

Magdalena Fikus

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Warszawa

Elektrotransformacja, elektrotransfekcja i elektrofuzja: nowe metody modyfikacji genetycznej mikroorganizmów i komórek eukariotycznych

Błona cytoplazmatyczna spełnia w życiu komórki dwie, pozornie przeciwstawne funkcje: stanowi barierę między komórką i środowiskiem zewnętrznym, zapewniając integralność komórki, jednocześnie jest przenośnikiem substancji i sygnałów metabolicznych między cytoplazmą i środowiskiem. Między tymi dwoma ośrodkami błona, a ściślej mówiąc zintegrowane z nią układy enzymatyczne, utrzymują różnicę potencjałów, rzędu 100 mV.

Właściwości elektryczne błony i cytoplazmy sprawiają, że błona zachowuje swoją integralność do pewnej wartości krytycznej potencjału membranowego, E_c , równej ok. 1 kV.

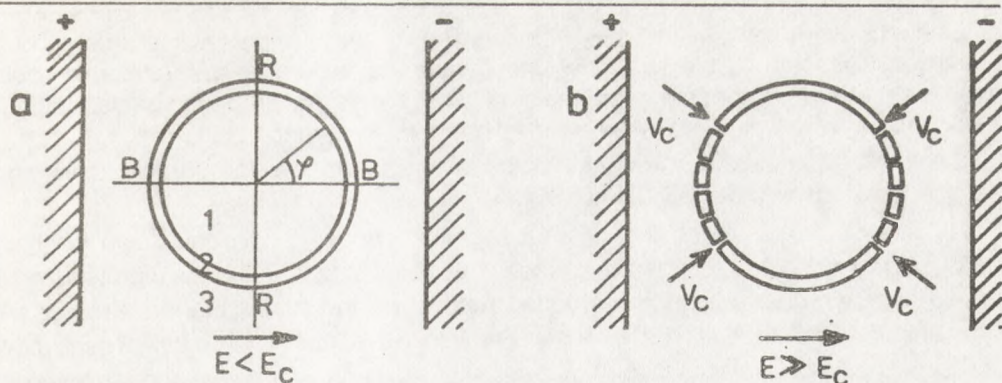
Błona komórkowa umieszczona w zewnętrznym polu elektrycznym może być traktowana, w przybliżeniu, jako ośrodek nieprzewodzący, oddzielający dwa przewodzące obszary: cytoplazmę i środowisko. Wszystkie trzy obszary wykazują również cechy dielektryków stratnych*. Zewnętrzne pole elektryczne powoduje dodatkowe gromadzenie się ładunków na zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni błony; potencjał membranowy wzrasta proporcjonalnie do natężenia zewnętrznego pola. Proces ten dla sferycznej komórki opisuje równanie:

$$V = 1,5 \cdot E \cdot a \cdot \cos \gamma$$

- gdzie: V – indukowany potencjał membranowy,
 a – promień komórki, kierunkiem pola elektrycznego,
 γ – kąt między danym punktem powierzchni komórki
 a kierunkiem pola elektrycznego
 E – natężenie zewnętrznego pola elektrycznego.

Zatem dodatkowy potencjał uzyskany po przyłożeniu pola elektrycznego jest największy na "biegunach" komórki ($\cos \gamma = 1$), stopniowo obniża się w miarę przesuwania ku "równikowi", na którym jest równy 0 ($\cos \gamma = 0$) (rys. 1 a). Przekroczenie potencjału krytycznego E_c , które nastąpi najwcześniej na biegunach, powoduje destabilizację błony i powstawanie stopniowo rozszerzających się otworów (por. rys. 1b).

* Dielektryk stratny to dielektryk, w którym pod wpływem pola elektrycznego następuje przepływ prądu przewodzenia i w związku z tym pole elektryczne oddaje część swojej energii w postaci tzw. ciepła Joula.



Rys.1. Schematyczna interpretacja zjawiska elektroporacji: 1) cytoplazma, 2) błona komórkowa, 3) środowisko zewnętrzne, B – bieguny komórki, R – punkty równikowe, \rightarrow kierunek pola elektrycznego, E – natężenie zewnętrznego pola elektrycznego, E_c – potencjał krytyczny, V_c – indukowany krytyczny potencjał membranowy, zależny od kąta γ .

Po wyłączeniu zewnętrznego pola błona cytoplazmatyczna ulega odwrotnemu uporządkowaniu i osiąga stan natywny. Proces elektroporacji jest w określonych warunkach odwracalny. Stopień odwracalności zależy od natężenia i czasu trwania zewnętrznego pola, odwracalnymi są impulsy elektryczne trwające od mikro- do milisekund o natężeniu rzędu 1–20 kV/cm. Powyżej tych wartości błona, a w następstwie komórka, ulegają nieodwracalnej destrukcji. Pory otwierają się w czasie kilku mikrosekund, szybkość zamykania zależy od temperatury i wynosi kilka sekund w 37°C i kilkanaście minut w 40°C.

Konsekwencje naruszenia ciągłości błony komórki poddanej impulsowi elektrycznemu są dwojakie:

1) elektroporacja: do komórki mogą przeniknąć substancje nie przechodzące przez błonę natywną,

2) elektrofuzja: jeżeli impuls stosowany jest w stosunku do komórek ustawionych wzdłuż linii pola i znajdujących się w bliskim kontakcie, może dojść do wymieszania się błon w regionie kontaktu, utworzenia mostka cytoplazmatycznego między różnymi komórkami i wspólnej błony otaczającej cytoplazmy uprzednio oddzielnych komórek, czyli do fuzji komórek (1).

Oba zjawiska mają charakter uniwersalny, co wynika z generalnie zbieżnego charakteru struktury wszystkich błon biologicznych.

Przygotowanie komórek niższych grzybów i roślin do elektrofuzji i elektrotransformacji wymaga enzymatycznego usunięcia ściany komórkowej w celu uzyskania protoplastów.

Procesy elektroporacji wykorzystano m.in. do wprowadzania kwasów nukleinowych do komórek mikroorganizmów (elektrotransformacja) (2,3,4) i komórek eukariotycznych (elektrotransfekcja) (5,6,7,8). Po empirycznej optymalizacji warunków elektroporacji (temperatura, pH, siła jonowa, osmolalność środowiska, parametry pola elektrycznego, obecność substancji takich jak ATP, sperminalna, jony Ca^{+2} , Mg^{+2}), uzyskuje się powtarzalne wyniki i wydajności wyższe niż osiągnięte uprzednio stosowanymi metodami.

Elektroporację można osiągnąć stosując dwa typy impulsów: prostokątne i zanikające eksponencjalnie; częściej stosowane są te ostatnie. Natężenie pola zmienia się wówczas zgodnie z równaniem $E_t = E_0 \cdot e^{-t/\tau}$, gdzie τ ma wymiar czasu, w którym natężenie spada do $1/e$ wysokości natężenia wstępnego, E_0 .

Optymalizując elektryczne i biologiczne parametry elektroporacji uzyskano wydajne transformacje bakterii, komórek zwierzęcych i roślinnych.

Metoda elektroporacji okazała się szczególnie użyteczna w odniesieniu do tych gatunków bakterii, dla których nie opracowano dotychczas systemu wprowadzania obcych genów lub istniejące są zawodne, mało wydajne i pracochłonne. Stosuje się ją z powodzeniem zarówno do Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych organizmów (9). Ze względu na małe wymiary komórek skuteczne są impulsy eksponencjalne w wysokim natężeniu lub wysokiej stałej czasowej. Tak np. porównywalną elektrotransformację *Escherichia coli* uzyskuje się po pojedynczym impulsie 3,75 kV/cm, $\tau=50$ msek lub 6,25 V/cm, $\tau=10$ msek.. Dobierając właściwe stężenie DNA i komórek uzyskano najwyższą ze znanych wydajność transformacji *E. coli* równą 10^{10} transformantów na $1\mu\text{g}$ DNA (3).

Do elektrotransfekcji komórek ssaków stosowano zarówno impulsy prostokątne jak i eksponencjalne od 0,5 do 8 kV/cm, o stałych czasowych rzędu mikro- i milisekund. Podobną wydajność transfekcji komórek chomika (CHO) uzyskano po impulsie 4 kV/cm, $\tau=0,5$ msek lub 0,875 kV/cm, $\tau=5$ msek. Wyższe wydajności transfekcji uzyskano dla komórek w stadium aktywnego wzrostu stosując do transformacji liniowy, a nie kolisty, DNA.

Protoplasty z różnych gatunków i odmian roślin, a nawet różnych tkanek tej samej rośliny różnią się wrażliwością na impulsy elektryczne. Udana elektroporacje i transfekcje odnotowano m.in. dla protoplastów tytoniu, soi, kukurydzy, marchwi, ryżu, pszenicy, owsa, stosując impulsy o podobnych parametrach jak przy transfekcji komórek zwierzęcych. Dla tych gatunków roślin, dla których opracowane są metody regeneracji roślin z pojedynczych protoplastów elektroporacja może być wykorzystana do konstrukcji, po transfekcji, roślin transgenicznych. Taki pełny cykl opisany został dla kukurydzy (10) i ryżu (11), dwóch bardzo ważnych gatunków roślin uprawnych.

Zastosowanie elektrofuzji przyniosło pierwsze skutki praktyczne przy konstrukcji nowych szczepów *Saccharomyces cerevisiae*. Pokazano, że można uzyskać diploidalne szczepy mieszańcowe po fuzji protoplastów haploidalnych o różnym i identycznym typie MAT (12), jak również nowe, poliploidalne szczepy, w tym również szczepy przemysłowe (13).

Opracowanie metod otrzymywania protoplastów komórek roślinnych umożliwiło uzyskanie nowych somatycznych komórek mieszańcowych powstających po fuzji protoplastów różnego pochodzenia. Produkty takich fuzji są użyteczne w genetycznych badaniach komórek somatycznych. Metoda fuzji, choć mniej precyzyjna niż metody przenoszenia pojedynczych genów, umożliwia jednak uzyskiwanie korzystnych kombinacji cech genetycznych nawet w sytuacji, gdy nieznanne jest w szczegółach genetyczne i molekularne podłoże takich cech. Komórki mieszańcowe mogą także służyć jako materiał wyjściowy do regeneracji do roślin transgenicznych.

Elektrofuzja jest metodą bardziej powtarzalną i wydajną niż metoda fuzji za pośrednictwem chemicznych lub biologicznych czynników fuzjogennych. Wiele protoplastów roślinnych wykazuje wysoką wrażliwość na toksyczne działanie najczęściej stosowanego czynnika fuzjogennego, glikolu polietylenowego (PEG), stąd zmienna i niska wydajność fuzji. Optymalne parametry elektryczne elektrofuzji mogą być ilościowo oznaczone i określone.

Bezpośredni kontakt między protoplastami przed fuzją uzyskuje się dzięki zastosowaniu pola elektrycznego wysokiej częstotliwości ($f \sim$ MHz), które porządkuje komórki w łańcuszki, wzdłuż linii pola, przy elektrodach lub w przestrzeni międzyelektrodowej. Zjawisko to, związane z polaryzacją dielektryków w zmiennym polu elektrycznym, nosi nazwę dielektroforezy. Używane powszechnie do elektrofuzji komory doświadczalne są tak skonstruowane, że możliwa jest bezpośrednia obserwacja dielektroforezy i elektrofuzji pod mikroskopem. Możliwe jest również prowadzenie doświadczeń w połączeniu z mikromanipulacją i izolowaniem wybranych produktów fuzji do dalszych badań (14). Na uporządkowane dielektroforetycznie komórki działa się pojedynczymi lub kilkoma w serii impulsami elektrycznymi, prostokątnymi lub eksponencjalnymi. Wybór właściwych parametrów dielektroforezy pozwala na uzyskanie 50-60% produktów fuzji pochodzących z układów dwukomórkowych; wybór właściwych parametrów fuzji - 60-70% fuzji w stosunku do liczby uporządkowanych dielektroforetycznie protoplastów. Na wydajność elektrofuzji wpływają: sposób przygotowania protoplastów, typ, wielkość i metaboliczna aktywność protoplastów, długość i natężenie impulsów, skład środowiska zewnętrznego, ciśnienie osmotyczne.

Metodą elektrofuzji uzyskano serie mieszańcowych roślin tytoniu (15,16), a także nowe odmiany roślin o znaczeniu gospodarczym. W testach polowych badane są odmiany ziemniaka powstałe po fuzji protoplastów pochodzących z dzikich gatunków *Solanum brevidans*, opornych na wirus liściozwoju i wirus Y, z protoplastami handlowej odmiany *S. tuberosum* (17).

Praktyczne perspektywy stwarza również metoda elektrofuzji zastosowana do wytworzenia hybrydom i przeciwciał monoklonalnych (18).

Aparatura umożliwiająca elektroporację i elektrofuzję znajduje się w Polsce w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (Warszawa), w Instytucie Elektrotechniki (Warszawa) oraz w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego (Warszawa). Stosowana była z powodzeniem do fuzji protoplastów drożdżowych (IBB i IBPR-S) i protoplastów roślinnych (IE1) (19).

Literatura

1. Zimmermann U., Vienken J., Halfmann H. J., Emeis C. C., (1985), *Advances in Biotechnological Processes*, 4, 79-150, Alan R. Liss. Inc.
2. Calvin N. M., Hanawalt P. C., (1988), *J. Bacteriol.*, 170, 2796-2801.
3. Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W., (1988), *Nucl. Acids Res.*, 16, 6127-6146.
4. Halfmann H. J., Röcken W., Emeis C. C., Zimmermann U., (1982), *Current Genetics*, 6, 25-28.

5. Chu G., Hayakawa H., Berg P., (1987), *Nucl. Acids Res.*, 15, 1311-1326.
6. Fountain J. W., Lockwood W. K., Collins F. S., (1988), *Gene*, 68, 167-172.
7. Miller J. F., Dower W. J., Tompkins L. S., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85, 856-860.
8. Tatsuka M., Oritu S., Yagi T., Kakunaga T., (1988), *Exp. Cell Res.*, 178, 154-162.
9. Luchansky J. B., Muriana P. M., Klaenhammer T. R., (1988), *Molecular Microbiology*, 2, 637-646.
10. Rhodes C. A., Pierce D. A., Mettler I. J., Mascarenhas D., Detmer J. J., (1988), *Science*, 240, 204.
11. Halfmann H. J., Emeis C., Zimmermann U., (1983), *Arch. Microbiol.*, 134, 1-4.
12. Halfmann H. J., Emeis C., Zimmermann U., (1983), *FEMS Microbiol. Lett.*, 20, 13-16.
13. Toriyama K., Arimoto Y., Uchimija H., Hinata K., (1988), *Bio/Technology*, 6, 1072-1074.
14. Schweiger H-G., Dirk J., Koop H. U., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 73, 769-789.
15. DeVries S. E., Jacobsen E., Jones M. G. K., Loonen A. E. H. M., Tempelaar M. J., Wijbrandi J., Feenstra W. J., (1987), *Plant Science*, 51, 105-112.
16. Morikawa H., Kumashiro T., Kusakari K., Iida A., Hirai A., Yamada Y., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 75, 1-4.
17. Fish N., Karp A., Jones M. G. K., (1987), *In Vitro*, 23, 575-580.
18. Lo M. S., Tsong T. Y., Conrad M. K., Strittmater S. M., Hester L. D., Snyder S. H., (1984), *Nature*, 310, 792-797.
19. Różycki S., Wojda U., Fikus M., (1987), *Materiały V Ogólnopolskiej Konferencji Kultur Tkankowych Roślin (1987) Skierniewice.*

Summary

Electrotransformation, electrotransfection and electrofusion: new methods for genetic modifications of microorganisms and eukaryotic cells

A short description of the effects of pulse and alternating electric fields on cells and cellular membranes is presented. Practical implications of these are outlined and the results pertinent for biotechnological applications are summarized.

**Magdalena Fikus, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.**