



Skarby z genetycznego śmietnika

W połowie 1994 r. znamy sekwencje nukleotydowe ok. 4000, spośród — jak się sądzi — 100 tysięcy, ludzkich genów.

Nawet te 100 tysięcy genów stanowi zaledwie 3% ludzkiego DNA. Niektórzy ośmielili się kiedyś nazwać niebagatelną resztę — genetycznym śmietnikiem. Trudno taki pogląd zaakceptować; jednak jeszcze trudniej przypisać konkretne funkcje 97% naszego genomu. Jak je wykryć i jak je poznać?

Trzeba utrwalić sposób patrzenia na chromosom nie jak na katalog pożytecznych informacji rozrzuconych w śmietniku, a jak na złożoną informacyjną strukturę przepelnioną wyszukаныmi systemami podtrzymującymi i kontrolującymi aktywność genów kodujących białka. Im prostszy organizm, tym procent genów kodujących — na tle pozostałych sekwencji DNA — jest wyższy. Bakterie mają ich ponad 90%, prosty jednokomórkowy organizm eukariotyczny, drożdże — jeszcze kilkadziesiąt procent. Niekodujące sekwencje genomowe bardziej niż odpadem — mogą być udanym tworem ewolucji.

Najłatwiej i najwcześniej odkryto regulacyjną rolę fragmentów DNA położonych „przed” i „za” genami. Niedawno okazało się, że można je znaleźć nawet w obszarach, których o regulacyjne funkcje nikt nie posądzał, a mianowicie w różnorodnych satelitarnych DNA.

DNA satelitarny spotykany jest w genomach wszystkich wyższych eukariotów, stanowi powtarzające się dziesiątki, setki i tysiące razy bloki od dwu do kilku(nastu) nukleotydów. W sierpniu 1993 r. Theodor Kroniris ze wsp. z Tufts University School of Medicine, Boston, opublikował wyniki badań wykazujące, że zmiany w satelitarnym DNA mogą odpowiadać za około 10% przypadków raków sutka, jelita grubego i pęcherza. Przypuszcza się, że za końcem onkogeny *Harvey ras* znajduje się satelitarny DNA wiążący specyficznie czynniki transkrypcji aktywujące ekspresję tego genu, którego nadrzędny udział w regulacji wzrostu komórek nie budzi wątpliwości.

Istotną rolę w życiu komórki odgrywają satelitarne DNA występujące w regionach centromerów i telomerów. Skutkiem usunięcia lub skrócenia sekwencji telomerowych chromosomu drożdży jest rozpad takiego chromosomu.

Najwięcej kontrowersji od czasu ich odkrycia budzi funkcjonalna rola, o ile taka istnieje, intronów. Jedna z ostatnich lansowanych hipotez zakłada, że introny stanowią dodatkowy system regulacji ekspresji genów, dostępny tylko eukariotom, ze względu na przestrzenne rozdzielanie transkrypcji od translacji w komórkach z jądrem. Jeżeli introny byłyby pasożytniczym śladem po świecie RNA, cząsteczkami, które zasiedliły komórki eukariotyczne, to tylko takie komórki mogły na nowych osiedleńcach skorzystać. W bakteriach uniemożliwiałyby syntezę białek, a w organizmach jądrowych (eukariotach) takich przeszkód nie stwarzałyby.

John Mattic z Uniwersytetu Queensland w Australii uważa, że istnieje (lub istniał) system regulacji aktywności genów polegający na oddziaływaniu RNA kodowanego przez introny z DNA lub RNA. Przykładem sugerującym taką regulację jest np. kodowany przez ludzki gen *XIST* RNA blokujący aktywność jednego z dwu chromosomów X samic ssaków. Gen regulujący rozwój nicienia *C. elegans*, *lin-4*, koduje mały RNA wiążący mRNA innego genu, *lin-14*, uniemożliwiając jego dalszą ekspresję. Najciekawszą cechą ostatniego układu jest fakt, że *lin-4* położony jest w intronie innego genu.

Na koniec, zaczynają się gromadzić informacje o funkcji odcinków DNA położonych w tych regionach 3' genu, które ulegają transkrypcji, ale nie translacji. To ten właśnie odcinek RNA *lin-14* jest blokowany przez RNA *lin-4*, w takim też rejonie leżą mutacje, znalezione przynajmniej w 10 różnych genach z bardzo różnych organizmów, decydujące o aktywności danego genu. Najbardziej słynna — to mutacja w genie kodującym kinazę miotoniny, a jej wynikiem jest choroba genetyczna, dystrofia miotoniczna.

Postępy technik analitycznych pozwalających na identyfikację natywnych, małych, cząsteczek RNA, występujących w komórkach w śladowych ilościach, obiecują wiele nowych, zaskakujących odkryć zjawisk przebiegających z udziałem tego typu cząsteczek.

M.F.

Opracowano na podstawie: "Science", (4 February 1994), 263, 608 – 610.

Nieznane możliwości antysensu

Doniesienia z ostatnich kilku lat o zastosowaniach antysensowych DNA (a-DNA) dotyczyły przede wszystkim specyficznego blokowania ekspresji genów. Hybrydyzacja a-DNA do mRNA powoduje zatrzymanie translacji na rybosomie, bądź też jest przyczyną degradacji matrycowego RNA przez obecną w komórce RNazę H. Utworzenie trypleksu a-DNA z podwójną helisą DNA hamuje transkrypcję — struktura trypleksu uniemożliwia sprawne działanie polimerazy II. Pod koniec 1993 r. pojawiło się doniesienie mówiące o wykorzystaniu a-DNA w celu przywrócenia funkcji uszkodzonego genu z zastosowaniem strategii antysensu. Wiadomo, że następujące mutacje pre-mRNA ludzkiej β -globiny są przyczyną β -talasemii: A \rightarrow G (pozycja 110 β^{110}) w obrębie pierwszego intronu oraz w obrębie drugiego: T \rightarrow G (pozycja 705, IVS2⁷⁰⁵) i C \rightarrow T (pozycja 654, IVS2⁶⁵⁴). Mutacje te powodują zaburzenie składania (*splicing*) pre-mRNA. Oligonukleotydy komplementarne do obszarów, w których występują zmutowane zasady bądź do miejsc pęknięć pre-mRNA powstałych na skutek mutacji przywracają w zadowalającym stopniu przebieg składania. Stosunek ilościowy prawidłowy mRNA

do nieprawidłowego mRNA wynosi 1:9 w mieszaninie zmutowanego pre-mRNA (β^{110}); natomiast w wyniku hybrydyzacji odpowiedniego oligonukleotydu następuje zmiana proporcji produktów do wartości 5:1 (przewaga właściwego produktu). Do badań używano 2'-O-metylowe pochodne oligodezoksynukleotydów odporne na nukleazy i tworzące stabilne hybrydy z mRNA. W kompleksach tych mRNA jest odporny na hydrolityczne działanie RNazy H. Gdyby podobne rezultaty udało się powtórzyć *in vivo* być może a-DNA znajdzie zastosowanie w walce z β -talasemią, a w przyszłości również w walce z innymi chorobami wynikłymi z błędnego składania pre-mRNA, np. fenyloketonurią.

Andrzej Sobkiewicz

Opracowano na podstawie: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993), 90, 8673 – 8677.

Antysens przeciw HIV

Strategia antysensu budzi wciąż żywe zainteresowanie badaczy pracujących nad znalezieniem skutecznego leku przeciw HIV. Antysensowy oligonukleotyd komplementarny do określonego fragmentu mRNA wirusa HIV obniża ekspresję informacji genetycznej zawartej w genomie wirusa. Strategia ta mimo wielu zalet posiada także i słabe strony. Nie rozwiązany jak dotąd w zadowalającym stopniu pozostaje między innymi problem stabilności oligonukleotydów w warunkach *in vivo*. Niemodyfikowane oligodezoksynukleotydy są stosunkowo szybko degradowane przez znajdujące się w komórkach nukleazy. Zwiększenie odporności osiąga się przez zastosowanie tiofosforowych pochodnych oligodezoksynukleotydów, w których atom tlenu znajdujący się przy fosforze jest wymieniany na siarkę. Badania kinetyczne wykazały, że pochodne tiofosforowe (podobnie jak niemodyfikowane oligonukleotydy) są degradowane głównie od końca 3'. Zwiększenie stabilności tych związków można zatem osiągnąć poprzez wbudowanie międzynukleotydowych połączeń odpornych na nukleazy w pobliżu końca 3'. Zwiększenie stabilności tych związków można zatem osiągnąć poprzez wbudowanie międzynukleotydowych połączeń odpornych na nukleazy w pobliżu końca 3'. W „Nucleic Acids Research” (kwiecień 1993) ukazała się praca, której autorzy Jin yan Tang, Jamal Tamsamani i Sudhir Agrawal, zaproponowali nowy sposób ochrony oligonukleotydów przed degradacją, a mianowicie poprzez zaangażowanie zasad z końca 3' oligodezoksynukleotydu w tworzenie dupleksu (parowanie zasad typu Watson-Crick) z pozostałą częścią oligonukleotydu. Związek ten określane terminem *self stabilized antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates* posiada zwiększoną odporność na nukleazy przy jednoczesnym zachowaniu zdolności do hybrydyzacji, porównywalnej z jej liniowym odpowiednikiem (tzn. oligonukleotydem krótszym, bez odcinków uwikłanych w tworzenie dupleksu, z fragmentem zdolnym do hybrydyzacji takiej samej długości). Wykorzystując tak zaprojektowany oligonukleotyd z sekwencją komplementarną do sekwencji gag mRNA wirusa HIV-1 inicjującej translację stwierdzono, że wykazuje on podobne właściwości terapeutyczne jak jego liniowy protoplasta posiadając jednocześnie zwiększoną stabilność *in vivo*. Dodatkową zaletą takich oligonukleotydów jest zwiększona specyficzność spowodowana faktem, że tylko krótki fragment takiego oligonukleotydu jest jednoniciowy.

Andrzej Sobkiewicz

Opracowano na podstawie: „Nucleic Acids Research”, (1993), 21, 11, 2729 – 2735.

Nowa metoda wprowadzania genów u roślin za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*

Spośród wielu metod wprowadzania DNA do komórek roślinnych, takich jak np. selektroporacja, mikroiniekcja, wstrzeliwanie, ultrasonikacja, na szczególną uwagę zasługują transformacje za pośrednictwem *Agrobacterium*. Istnieje wiele odmian tych metod. W 1993 r. Bechtold, Ellis i Pelletier donieśli, że za pośrednictwem *Agrobacterium* — stosując metodę infiltracji — udaje się stransformować dojrzałe okazy rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) (1). Infiltrację DNA do pęczniejących nasion wykorzystali już wcześniej Feldmann i Marks (2). Stosowali oni *Agrobacterium tumefaciens* z wektorem kointegracyjnym, niosącym oporność na kanamycynę, ale otrzymali niski procent transformantów. Bechtold i wsp. spróbowali inokulować trzylub czterotygodniowe okazy *Arabidopsis* dwóch ekotypów. W tym przypadku *A. tumefaciens* zawierał binarny wektor z genem *npt II* niosącym oporność na kanamycynę i genem *bar* — na herbicyd fosfotrycynę, oraz genem β -glukuronidazy (GUS) bez promotora. Rośliny inokulowane pod próżnią w pożywce Murashige i Skooga, zawierającej 6-benzyloaminopurynę i zagęszczoną zawiesinę *A. tumefaciens* były zdolne do dojrzewania w szklarni. Autorzy prowadzili hodowlę do drugiego pokolenia.

Analiza transformantów obejmowała badanie oporności na kanamycynę, oznaczenie aktywności β -glukuronidazy, oraz analizę DNA techniką *Southern blot* i hybrydyzacji. Wówczas gdy żywotne okazy roślin na początku okresu kwitnienia transformowano *Agrobacterium* przez 20 minut, to współczynnik transformacji (stosunek transformantów pierwszego pokolenia do liczby roślin infiltrowanych) wynosił 4 do 5. Jeśli użyto młodsze rośliny, zastąpiono pożywkę wodą albo zmniejszono stężenie bakterii — to wskaźnik ten gwałtownie się zmniejszył. Autorzy stwierdzili, że na wydajność transformacji mają wpływ również subtelne, fizjologiczne różnice pomiędzy inokulowanymi roślinami.

Stosując pewne konstrukty zawierające gen β -glukuronidazy ustalili, że nie wszystkie części roślin ulegają transformacji, np. korzenie i części liści. Autorzy podają także przypadki transformacji postinfiltracyjnej, np. w bliznach po odpadnięciu działek kielicha kwiatów. Na podstawie przedstawionych badań sądzą, że utrwalenie się zmian w pokoleniach jest wynikiem preferencyjnej transformacji kwiatów, które rozwinęły się wcześniej po infiltracji. Proces ten jest prawdopodobnie niezależny od przypadków transformacji wykrywanych przez test na GUS. Większość insercji autorzy przypisują pojedynczemu locus (63% transformantów) lub dwóm loci (21%), a w 16% pozostałych — ilość loci była trudna do określenia, co wymaga dokładniejszych analiz. Metoda zaprezentowana przez Bechtolda, Ellis i Pelletier jest metodą inwazyjną i pozwala na szybkie przetestowanie funkcjonalności różnego rodzaju konstruktyw i może mieć zastosowanie w badaniach ekspresji genów. Pozwoli ona w przyszłości — jak się wydaje — lepiej poznać genetykę oddziaływań układów bakteryjnych i roślinnych oraz wczesnych etapów rozwoju roślin wyższych.

Michał Rurek

Opracowano na podstawie:

1. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G., (1993), C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences, 316, 1194 – 1199.
2. Feldmann K. A., Marks M. D., (1987), Mol. Gen. Genet., 208, 1 – 9.