dotyczących stężenia jednocześnie poliamin i etylenu w szlaku metabolicznym od argininy przez sperminę do etylenu mogą prowadzić nawet do zmiany fenotypu ziemniaka (29).

Oprócz wykorzystania antysensu w agrobiotechnologii, trwają badania nad zastosowaniem aDNA jako terapeutyków. Z największym zainteresowaniem spotkały się oligonukleotydy antysensowe wobec mRNA. Prowadzone są badania kliniczne z sześcioma aDNA odpowiedzialnymi za: hamowanie replikacji wirusów (cytomegalowirusa i HIV), hamowanie ekspresji białka ICAM-1, kinazy białkowej C oraz onkogenów c-myc i c-raf (2). Badania nad zastosowaniem strategii antygenowej i rybozymów jako leków oligonukleotydowych prowadzone są jeszcze na poziomie *in vitro*.

5. Zakończenie

Zrozumienie mechanizmu aktywności biologicznej antysensowych oligomerów często jest bardzo trudne, dlatego że niejednokrotnie obserwujemy efekty niespecyficzne (artefakty). Fakt ten ma szczególnie istotne znaczenie przy wzrastającym znaczeniu a-DNA jako terapeutyków. Błędy interpretacyjne są częściej spotykane w odniesieniu do tiofosforanowych analogów oligonukleotydów (PS) aniżeli w przypadku fosfodwuestrowych (PO). Ponieważ coraz częściej stosowane są PS jako bardziej odporne na trawienie przez nukleazy (w porównaniu z PO) dlatego przyjęcie właściwych i jednoznacznych prób kontrolnych ma szczególne znaczenie.

Najczęstsze przyczyny powstawania artefaktów i dalej błędów interpretacyjnych są następujące:

Ładunek oligonukleotydów powoduje, że są one polianionami, a zatem możliwe jest oddziaływanie i wiązanie oligonukleotydów do kwasów nukleinowych, białek i innych składników komórkowych, niezależnie od sekwencji nukleotydowej. Ponieważ stała dysocjacji PS w takich kompleksach jest znacznie niższa, a zatem to zastrzeżenie jest szczególnie istotne w odniesieniu do tych właśnie oligonukleotydów, którym przypisuje się istotniejszą rolę w możliwych zastosowaniach.

Analogi PS oligonukleotydów mogą dawać efekty biologiczne, które nie są funkcją antysensu, a są uzależnione od sekwencji. W szczególności obserwowano takie efekty w przypadku występowania kilku takich samych nukleotydów (np. G₄) na końcach aDNA.

Sekwencje palindronowe w aDNA są również przyczyną niespecyficznych oddziaływań (zarówno PS jak i PO). Szczególnie w takiej sytuacji ma miejsce występowanie mechanizmów sekwencyjnie niespecyficznych (sekwencyjnie zależnych i niezależnych).

Dlatego sprawą zasadniczą jest przygotowanie właściwych prób kontrolnych. Podstawowy efekt kontrolny to obniżenie inhibicji ekspresji docelowego DNA lub RNA jako funkcji stężenia stosowanego aDNA. Istotnym elementem weryfikacyjnym jest sprawdzenie efektu statystycznie przypadkowych (losowych) sekwencji aDNA czy też takich oligo, w których zmieniono tylko kilka nukleotydów w istotnych pozycjach.

Inne możliwości weryfikacji efektu aDNA stwarza zastosowanie PNA (*peptide nucleic acid*; peptydylowe kwasy nukleinowe). PNA są analogami strukturalnymi DNA, w których występuje szkielet pseudopeptydowy zbudowany z niechiralnych i wolnych od ładunków cząsteczek N-(2-aminoetylo)-glicyny. PNA są zdolne do sekwencyjnie zależnej hybrydyzacji wiązaniami typu Watsona-Cricka. Więcej informacji na temat PNA zawartych jest w opracowaniu „PNA jako nowe narzędzie w biologii molekularnej” w tym samym numerze „Biotechnologii”.

Niezależnie od wzmiankowanych trudności należy sądzić, że strategie antysensowe są jedną z najbardziej atrakcyjnych technologii modyfikacji ekspresji genomu.

Literatura

1. Stec W. J., (1996), *Biotechnologia*, 4(35), 91-107.
2. Koziółkiewicz M., (1998), *Postępy Biochemii*, 2, 125-135 i prace tam cytowane.
3. Kwintowski M., (1994), *Biotechnologia*, 4(27), 69-78.
4. Marabelli Ch. K., Crooke S. T., (1993), *Antisense oligonucleotides in the context of modern molecular drug discovery and development*, in: *Antisense Research and Applications*, Eds. Lebleu B., Crooke S. T., 8-35.
5. Cierniewski C. S., Babińska A., Świątkowska M., Wilczyńska M., Okruszek A., Stec W. J., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 227, 494-499.
6. Stec W. J., Cierniewski C. S., Okruszek A., Kobylańska A., Pawłowska Z., Koziółkiewicz M., Pluskota E., Maciaszek A., Rębowska B., Stasiak M., (1997), *Antisense and Nucl. Acids Drug Dev.*, 7, 567-573.
7. Buczek W., Cierniewski C. S., Kobylańska A., Koziółkiewicz M., Okruszek A., Pawłowska Z., Pluskota E., Stec W. J., (1997), *Pharmacology and Therapeutics*, 76, 161-175.
8. Świątkowska M., Wilczyńska M., Cierniewski C. S., (1991), *Post. Biochemii*, 37 (3/4), 139-145.
9. Koziółkiewicz M., (1994), *Biotechnologia*, 4(27), 50-54.
10. Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J. S., Brodes S., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7706-7711.
11. Stec W. J., Grajkowski A., Kobylańska A., Koziółkiewicz M., Misiura K., Okruszek A., Wilk A., Guga P., Boczkowska M., (1995), *J. Am. Chem.*, 117, 12019-12029.
12. Porter L., Connolly B. A., Eckstein F., (1983), *Biochemistry*, 22, 1369-1374.
13. Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J., Sand J., Gotschling D. E., Czech T. R., (1982), *Cell*, 31, 147-157.
14. Guerrier-Takada C., Gardiner K. J., Marsh T. L., Pace N. R., Altman S., (1983), *Cell*, 35, 849-857.
15. Cech T. R., (1987), *Science*, 236, 1532-1539.
16. Michel F., Umesono K., Ozeki H., (1989), *Gene*, 82, 5-30.
17. van der Veen R., Arnberg A. C., van der Horst G., Bonnen L., Tabak H. F., Grivell L. A., (1986), *Cell*, 44, 225-234.

18. Buzayan J. M., Gerlach W. L., Bruening G., (1986), *Nature*, 323, 349-353.
19. Saville B. J., Colins R. A., (1990), *Cell*, 61, 685-696.
20. Scott W. G., Finch J. T., Klug A., (1995), *Cell*, 81, 991-1002.
21. Birikh K. R., Heaton P. A., Eckstein F., (1997), *Eur. J. Biochem.*, 245, 1-16.
22. Murray J. B., Adams C. J., Arnold J. R. P., Stockley P. G., (1995), *Biochem J.*, 311, 487-494.
23. Boiziau C., Toulme J. J., (1991), *Biochimie*, 73, 1403-1408.
24. Stevenson M., Iverson P. L., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 2673-2682.
25. Degols G., Leonetti J. P., Gagnor C., Lemaite M., Lebleu B., (1989), *Nucl. Acids Res.*, 17, 9341-9350.
26. Leonetti J. P., Machy P., Degols G., Lebleu B., Leserman L., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2448-2451.
27. Thierry A. R., Dritschilo A., (1992), *Nucl. Acids Res.*, 20, 5691-5698.
28. Bartoszewski G., Niemirowicz-Szczytt K., (1998), *Biotechnologia*, 1, (40), 43-63 i prace tam cytowane.
29. Kumar A., et al., (1996), *Plant J.*, 9, 147-158.

Background of antisense strategy and potential applications

Summary

Structure and function of antisense oligomers and ribozymes are discussed. Some applications of aDNA in medicine and agrobiotechnology are discussed.

Key words:

antisense, antigene, ribozyme.

Adres do korespondencji:

Beata Madej-Dudzińska, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań.