

Strategie antysensowe w regulacji translacyjnej biosyntezy białka. Perspektywy agrobiotechnologii roślin

Maciej Nawrot

Andrzej Sobkiewicz

Tomasz Twardowski

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań

1. Translacja jako ważny etap regulacji ekspresji genomu

Jednym z najbardziej skomplikowanych procesów przebiegających w komórce, który jednakże potrafimy z dużą wiernością odtworzyć *in vitro* jest biosynteza białka. Komponenty tego procesu (czynniki białkowe i kwasy nukleinowe) zostały wydzielone i scharakteryzowane z różnorodnego materiału. Opanowanie procesu „tłumaczenia” mRNA na skalę preparatywną tworzy szansę zasadniczego skrócenia cyklu produkcyjnego cennych peptydów (białek czy też hormonów) w przemyśle. Synteza białka z pominięciem etapu transkrypcji, a zatem bez trudnych i kosztownych manipulacji na etapie genomu, będzie miała zasadnicze znaczenie ekonomiczne.

Początkowo sądzono, że mechanizmy regulatorowe działają, jeżeli nie wyłącznie — to przede wszystkim — na poziomie transkrypcji. Obecnie również translacja jest uważana za ważny etap regulacji ekspresji genów, szczególnie u organizmów wyższych charakteryzujących się kompartmentacją komórki. Regulacja szybkości translacji może być traktowana jako:

- a) kontrola całkowita procesu biosyntezy w komórce,
- b) specyficzna regulacja dotycząca ekspresji konkretnego genu.

W przypadku regulacji związanej z aktywnością całego aparatu translacyjnego (a zatem nie dotyczącej syntezy określonego białka) obserwujemy modyfikację uniwersalnych komponentów systemu, np. rybosomów albo czynników inicjatorowych czy też elongacyjnych. Natomiast w odniesieniu do konkretnego białka najprawdopodobniej mechanizm regulacji będzie związany ze specyficznym mRNA albo z innym komponentem układu funkcjonalnie związanym z danym białkiem, np. z drugorzędowym metabolitem.

Możliwości regulatorowe organizmu na poziomie transkrypcji i translacji związane są z wieloma podetapami tych procesów, a w szczególności dotyczą one: transportu RNA przez membrany, trwałości cząsteczek (białek i RNA), składania mRNA (*splicing*), formowania części 3' mRNA zaangażowanego

w inicjację biosyntezy, czy też tworzenia nieaktywnych kompleksów translacyjnych. Fizjologiczne znaczenie tych mechanizmów regulatorowych jest oczywiste. Zatrzymanie transkrypcji jakiegoś genu nie ma znaczenia dla syntezy odpowiadającego mu białka, jeżeli transkrybowany DNA (do mRNA) znajduje się w cytoplazmie, w formie stabilnych kompleksów zmagazynowanych w komórce. Translacja takiego mRNA przebiega niezależnie od innych procesów, np. przebiegających w jądrze komórkowym. W związku z tym tylko regulacja translacyjna albo posttranslacyjna może determinować ilość funkcjonalnego produktu biosyntezy i mieć znaczenie dla cyklu fizjologicznego. W przypadku roślin, które charakteryzują się zarówno niemożliwością zmiany swej lokalizacji jak i syntezą dużej ilości materiałów zapasowych, niezależnie od warunków zewnętrznych, efektywna regulacja biosyntezy białka umożliwiła szybką adaptację do tych warunków. Regulacja translacyjna biosyntezy białka ma znaczenie dla stymulacji czy też zahamowania określonych procesów, które są pobudzane (lub modulowane) warunkami zewnętrznymi. W wyniku zastosowania strategii a-DNA (antysensowych oligonukleotydów) możliwa jest represja aktywności biologicznej komplementarnego kwasu nukleinowego. W pewnych warunkach prowadzi to nawet do stymulacji biosyntezy innego produktu, np. blokowanie genów represorów lub „naprawa” skłádania mRNA (1).

2. Możliwości zastosowania antysensowych oligonukleotydów w regulacji translacji

Dzięki stosowaniu obecnie nowoczesnych, efektywnych metod syntezy DNA istnieją możliwości użycia oligodeoksynukleotydów do blokowania funkcji genów (zob. M. Kwinkowski). Antysensowy związek mający spełniać funkcję regulatora translacji powinien charakteryzować się kilkoma uniwersalnymi cechami:

- 1) możliwie wysoką odpornością na nukleazy (preferencja w stosowaniu serii oligodeoksy),
- 2) specyficznym wiązaniem substratu w ściśle zdefiniowanym rejonie,
- 3) nietoksycznością,
- 4) możliwością łatwego zastosowania *in vivo*.

Regulacja translacji *in vivo* wymaga wprowadzenia a-DNA do komórki, co jest realizowane poprzez wbudowanie genu odpowiedzialnego za produkcję a-DNA do genomu lub egzogenne podawanie oligonukleotydu. Efekt działania związku antysensowego uzależniony jest jednak od wielu czynników, np. dostępności substratu; struktury drugorzędowej kompleksu [a-DNA*substrat]; stabilności wiązań pomiędzy substratem i a-DNA oraz mechanizmu efektu inhibitorowego powodującego zahamowanie ekspresji genu.

Podstawowe strategie regulacji translacyjnej obejmują oddziaływania pomiędzy związkiem antysensowym a kwasem nukleinowym (mRNA, rRNA, tRNA,

DNA). W przypadku zastosowania związków antysensowych do blokowania aktywności genów mamy do czynienia albo z tworzeniem trypleksu pomiędzy helisą genu i a-DNA (zob. M. Kwinkowski), tworzeniem dupleksu pomiędzy jedną z nici DNA i a-DNA albo heterodupleksu pomiędzy mRNA i a-DNA.

W świetle niedawnych odkryć, realizacja strategii antysensowych może napotkać na pewne trudności. Wprowadzając do komórki gen odpowiedzialny za syntezę a-DNA musimy znać sekwencję docelowego mRNA (*target*). Informacje na temat sekwencji genów pozyskujemy z przeprowadzonych eksperymentów sekwencjonowania genu oraz z komputerowych baz danych. Kolejnym etapem jest określenie sekwencji intronów w obrębie genu (mRNA składa się z eksonów). Zazwyczaj na tym etapie można już określić sekwencję mRNA badanego genu. Jednakże za ostateczną sekwencję mRNA odpowiada nie DNA, lecz *guide* RNA, od którego uzależniony jest proces redagowania (*editing*) czyli wymiany oligonukleotydów w obrębie mRNA (2). Proces ten, nie do końca poznany, prowadzi do znacznych zmian w mRNA; w konsekwencji odmienna jest jego sekwencja od zapisanej w DNA. Istnienie tego procesu powodować może zatem utrudnienia w projektowaniu a-DNA na podstawie struktury genu.

Próby blokowania aktywności mRNA przez tworzenie w jego obrębie dwuniciowych heterohybrydów może czasami okazać się nieskuteczne. W mRNA występują różne struktury II-rzędowe, powstające przez parowanie komplementarnych odcinków wewnątrz tego kwasu. Badania translacji takiego mRNA na rybosomie wykazały, że możliwy jest „przeskok” rybosomu „obok” takiego, dwuniciowego fragmentu, a następnie kontynuacja syntezy peptydu (3). W konsekwencji konformacja mRNA może zatem warunkować powstanie określonego peptydu. Ingerencja w ten skomplikowany układ aparatu biosyntezy białka za pomocą a-DNA może w pewnych przypadkach zmodyfikować, a nie zahamować proces translacji. Blokowanie aktywności genu przez hybrydyzację z a-DNA jest utrudnione w przypadku komórek Eukariota ze względu na konieczność transportu oligonukleotydu zarówno przez błonę komórkową jak też jądrową. W tym przypadku, jak się wydaje, celowe jest umieszczenie w obrębie genomu genu odpowiedzialnego za syntezę antysensowych oligonukleotydów. W niektórych laboratoriach wykorzystuje się już do znalezienia optymalnych oligomerów biblioteki oligonukleotydów. Są to zbiory różnych oligonukleotydów o określonej długości posiadające wszystkie możliwe kombinacje sekwencji nukleotydów (np. biblioteka oligonukleotydów o długości 8-meru posiada $4^8 = 65\,536$ różnych oligomerów). Wykorzystując metodę SURF (ang. *synthetic unrandomization of randomized fragments*) oraz bibliotekę 2'-O-metylowych i tiofosforowych pochodnych oligonukleotydów możliwe było znalezienie miejsca najbardziej dostępnego dla hybrydyzacji w strukturze szpilki do włosów H-*ras* mRNA, jak również znalezienie takiej sekwencji oligonukleotydu (8-mer), która najbardziej inhibuje aktywność wirusa HSV-1 (4).

Znane są również pierwsze prace na temat strategii zastosowania antysensowych oligonukleotydów do naprawy funkcji uszkodzonego genu. Doniesienia z ostatnich kilku lat o zastosowaniach antysensowych DNA dotyczyły

przede wszystkim specyficznego blokowania ekspresji genów. Pod koniec 1993 r. pojawiła się praca o wykorzystaniu a-DNA do przywrócenia funkcji uszkodzonego genu (1). Mutacje w obrębie intronów pre-mRNA ludzkiej β -globiny uważane są za przyczynę β -talasemii. Mutacje te powodują zaburzenie składania pre-mRNA. Oligonukleotydy komplementarne do obszarów, w których występują zmutowane zasady bądź do miejsc pęknięć mRNA powstałych na skutek mutacji przywracają w zadowalający sposób prawidłowe składanie mRNA.

Kolejnym zastosowaniem oligonukleotydów jest tworzenie kompleksów z białkami — produktami translacji. Metoda ta opiera się na oddziaływaniach pomiędzy białkami a kwasami nukleinowymi. Niektóre z białek (czynniki elongacyjne, histony) wiążą kwasy nukleinowe w warunkach fizjologicznych. Zakładać można zatem, że każde takie białko (np. enzym) może związać DNA lub RNA pod warunkiem występowania odpowiedniej sekwencji i struktury tych kwasów. Poszukiwania takiej sekwencji prowadzone są za pomocą selekcji i ewolucji *in vitro*. Stosowanie tej metody przyniosło już pierwsze sukcesy. Przeprowadzona została selekcja pełnej puli oligonukleotydów (oktamerów) pod względem wiązania się do trombiny (jeden z enzymów odpowiedzialnych za krzepliwość krwi) (5). Okazało się, że pewne oligonukleotydy trwale wiążą się z tym białkiem. Istnieje zatem prawdopodobieństwo zastosowania ich jako inhibitorów tego enzymu podczas leczenia zawałów serca, w celu obniżenia poziomu krzepliwości krwi. Zastąpienie stosowanego do tej pory białkowego inhibitora trombiny przez oligonukleotydy niweluje możliwość odpowiedzi immunologicznej na ten lek.

2.1. Komponenty układu translacyjnego jako obiekty docelowe dla antysensowych oligonukleotydów

Mechanizm biosyntezy białka jest uniwersalny dla wszystkich organizmów (Prokariota i Eukariota). Wykorzystując strategie a-DNA i znając funkcjonalnie ważne sekwencje rRNA możemy podjąć się próby blokowania ważnych procesów zachodzących na rybosomie.

Badania regulacji na poziomie translacji możliwe są dzięki istnieniu (np. w obrębie rybosomu) krótkich sekwencji rRNA, zachowawczych u większości organizmów. Cechą wyróżniającą je jest ich konserwatywność, co prowadzi do wniosku o znaczeniu tych elementów strukturalnych. Sekwencje te są najczęściej eksponowane na powierzchni rybosomu, co warunkuje ich oddziaływanie z czynnikami zewnętrznymi (będącymi kofaktorami translacji m.in. czynniki elongacyjne, GTP) oraz tworzenie centrów aktywnych.

Zastosowanie analizy komputerowej pozwala na: badanie ich sekwencji, określanie struktury wyższego rzędu, a także na obliczanie energii swobodnej w różnych stanach konformacyjnych. Zabiegi te okazały się pomocne przy projektowaniu antysensowych oligonukleotydów i ustalaniu koncepcji eksperymentalnej dla regulacji biosyntezy białka na poziomie translacji.

Niezwykle interesujące, jak się wydaje, jest użycie w strategii antysensowej rybozymów, czyli cząsteczek RNA o właściwościach katalitycznych (zob. L. Woźniak). Działanie rybozymu wydaje się bardziej efektywne niż zastosowanie klasycznych strategii antysensowych, opartych na powstawaniu hybrydy [aDNA*kwasy nukleinowy]. Działanie rybozymu powoduje trwałe uszkodzenie aktywnego odcinka kwasu nukleinowego. Natomiast mechanizm działania oligodeksynukleotydów polega na hybrydyzacji i utrzymaniu równowagi ich dysocjacji i asocjacji z docelowym kwasem nukleinowym. Produktem jest powstający nieaktywny kompleks lub substrat dla RNazy H. Obecnie konstruuje się rybozomy skierowane do określonych sekwencji mRNA, w celu blokowania ich aktywności. Pierwsze sukcesy przy zastosowaniu tej metody zanotowano, np. w inhibicji aktywności wirusa HIV.

2.2. Modelowe badania regulacji translacji przez blokowanie funkcji rRNA za pomocą α -DNA

2.2.1. Domena α -sarcyny dużego rybosomalnego RNA (L-rRNA)

Jednym z najlepiej poznanych rejonów L-rRNA jest domena α -sarcyny. Jest ona oddalona o ok. 360 nukleotydów od końca 3' dużego rybosomalnego RNA (L-rRNA), posiada w swoim obrębie zachowawczą sekwencję, uniwersalną we wszystkich królestwach: pętlę domeny α -sarcyny (domena składa się z pętli i pnia). W obrębie pętli następuje specyficzne przecięcie domeny przez toksynę pochodzenia grzybowego: α -sarcynę (6). Hydroliza wiązania fosfodiestrowego, pomiędzy 2661 i 2662 nukleotydami 23S rRNA z *E. coli* oraz 3025 i 3026 nukleotydami z 26S rRNA z *S. cerevisiae* w domenie α -sarcyny, powoduje zablokowanie określonych procesów związanych z biosyntezą białka: syntezy wiązania peptydowego i przemieszczenia nowo syntetyzowanego peptydylo-tRNA z miejsca A do P na rybosomie (7). Stwierdzono udział pętli domeny α -sarcyny w wiązaniu czynników elongacyjnych (EF1, EF2) do rybosomu. Przypuszcza się, że pętla domeny α -sarcyny przyjmuje dwa stany konformacyjne o minimalnej energii swobodnej, a przejścia pomiędzy nimi są wymuszone przyłączeniem czynników elongacyjnych.

W badaniach nad domeną α -sarcyny wykorzystano technikę blokowania aktywności rybosomu przez hybrydyzację pętli domeny z antysensowymi oligonukleotydami (8). Spośród wielu testowanych oligonukleotydów tylko hybrydyzacja oligomerów komplementarnych do pętli od strony 3' (włącznie z fragmentem łożdgi) wykazywała zahamowanie elongacji łańcucha peptydowego na rybosomie oraz dysocjację rybosomów na podjednostki. Hybrydyzacja a-DNA do tego fragmentu L-rRNA ochrania go przed specyficzną hydrolizą przez α -sarcynę. Powstający na rybosomie peptyd uniemożliwia wiązanie antysensowego oligomeru do domeny α -sarcyny. Można to tłumaczyć za pomocą hipotezy „tunelu peptydowego” (9), według której ulokowanie nowo syntetyzowanego białka wewnątrz rybosomalnego tunelu peptydowego stabilizuje

i ochrania zarówno domenę α -sarcyny jak też sam peptyd. Udział domeny α -sarcyny w biosyntezie białka nie budzi wątpliwości.

Inną możliwością badania regulacji biosyntezy białka na poziomie translacji w obrębie domeny α -sarcyny jest zastosowanie syntetycznego rybozemu skierowanego względem tego regionu rRNA. Trwałe uszkodzenie domeny przez rybozym mogłoby w innym aspekcie określić jej udział w biosyntezie białka i asocjacji podjednostek rybosomu. Jednakże takie podejście eksperymentalne wymaga występowania określonych struktur sekwencyjnych (np. GUC) i II-rzędowych, nie występujących w obrębie domeny, a warunkujących aktywność rybozemu.

2.2.2. Pętla „C” 5S rRNA

5S rRNA jest najmniejszym kwasem nukleinowym rybosomu. Wykazano, że rekonstruowana podjednostka 50S *E. coli* pozbawiona 5S rRNA ma znacznie obniżoną zdolność enzymatycznego wiązania aminoacylo-tRNA do miejsca A na rybosomie (10). Kompleks [5S rRNA*białko L5] jest miejscem wiązania do rybosomu faktora elongacyjnego eEF-2. W przeprowadzonych eksperymentach z wykorzystaniem techniki wiązania krzyżowego wskazano, że odległość pomiędzy faktorem eEF-2 i 5S rRNA w kompleksie [rybosom*eEF-2*GTP] wynosi 4Å (11). Zastosowanie syntetycznych sond oligonukleotydu kompleksarnych do różnych fragmentów 5S rRNA z zarodków pszenicy pozwoliło na analizę ich wpływu na wiązanie fenyloalanylo-tRNA do rybosomu i syntezę polifenyloalaniny. Wykazano wyraźne różnice w zdolności do hybrydyzacji poszczególnych sond oraz różny efekt inhibitorowy w procesie wiązania fenyloalanylo-tRNA i syntezy polifenyloalaniny. Spośród dziewięciu testowanych oligonukleotydów największy efekt inhibitorowy wykazywała sonda komplementarna do zachowawczej pętli „C” cząsteczki 5S rRNA (12). Rybosomy w czasie cyklu elongacyjnego „oscylują” pomiędzy dwoma stanami: post- i pretranslokacyjnym. Poziom hybrydyzacji sondy komplementarnej do pętli „C” 5S rRNA jest wyższy dla rybosomów w stanie pretranslokacyjnym. Pętla „C” 5S rRNA jest zaangażowana w katalizowaną przez eEF-2 hydrolizę GTP. Hybrydyzacja antysensowego oligonukleotydu do tego fragmentu cząsteczki 5S rRNA prowadzi do zmiany konformacyjnej rejonu wiązania faktora eEF-2 inhibując reakcje syntezy polipeptydu.

Badania modelowe tego typu mogą być rozszerzone na inne funkcjonalne centra aktywne rybosomu. Jednym z fragmentów L-rRNA posiadającym odcinki zachowawcze, które mogą stanowić cel dla a-DNA jest u Eukariota region pomiędzy 1838 a 1936 nukleotydami tego kwasu. Region ten wiąże się z białkami rybosomalnymi oznaczonymi P0, P1, P2 oraz białkiem L12. Zablockowanie tego regionu prowadzi do zahamowania rybosomalnej hydrolizy GTP, zależnej od przyłączenia drugiego faktora elongacyjnego eEF-2 (13). Inhibicja tego procesu uniemożliwia przeprowadzenie procesu translacji.

Centrum GTP-azowe zostało dokładnie zbadane w przypadku rybosomów 70S z *E. coli*. Wykazano, że oprócz rRNA w jego formowanie zaangażowane

są też białka: L11 oraz kompleks [L10(L7/L12)]. Wiąże ono też specyficznie antybiotyk tiostrepton (14). Na podstawie uzyskanych wyników eksperymentalnych wykazano wysoką konserwatywność fragmentów sekwencji L-rRNA oraz białek tworzących centrum GTP-azowe na rybosomie. Obecność zachowawczych sekwencji rRNA, jak też stabilność ewolucyjna białek tego centrum, dają możliwość zastosowania w inhibicji procesu hydrolizy GTP takich czynników jak antysensowe oligonukleotydy. Skierowanie przeciw centrum GTP-azy antysensowego oligonukleotydu może okazać się jednak utrudnione przez silne oddziaływanie rRNA z osłaniającymi je białkami.

3. Agrobiotechnologia

Zastosowanie strategii a-DNA w agrobiotechnologii w celu ulepszenia bądź otrzymywania nowych odmian roślin, jak się wydaje, jest obecnie realne. Rozwój biologii molekularnej i biotechnologii pozwala na stosowanie coraz efektywniejszych zabiegów w celu poprawy cech roślin poprzez transformację ich genomu. Można sądzić, że transformacja genem odpowiedzialnym za produkcję a-DNA będzie najlepszym sposobem na zastosowanie oligonukleotydów w regulacji biosyntezy białka w roślinach. Podstawowym problemem przy wprowadzaniu genu odpowiedzialnego za syntezę a-DNA do roślin jest konstrukcja wektora. Należy zwrócić uwagę, że gen taki powinien być zaopatrzony w sekwencje regulatorowe pozwalające na produkcję a-DNA przez całe życie rośliny, bądź tylko w okresie ekspresji określonego białka.

W naszej opinii jedną z zasadniczych trudności w transformacji roślin genami dla antysensowych oligonukleotydów jest umiejscowienie takiego genu w komórce. Obecność trzech genomów (cytoplazmatycznego, mitochondrialnego i plastydowego) stanowi utrudnienie przy pracach nad wbudowaniem i ekspresją genów a-DNA. Większość białek kodowanych na genomie plastydowym ulega ekspresji w cytoplazmie. Podobnie dzieje się w przypadku białek genów mitochondrialnych. Z drugiej strony tylko nieliczne białka genów cytoplazmatycznych ulegają ekspresji poza cytoplazmą. Należy zatem wybrać najkorzystniejszą strategię antysensową pozwalającą w najprostszy sposób transformować rośliny. Jeżeli, np. blokowany ma być gen cytoplazmatyczny ulegający ekspresji w organellach najlepszą strategią wydaje się tworzenie potrójnej helisy. Jeżeli natomiast a-DNA ma być skierowany przeciw genom organellowemu, ulegającym ekspresji w cytoplazmie korzystniejsza wydaje się strategia anty-mRNA.

Postęp jakiego dokonano w zakresie technik inżynierii genetycznej spowodował, że w skali laboratoryjnej, pozyskiwanie nowych transgenicznych roślin osiągnęło etap prawie rutynowy. Podstawowe cele tych prac można sformułować następująco:

1. Osiągnięcie ekspresji genów obcych dla danej rośliny, a w opinii badacza odpowiedzialnych za syntezę wartościowych komponentów (np. warunkujących odporność na insekty czy zasolenie gleby).

2. Stymulacja ekspresji własnych genów dla uzyskania zwiększonej biosyntezy określonych produktów (np. białek bogatych w grupy -SH).

3. Zahamowanie aktywności pewnych procesów (np. obniżenie syntezy enzymów trawiących pektyny).

Każdy z nich może przynieść istotne efekty ekonomiczne po wdrożeniu do produkcji rolnej.

3.1. Wykorzystanie strategii α -DNA u roślin

Już od ponad dziesięciu lat stosowana jest inżynieria genetyczna w odniesieniu do roślin, jednakże podstawowe sukcesy odnotowano w przypadku roślin dwuliściennych. Natomiast rośliny o podstawowym znaczeniu gospodarczym należą do roślin jednoliściennych, których inżynierowanie z zastosowaniem *Agrobacterium tumefaciens* okazało się praktycznie niemożliwe. Regeneracja roślin z transformowanych protoplastów, z wyjątkiem ryżu, przebiega nieefektywnie. Dla transformacji monokotyledonów rozważane są między innymi nowe geny reporterowe (ang. *reporter genes*), elementy promotory (ang. *promoter elements*) oraz zastosowanie czynników egzogennych, takich jak α -DNA, oddziałujących na ekspresję genów.

Wśród sukcesów osiągniętych w agrobiotechnologii, zrealizowanych przy zastosowaniu α -DNA, z pewnością należy wymienić pomidory *Flavr Savr* opracowane przez amerykańską firmę Calgene, a także prowadzone prace nad petunią. W przypadku pomidora *Flavr Savr* antysensowy oligomer jest komplementarny do genu kodującego enzym poligalaktourynazę, którego aktywność katalityczna polega na trawieniu pektyny odpowiedzialnej za twardość skórki pomidora. Zablockowanie aktywności tego genu powoduje zmniejszenie produkcji enzymu, a w konsekwencji istotne spowolnienie mięknięcia owocu, co przedłuża dojrzewanie, ułatwia transport i składowanie. Dojrzały pomidor pozostaje twardy o 7-10 dni dłużej w porównaniu z pomidorem nie transformowanym genem dla α -DNA. Na podstawie szacunkowych obliczeń ekonomistów amerykańskich oznacza to kilkanaście miliardów dolarów zysku rocznie na rynku Ameryki Północnej. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA - *Food and Drug Administration*) w sierpniu 1994 r. zezwoliła na komercyjną dystrybucję pomidorów *Flavr Savr* (17) mimo licznych oporów grup konsumenckich.

W przypadku petunii już pod koniec lat osiemdziesiątych (18) przeprowadzono spektakularny eksperyment, w którym zablockowano antysensowym oligomerem syntezę czerwonego barwnika, co umożliwiło otrzymanie transgenicznej rośliny o wyłącznie białych kwiatach. W 1993 r. pracując na tym samym materiale roślinnym, z zastosowaniem właśnie tego podejścia badawczego, opracowano metodę selektywnej supresji β -glukoronidazy w protoplastach z liści (19).

Bliska integracja Polski i krajowego rolnictwa z Unią Europejską stawia przed nami szczególne problemy wymagające rozwiązań. Należy sądzić, że

produkcja, np. żyta i ziemniaków w małych gospodarstwach rolnych ma niewielkie perspektywy ekonomiczne. Jednym z ewentualnych rozwiązań może być w perspektywie hodowla roślin niepopularnych w Europie Zachodniej, a tradycyjnie uprawianych w Polsce. Cechują się one specyficznymi właściwościami, np. biosyntezą drugorzędowych metabolitów o szczególnych wartościach dla medycyny i farmacji czy też specyficznych walorach odżywczych, względnie fitosanitarnych (np. wchłaniających metale ciężkie, np. ferrytyna wiążąca żelazo) i pionierskich — zdolnych do rekultywacji gleb zniszczonych przez przemysł. Jest to dla nas na pewno alternatywa, choć zapewne może wydawać się ona dyskusyjna. Podkreślić tu jednak należy, że te pożądane cechy roślin zazwyczaj wymagają specyficznego „wzmocnienia”, czyli potrzebne jest zwiększenie biosyntezy określonych produktów naturalnych, białek czy też drugorzędowych metabolitów. Jesteśmy przekonani, że efekty te są możliwe do osiągnięcia najszybciej i najtaniej za pomocą technik inżynierii genetycznej, a być może właśnie przy zastosowaniu strategii antysensowych oligonukleotydów.

Literatura

1. Dominski Z., Kole R., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8673 – 8677.
2. Kudla J., Igloi G.L., Metzclaff M., Hagemann R., Kössel H. (1992), *EMBO Journal* 11, 1099-1103.
3. Prüfer D., Tacke E., Schmitz J., Kull B., Kaufmann A., Rohde W., (1992), *EMBO Journal*, 11, 1111 – 1117.
4. Ecker D.J., Vickers T.A., Hanecak R., Driver V., Anderson K., (1993), *Nucl. Acids Res.*, 21, 1853-1856.
5. Bock L. C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E., Tool J.J., (1992), *Nature*, 355, 564 – 566.
6. Wool I., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, 9, 14 – 17.
7. Bohun E., Twardowski T., (1993), *Acta Biochimica Polonica*, 40, 12 – 16.
8. Bohun E., Twardowski T., (1994), *J. Plant. Physiol.*, 143, 659 – 666.
9. Yonath A., Wittmann H. G., (1989), *Trends Biochem. Sci.*, 14, 329 – 332.
10. Nomura Y., Erdmann V. A., (1970), *Nature*, 228, 744 – 748.
11. Nygard O., Nilsson L., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, 908, 46 – 53.
12. Shaikhin S., Sobkiewicz A., Barciszewski J., Twardowski T., (1994), *Acta Biochim. Polonic.*, 41, 58 – 62.
13. Uchiumi T., Kominami R., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 19179 – 19185.
14. Thompson J., Schmidt F., Cundliffe E., (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 7915 – 7917
15. El-Baradi T.A.L., de Regt V.C.H.F., Einerhand S.W.C., Teixido J., R.J. Planta, Ballesta J.P.G., Raue H.A., (1987), *J. Mol. Biol.*, 195, 909-917.
16. Musters W., Goncalves P.M., Boon K., Raue H.A., Heerikhuizen H.V., Planta R.J., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 1469 – 1473.
17. Fox J.L., (1994), *Biotechnology*, 12, 439.
18. von der Krol A.R., Mur L.A., de Lange P., Mol J.P., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 14, 457 – 466.
19. de Lange P., de Boer G.J., Mol J.N.M., Kooter J.M., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 23, 45 – 55.

**Antisense strategy in translational regulation of protein biosynthesis.
Perspectives in plant agrobiotechnology**

Summary

Model research with antisense strategy on plant system at translational level (26S rRNA and 5S rRNA) are presented. The perspective application of this technology for Polish agriculture is discussed.

Key words:

antisense oligonucleotides, protein biosynthesis, regulation, ribozymes, 5S rRNA, α -sarcin, translation.

Adres dla korespondencji:

Maciej Nawrot, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12,
61-704 Poznań.

Praca finansowana w ramach grantu UE: CIPA-CT93-0263/ERB 3510 PL 92 6901.