



Wraz z rozpoczęciem na przełomie minionej i obecnej dekady wielkiego programu zmapowania i określenia sekwencji genomu ludzkiego (1), przystąpiono do badań nad materiałem genetycznym szeregu organizmów modelowych. W styczniu 1989 r. do Programu Badań Wspólnoty Europejskiej BAP (*Biotechnology Action Programme*) włączono projekt zsekwencjonowania chromosomu III drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (2). Miała to być wstępna faza szerszych prac nad tym organizmem, którego wybór wynika z kilku przyczyn. Drożdże posiadają niewielki genom, na który składa się 16 chromosomów. Zawierają one łącznie około 14 milionów par zasad, zatem tylko czterokrotnie więcej niż chromosom bakterii *Escherichia coli*. Badania ułatwia niewielki w genomie *S. cerevisiae* udział intronów i sekwencji niekodujących. Poza tym, drożdże są organizmem, dla którego opracowano już wcześniej szczegółową mapę genetyczną.

Chromosom III, jeden z trzech najmniejszych chromosomów drożdży, oceniany był (metodą elektroforezy w pulsującym polu) na około 300 – 360 kb (3). Jego wyboru dokonano nie tylko z uwagi na niewielkie rozmiary, ale i na fakt, że istniały już dla niego biblioteki klonów, skonstruowane w USA przez M. Olsona i C. Newtona, a udostępnione przez nich dla omawianych badań.

Szesnastomiesięczne prace, prowadzone przez 35 europejskich laboratoriów uczestniczących w programie BAP przyniosły w efekcie pełną sekwencję chromosomu III, liczącego ostatecznie 315 357 par zasad (bez krótkiego regionu kilkuset pz na jednym z końców). Jest to, tym samym, nie tylko pierwsza w historii biologii molekularnej sekwencja całego chromosomu eukariotycznego, ale w ogóle najdłuższy odczytany, ciągły odcinek DNA.

Uzyskany wynik zawdzięczamy głównie tradycyjnym technikom sekwencjonowania, przede wszystkim zmodyfikowanej metodzie Sangera, wykorzystującej dideoksyprochodne nukleotydy. Jedynie ok. 25 kb odczytano za pomocą technik zautomatyzowanych.

W otrzymanej sekwencji chromosomu III znaleziono, na obu niciach, 10 genów dla tRNA oraz 182 otwarte ramki odczytu (ang. ORF, są to odcinki DNA potencjalnie kodujące polipeptydy, rozpoczynające się kodonem inicjacji translacji ATG, a zakończone jednym z kodonów terminacji w tej samej fazie odczytu (4). Uwzględniono te ORF, które mogą kodować białka o długości powyżej 100 aminokwasów. Jedynie 37 z nich odpowiadało znanym i zsekwencjonowanym wcześniej genom, zaś 29 kolejnych wykazywało znaczące podobieństwo do różnych sekwencji nukleotydydów zapisanych w bazach danych. Spośród pierwszej grupy genów, 34 zmapowano na chromosomie III metodami genetyki klasycznej, co oznacza, że metody te były w stanie dostarczyć informacji jedynie o około 20% kodowanych tam ORF. Niewątpliwie zatem, cały genom drożdżowy zawiera znacznie więcej genów niż przewidywano i to pomimo tak daleko posuniętych badań nad genetyką oraz fizjologią tego workowca.

Uzyskanie pełnej sekwencji chromosomu, na którym zmapowano wcześniej wspomniane 34 geny, pozwoliło też na porównanie otrzymanej w ten sposób mapy fizycznej z genetyczną, a zatem na analizę zależności częstości rekombinacji między odcinkami chromosomu od ich rzeczywistej odległości. Stwierdzono dziesięciokrotną różnicę między częstością rekombinacji w pewnych regionach w środku obu ramion (*hot spots*) a obszarami telomerów i centromerów (*cold spots*).

145 otwartych ramek odczytu, których nie udało się przypisać do żadnego znanego wcześniej genu, poddano natomiast badaniom wykorzystującym dwie metody: porównywanie z sekwencjami z baz danych oraz ukierunkowaną inaktywację genu (5). Stwierdzono, za pomocą pierwszej z nich, że z nowo odkrytych ORF tylko 29 wykazuje podobieństwo powyżej określonego poziomu istotności do różnych znanych wcześniej sekwencji pochodzących nie tylko z drożdży, ale i z organizmów tak ewolucyjnie odległych jak: *E. coli*, tytoń, *Arabidopsis thaliana*, mucha *Drosophila*, żaba *Xenopus*, szczur, czy wreszcie człowiek. Zidentyfikowano sekwencje homologiczne m.in. do genów kinaz białkowych, permeaz, białek G, kanałów jonowych oraz dehydrogenazy alkoholowej. Największym zaskoczeniem dla badaczy było znalezienie ramki odczytu o 44% homologii sekwencji z genem *nifS* z operonu nitrogenazy, występującego u wiążącej azot bakterii *Anabaena*. Mimo dużej odległości ewolucyjnej obu organizmów jak też faktu, że drożdże nie wiążą azotu z atmosfery, nowo odkryty gen jest im niezbędny do wzrostu. Przypuszczalnie jego produkt bierze udział w procesach obróbki (*processing*) tRNA jak też w metabolizmie mitochondriów.

Równoległe z przedstawionymi pracami w zakresie „biochemii komputerowej” podjęto badania nowo odkrytych ORF za pomocą metody ukierunkowanej inaktywacji genu poprzez homologiczną rekombinację chromosomu z plazmidem niosącym zmodyfikowany gen oraz cechę umożliwiającą selekcję zmienionego w ten sposób szczepu. Fenotypowy efekt takiej modyfikacji może sugerować funkcję białka kodowanego przez dany gen. Opisaną metodą przebadano 55 ORF, ale tylko w 27 przypadkach dostrzegalny był wpływ inaktywacji genu na fenotyp. Trzy z wprowadzonych zmian okazały się letalne, zaś pozostałe dawały takie efekty, jak: bezpłodność, defekty morfologiczne, chemiczną i termiczną nadwrażliwość jak też inne. Taki wynik eksperymentu jest zaskakujący: zablokowanie połowy z przetestowanych ORF, jak się wydaje, nie wpływa na czynności życiowe drożdży. Trudno przypuszczać, że połowa genów tego organizmu nie pełni żadnej istotnej funkcji. Mimo całej naszej dotychczasowej znajomości biologii drożdży, wiele zatem jeszcze zostało na tym polu do zbadania.

Określenie pełnej sekwencji tak niewielkiego fragmentu genomu (ok. 2%), jakim jest dla drożdży chromosom III, dostarczyło ogromnej ilości cennych dla biologii molekularnej danych, ale niewątpliwie powstało przy tej okazji więcej nowych pytań i problemów niż udało się rozwiązać. Prace nad sekwencjonowaniem kolejnych chromosomów drożdżowych trwają nadal, zarówno w laboratoriach europejskich, jak i w USA, Kanadzie oraz Japonii. W połowie 1992 r. oceniano, że wszystkie sekwencje z drożdży, zapisane w bankach danych obejmowały 27% całości ich informacji genetycznej (6). Utrzymanie tego tempa prac pozwoli na uzyskanie pierwszej pełnej sekwencji genomu organizmu eukariotycznego jeszcze w ciągu obecnej dekady. Jej szczegółowa analiza przyczyni się do zrozumienia molekularnych podstaw wspólnych dla wszystkich *Eukaryota* zjawisk genetycznych oraz fizjologicznych.

Łukasz Bielecki

Literatura

1. Maddox J., (1991), *Nature*, 352, 11 – 14.
2. Vassarotti A., Goffeau A., (1992), *TIBTECH*, 10, 15 – 18.
3. Oliver S. G., et al., (1992), *Nature*, 357, 38 – 46.
4. Robinson C., (1992), *TIBTECH*, 10, 1 – 5.
5. Winnacker E.-L., (1992), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31, 1578 – 1582.
6. Hodgson J., (1992), *Biotechnology*, 10, 760 – 761.

Ocena jakości patentów biofarmaceutycznych w USA

Według potocznej opinii wystarczy policzyć liczbę wydanych patentów, a uzyskać się pogląd o produktywności danej jednostki badawczo-rozwojowej. Formułując ocenę firm biofarmaceutycznych w porównaniu z głównymi, amerykańskimi koncernami farmaceutycznymi, prowadzącymi własne laboratoria badawcze sformułowano dodatkowe kryteria. Wśród firm najlepiej notowanych należą: Cetus, Genetech, Genetics Institute, Chiron, Genex. Firmy te porównano z najlepszymi koncernami, w konkretnej kategorii: Merck, Ciba Geigy, Eli Lilly, Upjohn, Warner Lambert, Bristol-Myers, Wellcome, Pfizer, Searle, Glaxo, Syntex.

W liczbie zgłoszonych patentów wśród firm przoduje Cetus (68), a średnia grupy wynosi 36. Koncerny górują zdecydowanie: pierwszy Merck (289), średnia grupy 120. Jednakże już w kategorii jakości sytuacja ulega odwróceniu. Za miarę jakości przyjęto liczbę cytowań patentów danej firmy w kolejnych patentach. Najlepsza firma biofarmaceutyczna to Cetus (patent średnio cytowany 2,89 razy), średnia grupy 1,92. Wśród koncernów przoduje Warner Lambert (1,76), a średnia grupy wynosi 1,06.

Firmy biofarmaceutyczne znacznie bardziej uzależniają swoje odkrycia od badań podstawowych, co mierzy się liczbą odnośników w tekście patentowym do piśmiennictwa naukowego. W firmie Genetech na jeden patent przypada średnio 21,60 odnośników, średnia grupy wynosi 15,60; w koncernach przoduje Eli Lilly (6,87 cytowań), średnia grupy 3,72.

Wreszcie dla lepszej oceny wypracowano kategorię współczesności klasyfikowaną przez „średni wiek” patentów cytowanych w patentach danej firmy. Wśród firm biofarmaceutycznych na pierwszym miejscu znajduje się Genetics Institute (4,1 lat), śred-

nia grupy 5,3, podczas gdy w koncernach pierwszy Glaxo ma wynik 6,4, a średnia wynosi 7,9.

Tak zatem koncerny patentują dużo więcej odkryć niż rozwojowe firmy biofarmaceutyczne, ale patenty tych ostatnich dotyczą nowocześniejszych odkryć.

M. F.

Opracowano na podstawie: „Bio/Technology”, (1992), 10, 1079.

Co nowego na wschód od Rzeczypospolitej

Rosyjska Fundacja Badań Podstawowych przyjęła do 15 marca 1993 r. zgłoszenia kilku tysięcy wniosków w konkursie na indywidualne dofinansowanie badań. Roczny budżet Fundacji wynosi 7,7 miliardów rubli, planuje się przyznanie dotacji w wysokości ok. 5 mln rubli pojedynczym badaczom lub małym zespołom. Z sumy tej 60% będzie mogło być wydane bezpośrednio na badania, 7,5% na międzynarodowe podróże i współpracę, 7,5% na koszty publikacji. Pozostałe 25% wchłonie administracja opiniująca danego badacza lub zespół.

Wydzielono sześć merytorycznych zakresów finansowania i powołano naukowe rady ekspertów. Statut Fundacji wzorowany jest na zasadach fundacji Sorosa, która w ubiegłym roku przyznała w krajach byłego Związku Radzieckiego 100 mln dolarów w formie indywidualnych dotacji.

W lutym br. wydano w Moskwie pierwszy numer miesięcznika przedrukującego najważniejsze artykuły z tygodnika „Nature”. W założeniu miał zacząć się ukazywać regularnie od kwietnia. Rosyjski wydawca sądzi, że jest to krok wstępny do publikowania w przyszłości pełnych, cotygodniowych przedruków. Wydawnictwa tego typu ukazują się w USA, w Japonii i w Chinach.

M. F.

Opracowano na podstawie: „Nature”, (11 February 1993), 361, 483, 485.

Tytułowe obietnice i nadzieje

W dziale „Nowości badawcze” tygodnika „Science” napisano, że pojawiła się nowa nadzieja dla chorych na chorobę Parkinsona. Znalaziono bowiem nowy czynnik wzrostu komórek nerwowych. Przyjrzyjmy się zatem właśnie na tym przykładzie, jaka droga dzieli nas od najbardziej obiecujących odkryć do medycznego ich zastosowania.

Do grupy kilku znanych białek o aktywności pobudzającej wzrost komórek nerwowych doszło ostatnio nowe nazwane *glial cell line-derived neurotrophic factor*, GDNF (biotechnologiczna firma „Synergen” z Colorado, USA, F. Collins i wsp.). Zaczęło się od obserwacji z 1992 r., że komórki głejowe szczura wydzielają jakąś substancję, która ułatwia przeżywalność neuronom wydzielającym dopaminę. W „Synergenie” uzyskano linię komórkową szczególnie obficie wydzielającą ten nowy czynnik, który po 6 miesiącach oczyszczono w ilości pozwalającej na analizę chemiczną. Jest to białko, na podstawie oznaczonej częściowo sekwencji aminokwasów syntetyzowano sondy molekularne, którymi wyszu-

kano w genomie ludzkim gen kodujący analogiczne białko. Gen ten sklonowano w bakteriach i uzyskano prawidłowo zwinięte, aktywne białko GDNF.

Białko to nie pobudza do podziałów komórkowych; stabilizuje hodowle *in vitro* neuronów, przyspiesza dojrzewanie neuronów embrionalnych i stymuluje powstawanie licznych odgałęzień neuronalnych. Wszystko to czyni w stężeniach pikomolarnych i, jak się wydaje, jest także wysoce specyficzne, nie działa na neurony uwalniające inne niż dopamina neurotransmitery (GABA, serotonina). Właśnie brak dopaminy, jak się uważa, leży u podstaw choroby Parkinsona i braku tego żadne leki nie są w stanie w sposób zadowalający uzupełnić.

Obecnie są jednak daleko zaawansowane badania laboratoryjne, ale nie kliniczne. Do rozwiązania najważniejszych pytań i problemów, pozostają m.in. jak działa nowo odkryty czynnik na inne komórki układu nerwowego? Jak działa na cały organizm (konieczne jest przeprowadzenie badań na zwierzętach, w tym na naczelnych), i co może się okazać najtrudniejsze — w jaki sposób potencjalnie będzie można wprowadzić terapeutyczne białko do mózgu, bowiem podobnie jak inne białka, nie może ono pokonać bariery krwi — mózgu. Podawanie domięscowe wiązałoby się z ryzykiem zakażeń. Rozważa się (choć daleko jest jeszcze do podjęcia jakichkolwiek prób) wprowadzenie GDNF z wektorem (pochodne wirusów opryszczki?) lub w postaci transplantów zrekombinowanych z genem GDNF komórek. Wreszcie przystąpiono do prób modelowania potencjalnego obszaru aktywnego białka, w celu przeprowadzenia ewentualnej syntezy chemicznej małej cząsteczki, przenikającej do mózgu (oligopeptydu), zachowującej żądaną aktywność biologiczną. Czy zatem tytuł informacji w „Science”: „Obiecujące białko dla chorych na chorobę Parkinsona” brzmi zbyt optymistycznie i czy na razie obiecuje im tylko nadzieję?

M. F.

Opracowano na podstawie: „Science”, (21 May 1993), 260, 1072 – 1073; 1130 – 1132.

Szybszy marsz wzdłuż genomu

Genetycy zgodni są w poglądzie, że dotrzymanie terminów w projekcie sekwencjonowania ludzkiego genomu (HGP, *Human Genome Project*) wymaga wymyślenia szybszych niż stosowane dotychczas procedury. Etapem, w którym właśnie zaproponowano korzystne modyfikacje jest dzielenie DNA na fragmenty, poddawane następnie sekwencjonowaniu.

Dotychczasowa technika przypadkowej fragmentacji (ang. *shot gun*), po której następuje sekwencjonowanie i składanie uzyskanych sekwencji w ciągi jest pracochłonna. Nowa technika polega na ulepszeniu podejścia tzw. *primer walking* („maszerujący starter”). Klonuje się długi fragment DNA i rozpoczyna sekwencjonowanie, używając syntetycznego startera (ok. 20 nukleotydów) i kontynuując jak daleko się da. Zgodnie z końcówką, poznaną sekwencją syntetyzuje się kolejny starter i sekwencjonowanie „maszeruje” dalej. Wadą tej techniki jest wysoki koszt starterów.

W 1990 r. Waclaw Szybalski z Uniwersytetu w Wisconsin zaproponował użycie jako starterów zestawów wcześniej syntetyzowanych sześcionukleotydowych oligonukleotydów (4096 możliwych kombinacji). Pomysł ten doświadczalnie wykorzystano w 1992 r. (W. Studier, „Science”, 11 Dec. 1992, p. 1787). Do DNA związanego z białkiem dodano trzy heksamery o sekwencji odpowiadającej 18 nukleotydowemu star-

terowi. Heksamery „odsunęły” białko w obszarze, do którego były komplementarne i spełniły oczekiwaną funkcję startera.

W bieżącym roku L. Ulanovsky z Instytutu Weizmanna w Izraelu powtórzył tę technikę, unikając białek wiążących DNA. W laboratorium Szybalskiego dokonano połączenia kowalencyjnego heksamerów po ich związaniu się z matrycą DNA. We wszystkich grupach dąży się do automatyzacji całego etapu. Gdyby się to udało, to zdaniem tego doświadczanego badacza, jakim jest prof. Szybalski uzyskanie pełnej sekwencji genomu *E. coli* zajęłoby 10 osobom parę tygodni!

M. F.

Opracowano na podstawie: „Science”, (21 May 1993), 260.

Kto lepszy: naukowcy z Zachodu, czy też ze Wschodu

Czasopismo „Nature” przeprowadziło badania składu osobowego 97 naukowych instytutów w byłym NRD. Po zamknięciu Akademii Nauk NRD w 1991 r. Rada Naukowa Niemiec zarekomendowała powołanie do instytutów naukowych — pozostałych po Akademii — naukowców z obu części Niemiec. Jednak ze względu na trudniejsze warunki życia i gorsze wyposażenie wschodniemieckich instytutów nie stanowią one wymarzonego miejsca pracy, szczególnie dla młodego środowiska naukowego. Oczywiście inaczej wygląda to w przypadku, gdy takiej ofercie przyjrzy się samodzielny pracownik naukowy, a jeszcze inaczej, gdy dotyczy to kogoś kto ma trudności z uzyskaniem kierowniczego stanowiska i to najchętniej na terenach zachodniemieckich.

TABELA

STAN ZATRUDNIENIA PRACOWNIKÓW NAUKOWYCH Z BYŁEGO NRD

Stanowisko	Liczba (%)
Narodowe Instytuty badań Podstawowych	
dyrektor instytutu	15
kierownik wydziału	50
kierownik grupy badawczej	25
Instytuty finansowane przez landy i rząd federalny	
dyrektor instytutu	30
kierownik wydziału	75
kierownik grupy badawczej	80
Instytuty Towarzystwa Maxa Plancka	
dyrektor instytutu	30
kierownik wydziału	30
kierownik grupy badawczej	95
Instytuty Badań Stosowanych (Towarzystwa Fraunhofer)	
dyrektor instytutu	75
kierownik wydziału	95

M. F.

Opracowano na podstawie: „Nature”, (22 April 1993), 362, 685.