



Polskie

Towarzystwo

Przyrodników

im. KOPERNIKA

KOSMOS

Wybrane zagadnienia współczesnej
biotechnologii i biotechniki



Tom 36

WARSZAWA 1987

Numer 2

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

K O S M O S

Rok założenia 1876



Warszawa 1987

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

RADA REDAKCYJNA

Leszek Kuźnicki (wiceprzewodniczący), *Włodzimierz Michajłow*, *Włodzimierz Ostrowski*,
Henryk Szarski, *Przemysław Trojan*, *Adam Urbanek* (przewodniczący), *Kazimierz Zieliński*
sekretarz: *Jadwiga Kobuszewska*

KOMITET REDAKCYJNY

Władysław Goliński, *Krystyna Kisielewska*, *Adam Łomnicki*, *Włodzimierz Michajłow* (redaktor
naczelny), *Halszka Osmólska*, *Aleksandra Przełęcka*, *Andrzej Wierciński*, *Kazimierz Lech*
Wierzchowski (zastępca redaktora naczelnego), *Jerzy Żuk*
sekretarz: *Jadwiga Kobuszewska*

Redaktor tomu: *Kazimierz Lech Wierzchowski*

Adres redakcji: 00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, XIX p.,
Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
(tel. 20-02-11, wewn. 25-44)

Wydano z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA MIODOWA 10

Nakład 1135+115. Ark. wyd. 9.25. Ark. druk. 7.75. Papier druk.
mat. III 71 g. B-1

Oddano do składania 16.I.1987 r. Podpisano do druku 3.VII.1987 r.
Druk ukończono w lipcu 1987 r.

Zam. 64/87

K-32

Cena zł. 170,—

WARSZAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA, WARSZAWA ul. ŚNIADECKICH 8

SŁOWO WSTĘPNE

Dzięki doniosłym — poznawczym i metodycznym — osiągnięciom biologii molekularnej w ostatnim ćwierćwieczu, biologia znajduje się dzisiaj w centrum uwagi świata. Z praktycznym wykorzystaniem niezwykle szybko poszerzającej się wiedzy o mechanizmach funkcjonowania komórek i organizmów wiąże się ogromne i niepełne nadzieje na skuteczne rozwiązywanie problemów wyżywienia, problemów surowcowych i energetycznych barier wzrostu gospodarczego, a także ochrony zdrowia i przyrodniczego środowiska człowieka. Powstają narodowe i międzynarodowe programy badań w różnych dziedzinach biologii, pośrednio lub bezpośrednio służące rozwojowi biotechnologii w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i chemicznym oraz biotechniki w medycynie, hodowli roślin i zwierząt, a także w ochronie środowiska. W krajach rozwiniętych gospodarko przeznaczają się na te programy ogromne środki finansowe. Powstają tam liczne inowacyjne firmy, zatrudniające badaczy o najwyższych kwalifikacjach, zajmujące się projektowaniem nowych biotechnologii i biologicznych technik a następnie ich transferem do różnych dziedzin gospodarki. Pierwsze produkty biotechnologiczne, powstałe w wyniku zastosowania metod inżynierii genetycznej do konstrukcji wytwarzających je komórek drobnoustrojów, pojawiły się już na rynku. Upowszechnia się stosowanie metod diagnostycznych i analitycznych opartych na technikach badawczych biologii molekularnej w medycynie, weterynarii i ochronie roślin. Towarzyszy temu zrozumiałe, rosnące zainteresowanie społeczne. O biotechnologii wiele mówi się dziś w prasie, radio i telewizji. Powstaje więc potrzeba rzetelnej, dostosowanej do poziomu wykształcenia odbiorców, informacji o tych osiągnięciach nauki i techniki, na których oparte są prognozy przewidujące, że XXI wiek będzie wiekiem biologii. Mając na uwadze tę potrzebę, Kosmos na swoich łamach poświęca coraz więcej miejsca osiągnięciom współczesnej biologii. Wyrazem tego jest m.in. wydanie w 1985 roku numeru pt. „Geny i genomy — struktura i funkcja” (Kosmos t. 34, nr 1), prezentującego podstawowe zagadnienia biologii molekularnej genów. Wśród zamieszczonych w nim artykułów, dwa informowały również o praktycznym zastosowaniu metod rekombinacji DNA *in vitro* (inżynierii genetycznej) w medycynie i hodowli roślin. Obecnie oddajemy do rąk Czytelników numer poświęcony wybranym problemom stosowanej biologii molekularnej i biotechnologii. Przy wyborze tematyki kierowaliśmy się chęcią przedstawienia przede wszystkim tych dziedzin, w których również w Polsce są prowadzone, lub przynajmniej podejmowane, prace badawcze. Na początek zaprosiliśmy do współpracy, jako autorów, uczestników utworzonego niedawno Centralnego Programu Badawczo-Rozwojowego: „Molekularne podstawy biotechnologii”, koordynowanego przez Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Zastosowanie metod inżynierii genetycznej do konstrukcji komórek drobnoustrojów, zdolnych do wytwarzania pożądaných produktów w ilościach umożliwiających wykorzystanie ich jako produktów na skalę przemysłową, przyniosło dotychczas największe sukcesy w przypadku czynnych fizjologicznie związków białkowych dla medycyny i weterynarii. Na tym zagadnieniu skupiony jest obecnie największy wysiłek badawczy a na projekty inowacyjne, dotyczące opracowania metod i technologii wytwarzania określonych białek o działaniu leczniczym lub ochronnym, przeznaczają się największe środki. Dotyczy to przede wszystkim hormonów, różnego rodzaju cytokin, antygenów, czynników krzepnięcia krwi i inhibitorów enzymów, których otrzymywanie z tkanek ludzkich lub zwierzęcych jest na ogół możliwe na niewspółmiernie małą skalę w stosunku do potrzeb lub których preparaty pochodzenia naturalnego mogą zawierać trudne do wykrycia czynniki patogene, takie jak np. powolne wirusy, wirusy żółtaczki zakaźnej B lub wirusy wywołujące zespół nabytego braku odporności immunologicznej (AIDS). Pierwszymi, dopuszczonymi na rynek produktami technologii rekombinacyjnych były właśnie leki białkowe: ludzka insulina i hormon wzrostu oraz interferon alfa. Szczególnie duże nadzieje wiąże się z otrzymywaniem metodami biotechnologicznymi różnych antygenów jako składników szczepionek przeciwko drobnoustrojom chorobotwórczym i pasożytom, przeciwko którym, z różnych zasadniczych przyczyn, nie udało się dotychczas opracować konwencjonalnych, skutecznych i tanich szczepionek. W grupie tej znajdują się m.in. szczepionki przeciwko wirusowi żółtaczki zakaźnej typu B oraz przeciwko malarii. Potencjalnym, obecnym możliwościami wykorzystania inżynierii genetycznej do otrzymywania leków białkowych i szczepionek poświęcony jest artykuł Andrzeja Płucienniczaka, który doświadczenie w tej dziedzinie zdobywał m.in. w Instytucie Pasteura w Paryżu. Na przykładzie wyników dotychczasowych badań nad opracowaniem szczepionki przeciwko wirusowi HBV wywołującemu żółtaczkę, pokazuje stosowane podejścia badawcze oraz ujawnia trudności wymagające jeszcze pokonania, zanim skuteczna szczepionka rekombinacyjna będzie mogła wejść do powszechnego użycia. Natomiast o perspektywach utrzymania rekombinacyjnej szczepionki przeciwko malarii pisze Przemysław Szafrński, II. Zajmował się on klonowaniem wybranych genów antygenów powierzchniowych różnych stadiów rozwojowych zarodźca wywołującego malarię, w czasie stażu w laboratorium prof. N. Godsona w Szkole Medycyny Nowojorskiego Uniwersytetu Stanowego. W Polsce, ze zrozumiałych względów, nie prowadzi się badań w tej dziedzinie. Uznaliśmy jednak za celowe przedstawienie wyników dotychczasowych badań nad szczepionką przeciwko malarii zarówno ze względu na ponowne zagrożenie tą chorobą dużych populacji ludzkich, jak i w celu pokazania problemów, jakie związane są z opracowaniem szczepionek przeciwko pasożytom o złożonych cyklach rozwojowych.

Istotny problem stanowią dzisiaj choroby genetycznie uwarunkowane. Rozpoznano już ponad 3000 jednostek chorobowych związanych z mutacją jednego lub kilku genów. Wśród tych ostatnich znajdują się najprawdopodobniej cukrzyca i choroby krążenia. Każdego roku przychodzi na świat

ok. pół miliona dzieci z wadami genetycznymi. Jednak tylko nieliczne, genetycznie uwarunkowane wady metaboliczne mogą być leczone zachowawczo. Zastosowanie metod somatycznej genetyki, w połączeniu z metodami rekombinacji DNA *in vitro*, doprowadziło do szybkiego postępu w diagnostyce chorób dziedzicznych, w tym również diagnostyce prenatalnej. Pisała o tym w Kosmosie przed dwoma laty Magdalena Fikus (t. 34, nr 1). Od tego czasu nastąpił dalszy postęp. W ponad 500 przypadkach chorób, spowodowanych recesywną mutacją w jednym genie, udało się zidentyfikować odpowiedzialne za nie uszkodzone geny i ich produkty a w wielu przypadkach również zlokalizować położenie tych genów na określonych chromosomach. Metody diagnostyczne oparte na analizie fragmentów restrykcyjnych DNA oraz genowe i oligodezoksorybonukleotydowe sondy molekularne wchodzić do praktyki lekarskiej w wielu krajach. Również w Polsce, w ramach wspomnianego programu „Molekularne podstawy biotechnologii”, podjęte zostały prace w Zakładzie Genetyki Człowieka w Poznaniu i w kilku współpracujących z nim placówkach medycznych. Prace te mają na celu opanowanie metod i ich upowszechnienie w odniesieniu do wybranych jednostek chorobowych dla celów rodzinnego poradnictwa genetycznego i prewencji. Piszą o tym Małgorzata Jungerman i Ryszard Słomski, pod którego opieką realizowany jest krajowy program prac w zakresie diagnostyki molekularnej chorób dziedzicznie uwarunkowanych.

Jednym z głównych produktów przemysłu biotechnologicznego są antybiotyki. Wartość rynkowa światowej produkcji wynosi rocznie ponad 10 miliardów dolarów. Stanowi to ok. 75% wartości całej produkcji przemysłu farmaceutycznego stosującego procesy biotechnologiczne. Spośród ponad 6000 poznanych dotychczas związków o działaniu antybiotycznym, produkuje się obecnie tylko ok. 100. Jednakże profil produkcji stale się zmienia wobec konieczności wprowadzania do użytku nowych antybiotyków, spowodowanej uodpornianiem się drobnoustrojów na dotychczas stosowane antybiotyki oraz poszukiwaniem związków o większej specyficzności i mniejszej toksyczności. Osiąga się to na drodze chemicznej modyfikacji znanych antybiotyków (antybiotyki półsyntetyczne), poszukiwania nowych antybiotyków naturalnego pochodzenia oraz różnego rodzaju genetycznych manipulacji na komórkach producentów, głównie mutacji i selekcji. W tych poszukiwaniach i konstrukcji szczepów wydajnych producentów, metody rekombinacji genetycznej *in vitro* znajdują stopniowo coraz szersze zastosowanie. Warunkiem ograniczającym pełne wykorzystanie potencjału tych metod jest nieznanosć szlaków metabolicznych u producentów oraz mechanizmów ich genetycznej regulacji. Nowym kierunkom w biotechnologii otrzymywania antybiotyków poświęcony jest artykuł Marleny Lewandowskiej. Autorka, niedawna doktorantka Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, współpracowniczka Ośrodka Badawczo-Rozwojowego Biotechnologii w Warszawie stanowiącego zaplecze badawcze przemysłu antybiotyków w Polsce, specjalizuje się w poznawaniu dróg regulacji biosyntezy antybiotyków z grupy cefalosporyn.

Z właściwym, efektywnym i tanim technologicznie wykorzystaniem odnawialnych surowców roślinnych, powstających w procesie fotosyntezy, wiąże się nadzieje na rozwiązanie problemów żywienia a częściowo

również problemów energetycznych świata. Przetwarzanie roślinnych substancji zapasowych, takich jak cukier i skrobia na drodze fermentacji alkoholowej i innych procesów fermentacyjnych w różnego rodzaju produkty spożywcze i surowce dla przemysłu chemicznego, było przedmiotem zainteresowania biotechnologów od momentu powstania przemysłu fermentacyjnego w XIX wieku. Rozwój biotechnologii stwarza obecnie przesłanki doskonalenia klasycznych procesów i projektowania nowych technologii, opartych na wykorzystaniu innych niż dotychczas producentów do wytwarzania tradycyjnych produktów lub nowych produktów z tych samych substancji wyjściowych. Jako przykład może służyć opracowana niedawno w RFN technologia wytwarzania etanolu z odpadków skrobi przez bakterie *Zymomonas mobilis*, czy też wprowadzenie na dużą skalę w USA technologii enzymatycznego przetwarzania skrobi kukurydzianej na syrop fruktozowo-glukozowy. Nie rozwiązany pozostaje jednak nadal problem biotechnologicznego wykorzystania surowców bogatych w celulozę zbudowaną z jednostek glukozy stanowiącej uniwersalne źródło energii dla wszystkich organizmów. Ponad połowa węgla znajdującego się na Ziemi w formie związanej zawarta jest w tych surowcach. Problemem tym zajmuje się Stanisław Cebat, trafnie podkreślając, że trudności związane z użyciem celulozy na drodze biologicznej spowodowane zostały przez procesy ewolucyjne, które przez miliardy lat „pracowały” nad tym, aby celuloza nie tylko nie była materiałem zapasowym dla samego jej producenta, ale również aby inne organizmy miały trudności z jej wykorzystaniem. Nic więc dziwnego, że tym problemem — trudnym, ale jednocześnie stawiającym wyzwanie nauce — zajmuje się wielu badaczy i wiele ośrodków na całym świecie. Również i w Polsce szereg zespołów, w tym również laboratorium autora tego artykułu, zajmuje się różnymi aspektami tej problematyki w kilku centralnych programach badawczych.

Choroby roślin uprawnych, wywoływane przez wirusy i wiroidy, powodują duże straty plonów i uniemożliwiają eksport produktów z zakażonych plantacji. Selekcja roślin odpornych na te patogeny jest więc zabiegiem powszechnie stosowanym przez hodowców. Prace selekcyjne wymagają jednak stosowania szybkich i czułych metod wykrywania patogenów w tkance roślinnej. Również i w tej dziedzinie metody inżynierii genetycznej znajdują ostatnio zastosowanie w diagnostyce i ilościowym oznaczaniu wirusów i wiroidów. Te ostatnie są nową klasą stosunkowo niedawno odkrytych patogenów, zbudowanych wyłącznie z kołowych cząsteczek RNA, w których nie jest zakodowana informacja o syntezie białek. Atakują one ziemniaki, również w Polsce. O ich naturalnej historii, ustaleniu budowy metodami biologii molekularnej i opracowywanej własnej metodzie wykrywania wiroida PSTV, wywołującego chorobę wrzecionowatości bulw ziemniaka, piszą w swoim artykule Włodzimierz Zagórski, Marek Welnicki i Jacek Skrzeczkowski. Opracowywana przez nich metoda, oparta na technice inżynierii genetycznej, jest już stosowana w pracach selekcyjnych prowadzonych w Instytucie Ziemniaka.

Katalizowane enzymatycznie, biochemiczne procesy syntezy lub przekształcania określonych związków chemicznych są realizowane w przemyśle bio-

technologicznym przez komórki drobnoustrojów. W zasadzie mogłyby być również realizowane pozakomórkowo, z udziałem wyodrębnionych enzymów jako przemysłowych katalizatorów. Jednak, mimo wieloletnich badań nad tym zagadnieniem, sięgających przełomu lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych, dotychczasowe sukcesy w tej dziedzinie są nadal skromne. Spośród kilku tysięcy scharakteryzowanych biochemicznie enzymów, zaledwie kilkanaście wykorzystuje się obecnie w przemyśle. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy jest chemiczna nietrwałość białek enzymatycznych w warunkach odbiegających od fizjologicznych. Niejednokrotnie zwiększenie trwałości enzymu można osiągnąć przez jego unieruchomienie na stałym podłożu metodami adsorpcji, okluzji lub chemicznego związania z powierzchnią podłoża. Unieruchomione enzymy mogą być wielokrotnie wykorzystywane, co, poważnie obniża koszty procesu technologicznego czyniąc go czasem konkurencyjnym z ekonomicznego i technicznego punktu widzenia w stosunku do odpowiedniego procesu biotechnologicznego. W ostatnich latach podejmowane są próby pełniejszego zbadania związku między budową molekularną a chemicznymi i katalitycznymi własnościami białek enzymatycznych i na tej podstawie wprowadzania modyfikacji budowy w celu podniesienia chemicznej trwałości, specyficzności katalitycznej lub jej zmiany w pożądanym kierunku. Badania te prowadzone są na podstawie ustalonej krystalograficznie struktury przestrzennej białek oraz metody semisyntezy chemicznej i ukierunkowanej mutagenety, w której wykorzystywane są techniki rekombinacji DNA *in vitro*. Inne jeszcze podejście w poszukiwaniu większej trwałości enzymów polega na stosowaniu organicznych rozpuszczalników jako środowiska reakcji. Problematykę tę, nazywaną coraz częściej inżynierią enzymatyczną, przedstawia w swoim artykule Andrzej Okruszek. W Polsce prace z tego zakresu ograniczały się dotychczas do immobilizacji enzymów. W programie „Molekularne podstawy biotechnologii”, koordynowanym przez Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, przewidywane jest ich stopniowe rozszerzenie również na inne dziedziny.

Opracowanie chemicznych metod syntezy oligonukleotydowych fragmentów DNA o zaprogramowanej sekwencji zasad przyczyniło się w istotny sposób do rozwoju technik rekombinacji DNA *in vitro*. Chemiczna synteza fragmentów genów, elementów regulujących ich funkcje oraz linkerów zawierających miejsca rozpoznawane przez określone enzymy większej liczby analitycznych i diagnostycznych metod, w których stosowane są oligonukleotydowe sondy molekularne. Dzięki postępom chemii kwasów nukleinowych i wprowadzeniu metod ich syntezy na stałym podłożu, znalazły się w użyciu automatyczne, programowane syntetyzery fragmentów DNA. Znacznie poszerzyło to dostępność tych fragmentów do badań w biotechnologii. O osiągnięciach chemii w tej dziedzinie i nierozwiązanych jeszcze problemach syntezy pisze Wojciech Markiewicz. Jest on współpracownikiem Zakładu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, w którym od wielu lat prowadzone są badania w tej dziedzinie i zsyntetyzowano już wiele fragmentów genów i całych genów, w tym również gen ludzkiej insuliny. Innym znanym ośrodkiem badań chemii kwasów nukleinowych w Polsce, w którym również

syntetyzowane są fragmenty genów i całe geny różnych białek jest Zakład Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi.

Przedstawione w tym numerze zagadnienia badawcze stosowanej biologii molekularnej i biotechnologii nie wyczerpują jednak problematyki obu dziedzin. Redakcja Kosmosu zaprosi w najbliższym czasie innych specjalistów z tej dziedziny do podobnej prezentacji bliskich im zagadnień. Mamy nadzieję, że ułatwimy w ten sposób naszym Czytelnikom pełniejsze poznanie tych istotnych dla losów ludzkiej społeczności osiągnięć i kierunków rozwoju stosowanych nauk biologicznych.

Kazimierz L. Wierzchowski

ANDRZEJ PLUCIENNICKI

Instytut Fizjologii i Biochemii
Akademia Medyczna w Łodzi

MOŻLIWOŚCI INŻYNIERII GENETYCZNEJ W DZIEDZINIE OTRZYMYWANIA LEKÓW I SZCZEPIONEK

WSTĘP

W latach siedemdziesiątych osiągnięcia genetyki mikroorganizmów, biologii molekularnej, enzymologii, chemii biopolimerów i postępującej komputeryzacji nauki pozwoliły na wyodrębnienie się nowej dziedziny biologii doświadczalnej, która nazywa się dzisiaj inżynierią genetyczną. Metody stosowane w inżynierii genetycznej pozwalają na wyodrębnianie z organizmów dawców potrzebnych fragmentów genomów, genów i odcinków regulatorowych, łączenie ich w nowe, nie występujące w przyrodzie konfiguracje i przenoszenie takich sztucznych tworów do organizmu biorcy.

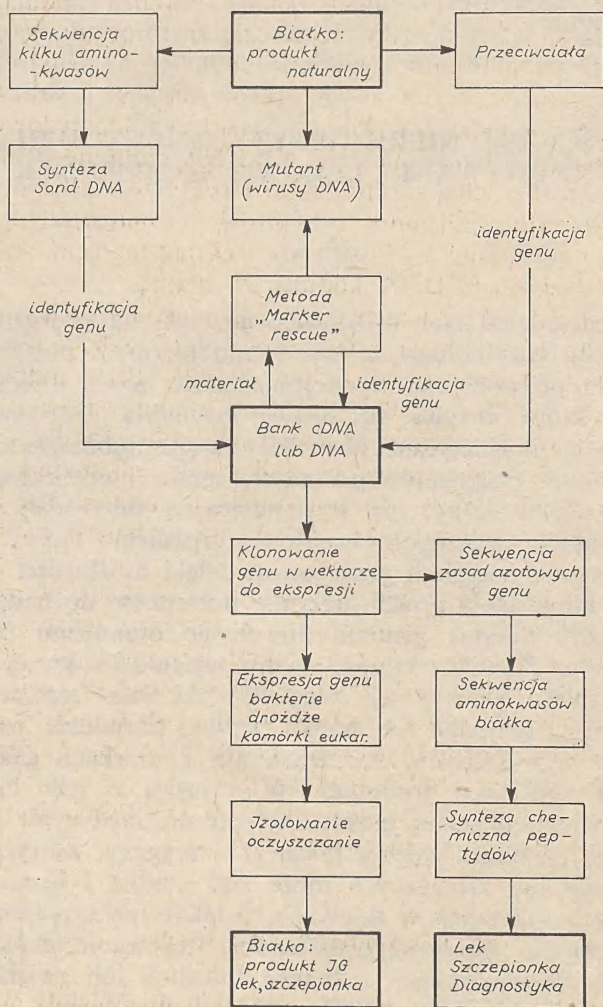
Stosowanie metod inżynierii genetycznej, dzięki możliwości sporządzania banku genów i korzystania z nich, uczyniło dostępnym do badań i zastosowań prawie każdy zakątek genomu dowolnego organizmu (niekoniecznie żyjącego obecnie na Ziemi), z którego można wyizolować kwasy nukleinowe.

Metody inżynierii genetycznej osiągnęły taki stan zaawansowania, że odszukanie genu w genomie lub banku genów, określenie jego sekwencji i jego ekspresja w bakteriach, drożdżach lub komórkach eukariotycznych nie przedstawia większych trudności. W związku z tym biotechnologia oparta na metodach inżynierii genetycznej oferuje medycynie i weterynarii białka; hormony, różnego rodzaju faktory i antygeny, których izolowanie z tkanek ludzkich lub zwierzęcych może być trudne i drogie z powodu małych ilości tych substancji w tkankach, a także niebezpieczne z powodu możliwej patogenności wyjściowego materiału. Stosowanie leków białkowych lub szczepionek otrzymywanych z tkanek ludzkich lub zwierzęcych niesie realne ryzyko zakażenia wirusami lub wirusami powolnymi.

Celem tej pracy nie jest wyliczanie leków, szczepionek i firm, które je wyprodukowały stosując metody inżynierii genetycznej. Chciałbym wskazać zalety i wady różnych systemów ekspresji cudzych genów, wskazując najnowsze rozwiązania w tej dziedzinie i na przykładzie 8-letniego stosowania kierowanej rekombinacji DNA w badaniach wirusa zapalenia wątroby B (HBV), zilustrować potencjalne możliwości wynikające ze stosowania metod inżynierii genetycznej.

OD FENOTYPU DO GENU

Określony fenotyp może być cechą identyfikującą pojedynczy gen. Przykładem są sposoby izolowania onkogenów [1] lub wykorzystanie metody „marker rescue” w celu identyfikacji i określania miejsca genów w genomach dużych DNA wirusów [2]. Metoda „marker rescue” polega na naprawianiu



Rys. 1. Sposoby identyfikacji genu. Dane początkowe: wyizolowane białko lub zmieniony fenotyp wirusa

genomu zmutowanego wirusa, który utracił pewną cechę drogą wprowadzania do zakażonych zmutowanym wirusem komórek eukariotycznych zrekombinowanych plazmidów zawierających fragmenty DNA dzikiego wirusa. Plazmid przywracający zmutowanemu wirusowi cechy dzikiego zawiera DNA genu lub fragmentu genu, który warunkuje utraconą cechę.

Identyfikacja i wyizolowanie fragmentu DNA kodującego konkretne białko jest znacznie prostszym zadaniem niż wyizolowanie onkogenu i obecnie dla dobrze wyposażonych laboratoriów nie przedstawia większych trudności metodycznych. Potrzebna jest niewielka ilość oczyszczonego, homogennego preparatu białkowego i bank cDNA lub DNA. Banki cDNA, kopie DNA sporządzone z mRNA wyizolowanych z odpowiedniej tkanki lub z RNA wirusów, stosuje się w trakcie identyfikacji sekwencji kodujących białka eukariotyczne i białka RNA-wirusów. Konieczność stosowania banków cDNA przy identyfikacji i izolowaniu sekwencji kodujących strukturę pierwszorzędową białek eukariotycznych jest skutkiem nieciągłej struktury genów. Ich długość może dochodzić do kilkuset tysięcy nukleotydów [3]. Dzięki możliwości sporządzania banków cDNA z mRNA redukuje się długość fragmentu DNA niosącego pełną informację o strukturze białka do rozmiarów niższych niż maksymalna pojemność wektorów plazmidowych lub fagowych (około 40 tys. nukleotydów). Poza tym, ekspresja genu w bakteriach wymaga ciągłości sekwencji DNA kodujących białka.

Banki DNA stosuje się do identyfikacji genów DNA-wirusów.

Wybór sposobu identyfikacji i izolowania genu zależy w dużym stopniu od ilości wyizolowanego uprzednio białka. Przy małych ilościach określa się zwykle sekwencje kilku kolejnych aminokwasów i na tej podstawie, biorąc pod uwagę częstość występowania kodonów dla aminokwasów w danym organizmie, syntetyzuje się kilka lub kilkanaście sond DNA o długości 15-20 nukleotydów. Za pomocą tych sond, drogą hybrydyzacji DNA-DNA odszukuje się w banku cDNA lub w banku DNA określony gen [4].

Do odszukania genu lub jego fragmentu w bankach skonstruowanych w specjalnych wektorach, w których może nastąpić ekspresja sekwencji kodującej, można wykorzystać metody immunologiczne [5]. Potrzebna jest wtedy większa ilość białka do immunizacji zwierząt w celu otrzymania przeciwciał. W przypadku kiedy zostanie odnaleziony fragment genu, można go użyć jako sondy do hybrydyzacji DNA-DNA przy poszukiwaniach całej sekwencji kodującej w innych bankach.

Spodoby identyfikacji i izolowania sekwencji DNA kodujących kolejność aminokwasów w białkach przedstawiono na rys. 1.

SYSTEMY EKSPRESJI GENÓW

W celu uzyskania ekspresji genu w określonym systemie wektor-gospodarz, gen otacza się sekwencjami regulatorowymi, które są rozpoznawane przez enzymy gospodarza, i łączy się z DNA wektora. Stosuje się następujące systemy ekspresji: plazmidy-bakterie, plazmidy-drożdże, plazmidy-komórki eukariotyczne, wirusy-komórki eukariotyczne. Różne systemy ekspresji genów scharakteryzowano w tabeli 1.

Nowe, w stosowaniu systemu plazmidy-bakterie, jest użycie plazmidów do ekspresji fuzji białkowych, w których sekwencje kodujące białko bakteryjne oddzielono od cudzego genu kilkunastoma nukleotydami kodującymi

polipeptyd rozpoznawany przez proteazę [6] lub sześcioma nukleotydami kodującymi dwupeptyd asp-pro, który w środowisku kwaśnym tworzy labilne wiązanie peptydowe [7]. Takie wektory umożliwiają maksymalne wykorzystanie układu biosyntezy białka *Escherichia coli* i pozwalają otrzymywać cudzy produkt białkowy o niezmienionej strukturze pierwszorzędowej.

W dziedzinie systemów wirusy-komórki eukariotyczne dużą przyszłość może mieć stosowanie wirusa krowianki jako wektora. W tym celu w genom wirusa krowianki, pod kontrolę promotora RNA polimerazy tego wirusa,

Tabela 1

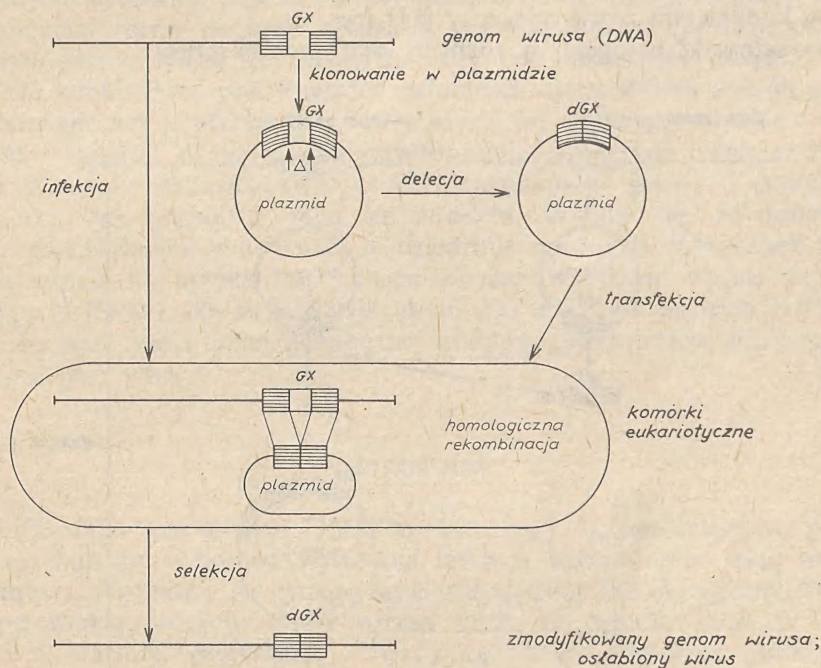
Charakterystyka różnych systemów ekspresji genów

System ekspresji	Zalety	Wady
Plazmidy-bakterie	— duża wydajność — łatwość izolowania — tania produkcja	— nierozpuszczalny, zdenaturowany produkt — brak modyfikacji posttranslacyjnych
Plazmidy-drożdże	— możliwość glikolizacji — duża antygenowość produktu — produkt może być wydzielany na zewnątrz komórki	— niższa wydajność niż w bakteriach — nie zawsze właściwe modyfikacje posttranslacyjne
Hodowle komórkowe z genem włączonym na stałe w genom	— właściwe modyfikacje — wysoka antygenowość produktu	— mała wydajność — droga produkcja
Wirusy-komórki eukariotyczne	— duża wydajność — właściwe modyfikacje [8]	

włączono gen RNA polimerazy faga T7. Jednocześnie stworzono inny zmodyfikowany genom krowianki włączając gen acetylotransferazy chloramfenikolu pod kontrolę promotora RNA polimerazy faga T7. Jednocześnie zakażenie komórek dwoma zmodyfikowanymi wirusami (test na komplementację) powodowało 400-600 razy większą ekspresję acetylotransferazy chloramfenikolu niż ta, którą obserwowano w komórkach eukariotycznych, kiedy ten sam gen znajdował się pod kontrolą promotora i sekwencji wzmacniającej wirusa sarkomy Rousa [9]. Należy oczekiwać, że zostaną stworzone wirusy, do których jednocześnie będą włączone gen RNA polimerazy faga T7 pod kontrolą promotora krowianki i cudzy(e) gen(y) pod kontrolą promotora faga T7. W ten sposób może powstać niezwykle wydajny wektor eukariotyczny, dzięki któremu będzie można otrzymywać duże ilości właściwie zmodyfikowanych postranslacyjnie białek. Metodę włączania fragmentów DNA w genomy DNA wirusów przedstawiono schematycznie na rys. 2.

Nie ma ostatecznych reguł określających przydatność danego systemu ekspresji przed sprawdzeniem wartości produktu jako leku czy szczepionki. W przypadku leków sytuacja jest nieco jaśniejsza, ponieważ po stwierdzeniu

nieprzydatności najprostszego systemu ekspresji plazmidy-bakterie, zawsze można mieć nadzieję, że uda się znaleźć system eukariotyczny, który będzie zapewniał właściwą strukturę i odpowiednie modyfikacje postranslacyjne białka. Mówiąc nieco inaczej, w przypadku leku zadanie polega na wiernym odtworzeniu struktury białka i jego modyfikacji postranslacyjnych, natomiast w przypadku szczepionek zadanie jest inne: należy



Rys. 2. Schemat procedury otrzymywania delecji w określonym genie wirusa (Gx). W ten sposób otrzymano żywą szczepionkę przeciw wirusowi wścieklizny rzekomej, uszkodzając gen kinazy tymidynowej [10]

w miarę wiernie odtworzyć strukturę antygenów, które zwykle są częściami patogennego organizmu, wirusa, bakterii lub pierwotniaka tak, aby to co powstanie nie było patogenne i jednocześnie po zaszczepieniu wywoływało długotrwałą reakcję obronną przed patogenem. Doświadczenie kilku lat stosowania metod inżynierii genetycznej wskazuje, że otrzymanie szczepionki jest zwykle trudniejsze niż leku białkowego.

OTRZYMYWANIE SZCZEPIONEK METODAMI INŻYNIERII GENETYCZNEJ

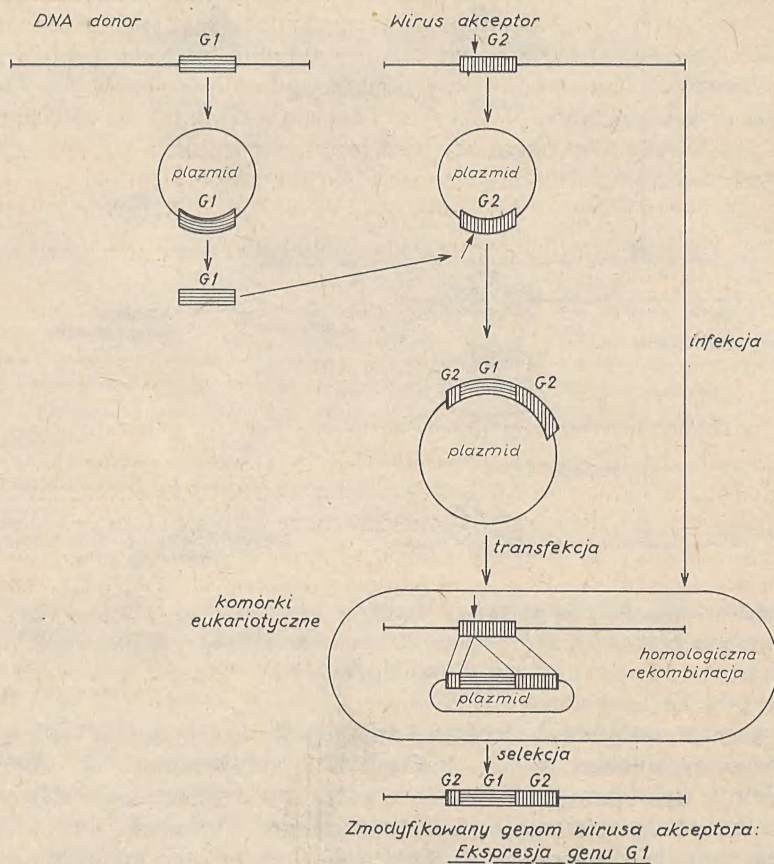
Tradycyjne metody otrzymywania szczepionek to:

1. Osłabianie patogenu drogą kolejnych pasażów lub działaniem czynników mutagennych (szczepionki żywe).
2. Inaktywacja patogenu (szczepionki martwe).

3. Izolowanie podjednostek patogenu — białek, glikoproteidów, kompleksów glikoproteidów z membranami.

Metodami inżynierii genetycznej można otrzymać:

1. Osłabione wirusy poprzez kierowaną delecję w określonych genach, np. osłabiony wirus pseudowścieklizny [10] (metoda otrzymywania przedstawiona na rys. 2).
2. Zmodyfikowane wirusy krowianki z włączonymi w genom fragmentami DNA kodującymi różne antygeny [11] (rys. 3).
3. Podjednostki patogenu w różnych systemach ekspresji.



Rys. 3 Schemat procedury prowadzącej do włączenia cudzego genu G1 w DNA wirusa akceptora. W ten sposób, włączając różne geny, otrzymano dziesiątki zmodyfikowanych genów wirusa krowianki [9, 11]. Możliwe jest włączenie kilku genów do jednego genomu wirusa

4. Syntetyczne polipeptydy — najczęściej na podstawie danych uzyskanych z sekwencji nukleotydów genu kodującego podjednostkę patogenu.

Zupełnie nowym podejściem do produkcji szczepionek jest otrzymywanie przeciwciał antyidiotypowych [12].

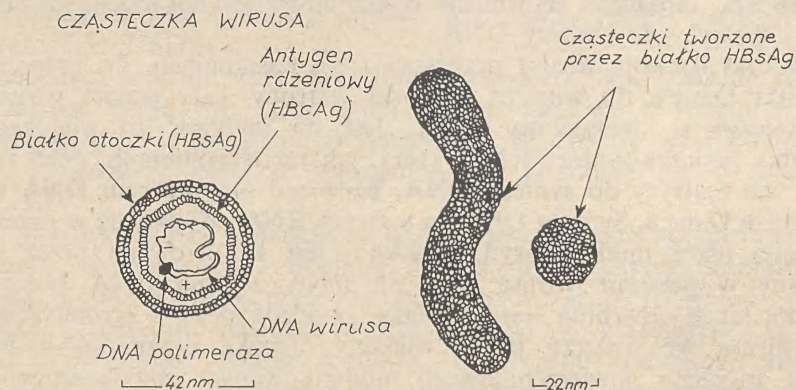
Wydaje się, że przewaga antygenów wytwarzanych metodami inżynierii genetycznej może polegać na: 1) stabilności, 2) braku działania ubocznego, 3) czystości otrzymywanych preparatów, 4) bezpieczeństwie przy izolowaniu, 5) niskiej cenie, 6) możliwości szybkiego reagowania na zmiany patogenów i 7) możliwości stosowania antygenów do celów diagnostycznych [13].

Przedstawione tu bardzo pozytywne cechy przyszłych szczepionek otrzymywanych metodami inżynierii genetycznej to raczej spis pobożnych życzeń niż rzetelna ocena poparta wiedzą i doświadczeniem. W rzeczywistości nie było jeszcze czasu aby stwierdzić czy rekombinacyjne antygeny będą w stanie konkurować pod względem zdolności stymulowania układu obrony immunologicznej z otrzymywanymi tradycyjnie. Jedynym sposobem oceny w tym względzie okaże się najprawdopodobniej metoda prób i błędów.

Wymienianie sklonowanych genów, fragmentów genów i patogenów, z których one pochodzą, mija się z celem. Wydaje się, że potencjalne możliwości inżynierii genetycznej w dziedzinie produkcji szczepionek łatwiej będzie ocenić na przykładzie jednego wirusa. Wybrałem wirusa zapalenia wątroby B (HBV). Na świecie żyje około 200 milionów nosicieli HBV [13]. Potrzeba szczepionki taniej, bezpiecznej, uodporniającej przeciw HBV na długi czas jest oczywista.

WIRUS HBV

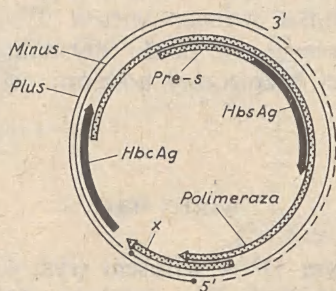
Wirus HBV jest małym DNA wirusem (rys. 4), powodującym głównie infekcje wątroby. Choroba wywołana infekcją wirusa może mieć przebieg gwałtowny, prowadząc do ostrego zapalenia wątroby lub chroniczny. W trakcie przewlekłej infekcji, DNA wirusa może się wbudowywać w genom komórek wątroby gospodarza. Uważa się to za przyczynę powstawania nowotworu wątroby. Zakażone komórki, hepatocyty wydzielają specyficzne



Rys. 4 Cząstki wirusa HBV i struktura jego genomu. Oba rodzaje cząstek infekcyjne (42nm) i nieinfekcyjne (22nm) powstają w zakażonych wirusem hepatocytach. Cząstki infekcyjne zawierają cyrkularny DNA i enzym, DNA polimerazę

cząsteczki pochodzenia wirusowego, które zbierają się we krwi w ilości 10^{13} cząstek na 1 ml. Obserwuje się dwa typy cząstek: 1) cząstki nie powodujące infekcji o kulistym lub cylindrycznym kształcie (średnica 22 nm, rys. 4), składające się głównie z białka antygeny powierzchniowego (HbsAg), polisacharydów modyfikujących to białko i lipidów, cząstki te nie zawierają wirusowego DNA; 2) infekcyjne cząstki wirusa o średnicy 42 nm, cząstki Dane'a, zawierające DNA otoczony dwiema warstwami, nukleokapsydem (antygen rdzeniowy — HbcAg) i zewnętrzną otoczką, której powstawanie jest indukowane przez białko HbsAg. Ilość cząstek wirusa w 1 ml krwi może wynosić około 10^{10} .

Badanie cyklu rozwoju wirusa jest trudne, ponieważ do tej pory nie udało się go wyhodować w kulturach komórkowych *in vitro*. Wiadomo jednak, że w biosyntezie DNA wirusa bierze udział RNA, będący kopią nici DNA „minus” (rys. 5). Uważa się [14], że ten RNA pełni podwójną



Rys. 5 Genom wirusa HBV. 3182 nukleotydy łańcucha „minus” kodują: antygen powierzchniowy HbsAg i pre-S; antygen rdzeniowy HbcAg; DNA polimerazę i białko X. Otwarte ramki odczytu zaznaczono grubymi strzałkami. Linia przerywaną zaznaczono jednoniciowy fragment genomu HBV [19]

rolę: mRNA, niosącego informację o kolejności aminokwasów w białkach wirusa i matrycy do syntezy DNA.

Cały cykl rozwoju wirusa przedstawia się następująco. Po przedostaniu się cząstki Dane'a do wnętrza komórki wątroby, cały genom wirusa jest przekształcany w dwuniciowy DNA. Jest on matrycą do wielokrotnego powielania podczas syntezy RNA, który, jak już wspomniano, pełni funkcję mRNA lub matrycy do syntezy DNA, będącego prekursorem DNA wirusa w cząstkach Dane'a. Synteza DNA na matrycy RNA odbywa się w przestrzeni zamkniętej przez nukleokapsyd, HbcAg i jest katalizowana przez enzym kodowany w genomie wirusa (rys. 5), RNA zależną DNA polimerazę, nazywaną także odwrotną transkryptazą. Nukleokapsyd z zsintetyzowanym DNA wirusa we wnętrzu jest powlekany otoczką utworzoną z lipidów i białek antygeny powierzchniowego modyfikowanych przyłączaniem polisacharydów. W ten sposób tworzą się nowe cząstki Dane'a, które są eksportowane na zewnątrz hepatocytów [14].

Opracowane dotychczas szczepionki przeciw HBV to wprowadzone na rynek przez Instytut Pasteura [15, 16] i firmę Merck [17], izolowane

z surowicy nosicieli HBV cząstki o średnicy 22 nm. Mimo tego, że stosowanie tych szczepionek wykazało ich wysoką skuteczność [18] nie można oczekiwać, że będą one szeroko stosowane. Główne przyczyny to wysoka cena (około 100 USD) i możliwość zakażenia innymi patogenami podczas ich stosowania.

REKOMBINACYJNA SZCZEPIONKA PRZECIW HBV

Punktem wyjścia do rozpoczęcia pracy nad rekombinacyjnymi szczepionkami przeciw HDV było sklonowanie i określenie sekwencji nukleotydów DNA wirusa [19-21]. 3182 nukleotydy kolistego genomu HBV (rys. 5) kodują: 1) DNA polimerazę, 2) antygen powierzchniowy — HbsAg poprzedzony rejonem pre-S, 3) antygen rdzeniowy — HbcAg i 4) antygen X.

Próby ekspresji genu HbsAg w *Escherichia coli* nie przyniosły zadowalających wyników [22]. Ilość białka otrzymywana z bakterii była niewielka i oprócz tego otrzymany produkt okazał się słabym antygenem i nie chronił zwierząt doświadczalnych przed HBV. Negatywne wyniki przyniosły także badania antygenowości oligopeptydów będących częściami białka HbsAg.

Po tych wstępnych porażkach metod inżynierii genetycznej zaczęto badać ekspresję genu HbsAg w komórkach eukariotycznych. Zastosowano drożdże i komórki ssaków [23]. Uzyskane, rekombinacyjne kompleksy białka HbsAg z membranami przypominały swoim kształtem i wielkością, cząstki izolowane z surowicy nosicieli HBV. Szympanse zaszczepione tymi cząstkami były odporne na zakażenie HBV.

Zupełnie nowe podejście do problemu szczepionki przeciw HBV zaprezentowano w pracowni Bernarda Mossa (NIH, Bethesda), gdzie drogą rekombinacji włączono gen HbsAg w genom wirusa krowianki (rys. 3). Szympanse zaszczepione tym wirusem były odporne na zakażenie HBV [24]. Mimo wielu wątpliwości dotyczących stosowania zrekombinowanych wirusów krowianki jako szczepionek, niewątpliwą ich zaletą byłaby bardzo niska cena (około 0,31 USD).

Potencjalnym źródłem aktywnych immunologicznie kompleksów HbsAg z membranami mogą być także zwierzęta transgenowe z genem HbsAg włączonym na stałe w ich materiał genetyczny. Można by takie kompleksy izolować z surowicy zwierząt transgenowych, podobnie jak z surowicy nosicieli HBV.

Niezwykłe interesujące podejście, wykorzystujące zdolność antygeny HbsAg do tworzenia kompleksów z lipidami cytoplazmy i sekrecję kompleksów poza obręb komórek, zaproponowali pracownicy Grupy Inżynierii Genetycznej G3 z Instytutu Pasteura w Paryżu [25]. W plazmidzie służącym do transfekcji komórek ssaków środkową część genu kodującego antygen HbsAg zamieniono fragmentem DNA kodującym antygen wirusa polio. Po transfekcji hodowli komórkowych odnaleziono klony komórek, z których następowała sekrecja białkowo-lipidowych kompleksów, zawierających hybrydowe białko, z wyekspozowanym na zewnątrz antygenem wirusa polio. W ten sposób, być może, powstał uniwersalny nośnik antygenów.

Badano także przydatność innych antygenów wirusa HBV otrzymanych metodami inżynierii genetycznej jako szczepionek. Uzyskano wysoką ekspresję genu HbcAg w *Escherichia coli* [26]. Ze zrekombinowanych bakterii wyizolowano wysokocząsteczkowe agregaty białkowe, podobne do otrzymywanych z materiałów pobranego podczas biopsji z wątrób chorych na wirusowe zapalenie wątroby [27]. Wykazano dużą przydatność zrekombinowanego HbcAg do testów diagnostycznych [26, 28] i możliwość wykorzystania cząstek HbcAg jako szczepionki [29], ponieważ próby przeprowadzone na szympanсах dowiodły, że otrzymany z *Escherichia coli* antygen indukuje powstawanie przeciwciał chroniących przed zakażeniem HBV [30, 31].

Wielce obiecujące wydają się także badania nad stymulowaniem specyficznej odpowiedzi immunologicznej przez antygen kodowany we fragmencie genomu pre-S (rys. 5) [32, 33]. Ostatnio ustalono, że otrzymany na drodze chemicznej polipeptyd składający się z 27 aminokwasów o sekwencji identycznej z częścią antygeny pre-S rozpoznaje hepatocyty. Polipeptyd ten zaszczepiony zwierzętom doświadczalnym powoduje powstawanie przeciwciał neutralizujących wirusa HBV [34].

Przedstawiony obraz osiągnięć inżynierii genetycznej w dziedzinie wytwarzania antygenów HBV mimo tego, że jeszcze żaden z nich nie został zastosowany jako szczepionka, pozwala na stawianie optymistycznych prognoz odnośnie walki z HBV. Po 8 latach stosowania metod inżynierii genetycznej w badaniach wirusa HBV można mieć nadzieję, że przynajmniej jeden z wymienionych antygenów będzie w przyszłości dobrą szczepionką.

Należy przestrzec przed automatyczną ekstrapolacją możliwości metod inżynierii genetycznej z jednej dziedziny w drugą. Dobrymi przykładami są prace nad stworzeniem szczepionek przeciw pasożytom wywołującym malarię (zob. art. Szafrąńskiego w tym samym numerze Kosmosu) i wirusowi pryszczycy. Mimo zaangażowania wielu pracowników i dużych środków, dotychczas otrzymane wyniki nie wskazują na rychłe osiągnięcie pełnego sukcesu. Nie z powodu trudności technicznych w otrzymywaniu szczepionki, lecz ze względu na złożone strategie unikania przez pasożyty zniszczenia przez immunologiczny układ gospodarza.

UWAGI KOŃCOWE

Ludzkość może mieć do swojej dyspozycji ogromne, tworzone przez miliardy lat bogactwo — informacje zawartą w rezerwuarze genomów wszystkich żywych ziemskich istnień, z naszym ludzkim włącznie, wszystkie ogólne i unikalne rozwiązania w nich zakodowane, te o których już wiemy i staranny się z nich korzystać i te, które wyjdą na jaw w trakcie przyszłych badań. Wiele naszych zamierzonych i nie zamierzonych działań prowadzi do eliminacji całych populacji żywych istot. Miejmy nadzieję, że tworzone przez ludzi nowe konfiguracje genowe wyeliminują z życia tylko nieliczne z nich.

LITERATURA

1. Weinberg R. A. — *A molecular basis of cancer*. Sci. Amer. 249: 102-117, 1983.
2. Perucho M., Hanahan D., Lipsich L., Wigler M. — *Isolation of the chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue*. Nature 285: 207-210.
3. Gitschier J., Wood W. I., Goralka T. M., Wion K. L., Chen F. Y., Eaton D. H., Vohar G. A., Capon D. J., Lawn R. M. — *Characterization of the human factor VIII gene*. Nature 312: 326-337, 1984.
4. Toole J. J., Knopf J. L., Wozney J. M., Sultzman L. A., Buecker J. L., Pittman D. D., Kaufman R. J., Brown E., Shoemaker C., Orr E. C., Amphlett G. W., Foster W. B., Coe M. L., Knutson G. J., Fass D. N., Hewick R. M. — *Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor*. Nature 312: 342-347, 1984.
5. Koenen M., Griesser H. W., Muller-Hill B. — *Immunological detection of chimeric? -galactosidases expressed by plasmid vectors*. W: *DNA cloning a practical approach*. Glover D. M. (red.), IRL Press. Oxford-Washington, s. 89-100, 1986.
6. Nagai K., Perutz M. F., Poyart C. — *Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7252-7255, 1985.
7. Szoka P. R., Schreiber A. B., Chan H., Murthy J. — *A general method for retrieving components of a genetically engineered fusion protein*. DNA 5: 11-20, 1986.
8. Kuroda K., Hauser C., Rott R., Klenk H., Doerfler W. — *Expression of the influenza virus haemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector*. EMBO J. 5: 1359-1365, 1986.
9. Fuerst T. R., Niles E. G., Studier F. W., Moss B. — *Eucaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase*. Abstracts of papers presented at the 6th workshop on POLYVIRUS/IRIDOVIRUS. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
10. Beardsley T. — *USDA goes to public too quickly*. Nature 320: 473, 1986.
11. Moss B. — *Use of vaccinia virus vectors for the development of live vaccines*. Banbury Report 22: *Genetically altered viruses and the environment*. Cold Spring Harbor Laboratory, s. 291-300, 1985.
12. Kennedy R. C., Dreesman G. R. — *Anti-idiotypic antibodies as idioptope vaccines that induce immunity against infectious agents*. Intern. Rev. Immun. 1: 67-78, 1986.
13. Davies J. E. — *Genetic engineering and vaccines*. Ann. Inst. Pasteur Immunol. 136D: 143-150, 1985.
14. Summers J., Mason W. — *Replication of the genome of hepatitis B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate*. Cell 9: 403-415, 1982.
15. Couroucé A. M., Laplanche A., Benhamou E., Jungers P., Crosner J., Degos F. — *Long term immunogenicity and clinical efficacy of hepatitis B vaccine*. Hepatitis B Vaccine Symposium nt. New Findings and Perspectives. Pasteur Vaccines, Marnes-la-Coquette, s. 21-27, 1984.
16. Goudeau A., Dubois F., Barin F., Dubois M. C., Coursaget P. — *Hepatitis B vaccine: clinical trial in high risk settings in France (September, 1975-September, 1982)*. Develop. Biol. Stand. 54: 267-284, 1982.
17. Stevens C. E., Alter H. J., Taylor P. E., Zang E. A., Harlley E. J., Szmuness W. — *Hepatitis B vaccine in patients receiving hemodialysis, immunogenicity and efficacy*. New Engl. J. Med. 311: 496-501, 1984.
18. Coursaget P., Yvonnnet B., Chiron J. P., Diop-Mar I. — *Long-term efficacy of hepatitis B vaccine in infants from an endemic area*. Ann. Inst. Pasteur/Virol. 137E: 221-224, 1986.
19. Galibert F., Mandart E., Fitoussi, Tiollais P., Charnay P. — *Nucleotide sequence of the hepatitis B genome (subtype ayw) cloned in E. coli*. Nature 281: 646-650, 1979.

20. Galibert F., Chen T.N., Mandart E. — *Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence*. J. Virol. 41: 51-65, 1982.
21. Valenzuela P., Gray P., Quiroga M., Zaldivar J., Goodman H. M., Rutter W. — *Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen*. Nature 280: 815-819, 1979.
22. Charnay P., Gervaisq M., Louise A., Galibert F., Tiollais P. — *Biosynthesis of hepatitis surface antigen in E. coli*. Nature 286: 893-895, 1980.
23. Zuckerman A. J. — *Subunit, recombinant and synthetic hepatitis B vaccines*. Microbiol. Sci. 2: 132-137, 1985.
24. Moss B., Smith L.G., Gerin J.L., Purcell R.H. — *Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B*. Nature 311: 67-69, 1984.
25. Delpeyrox F., Chenciner N., Lim A., Malpi  e Y., Blondel B., Crainic R., Van Der Werf S., Streeck R.E. — *A poliovirus neutralization etiope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles*. Science 233: 472-474, 1986.
26. Stahl S., MacKay P., Magazin M., Bruce S.A., Murray K. — *Hepatitis core antigen: synthesis in Escherichia coli and application in diagnosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1606-1610, 1982.
27. Cohen B. J., Richmond J. E. — *Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in E. coli*. Nature 296: 677-678, 1982.
28. Archer A.C., Cohen B.J., Mortimer P.P. — *The value of srening blood donors for antibody to hepatitis B core antigen*. J. Clin. Path. 36: 924-928, 1983.
29. Prince A.M. — *Mechanism of protection against hepatitis B infection by immunization with hepatitis B virus cores*, Lancet I: 512, 1984.
30. Murray K., Bruce S.A., Hinnen A., Wingfield P., Van Erd P.M.C.A., de Reus A., Schellekens H. — *Hepatitis B virus antigen made in microbial cells immunize against viral infection*. Europ. J. Mol. Biol. 3: 645-650, 1984.
31. Tabor E., Gerety R. J. — *Possible role of immune response to hepatitis core antigen in protection against hepatitis B infections*. Lancet I: 171, 1984.
32. Milich D.R., Thornton G.B., Neurath A.R., Kent S.B., Tiollais P., Chisari F. V. — *Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen*. Science 228: 1195-1198, 1984.
33. Fujisawa Y., Ito Y., Ikeyama S., Kikuchi M. — *Expression of hepatitis B virus surface antigen P31 gene in Escherichia coli*. Gene 40: 23-29, 1985.
34. Neurath A.R., Kent S.B.H., Strick N. — *Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus*. Cell 46: 429-436, 1986.

PRZEMYSŁAW SZAFRAŃSKI, II

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Warszawa

PERSPEKTYWY SZCZEPIONKI PRZECIW MALARII

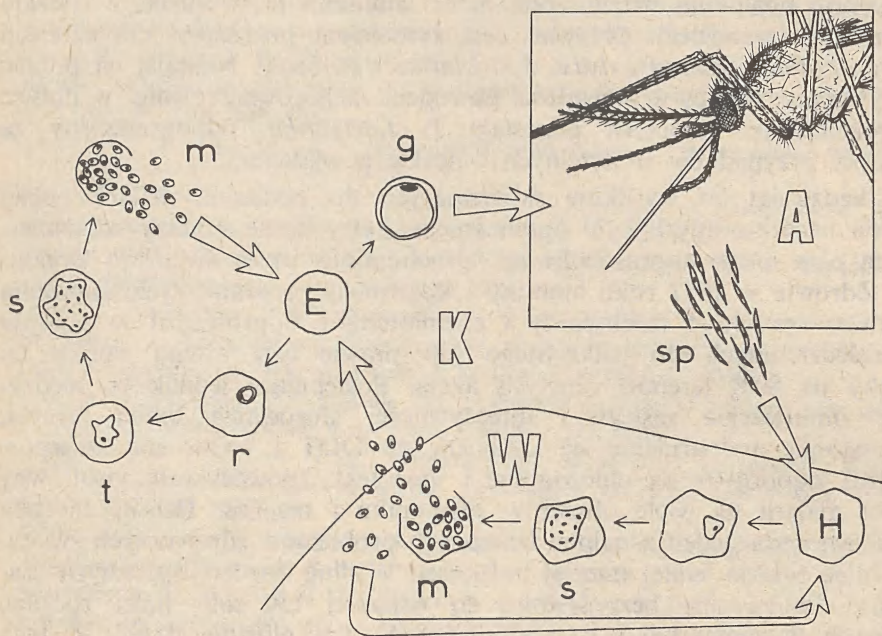
Malarię powodują przenoszone przez widliszka pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium* (zarodziec). Człowiek jest żywicielem pośrednim dla czterech z nich: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* i *P. ovale*. Najdalej na północ sięga *P. vivax*, będący w przeszłości powodem zachorowań również w Polsce. Najgroźniejszym natomiast pozostaje *P. falciparum*, odpowiedzialny za większość przypadków śmiertelnych i ciężkie powikłania.

Kilkadziesiąt lat wysiłków zmierzających do poddania malarii pełnej kontroli nacechowanych było optymizmem, który liczne sukcesy odnoszone na tym polu mogły usprawiedliwiać. Uruchomiony przez Światową Organizację Zdrowia w 1957 roku ambitny i kosztowny program wyeliminowania malarii w oparciu o insektycydy i chemioterapię doprowadził w połowie lat sześćdziesiątych do całkowitego lub prawie całkowitego zaniku tej choroby na 80% terenów objętych akcją. Postępujące jednak w międzyczasie zmniejszenie zasięgu i intensywności stosowania takiej taktyki, a szczególnie uodparnianie się komarów na DDT i pojawienie szczepów zarodźca odpornych na chloroquine i inne leki, spowodowały gwałtowny powrót malarii na wiele obszarów subtropiku i tropiku. Dzisiaj choroba ta stanowi nadal jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych świata, zagrażając prawie jednej trzeciej ludzkości. Według bardzo ostrożnych szacunków dotyka ona bezpośrednio co najmniej 150 mln ludzi rocznie, z których w samej tylko Afryce umiera 1 mln, głównie dzieci. Z tych chociażby względów potrzeba szczepionki staje się wyjątkowo nagląca. Faktem jednak jest, że do chwili obecnej nie udało się opracować szczepionki przeciwko żadnej chorobie pasożytniczej człowieka. Odpowiedzialne za ten stan są niewątpliwie złożoność budowy i cykli życiowych pasożytów oraz niejednokrotnie poważne trudności z uzyskaniem niezbędnego materiału biologicznego do badań. Z drugiej jednak strony, zakres prac prowadzonych nad tymi chorobami nie był proporcjonalny do problemów jakie one powodują. Obserwowane od kilku lat rosnące zainteresowanie molekularną parazytologią jest niewątpliwie wynikiem zwrotu w metodologii jaki dokonuje się za sprawą upowszechnienia technik klonowania DNA i hodowli tkankowych *in vitro*.

Artykuł dotyczy zasadniczo problemów immunizacji przeciwko *P. falciparum*, nad którym prowadzi się obecnie najwięcej badań. Niemniej jednak również inne gatunki zarodźca, w tym *P. vivax*, były i nadal są obiektami zainteresowania naukowców z kilku ośrodków badawczych.

CYKL ŻYCIOWY ZARODZCA

W warunkach naturalnych zakażenie malarią następuje w wyniku przedostania się ze ślinianek komara do krwiobiegu człowieka formy zarodźca zwanej sporozoitami (rys. 1). Już po kilku zaledwie minutach pasożyty znajdują się niemal wyłącznie w komórkach układu siateczkowo-śródbłonowego, głównie wątroby i trzustki, gdzie mogą pozostawać do kilku nawet miesięcy. W śródbłonku zarodek ulega przeobrażeniu do wielojądrzastych form schizontów, rozpadających się w końcu na liczne merozoity wnika-ające ponownie do hepatocytów lub dostające się do krwiobiegu gdzie atakują erythrocyty. Wewnątrz czerwonych krwinek pasożyty przekształcają



Rys. 1. Uproszczony schemat cyklu życiowego *Plasmodium*. A — komar *Anopheles*, K — krwiobieg, W — wątroba, H — hepatocyt, E — erytrocyt, sp — sporozoity, s — schizont, m — merozoity, r — forma pierścieniowa, t — trofozoit, g — gametocyt

się kolejno w formy pierścieniowe, których czas istnienia w przypadku *P. falciparum* wynosi ok. 20 godzin, trofozoity, a po następnych 20 godzinach w schizonty. Po dalszych 8 godzinach z każdego zniszczonego erythrocyta wydostaje się 10 do 30 merozoitów atakujących nowe krwinki. Cykl schizogonii może trwać aż do śmierci chorego lub też opanowania sytuacji przez jego system immunologiczny lub leki. Po ok. dziesięciu dniach od pojawienia się zarodźca w krwi część merozoitów po inwazji erythrocytów rozwija się do płciowych form zwanych gametocytami. Po dostaniu się do organizmu komara, wraz z pobraną przez niego krwią, przekształcają się one dalej w makro i mikro gamety. Zygoty powstałe z połączenia gamet

przechodzą następnie sporogonie dając w efekcie bardzo liczne sporozycy, gromadzące się w gruczołach ślinowych owada.

Tak złożony cykl rozwojowy zarodźca wykształcił się najprawdopodobniej dla jak najefektywniejszego uniknięcia odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza. Większość stadiów różni się bowiem między sobą antygenowo. Poza tym tylko sporozycy i merozycy, jako formy pozakomórkowe, są bezpośrednio dostępne dla przeciwciał jednakże przez bardzo krótki czas.

INDUKCJA ODPOWIEDZI HUMORALNEJ PRZEZ SPOROZOITY

Zainteresowanie inwazyjnym stadium zarodźca jakim są sporozycy jest duże, gdyż stymulacja odporności organizmu właśnie przeciwko nim nie powinna dopuścić do rozwoju innych form zarodźca w organizmie człowieka i powinna zapobiec chorobie.

W 1941 roku pracujący w Indiach Mulligan wraz ze współpracownikami jako pierwsi użyli naświetlonych ultrafioletem sporozyców do wywołania odporności u ptaków, osiągając istotny poziom ochrony ich organizmu przed zwykle śmiertelną infekcją. W późniejszym czasie przeprowadzono szereg podobnych eksperymentów z malarią gryzoni, małp i człowieka, zakończonych również pozytywnymi wynikami, chociaż jak to było w przypadku człowieka, odporność utrzymywała się zaledwie przez 3 do 6 miesięcy. Stwierdzono, że sporozycy są wysoce immunogenne oraz że stymulowana przez nie immunologiczna ochrona organizmu jest specyficzna gatunkowo i wyłącznie względem tego tylko stadium rozwojowego (zob. artykuł przeglądowy [16]).

Warto tutaj zaznaczyć, że jakkolwiek uzyskanie pełnej odporności przeciwko sporozycom okazało się osiągalne, dość powszechnie wyrażana była wątpliwość, czy szczepionka antysporozycowa byłaby rzeczywiście skuteczna. Przedostanie się bowiem do komórek np. wątroby choćby jednego sporozycu mogłoby doprowadzić do rozwoju najgroźniejszych dla organizmu człowieka stadiów erytrocytalnych. Wątpliwości te można uznać za nieuzasadnione, ponieważ jak się okazuje samo zmniejszenie sporozycowego inokulumu bardzo znacznie osłabia przebieg choroby i jej następstwa. Co więcej liczba sporozyców wprowadzana przez komara do krwi jest stosunkowo niewielka; można więc łatwo doprowadzić do przynajmniej znacznej jej redukcji.

BIAŁKO CS

Antygenem powodującym obserwowaną indukcję odpowiedzi humoralnej jest białko CS (od ang. *circumsporozoite*), rozmieszczone równomiernie na powierzchni sporozyców [5, 17, 20]. Monoklonalne przeciwciała (mAb) względem tego polipeptydu blokują infekcję *in vitro* hepatocytów przez sporozycy i chronią zwierzęta przed zachorowaniem. Neutralizująca aktyw-

ność przeciwciał *in vivo* jest bezpośrednim efektem ich oddziaływania z antygenem, a nie wiązania komplementu czy też fagocytozy. MAb przeciwko białku CS, podobnie jak przeciwciała surowicy zainfekowanych zwierząt i człowieka, wiążą się z powierzchnią sporozoitów, powodując ich „linienie” i utratę infekcyjności (reakcja CSP od ang. *circumsporozoite precipitin*). W procesie tym odrzucane są przez komórkę właśnie białka CS, powiązane ze sobą krzyżowo przeciwciałami, tworzące przypominający ogon strąt na jednym z końców pasożyta. Przypuszcza się, że reakcja ta może imitować sytuację zachodzącą podczas oddziaływania sporozoitów z receptorami powierzchni hepatocytów. Istnieje także dowód na towarzyszące reakcji CSP uzupełnianie ubytku białka CS w błonie. Wg niektórych badaczy mogłoby to stanowić proces umożliwiający, przynajmniej niewielkiej ilości pasożytów, wnikięcie do komórek wątroby.

Z sygnalizowanych już przyczyn dalsze prace oparte na białku CS mogły stać się realne dopiero po sklonowaniu kodującego je genu. W przypadku *P. falciparum* dokonały tego przed trzema laty niezależnie od siebie dwie grupy badaczy w USA. Zespół kierowany przez Ruth Nussenzweig z NYU Medical Center użył tutaj metody tradycyjnej, konstruując ekspresyjny bank genów oparty na komplementarnym DNA (cDNA) [8]. Wymagało to jednak ok. 2 lat żmudnego gromadzenia poliA⁺RNA sporozoitów izolowanych ze ślinianek komarów. Druga grupa, w skład której weszli m.in. Tom McCutchan i Louis Miller z National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) oraz kilku badaczy z Walter Reed Army Institute of Research, posłużyła się opracowaną przez McCutchana oryginalną techniką wycinania z DNA nienaruszonych genów przy użyciu nukleazy mung-bean [6]. Przygotowując również ekspresyjny bank genów użyli oni DNA z bezpłciowych stadiów erytrocytalnych, pochodzących z ciągłej hodowli, a więc znacznie łatwiej dostępnych niż sporozycy. Rekombinacyjne kłony, niosące przynajmniej fragment genu CS, identyfikowano w obu przypadkach *in situ*, używając mAb przeciwko białku CS.

Struktura pierwszorzędowa antygeny, uzyskana na podstawie sekwencji sklonowanego genu, okazała się w pewnym sensie zbliżona, chociaż, poza dwoma krótkimi fragmentami peptydowymi, niehomologiczna z tą jaką rok wcześniej opublikował zespół Nigela Godsona z NYU Medical Center dla analogicznego ciała małego zarodźca *P. knowlesi* [9]. Dzisiaj znamy strukturę analogicznych antygenów również *P. cynomolgi* [7] i *P. vivax* [2]. Wszystkie one mają charakter kwasowy, c.c. od 40 do 60 kd i postać błonową krótszą od prekursora o 50-100 aminokwasów. Centralny obszar antygeny CS, będący lokalizacją głównego rejonu immunogennego, tworzą tendemowo powtórzone krótkie sekwencje aminokwasowe, mające w przypadku *P. falciparum* postać Asn-Ala-Asn-Pro. Trzy następujące po sobie tetrapeptydy tworzą immunogeny epitop [26]. Przeciwciała otrzymane względem syntetycznego (Asn-Ala-Asn-Pro)₃, związanego z białkiem przenośnikowym, reagują ze sporozoitami dając reakcję CSP i neutralizują infekcyjność pasożytów. W rejonach endemicznego występowania *P. falciparum*, antysporozoitowa odpowiedź humoralna organizmu ludzkiego skierowana jest wyłącznie lub w głównej mierze względem epitopu (Asn-Ala-Asn-Pro)₃.

Liczba powtórzeń Asn-Ala-Asn-Pro w białku CS, wynosząca przykładowo 37 dla szczepu brazylijskiego [6], może być różna w antygenach pochodzących z innych szczepów. Bardziej jednak istotny wydaje się fakt dużego stopnia niezmienności samej czteroaminokwasowej sekwencji, chociaż w szczepie brazylijskim, w przeciwieństwie do tajlandzkiego [8], czterokrotnie pojawia się Asn-Asp-Val-Pro zamiast Asn-Ala-Asn-Pro. MA b przeciwko białku CS z dowolnego szczepu *P. falciparum* rozpoznają to białko w błonach sporozoitów wszystkich innych dotychczas zbadanych szczepów z Ameryki Łacińskiej, Afryki i Azji. Tak więc obserwowany swego rodzaju polimorfizm immunogenego rejonu antygeny nie powinien ograniczać uniwersalności szczepionki opartej na strukturze Asn-Ala-Asn-Pro.

Podobnie niezmienny charakter ma rejon powtarzalnych sekwencji białka CS *P. vivax* (tab. 1), u którego immunogeny epitop tworzy osiemnastoaminokwasowy dimer.

Wyjątkowa prostota budowy epitopu CS stwarza możliwość jego łatwej i taniej chemicznej syntezy na dużą skalę. Z drugiej strony, wydajnym źródłem epitopu okazują się również bakterie *E. coli* transformowane

Tabela 1

Pierwszorzędowa struktura immunogennych rejonów wybranych antygenów *Plasmodium*

Nazwa antygeny	Sekwencja części powtarzalnej białka
CS <i>P. knowlesi</i> H	(Gly-Gln-Pro-Gln-Ala-Gln-Gly-Asp-Gly-Ala-Asn-Ala) ₁₂
CS <i>P. knowlesi</i> Nuri	(Glu-Gln-Pro-Ala-Ala-Gly-Ala-Gly-Gly) ₁₆
CS <i>P. falciparum</i>	(Asn-Ala-Asn-Pro) _{≥23}
CS <i>P. vivax</i>	(Asp-Arg-Ala-Asp/Ala-Gly-Gln-Pro-Ala-Gly) ₁₉
GBP-130 <i>P. falciparum</i>	(Leu-Thr-Ser-Ala-Asp-Pro-Gln-Gly-Gln-Ile-Met-Arg-Glu-Tyr-Ala-Ala-Asp-Pro-Glu-Tyr-Arg-Lys-His-Leu-Glu-Ile-Phe-Tyr-Lys-Ile-Leu-Thr-Asn-Thr-Asp-Pro-Asn-Asp-Glu-Val-Glu-Arg-Arg-Asn-Ala-Asp-Asn-Lys-Glu-Asp) ₁₁
Pf155 <i>P. falciparum</i>	(Glu-Glu-Asn-Val-Glu-His-Asp-Ala) ₅ *
p190 <i>P. falciparum</i> K1	(Ser-Gly-Thr) ₃ (Ser-Gly-Pro) ₂ (Ser-Gly-Thr) ₁
p190 <i>P. falciparum</i> Wellcome	(Ser-Val-Ala) ₁ (Ser-Gly-Gly) ₂ (Ser-Val-Ala) ₁ (Ser-Gly-Gly) ₁ ₄
S <i>P. falciparum</i> F	(Pro-Ala-Lys-Ala-Ser-Gln-Gly-Gly-Leu-Glu-Asp) _n
S <i>P. falciparum</i> N	(Ala-Arg/Leu-Lys-Ser-Asp-Glu-Ala-Glu) _k

* Najdłuższa z trzech jednostek peptydowych powtórzonych przy końcu C antygeny. n, k — w granicach od 20 do 110.

np. zrekombinowanym plazmidem pAS1, niosącym fragment powtarzalnego rejonu genu CS [27]. Skonstruowano wiele takich klonów z tetrapeptydowymi jednostkami *P. falciparum* powtórzonymi od 16 do 112 razy. Okazuje się, że długość immunogenu jest istotna dla poziomu odpowiedzi humoralnej, chociaż trudno powiedzieć czy jest to spowodowane konformacyjnymi różnicami między polipeptydami czy tylko różnicami w liczbie epitopów w jednej cząsteczce. Pomimo niepospolitego składu aminokwasowego, rekombinacyjne białka stanowią w tym przypadku ok. 5% wszystkich białek bakteryjnych i dają się łatwo oczyszczać do homogenności.

Równie istotny z praktycznego punktu widzenia jest fakt, że przeciwciała produkowane względem pochodnych białka CS mogą rzeczywiście spełniać rolę ochronną. Test immunofluorescencyjny (IFA) i reakcja CSP pokazały, że przeciwciała do tych „bakteryjnych” polipeptydów reagują z powierzchnią sporozoitów, jak również hamują inwazję przez sporozycyty ludzkich komórek hepatomy *in vitro*.

Atrakcyjną alternatywę dla przedstawionych powyżej możliwości indukcji odporności na malarię stanowi konstrukcja „żywej” szczepionki w postaci, zawierającego odpowiednie sekwencje, genu CS zrekombinowanego wirusa *vaccinia*. Genom tego wirusa stanowi dwuniciowy DNA liczący aż 187 kb, replikujący się w cytoplazmie zainfekowanych komórek. Ze względu na utrudnione manipulowanie *in vitro* tak dużymi cząsteczkami DNA, obce geny wprowadza się do nich w drodze homologicznej rekombinacji *in vivo*. Wydajność tego procesu jest wprawdzie mała, ale m.in. dzięki takim właśnie rozmiarom genomu, wirus akceptuje inserty liczące nawet 25 kb. Na uwagę zasługuje również fakt, że w przeciwieństwie do wielu innych wektorów komórek eukariotycznych, insercja i ekspresja obcych genów w wirusie *vaccinia* nie zaburza jego infekcyjności.

Pod kierunkiem Bernarda Mossa (NIAID) skonstruowano wirusa *vaccinia* przenoszącego najwcześniej sklonowany gen CS zarodźca *P. knowlesi* [21]. Komórki zainfekowane wirusem syntetyzowały białko CS specyficznie reagujące z mAb przeciwko powtarzalnemu epitopowi antygeny CS. Ponadto króliki zainfekowane zrekombinowanym wirusem produkowały przeciwciała, wiążące się specyficznie ze sporozoitami. Teraz prowadzone są analogiczne prace z antygenami CS *P. falciparum* i *P. vivax*. Ze względu na niską cenę, łatwość produkcji i podawania oraz dużą stabilność, szczepionka taka wydaje się szczególnie predestynowana do masowego użycia w krajach rozwijających się. Zgodnie jednak z decyzjami Światowej Organizacji Zdrowia, stosowanie wirusa *vaccinia* na wielką skalę musi zostać poprzedzone dodatkowymi badaniami. Niezbędne jest opracowanie testów laboratoryjnych *in vivo* i *in vitro*, które pozwoliłyby na jednoznaczne określenie stopnia wirulentności rekombinowanych wirusów *vaccinia* jak i ich skuteczności w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej. Warto również zaznaczyć, że wirus *vaccinia* nie jest jedynym czy też najlepszym wektorem dla każdego przypadku. Zastąpienie go innymi dużymi DNA wirusami lub bakteriami może mieć nawet przewagę w pewnych sytuacjach.

ANTYGENY STADIÓW ERYTROCYTALNYCH

W przeciwieństwie do sporozoitów, mających na swej powierzchni zasadniczo jeden rodzaj antygeny, merozoity mają ich wiele. Ale tylko niektóre z nich mogą mieć znaczenie ochronne dla organizmu żywiciela jako składniki szczepionki. Wśród nich szczególnie istotne są białka specyficznie oddziałujące z błonami erytrocytów. Inwazja komórek gospodarza jest krytycznym momentem cyklu życiowego zarodźca. Wnikanie tego pasożyta do komórek nie odbywa się przez konwencjonalną endocytozę.

W procesie tym zaangażowane są białka zarodźca biorące udział nie tylko w rozpoznawaniu komórek żywiciela i wiązaniu się z ich powierzchnią ale również uczestniczące w deformacji błon tych komórek, prowadzącej w efekcie do tworzenia się endocytotycznych wakuoli [1].

Erytrocytalnymi receptorami dla merozoitów *P. falciparum* są m.in. glikofory A i B [18]. Inwazję *in vitro* erytrocytów przez merozoity skutecznie hamuje szereg czynników takich, jak genetycznie uwarunkowany brak glikoforyny A w błonie erytrocytów, specyficzne względem tego białka przeciwciała czy też roztwór glikoforyny. Zidentyfikowano dwa białka błonowe merozoitów wiążące się specyficznie z glikoforyną [19].

GBP-130 (od ang. glycophorin binding protein) o c.c.z. 130-135 kd ma jedenaście tandemowo powtórzonych pięćdziesięcio-aminokwasowych jednostek peptydowych (tab. 1) [13]. Powtarzające się jednostki pozostają niezmiennie w obrębie cząsteczki antygeny, jak i między białkami pochodzącymi z różnych szczepów. Rejon powtórzeń stanowi część GBP-130 wiążącą glikoforynę i jest jedynym spośród analogicznych struktur innych białek zarodźca, którego funkcja jest naprawdę znana. Stwierdzono, że potrzeba minimum czterech pięćdziesięcio-aminokwasowych jednostek na przyłączenie się cząsteczki akceptora do glikoforynowej matrycy. Spośród innych cech białka GBP-130 na uwagę zasługuje jego duża termostabilność i łatwość uwalniania się z błony merozoitów. Natomiast o potencjalnych jego możliwościach przeciwdziałania malarii świadczy fakt, że surowica królików immunizowanych fuzyjnym polipeptydem o 4,5 powtórzeniach hamowała inwazję erytrocytów *in vitro*.

Drugim z poznanych receptorów glikoforyny jest białko GBP-155 o c.c.z. 155 kd. Najprawdopodobniej jest ono identyczne z Pf155 [23] oraz antygenem RESA (od ang. ring-infected erythrocyte surface antigen) [3], zidentyfikowanymi i badanymi niezależnie w dwóch innych laboratoriach. Przeciwciała względem Pf155 wydajnie hamują reinwazję erytrocytów *in vitro* [24]. Stwierdzono też wyraźną korelację między mianem przeciwciał względem Pf155 a poziomem nabytej odporności przeciw *P. falciparum* u ludzi z terenów endemicznej malarii. Białko Pf155 ma dwa silnie immunogenne bloki powtarzalnych sekwencji aminokwasowych o strukturze niezależnej od rodzaju szczepu *P. falciparum* (tab. 1).

Pf155 należy również do grupy antygenów zarodźca obecnych w błonie zainfekowanych erytrocytów, chociaż nie jest eksponowany na ich powierzchni. W tym konkretnym przypadku jest ono wbudowywane w błonę podczas inwazji krwinek przez merozoity. Antygenowa zmiana błon erytrocytów powoduje, że mogą one specyficznie wiązać odpornościowe przeciwciała, powodując na przykład ograniczenie dostępu składników odżywczych dla wewnątrzkomórkowych form pasożyta lub też ułatwiając usuwanie z krwioobiegu tych erytrocytów przez komórki śledziony. Poza Pf155 znamy pięć innych białek zarodźca związanych z błoną zainfekowanych erytrocytów o c.c.z. 240 kd [10], 80-95 kd [12], 55 kd, 45 kd, 35 kd i 20 kd [22], ale jedynie o pierwszym z nich wiadomo, że jest przynajmniej w części eksponowane na powierzchni krwinki.

Surowica większości ludzi zamieszkujących tereny endemicznego występowania malarii ma wysokie miano przeciwciał względem błonowego glikoproteidu schizontów i merozoitów, o c.c.z. wahającym się w zależności od szczepu *P. falciparum* od 190 do 200 kd [11]. Został on opisany niezależnie przez kilka laboratoriów, stąd w literaturze znany jest jako p190, gp195 lub też antygen PSA (od ang. polymorphic schizont antigen). Podczas dojrzewania schizontów i uwalniania merozoitów z zainfekowanych erytrocytów, białko to podlega intensywnym przemianom proteolitycznym prowadzącym do powstania kilku krótszych polipeptydów, również zlokalizowanych w błonie merozoitów. Proces ten zbadano szczegółowo u szczepu Camp [14]. Przypuszcza się, że pierwszy odcinany jest z końca C antygenu glikozylowany polipeptyd o c.c.z. 45 kd. W dalszej kolejności pojawiają się, poczynając również od tego końca, polipeptydy o 45 kd, 20-30 kd i 83 kd. Ten ostatni w badanym szczepie jest procesowany dalej do produktu o 67 kd.

Białko p190 ma przynajmniej cztery immunogenne rejony epitopów, z których trzy zlokalizowane są w jego części stanowiącej jednostkę 83 kd. Rejon leżący najbliżej końca N ma powtarzalną strukturę różną u poszczególnych szczepów. Podany w tabeli 1 przykład tych różnic jest jednak najbardziej drastyczny i w pozostałych znanych przypadkach organizacja rejonu powtarzalnego jest bardziej zbliżona do obserwowanej w szczepie Wellcome. Pozostała część białka jest względnie stała, wykazując tylko 1,2% zmian na poziomie aminokwasowym. Tym prawdopodobnie należy tłumaczyć zdolność przeciwciał uzyskanych względem p190 z jednego szczepu, w reagowaniu z p190 pochodzącym z innych. W tym kontekście wydaje się interesujący również fakt, że pomimo wszystkich różnic, u każdego z przebadanych szczepów trójpeptydowa jednostka powtarzalna ma niezmiennie postać Ser-X-X [15].

Duża różnorodność antygenów zarodźca, z których wybrano tylko kilka najlepiej zbadanych, stanowi poważny problem dla pracujących nad skuteczną i tanią szczepionką. Niemniej jednak wspomniana wcześniej ogromna „pojemność” wirusów *vaccinia* stwarza możliwość jednoczesnej ekspresji wielu rodzajów immunogennych peptydów różnych stadiów rozwojowych i gatunków zarodźca. Możliwe jest także stworzenie poliwalencyjnej szczepionki poprzez dodatkową insercję genów antygenów szczególnie tych organizmów chorobotwórczych, których destrukcyjny wpływ na organizm człowieka jest stymulowany przez malarię. Mogłoby to dotyczyć np. antygenów wirusa Epsteina-Barra. Zakażenie zarodźcem redukuje poziom komórek pomocniczych T (T4) względem komórek supresorowych T (T8), umożliwiając niekontrolowaną proliferację limfocytów B zainfekowanych wirusem [25] i tym samym zwiększając szansę aktywacji onkogeny c-myc i chłoniaka Burkitta.

Poza antygenami zarodźca istotnymi dla profilaktyki immunologicznej człowieka, poznano wiele takich, których znaczna immunogenność wydaje się sprzyjać przeżywaniu pasożytów. Większość z nich ma również wielo-

krotnie i tandemowo powtórzone jednostki peptydowe, co jest prawdopodobnie przyczyną wysokiej immunogenności tych białek. Jednocześnie może też być przyczyną faktu, że nabycie odporności na malarię w rejonach jej endemicznego występowania następuje dopiero po kilku latach intensywnej ekspozycji względem pasożyta. Najprawdopodobniej wiele z tych antygenów prowadzi do „przeladowania” i „zmęczenia” systemu immunologicznego lub też swoistego ukrycia bardziej istotnych dla przeżycia zarodźca rejonów nawet tej samej cząsteczki białka. Sądzi się, że temu celowi może również służyć obserwowany u wielu antygenów polimorfizm, najczęściej obejmujący powtarzalne jednostki peptydowe. Dotyczy to, na przykład antygeny S (od ang. soluble), uwalnianego przez merozoity do ich otoczenia (tab. 1) [4].

UWAGI KOŃCOWE

Wykonane dotychczas prace pozwoliły na zidentyfikowanie, sklonowanie i zbadanie struktury większości głównych antygenów wolno żyjących stadiów zarodźca. Wiadomo które z nich mogą stymulować odporność organizmu na zakażenie. Problem wydajnego źródła tych białek dla immunizacji człowieka w skali masowej został również zasadniczo rozwiązany. Nie wiadoma jest natomiast efektywność przyszłej szczepionki. Dotychczasowe osiągnięcia są obiecujące ale jeszcze nie w pełni zadowalające. Trudności pojawiające się w badaniach laboratoryjnych są niejako odzwierciedleniem tego co obserwuje się w naturze. Do osiągnięcia pełnej odporności potrzeba wielu ataków malarii i to przez okres kilku lat, a sama odporność może być częściowo specyficzna względem jednego tylko szczepu pasożyta. Ponadto, w krwi połowy ludzi o nabytej odporności z terenów endemicznej malarii, zawsze można wykryć pewną liczbę pasożytów, których obecność może być właśnie warunkiem zapobieżenia klinicznie istotnym infekcjom.

Bardzo prawdopodobne jest, że w momencie dotarcia artykułu do rąk czytelnika przynajmniej jedna wersja szczepionki oparta na antygenie CS będzie już oczekiwać na dopuszczenie do produkcji i stosowania w profilaktyce medycznej. Wskazują na to, zarówno szybkość prowadzonych badań, jak i waga problemu. Sledząc jednak minione lata zmagania człowieka z malarią nie można nie mieć wątpliwości czy w tym przypadku sama szczepionka będzie w stanie rozwiązać raz na zawsze problem, tak jak to się udało w przypadku kilku innych chorób. Obserwowana zmienność struktury niektórych antygenów w obrębie gatunku, a nawet poszczególnych linii komórkowych w obrębie szczepu, powoduje, że nie można wykluczyć zajścia takich zmian również w odpowiedzi na stymulację sekrecji dużych ilości przeciwciał odpornościowych. Pewne natomiast jest, że możliwości kompleksowego podejścia do sprawy eliminacji malarii w skali globalnej, jakie stwarza dostęp do szczepionki, stawiają nas w sytuacji jakościowo zupełnie niepodobnej do tej z końca lat pięćdziesiątych.

LITERATURA

1. Aikawa M., Miller L. H., Johnson J., Rabbege J. — *Erythrocyte entry by malaria parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite.* J. Cell Biol. 77: 72, 1978.
2. Arnot D. E., Barnwell J. W., Tam J. P., Nussenzweig V., Nussenzweig R. S., Enea V. — *Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope.* Science 230: 815-818, 1985.
3. Coppel R. L., Cowman A. F., Anders R. F., Bianco A. E., Saint R. B., Lingelbach K. R., Kemp D. J., Brown G. V. — *Immune sera recognize on erythrocytes a Plasmodium falciparum antigen composed of repeated amino acid sequences.* Nature 310: 789-792, 1984.
4. Cowman A. F., Saint R. B., Coppel R. L., Brown G. V., Anders R. F., Kemp D. J. — *Conserved sequences flank variable tandem repeats in two S-antigen genes of Plasmodium falciparum.* Cell 40: 775-783, 1985.
5. Cochrane A. H., Santoro F., Nussenzweig V., Gwadz R. W., Nussenzweig R. S. — *Monoclonal antibodies identify the protective antigens of sporozoites of Plasmodium knowlesi.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5651-5655, 1982.
6. Dame J. B., Williams J. L., McCutchan T. F., Weber J. L., Wirtz R. A., Hockmeyer W. T., Maloy W. L., Haynes J. D., Schneider I., Roberts D., Sanders G. S., Reddy E. P., Diggs C. L., Miller L. H. — *Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.* Science 225: 593-599, 1984.
7. Enea V., Arnot D., Schmidt E. C., Cochrane A., Gwadz R., Nussenzweig R. S. — *Circumsporozoite gene of Plasmodium cynomogli (Gombak): cDNA cloning and expression of the repetitive circumsporozoite epitope.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7520-7524, 1984.
8. Enea V., Ellis J., Zavala F., Arnot D. E., Asavanich A., Masuda A., Quakyi I., Nussenzweig R. S. — *DNA cloning of Plasmodium falciparum circumsporozoite gene: amino acid sequence of repetitive epitope.* Science 225: 628-630, 1984.
9. Godson G. N., Ellis J., Svec P., Schlesinger D. H., Nussenzweig V. — *Identification and chemical synthesis of a tandemly repeated immunogenic region of Plasmodium knowlesi circumsporozoite protein.* Nature 305: 29-33, 1983.
10. Gruenberg J., Sherman I. W. — *Isolation and characterization of the plasma membrane of human erythrocytes infected with the malarial parasite Plasmodium falciparum.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1087-1091, 1983.
11. Holder A. A., Lockyer M. J., Odink K. G., Sandhu J. S., Riveros-Moreno V., Nicholls S. C., Hillman Y., Davey L. S., Tizard M. L. V., Schwarz R. T., Freeman R. R. — *Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of Plasmodium falciparum merozoites.* Nature 317: 270-273, 1985.
12. Kilejin A. — *Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4650-4653, 1979.
13. Kochan J., Perkins M., Ravetch J. V. — *A tandemly repeated sequence determines the binding domain for an erythrocyte receptor binding protein of P. falciparum.* Cell 44: 689-696, 1986.
14. Lyon J. A., Geller R. H., Haynes J. D., Chulay J. D., Weber J. L. — *Epitope map and processing scheme for the 195,000-dalton surface glycoprotein of Plasmodium falciparum merozoites deduced from cloned overlapping segments of the gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2989-2993, 1986.
15. Mackay M., Goman M., Bone N., Hyde J. E., Scaife J., Certa U., Stunnenberg H., Bujard H. — *Polymorphism of the precursor for the major surface antigens of Plasmodium falciparum merozoites: studies at the genetic level.* EMBO J. 4: 3823-3829, 1985.

16. Nussenzweig R. S., Nussenzweig V. — *Immunoprophylaxis of malaria characterization of a protective surface antigen*. NYU Physician 40: 2-19, 1984.
17. Nussenzweig V., Nussenzweig R. S. — *Circumsporozoite proteins of malaria parasites*. Cell 42: 401-403, 1985.
18. Perkins M. E. — *Binding of glycophorins to P. falciparum merozoites*. Mol. Biochem. Parasitol. 10: 67-78, 1984.
19. Perkins M. E. — *Surface proteins of Plasmodium falciparum merozoites binding to the erythrocyte receptor, glycophorin*. J. Exp. Med. 160: 788-798, 1984.
20. Santoro F., Cochrane A. H., Nussenzweig V., Nardin E. H., Nussenzweig R. S., Gwadz R. W., Ferreira A. — *Structural similarities among the protective antigens of sporozoites from different species of malaria parasites*. J. Biol. Chem. 258: 3341-3345, 1983.
21. Smith G. L., Godson G. N., Nussenzweig V., Nussenzweig R. S., Barnwell J., Moss B. — *Plasmodium knowlesi sporozoite antigen: expression by infectious recombinant vaccinia virus*. Science 224: 397-399, 1984.
22. Stanley H. A., Reese R. T. — *Plasmodium falciparum polypeptides associated with the infected erythrocyte plasma membrane*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6093-6097, 1986.
23. Udomsangpetch R., Lundgren K., Berzins K., Wahlin B., Perlmann H., Troye-Blomberg M., Carlsson J., Wahlgren M., Perlmann P., Bjorkmann A. — *Human monoclonal antibodies to Pf155, a major antigen of malaria parasite Plasmodium falciparum*. Science 231: 57-59, 1986.
24. Wahlin B., Wahlgren M., Perlmann H., Berzins K., Bjorkmann A., Patarroyo M. E., Perlmann P. — *Human antibodies to a M_r 155,000 Plasmodium falciparum antigen efficiently inhibit merozoite invasion*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7912-7916, 1984.
25. Whittle H. C., Brown J., Marsh K., Greenwood B. M., Seidelin P., Tighe H., Wedderburn L. — *T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B cells is lost during P. falciparum malaria*. Nature 312: 449-450, 1984.
26. Zavala F., Tam J. P., Hollingdale M. R., Cochrane A. H., Quakyi I., Nussenzweig R. S., Nussenzweig V. — *Rationale for development of a sythetic vaccine against Plasmodium falciparum malaria*. Science 228: 1436-1440, 1985.
27. Young J. F., Hockmeyer W. T., Gross M., Ballou W. R., Wirtz R. A., Trosper J. H., Beaudoin R. L., Hollingdale M. R., Miller L. H., Diggs C. L., Rosenberg M. — *Expression of Plasmodium falciparum circumsporozoite proteins in Escherichia coli for potential use in human malaria vaccine*. Science 228: 958-962, 1985.

MALGORZATA JUNGEMAN

RYSZARD SŁOMSKI

Zakład Genetyki Człowieka PAN

Poznań

CHOROBY DZIEDZICZNE — DIAGNOSTYKA METODĄ POLIMORFIZMU FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH DNA I SOND MOLEKULARNYCH

Genom człowieka zawiera ok. 3×10^9 par zasad, z czego jedynie 10% stanowią sekwencje kodujące i regulatorowe. Liczba genów, rozproszonych lub zgrupowanych w rodziny, wynosi $2-5 \times 10^4$, co oznacza, że oprócz poznanych i nie poznanych dotąd genów genom człowieka zawiera olbrzymią liczbę sekwencji o nieznaanej funkcji. Badania DNA wykonane w ostatnich latach wykazały znaczną liczbę wariantów sekwencji DNA u człowieka, obejmujących zarówno kodujące, jak i wtrącone sekwencje. Zmiany w sekwencjach DNA, prowadzące do zmian sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne, pozwoliły na lokalizację genów na chromosomach i identyfikację genów odpowiedzialnych za występowanie chorób genetycznych [22].

Do niedawna diagnostyka chorób genetycznie uwarunkowanych opierała się wyłącznie na oznaczaniu biochemicznych defektów stanowiących podłoże danej choroby. Diagnostyka prenatalna była możliwa jedynie w przypadku, gdy ekspresja patologicznego genu występowała w fibroblastach płodowych. Umożliwiało to rozpoznanie zaledwie 2% ogólnej liczby chorób dziecięcych się według praw Mendla.

Dzięki pionierskim pracom dotyczącym hemoglobinopatii, obecnie można przeprowadzić diagnostykę defektów genetycznych na poziomie DNA. Ma to ogromne znaczenie dla diagnostyki prenatalnej chorób, których leczenie nie jest jeszcze możliwe.

Defekt genetyczny może być spowodowany mutacją punktową, polegającą na zamianie jednego nukleotydu w łańcuchu DNA. Często taka substytucja występuje w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez enzym restrykcyjny. Miejsce takie nie jest wtedy rozpoznawane przez enzym, co powoduje zmianę wielkości fragmentów restrykcyjnych po trawieniu DNA. W wyniku mutacji może pojawić się dodatkowe miejsce restrykcji, co również wywoła różnice w długości odpowiednich fragmentów restrykcyjnych.

Niektóre defekty genetyczne są spowodowane mutacjami różniącymi się u poszczególnych rodzin z daną chorobą i nie wykrywalnymi drogą bezpośredniej analizy restrykcyjnej. W takich przypadkach do celów diagno-

stycznych wykorzystuje się polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA, wynikający nie z samego defektu, lecz z występującej w populacji naturalnej zmienności. Wykonując wstępne badania wśród rodzin można ustalić wielkość fragmentów restrykcyjnych, w których występuje prawidłowy lub zmutowany gen, a następnie rozpoznawać odpowiednie homozygoty i heterozygoty recesywne. Szczególnie istotna jest możliwość wykrywania nosicieli chorób, co w oparciu o klasyczne metody cytogenetyki lub oznaczania aktywności enzymów w ogóle nie mogło być wykonane.

Pierwszym etapem w badaniach diagnostycznych jest przygotowanie wysokocząsteczkowego DNA, który najczęściej uzyskuje się z ok. 10-40 ml krwi obwodowej, z wydajnością 10-40 µg/ml krwi. Innym, teoretycznie nieograniczonym, źródłem DNA są hodowle komórkowe fibroblastów skóry lub komórek limfoblastoidalnych krwi. Dla celów diagnostyki prenatalnej prowadzi się również hodowle komórek płynu owodniowego, uzyskiwane metodą amniocentezy. Wadą wszystkich hodowli jest dość długi czas (kilka tygodni) niezbędny do uzyskania znacznej liczby komórek i ilości DNA. Ostatnio i ten etap udało się w znacznym stopniu uprościć dzięki opracowaniu enzymatycznej amplifikacji wybranych, kilkudziesięcionukleotydowych sekwencji DNA. Metoda ta wymaga zastosowania syntetycznych oligonukleotydów inicjujących syntezę komplementarnej nici DNA oraz fragmentu Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* [34]. Dzięki tej metodzie można otrzymać niezbędną do celów diagnostycznych ilość DNA przy użyciu zaledwie 1 µg genomowego DNA uzyskanego na przykład z limfocytów krwi obwodowej pacjenta. Metoda amplifikacji genu została dotychczas zastosowana w diagnostyce anemii sierpowatej. Dzięki pominięciu etapu hodowli komórkowej czas potrzebny do ustalenia diagnozy uległ skróceniu z kilku tygodni do 10 godzin.

Podstawową techniką stosowaną w diagnostyce chorób genetycznie uwarunkowanych jest hybrydyzacja badanego DNA z radioaktywnymi sondami molekularnymi. W zależności od badanej choroby stosuje się różnego rodzaju sondy. Często są to syntetyczne odcinki DNA (19-nukleotydowe oligomery) służące do wykrywania pojedynczych substytucji nukleotydowych w badanych sekwencjach. Analizę prowadzi się w odpowiednio dobranych warunkach, w których radioaktywna sonda hybryduje wyłącznie z komplementarną sekwencją, a nie hybryduje z sekwencjami wykazującymi różnice jego nukleotydu. W diagnostyce sondy takie stosuje się tylko w przypadku chorób wywołanych tranzycją jednej zasady w obrębie znanej sekwencji genu.

Innym rodzajem sond molekularnych stosowanych w diagnostyce medycznej są syntetyczne geny zawierające tylko sekwencje kodujące oraz naturalne geny zawierające wszystkie sekwencje (eksony, introny, regulacyjne) wchodzące w skład danego genu.

W diagnostyce medycznej stosuje się również sondy cDNA, zawierające wyłącznie sekwencje kodujące. Pewnym ograniczeniem w zastosowaniu sond cDNA jest ich skomplikowane przygotowanie, które obejmuje immunoprecypitację polisomów syntetyzujących określone białko, izolację polisomalnego mRNA oraz jego odwrotną transkrypcję.

Sondami molekularnymi mogą być również odcinki chromosomalnego DNA, stosowane w przypadkach gdy molekularne podłoże choroby nie jest znane, natomiast określono region chromosomu, w którym pojawiła się mutacja.

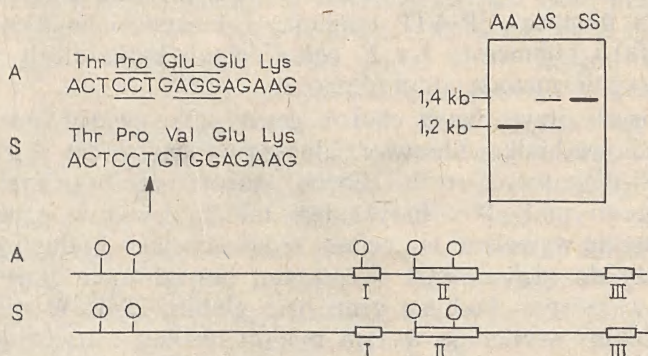
Przed hybrydyzacją z jedną z wyżej wymienionych sond genomowy DNA poddawany jest trawieniu enzymem restrykcyjnym i powstałe fragmenty rozdziela się elektroforetycznie w żelu agarozowym, a następnie przenosi na filtr nitrocelulozowy metodą Southerna [35]. DNA unieruchomiony na filtrze poddawany jest hybrydyzacji z radioaktywną sondą, znakowaną najczęściej za pomocą ^{32}P -ATP (gamma) i kinazy polinukleotydowej lub ^{32}P -NTP (alfa) i polimerazy I z *E. coli*. Odcinki, które uległy hybrydyzacji można uwidocznic metodą autoradiografii.

W niektórych przypadkach chorób genetycznie uwarunkowanych znane jest nieprawidłowe białko odpowiedzialne za występowanie objawów patologicznych. W diagnostyce tych chorób stosuje się bezpośrednią analizę genu kodującego to białko. Przykładem takich defektów genetycznych są hemoglobinopatie wywołane mutacjami w sekwencjach kodujących łańcuchy globin. Należy do nich anemia sierpowata, powodowana pojedynczą tranzycją A→T w szóstym kodonie genu beta globiny [26]. W nieprawidłowej cząsteczce globiny występuje w tym miejscu walina zamiast kwasu glutaminowego. Mutacja powodująca anemię sierpowatą powoduje jednocześnie wyłączenie miejsc restrykcyjnych rozpoznawanych przez enzymy Mst II i Dde I. Stąd po trawieniu tymi enzymami genomowego DNA i hybrydyzacji z odpowiednią sondą zaobserwować można różnice w długości (wielkości) fragmentów restrykcyjnych prawidłowego i zmutowanego DNA. Jako sondy używa się fragmentu Alu I końca 5' genu beta globiny [40]. Przy zastosowaniu enzymu Mst II u homozygot prawidłowych występuje hybrydyzacja sondy z fragmentem o wielkości 1140 par zasad, u homozygot recesywnych (zmutowanych) z fragmentem 1340 par zasad, a u heterozygot (nosicieli patologicznego genu) obecne są obydwa fragmenty (rys. 1). Również po trawieniu enzymem Dde I zaobserwować można charakterystyczne dla homo- i heterozygot fragmenty.

Mutacja w genie beta globiny może być również wykryta metodą hybrydyzacji badanego DNA z syntetycznymi nonadekamerami nukleotydów. Stosuje się wtedy dwa oligomery — jeden komplementarny do sekwencji prawidłowej a drugi do zmutowanej [6]. Genomowy DNA musi zostać poddany hybrydyzacji z obiema sondami. DNA homozygot tworzy odpowiednio trwałe hybrydy tylko z jednym rodzajem sondy, natomiast DNA heterozygot — nieco mniej trwałe hybrydy z oboma oligomerami (rys. 2).

Odrębną grupę hemoglobinopatii stanowią talasemie, polegające na zaburzeniach w syntezie łańcuchów globiny. Najbardziej rozpowszechniona wśród ludności zamieszkującej w rejonie Morza Śródziemnego jest tzw. beta talasemia spowodowana pojedynczą substytucją G→A w obrębie pierwszego intronu w genie beta globiny. W wyniku tej mutacji powstający pre-mRNA jest niestabilny *in vivo*. Nie występuje w tym przypadku zmiana sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny, stąd wykrycie tej mutacji nie jest możliwe drogą analizy restrykcyjnej [38].

W diagnostyce beta talasemii stosuje się metodę hybrydyzacji badanego DNA z syntetycznymi, 19-nukleotydowymi sondami: G — komplementarną do sekwencji prawidłowej oraz A — komplementarną do sekwencji zmutowanej. Hybrydyzację z odpowiednią sondą przeprowadza się po trawieniu genomowego DNA endonukleazą Bam H I. Sonda G tworzy trwały hybryd z fragmentem prawidłowego genu o wielkości 1,8 tys. par zasad, a nie tworzy hybrydu z fragmentem o tej samej wielkości, genu zmutowanego. Postępowanie metodyczne jest więc identyczne z opisanymi w przypadku

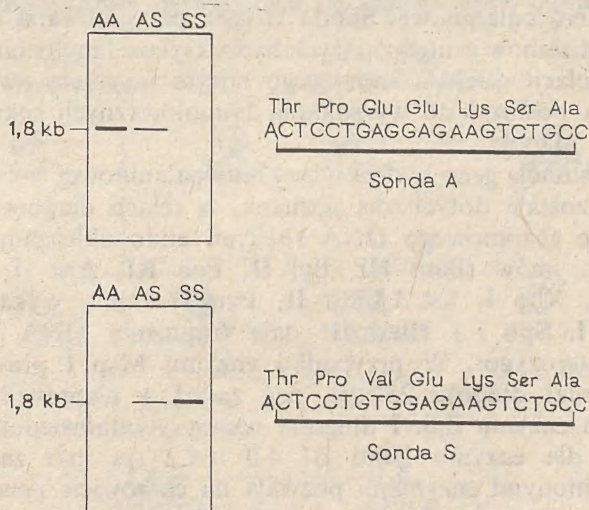


Rys. 1. Diagnostyka anemii sierpowatej oparta na zmianie miejsca restrykcji endonukleazy Mst II. W górnej części rysunku przedstawiono sekwencje nukleotydów genu β^A i β^S od kodonu 4 do 8. Sekwencję rozpoznawaną w genie β^A przez enzym Mst II podkreślono (CCTNAGG, N = G). Strzałką oznaczono substitucję A→T powodującą zmianę miejsca restrykcji. W dolnej części rysunku przedstawiono miejsca rozpoznawane przez enzym Mst II w genach β^A i β^S . Sekwencje kodujące oznaczono cyframi rzymskimi. W prawej części rysunku schematycznie przedstawiono autoradiogramy uzyskane po elektroforetycznym rozdziale DNA trawionego endonukleazą Mst II. Hybrydyzacja z sondą naturalną lub syntetyczną

anemii sierpowatej, z tą różnicą, że może być stosowane w diagnostyce prenatalnej dopiero po uprzednim badaniu rodziców i ustaleniu mutacji powodującej beta talasemię [25].

Innym defektem genetycznym badanym metodą bezpośredniej analizy genu jest niedobór alfa₁-antytrypsyny (alfa₁AT). Ten inhibitor proteaz jest syntetyzowany w wątrobie i pełni niezmiernie ważne dla organizmu funkcje, m.in. chroni włókna elastyczne tkanki płucnej przed trawieniem przez elastazę. Niedobór alfa₁AT prowadzi do uszkodzenia pęcherzyków płucnych i w rezultacie do rozedmy płuc. U 14% dzieci z tym niedoborem rozwija się marskość wątroby [9, 19]. Niedobór alfa₁AT jest chorobą genetycznie uwarunkowaną spowodowaną pojedynczą tranzycją G→A w obrębie sekwencji kodującej. W powstałym białku, w pozycji 342, zamiast kwasu glutaminowego występuje lizyna. Tranzycję tę można wykryć podobnie, jak w przypadku anemii sierpowatej i beta talasemii, stosując syntetyczne sondy 19-nukleotydowe: M — komplementarną do sekwencji prawidłowej i Z — komplementarną do sekwencji zmutowanej.

Analizę na poziomie DNA stosuje się również w diagnostyce fenyloketonurii. Fenyloketonuria jest najczęstszym, genetycznie uwarunkowanym blokiem metabolicznym, który jest spowodowany brakiem enzymu hydroksylazy fenyloalaninowej. Choroba dziedziczy się jako autosomalna cecha



Rys. 2. Diagnostyka anemii sierpowatej z zastosowaniem syntetycznych oligonukleotydów komplementarnych do β^A i β^S -DNA. W prawej części rysunku przedstawiono sekwencje syntetycznych oligonukleotydów (sonda A i S) i odpowiadające im sekwencje aminokwasów. W lewej części rysunku schematycznie przedstawiono autoradiogramy uzyskane po elektroforetycznym rozdziale DNA, trawionego endonukleazą, otrzymanego od homozygot AA i SS oraz od heterozygot AS. Górna część rysunku — hybrydyzacja z sondą A. Dolna część rysunku — hybrydyzacja z sondą S

recesywna i występuje z częstością ok. 1/10000 żywych urodzeń (nosiciele stanowią 2% populacji ogólnej) [1]. Diagnostyka prenatalna, oparta o oznaczanie aktywności tego enzymu jest w zasadzie niemożliwa, gdyż enzym ten występuje jedynie w wątrobie, a nie występuje w surowicy krwi ani w fibroblastach. Fenyloketonuria jest jedną z niewielu chorób genetycznych uwarunkowanych, w których możliwe jest skuteczne leczenie chorego po odpowiednio wczesnym rozpoznaniu choroby, i badania przesiewowe (skriningowe) u noworodków są szeroko prowadzone na świecie. W tej sytuacji celowość wprowadzenia diagnostyki prenatalnej tej choroby jest przedmiotem trwającej dyskusji. Mimo to wiele rodzin z pewnością skorzystałoby z możliwości rozpoznania choroby u płodu.

Obecnie można przeprowadzić diagnostykę fenyloketonurii na podstawie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA. U osób chorych stwierdzono występowanie genu hydroksylazy fenyloalaninowej, a więc fenyloketonuria nie jest wynikiem delecji genu, lecz zmiany w jego strukturze. Mutacja (lub mutacje) wywołująca tę chorobę nie jest jeszcze poznana. Na podstawie badań prze-

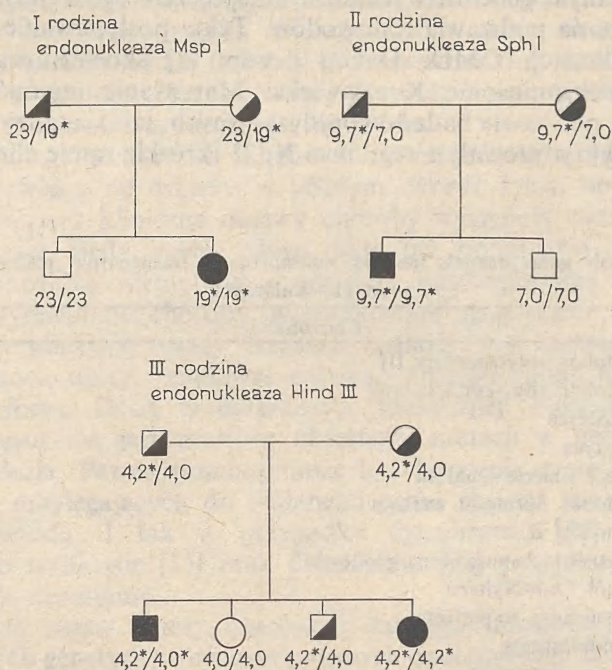
prowadzonych na całej rodzinie, w której wystąpiła fenyloketonuria można ustalić wielkość fragmentów restrykcyjnych, charakterystycznych dla zmutowanego i prawidłowego genu. Podobnie jak w przypadku innych chorób stosuje się trawienie genomowego DNA różnymi restryktazami i hybrydyzację z sondą którą w przypadku fenyloketonurii jest cDNA zawierający sekwencje kodujące hydroksylazę fenyloalaninową. Sonda została przygotowana drogą immunoprecypitacji polisomów syntetyzujących hydroksylazę fenyloalaninową z wątroby szczura, izolacji mRNA kodującego enzym i syntezy swoistego cDNA. Z kolei cDNA posłużył do wyszukania homologicznych sekwencji z biblioteki ludzkiego cDNA.

Ponieważ mutacja genu hydroksylazy fenyloalaninowej, wywołująca fenyloketonurię nie została dotychczas poznana, w celach diagnostycznych stosowano trawienie genomowego DNA różnymi endonukleazami. Zastosowano cały szereg enzymów (Bam HI, Bgl II, Eco RI, Ara II, Taq I Bcl I, Kpn I, Pst I, Xho I, Sst I, Stu II, Pvu I) zanim wykazano, że tylko enzymy Msp I, Sph I i Hind III dają fragmenty DNA różnej długości u homo- i heterozygot. W przypadku enzymu Msp I prawidłowy prążek restrykcyjny miał długość 23 tys. par zasad a nieprawidłowy — 19 tys. par zasad. Dla enzymu Sph I długości wynosiły odpowiednio 7,0 i 9,7 tys. par zasad, a dla enzymu Hind III 4,0 i 4,2 tys. par zasad. Połączona analiza wymienionymi enzymami pozwala na całkowicie pewne rozpoznanie homozygot recesywnych i heterozygot (rys. 3) [41].

W ostatnim czasie ukazały się również prace, w których metody biologii molekularnej znalazły zastosowanie w badaniach miażdżycy. W Wielkiej Brytanii hipertrójglicerydemia występuje u 10% populacji. W rzadkich przypadkach jest spowodowana mutacją genu strukturalnego (np. genu lipazy lipoproteinowej lub apolipoproteiny CII), dziedziczy się wówczas jako mendłowska cecha recesywna [31]. W większości przypadków nie stwierdza się obecności zmutowanego białka u chorych i choroba nie dziedziczy się według prostych praw mendelskich. Przypuszcza się, że choroba dziedziczy się w sposób wielogenowy, zaś geny apoprotein należy uważać za główne czynniki odpowiedzialne za powszechne formy hipertrójglicerydemii. Geny apoprotein kodują apoA-1 i apoA-2, tj. główne peptydy lipoprotein o dużej gęstości (HDL). Stosując enzym restrykcyjny Sst I stwierdzono polimorfizm fragmentów restrykcyjnych w pobliżu końca 5' genu apoA-1 u około 5% przypadkowo dobranych osób i u ponad 40% chorych z trójglicerydemią [18, 31]. Mechanizm tego polimorfizmu może wynikać z mutacji punktowej tworzącej nowe miejsca restrykcji, charakterystyczne dla enzymu Sst I, lub delecji lub insercji DNA, powodującej zmianę długości fragmentu restrykcyjnego [17, 31].

Przedstawione przykłady wykorzystania badań nad polimorfizmem fragmentów restrykcyjnych DNA w diagnostyce prenatalnej sygnalizują całkowicie nowe podejście naukowe do problemu rozpoznawania chorób uwarunkowanych genetycznie. Metoda ta jest obecnie najdokładniejsza, gdyż bezpośrednio bada sam defekt genetyczny. Dla wielu chorób genetycznie uwarunkowanych, których diagnostyka prenatalna była znana, opracowuje się nowe metody, wykorzystując polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA, w przypadku

innych chorób uwarunkowanych genetycznie jest ona jedyną szansą ich prenatalnego rozpoznania. Prowadzone są badania nad podłożem genetycznym i możliwością prenatalnego rozpoznawania wielu chorób niezmiernie rozpowszechnionych w populacji ogólnej, np. w cukrzycy stwierdzono polimorfizm fragmentów restrykcyjnych u osobników z cukrzycą typu MODY, uwarunkowaną jednogennowo, dziedziczącą się autosomalnie dominująco [32, 33].



Rys. 3. Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA w rodzinach, w których wystąpiła fenyloketonuria. Analizę przeprowadzono przy użyciu enzymów restrykcyjnych: Msp I (I rodzina) Sph I (II rodzina), Hind III (III rodzina). Pod każdym symbolem zaznaczono wielkość prążków hybrydacyjnych (w tys. par zasad). Gwiazdka oznaczono zmutowany odcinek DNA

Osteogenesis imperfecta, zarówno postać letalna, dziedzicząca się autosomalnie recesywnie, jak i łagodniejsza, dziedzicząca się autosomalnie dominująco, mogą być rozpoznawane prenatalnie na podstawie przedstawionych metod badawczych [5, 29, 37].

Na tej samej zasadzie możliwe jest również rozpoznanie retinoblastoma, a także identyfikacja zdrowych klinicznie nosicieli patologicznego genu, co jest niezmiernie ważne ze względu na fakt niepełnej penetracji genu retinoblastoma i istnienie fenokopii [4].

Mimo, że w ostatnich latach zaobserwowano znaczny postęp w mapowaniu ludzkich genów, nie uzyskano jednak funkcjonalnie lub strukturalnie zmienionych białek, które mogłyby reprezentować pierwotny produkt genu w przypadku takich chorób jak dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a (DMD), mukowiscydoza (ang. cystic fibrosis, CF) czy płasawica Huntingtona

(HD). Nieznajomość zmian w białkach znacznie utrudnia poznanie genów odpowiedzialnych za występowanie tych chorób i badania obecnie przeprowadzane zmierzają do precyzyjnego określenia loci genów na chromosomach. Udało się to już dla większości chorób sprzężonych z płcią i kilku defektów autosomalnych. Strategia badań dla celów diagnostyki prenatalnej, jak i wykrywania nosicieli polega na analizie specyficznych markerów sąsiadujących z badanym genem i wykazujących sprzężenie genetyczne z badanym genem, ustalone na podstawie rodowodów. Takie postępowanie zastosowano właśnie w badaniach DMD. Davies i wsp. [8] skonstruowali bibliotekę klonów DNA chromosomu X człowieka. Mapowanie regionów odbywało się zarówno na podstawie badań hybrydizacyjnych, jak i analizy rodowodów. Klony, które hybrydizowały z regionem Xp21 (krótkie ramię chromosomu X)

Tabela 1

Diagnostyka chorób genetycznych metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA i sond molekularnych

	Choroba	Literatura
I *	niedobór antytrombiny III	[30]
	niedobór alfa ₁ -antytrypsyny	[19]
	miażdżycza	[18]
	cukrzyca	[14]
	zespół Ehlersa-Danlosa	[29]
	niedobór hormonu wzrostu	[27]
	hemofilia B	[12]
	przetrwiała hemoglobina płodowa	[10]
	zespół Lesh-Nyhana	[42]
	osteogenesis imperfecta	[5]
	retinoblastoma	[4]
II *	anemia sierpowata	[11]
	talasemia	[21]
	miażdżycza	[16]
	cukrzyca (typ II)	[32, 33]
	niedobór hormonu wzrostu typ I	[28]
	hipertrójglicerydemia	[31]
	anemia sierpowata	[2]
	zespół Lesh-Nyhana	[34, 42]
	osteogenesis imperfecta	[37]
III *	fenyloketonuria	[41]
	talasemia	[2]
	niedorozwój umysłowy (kruchliwy chromosom X)	[3]
	pląsawica Huntingtona	[13]
	zespół Menkesa	[39]
	dystrofia mięśniowa Beckera	[20]
	dystrofia mięśniowa Duchenne'a	[8]

*I — Choroby, w których przy użyciu sond molekularnych analizuje się bezpośrednio defekty struktury genów. II — Choroby, w których za pomocą sond molekularnych analizuje się defekty struktury odcinków DNA znajdujących się w sąsiedztwie genów. III — Choroby, których diagnostyka opiera się na badaniu odcinków DNA sprzężonych z właściwym genem.

znalazły zastosowanie jako sondy molekularne w badaniach diagnostycznych. Jednak często nie nadają się one do identyfikacji nosicieli, ponieważ wcześniej w embriogenezie dochodzi do losowej inaktywacji chromosomów X i efektu dawki genu. Bardzo ważny jest również fakt, że ok. 30% przypadków DMD jest wynikiem nowych, spontanicznych mutacji, a zatem ich wykrycie nie jest obecnie możliwe bez zakrojonych na szeroką skalę badań prenatalnych, których przeprowadzenie jest obecnie nie realne. W rodzinach, w których wystąpiła mutacja (tylko jedno chore dziecko) badania z zastosowaniem RFLP (metody polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA) są aktualne, jednak mogą prowadzić do przerwania ciąży w przypadku prawidłowo rozwijającego się płodu.

Szczególnie należy podkreślić możliwość określenia nosicielstwa genu chorób, które rozwijają się dopiero w późnym okresie życia, np. płasawicy Huntingtona, ponieważ kliniczne objawy choroby występują około 40 roku życia, tj. w okresie kiedy osoby chore mają już potomstwo, a do tego czasu nie jest możliwa identyfikacja nosiciela patologicznego genu [13].

W tabeli 1 wymieniono choroby uwarunkowane genetycznie, w których przedstawione w niniejszej pracy badania znalazły już zastosowanie [7]. W najbliższym czasie należy oczekiwać dalszego postępu badań nad zastosowaniem polimorfizmu DNA w diagnostyce medycznej. Niestety, jak już wspomniano, często nie jest możliwe określenie mutacji w genie jeśli nie jest nią duża delecja. Pewną pomocą może być korelacja z polimorfizmem odcinków DNA przylegających do badanego genu, chociaż nie zawsze jest to skuteczna metoda. I tak w przypadku cytrulinemii [36], niedoboru białka wiążącego tyroksynę [15] oraz daltonizmu [23] poszukiwanie takich korelacji nie dało rezultatów.

W najbliższym czasie należy oczekiwać dalszego udoskonalenia metod wykrywania chorób genetycznie uwarunkowanych oraz nosicieli patologicznego genu na podstawie analizy polimorfizmu sekwencji DNA. Postęp zależy w dużej mierze od przygotowania odpowiednich sond molekularnych. Diagnostyka prenatalna może już być rutynowo wykonywana w przypadku takich chorób, jak anemia sierpowata, talasemia, niedobór alfa₁-antytrypsyny, fenylketonuria, niedobór antytrombiny III, zespół Lesh-Nyhana, niedobór hormonu wzrostu, hemofilia A i B, zespół łamliwego chromosomu X, dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a i Beckera, a dla wielu innych musi jeszcze być poprzedzona badaniami laboratoryjnymi.

LITERATURA

1. Bickel H., Guthrie R., Hamersen G. (red.) — *Neonatal screening for inborn errors of metabolism*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1980.
2. Boehm C. D., Antonarakis S. F., Phillips J. A., Stetten G., Kazazian H. H. — *Prenatal diagnosis using DNA polymorphism. Report on 95 pregnancies at risk for sickle-cell disease or beta-thalassaemia*. N. Engl. J. Med. 308: 1054-1058, 1983.
3. Camerino G., Mattei M. G., Mattei J. F., Jaye M., Mandel J. I. — *Close linkage of fragile X-mental retardation syndrome to haemophilia B and transmission through a normal male*. Nature 306: 701-704, 1983.

4. Cavenee W. K., Dryja T. P., Phillips R. A., Benedict W. F., Godbout R., Gallie B. L., Murphree A. L., Strong L. C., White R. L. — *Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma*. *Nature* 305: 779-784, 1983.
5. Chu M. L., Williams C. J., Pepe G., Hirsch J. L., Prockop D. J., Ramirez F. — *Internal deletion of collagen gene in a perinatal lethal form of osteogenesis imperfecta*. *Nature* 304: 78-80, 1983.
6. Conner B. J., Reyes A. A., Morin C., Itakura K., Teplitz R. L., Wallace R. B. — *Detection of sickle cell beta^s-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 278-282, 1983.
7. Cooper D. N., Schmidtke J. — *DNA restriction fragment length polymorphisms and heterozygosity in human genome*. *Hum. Genet.* 66: 1-16, 1984.
8. Davies K. E., Pearson P. L., Harper P. S., Murray J. M., O'Brien T. O., Sarfarazi M., Williamson R. — *Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome*. *Nucleic Acid Res.* 11: 2303-2307, 1983.
9. Fagerhal M. K., Cox D. W. — *The Pi polymorphism: Genetic, biochemical and clinical aspects of human alfa₁-antitrypsin*. W: *Advances in human genetics*. 11. Harris H., Hirschorn K. (Ured.), Plenum Press, New York-London, 1981.
10. Farguhar M., Gelinas R., Tatsis B., Murray J., Yagi M., Mueller R., Stamatoyannopoulos G. — *Restriction endonuclease mapping of gamma-delta-beta-globin region in G gamma (beta)+HPFH and a Chinese A gamma HPFH variant*. *Amer. J. Hum. Genet.* 35: 611-620, 1983.
11. Geever R. F., Wilson L. B., Nallaseth F. S., Milner P. F., Bittner M., Wilson J. T. — *Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5081-5085, 1981.
12. Gianelli F., Choo K. H., Rees D. J. G., Boyd Y., Rizza C. R., Brownlee G. G. — *Gene deletions in patients with haemophilia B and antifactor IX antibodies*. *Nature* 303: 181-182, 1983.
13. Gusells J. F., Wexler N. S., Conneally P. M., Naylor S. L., Anderson M. A., Tanzi R. E., Watkins P. C., Ottina K., Wallace M. R., Sakaguchi A. Y., Young A. B., Shoulson I., Bonilla E., Martin J. B. — *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease*. *Nature* 306: 234-239, 1983.
14. Haneda M., Chan S. J., Kwok S. C. M., Rubenstein A. H., Steiner D. F. — *Studies on mutant human insulin genes: identification and sequence analysis of a gene encoding (Ser^{B24}) insulin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6366-6370, 1983.
15. Hill M. E. E., Davies K. E., Harper P., Williamson R. — *The Mendelian inheritance of a human X chromosome-specific DNA sequences and its use in linkage studies of genetic disease*. *Hum. Genet.* 60: 222-226, 1982.
16. Karathanasis S. K., Norum R. A., Zannis V. I., Breslow J. L. — *An inherited polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene locus related to the development of atherosclerosis*. *Nature* 301: 718-720, 1983.
17. Karathanasis S. K., McPherson J., Zannis V. I., Breslow J. — *Linkage of human apolipoprotein A-I gene and c-III genes*. *Nature* 304: 371-373, 1983.
18. Karathanasis S. K., Zannis V. I., Breslow J. L. — *A DNA insertion in the apolipoprotein A-I gene of patients with premature atherosclerosis*. *Nature* 305: 323-325, 1983.
19. Kidd V. J., Wallace R. B., Itakura K., Woo S. L. C. — *Alfa₁-antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene*. *Nature* 304: 230-234, 1983.
20. Kingston H. M., Thomas N. S. T., Pearson P. E., Sarfarazi M., Harper P. S. — *Genetic linkage between Becker muscular dystrophy and a polymorphic DNA sequence on the short arm of the X chromosome*. *J. Med. Genet.* 20: 255-258, 1983.
21. Little P. E. R., Annison G., Darling S., Williamson R., Camba L., Modell B. — *Model for antenatal diagnosis of beta-thalassaemia and other monogenic disorders by*

- molecular analysis of linked DNA polymorphism.* Nature 285: 144-147, 1980.
22. McKusick V. — *Mendelian inheritance in man.* Univ. Press, Baltimore-London, 1978.
 23. Murray J. M., Davies K. E., Harper P. S., Meredith L., Mueller C. R., Williamson R. — *Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy.* Nature 300: 69-71, 1982.
 24. Nussbaum R. L., Crowder W. E., Nyhan W. L., Caskey C. T. — *A three allele restriction fragment polymorphism at the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus in man.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4035-4039, 1983.
 25. Orkin S. H., Markham A. F., Kazazian H. H. — *Direct detection of the common mediterranean beta-thalassaemia gene with synthetic DNA probes.* J. Clin. Invest. 71: 775-779, 1983.
 26. Panny S. R., Scott A. F., Smith K. D., Phillips J. A., Kazazian H. H., Talbot C. C., Boehm C. D. — *Population heterogeneity of the Hpa I restriction site associated with the beta-globin gene: Implications for prenatal diagnosis.* Amer. J. Hum. Genet. 33: 25-35, 1981.
 27. Phillips J. H., Hjelle B. L., Seeburg P. H., Zachman M. — *Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6372-6375, 1981.
 28. Phillips J. H., Parks J. S., Hjelle B. L., Herd J. E., Plotnick L. P., Migeon C. J., Seeburg P. H. — *Genetic analysis of familial isolated growth hormone deficiency type I.* J. Clin. Invest. 70: 489-495, 1982.
 29. Pope F. M., Nicholls A. C., Grosveld F. G. — *Similar alfaI(I)-like gene deletions cause types of Ehlers Danlos syndrome type II and lethal osteogenesis imperfecta.* Clin. Genet. 24: 303-308, 1983.
 30. Prochownik E. V., Antonarakis S., Bauer K. A., Rosenberg R. D., Fearon E. R., Orkin S. H. — *Molecular heterogeneity of inherited antithrombin III deficiency.* N. Engl. J. Med. 308: 1549-1552, 1983.
 31. Rees A., Shoulders C. C., Stocks J., Galton D. J., Baralle F. E. — *DNA polymorphism adjacent to human apoprotein A-I gene: relation to hypertriglyceridaemia.* Lancet 1: 444-446, 1983.
 32. Rotwein P., Chyn R., Chirgwin J., Cordell B., Goodman H. M., Permutt M. A. — *Polymorphism in the 5'-flanking region of the human insulin gene and its possible relation to type 2 diabetes.* Science 213: 1117-1120, 1981.
 33. Rotwein P. S., Chirgwin J., Province M., Knowler W. C., Perkitt D. J., Cordell B., Goodman H. M., Pettitt M. A. — *Polymorphism in the 5'-flanking region of the human insulin gene: a genetic marker for non-insulin-dependent diabetes.* N. Engl. J. Med. 308: 65-71, 1983.
 34. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. — *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science 230: 1350-1354, 1985.
 35. Southern E. M. — *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* J. Mol. Biol. 98: 503-517, 1975.
 36. Su T.-S., Bock H.-G. O., Beaudet A. L., O'Brien W. E. — *Molecular analysis of agrinosuccinate synthetase deficiency in human fibroblasts.* J. Clin. Invest. 70: 1334-1339, 1982.
 37. Tsiipouras P., Myers J., Prockop D., Ramirez F. — *Genetic analysis of the mild autosomal dominant osteogenesis imperfecta with restriction fragment length polymorphism associated with the pro alpha2(I) collagen gene.* Materials, 34th Annual Meeting of American Society of Human Genetics 182A, 1983.
 38. Westway D., Williamson R. — *An intron variant in a cloned beta⁺-thalassaemia gene.* Nucleic Acids Res. 9: 1777-1788, 1981.
 39. Wieacker P., Horn N., Pearson P., Wienker T. F., McKay E., Ropers H. H. — *Menkes kinky hair disease: a search for closely linked restriction fragment length*

- polymorphism*. Hum. Genet. 64: 139-142, 1983.
40. Wilson J. T., Milner P. F., Summer M. F., Nallaseth F. S., Fadel H. E., Reindollar R. H., McDonough P. G., Wilson L. B. — *Use of restriction endonucleases for mapping the allele for beta^s-globin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3628-3631, 1982.
 41. Woo S. L. C., Lidsky A. S., Guttler F., Chandra T., Robson K. J. H. — *Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria*. Nature 306: 151-155, 1983.
 42. Yang T. P., Patel P. I., Brennand J., Chinault A. C., Laskey C. T., — *Molecular analysis of the human HPRT locus*. Materialy, 34th Annual Meeting of American Society of Human Genetics 185A, 1983.

MARLENA LEWANDOWSKA

Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Biotechnologii
WarszawaNOWE KIERUNKI ROZWOJU BIOTECHNOLOGII
OTRZYMYWANIA ANTYBIOTYKÓW

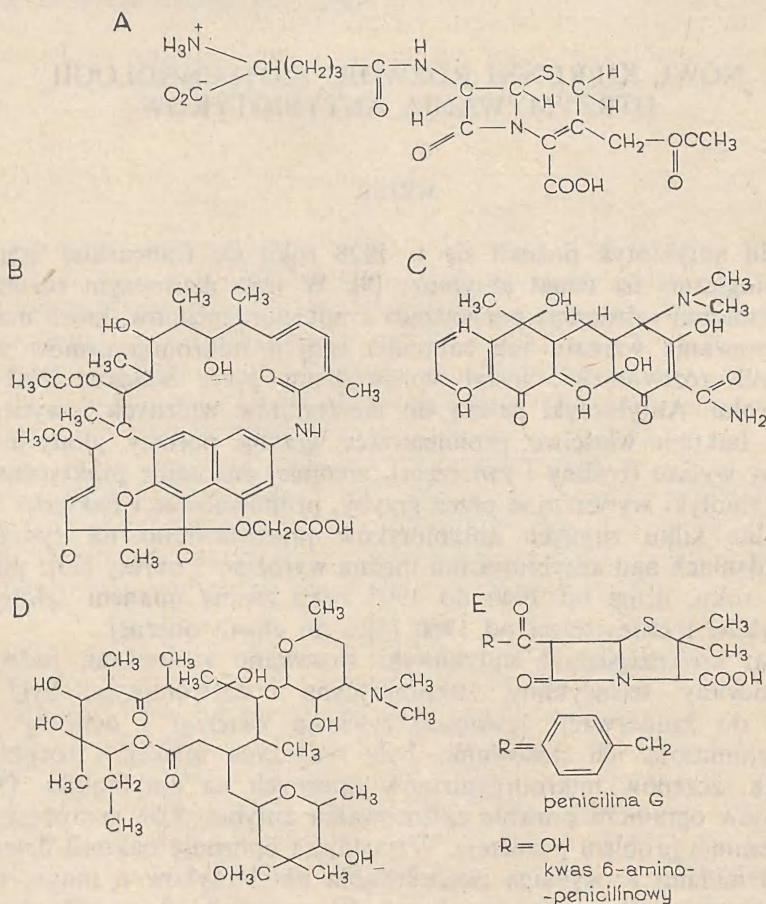
WSTĘP

Termin antybiotyk pojawił się w 1928 roku we francuskiej literaturze mikrobiologicznej na temat antybiozy [9]. W jego dzisiejszym rozumieniu, jako „chemiczna substancja pochodząca z mikroorganizmów, która ma zdolność hamowania wzrostu lub zabijania innych mikroorganizmów w rozcieńczonych roztworach”, został wprowadzony przez Selmana Waksmana w 1942 roku. Antybiotyki należą do metabolitów wtórnych i wytwarzane są przez: bakterie właściwe, promieniowce, grzyby, porosty, glony a nawet organizmy wyższe (rośliny i zwierzęta), niemniej znaczenie praktyczne mają tylko antybiotyki wytwarzane przez grzyby, promieniowce i bakterie. Wzory strukturalne kilku znanych antybiotyków przedstawiono na rysunku 1.

W badaniach nad antybiotykami można wyróżnić 3 okresy [33]: pierwszy do 1940 roku, drugi od 1940 do 1960 roku zwany mianem „złotej ery” antybiotyków i okres trzeci od 1960 roku do chwili obecnej.

Do lat sześćdziesiątych antybiotyki stosowane w leczeniu ludzi takie jak: penicyliny, tetracykliny, streptomycyna i erytromycyna były także używane do konserwacji żywności, żywienia zwierząt i ochrony roślin. To nieograniczone ich stosowanie, było przyczyną selekcji i rozprzestrzeniania się szczepów mikroorganizmów opornych na antybiotyki. Obecnie wiele krajów ogranicza prawnie zastosowania antybiotyków terapeutycznych [2, 8], niemniej problem pozostaje. Wzrastająca oporność bakterii determinowana plazmidami R wymaga poszukiwania antybiotyków o innym mechanizmie działania niż znane dotychczas. W ostatnich latach nie obserwuje się już takiej intensywności poszukiwania antybiotyków pochodzenia naturalnego, natomiast prowadzone są metodami przesiewania, badania nad antybiotykami półsyntetycznymi oraz rozwijane są badania genetyczne, biochemiczne, chemiczne i farmakologiczne nad drobnoustrojami wytwarzającymi antybiotyki w celu lepszego wykorzystania ich potencjału produkcyjnego. Wiodącą rolę odgrywają w tym Japonia, Stany Zjednoczone i Anglia. Uderzający wzrost w produkcji antybiotyków jest głównie wynikiem „zmuszania” mikroorganizmów do nadprodukcji. Proces nadprodukcji jest zjawiskiem nigdy nie występującym w szczepach otrzymanych bezpośrednio z ich naturalnych środowisk. Nadprodukcję osiągnięto przez mutację,

mutasyntezę, fuzję prostoplastów i inne typy genetycznych manipulacji lub przez bezpośrednie wpływanie na metabolizm komórkowy, np. przez kontrolę żywieniową lub dodawanie prekursorów, próbuje się również stosować metody inżynierii genetycznej [11, 13, 14, 24, 37, 40, 55], o czym będzie mowa. W tych działaniach istotna jest znajomość szlaków metabolicznych prowadzących do syntezy antybiotyku. Niestety w wielu przypadkach znajomość ta jest niewielka, co wynika z dużej złożoności tych procesów.



Rys. 1. Wzory strukturalne kilku znanych antybiotyków. A — cefalosporyna, C, B — rifamycyna, C — tetracyklina, D — erytromycyna, E — penicilina

Na przykład synteza antybiotyków tetracyklinowych znajduje się pod kontrolą około 300 genów [27]. Niemniej znajomość tylko ogólnych zasad regulacji metabolizmu, pozwala selekcjonować mutanty regulacyjne — oczywiście o korzystnych cechach z punktu widzenia technologii produkcji.

Tworzenie antybiotyku charakterystyczne jest dla idiofazy — okresu w hodowli mikroorganizmów, w którym wzrost jest zahamowany — ale komórki pozostają metabolicznie aktywne [58]. W okresie poprzedzającym

idiofazę, tzw. trofofazie, ma miejsce aktywny wzrost komórek i represja enzymów koniecznych do syntezy antybiotyków. Synteza ta wymaga udziału czynników inicjujących, którymi mogą być naturalne metabolity. Czynniki inicjujące są wbudowywane bezpośrednio do cząsteczki antybiotyku lub działają jako induktory enzymów niezbędnych do ich syntezy. Udział innych czynników, tzw. regulacyjnych w tej syntezie obejmuje między innymi:

- 1) regulację przez normalne metabolity na drodze hamowania zwrotnego, np. hamowanie syntezy penicyliny przez L-lizynę;
 - 2) hamowanie zwrotne fosfatyzacji przez nieorganiczne fosforany, np. hamowanie tworzenia streptomycyny;
 - 3) represję kataboliczną przez szybko wykorzystywane źródła węgla.
- Wiele antybiotyków i ich prekursorów hamują ich własną biosyntezę przez działanie na określone enzymy. To hamowanie może być zmniejszone poprzez mutacyjne zmiany genów kodujących te białka.

Ostatnie kierunki w produkcji antybiotyków obejmują ich pełną enzymatyczną syntezę [19], użycie techniki immobilizowanych komórek [53, 54] oraz uzyskiwanie chemicznych pochodnych i biokonwersje naturalnych związków w kierunku otrzymywania nowych półsyntetycznych antybiotyków [49, 52]. Większość ostatnio wprowadzonych antybiotyków to pochodne półsyntetyczne kilku związków naturalnych. Izolacja kwasu 6-aminopenicylinowego (6-APA) w latach pięćdziesiątych otworzyła drogę do półsyntetycznych penicylin i rozwoju półsyntetycznych antybiotyków w ogóle [45, 52]. Półsyntetyczne β -laktamy (penicyliny, cefalosporyny, cefamycyny) nadal dominują w lecznictwie, wzrasta jednak znaczenie ulepszonych pochodnych tetracyklin (minocykliny, doksycykliny) i kanamycyn (amikacyny, dibekacyny, kanendomycyny). Duże znaczenie mają również półsyntetyczne rifamycyny: rifampicyna, lincomycyna i klindamycyna.

Prowadzone są prace nad modyfikacją takich grup antybiotyków, jak makrolidy, czynniki antywirusowe, przeciwgrzybowe polieny i przeciwnowotworowe antracyliny. Ostatnio znacznie wzrosła ilość analogów związków o małej masie cząsteczkowej lub biosyntetycznych modyfikacji wcześniej znanych antybiotyków. Mimo, że obecnie okres od odkrycia antybiotyków do wprowadzenia ich do kliniki jest bardzo długi, kilka nowych aminoglikozydów znalazło dosyć szybko zastosowanie w lecznictwie (sisomicyna, fortamycyna A, tobramycyna, ribostamycyna).

PROBLEMY SELEKCJI MUTANTÓW I SCREENING NOWYCH ANTYBIOTYKÓW

Metoda selekcji mutantów produkcyjnych polegała i polega obecnie na losowym badaniu klonów otrzymanych z pojedynczych przetrwalników, które przeżyły działanie mutagenów. Wielkość sfery zahamowania wzrostu wskaźnikowych bakterii wokół kolonii mikroorganizmu produkującego antybiotyk świadczy o jego zdolnościach produkcyjnych. Jednym ze sposobów „poprawiania” drobnoustrojów produkcyjnych jest stosowanie nowych czyn-

ników mutagennych. Niestety, często uzyskuje się po zastosowaniu tych czynników mutanty produkcyjne, które oprócz pożądaných cech mają też cechy niekorzystne z punktu widzenia technologii produkcji. Jest to zjawisko tak zwanej degeneracji szczepów przemysłowych. W ostatnich 30 latach ulepszono znacznie metody selekcjonowania szczepów nadprodukujących antybiotyki. Dotychczas stosowane przesiewanie (screening) losowo wybieranych kolonii zastąpiono testami, w których w mniejszym lub większym stopniu występuje element pozytywnej selekcji, to znaczy wybierania wprost z wysiewu kolonii o pożądaných cechach. Te metody selekcji nazywać będziemy racjonalnymi. Często wiążą się one z lepszym rozumieniem metabolizmu [34]. Mutanty stosowane w produkcji często wykazują zaburzenia właśnie w procesach regulacji metabolizmu — mutacji ulegają geny odpowiedzialne za wytwarzanie sygnałów, które w określonych warunkach włączają lub wyłączają dany etap lub cały szlak metaboliczny. Znana jest powszechnie metoda selekcji mutantów regulacyjnych, u których nie działa mechanizm represji przez końcowy produkt. Represja taka polega na zatrzymaniu syntezy enzymów danego szlaku metabolicznego w warunkach nagromadzenia produktu końcowego tego szlaku. Usiłuje się otrzymać mutanty odporne na toksyczny analog tego produktu. W mutantach takich przebiega synteza właściwego produktu, który znosi toksyczne działanie analogu. Zauważono na przykład, że mutanty odporne na analogi aminokwasów często nadprodukują te właśnie aminokwasy, ponieważ nie działa mechanizm represji. Zasadę tę wykorzystano do szczepów *Pseudomonas*, które produkują antybiotyk pirolonitrynę (antybiotyk przeciwgrzybowy tryptofano-pochodny). Szczepy odporne na fluorotryptofan lub metylotryptofan produkowały trzykrotnie więcej antybiotyku niż szczep rodzicielski w obecności tryptofanu [16]. Do innych metod racjonalnych można zaliczyć haploidyzację szczepów, w niektórych przypadkach podwyższanie ploidalności (zwiększenie liczby chromosomów), a przede wszystkim rekombinację genetyczną między szczepami w drodze krzyżowania lub przez wprowadzanie sklonowanych genów do macierzystych lub obcych organizmów, co zostanie omówione później. Do odkrycia nowych antybiotyków dochodzi niekiedy dzięki wprowadzeniu modyfikacji do testów przesiewowych, tak zwanych „pierwotnych”. Testy te opierały się na bakteriostatycznym lub bakteriobójczym oddziaływaniu antybiotyku na szczep wskaźnikowy rosnący w optymalnych warunkach. Stosowane w tych testach kryterium hamowania wzrostu lub śmierci komórek zastępuje się np. kryterium opartym na morfogenezie komórki i stopniu jej zróżnicowania pod wpływem antybiotyku. W innych przypadkach zastępuje się optymalne, złożone podłoża dla szczepu testowego podłożami prostymi, chemicznie zdefiniowanymi. Niektóre tak zwane „nieklasyczne” metody przesiewania przedstawione są wg. Zähnera w Postępkach Mikrobiologii [33]. Ball i Mc Gonagle [4] donosili o szybkiej płytkowej procedurze przesiewania do wykrywania ulepszonych szczepów *Penicillium chrysogenum* produkujących penicylinę polegającą na tym, że do podłoża ze szczepem wskaźnikowym dodawano penicylinazę i zalewano tym kolonie producenta antybiotyku wyrosłe po działaniu mutagenu. Rozmiar stref zahamowania wzrostu wokół poszczególnych kolonii ograniczany był

przez penicylinazę. Kolonie wytwarzające dużo antybiotyku łatwo można było odróżnić od pozostałych.

ZASTOSOWANIE REKOMBINANTÓW GENETYCZNYCH

Wiedza na temat genetyki mikroorganizmów produkujących antybiotyki jest wciąż niewystarczająca (dotychczas opracowane mapy genetyczne drobnoustrojów produkcyjnych są niekompletne, szczególnie w odniesieniu do złożonych szlaków syntezy antybiotyków), niemniej coraz szerzej wprowadzane są metody rekombinacji genetycznej dla polepszania szczepów. W latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych genetyczna rekombinacja u szczepów przemysłowych nie odgrywała większego znaczenia ze względu na bardzo małą jej częstość [32]. U wielu gatunków używanych w przemyśle, na przykład u promieniowców (*Actinomyces*) nie ma cyklu płciowego zaś rekombinacja zachodzi jedynie w rzadkich przypadkach łączenia się jąder pochodzących z różnych szczepów. W czasie ich podziałów mitotycznych dochodzi z małą częstością do rekombinacji genetycznej. Jest to tak zwany proces parapłciowy. Wykorzystano go na przykład to polepszania szczepów *Penicillium chrysogenum* [3, 17].

Bardzo małe częstości wewnątrzgatunkowej rekombinacji wśród *Actinomyces* (do których należy większość producentów antybiotyków), wymagają wprowadzania genetycznych markerów w celu wykrywania rekombinantów. Wprowadzanie takich selektywnych markerów było czasochłonne i kończyło się często różnymi negatywnymi wpływami na produkcję antybiotyku.

Wraz z odkryciem fuzji protoplastów przy udziale PEG (poli-etylenoglikolu) uzyskano efektywne narzędzie genetycznej rekombinacji u szczepów przemysłowych. Fuzja protoplastów zwiększa szanse procesu parapłciowego co pozwala na genetyczną wymianę chromosomów lub ich części, dając bardzo dużą częstość rekombinacji rzędu 10^{-1} . Fuzję protoplastów zastosowano najpierw w przypadku komórek zwierzęcych i roślinnych, później u grzybów i bakterii. Ostatecznie praca Okanishi i wsp. [38] na temat tworzenia protoplastów, fuzji i regeneracji przyspieszyła użycie tej techniki do genetycznych manipulacji u promieniowców. Chociaż nie uzyskano zdolnych do życia, stabilnych rekombinantów przez fuzję protoplastów całkowicie niespokrewnionych gatunków, to jednak udało się międzygatunkowa fuzja protoplastów i rekombinacja na przykład między *Penicillium chrysogenum* i *Penicillium cyaneofulvum*, *Aspergillus nidulans* i *Aspergillus regulosus*, a także w przypadku niektórych promieniowców oraz między *Candida* i *Endomycopsis*. Zakres zastosowania fuzji protoplastów do otrzymywania rekombinantów może być prawdopodobnie jeszcze bardziej rozszerzony dzięki odkryciu, że protoplasty promieniowców naświetlane promieniami UV przed fuzją mają około 10-krotnie większą częstość rekombinacji po fuzji [21]. Metodyka fuzji protoplastów jest już dobrze znana i opisana w wielu publikacjach [patrz artykuły przeglądowe: 5, 6, 18, 22, 57]. Fuzie protoplastów wykorzystano już do uzyskiwania szczepów

o większej zdolności do produkcji antybiotyku. Hamlyn i Ball [20] dokonali fuzji protoplastów dwóch szczepów *Cephalosporium acremonium*. Szczep o małej zdolności do produkcji antybiotyku, szybko rosnący, sporujący, wymagający metioniny do optymalnej produkcji cefalosporyny C, skrzyżowano ze szczepem o dużej zdolności do produkcji antybiotyku, wolno rosnącym, niesporującym, który wykorzystywał nieorganiczny siarczan. Uzyskano rekombinanta, który росł szybko, sporował, produkował cefalosporynę C z siarczanu i to o 40% więcej niż szczep rodzicielski o dużej zdolności do produkcji antybiotyku. Przez rekombinację drogą fuzji protoplastów uzyskano między innymi super producenta refamycyny C: dwa szczepy *Nocardia lactamdurans* poddano fuzji i wśród rekombinantów były dwa, które produkowały 10-15% więcej antybiotyku niż szczepy rodzicielskie [60].

Wyizolowano również rekombinanta po międzygatunkowej fuzji protoplastów szczepów produkujących cefamycynę: *Streptomyces griseus* i *Nocardia lactamdurans*. Rekombinant ten produkował 7-11% więcej cefamycyny C niż prototroficzny szczep *Nocardia lactamdurans* [56]. Bradshaw i Peberdy [7] dokonali fuzji protoplastów *Aspergillus nidulans*, produkującego penicylinę, ze szczepami *Aspergillus regulosus*, które nie produkowały antybiotyku na wykrywalnym poziomie. Izolowano stabilne segreganty. Niektóre z nich (o zrekombinowanych fenotypach) produkowały wyraźnie więcej penicyliny niż szczep rodzicielski *Aspergillus nidulans*.

Stosując klasyczne krzyżowanie lub fuzje protoplastów różnych szczepów, udało się otrzymać rekombinanty wytwarzające nowe typy antybiotyków. Na przykład w wyniku krzyżowania dwóch szczepów *Nocardia mediterranei* uzyskano dwie nowe ryfamycyny [47, 50]. Podobnie, rekombinanty promieniowców wytwarzały antybiotyki nie występujące u szczepów rodzicielskich [40]. Stosując fuzje protoplastów szczepów *Streptomyces griseus* SS-1198 (produkującego streptomycynę) i *Streptomyces tenjimariensis* SS-939 (produkującego istamycynę) uzyskano rekombinanty, z których część produkowała antybiotyk zupełnie inny niż wytwarzany przez szczepy rodzicielskie [60]. Hopwood [26] rozważa dwa mechanizmy tworzenia nowych antybiotyków przez rekombinanty:

- 1) przenoszenie strukturalnych genów kodujących produkcję antybiotyku z jednego szczepu do drugiego co może prowadzić do produkcji hybrydowego antybiotyku;
- 2) rekombinacja genów regulatorowych mogłaby pozytywnie wpływać na ekspresję genów, które tej ekspresji nie ulegały (geny „silent”) w szczepach wyjściowych.

Ikeda i wsp. [32] zaobserwowali raczej zaskakujące zjawisko, że przez zwykłą protoplastyzację i regenerację promieniowców produkujących jeden makrolid, uzyskano szczepy wysokoprodukcyjne. W ostatnich latach opracowano różne modyfikacje fuzji protoplastów. Na przykład okazało się możliwe dokonanie jednokierunkowego przeniesienia informacji genetycznej przez transformację promieniowców z udziałem liposomów, w których umieszczano wyizolowany z jednego szczepu DNA, a następnie poddawano je fuzji z protoplastami innego szczepu [35]. Inną modyfikacją jest

metoda Hopwooda i Wrighta [21], w której poddane działaniu UV protoplasty używano do eliminowania szczepu rodzicielskiego z antyselektywnymi markerami. W innych przypadkach stosowano inaktywację ciepłem jednego z rodzicielskich szczepów [21] lub zabijanie chemiczne opisane przez Wrighta [59]. Metody te znane są jako techniki „zabitego dawcy” („dead donor”). Ogólnie biorąc wewnątrzgatunkowa fuźja protoplastów nie przedstawia dzisiaj większych problemów. Nie można natomiast powiedzieć tego o fuźji międzygatunkowej. Zaobserwowano, że szczepy hybrydowe są w tych przypadkach zwykle niestabilne. W pokonaniu tych problemów pomocne okazać się mogą badania organizacji genomu promieniowców i współpraca z taksonomistami.

POSTĘP W DZIEDZINIE BADAŃ GENETYCZNYCH — TECHNOLOGIA REKOMBINACJI DNA

W ciągu 30-50 lat poziom produkcji licznych antybiotyków zwiększył się setki i tysiące razy. Dalsze zwiększanie zdolności produkcyjnych szczepów konwencjonalnymi metodami mutacji i selekcji często jest niemożliwe. Poza tym, wspomniana wcześniej międzygatunkowa fuźja protoplastów promieniowców, daje często niezadawalające rezultaty, co może być spowodowane brakiem homologii DNA, różnymi systemami restrykcyjnymi czy też komórkową niezgodnością. W ostatnich latach obserwuje się ogromny postęp w genetyce molekularnej i inżynierii genetycznej, co rokuje dalsze podwyższanie poziomu produkcji znanych antybiotyków i daje możliwość konstruowania szczepów produkujących nowe antybiotyki.

Technologia rekombinacji DNA stwarza możliwość dokonania pożądanych, ukierunkowanych zmian genetycznych. Technologia ta pozwala wydzielić geny odpowiedzialne za biosyntezę antybiotyków z jednego organizmu i przenieść je do innego. Takie działanie może doprowadzić do stworzenia szczepu produkującego nowy antybiotyk nie spotykany w naturalnych warunkach [26], dzięki nowej kombinacji genów związanych z wytwarzaniem antybiotyku. Warto w tym miejscu podkreślić, że konstruowanie super szczepów produkujących antybiotyki z użyciem technologii rekombinacji DNA, nie jest zadaniem łatwym, gdyż biosynteza antybiotyków jest kontrolowana przez wiele genów. Technologia rekombinacji DNA przechodzi szybki rozwój u promieniowców, które wytwarzają 70% znanych antybiotyków. Klonowanie genów kontrolujących produkcję antybiotyków przez te organizmy, stało się możliwe wraz z konstruowaniem plazmidowych i fagowych wektorów, tj. cząsteczek DNA mających zdolność autonomicznej replikacji w komórkach, w które wbudowano interesujące nas geny. Wcześniej już obserwowano, że plazmidowe i fagowe DNA efektywnie transformuje protoplasty otrzymane po działaniu PEG. U różnych gatunków produkujących antybiotyki izoluje się plazmidy i bada się jaki one mają wpływ na produkcję antybiotyku. Do tej pory stwierdzono, że 15-25% szczepów *Streptomyces* zawiera plazmidowy DNA [cyt. za 12]. Dzisiaj

już wiadomo, że niektóre geny związane z biosyntezą antybiotyków są przenoszone na plazmidach, zaś w innych przypadkach DNA plazmidowy reguluje ekspresję chromosomalnych genów kodujących enzymy biosyntezy antybiotyku.

Według Hopwooda [25], plazmidy przenoszone podczas koniugacji prawdopodobnie biorą udział w genetycznej rekombinacji u promieniowców. Najlepszy dowód na taką rolę plazmidów pochodzi ze *Streptomyces lividans* 66. Znalaziono w tym szczepie plazmid oznaczony pIJ 101, który przenosił się przez koniugację i między innymi wywoływał rekombinację chromosomalną z dużą częstością (do 1%) u *S. lividans* 66 i *S. coelicolor* A3 (2) [30]. Jest to plazmid występujący w wielu kopiach, o szerokim zakresie gospodarzy — promieniowców. Skonstruowano już kilka pochodnych tego plazmidu, dających się wykorzystać jako wektory do klonowania DNA. Otrzymano między innymi bifunkcyjny wektor (p IJ 123), który transformuje szczepy *E. coli* i *Streptomyces* [42]. Przegląd klonowania genów u *Streptomyces* przedstawili między innymi Okanishi i wsp. [39].

Podjęto próby wykorzystania badań nad amplifikacją genów plazmidowych u promieniowców, dążąc do zwielokrotnienia genów kodujących produkcję antybiotyku. Ponieważ jednak nasza wiedza o poszczególnych etapach istotnych w biosyntezie antybiotyku, tj. ograniczających jej tempo, jest bardzo mała, stąd nie zawsze wiadomo, które geny należałoby zamplifikować w celu podwyższenia wytwarzania antybiotyku.

Zbadano wiele szczepów wytwarzających antybiotyki i stwierdzono u niektórych przynajmniej częściowe skupienie genów związanych z syntezą antybiotyku. Przykładem mogą być geny oxytetracykliny u *Streptomyces rimosus* [41], czy ryfamycyny u *Nocardia mediterranei* [46]. Takie skupienie genów daje nadzieję włączenia ich w całości do wektorów i sklonowania w bakteriach lub innych promieniowcach.

Wydaje się prawdopodobne, że polepszenie szczepów przemysłowych można by również uzyskać przez losowe transformacje szczepów wektorami niosącymi różne geny (tzw. bankiem genów), w tym też limitujące tempo biosyntezy antybiotyków, przy odpowiedniej metodzie selekcji transformantów o ulepszonych cechach. Tą samą drogą można by wprowadzić geny (czasem nawet nieznane) powodujące modyfikacje antybiotyku gospodarza.

TECHNOLOGIA IMMOBILIZOWANYCH BOKATALIZATORÓW

Jak wspomniano wcześniej, klasyczne hodowle prowadzone w celu otrzymania antybiotyku zawsze mają fazę „nieproduktywną”, tj. wytwarzanie antybiotyku rozpoczyna się dopiero, gdy wzrost komórek staje się coraz wolniejszy lub się zatrzymuje. Faktem jest, że enzymy biorące udział w biosyntezie tworzone są w komórce w czasie wzrostu i gdy on ustaje, dosyć szybko są inaktywowane. Gdyby nie to, faza „linearnej” produkcji antybiotyku mogłaby utrzymywać się znacznie dłużej. Dużym problemem w przemyśle antybiotyków jest zjawisko degeneracji szczepów, tj. wyselekcjonowywania się szczepów słabo produkujących, które rosną szybciej.

Jako rozwiązanie tych lub innych niekorzystnych zjawisk (np. nieekonomicznego wykorzystywania surowców węglowodanowych, które wykorzystywane są głównie na rozwój wegetatywny producenta), dokonuje się prób zastąpienia klasycznej fermentacji antybiotycznej przez syntezę antybiotyku *in vitro* przy użyciu enzymów izolowanych z mikroorganizmów (enzymów w formie rozpuszczalnej lub immobilizowanych na stałym nośniku). Na przykład, przy użyciu nie immobilizowanych enzymów dokonano całkowicie enzymatycznej syntezy antybiotyków oligopeptydowych, gramicyny S i bacytracyny, w Instytucie Technologii w Massachusetts [15, 53, 54]. Immobilizacja polega na przyłączeniu lub adsorpcji cząsteczek enzymu do powierzchni nośnika (zob. art. Okruszko). Możliwa jest również immobilizacja całych komórek (żywych, czasem martwych), jako biokatalizatora, do stałego podłoża wewnątrz systemu reaktora. Przez reaktor przechodzi wówczas faza ruchoma zawierająca substraty i produkty reakcji. Wiele problemów pozostaje jeszcze do rozwiązania, najważniejszym z nich wydaje się być problem inaktywacji enzymów.

Odkryto kompleksy enzymatyczne *in vivo* zlokalizowane na błonach lub organellach komórkowych i wakuolach, które zdolne są katalizować, częściowo lub całkowicie, syntezę antybiotyku. Kurzątkowski i wsp. [31], immobilizowali w żelu alginianowym wakuole (40-2000 nm) izolowane z protoplastów *Penicillium chrysogenum* PQ-96 i przy ich pomocy przeprowadzili całkowitą syntezę penicyliny G.

Zainteresowanie użyciem całych mikroorganizmów immobilizowanych w stałych nośnikach wzrosło w ostatnich latach [1, 10, 29, 48, 51, 53]. W przemyśle antybiotycznym takie immobilizowane komórki znajdują zastosowanie: 1) w procesach produkcji antybiotyku drogą fermentacji, 2) w procesach modyfikacji antybiotyku, 3) przy wytwarzaniu związków pośrednich, 4) przy syntezie antybiotyków półsyntetycznych. Wykorzystano immobilizowane komórki do syntezy kilku antybiotyków — szczególnie cenna jest ta technika do wytwarzania antybiotyków, które są lub mogą być wydzielane do podłoża hodowli. Donoszono już o immobilizacji żywych komórek jako katalizatorów w produkcji penicyliny G, ampicyliny, bacytracyny, cefamycyny oraz kandycydyny i innych. Jednakże prace nad biosyntezą antybiotyków przy użyciu tej techniki znajdują się ciągle jeszcze w fazie laboratoryjnej. Wiemy już jednak, że systemy immobilizowanych żywych komórek w stosunku do konwencjonalnej fermentacji dają kilka ważnych korzyści, między innymi:

- 1) możliwość prowadzenia procesu w sposób ciągły,
- 2) redukcję nieproduktywnej fazy wzrostu,
- 3) szybkie tempo reakcji przez zwiększenie gęstości komórek,
- 4) większe wydajności przy niższych kosztach produkcji,
- 5) łatwiejszą kontrolę procesu i namnażania komórek [53].

W przeciwieństwie do immobilizowanych jednoenzymatycznych systemów, kataliza przez wieloetapowe enzymatyczne kompleksy i przez całe unieruchomione komórki jest znacznie bardziej złożona i wiele jej aspektów musi być jeszcze zbadanych dla uzyskania optymalnego przebiegu procesu wytwarzania antybiotyku. Wśród istotnych problemów czekających na roz-

wiązanie, znajduje się: stan fizjologiczny i żywotność komórek, zjawisko lizy i wzrostu, procesy energetyczne w komórkach przy małym lub zerowym tempie wzrostu, zużywanie kofaktorów i ich regeneracja, problem zakażeń oraz zapobieganie niepożądanym reakcjom ubocznym.

Mimo nierozwiązania jeszcze tych i innych problemów, które określają całkowitą produktywność komórkowego reaktora, jasne jest obecnie, że immobilizowane komórki mogą być rozważane jako jedno z narzędzi syntezy i bioprodukcji w najbliższej przyszłości [54].

MUTASYNTEZA

W ostatnich latach okazało się możliwe podanie mikroorganizmowi specjalnie przygotowanego prekursora antybiotyku (takiego, którego sam mikroorganizm nie jest w stanie wytworzyć), który następnie jest przez niego przetworzony w gotowy antybiotyk. Taki prekursor nazywa się mutasyntonem, a sama technika mutasynteza. Utworzone tą drogą antybiotyki nazywa się mutasyntetycznymi [43]. Dotychczas mutasynteza została zastosowana w badaniach nad antybiotykami o budowie aminocyklitolii, głównie neomycyny, jak również innych klinicznie ważnych antybiotyków: streptomycyny, kanamycyny, gentamycyny, spektynomycyny i rybostamycyny. Ogólnie rzecz biorąc mutasynteza obejmuje kilka etapów:

- 1) Otrzymanie mutantów niezdolnych do syntezy prekursora (który normalnie stanowi element cząsteczki antybiotyku), ale mających zdolność do pobierania z podłoża różnych mutasyntonów i wbudowywania ich w cząsteczkę antybiotyku.
- 2) Dobór i przygotowanie mutasyntonów — otrzymuje się je przez hydrolizę różnych antybiotyków pochodzenia naturalnego, modyfikowanych lub syntetycznych.
- 3) Pobieranie mutasyntonu przez komórki użytego mutantu i włączenie go do fragmentu cząsteczki wytwarzanego antybiotyku.
- 4) Badanie biologicznych właściwości otrzymanego antybiotyku mutasyntetycznego.

Na ogół antybiotyki mutasyntetyczne mają zbliżoną aktywność biologiczną do aktywności antybiotyków wyjściowych, ale ich znaczenie kliniczne, zdaniem Rineharta [43], leży w potencjalnej możliwości obniżenia toksyczności w porównaniu z antybiotykami macierzystymi. Mutasynteza może w przyszłości znaleźć zastosowanie nie tylko w poszukiwaniu nowych antybiotyków, lecz również w badaniach zależności między strukturą i aktywnością biologiczną oraz w badaniach nad specyficznym działaniem enzymów w uzyskiwaniu specjalnie znakowanych antybiotyków.

UWAGI KOŃCOWE

Dalszy rozwój metod genetycznych, takich jak: fuzja protoplastów, wysokowydajna transformacja i technologia rekombinacji DNA oraz ich zastosowanie do przemysłowo ważnych promieniowców i grzybów, będą

niewątpliwie skupiały uwagę naukowców i praktyków w najbliższej przyszłości. Nowe genetyczne technologie oferują perspektywy systematycznego, genetycznego konstruowania ulepszonych szczepów. W ostatnich dwóch latach, grzyby nitkowate są jedną z wylaniających się grup mikroorganizmów, gdzie techniki molekularne znajdują swoje zastosowanie. Ponieważ jest to dopiero początek molekularnych manipulacji z grzybami nitkowatymi, mało jest publikowanych danych związanych z ich bezpośrednimi zastosowaniami do szczepów przemysłowych. Wspomniałam już o nadziejach związanych z immobilizowanymi enzymami i komórkami. Intensywność badań idących w tym kierunku jest ogromna.

Trudno też pominąć fakt, że technika komputerowa ma wyraźny wpływ na przebieg hodowli i wytwarzania antybiotyków, szczególnie w ostatnich latach [44]. Integracja komputerów do systemów produkcyjnych uzasadniona jest ich zdolnością do monitorowania procesów, zbierania i przetwarzania danych, kontroli procesu i wykrywania błędów.

LITERATURA

1. Abbott B. J. — *Preparation of pharmaceutical compounds by immobilized enzymes and cells*. Adv. Appl. Microbiol. 20: 203-257, 1976.
2. Anonymous — *Saving antibiotics from themselves*. Nature 292: 661, 1981.
3. Ball C., Azevedo J. L. — *Genetic instability in parasexual fungi*. W: Mac Donald K. D. (red.). *Second international symposium on the genetics of industrial microorganisms*. Academic Press, London-New York-San Francisco, s. 243, 1976.
4. Ball C., Mc Gonagle M. P. — *Development and evaluation of a potency index screen for detecting mutants of *Penicillium chrysogenum* having increased penicillin yield*. J. Appl. Bacteriol. 45: 67-74, 1978.
5. Baltz R. H. — *Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces**. Devel. Ind. Microbiol. 21: 43-54, 1980.
6. Baltz R. H., Mutsushima P. — *Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration*. J. Gen. Microbiol. 127: 137-146, 1981.
7. Bradshaw R. E., Peberdy J. F. — *Aspects of penicillin production in *Aspergillus* hybrids*. Enzyme Microbiol. Technol. 6(3): 121-126, 1984.
8. Burg R. P. — *Fermentation products in animal health*. ASM News 48: 460-463, 1982.
9. Brukholder P. R. — *Cooperation and conflict among primitive organisms*. Amer. Sci. 40: 601-631, 1952.
10. Chibata I., Tosa T. — *Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells*. Adv. Appl. Microbiol. 22: 1-27, 1977.
11. Claridge C. A. — *Mutasynthesis and directed biosynthesis for the production of new antibiotics*. W: *Basic biology of new developments in biotechnology*. A. Hollaender, A. I. Laskin, P. Rogers (red.). Plenum, New York, s. 231-269, 1983.
12. Danilenko V., Navashin S. — *Cloning and amplification of DNA in actinomycetes: possible use for construction of antibiotic-producing organisms*. Biotechnol. Bioindustry 1: 5-9, 1986.
13. Daum S. J., Lemke J. R. — *Mutational biosynthesis of new antibiotics*. Ann. Rev. Microbiol. 33: 241-265, 1979.
14. Demain A. L. — *The new biology: Opportunities for the fermentation industry*. Ann. Rep. Ferment. Proc. 4: 193-208, 1980.
15. Demain A. L., Wang D. I. C. — *Enzymatic synthesis of gramicidin S*. W: *Second*

- International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*. K. D. Mac Donald (red.) Academic, New York, s. 115-128, 1976.
16. Elander R. P., Mabe J. A., Hamill R. L., Gorman H. — *Biosynthesis of pyrrolnitrins by analogue-resistant mutants of Pseudomonas fluorescens*. *Folia Microbiol.* 16: 156-165, 1971.
 17. Elander R. P., Espenshade M. A., Pathak S. G., Pan C. H. — *The use of para-sexual genetics in and industrial-strain improvement program with Penicillium chrysogenum*. W: *Genetics of Industrial Microorganisms. Actinomycetes and fungi*. Sterzl J., Riha I. (red.) Prague, s. 239-254, 1973.
 18. Ferenczy L. — *Microbiological protoplast fusion*. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 31: 1-34, 1981.
 19. Fodor K., Demiri E., Alföldi L. — *PEG-induced fusion of heat-irradiated and living protoplasts of Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 135: 68-70, 1978.
 20. Hamlyn P. F., Ball C. — *Recombination studies with Cephalosporium acremonium*. W: *Genetics of industrial microorganisms*. O. K. Sebek and A. I. Laskin (red.). Amer. Soc. Microbiol. Washington, D. C., s. 185-191, 1979.
 21. Hopwood D. A., Wright H. M. — *Protoplast fusion in Streptomyces: Fusion involving ultraviolet-irradiated protoplasts*. *J. Gen. Microbiol.* 126: 21-27, 1981.
 22. Hopwood D. A. — *Genetic studies with bacterial protoplasts*. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 237-272, 1981.
 23. Hopwood D. A. — *Possible application of genetic recombination in the discovery of new antibiotics in actinomycetes*. W: *The Future of Antibiotherapy and Antibiotic Research*. L. Ninet, P. E. Bost, D. H. Bouanchaud, J. Florent (red.) Academic Press, London, s. 407-416, 1981.
 24. Hopwood D. A., Chater K. F. — *Cloning in streptomyces-systems and strategies*. W: *Genetic Engineering*, T. 4. J. K. Setlaw, A. Hollaender (red.) Plenum Publishing, New York, s. 119, 1982.
 25. Hopwood D. A. — *Genetic manipulation in Streptomyces*. W: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms*. Ikeda J., Beppu F. (red.). Kodansha, Tokyo, s. 3-8, 1983.
 26. Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H., Duncan J., Fujii I., Rudd B. A. M., Floss H. G., Omura S. — *Production of „hybrid” antibiotics by genetic engineering*. *Nature* 314: 639-642, 1985.
 27. Hostalek Z., Blumauerova M., Vanek Z. — *Genetic problems of the biosynthesis of tetracycline antibiotics*. W: *Advances in biochemical engineering*, T. 3, T. K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough (red.). Springer Verlag, Berlin, s. 13-67, 1974.
 28. Ikeda H., Inoue G., Omura S. — *Improvement of macrolide antibiotic-producing Streptomyces strains by the regeneration of protoplasts*. *J. Antibiot.* 36: 283-288, 1983.
 29. Kierstan M., Bucke C. — *The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels*. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 387-397, 1977.
 30. Kieser T., Hopwood D. A., Wright H. M., Thompson A. J. — *p IJ 101, a multi-copy broad host-range Streptomyces plasmid: Functional analysis and development of DNA cloning vectors*. *Mol. Gen. Genet.* 185: 223-238, 1982.
 31. Kurzątkowski W., Kuryłowicz W., Paszkiewicz A. — *Penicillin G. production by immobilized fungal vesicles*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5: 211-213, 1982.
 32. Kurth R., Demain A. L. — *The impact of new genetics on antibiotic production*. W: *Biotechnology of Ind. Antibiotics*. E. J. Vandamme (red.) Marcel Dekker, New York, s. 781-789, 1984.
 33. Kuryłowicz W., Kowszyk-Gindifer Z. — *Stan obecny i przyszłość badań nad antybiotykami*. *Post. Mikrobiol.* 19: 103-120, 1980.
 34. Kwiatkowski Z. — *Zastosowanie genetyki w mikrobiologii przemysłowej*. *Post. Mikrobiol.* 19: 317-325, 1980.

35. Makins J. F., Holt G. — *Liposome-mediated transformation of streptomycetes by chromosomal DNA*. Nature 293: 671-673, 1981.
36. Mazieres N., Peyre M., Penasse L. — *Interspecific recombination among aminoglycoside producing streptomycetes*. J. Antibiot. 34: 544-550, 1981.
37. Normansell I. D. — *Strain improvement in antibiotic producing microorganisms*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 32: 296-303, 1982.
38. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. — *Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological studies*. J. Gen. Microbiol. 80: 389-400, 1974.
39. Okanishi M., Katagiri K., Furmai T., Takeda K., Kawaguchi K., Saitoh M., Nabeshima S. — *Basic techniques for DNA cloning and conditions required for streptomycetes as a host*. J. Antibiot. 36: 99-108, 1983.
40. Perlman, D. — *Stimulation of innovation in the fermentation industries 1910—1980*. Proc. Biochem. 13: 3-5, 1978.
41. Rhodes P. M., Winskill N., Friend E. J., Warren M. — *Biochemical and genetic characterization of Streptomyces rimosus mutants impaired in oxytetracycline biosynthesis*. J. Gen. Microbiol. 124: 329-338, 1981.
42. Richardson M. A., Mabe J. A., Beerman N. E., Nakatsukasa W. M., Fayerman J. T. — *Development of cloning vehicles from the Streptomyces plasmid p FJ 103*. Gene 20: 451-457, 1982.
43. Rinehart K. L. Jr. — Pure Appl. Chem. 49: 1361, 1977.
44. Rolf M. J., Lim H. C. — *Computer control of fermentation processes*. Enzyme Microb. Technol. 4(6): 370-380, 1982.
45. Rolinson G. N. — *6-APA and the development of the β -lactam antibiotics*. J. Antimicrob. Chemother. 5: 7-14, 1979.
46. Schupp Th., Nüesch J. — *Chromosomal mutations in the final step of rifamycin B biosynthesis*. FEMS Microbiol. Lett. 6: 23-27, 1979.
47. Schupp Th., Traxler P., Auden J. A. L. — *New rifamycins produced by a recombinant strain of Nonardia mediterranei*. J. Antibiot. 34: 965-970, 1981.
48. Shimizu S., Morioka H., Tani I., Ogata K. — *Synthesis of coenzyme A by immobilized microbial cells*. J. Ferment. Technol. 53: 77-83, 1975.
49. Sebek O. K. — *Microbial transformations of antibiotics*. W: *Economic Microbiology*. T. 5. A. H. Rose (red.), Academic, New York. s. 575-612, 1980.
50. Traxler P., Schupp Th., Wehrli W. — *16,17-Dihydrovifamycin S and 16,17-dihydro-17-hydroxyrifamycin, S, two novel rifamycins from a recombinant strain C5/42 of Nocardia mediterranei*. J. Antibiot. 35: 594-601, 1982.
51. Vandamme E. J. — *Immobilized microbial cells as catalysts*. Chem. Ind. 24: 1070-1072, 1976.
52. Vandamme E. J. — *Penicillin acylases and β -lactamases*. W: *Economic microbiology*. T. 5. H. Rose (red.) Academic, New York, s. 467-522, 1986.
53. Vandamme E. J. — *Use of microbial enzyme and cell preparations to synthesize oligopeptide antibiotics*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 31: 637-659, 1981.
54. Vandamme E. J. — *Peptide antibiotic production through immobilized biocatalys technology*. Enz. Microbiol. Technol. 5: 403-416, 1983.
55. Vournakis J. N., Elander R. P. — *Genetic manipulation of antibiotic producing microorganisms*. Science 219: 703-709, 1983.
56. Wesseling A. C., Lago B. — *Strain improvement of genetic recombination of cephamycin producers, Nocardia lactamdurans and Streptomyces griseus*. Devel. Ind. Microbiol. 22: 641-651, 1981.
57. Weseling A. C. — *Protoplast fusion among the actinomycetes and its industrial applications*. Devel. Ind. Microbiol. 23: 31-40, 1982.

58. Woodruff H. B. — *Natural products from microorganisms*. Science 208 (4449): 1225-1229, 1980.
59. Wright W. E. — *The isolation of heterokaryons and hybrids by a selective system using irreversible biochemical inhibitors*. Exp. Cell Res. 112: 395-407, 1978.
60. Yamashita F., Hotta K., Kurasawa S., Okami Y., Umezawa H. — *Antibiotic formation by interspecific protoplast fusion in streptomycetes and emergence of drug resistance by protoplast regeneration*. Abstracts of the Fourth International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, s. 108, 1982.

STANISŁAW CEBRAT

Instytut Mikrobiologii

Uniwersytet Wrocławski

WYKORZYSTANIE MIKROORGANIZMÓW CELULOLITYCZNYCH DO UTYLIZACJI MATERIAŁÓW BOGATYCH W CELULOZĘ

WSTĘP

Celuloza jest najpospolitszym, naturalnie występującym związkiem organicznym na naszej planecie. Szacuje się, że ponad połowa węgla znajdującego się w połączeniach organicznych związana jest właśnie w celulozie, a ostrożne szacunki wielkości produkcji celulozy przez rośliny lądowe wynoszą około 10 miliardów ton rocznie. Jeżeli dodamy do tego, że jest to związek zbudowany z uniwersalnego dla wszystkich organizmów źródła energii jakim jest glukoza to zrozumiemy, dlaczego zainteresowanie celulozą jest obecnie tak duże i od pewnego czasu ciągle rośnie — wiąże się to między innymi z nadzieją rozwiązania problemu żywności dla ludzkości.

Celuloza nie jest jednak syntetyzowana przez rośliny „z myślą” o tym, by wykorzystywać ją kiedykolwiek jako materiał energetyczny; nie jest, tak jak inne polimery glukozy, materiałem zapasowym. Wydaje się wręcz przeciwnie, ewolucja przez miliardy lat pracowała nad tym, aby celuloza nie tylko nie była takim materiałem dla samego jej producenta, ale również żeby inne organizmy miały trudności z jej wykorzystaniem wbrew interesom producenta. Tym należy tłumaczyć, że celuloza jest jednym z najtrwalszych, wśród naturalnie występujących, związków organicznych i dotyczy to zarówno celulozy występującej w żywych jeszcze organizmach, jak i złożu celulozy w organizmach obumarłych. Częsteczki celulozy w liczących sobie tysiące lat sekwojach, czy drzewach oliwnych są te same co w chwili ich syntezy przed tysiącami lat. Nie ulegają one odnowie, jak wiele innych polimerów organicznych, których stężenie w organizmach pozostaje przez dziesiątki lat niezmienione ale faktycznie czas życia danej cząsteczki jest bardzo krótki i może wynosić zaledwie godziny, czy nawet minuty.

Ponieważ ewolucja tak wytrwale pracowała nad ochroną celulozy przed atakami innych organizmów, a rodowody producentów celulozy rozchodziły się ciągle w dalekiej i bliższej przeszłości, więc i sposoby ochrony celulozy przed tymi atakami również ulegały dywergencji, w rezultacie czego mamy obecnie bardzo dużo różnych źródeł celulozy — teoretycznie

identycznej w każdym z tych źródeł ale praktycznie różniącej się sposobem jej chronienia przed degradacją. Tym samym, każde z tych źródeł stanowi osobny problem technologiczny w procesie jej wykorzystania, jako źródła glukozy, nie tylko dla człowieka, ale również dla organizmów, które chciałyby z tego źródła skorzystać.

STRUKTURA CELULOZY I MATERIAŁÓW BOGATYCH W CELULOZĘ

Celuloza jest homopolisacharydem, to znaczy w jej skład wchodzi tylko jeden rodzaj monosacharydu — glukoza. W tabeli 1 przedstawiono najważniejsze homopolisacharydy występujące w przyrodzie. Wszystkie, które pełnią funkcje strukturalne, są bardzo stabilne, odporne na działanie zarówno wielu czynników fizycznych i chemicznych, jak również na biodegradację.

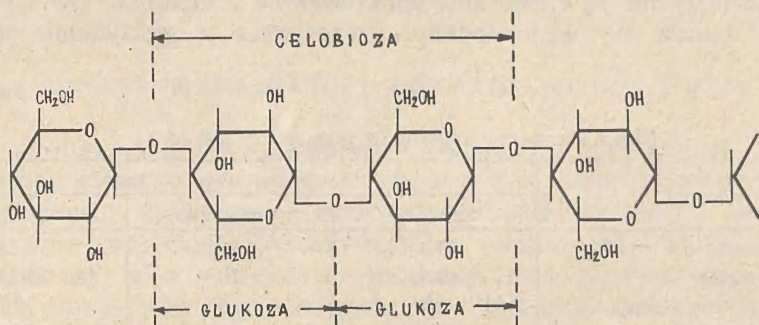
Tabela 1

Najbardziej pospolite homopolisacharydy

Polisacharyd	Monosacharyd	Wiązanie	Funkcje
Celuloza	glukoza	$\beta, 1 \rightarrow 4$	strukturalne
Amyloza	glukoza	$\alpha, 1 \rightarrow 4$	zapasowe
Amylopektyna	glukoza	$\alpha, 1 \rightarrow 4$	zapasowe
		$\alpha, 1 \rightarrow 6$	
Chityna	N-acetyloglukozamina	$\beta, 1 \rightarrow 4$	strukturalne
Inulina	fruktoza	$\beta, 2 \rightarrow 1$	zapasowe
Ksyłan	ksyloza	$\beta, 1 \rightarrow 4$	strukturalne
Glikogen	glukoza	$\alpha, 1 \rightarrow 4$	zapasowe
		$\alpha, 1 \rightarrow 6$	
Agar	galaktoza	$\alpha, 1 \rightarrow 3$	strukturalne

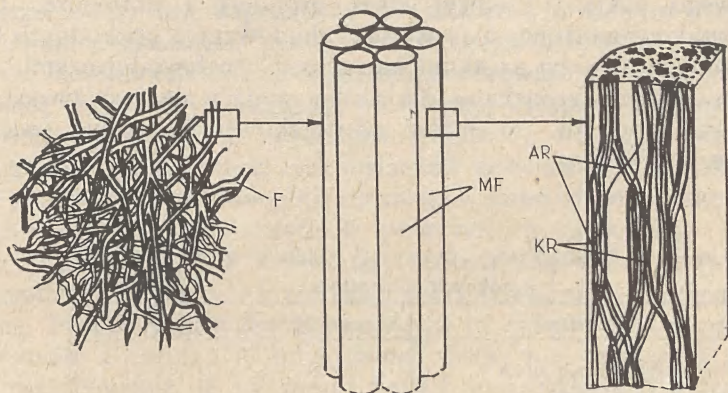
Polisacharydy takie jak amyloza, amylopektyna czy glikogen spełniają funkcje materiałów zapasowych i chociaż są zbudowane również z glukozy a ich stopień polimeryzacji nie jest mniejszy od stopnia polimeryzacji celulozy, są stosunkowo łatwo rozkładane nie tylko przez organizmy, które je syntetyzują ale również przez wiele innych organizmów. Celuloza jest związkiem o całkowicie odmiennych właściwościach. W łańcuchu celulozy, cząsteczki glukozy połączone są ze sobą wiązaniem glikozydowym $\beta 1 \rightarrow 4$. Łańcuch celulozy może być zbudowany z kilku do kilkunastu tysięcy reszt glukozy. Chociaż poza skrajnymi cząsteczkami glukozy w łańcuchu, wszystkie podjednostki tego polimeru są identyczne, to ze względu na konformacyjne ułożenie cząsteczek glukozy w łańcuchu, powtarzającą się okresowo podjednostką jest dwucukier zwany celobiozą (rys. 1). Celuloza pełni w roślinach funkcje strukturalne. Długie, liniowe cząsteczki ułożone są równolegle w stosunku do siebie i wzajemnie połączone wiązaniami wodorowymi. Tworzą one tak zwane fibryle, mające właściwości krystaloidów, z bardzo ściśle upakowanymi cząsteczkami celulozy. Ta sama cząsteczka celulozy może jednak przechodzić z jednego krystaloidu do innego. W takim

regionie przejścia (amorficznym) łańcuchy celulozy nie są już tak ściśle upakowane i są bardziej podatne na działanie wielu czynników chemicznych i fizycznych niż regiony krystaliczne. Fibryle połączone są z kolei w wiązki, których konstrukcja znowu przypomina strukturę samych fibryli,



Rys. 1. Wzór strukturalny fragmentu łańcucha celulozy

to znaczy istnieją w tych wiązках regiony bardziej zwarte i regiony, w których następuje wymiana pojedynczych fibryli między sąsiadującymi regionami zwartymi. Strukturę tę schematycznie przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Struktura włókien celulozy, według Sihtola i Neimo [1]. F — fibryle, MF — mikrofibryle, AR — regiony amorficzne, KR — regiony krystaliczne. W prostokątach zaznaczono fragmenty, które w powiększeniu przedstawia kolejna część rysunku

Dzięki takiej strukturze i rozmieszczeniu fibryli i ich wiązek na peryferiach komórek roślinnych, rośliny uzyskują niezwykle wytrzymały a zarazem elastyczny szkielet. Struktura ta jest również powodem tak cenionej przez nas miękkości i puszystości włókien bawełny, które są najczystsza postacią naturalnie występującej celulozy.

Na nieszczęście dla biotechnologów, a także organizmów usiłujących wykorzystywać celulozę niezgodnie z jej przeznaczeniem, to znaczy nie jako materiał strukturalny ale zapasowy i energetyczny, przestrzenie w regionach amorficznych, bezpośrednio otaczające mikrofibryle oraz przestrzenie między

mikrofrybrylami wypełnione są najczęściej innymi polimerami, często znacznie bardziej skomplikowanymi pod względem chemicznym i konformacji przestrzennej niż sama celuloza. Tymi związkami inkrustującymi natywną celulozę są głównie hemicelulozy, ligniny i żywice.

Hemicelulozy nie są chemicznie spokrewnione z celulozą. Do tej grupy związków zalicza się węglowodany, które wraz z pektynami otaczają

Tabela 2

Skład chemiczny materiałów bogatych w celulozę

Materiał	Zawartość w procentach		
	celulozy	hemicelulozy	ligniny
Drewno twarde	40-45	15-35	17-25
Drewno miękkie	40-45	20	25-35
Odpady z trzciny cukrowej	33	30	19
Słoma z pszenicy	30	28	18
Słoma ryżowa	32	24	12,5
Torf (przy powierzchni)	22	36	10
Bawełna (włókna)	>95		

fibryle celulozy. Najbardziej pospolite hemicelulozy zawierają ksylany (polimer pięciowęglowego cukru — ksylozy) kwas uronowy i arabinozę. Ligniny tworzą skomplikowane trójwymiarowe sieci zbudowane z pochodnych fenolowych połączonych ze sobą krótkimi łańcuchami węglowodorowymi. Jeszcze bardziej egzotycznymi związkami dla roślin wydają się być żywice, które są polimerami izoprenu — o masie cząsteczkowej od kilku tysięcy do kilkuset tysięcy daltonów.

Tabela 3

Porównanie hydrolitycznej aktywności celulazy w stosunku do różnych substratów

Substrat	Aktywność, jednostki/mg białka
Karboksymetyloceluloza	8
Celuloza amorficzna	1,0
Bibuła filtracyjna	0,8
Celuloza mikrokrystaliczna	0,1
Słoma ryżowa	0,005

Przybliżony skład materiałów bogatych w celulozę przedstawiono w tabeli 2. Z zestawienia tego wynika, że przedstawione materiały mogą się między sobą różnić w istotny sposób właściwościami chemicznymi (o różnicach w ich właściwościach fizycznych nikogo nie trzeba przekonywać). Dane w tej tabeli należałoby uzupełnić dodatkowo istniejącymi różnicami w składzie hemiceluloz i lignin oraz różnicami w stopniu krystalizacji celulozy.

Wszystko to ma bardzo istotny wpływ na podatność materiałów bogatych w celulozę na enzymy rozkładające ją. Najlepiej ilustruje to tabela 3.

Z danych przedstawionych w tej tabeli można wnioskować o podatności różnych celuloz na enzymy rozkładające je. Najgorszym substratem jest substrat naturalny, jakim jest słoma ryżowa. Później kolejno celuloza krystaliczna i amorficzna a najlepszym — sztucznie modyfikowana celuloza, w której rozbito naturalną strukturę przestrzenną jej włókien.

NATURALNE BIOREAKTORY ROZKŁADAJĄCE CELULOŻĘ

Przedstawiona struktura naturalnie występujących źródeł celulozy w sposób jednoznaczny wskazuje, że jej wykorzystanie w dowolnym procesie technologicznym wymaga specyficznego podejścia, zależnie od rodzaju substratu. Stąd tak wiele technologii wykorzystujących celulozę jako źródło włókien naturalnych czy jako substrat do produkcji mas plastycznych, włókien sztucznych, materiałów wybuchowych itp. Wykorzystanie celulozy jako źródła glukozy czy innych związków pośredniej przemiany materii w procesach biotechnologicznych jest o wiele bardziej skomplikowane i wymaga zastosowania wielu różnych strategii. Wydaje się, że najlepszą strategię przyjęły niektóre zwierzęta. Chociaż żadne z nich nie potrafi samodzielnie trawić celulozy, (mogą to robić tylko niektóre bakterie i grzyby) to jednak mogą je wykorzystywać niezwykle efektywnie. Celują w tym przeżuwacze. Żwacz jest wspaniałym bioreaktorem, w którym utrzymywane są co najmniej dziesiątki szczepów mikroorganizmów w odpowiednich stosunkach ilościowych, które rozkładają zarówno związki inkrustujące i osłaniające mikrofibryle celulozy, jak i samą celulozę. Powstające cukry i inne związki energetyczne wykorzystują one do własnego metabolizmu, zwiększając swoją masę (część tych związków wykrada im gospodarz wchłaniając je częściowo). Mikroorganizmy te są z kolei zjadane przez pierwotniaki, które w dalszych częściach przewodu pokarmowego są łatwiej trawione niż same bakterie, a produkty trawienia są efektywnie wchłaniane przez organizm przeżuwacza. Przeżuwacz więc, żywiąc się pokarmem bogatym w celulozę, hemicelulozę i ligniny zamienia te związki w żwacz na taką zwaną biomasę i dopiero tę trawi samodzielnie, a w procesach anabolicznych znowu zamienia je na często bardzo poszukiwane przez człowieka produkty, jak mięso, mleko, wełnę itp. Celuje w tym chyba koza, która wręcz z upodobaniem zamienia bezużyteczne celulozopochodne śmieci i gazety na mleko. Przeżuwacze tak wyspecjalizowały się w takim trybie odżywiania, że dostarczenie im w diecie zbyt dużej ilości cukrów prostych, jest dla nich zabójcze na skutek rozchwiania subtelnych stosunków istniejącej w ich żwaczce flory bakteryjnej i przez zmianę jej metabolizmu.

Podobną strategię przyjęły również niektóre inne zwierzęta, jak króliki i konie, które wydzieliły w swoim przewodzie specjalny odcinek (jelito ślepe), który służy im za podobny bioreaktor rozkładający pokarm bogaty w celulozę. Również niektóre owady potrafią odżywiać się celulozą, dzięki mikroorganizmom żyjącym w ich przewodzie pokarmowym i pozostającym z nimi w symbiozie. Najbardziej znane są termyty, które potrafią nawet prowadzić wstępne procesy trawienia materiałów bogatych w celulozę

w specjalnie do tego celu wydzielonych miejscach w termitierach. Inne owady, tzw. drewnojady, również mają w swoich przewodach pokarmowych celulolityczne szczepy mikroorganizmów. Owady wydają się być jednak o wiele bardziej wyspecjalizowane w stosunku do źródła celulozy niż przeżuwacze i na ogół żywią się tylko jednym rodzajem pokarmu, np. żerują tylko na jednym gatunku drzew a nawet pożerają tylko jeden rodzaj tkanki tej rośliny.

Strategię przyjętą przez przeżuwacze, króliki, konie czy drewnojady, najefektywniejsze w wykorzystaniu źródeł celulozy, można by określić mianem generalnych, prowadzących do całkowitego trawienia i przemiany celulozy i zamiany jej i towarzyszących jej związków w biomasę bakteryjną, stanowiącą pełnowartościowy pokarm dla tych zwierząt. Biotechnologów satysfakcjonują jednak bardziej proste, chociaż mniej wydajne, procesy, w których można by odzyskiwać pośrednie produkty degradacji celulozy, jak glukoza, bądź też produkty przemiany samej glukozy, jak etanol, metanol lub metan, lub wreszcie dalsze produkty syntez pojedynczych szczepów mikroorganizmów tak zwane SCP (single-cell protein). Zanim jednak przejdziemy do bardziej szczegółowego omówienia tych strategii biotechnologicznych, musimy zapoznać się z mechanizmami rozkładu celulozy przez drobnoustroje, bo przecież tylko one są w stanie prowadzić ten proces samodzielnie.

CELULAZY I CELULOLIZA

Zdolność do enzymatycznego rozkładania celulozy ma wiele organizmów zaliczanych do grzybów, promieniowców, śluzowców i bakterii właściwych. Organizmy te produkują najczęściej kompleks enzymów, działających synergistycznie na natywną celulozę doprowadzając do jej rozkładu do glukozy. Istnieją również mikroorganizmy, które samodzielnie nie potrafią rozkładać natywnej celulozy, chociaż produkują enzymy zdolne do przeprowadzenia któregoś z wielu etapów rozkładu celulozy. Z punktu widzenia biotechnologii, organizmy te również mogą być cenne ze względu na potencjalną możliwość nadprodukcji danego enzymu bądź na możliwość kooperatywnego degradowania celulozy wraz z innymi celulolitycznymi szczepami [6].

Natywną celuloza występuje w postaci tak olbrzymich cząstek, że żaden z mikroorganizmów nie jest w stanie trawić jej wewnątrzkomórkowo, w związku z czym, do kontaktu enzymów z substratem dochodzi poza komórką. Nie znaczy to jednak, że wszystkie enzymy celulolityczne wydzielane są do podłoża. Nawet w organizmach, które produkują pozakomórkowe enzymy celulolityczne, duża ich część może pozostawać wewnątrz komórki, o czym zdaje się świadczyć fakt, że największą aktywność celulolityczną mają podłoża z hodowli stacjonarnych, w których znaczna liczba komórek ulega autolizie. Niektóre badania wskazują na to, że celuloza jest efektywniej trawiona, jeżeli mikroorganizmy mają możliwość bezpośredniego kontaktu powierzchni komórki z substratem [7]. Według niektórych autorów prze-

mawiałoby to za hipotezą powierzchniowego wiązania tych enzymów. Możliwe jest jednak, że po prostu w tych warunkach znacznie mniej produktów celulozy „ucieka” komórce, w związku z czym z jej punktu widzenia proces jest o wiele bardziej efektywny. Może ona szybciej rosnąć i dzielić się, tym samym rośnie celulolityczna aktywność całej hodowli, co eksperymentator interpretuje, jako stymulujący wpływ bezpośredniego kontaktu komórek na aktywność celulolityczną hodowli.

Spośród grzybów produkujących pozakomórkowe enzymy celulolityczne, do najaktywniejszych należą przedstawiciele rodzajów: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Phanerochaete*, *Polyporus*, *Myrothecium*, *Pellicularia* i *Eupenicillium*. Ponadto wiele innych grzybów potrafi rozkładać modyfikowaną celulozę ale nie potrafi trawić natywnej, krystalicznej celulozy. Do bakterii degradujących celulozę można zaliczyć spośród *Myxobacterales*: *Sporocytophaga* i *Cytophaga*, spośród *Actinomycetales*: *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* i *Thermopolyspora*. Wśród *Eubacterales* najaktywniejsze są *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacteroides* i *Ruminococcus* [6]. Dużą aktywność celulolityczną mają również niektóre szczepy *Erwinia*, które dysponując również aktywnością pektynolityczną mogą być groźnymi pasożytami roślinnymi [8]. Nakazuje to szczególną ostrożność w podejmowaniu ewentualnej decyzji o masowej produkcji tych szczepów w olbrzymich bioreaktorach. Ta sama uwaga dotyczy również wielu szczepów grzybów. Wszystkie celulolityczne szczepy mikroorganizmów, zdolne do samodzielnego przeprowadzenia lizy natywnej celulozy produkują kompleks enzymów. W kompleksie tym można wyróżnić trzy główne aktywności enzymatyczne:

- 1) Endoglukanazy (1,4- β -D-glukan 4-glukanohydrolaza, E.C.3.2.1.4),
- 2) Celobiohydrolazy (1,4- β -D-glukan celobiohydrolaza, E.C. 3.2.1.91).
- 3) β -Glukozydazy (β -D-glukozyd glukohydrolaza, E.C. 3.2.1.21).

Stwierdza się również czasem obecność czwartego typu aktywności enzymatycznej [6]:

- 4) Glukan glukohydrolazy (1,4- β -D-glukan glukohydrolaza, E.C.3.3.2.1.74).
- Enzymy tych typów były już izolowane i przynajmniej częściowo oczyszczane, i chociaż ciągle istnieją pewne kontrowersje co do ich specyficzności (wynikające prawdopodobnie z wielkiej ich różnorodności) to można jednak przedstawić ich ogólną charakterystykę w stosunku do rodzaju substratów (tabela 4). Endoglukanaza (EG) hydrolizuje wiązania β -1,4 glikozydowe

Tabela 4

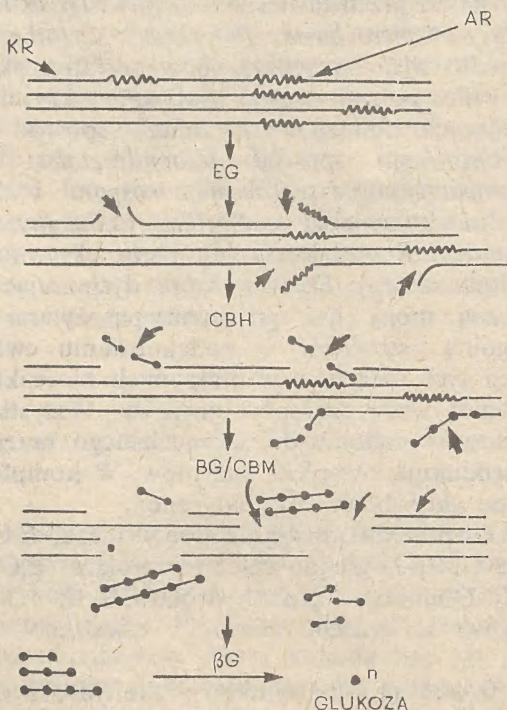
Specyficzność różnych enzymów celulolitycznych w stosunku do substratu

Enzym	Celuloza krystaliczna	CMC *	Celuloza amorficzna	Celotetroza	Celobioza
Endoglukanaza	—	+	+	+	—
Celobiohydrolaza	+	—	+	+	—
β -glukozydaza	—	—	—	+	+

*CMC — karboksymetyloceluloza

w sposób losowy, ale raczej nie w krystalicznej formie celulozy (choć istnieją doniesienia, że również może hydrolizować celulozę krystaliczną). Nie hydrolizuje celobiozy ale jest aktywna w stosunku do celodekstryn. Enzym ten jest również aktywny w stosunku do celuloz modyfikowanych, jak karboksymetyloceluloza (CMC) i hydroksyetyloceluloza (HEC). Świadczy to o raczej małej specyficzności substratowej tego enzymu.

Celobiohydrolaza (CBH) odcina cząsteczki celobiozy z nieredukujących końców łańcuchów celulozy zarówno amorficznej, jak i krystalicznej oraz



Rys. 3. Schemat celulolizy prowadzonej przez grzybowy kompleks celulolityczny, wg Montenecourt i Eveleigh [9]. EG — endoglukanaza, CBH — celobiohydrolaza, β G — β -glukozydaza, KR — regiony krystaliczne, AR — regiony amorficzne

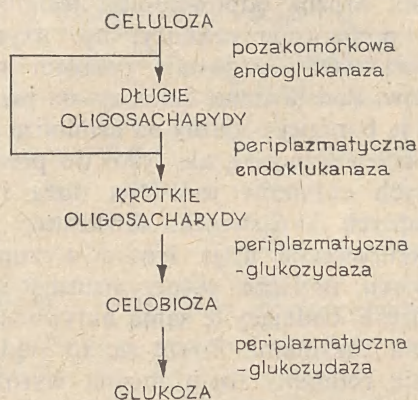
celodekstryn. Celobioza jest końcowym produktem jej aktywności i nie jest już przez nią hydrolizowana. Również podstawione formy celulozy nie są hydrolizowane przez celobiohydrolazy, co świadczy o jej większej specyficzności substratowej niż endoglukanazy. β -Glukozydaza (β G) hydrolizuje celobiozę i krótkie oligocelodekstryny, jest nieaktywna w stosunku do dłuższych celodekstryn i samej celulozy.

Glukan glukohydrolaza (GG) jest prawdopodobnie enzymem o mniejszym znaczeniu w procesach rozkładania celulozy. Odcina ona glukozę z nieredukującego końca łańcuchów celulozy. Jest aktywna również w stosunku do podstawionych form celulozy i celodekstryn.

W kompleksach enzymatycznych pochodzenia bakteryjnego nie występuje

celobiohydrolaza ale pomimo tego mogą one rozkładać krystaliczną celulozę, chociaż dwa pozostałe kompleksy enzymatyczne pochodzenia grzybowego nie miałyby takiej aktywności.

Schemat rozkładu włókien celulozy przez kompleks enzymatyczny pochodzenia grzybowego przedstawiono na rys. 3. Wszystkie aktywności kompleksu enzymatycznego są niezbędne do całkowitej degradacji celulozy. Pierwszym enzymem atakującym natywne włókno celulozy jest endoglukanaza, rozcinająca łańcuchy w amorficznych regionach. Uwolnione, nieredukujące końce łańcuchów są substratem dla celobiohydrolazy, która odcina z nich celobiozę. Głównym produktem celobiohydrolazy jest więc celobioza, ale w tym procesie powstają również krótkie oligocelosacharydy, które z kolei są substratem dla β -glukozydazy, która rozkłada zarówno celobiozę jak i oligocelosacharydy do glukozy. Według klasycznej już dzisiaj hipotezy Reese



Rys. 4. Mechanizm celulolizy bakteryjnej według Ramasamy i Verachtert [12]

i współpr. [10] rozkład celulozy przebiega podobnie jak przedstawiono na rys. 3. Hipoteza ta zakładała jednak, że we wstępnym etapie celuloza pod wpływem enzymu określonego symbolem C_1 , o niehydrolitycznych właściwościach przechodzi w formę reaktywną — podatną na hydrolityczną aktywność innych enzymów określanych równie enigmatycznym symbolem C_x . Obecnie uważa się raczej, że tym tajemniczym enzymem C_1 jest endoglukanaza, chociaż stwierdzono już udział innych, niehydrolitycznych enzymów biorących udział w reaktywacji natywnej celulozy, to jest w zwiększaniu jej podatności na działanie głównego, celulolitycznego kompleksu enzymatycznego [11].

Schemat degradacji celulozy, przedstawiony na rys. 3, dotyczy rozkładu celulozy przez grzyby, ponieważ w rozkładzie tym uczestniczy celobiohydrolaza. Bakterie rozkładają celulozę według schematu przedstawionego na rys. 4. Schemat ten pokazuje również lokalizację kolejnych etapów degradacji celulozy.

Przedstawione schematy rozkładu celulozy są bardzo ogólne i raczej nie ma kontrowersji co do ich zgodności z rzeczywistością. Istnieje jednak

wiele rozbieżnych opinii dotyczących szczegółów przebiegu kolejnych etapów, aktywności właściwych enzymów, ich inhibitorów i aktywatorów oraz optymalnych warunków ich aktywności. Rozbieżności te mają źródło w co najmniej dwóch, zasadniczych dla procesu celulozy *in vivo* i *in vitro*, przyczynach:

1. W zasadzie nie ma standardowego substratu. Jako substratu używa się natywnej celulozy (najczęściej pochodzącej z włókien bawełny), jej form potraktowanych kwasem siarkowym, fosforowym, ługami lub pochodnych podstawionych resztami karboksymetylowymi lub hydroksyetylowymi. Przede wszystkim już sama bawełna, jest produktem naturalnym, który z trudem poddaje się standaryzacji. Jej próbki różnią się między sobą zarówno długością łańcuchów celulozy w mikrofibrylach, długością mikrofibryli, długością samych włókien, a co chyba jest najistotniejsze — stopniem krystaliczności. Na ogół we włóknach bawełny 72%-80% celulozy pozostaje w stanie krystalicznym. Można odpowiednimi technikami doprowadzić do pewnej standaryzacji preparatów celulozy, np. uzyskać tylko jej formę krystaliczną, ale nawet wtedy pozostaje problem standaryzacji długości pojedynczych łańcuchów. Podstawianie celulozy, na przykład resztami karboksymetylowymi, czyni ją bardziej podatną na celulozę (zmniejszając prawdopodobnie stopień jej krystaliczności), ale tylko do pewnego etapu, ponieważ specyficzność niektórych enzymów jest zbyt duża i nie rozpoznają one podstawionych pochodnych jako swojego substratu.

2. Innego rodzaju kontrowersje mają źródło w zupełnie paradoksalnym, wydawałoby się, zjawisku. Badacze, eksperymentujący nawet z tym samym szczepem mikroorganizmu, badający tę samą aktywność enzymatyczną mogą posługiwać się różnymi enzymami. Bierze się to stąd, że chociaż w enzymatycznym kompleksie celulolitycznym można wyróżnić tylko dwie albo trzy różne aktywności enzymatyczne, to jeden szczep produkuje na ogół znacznie więcej różnych enzymów celulolitycznych — do kilkudziesięciu [13]! Poszczególne badane aktywności są więc sumą aktywności kilku a nawet kilkunastu różnych białek, które mogą się przecież różnić między sobą aktywnością właściwą, specyficznością substratową, optymalnymi warunkami trawienia itp. Poszczególne przesącze, czy nawet preparaty enzymatyczne pochodzące z tego samego szczepu mogą się natomiast różnić stosunkami ilościowymi białek w poszczególnych kompleksach enzymatycznych.

Tym należy tłumaczyć stosunkowo małą liczbę danych na temat kinetyki enzymatycznej celulaz oraz dużą ich niezgodność (dochodzi tutaj jeszcze jedna trudność — reakcja jest dwufazowa, ponieważ substrat jest ciałem stałym, a enzym pozostaje w roztworze wodnym). Bardziej zainteresowani tym tematem znajdą bliższe informacje w obszernych monografiach Lee i współpr. [14, 15].

SYNERGIZM DZIAŁANIA CELULAZ

Ze schematów przedstawiających enzymatyczny rozkład celulozy natywnej (rys. 3 i 4) wynika, że endoglukanaza dostarcza substratu celobiohydrola-

zie, a obydwu te enzymy dostarczają z kolei substratów β -glikozydazie. Zrozumiałe jest więc, że każda z tych aktywności wydzielona z całego kompleksu enzymatycznego nie jest w stanie samodzielnie prowadzić całkowitego rozkładu celulozy. W tabeli 5 przedstawiono wyniki badań Wooda i McCrae [16] nad solubilizacją bawełny, a więc wysoko krystalicznej formy celulozy. Każdy z podstawowych enzymów kompleksu celulolitycznego *F. solani* lub *T. koningii* praktycznie nie potrafi degradować tej formy celulozy, zachowując jedynie do trzech procent aktywności oryginalnego przesączu hodowli. Celobiohydrolaza i endoglukanaza razem mają 75%-82% aktywności kompleksu. Dodanie do mieszaniny tych dwóch enzymów

Tabela 5

Celuloliza (solubilizacja bawełny) przez izolowane enzymy celulolityczne i ich kombinacje.
Według Wood i McCrae [16]

Enzym	Solubilizacja bawełny (%)	
	<i>F. solani</i>	<i>T. koningii</i>
Celobiohydrolaza (CBH)	2	1
Endoglukanaza (EG)	1	1
β -Glukozydaza (β G)	1	0
CBH + EG	58	53
CBH + β G	18	20
CBH + EG + β G	71	72
Oryginalny przesącz hodowli	71	71

β -glukozydazy w stosunku odpowiadającym jej zawartości w przesączu otwiera w 100% wyjściową zdolność celulolityczną. Mogłoby się wydawać niezrozumiałe, dlaczego endoglukanaza i celobiohydrolaza nie mają początkowej aktywności solubilizacji celulozy. W procesie tym nie jest bowiem wymagany rozkład celulozy do glukozy ale do rozpuszczalnych celodekstryn i oligocelosacharydów. W tym przypadku β -glukozydaza zwiększa jednak aktywność celobiohydrolazy, usuwając ze środowiska celobiozę, która jest końcowym produktem aktywności celobiohydrolazy i jej inhibitorem [17].

Przedstawiony efekt synergistycznego działania enzymów kompleksu celulolitycznego zależy od stopnia krystaliczności celulozy, jej źródła oraz ewentualnie od stopnia jej podstawiania w pochodnych celulozy. Zależy również od źródła kompleksu enzymatycznego. Synergizm taki obserwować można również stosując kompleksy enzymatyczne pochodzące z różnych mikroorganizmów. Wspomniano już, że niektóre mikroorganizmy nie potrafią samodzielnie rozkładać natywnej celulozy, chociaż produkują niektóre enzymy celulolityczne. W naturalnych środowiskach, enzymy te wydzielane poza komórkę mogą odgrywać istotną rolę w ogólnej puli anzymatycznej kompleksu celulolitycznego [6].

SYNERGIZM SZCZEPÓW DROBNOUSTROJÓW W ROZKŁADZIE MATERIAŁÓW BOGATYCH W CELULOZĘ

Naturalne źródła celulozy zawierają zawsze dużą ilość towarzyszących polimerów — lignin i hemiceluloz. Biotechnologiczne wykorzystanie tych materiałów związane jest więc z koniecznością rozłożenia lub innego usunięcia tych związków towarzyszących w celu odsłonięcia celulozy i tym samym umożliwienia jej trawienia przez enzymy celulolityczne. Chemiczna złożoność hemiceluloz jest znacznie większa niż samych celuloz w związku z tym zrozumiały staje się fakt, że liczba enzymów zaangażowanych w rozkładzie hemiceluloz jest znacznie większa niż enzymów celulolitycznych [18]. Uważa się obecnie, że jest wręcz niemożliwe aby jeden szczep drobnoustrojów był zdolny do całkowitego rozkładu hemiceluloz zawartych na przykład w słomie. Skład chemiczny hemiceluloz różni się bowiem nie tylko w zależności od gatunku rośliny ale również od jej wieku, części i tkanki. Flora bakteryjna w żwaczu, aktywna w stosunku do hemiceluloz jest znacznie bardziej urozmaicona, i reprezentowana przez znacznie liczniejszą grupę gatunków bakterii niż flora celulolityczna [19, 20, 21]. Już tutaj rodzi się pytanie, w jaki sposób i dzięki jakim zależnościom tak duża liczba gatunków bakterii potrafi się utrzymywać w żwaczu w odpowiednich stosunkach ilościowych i kooperować w rozkładzie celuloz i hemiceluloz. Zasadniczą barierą w rozkładzie tych dwóch polimerów są ligniny. Aktywność ligninazowa nie zawsze towarzyszy aktywnościom celulolitycznym tego samego szczepu. W rozkładzie lignoceluloz muszą więc kooperować ze sobą szczepy, które potrafią rozkładać zarówno celulozy, hemicelulozy, jak i ligniny. Najaktywniejszym z dotychczas izolowanych szczepów rozkładających ligninę, jest *Phanerochaete chrysosporium* [22, 23, 24]. Ligninaza z tego szczepu jest białkiem H_2O_2 zależnym, zawierającym hem o aktywności peroksydazowej. Enzym ten prowadzi do wstępnej depolimeryzacji ligniny. Inne enzymy kompleksu ligninazowego prowadzą do dalszej degradacji lignin i metabolizmu produktów tej degradacji usuwając ewentualne inhibitory ligninolizy ze środowiska [25, 26].

Znanych jest wiele szczepów, które wykazują wszystkie trzy główne aktywności niezbędne do rozkładu naturalnych substratów bogatych w celulozę, to znaczy ligniny, hemicelulozy i samej celulozy. Szczególnie aktywne są niektóre podstawczaki. Niestety, szybkość rozkładania takich naturalnych substratów, jak drewno czy słoma nie jest jednak zbyt duża i wydaje się, że zastosowanie tych grzybów na skalę przemysłową do rozkładania naturalnych substratów, bez jakiegokolwiek ich wstępnej obróbki, nie będzie możliwe. Oczywiście, można te mikroorganizmy zastosować w przypadku, gdy z odpadów słomy lub drewna będzie się produkować kompost. Wtedy bioreaktor jest bardzo tani (zwykła pryzma, ewentualnie przykryta ziemią) a czas również nie jest parametrem drastycznie limitującym proces technologiczny. Jeżeli jednak naturalne materiały lignocelulozowe mają być substratem w drogich bioreaktorach przemysłowych, produkujących substraty do dalszych procesów biotechnologicznych, wtedy wydajność takiego bioreaktora decyduje o jego parametrach ekonomicznych.

Z przedstawionych rozważań wynika, że najefektywniej degradacja takich substratów mogłaby przebiegać w bioreaktorach typu żwacza, które w sposób niemal kompletny mogłyby degradować praktycznie każdy materiał pochodzenia roślinnego. Niestety, żwacz pozostaje niedoścignionym ideałem biotechnologa i prawdopodobnie pozostanie nim jeszcze długo. Obecnie dopiero zaczyna się badania teoretyczne i doświadczalne nad bioreaktorami, w których reakcje prowadzone będą przez więcej niż jeden szczep [27, 28]. Praca ciągła takiego bioreaktora wymaga precyzyjnego sterowania stosunkiem ilościowym między poszczególnymi szczepami, prowadzącymi kolejne etapy procesu. Na te stosunki, przy kilku szczepach w bioreaktorze, wpływa tak wiele czynników, że sam proces ciągle wymyka się jeszcze spod jakiegokolwiek teoretycznego modelowania. Na razie prowadzone są więc intensywne badania zmierzające do opracowania procesów, w którym kolejne etapy prowadzone będą przez pojedyncze szczepy o określonych aktywnościach enzymatycznych.

GENETYCZNE MODYFIKACJE SZCZEPÓW CELULOLITYCZNYCH

W większości, obecnie proponowanych procesów biotechnologicznych wykorzystujących celulozę, zakłada się używanie w samym procesie celulolizy nie bezpośrednio szczepu celulolitycznego ale oczyszczonego preparatu enzymatycznego lub surowego przesączu. Pierwszym zadaniem jest więc uzyskanie szczepu o jak najwyższej produkcji enzymów celulolitycznych. Obecnie dostępne są dwie strategie uzyskiwania takich szczepów. Pierwsza z nich polega na genetycznej modyfikacji szczepów celulolitycznych *in vivo*, to znaczy bez izolowania materiału genetycznego tych szczepów i jego obróbki metodami inżynierii genetycznej. Druga z nich zakłada obróbkę materiału genetycznego *in vitro*, przez klonowanie odpowiednich genów w szczepach o właściwościach fizjologicznych odpowiednich dla danego procesu biotechnologicznego.

Od szczepu, który mógłby być wykorzystany do przemysłowej produkcji enzymów celulolitycznych wymaga się przede wszystkim, żeby tak produkcja, jak i sama aktywność enzymów nie były hamowane przez produkty rozkładu celulozy, głównie przez celobiozę i glukozę. Biosynteza celulaz, zarówno bakteryjnych, jak i grzybowych kontrolowana jest między innymi na drodze represji katabolicznej [29, 30, 31]. Kompletna kontrola produkcji enzymów celulolitycznych i ich aktywności nie jest dotychczas poznana. Induktorami syntezy są celobioza, lektoza i sophoroza. Mechanizmy działania dwóch ostatnich nie są poznane, natomiast aktywność celobiozy jako naturalnego induktora produkcji tych enzymów jest przynajmniej teoretycznie łatwo wytłumaczalna. Szczepy celulolityczne produkują bowiem na niskim poziomie, w sposób konstytutywny, enzymy kompleksu celulolitycznego. Pojawienie się w środowisku celulozy powoduje więc jej powolną degradację, uwalniającą między innymi celobiozę. Jej obecność w środowisku komórki jest sygnałem, że pojawiło się źródło energii w postaci celulozy.

Jeżeli więc organizm jest w stanie głodu energetycznego, spowodowanego brakiem glukozy lub innych łatwo dostępnych źródeł energii, to zaczyna produkcję celulaz. Ten typ regulacji działa na poziomie pretranskrypcyjnym i być może pretranslacyjnym.

Mikroorganizmy potrafią się jednak bronić przed wykorzystaniem ich aktywności celulolitycznej przez inne drobnoustroje w ten sposób, że nadmiar glukozy powoduje degradację już wyprodukowanych glukanaz [32]. Pozwala im to prawdopodobnie na oszczędzenie celulozy na „gorsze czasy” i na zmniejszenie konkurencyjności innych niecelulolitycznych szczepów żyjących w tej samej niszy ekologicznej przez ograniczenie dostępnego dla nich źródła energii.

Genetyczne ulepszanie szczepów celulolitycznych polega więc na uodpornianiu tych szczepów na represję kataboliczną oraz uzyskiwaniu mutantów konstytutywnych, nie wymagających do produkcji celulaz żadnych induktorów. Teoretycznie możliwe jest również uzyskanie tą drogą mutantów ze zwiększoną dawką genów, warunkujących produkcję tych enzymów i wykazujących tym samym nadprodukcję odpowiednich enzymów. Dopóki jednak nie będzie znana organizacja zespołu tych genów i dokładna ich kontrola nie potrafimy określić skutków takiej amplifikacji.

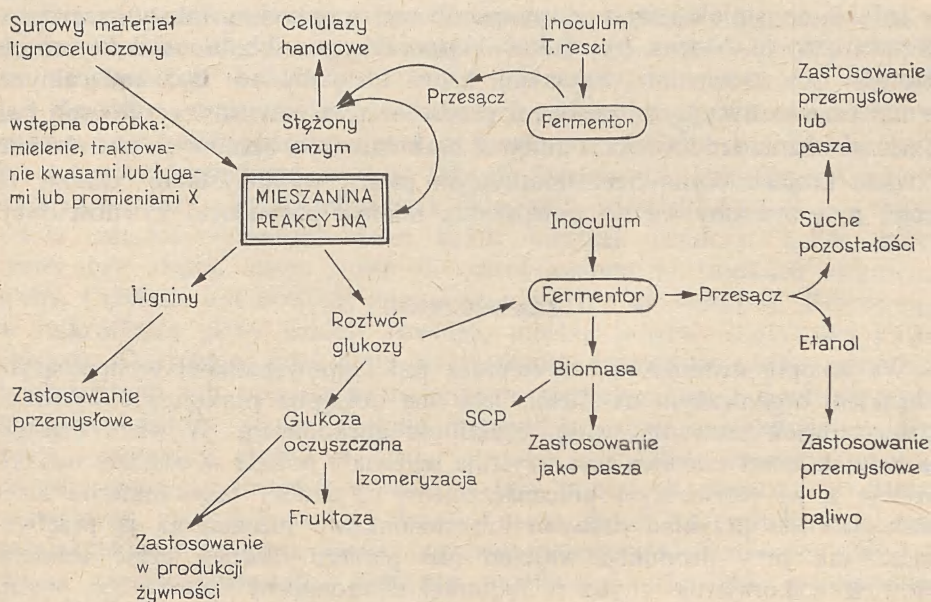
Inżynieria genetyczna otwiera znacznie większe możliwości w konstruowaniu szczepów celulolitycznych o odpowiednich właściwościach. Niestety, w obecnej chwili również w tej dziedzinie można raczej spekulować i projektować odpowiednie badania niż mówić o konkretnych wynikach. Udało się dotychczas w kilku przypadkach sklonować geny celulaz w *E. coli* [33, 34, 35, 36]. W niektórych przypadkach uzyskano ekspresję tych genów [33, 36, 37], a nawet produkty tych genów ulegały wydzielaniu z komórek [36]. Ekspresja genów kodujących celulazy w *E. coli* jest bardzo obiecująca z punktu widzenia przemysłowego, ponieważ *E. coli* rośnie znacznie szybciej od, najlepszego w obecnej chwili, celulolitycznego szczepu *Trichoderma resei* 9414. Szczególnie zachęcająco wyglądają perspektywy zastosowania *E. coli* z klonowanymi genami celulaz do produkcji pojedynczych enzymów tego kompleksu. Do procesów biotechnologicznych należałoby wtedy mieszać enzymy w odpowiednich stosunkach, aby odtworzyć kompletną aktywność celulolityczną.

Znacznie bardziej atrakcyjnie wyglądają projekty klonowania kompletnych zespołów genów w odpowiednich, szybko rosnących gospodarzach. Dokonując fuzji tych genów z odpowiednimi sekwencjami regulatorowymi można by łatwo sterować aktywnością tych genów za pomocą substancji regulatorowych nie związanych z metabolizmem celulozy. Niestety te projekty wymagają dokładniejszego poznania struktury tych genów i systemów ich regulacji. Wiadomo już, że geny kodujące celobiohydrolazy u *Trichoderma resei* mają introny [35]. Ekspresja tych genów w komórkach *E. coli* wymagać więc będzie co najmniej wycięcia tych intronów. Inną alternatywą jest skonstruowanie wektorów genetycznych, których można by użyć w naturalnych szczepach celulolitycznych i z ich pomocą konstruować szczepy o pożądanym aktywnościach enzymatycznych. Należy jeszcze dodać, że udały się już próby klonowania i ekspresji w komórkach *E. coli* genu

ksylanazy, pochodzącego z *Aeromonas* [38]. Stwarza to nadzieję, że jednoczesne osiągnięcia we wzroście wydajności procesów celulozy i hemicelulozy doprowadzą do opracowania wydajnych procesów technologicznych, wykorzystujących natywne źródła celulozy bez konieczności kosztownego wstępnego ich preparowania.

SCHEMAT PROCESU BIOTECHNOLOGICZNEGO

Na rys. 5 przedstawiono schemat biotechnologicznego wykorzystania celulozy. W schemacie tym założono, że ligniny zostaną usunięte w trakcie wstępnego przygotowania materiału bogatego w celulozę oraz, że hemicelu-



Rys. 5. Schemat użycia surowego materiału lignocelulozowego. SCP — pasza wysoko-białkowa (ang. single cell protein)

lozy i produkty ich rozkładu nie zakłócają w sposób istotny samego procesu celulozy, oczyszczania jego produktów i ewentualnego dalszego ich zastosowania. Pomimo tych upraszczających założeń schemat wcale nie jest zbyt prosty. Przedstawiono w nim najbardziej popularne założenia wykorzystania celulozy do produkcji glukozy, która mogłaby być następnie użyta do produkcji etanolu lub innych produktów pochodzenia bakteryjnego. Jak wspomniano wcześniej, podjęto również próby rozkładania celulozy w hodowlach mieszanych. W takich hodowlach, szczepy mogą kooperować w rozkładaniu celulozy, albo jeden ze szczepów może bezpośrednio wykorzystywać produkty jej rozkładu do dalszych przemian, dostarczając oczekiwanych produktów końcowych [39, 40].

Wyniki dotychczasowych badań nad możliwością ekonomicznego, biotechnologicznego wykorzystywania celulozy wskazują, że rozwiązanie tego problemu gospodarczego można szukać w dwóch kierunkach. Pierwszy z nich polega na poszukiwaniu zespołu kooperujących ze sobą szczepów drobnoustrojów, które byłyby w stanie w jednym etapie całkowicie degradować celulozę (wraz z towarzyszącymi jej polimerami) i ewentualnie przetwarzać w odpowiednim kierunku produkty jej rozkładu. Drugi kierunek, to uzyskać metodami inżynierii genetycznej szczepy, które byłyby dobrymi producentami poszczególnych enzymów celulolitycznych, produkować te enzymy, rekonstruować kompletny system celulolityczny i użyć go (według przedstawionego schematu) do degradacji celulozy.

Obydwie alternatywy wymagają sprawnych i wydajnych systemów celulolitycznych, ze względu na koszty bioreaktorów i innych instalacji. Wydaje się jednak, że istnieje jeszcze jeden sposób wykorzystania celulozy i szczepów celulolitycznych. Można by szukać kooperującego układu celulolitycznych szczepów ze szczepami wiążącymi azot. Mogłoby to być opłacalnym, niemal bezinwestycyjnym sposobem produkowania nawozów azotowych bez zanieczyszczania środowiska. Ponieważ brak nawozów azotowych jest obecnie w wielu krajach czynnikiem limitującym plony, wykorzystanie celulozy tą drogą przyczyniłoby się do polepszania bilansu gospodarki żywnościowej.

ZAKOŃCZENIE

We wstępie stwierdzono, że celuloza jest najpowszechniej występującym związkiem organicznym na Ziemi. Jest ona dostępna praktycznie wszędzie, gdzie człowiek prowadzi swoją działalność gospodarczą. W wielu dziedzinach działalności człowiek wykorzystuje materiały bogate w celulozę niejako zgodnie z jej pierwotnym przeznaczeniem, to znaczy jako materiał konstrukcyjny (na przykład drewno) lub stosunkowo nieznacznie ją przetwarzając, jak przy produkcji włókien lub papieru. Jednak część celulozy człowiek wykorzystuje chyba w najmniej ekonomiczny sposób, po prostu ją spalając. Dobrze jeszcze, jeżeli energię uzyskaną z jej spalania wykorzystuje choćby do ogrzewania, gorzej jeżeli bezmyślnie wypala ścierniska. Tak tanie źródła celulozy jak słoma, odpadki w przemyśle drzewnym, celulozopochodne śmieci, odpadki po ekstrakcji cukru z trzciny cukrowej czy niesprzedane nakłady czasopism i książek (te ostatnie według niektórych źródeł są najtańsze, tańsze nawet od śmieci, bo nie trzeba ich już segregować) wskazywałyby, że biotechnologiczne procesy utylizujące te materiały powinny dawać równie tanie produkty i półprodukty. Odpowiednie wyliczenia ekonomiczne, przeprowadzone w uprzemysłowionych, bogatych krajach zachodnich z wysoką kulturą rolną wykazują, że same procesy biotechnologiczne prowadzące do sacharyzacji celulozy lub do produkcji z niej etanolu są zbyt drogie, żeby były w obecnej chwili opłacalne. Według wyliczeń Brandta [41] z 1975 roku — roku kryzysu energetycznego na świecie — koszt opłacalnej produkcji kilograma cukru z celulozy powinien wynosić znacznie poniżej 30 centów. Tyle bowiem kosztował wtedy

kilogram cukru na giełdzie światowej. Oplącalna produkcja etanolu z cukru w tym czasie musiałaby wykorzystywać cukier w cenie poniżej ośmiu centów za kilogram! Użycie cukru do produkcji białka paszowego typu SCP (single cell protein) stwarza podobne wymogi co do jego ceny. Cena glukozy do celów spożywczych, pochodzącej z rozkładu celulozy mogłaby prawdopodobnie być znacznie niższa, ale też celuloza używana do takiej produkcji musiałaby być stosunkowo czysta oraz sama glukoza musiałaby być poddawana dalszym, dość kosztownym procesom oczyszczania. W tej chwili znacznie tańsza jest produkcja cukru do celów przemysłowych z kukurydzy i zbóż. Badania nad rozkładem celulozy i polepszaniem wskaźników ekonomicznych tego procesu są jednak prowadzone bardzo intensywnie. Uważa się bowiem, że materiały bogate w celulozę mogą być alternatywnym źródłem energii i pożywienia w krajach trzeciego świata.

Do omówienia pozostaje jeszcze jeden aspekt biotechnologicznego pełnego wykorzystania celulozy — aspekt związany z ochroną środowiska. Wydawałoby się, że produkcja etanolu z celulozy i użycie go jako dodatku do benzyny (co nie tylko zmniejsza ilość toksycznych związków ołowiu używanych do paliwa ale również polepsza spalanie benzyny w silnikach bez jakichkolwiek ich przeróbek) zmniejszy istotnie zatrucie środowiska. Przy umiarkowanym zużyciu celulozy — niewątpliwie tak. Ale jeżeli człowiek, do tych czy innych celów, zacznie wydzierać ziemi każdy kawałek celulozy, każde źdźbło trawy czy zboża, może dojść do nieobliczalnej w skutkach degradacji gleby. Celuloza jest bowiem potrzebna nie tylko człowiekowi. Równowaga w mikroflorze gleby istnieje również, między innymi dzięki recyrkulacji celulozy. Dotychczas znakomita jej większość wracała do gleby, gdzie była bezpośrednim lub pośrednim materiałem energetycznym mikroflory gleby. Nikt nie jest w stanie obecnie przewidzieć czym należałoby zastąpić braki, gdybyśmy chcieli z lasów usuwać wszystkie obumarłe szczątki drzew i poszycia. Prawdopodobnie te lasy musiałyby umrzeć. Te ostatnie rozważania, prowadzone są obecnie może nieco na wyrost, ponieważ produkcja celulozy przez rośliny znacznie przewyższa możliwości człowieka w jej zagospodarowaniu. Jednakże możliwości człowieka w dewastacji środowiska są wszystkim znane. I wystarczy tylko, że człowiek upodoba sobie tylko jeden gatunek roślin, jako specjalnego producenta taniej w technologicznym przetwarzaniu celulozy, żeby równowaga środowiska została niebezpiecznie zachwiana. Albo że intensywna eksploatacja puszczy amazońskiej, już zagrożonej działalnością człowieka okaże się ekonomicznie opłacalna.

LITERATURA

1. Sihtola H., Neimo L. — *Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose* (M. Bailey, T. -Enari i M. Linko) SITRA, str. 9, Helsinki, 1975.
2. Clark T. F. — *Pulp and paper manufacture*, T. 2. *Control secondary fiber structural board coating*, II wyd., R. G. Macdonald J. N. Franklin, McGraw Hill, New York, 1969.
3. Rydholm S. — *Pulping processes*. John Wiley and Sons, New York, 1965.

4. Kurbatov I. M. — *2nd International Peat Congress*. Leningrad, 1963. Her Majesty's Stationery Office, Edinburgh, 1968.
5. Kamikubo T., Matsuno R. — *Kagaku Kogaku* 47: 291, 1983.
6. Enari T.-M. — *Microbial cellulases. Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publisher, London, 1983 (wyd. W. M. Fogarty).
7. Hofsten B. — *Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose*. (M. Bailey, T.-M. Enari, M. Linko) str. 281, Helsinki, 1975.
8. Chambost J. P. — *Biochemical and genetic analysis of cellulolytic and pectinolytic activities of Erwinia carotovora*. Postępy badań w ramach projektu CNRS, 1983.
9. Montencourt B. S., Eveleigh D. E. — *TAPPI Annual Meeting Proceedings*. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta, Ga., str. 101, 1979.
10. Reese E. T., Siu R. G. H., Levinson H. S. — *J. Bacteriol.* 59: 485, 1950.
11. Eriksson K.-E. — *The Eckman — Days*. International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, SPCI. Stockholm, str. III: 60, 1981.
12. Ramasamy K., Verachttert H. — *J. Gen. Microbiol.* 117: 181, 1980.
13. Farkas V., Jalanko A., Kolarova N. — *Bioch. Biophys. Acta* 706: 105, 1982.
14. Lee Y.-H., Fan L. T. — *Products from alkanes, cellulose and other feedstocks*. Akademie-Verlag, Berlin, str. 101, 1981.
15. Lee Y.-H., Fan L. T., Fan L.-S. — *Products from alkanes, cellulose and other feedstocks*. Akademie-Verlag, Berlin, str. 131, 1981.
16. Wood T. M., McCrae S. I. — *Advances in Chemistry Series*. 181: 181, 1979.
17. Eriksson K.-E. — *Microbial polysaccharides and polysaccharases*. (R. C. W. Berkeley, G. W. Gooday, D. C. Ellwood) Academic Press, London, str. 285, 1979.
18. Aspinall G. O. — *Chemistry of cell wall polysaccharides*. W: *Biochemistry of plants*. T. 3, str. 473. (Wyd. J. Preiss) Academic Press, London, 1980.
19. Dehority B. A. — *J. Bacteriol.* 89: 1515, 1965.
20. Dehority B. A. — *Fed. Proc.* 32: 1819, 1973.
21. Howard B. H., Jones G., Purdom M. R. — *Biochem. J.* 74: 173, 1960.
22. Kirk T. K., Fenn P. — *Decomposer basidiomycetes*, British Mycological Society Symposium 4 (wyd. A. Frankland, L. Hedger, B. Swift) str. 67. Cambridge University Press, Cambridge, 1982.
23. Gold M. H., Kuwahara M., Chiu A. A., Glenn J. K. — *Arch. Biochem. Biophys.* 234: 353, 1984.
24. Tien M., Kirk T. K. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2280, 1984.
25. Faison B. D., Kirk T. K. — *Appl. Envir. Microbiol.* 49: 299, 1985.
26. Harvey P. J., Schoemaker H. E., Bower R. M., Palmer J. M. — *FEBS Lett.* 183: 13, 1985.
27. Bull E. T. — *Trans. Biochem. Soc., Biochemical Society London*, 12: 1137, 1984.
28. Wimpenny J. W. T. — *Trans. Biochem. Soc., Biochemical Society London*, 12: 1138, 1984.
29. Nisizawa T., Suzuki H., Nisizawa K. — *J. Biochem.* 71: 1338, 1972.
30. Sternberg D., Mandels G. R. — *J. Bacteriol.* 144: 1179, 1980.
31. Stoppok W., Rapp P., Wagner F. — *Appl. Envir. Microbiol.* 44: 44, 1982.
32. Friebe B., Holldorf A. W. — *J. Bacteriol.* 122: 818, 1975.
33. Cornet P., Millet J., Béguin P., Aubert J.-P. — *Biotechnology* 1: 589, 1983.
34. Teeri T., Salovuori I., Knowles J. — *Biotechnology* 1: 589, 1983.
35. Shoemaker S. P., Schweickart V., Lander M., Gelfand D., Kwok S., Myambo K. — *Biotechnology* 1: 691, 1983.
36. Collmer A., Wilson D. B. — *Biotechnology* 1: 594, 1983.
37. Cornet P., Tronik D., Millet J., Aubert J.-P. — *FEMS Microbiology Letters* 16: 137, 1983.
38. Kudo T., Ohkoshi A., Horikoshi K. — *J. Gen. Microbiol.* 131: 2825, 1985.

39. Cooney C. L., Wang D. I. C., Wang S. D., Gordon J., Jiminez M. — *Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 8* (wyd. C. D. Scott) Wiley, New York, str. 103, 1978.
40. Ljungdahl L. G., Carreira L., Wiegel J. — *The Ekman — Days*. International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, SPCI, Stockholm, str. IV: 21, 1981.
41. Brandt D. — *Cellulose as a chemical and energy resource*. Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5, str. 275. John Wiley and Sons, New York, 1975.

WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

MAREK WELNICKI

JACEK SKRZECZKOWSKI

Dom Handlowy Nauki PAN

Warszawa

WIROIDY — NAJPROSTSZE PATOGENY

WSTĘP

Biologia molekularna opiera się na kilku określonych założeniach epistemologicznych. Wśród nich wyliczyć należy: mechanicyzm, redukcjonizm i stałe posługiwanie się zasadą ekonomii myślenia. Wizja Delbrücka i Lurii, zgodnie z którą o cechach organizmów decydują geny mające być po prostu złożonymi cząsteczkami chemicznymi, to wizja typowo redukcjonistyczna. Epitomizacją takiego widzenia zjawisk biologicznych stało się poznanie struktury DNA i wskazanie przez Watsona i Cricka praw rządzących przechowywaniem w cząsteczce kwasu dezoksyrybonukleinowego informacji genetycznej. Ekonomia myślenia objawia się w przyjęciu iż prosty, chemiczny opis cząsteczek DNA, polegający na podaniu kolejności zawartych w nich zasad azotowych, wystarcza do zrozumienia reguł działania komórki. Takie zastosowanie „brzytwy Okhama” stało się jednym ze źródeł rozwoju biologii molekularnej i wyłonionej z niej — inżynierii genetycznej.

Formalnie prosty, liniowy zapis sekwencji genu w postaci literowej (gdzie A, G, C, T i U oznacza odpowiednio: adeninę, guaninę, cytozynę, tyminę i uracyl — zastępujący w RNA — tyminę), wystarcza po to by biolog molekularny wiedział co ten gen koduje i w jaki sposób można poddać go manipulacjom genetycznym.

Tego typu epistemologia prowadzi do tworzenia swoistych modeli idealnych i szukania ich odpowiedników w przyrodzie. Takim właśnie modelem idealnym jest pojęcie „wirusa minimalnego”. Właściwie od początku lat czterdziestych, od badań „szkoły fagowej” Delbrücka i Lurii, trwa poszukiwanie patogenu zdolnego do samopowielania się przy wykorzystaniu możliwie najmniejszej ilości informacji genetycznej. Poszukiwania te zaowocowały dostrzeżeniem zasad ekonomii wykorzystania informacji genetycznej, leżących u podłoża symetrii w wielu strukturach biologicznych, czy zjawiska zachodzenia na siebie genów. Zwieńczeniem tych poszukiwań wydawało się poznanie w końcu lat siedemdziesiątych budowy genomu RNA-bakteriofagów — złożonego z tylko czterech relatywnie krótkich genów, kierujących

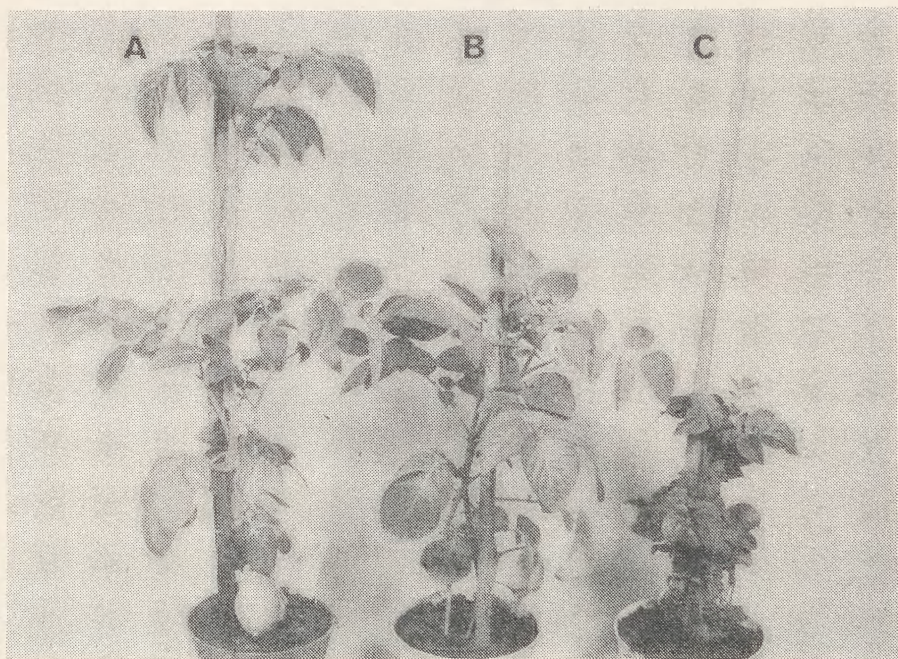
syntezą czterech białek pozwalających wirusowi na opanowanie komórki i przestawienie jej aparatu syntetyzującego na produkcję potomnych wirionów. Tymczasem ostatnie lata przyniosły nam wiadomości o istnieniu patogenów jeszcze bardziej „zminimalizowanych”. Są nimi wiroidy czyli infekcyjne cząsteczki kołowego RNA, nie wywołującego syntezy żadnych białek. Ich klasycznym przedstawicielem jest wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka — PSTV (z ang. potato spindle tuber viroid). Oprócz PSTV znamy dziś kilkanaście innych wiroidów zakażających różne gatunki roślin, np. chryzantemy, ogórki, drzewa cytrusowe, palmy kokosowe itp.

Wiroidowy RNA bezpośrednio w swojej strukturze zawiera zestaw informacji wymuszających podjęcie replikacji patogenu przez zainfekowaną komórkę, umożliwiających transport wiroida między komórkami i wywołujących głębokie zmiany chorobowe rośliny. I wszystko to — bez udziału jakichkolwiek białek syntetyzowanych przez patogen! Wydaje się, że rzeczywiście trudno już będzie znaleźć prostszy układ samopowielający się niż nieopłaszczona, krótka cząsteczka kwasu nukleinowego, namnażająca się w komórce lecz nie produkująca białek. Choćby z tego względu, warto czytelnikom „Kosmosu” przedstawić bliżej te dziwne patogeny o własnościach bliskich przewidywanym własnościom „wirusa idealnego”. Ale istnieje też po temu inny powód. Wiroidy wywołują groźne choroby roślin uprawnych, atakując między innymi ziemniaki. Wobec znaczenia tej uprawy w Polsce, warto też zdać sobie sprawę jak wyglądają perspektywy kontrolowania rozwoju tej nowej choroby w naszych uprawach.

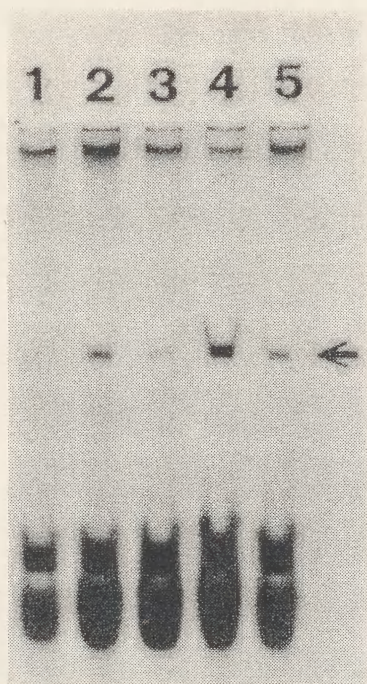
EPIDEMIOLOGIA ZAKAŻENIA WIROIDOWEGO

W latach 1917-1921 farmerzy w Maine zauważyli pojawienie się nowej choroby ziemniaka, objawiającej się zmianami pokroju rośliny. Porażone rośliny karłowaciały, ich liście były wydłużone i skręcone, łodygi niejednokrotnie — śrubowate, a bulwy mniej liczne i wrzecionowate. Wygląd porażonej rośliny przedstawiony jest na rysunku 1.

Wkrótce zorientowano się, że choroba ma charakter zakaźny i że rozprzestrzenia się szybko. By móc ją kontrolować podjęto badania nad drogami przenoszenia infekcji i próby izolacji czynnika zakaźnego. Wkrótce okazało się, że wrzecionowatość bulw ziemniaka przenoszona jest przede wszystkim mechanicznie — przez potarcie liści rośliny chorej o zdrowe. Szybkość rozprzestrzeniania się infekcji była funkcją odległości między rośliną zakażoną i zdrowymi, i malała w miarę wzrostu dystansu między roślinami. Wskazywało to, że infekcji nie przenoszą owady — często rozprzestrzeniające inne wirusy roślinne. W polu, gdzie pędy sąsiadujących roślin stykały się ze sobą, dochodziło do zakażenia 80% roślin. Gdy roślinę zakażoną izolowano siatką uniemożliwiającą kontakt ze zdrowymi, zakażenie się nie rozprzestrzeniało. Stwierdzono też, że czynnik infekcyjny przenoszony jest łatwo przez skażone sokiem chorej rośliny narzędzia rolnicze. Infekcja przenoszona była także w wyniku szczepienia infekcyjnymi zrazami, przez



Rys. 1. Objawy porażenia PSTV. A — zdrowy ziemniak odmiany Irys. B — ziemniak porażony szczepem „łagodnym”. C — ziemniak porażony szczepem „ostrym”. Zdjęcie otrzymane dzięki uprzejmości mgr S. Skrzeczowskiej, Oddział Naukowo-Badawczy Instytutu Ziemniaka — Młochów



Rys. 2. Analiza elektroforetyczna niskocząsteczkowej frakcji kwasów nukleinowych izolowanych z ziemniaka. 1 — roślina zdrowa. 2, 3, 4, 5 — rośliny w różnym stopniu porażone PSTV. Strzałka wskazuje pozycję dodatkowej frakcji RNA stwierdzonej w zakażonych roślinach

pyłek zakażonych roślin i wegetatywnie — przez bulwy. Ta droga zakażenia okazała się istotna, bowiem obecność we wczesnych stadiach wegetacji 5% zakażonych roślin w polu, powodowała zakażenie 70% bulw, przy czym wobec tego, że zakażenie rozprzestrzeniało się już po uformowaniu bulw, ich kształt był niezmieniony, a więc nie można było na podstawie obserwacji, odrzucić porażonych sadzeniaków.

Dalsze badania wskazały, że czynnik wywołujący wrzecionowatość bulw ziemniaka występuje u pewnych dziko rosnących w Ameryce *Solanaceae*. Wydaje się więc, że patogen ten utrzymuje się stale w naturalnych niszach ekologicznych, a jego rozprzestrzenianie się w naturze jest ograniczone wyłącznie przez ograniczenia arealów zasiedlanych w sposób zwarty przez naturalnych gospodarzy. W Europie, choroba pojawiła się po drugiej wojnie światowej, prawdopodobnie zawleczona z hodowli amerykańskich.

W sumie, zasadniczym czynnikiem ułatwiającym rozprzestrzenianie się infekcji okazały się współczesne metody agrotechniczne. Duże, uprawiane mechanicznie pola, w zwarty sposób obsadzone jedną odmianą ziemniaka, okazały się idealnym systemem ekologicznym ułatwiającym szybkie rozprzestrzenianie się choroby. Wrzecionowatość bulw ziemniaka jest więc właściwie jeszcze jedną chorobą cywilizacyjną, jej wystąpienie w skali masowej jest po prostu pochodną rozwoju technik rolniczych.

Trudniejszym od określenia sposobu rozprzestrzeniania się infekcji okazało się wydzielenie patogenu. Od rozpoznania infekcyjnego charakteru choroby do wydzielenia czynnika zakaźnego w postaci homogennej minęło więcej niż 50 lat! Z dzisiejszej perspektywy może to zdumiewać, ale własności wiroidów są na tyle odmienne od własności wirusów, że klasyczne metody izolacyjne wirusologii okazały się całkowicie zawodne. Dziś kiedy znamy strukturę oraz własności PSTV, w średnio wyposażonym laboratorium biochemicznym można wyizolować oczyszczony infekcyjny RNA wiroidowy w ciągu tygodnia pracy dwu osób, wiadomo bowiem jakimi metodami należy się posłużyć. Opracowywanie tych metod zajęło jednakże dziesiątki lat [1]. Nie jest to jedyny przykład w wirusologii. Do dziś właściwie trwają prace nad oczyszczaniem czynnika Scrapie [2], zidentyfikowanego jako jednostka zakaźna w 1953 r. Barierą metodyczną w obu przypadkach jest niekonwencjonalny charakter czynników zakaźnych w niczym nie podobnych do bakterii czy wirusów.

BUDOWA I WŁASNOŚCI PSTV

Przez wiele lat próby izolacji czynnika wywołującego wrzecionowatość bulw ziemniaka, kończyły się niepowodzeniem. W trakcie tych prób stwierdzono, że czynnik nie ma własności immunogennych i jest niewrażliwy na działanie proteaz, oraz nie ulega denaturacji fenolem. Sugerowało to, że czynnik nie zawiera składników białkowych. Stwierdzono również, że czynnik ma małą stałą sedimentacji (7S) i mały ciężar cząsteczkowy (ok. 40000). Co więcej czynnik ulegał inaktywacji pod wpływem RNaz, a nieczuły był na działanie DNaz. To sugerowało, że czynnik jest cząsteczką kwasu

rybonukleinowego. Podejrzenia te zostały całkowicie potwierdzone przez analizę elektroforetyczną (rys. 2).

Jak widać, w wyciągu z zakażonych roślin pojawia się dodatkowo frakcja RNA o m.cz. około 40000. Frakcję tę można z żelu wydzielić i wykazać, że zawarta w niej jest cała infekcyjność analizowanych wyciągów. Tak wydzielony preparat PSTV zbadano w mikroskopie elektronowym i stwierdzono, że występują w nim krótkie (ok. 0,05 μm) pałeczkowate cząsteczki RNA o średnicy (ok. 10 Å) charakterystycznej dla dwuniciowego heliksu RNA. Preparat poddano stopniowej denaturacji i ponownie zanalizowano w mikroskopie. Obok nielicznych form pałeczkowatych znaleziono tu formy częściowo rozplecione i wiele form kołowych o obwodzie dwukrotnie dłuższym (ok. 0,1 μm) od długości formy pałeczkowatej. Wynioskowano stąd, że cząsteczka PSTV jest kołowym RNA, nie mającym wolnych końców 5' i 3'. Jej występowanie w warunkach niedenaturujących w postaci dwuniciowej pałeczki wskazywało, że zasady azotowe jednej połowy cząsteczki są sparowane z zasadami drugiej połowy [3].

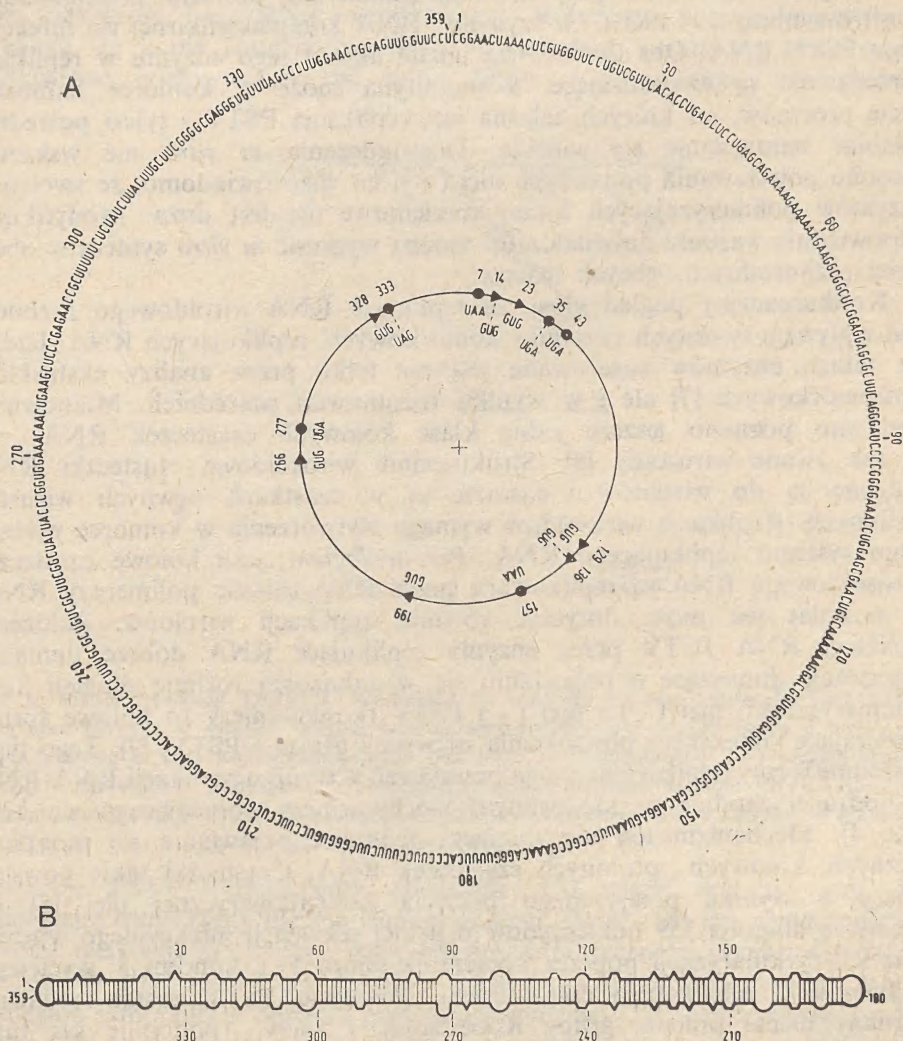
Z tego typu cząsteczką RNA o końcach połączonych ze sobą wiązaniem fosfodwuestrowym, spotkano się po raz pierwszy. Wszystkie dotąd poznane formy RNA były to cząsteczki liniowe, co było zgodne z wiadomościami na temat enzymatyki syntezy RNA.

Prowadzone jednocześnie badania nad własnościami kodującymi PSTV wykazały, że nie może on służyć jako matryca w syntezie białka, nie stymuluje bowiem inkorporacji aminokwasów w systemach *in vitro* ani nie wywołuje syntezy swoistych białek w zakażonej roślinie [4]. Wynik ten choć odtwarzalny, posiadał niewielką siłę dowodową — jak każdy wynik negatywny. Pogląd, że wiroidowy RNA nie zawiera w sobie informacji genetycznej wywołującej syntezę białka, został jednakże uprawdopodobniony przez badania nad sekwencją RNA PSTV. Sekwencja ta została podana w 1978 roku przez grupę Grossa i Sängera [5] (rys. 3A).

W RNA PSTV nie występuje kodon inicjatorowy AUG, co stawia pod znakiem zapytania możliwość związania z tego typu RNA rybosomów rozpoczynających syntezę białka. W PSTV występuje co prawda parę kodonów GUG mogących w pewnych warunkach zastąpić kodon AUG, ale za tymi prawdopodobnymi kodonami inicjatorowymi, w tej samej fazie odczytu, występują kodony terminalne — a więc rybosomy nawet gdyby zaczęły translację to i tak po zsyntetyzowaniu krótkiego peptydu odpadałyby od matrycy PSTV. Ale co więcej, cząsteczka jest kołowa, nie ma więc wolnego końca 5' niezbędnego do rozpoczęcia translacji przez rybosomy eukariotyczne. Wreszcie w informacyjnym RNA eukariotycznym rzadko występuje sąsiedztwo CG, a często — GC. Zwykle częstość sąsiedztw CG jest 10—20 razy mniejsza niż GC. W RNA wiroidowym częstości te są sobie równe. Wszystkie te fakty w pełni potwierdzają brak własności kodujących RNA wiroidowego i wskazują, że w odróżnieniu od innych poznanych dotąd genomów wirusowych, genom wiroidowy nie niesie informacji dotyczącej syntezy swoistych białek. Sugeruje to, że replikacja wiroida oparta jest całkowicie na wykorzystaniu systemów enzymatycznych komórki gospodarza.

REPLIKACJA WIROIDOWEGO RNA

Choć wydaje się oczywiste, że replikacja RNA PSTV zachodzi przy udziale enzymów zawartych w komórce gospodarza, to nie wiemy jak ten proces przebiega. Grupa Sängera proponuje, że wiroidowy RNA ulega transkrypcji pod wpływem DNA-zależnej RNA polimerazy II obecnej w komórkach roślinnych i biorącej udział w syntezie mRNA [6]. Enzym ten w komórce wiąże się z DNA i nie był uprzednio implikowany

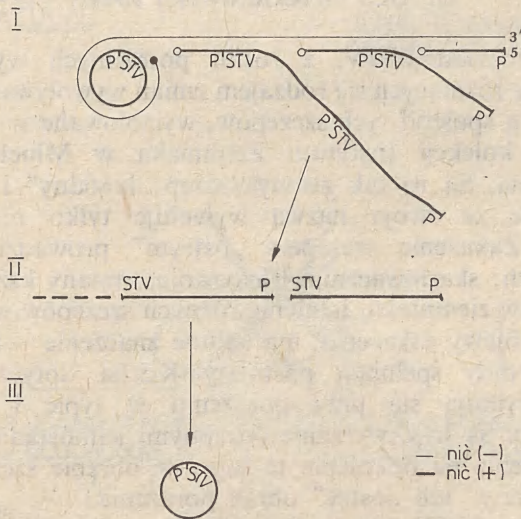


Rys. 3. Struktura genomu PSTV [wg. 5, zmodyfikowany]. A — sekwencja nukleotydowa. W wewnętrznym kole kropkami zaznaczono pozycje kodonów terminalnych, trójkątami — pozycje kodonów GUG, mogących teoretycznie inicjować syntezę białka. B — struktura II-rzędowa. Zwraca uwagę wysoki stopień sparowania zasad, narzucający cząsteczce kształt pałeczkowaty. Cyfry oznaczają numery poszczególnych nukleotydów

w replikacji RNA. Jednakże wiroidowy RNA jest wewnętrznie wysoko sparowany (rys. 3B). Częsteczka występuje więc w postaci dwuniciowego, regularnego heliksu zbliżonego kształtem do heliksu DNA. Teoretycznie więc, enzym mógłby się „mylić” i część jego mogłaby „przeskoczyć” z nici DNA na infekcyjną nić RNA PSTV, prowadząc transkrypcję patogenu. Ta hipoteza znajduje poparcie w dwu faktach doświadczalnych. Po pierwsze, namnażanie się wiroidów w roślinach jest hamowane przez α -amanitynę, antybiotyk swoiście inhibujący DNA zależną RNA polimerazę II. Po drugie, oczyszczone preparaty tej polimerazy potrafią przeprowadzić *in vitro* syntezę tzw. nici (—), czyli nici RNA komplementarnej do infekcyjnego PSTV RNA. Oba dowody na udział akurat tego enzymu w replikacji wiroida nie są wystarczające. α -Amanityna może w komórce hamować wiele procesów, od których zależna jest replikacja PSTV i tylko pośrednio osłabiać namnażanie się wiroida. Doświadczenia *in vitro* nie wskazują sposobu powstawania potomnych nici (+); co więcej wiadomo, że swoistość enzymów polimeryzujących kwasy nukleinowe nie jest duża. Modyfikując odpowiednio warunki doświadczalne można wymusić *in vitro* syntezę w obecności różnorodnych, obcych matryc.

Konkurencyjny pogląd głosi, że replikacja RNA wiroidowego zachodzi pod wpływem swoistych enzymów komórkowych, replikujących RNA. Istnienie takich enzymów sugerowane jest nie tylko przez analizy ekstraktów bezkomórkowych [7] ale i w wyniku rozumowań pośrednich. Mianowicie, niedawno poznano jeszcze jedną klasę kołowych cząsteczek RNA — są to tak zwane wirusoidy [8]. Strukturalnie wirusoidowe cząsteczki RNA zbliżone są do wiroidów i zawarte są w cząstkach pewnych wirusów roślinnych. Replikacja wirusoidów wymaga wytworzenia w komórce wirusowego systemu replikującego RNA. *Per analogiam*, jeśli kołowe cząsteczki wirusoidowego RNA są replikowane przez RNA-zależne polimerazy RNA, to postulat ten może dotyczyć również replikacji wiroidów. Założenie replikacji RNA PSTV przez enzymy replikujące RNA dobrze tłumaczy obserwacje donoszące o pojawianiu się w zakażonej roślinie długich konkatamerycznych nici (—) i nici (+) PSTV (konkatamery to liniowe formy zawierające kilkakrotne powtórzenia sekwencji genu PSTV) [9]. Tego typu pośrednie formy replikacyjne mogą powstawać w wyniku replikacji RNA-RNA zachodzącej zgodnie z tak zwanym mechanizmem obracającego się koła (rys. 4). Mechanizm ten nie tłumaczy jednakże pojawiania się monomerycznych, kołowych potomnych cząsteczek RNA. Cząsteczki takie powstać muszą w wyniku precyzyjnego pocięcia konkatamerycznej nici [5] na odcinki o długości 359 nukleotydów o pełnej sekwencji infekcyjnego wiroida oraz ich cyrkularyzacji poprzez połączenie końca 5' z końcem 3' wyciętego fragmentu. Przebieg tego etapu cyklu życiowego PSTV został niedawno poznany dzięki pracom grupy Robertsona, i znów — podobnie jak inne procesy życiowe wiroidów — ma przebieg nietypowy. Okazało się mianowicie, że cięcie konkatameru następuje w wyniku autokatalizy [10]. Konkatameryczna cząsteczka RNA niesie w swojej strukturze informację narzucającą samorzutne rozerwanie jednego z wiązań fosfodwuestrowych, zlokalizowanego najprawdopodobniej w rejonie cząsteczki PSTV, znajdującym się

między 250 i 270 nukleotydem. Stwierdzono to doświadczalnie przeprowadzając transkrypcję *in vitro* plazmidu zawierającego DNA kopię wiroidowego RNA. Kopie takie otrzymuje się za pośrednictwem odwrotnej transkryptazy, syntetyzującej na matrycy PSTV *in vitro* komplementarną nić DNA. Macierzystą nić RNA wytrawia się z uzyskanych kompleksów i dobudowuje się enzymatycznie w jej miejsce antyparalelną nić DNA. Otrzymany fragment DNA o sekwencji zgodnej z sekwencją wiroida wcielić można do plazmidu bakteryjnego, namnożyć w bakteriach i po izolacji użyć do doświadczeń. Transkrypcja takiego DNA prowadzi do powstania *in vitro* odcinków (+) RNA wiroidowego. Robertson i współpracownicy wykazali, że kopie fragmentów RNA wiroidowego produkują transkrypty pozbawione infekcyjności, zaś kopie DNA odpowiadające zdublowanej



Rys. 4. Model replikacji PSTV. I. Wnikająca do komórki kołowa cząsteczka (+) PSTV służy jako matryca w syntezie długich konkatomerycznych nici (-). Od końca 3' nici (-) rozpoczyna się synteza konkatomerycznych nici (+). II. Konkatomery (+) ulegają samo-przecięciu na odcinki o długości odpowiadającej pełnej długości genomu PSTV. III. Pod wpływem enzymów komórkowych następuje cyrkularyzacja powstałych monomerów; w komórce pojawiają się potomne cząsteczki (+) PSTV

cząsteczce PSTV — transkrypty infekcyjne. Co więcej wykazali oni, że dimeryczne transkrypty ulegają samoprzecięciu. Proces ten jest reminiscencją, również niedawno poznanego, zjawiska autokatalitycznego cięcia i składania mRNA. W 1982 roku Cech dowiódł iż cząsteczki pre-rybosomowego RNA podlegają samorzutnie obróbce post-transkrypcyjnej [11]. Prekursorowa cząsteczka RNA po transkrypcji porządkuje się przestrzennie i uporządkowanie to wymusza rozerwanie ściśle określonych, przez sekwencję nukleotydową, wiązań fosfodwuestrowych na granicy między intronami i eksonami, oraz odtworzenie nowego wiązania łączącego dwa sąsiednie eksony uprzednio oddzielone intronem. W ten sposób, bez udziału żadnych enzymów, czy

czynników białkowych, cząsteczka prekursorowego RNA „pozbywa się” intronów, tworząc poprzez łączenie eksonów właściwe, czynne w biosyntezie białka, formy RNA.

Cięcie konkatamerycznych nici (+) RNA wiroidowego zachodzi na zasadzie podobnego mechanizmu, jednakże przecięte wiązania fosfodwuestrowe na obu końcach cząsteczki nie reagują samorzutnie ze sobą. Zamknięcie cząsteczki w formę kołową — połączenie jej wolnego końca 5' z końcem 3' — następuje pod wpływem ligazy RNA, znajdującej się w komórkach gospodarza.

Wiadomości dotyczące replikacji PSTV skrótkowo przedstawia rysunek 4.

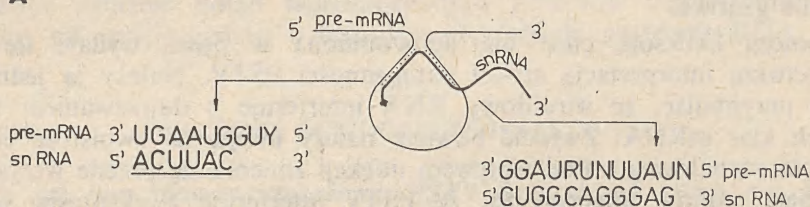
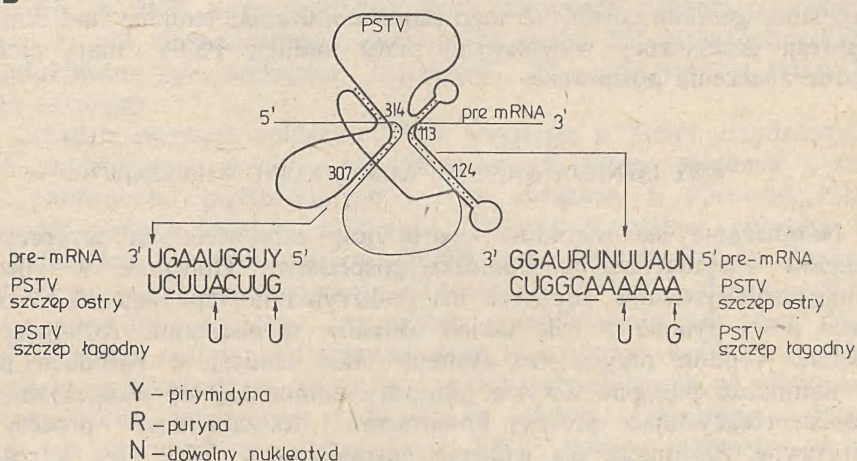
ŹRÓDŁA PATOGENNOŚCI PSTV

W trakcie prac nad PSTV, z roślin porażonych wyizolowano parę szczepów patogenu, różniących się rodzajem zmian wywoływanych w zainfekowanej roślinie. Dwa spośród tych szczepów, wyizolowane w USA i utrzymywane również w kolekcji Instytutu Ziemiaka w Młochowie, warte są bliższego omówienia. Są to tak zwany szczep „łagodny” i „ostry”. Szczep „łagodny” zgodnie ze swoją nazwą wywołuje tylko niewielkie zmiany pokroju rośliny. Zakażenie szczepem „ostrym” prowadzi do wyraźnych zmian chorobowych: skarłowacenia, liściozwoju, zmiany kształtu, uszkodzeń i spadku liczby bulw ziemniaka. Istnienie różnych szczepów wiroida, powodujących odmienne objawy zakażenia, ma istotne znaczenie — pozwala bowiem stwierdzić, że wiroidy spełniają postulaty Kocha dotyczące patogenów. Oba szczepy utrzymują się przy porażeniu w typie i nie przechodzą wzajemnie w siebie. Są więc wyraźnie odrębnymi jednostkami genetycznymi, niosącymi z pokolenia na pokolenie tę samą w obrębie szczepu, informację powodującą „łagodny” lub „ostry” obraz porażenia.

Wobec tego, że PSTV nie koduje białek mogących wywołać objawy choroby, uznać należy iż patogenność wynika z oddziaływania samego RNA wiroidowego z jakimś ciągiem metabolicznym zainfekowanej rośliny. Podobnie jak w przypadku replikacji wiroidów, istnieje kilka hipotez na temat sposobu w jaki PSTV interferuje z metabolizmem komórki. Jedna z nich głosi, że wiroidy mogą naśladować cząsteczki tRNA wiążąc się z jakimś elementem aparatu biosyntezy białka. Hipoteza ta wygląda na mało prawdopodobną, wobec tego, że wiroidowy RNA nie zakłóca syntezy białka *in vitro*. Druga hipoteza zakłada, że wiroidy współzawodnicząc z DNA komórkowym o DNA-zależną RNA polimerazę II, zakłócają transkrypcję. Wobec nikłego stężenia RNA wiroidowego w komórce, ta hipoteza nie wydaje się prawdopodobna.

Najczęściej przyjmowana jest hipoteza Dickson [12], zakładająca, że wiroidowy RNA interferuje z procesem składania genowego. Dickson zwróciła uwagę na fakt występowania w RNA wiroidowym sekwencji zbliżonych do odnajdywanych w niskocząsteczkowym, jądrowym RNA U 1 (snRNA). RNA ten ma brać udział w procesie cięcia i składania genowego (rys. 5).

Odcinki pre-mRNA mają w rejonie zetknięcia się eksonów i intronów sekwencje komplementarne do odcinków RNA U1. Uważa się, że w wyniku komplementacji między RNA U1 i rejonami pre-mRNA następuje wypełnienie intronów, umożliwiające ich prawidłowe wycięcie. Akurat te same rejonu pre-mRNA są komplementarne do pewnych odcinków RNA wiroidowego, występujących w postaci jednolitej w jednej z form konformacyj-

A**B**

Rys. 5. Model zakłócania przez PSTV procesu składania genowego [wg. 12, zmodyfikowany]. **A.** Intron występujący w pre-mRNA ulega wypełnieniu pod wpływem oddziaływania z snRNA (niskocząsteczkowy, jądrowy RNA, typu U1). Podkreśleniem wskazano odcinki snRNA komplementarne do rejonów pre-mRNA leżących na granicach eksonów i intronu. **B.** PSTV zastępuje RNA U1 w procesie wypełniania intronu. Podkreśleniem wskazano odcinki RNA PSTV komplementarne do rejonów pre-mRNA leżących na granicach eksonów i intronu. Strzałkami zaznaczono zmiany mutacyjne różniące szczep „łagodny” od „ostrego”

nych PSTV, pośredniej między całkowicie zdenaturowaną formą kołową i całkowicie uporządkowaną formą pałeczkową. Gdyby rzeczywiście RNA wiroidowy mógł zastąpić w procesie zwijania pre-mRNA w formy ulegające „splicingowi” (czyli cięciu i składaniu) właściwe fizjologicznie „spinki” jakimi są cząsteczki RNA U1, to łatwo sobie wyobrazić, że

prawidłowy przebieg procesu składania genowego mógłby zostać zakłócony po infekcji PSTV, prowadzącej do pojawienia się obcego składnika w komórkowym systemie składania genowego.

Szczep „łagodny” różni się od „ostrego” zmianami mutacyjnymi zlokalizowanymi akurat wyłącznie w tych fragmentach cząsteczki PSTV, które podejrzewane są o udział w składaniu pre-mRNA. Co więcej, zmiany takie prowadzą do osłabienia hipotetycznego hybrydu PSTV: pre-mRNA i tym samym „łagodny” szczep wiroida mógłby słabiej niż „ostry” zakłócać składanie genowe.

Hipoteza Dickson, choć nie udowodniona w pełni, wydaje się być najwłaściwszą interpretacją źródeł patogenności PSTV. Należy ją jednakże uściślić przyjmując, że wiroidowy RNA interferuje z dojrzewaniem tylko pewnych klas mRNA. Zwrócić bowiem należy uwagę na swoistość efektu porażenia wiroidowego. Pod wpływem infekcji zmienia się przede wszystkim morfologia rośliny. Sugeruje to, że PSTV interferuje z ekspresją jakiejś serii genów decydujących o kształcie organizmu gospodarza. Innymi słowy, PSTV właściwie jest czynnikiem włączającym w roślinie pewien swoisty program morfogenetyczny oparty na aktywacji lub dezaktywacji jakiegoś fragmentu genomu rośliny. Z tego punktu widzenia, badania nad zmianami ekspresji genetycznej, wywołanymi przez infekcję PSTV, mają pierwszorzędne znaczenie poznawcze.

CZY ISTNIEJĄ ANALOGI KOMÓRKOWE WIROIDÓW?

Namnażanie się wiroidów oparte jest całkowicie na wykorzystaniu układów enzymatycznych komórki gospodarza. Obecność w zdrowych komórkach systemów zdolnych do podtrzymania replikacji PSTV stawia przed nami pytanie o rolę takich układów w normalnie rozwijającej się roślinie. Trudno przyjąć, że systemy takie istnieją w roślinach po to, by namnażać patogen. Zwykle patogeny namnażają się wykorzystując po prostu preegzystujące procesy komórkowe i to zazwyczaj — procesy konstytutywne, zasadnicze dla istnienia gospodarza. Czyżby więc w roślinach istniały systemy replikacji pewnych klas niskocząsteczkowych RNA mające istotne znaczenie dla gospodarza?

W ciągu ostatnich lat dowiedzieliśmy się przynajmniej jednego — mianowicie, że w komórkach eukariotycznych istnieją względnie krótkie, kołowe cząsteczki RNA. Są to pewne introny wycięte w trakcie składania genowego. Uważa się, że introny po wycięciu ulegają degradacji i nie pełnią istotnej roli biologicznej. Pogląd taki może być jednakże poważnym uproszczeniem. Szczegółowe badania grupy Słonimskiego nad ekspresją genów mitochondrialnych, wskazują jednoznacznie, że mutacje zlokalizowane w intronach nie są obojętne genetycznie lecz wpływają na przebieg transkrypcji. Co więcej, jeden z intronów genu cytochromu b po wycięciu ulega cyrkularyzacji [13]. A więc w komórkach eukariotycznych istnieją analogi (przynajmniej strukturalne) wiroidów. Wiemy, że wiroidy namnażają się w komórce i przechodzą z komórek zakażonych do niezakażonych. Infekcja jednego

liścia prowadzi bowiem do pojawienia się PSTV w całej roślinie. Obok więc mechanizmów podtrzymujących replikację kołowego RNA, w roślinach istnieją też systemy umożliwiające jego transport międzykomórkowy. Może więc również analogi wiroidów — komórkowe, krótkie formy RNA nie niosącego informacji o syntezie białka, a mimo to regulujące rozwój rośliny — krążą między komórkami? Na ogół uważa się, że u eukariontów kwasy nukleinowe nie są przenoszone z komórki do komórki. Rozprzestrzenianie się w obrębie rośliny infekcji wiroidowej przeczy temu pogładowi i sugeruje istnienie dotąd nierozpoznanych procesów międzykomórkowej wymiany informacji opartej o transport niewielkich cząsteczek RNA.

ZNACZENIE GOSPODARCZE INFEKCJI PSTV

Jak już wspomniano, zakażenie PSTV roznosi się łatwo na dużych polach, uprawianych mechanicznie. Według danych kanadyjskich, zakażenie plantacji „ostrym” szczepem PSTV prowadzi do obniżenia plonu ziemniaka o 63% zaś szczepem „łagodnym” — o 25%. Rozprzestrzenienie PSTV w Kanadzie w 1970 roku obrazują dane dotyczące próbek pobranych losowo z 23 pól ziemniaczanych. Na ogólną liczbę 355 badanych roślin, 290 zainfekowane było szczepem „łagodnym”, 27 — „ostrym”, a tylko 38 nie było zakażone.

W Kanadzie pierwsza epidemia PSTV wystąpiła w latach trzydziestych i została zlikwidowana w końcu lat czterdziestych. Druga epidemia wystąpiła w połowie lat pięćdziesiątych i była związana z wprowadzeniem do hodowli nowych odmian ziemniaka. Dziś w Kanadzie, choroba ta została całkowicie zlikwidowana [14]. Służby agrotechniczne Stanów Zjednoczonych są w trakcie opanowywania epidemii PSTV, lecz w dalszym ciągu 1,8% sadzeniaków odrzucane jest wobec zainfekowania wiroidem [15]. Europa po wojnie została zaatakowana przez tę epidemię; kraje europejskie są w trakcie opracowywania systemów kontroli zezwalających na eliminację z hodowli roślin zakażonych i likwidację infekcji. Elementem takiego systemu jest wprowadzenie przez kraje EWG zakazu przewozu przez granice krajów wspólnoty roślinnych materiałów hodowlanych zakażonych wiroidami. Oznacza to, że w handlu międzynarodowym i w wymianie między ośrodkami agronomicznymi znaleźć się mogą tylko rośliny i materiały reprodukcyjne (m.in. sadzeniaki), w których odpowiednimi testami stwierdza się nieobecność wiroidów.

Polska jest znaczącym europejskim producentem i eksporterem ziemniaków, toteż ochrona naszego rolnictwa przed ewentualną epidemią PSTV jest istotnym problemem. O jego skali można się zorientować biorąc pod uwagę, że samych sadzeniaków, które teoretycznie powinny być wolne od wiroida, produkuje się rocznie około 1 mln ton. Niestety, dotychczas nie posiadamy pełnego rozeznania o rozmieszczeniu ewentualnych ognisk infekcji PSTV w kraju oraz informacji o stopniu zagrożenia naszych upraw.

Systemy zapobiegania rozprzestrzenianiu się infekcji opracowywane są przez Instytut Ziemniaka, gdzie już w połowie lat siedemdziesiątych grupa

kierowana przez prof. Swieżyńskiego rozpoczęła metodyczne badania nad PSTV. System ochrony oparty jest na eliminacji z hodowli materiału zakażonego. Tego typu selekcja wymaga oczywiście rozporządzania odpowiednimi metodami detekcji wiroida.

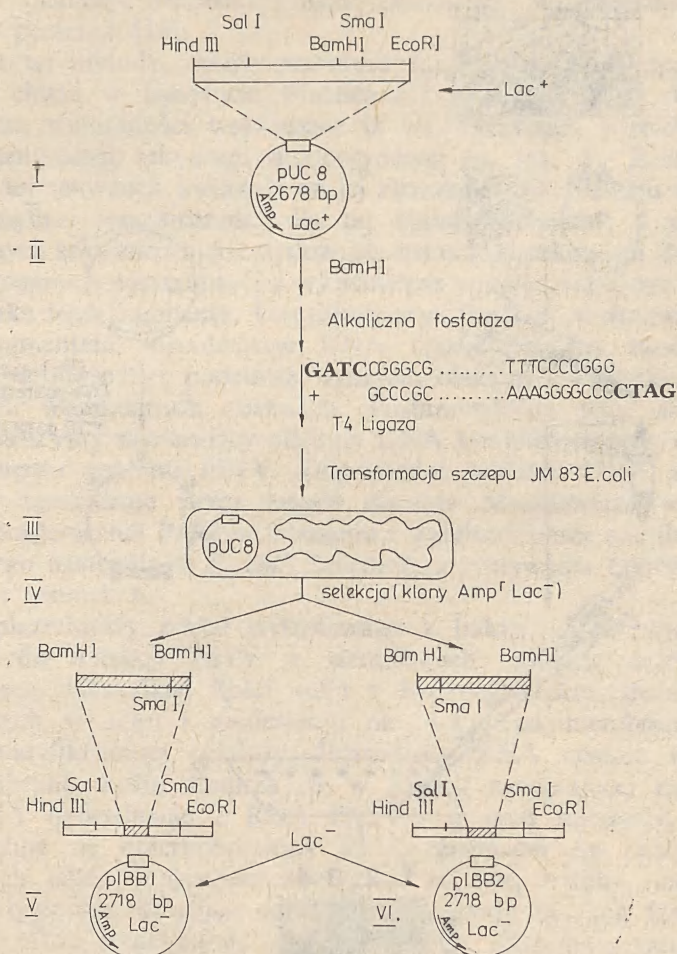
METODY DETEKCJI PSTV

W zasadzie istnieją cztery metody detekcji zakażenia PSTV. Pozornie najprostsza jest obserwacja roślin przez odpowiednio wyszkolonych inspektorów. W trakcie kilkakrotnych inspekcji pól sadzeniaków, rośliny o zmienionym pokroju są usuwane, bulwy sadzeniaków są przebierane ręcznie i podejrzane — są odrzucane. Metoda ta, wbrew oczekiwaniom dość wydajna, jest stosowana na szeroką skalę w USA. Wymaga ona jednakże oparcia się o liczne zespoły wysoce doświadczonych inspektorów. Według Slacka, inspektor wystarczająco dobrze rozpoznaje w polu porażone rośliny dopiero po około 10 latach praktyki [15]. Metoda ta pozwala na eliminację roślin zakażonych szczepem „ostрым” — gdzie zmiany pokroju roślin są wyraźne, zawodzi zaś przy zakażeniu szczepem „łagodnym” — prawie bezobjawowym. Jej stosowanie ogranicza epidemię ale jej nie eliminuje.

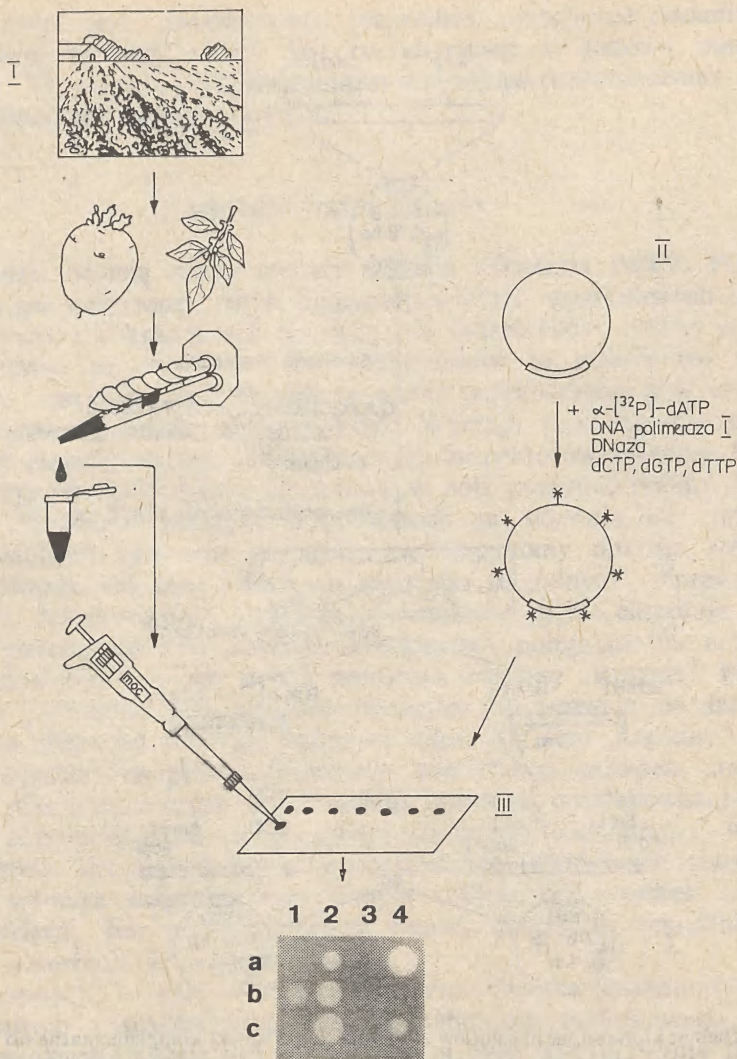
Drugą metodą jest tzw. „metoda biologiczna”, polegająca na zakażeniu sokiem wyciśniętym z rośliny siewek pomidora odmiany „Rutgers”. Przebieg choroby w pomidorze jest znacznie ostrzejszy co pozwala na łatwiejsze stwierdzenie obecności PSTV w badanym soku. Ale i tu „łagodny” szczep nie daje objawów, co prawda zapobiega nad-infekcji szczepem „ostрым”, toteż brak zakażenia „ostрым” PSTV rośliny uprzednio zainfekowanej sokiem badanym, przyjmuje się za oznakę obecności w soku „łagodnego” wiroida. Wadą metody jest jej czaso- i pracochłonność. Oznaczenie trwa kilka tygodni i wymaga zakażenia tym samym sokiem kilku siewek hodowlanych w szklarni. Jest to więc również metoda droga. Jej pracochłonność wyklucza stosowanie jej w skali masowej.

Trzeci sposób, to analiza elektroforetyczna kwasów nukleinowych wyekstrahowanych z rośliny (por. rys. 2). Obecność dodatkowego prążka RNA wskazuje na infekcję. I znów metoda ta choć szybka (wynik uzyskuje się w ciągu 2 dni) jest pracochłonna. Kombinacja obu metod — biologicznej i elektroforetycznej — jest dziś podstawą diagnostyki PSTV w Polsce i w innych krajach, np. w Holandii i Danii. Taka kombinowana metoda, choć wysoce czuła i niezawodna, oceniana jest jako droga. Wg. danych holenderskich, jedna kombinowana analiza kosztuje około 600 guldenów. Ze względu na jej pracochłonność i cenę stosuje się ją właściwie wyłącznie w badaniach cennych materiałów hodowlanych, używanych do otrzymywania nowych odmian ziemniaków.

Wreszcie czwarty sposób oznaczania polega na wykorzystaniu metod inżynierii genetycznej. Grupa Dienera i Owensa z USA skonstruowała plazmid bakteryjny, zawierający, uzyskaną w drodze odwrotnej transkrypcji, kopię DNA o sekwencji komplementarnej do PSTV. Plazmid taki wyznaczony radioaktywnym ^{32}P , hybryduje z RNA wiroidowym, hybryd można



Rys. 6. Schemat klonowania plazmidów zawierających wstawki komplementarne do RNA PSTV. **I.** Plazmid pUC8, niesie gen oporności na ampicylinę i rejon Lac^+ umożliwiające wykorzystanie przez bakterię laktozy jako źródła węgla. Fragment poprzedzający rejon Lac^+ powiększono i zaznaczono pozycje przecinane przez enzymy restrykcyjne (Hind III, Sal I, Bam HI, Sma I, Eco RI). **II.** Plazmid został przecięty enzymem Bam HI, terminalne grupy fosforanowe odtrawiono alkaliczną fosfatazą. Do mieszaniny dodano zsyntetyzowany chemicznie oligonukleotyd komplementarny do wybranego rejonu PSTV. Za pośrednictwem ligazy, wcielono oligonukleotyd do plazmidu. Otrzymanym hybrydowym plazmidem transformowano bakterie *E. coli* (szczep JM 83). **III.** Transformowane bakterie namnożono. **IV.** Klony bakteryjne odporne na ampicylinę (amp^r), nie zdolne do rozkładu laktozy (Lac^-), niosą hybrydowy plazmid. (Ekspresja rejonu Lac jest w takim plazmidzie zahamowana przez wstawienie dodatkowego syntetycznego oligonukleotydu). **V.**, **VI.** Z klonów amp^r , Lac^- wyizolowano plazmidowy DNA. Analiza restrykcyjna potwierdziła obecność wstawki o swoistej mapie cięć restrykcyjnych. Polarność wstawki jest w obu plazmidach różna



Rys. 7. Schemat wykrywania PSTV na plantacjach ziemniaków. **I.** Z plantacji pobiera się statystycznie reprezentatywne próbki bulw lub liści. Kielkowanie bulw prowadzi się w 30°C przy doświetlaniu. Dwutygodniowe kiełki lub świeże liście wyciska się na prasie serologicznej. Sok utrwała się formaldehydem. W tej postaci próbka jest trwała przez parę miesięcy i może być łatwo transportowana do laboratorium diagnostycznego. **II.** W laboratorium diagnostycznym przeprowadza się znakowanie plazmidu zawierającego wstawkę DNA komplementarną do RNA PSTV. Reakcja znakowania polega na wymianie części nieznakowanych nukleotydów adeninowych na znakowane izotopem [32 P] nukleotydy. Zachodzi ona w obecności odpowiedniego zestawu enzymów i nukleotydów. **III.** Próbkę utrwalonego soku (ok. 3 μ l) nanosi się na arkusz nitrocelulozy. Arkusz suszy się i RNA PSTV zostaje związany z podłożem pod wpływem wysokiej temperatury. Arkusz umieszcza się w mieszaninie hybrydyzacyjnej zawierającej wyznakowany i zdenaturowany plazmid. W odpowiednich warunkach, odcinek plazmidu komplementarny do RNA PSTV łączy się z wiroidowym RNA.

oddzielić i oznaczyć radioaktywność. Oczywiście w materiale zdrowym hybryd nie powstaje [16].

Wariant tej metody, oparty na nieco innym założeniu, opracowywany jest w tej chwili w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN. Wykorzystaliśmy w nim wiadomości wskazujące iż we wszystkich wiroidach istnieje rejon o identycznej sekwencji nukleotydowej (p. rys. 3). Zachowawczość ewolucyjna tej sekwencji wskazuje na jej znaczenie dla rozwoju wiroidów — a tym samym — specyficzności dla tej klasy patogenów. I rzeczywiście, wśród znanych sekwencji nukleotydowych niskocząsteczkowych RNA komórkowych, mogących występować w wyciśniętym z roślin soku, nie znaleźliśmy odpowiednika tego fragmentu. Uznaliśmy więc, że hybryd utworzony akurat z tym fragmentem wiroidowego RNA będzie wysoko swoisty i jego pojawienie się może być podstawą wykrycia obecności wszystkich szczepów wiroidowych w badanych roślinach. Postanowiliśmy więc skonstruować plazmid bakteryjny zawierający odcinek DNA komplementarny do omawianego fragmentu genomu PSTV. Odpowiedni odcinek DNA został zsyntetyzowany chemicznie przez zespół docenta Markiewicza w Zakładzie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i wcielony przez nas do plazmidu, namnożonego następnie w *E. coli*. Schemat otrzymywania takiego plazmidu przedstawia rysunek 6.

DNA plazmidowy został wyizolowany z bakterii i po wyznakowaniu ^{32}P użyty do detekcji PSTV w ziemniakach. Metoda detekcji polega na wyciśnięciu niewielkiej ilości soku z badanego liścia, denaturacji białek zawartych w soku i naniesieniu ok. 3-5 μl na membrany z odpowiednio modyfikowanej celulozy. Wiroidowy RNA zostaje wychwycony przez membranę, którą zanurza się w kąpeli zawierającej radioaktywny DNA. DNA hybryduje z RNA PSTV i w tych miejscach membrany gdzie znajduje się unieruchomiony RNA, gromadzi się radioaktywność. W miejscach gdzie naniesiono wyciąg ze zdrowej rośliny, nie stwierdza się radioaktywności. Stosując odpowiednie metody detekcji (zwykle autoradiografię) łatwo wykrywa się zakażone rośliny. Zaproponowany przez nas schemat badania wybranych plantacji przedstawia rysunek 7.

W skali masowej tego typu analizy możliwe są właściwie tylko przy zastosowaniu metody hybrydyzacyjnej. Jej zaletą jest względna taniaść, oraz możliwość analizowania licznych próbek we względnie krótkim czasie. Przeprowadzone przez nas, wspólnie z Instytutem Ziemniaka badania wskazały dobrą korelację między metodą „biologiczną” i hybrydyzacyjną w wykrywaniu szczepu „łagodnego” PSTV, a więc trudnego w diagnostyce objawowej. Wadą metody — przynajmniej we wstępnym okresie jej

Nadmiar znakowanego plazmidu odpłukuje się, wysuszony arkusz umieszcza się na kliszy rentgenowskiej i ekspozuje przez odpowiedni czas. Po wywołaniu kliszy, w miejscach gdzie naniesione próbki zawierają PSTV obserwuje się zacernienie (na przedstawionym na rysunku pozytywie — rozjaśnienie). W kolumnie 1, pozycje a, c — sok z roślin chorych, pozycja b — z rośliny zdrowej. W kolumnie 2 — wszystkie rośliny zdrowe. W kolumnie 3 — wszystkie rośliny chore. W kolumnie 4 — pozycje a, c — rośliny zdrowe, pozycja b — roślina chora

adaptacji — była rozbieżność sięgająca 40% z metodą „biologiczną” przy oznaczaniu szczepu „ostrego”. Szczep ten stanowi dla hodowców jednakże mniejszy problem, bo porażone nim rośliny wyglądają odmiennie i łatwiej je wyeliminować. Oczywiście staramy się w tej chwili podnieść czułość metody ograniczoną wyłącznie niską aktywnością specyficzną krajowych preparatów ^{32}P . Spodziewamy się wkrótce zmniejszyć stopień błędu metody; uważamy jednakże, że niezależnie od uzyskanych wyników, w przypadku szczególnie cennych rodów ziemniaka stosowanych w doświadczeniach genetycznych, detekcję wiroida powinno się prowadzić dwoma niezależnymi metodami, obarczonymi różnym błędem — biologiczną i hybrydyzacyjną.

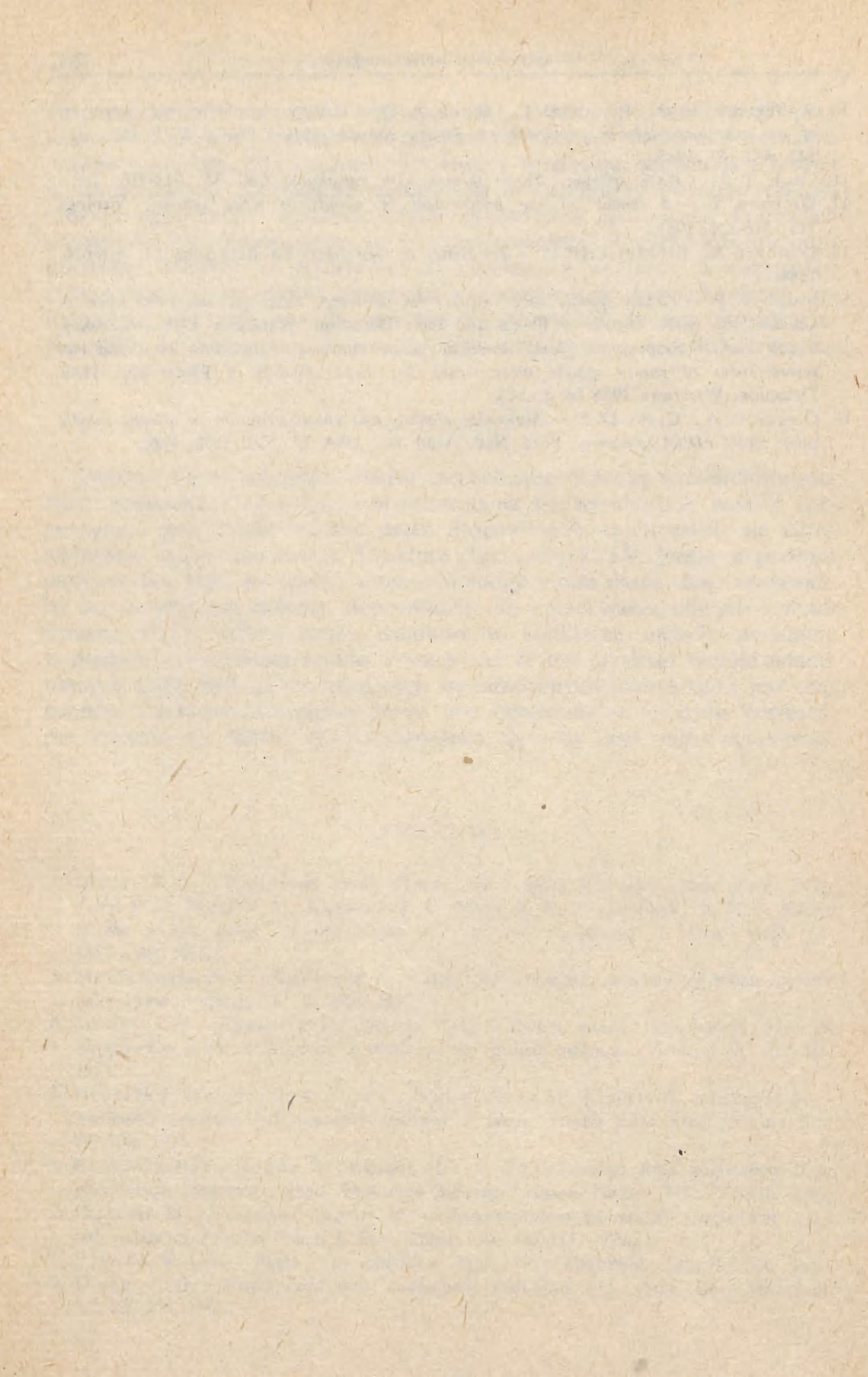
ZAKOŃCZENIE

Istnienie nowej jednostki zakaźnej wywołującej chorobę wrzecionowatości bulw ziemniaka i sposoby rozprzestrzeniania się tej choroby zostały rozpoznane i precyzyjnie opisane przez fitopatologów zajmujących się zdrowotnością upraw ziemniaka. Strukturę chemiczną PSTV, leżącą u podłoża nietypowości tego patogenu, ustalili biolodzy molekularni. Ich, wydawało by się, teoretyczne badania, doprowadziły do opracowania nowych technik detekcji PSTV, uzbrajających rolników w konkretne metody przydatne w pracach nad ochroną upraw. Wydaje się, że ten przykład współdziałania różnych gałęzi biologii posługujących się odmiennymi metodykami jest znamienny. Zjawisko biologiczne może być opisywane w różnych językach, nie zmienia to faktu, że rozpoznajemy je — by nad nim zapanować.

LITERATURA

1. Diener T. O. — *Viroids and viroid diseases*. John Wiley and Sons, New York, 1979.
2. Carp R. I., Merz P. A., Kascasak R. J., Merz G. S., Wisniewski H. M. — *Nature of the scrapie agent: current status of facts and hypotheses*. J. Gen. Virol. 66: 1357-1368, 1985.
3. McClements W. L., Kaesberg P. — *Size and secondary structure of potato spindle tuber viroid*. Virology 76: 477-484, 1977.
4. Davies J. W., Kaesberg P., Diener T. O. — *Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis*. Virology 61: 282-286, 1974.
5. Gross H. J., Domdey H., Lossow C., Jank P., Raba M., Alberty H., Sängner H. L. — *Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid*. Nature 273: 203-208, 1978.
6. RackwiJz H. P., Rohde W., Sängner H. L. — *DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA onto full-length copies*. Nature 291: 297-301, 1981.
7. Ikegami M., Fraenkel-Conrat H. — *Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase of Tobacco leaves*. J. Biol. Chem. 254: 149-154, 1979.
8. Francki R. I. B. — *Plant virus satellites*. Ann. Rev. Microbiol. 39: 151-174, 1985.
9. Diener T. O. — *Viroids and their interactions with host cells*. Ann. Rev. Microbiol. 36: 239-258, 1982.

10. Robertson H. D., Rosen D. L., Brach A. D. — *Cell-free synthesis and processing of an infectious dimeric transcript of Potato Spindle Tuber Viroid RNA*. Virology 142: 441-447, 1985.
11. Cech T. R. — *RNA splicing: Three themes with variations*. Cell 34: 713-716, 1983.
12. Dickson E. — *A model for the involvement of viroids in RNA splicing*. Virology 115: 216-221, 1981.
13. Danchin A., Słomski P. — *Les Gènes en morceaux*. La Recherche 15: 616-626, 1984.
14. Singh R. P. — *Potato spindle tuber viroid: its occurrence detection and eradication in Canada*. Int. Sem. Viroids of Plants and their Detection. Warszawa 1986 (w druku).
15. Slack S. A. — *Response of North American potato cultivars to infection with mild and severe strains of potato spindle tuber viroid*. Int. Sem. Viroids of Plants and Their Detection. Warszawa 1986 (w druku).
16. Owens R. A., Cress D. E. — *Molecular cloning and characterisation of potato spindle tuber viroid cDNA sequences*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5302-5306, 1980.



ANDRZEJ OKRUSZEK

Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych PAN,
ŁódźINŻYNIERIA ENZYMATYCZNA I WYKORZYSTANIE ENZYMÓW
JAKO PRZEMYSŁOWYCH KATALIZATORÓW

Klasyczna biotechnologia rozwinęła się w przemyśle fermentacyjnym stosującym mikroorganizmy do produkcji środków spożywczych, leków (antybiotyki) oraz masowych produktów chemicznych (alkohole, kwasy organiczne). Dalszy rozwój technik biotechnologicznych polegał na zaplanowanym stosowaniu mikroorganizmów (a właściwie zawartych w nich enzymów) oraz izolowanych enzymów do przeprowadzania określonych przemian chemicznych w dostarczanych do bioreaktora substratach. Typowym przykładem są wykonywane na dużą skalę transformacje sterydów przez mikroorganizmy, czy też produkcja L-aminokwasów z mieszanin racemicznych N-acyloaminokwasów z wykorzystaniem immobilizowanej aminoacylasy. Rozwój nowoczesnych technik rekombinacji DNA spowodował powstanie biotechnologii nowej generacji. Możliwa i realizowana jest chemiczna synteza odcinków DNA kodujących sekwencje ważnych biologicznie polipeptydów i białek. Ekspresja takich syntetycznych genów w organizmach bakteryjnych pozwala na otrzymywanie kodowanych przez nie sekwencji aminokwasowych w ilościach limitowanych jedynie wielkością bioreaktora. Otrzymywanie na tej drodze niektórych farmaceutyków takich, jak insulina czy interferon osiągnęło już etap produkcji rynkowej.

Wszystkie procesy biotechnologiczne mają jedną wspólną cechę — o ich przebiegu decydują związki chemiczne zwane enzymami, które w procesach tych spełniają funkcję katalizatorów [1]. Katalizatory to substancje, które poprzez obniżenie energii aktywacji danej reakcji umożliwiają szybsze osiągnięcie stanu równowagi. Enzymy pełnią więc funkcję biokatalizatorów, i w praktyce sterują przebiegiem wszelkich reakcji biochemicznych odbywających się w żywych organizmach. Enzymy są związkami chemicznymi o charakterze białek. Za ich działanie katalityczne odpowiedzialne jest centrum aktywne powstające w wyniku specyficznego przestrzennego połażenia łańcucha polipeptydowego. W centrum aktywnym następuje specyficzne wiązanie substratów warunkujące przebieg katalizy enzymatycznej. Niektóre enzymy do swego skutecznego działania wymagają obecności niskocząsteczkowych substancji zwanych koenzymami (kofaktorami). Typowymi koenzymami są np. trifosforan adenozyiny (ATP), dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD) i jego fosforan (NADP), dinukleotyd flawinowy (FAD) czy porfiryny.

Jakie własności enzymów przesadzają o wyjątkowej atrakcyjności procesów biotechnologicznych w porównaniu z tradycyjnymi procesami chemicznymi? Przede wszystkim wysoka skuteczność katalityczna enzymów — osiągane przez nie przyspieszenia reakcji są zwykle większe niż 10^6 razy. Oznacza to również, że reakcje wymagające podwyższonej temperatury czy podwyższonego ciśnienia w obecności enzymów mogą przebiegać z zadowalającą szybkością w łagodnych warunkach, w temperaturze pokojowej i pod normalnym ciśnieniem. Ma to szczególne znaczenie w przypadku dużych, wielofunkcyjnych cząsteczek, pozwalając uniknąć takich niepożądanych efektów ubocznych jak izomeryzacja, epimeryzacja, przegrupowanie czy też racemizacja substratów bądź produktów. Prowadzenie procesu w normalnych warunkach ciśnienia i temperatury pozwala ponadto na znaczne obniżenie kosztów aparatury i energii, niezbędnych do prowadzenia procesu. Zgodnie z kalkulacją japońskiego Ministerstwa Handlu i Przemysłu [2] wprowadzenie w pełnej skali bioreaktorów pozwoliłoby na obniżenie kosztów inwestycyjnych do jednej piątej, a nakładów na energię do połowy. Nie bez znaczenia dla ekonomiki procesów biotechnologicznych jest również fakt, że prowadzi się je na ogół w roztworach wodnych, czyli w najtańszym z możliwych rozpuszczalników.

Chiralna natura cząsteczki białka sprawia, że kataliza enzymatyczna odznacza się wysoką regio- i stereoselektywnością. Reakcje enzymatyczne prowadzą zazwyczaj do jednego z możliwych izomerów produktu, o ściśle zdefiniowanej strukturze przestrzennej. W przypadku substratu, będącego mieszaniną racemiczną, enzym najczęściej katalizuje przemianę tylko jednego enancjomeru pozostawiając drugi w stanie niezmienionym. Wynika stąd szerokie zastosowanie enzymów do rozdzielania mieszanin racemicznych (np. syntetycznych aminokwasów) oraz duży potencjał syntetyczny w transformacjach skomplikowanych cząsteczek organicznych obdarzonych licznymi centrami asymetrii.

We wcześniejszych etapach rozwoju biotechnologii, enzymy były wykorzystywane w formie natywnej, w komórkach mikroorganizmów, dla których prowadzony proces był fragmentem własnych przemian metabolicznych. Wkrótce jednak okazało się, że aktywność katalityczna danego białka nie jest nierozłącznie związana z organizmem, w którym ono występuje. W większości przypadków enzym wyizolowany z materiału biologicznego zachowuje w określonych warunkach *in vitro* swoje własności katalityczne w stosunku do substancji będących jego naturalnymi substratami. Co więcej, wykazano, że enzymy mogą katalizować *in vitro* reakcje wielu substancji, które w ogóle nie występują w organizmach żywych. Biorąc pod uwagę liczbę ponad 2000 enzymów identyfikowanych na podstawie katalizowanych przez nie reakcji [1], oraz fakt, że z nielicznymi wyjątkami (np. reakcje typu Dielsa-Aldera) istnieją enzymatyczne ekwiwalenty niemal wszystkich znanych reakcji chemicznych, enzymy stanowią potencjalnie niezwykle atrakcyjne katalizatory współczesnej syntezy organicznej [3].

Prześledźmy zatem aktualny stan przemysłowego wykorzystania enzymów w świetle ich przedstawionego wyżej potencjału syntetycznego. Tabela 1

zawiera zestawienie najważniejszych przemysłowych syntez chemicznych katalizowanych enzymami (stan z połowy 1984 roku). Analiza przytoczonych danych prowadzi do wniosku, że większość enzymów używanych do produkcji przemysłowej to hydrolazy, liazy oraz izomeryzy katalizujące stosunkowo proste procesy i nie wymagające obecności drogich kofaktorów. Dominuje przerób polisacharydów (skrobia) oraz produkcja enancjomerycznych L-aminokwasów. Rzadkie są przypadki przemysłowego wykorzystania enzymów z grupy oksydo-reduktaz czy ligaz, co wynika prawdopodobnie z wysokiego kosztu koenzymów niezbędnych do prowadzenia tych procesów enzymatycznych oraz z niedostatecznego rozwoju technik ciągłej regeneracji kofaktora. Do podobnych wniosków prowadzi przedstawiony w Tabeli 2 przegląd najważniejszych procesów przemysłowych, w których enzymy spełniają funkcje pomocnicze oraz polepszają własności użytkowe produktów. Mamy tu do czynienia z wieloma procesami z różnych dziedzin przemysłu spożywczego oraz niektórych innych rodzajów przemysłu.

Jakie zatem czynniki sprawiają, że przedstawiony ogromny potencjał syntetyczny enzymów wykorzystywany jest w nader ograniczonym zakresie? Wydaje się, że obok przyczyn subiektywnych, wynikających z niedostatecznej znajomości przez wielu chemików-organików problemów współczesnej enzymologii, istnieje szereg przyczyn obiektywnych [3]. Istotnym ograniczeniem jest np. wysoki koszt wyodrębniania i oczyszczania niektórych enzymów oraz większości kofaktorów. Wiele substancji będących przedmiotem współczesnej syntezy organicznej to hydrofobowe, słabo rozpuszczalne w wodzie substancje, których synteza pociąga za sobą konieczność tworzenia wiązań węgiel-węgiel oraz regioselektywnej funkcjonalizacji szkieletów węglowych. Substancje organiczne różnią się, niekiedy dość znacznie, od naturalnych substratów, co powoduje, że aktywność enzymów w stosunku do nich jest niewystarczająca. Istnieje wreszcie szereg problemów technicznych związanych z trwałością biokatalizatorów, możliwością ich wielokrotnego użycia oraz efektywnym wyodrębnieniem produktu z mieszaniny poreakcyjnej.

Wymienione przeszkody, stojące na drodze do szerszego stosowania enzymów w syntezie organicznej oraz w praktyce przemysłowej są usuwane przez rozwój enzymologii w kierunku określanym jako **inżynieria enzymatyczna**. Pojęcie to nie jest jednoznaczne ani ściśle zdefiniowane i wydaje się adekwatne zarówno do nowoczesnych technik przeprowadzania procesów katalizowanych przez enzymy (np. immobilizacja enzymów, kataliza enzymatyczna w rozpuszczalnikach organicznych), jak i do nowych metod modelowania własności katalitycznych enzymów poprzez zaplanowane modyfikacje strukturalne (np. metodą ukierunkowanej mutagenyzy bądź też poprzez chemiczną modyfikację struktury centrum aktywnego). W dalszej części niniejszego opracowania będą omówione główne nurty rozwoju inżynierii enzymatycznej. Należy podkreślić, że większość z nich jest jeszcze ciągle w fazie badań podstawowych. Rozległość tematu powoduje konieczność skrótowego przedstawienia i selektywnego potraktowania najbardziej istotnych, w opinii autora, kierunków rozwojowych tej nowej dziedziny molekularnej biotechnologii.

Tabela 1

Najważniejsze procesy przemysłu chemicznego wykorzystujące enzymy jako katalizatory [2, 4]

Produkt	Substrat	Enzym
Glukoza	skrobia	α -amylaza bakteryjna lub amylglukozydaza
Syropy maltozowe	skrobia	α -amylaza bakteryjna
Dekstryny	skrobia	α -amylaza bakteryjna
Zinwertowany cukier	sacharoza	inwertaza drożdżowa
	glukoza	izomeraza glukozyowa (immobilizowana)
Fruktoza	glukoza	inwertaza glukozyowa (immobilizowana)
Kwas glukonowy	glukoza	oksydaza glukozyowa
Hydrolizat białkowy	odpadowe białka	różne proteazy bakteryjne
Kwasy tłuszczowe (+ glicerol)	tłuszcze	różne lipazy
L-Aminokwasy (metoda ogólna)	N-acetylo DL-aminokwasy	aminoacylaza (immobilizowana)
L-Lizyna	DL-amino kaprolaktam (ACL)	L-ACL-hydrolaza
L-Alanina	kwas L-asparaginowy	dekarboksylaza asparaginianowa
L-Feniloalanina	kwas trans-cynamonowy	amoniakalna liaza feniloalaninowa
Kwas L-asparaginowy	kwas fumarowy	asparaginaza
L-Tryptofan	indol + L-seryna	syntetaza tryptofanowa
L-Cysteina	kwas DL-2-amino tiazolino 4-karboksylowy (ACT)	L-ACT hydrolaza
		ACT racemaza
L-Tyrozyna	fenol + pirogronian + amoniak	ligaza tyrozynowo-fenolowa
D-p-hydroksyfenyloglicyna	DL-p-hydroksyfenylohydantoina	hydantoinaza
Kwas 6-aminopenicylanowy	penicylina G (benzylowa)	acylaza penicylanowa lub amidaza penicylanowa (immobilizowana)
Kwas L-jabłkowy	kwas fumarowy	fumaraza
Kwas D- β -hydroksyizomasłowy	kwas izomasłowy	β -hydroksylaza izomasłowa
Wyższe kwasy dikarboksylowe	n-parafiny	hydrolazy, dehydrogenazy
Sterydy	prekursory sterydów	17- α -hydroksylaza sterydowa
		13- β -oksydaza sterydowa
5-Fosforan pirydoksalu	5-fosforan pirydoksyny	ekstrakt <i>Alcaligenes faecalis</i>
Kwas winowy	cis-epoksybursztynian	hydrolaza cis-epoksybursztynianowa
Akrylamid	akrylonitryl	hydrataza nitylowa
Diole	epoksydy	hydrolaza epoksydowa
Ludzka insulina	świńska insulina	proteaza bakteryjna
L-Mentol	DL-bursztynian metylu	ekstrakt <i>Rhodotorula minuta</i>
α -Hydroksykwasy	α -ketoaldehydy	glioksalaza

Tabela 2

Enzymy jako przemysłowe środki pomocnicze i uszlachetniające [4]

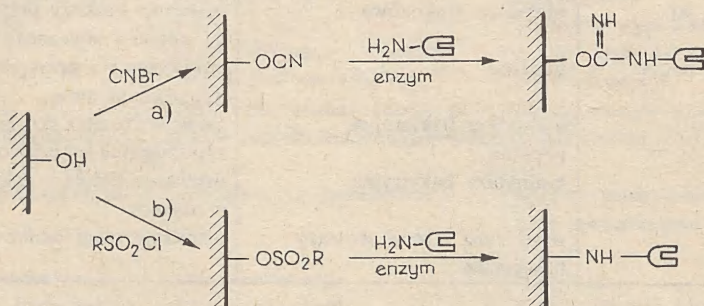
Rodzaj przemysłu	Enzym	Zastosowanie
Piekarnictwo	α -amylaza z grzybów, proteaza z grzybów, lipoksydaza	polepszanie własności pieczywa, zmiękczenie ciasta, rozjaśnianie chleba
Browarnictwo	α -amylaza bakteryjna oraz proteaza bakteryjna,	wyczerpujące słodowanie jęczmienia, rozpuszczanie domieszek zbożowych,
Cukrownictwo	amylglukozydaza, papaina, β -glukanaza α -amylaza bakteryjna, amylglukozydaza	usuwanie dekstranu z brzołki, zapobieganie mętnieniu piwa, obniżanie lepkości piwa rafinacja cukru, wyczerpująca przemiana skrobi w odpowiedni syrop
Mleczarstwo	podpuszczka penicylinaza, katalaza laktaza	ścinanie białka w mleku przy produkcji serów usuwanie śladów penicylin z mleka, usuwanie nadtlenu wodoru (środek konserwujący mleko) usuwanie laktozy z mleka używanego do produkcji lodów
Przetwórstwo owoców i warzyw	pektynaza, celulaza	klarowanie soków owocowych, zmiękczenie warzyw
Przetwórstwo jaj	oksydaza glukozowa	usuwanie glukozy przy produkcji proszku jajecznego
Przetwórstwo mięsa	papaina	zmiękczenie i przyspieszenie dojrzewania mięsa
Włókiennictwo	α -amylaza bakteryjna, papaina	usuwanie resztek skrobi z tkanin, zapobieganie kurczliwości wełny
Papiernictwo	α -amylaza bakteryjna	usuwanie skrobi i dekstryn z papieru
Pralnictwo	subtilizyna i inne proteazy bakteryjne	usuwanie plam białkowych

Immobilizacja (unieruchomienie) jest techniką wprowadzoną stosunkowo wcześniej do arsenału metod usprawniających praktyczne wykorzystanie enzymów [5]. Pierwsze doniesienia na temat adsorpcji enzymów na nośnikach ukazały się prawie 70 lat temu. Immobilizacja enzymów odbywa się poprzez ich przyłączenie do stałego nośnika w drodze adsorpcji, inkluzji w matrycy polimerycznego żelu lub kowalencyjnego związania z aktywnymi grupami nośnika. W chwili obecnej praktyczne zastosowanie znajdują dwie ostatnie z wymienionych metod.

Metoda inkluzji polega na umieszczeniu cząsteczek enzymu w matrycy polimerowej. Zazwyczaj odbywa się to przez polimeryzację hydrofilowej matrycy (najczęściej akrylamidu) w wodnym roztworze enzymu i rozdrobnienie powstałej masy polimerowej do utworzenia cząstek o pożądanej wielkości.

Inkluzja stanowi metodę ogólną, stosowaną do wszystkich białek i w zasadzie nie wywołującą zmiany ich struktury. Niekiedy jednak wolne rodniki tworzące się podczas polimeryzacji mogą niekorzystnie wpływać na aktywność enzymu. Istotną wadę stanowi fakt, że tylko cząsteczki substratów o niskich masach cząsteczkowych są w stanie dyfundować poprzez matrycę polimerową do powierzchni enzymu. Tym samym metoda inkluzji nie nadaje się do enzymów, których substratami są makrocząsteczki (np. trypsyna, rybonukleazy itp.). Szeroki rozrzut rozmiarów porów prowadzi też do częściowego uwalniania się enzymów z matrycy polimerowej. Zapobiega się temu przez międzycząsteczkowe sieciowanie białka aldehydem glutarowym. Interesującym wariantem metody inkluzji są techniki polegające na zamykaniu enzymów w mikrokapsułkach utworzonych z półprzepuszczalnych membran o jednolitej wielkości porów.

Najczęściej używaną ostatnio techniką immobilizacji jest kowalencyjne wiązanie enzymu do nośnika, przy czym stosowane są wszelkiego rodzaju nośniki naturalne (organiczne i nieorganiczne) oraz syntetyczne polimery. Jedynym warunkiem jest obecność na powierzchni nośnika wolnych grup funkcyjnych np. hydroksylowych, które po odpowiedniej aktywacji mogą w łagodnych warunkach reagować tworząc kowalencyjne wiązania z cząsteczkami białka. Najczęściej stosowane metody aktywacji polegają na reakcji grup hydroksylowych nośnika z bromocyjanem [6] lub halogenkami sulfonyowymi [7] (rys. 1). Zwłaszcza ta ostatnia metoda z użyciem, jako akty-

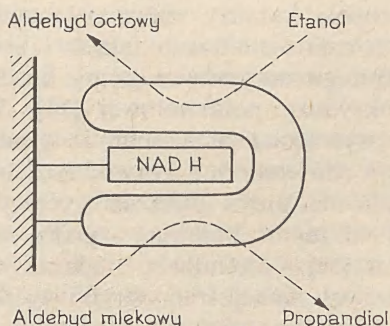


Rys. 1. Przyłączenie enzymu do nośnika zawierającego wolne grupy hydroksylowe przez aktywację bromocyjanem (a) oraz halogenkiem sulfonyowym (b)

watora, chlorku 2,2,2-trifluorometyloetanosulfonowego znajduje szerokie zastosowanie dzięki łagodniejszym warunkom wiązania enzymu oraz trwalszemu związaniu białka z nośnikiem [7].

Jakie korzyści daje unieruchomienie enzymu? Przede wszystkim istnieje możliwość łatwego oddzielenia produktu od katalizatora (przez zwykłe odsączenie lub odwirowanie) oraz możliwość wielokrotnego użycia związanego enzymu. Reakcje katalizowane immobilizowanymi enzymami są zatem o wiele łatwiejsze do kontroli i automatyzacji [8]. Wprawdzie enzymy

zawieszone na nośnikach wykazują pewne obniżenie aktywności (średnio 20% aktywności wykazywanej w roztworze), jednakże wzrost trwałości wywołany immobilizacją w pełni je kompensuje. Dodatkową stabilizację katalizatora można osiągnąć przez wielokrotne związanie enzymu z powierzchnią nośnika, bądź też przez dodatkowe przyłączenie do nośnika lub do cząsteczki białka grup stabilizujących enzym. Immobilizacja często pociąga za sobą wzrost trwałości termicznej enzymu oraz jego odporności na denaturację. Przyłączając do cząstki nośnika cząsteczki dwu lub większej liczby enzymów, których działanie jest ze sobą sprzężone, otrzymujemy system imitujący naturalne kompleksy wieloenzymatyczne. Czynnikiem entropowy



Rys. 2. Analog NAD(H) i dehydrogenaza alkoholowa koimmobilizowane na Sefarozie. Aktywność kompleksu testowano w układzie sprzężonych substratów etanol-aldehyd mlekowy [8]

sprawa, że efektywność katalityczna takich układów jest wielokrotnie większa niż wówczas, gdy enzymy są przyłączone do różnych cząstek nośnika lub gdy występują obok siebie w roztworze [9]. Np. Mosbachowi i współpracownikom [10] udało się, poprzez zorientowaną immobilizację, utworzyć enzymatyczny kompleks dwu dehydrogenaz (alkoholowej i mleczanowej) skierowanych do siebie centrami aktywnymi. Otrzymany układ umożliwia zamknięty obieg kofaktora — dinukleotydu nikotynamido-adeninowego NADH. W tej samej grupie badawczej, koimmobilizowano na Sepharozie dehydrogenazę alkoholową i analog NADH, uzyskując wysoką aktywność oksydacyjno-redukcyjną układu [11] (rys. 2). Przedstawione wyżej podejście polegające na zorientowanej immobilizacji układów wieloenzymatycznych, zwane często technologią enzymatyczną drugiej generacji [8], stanowi obecnie główny kierunek rozwoju metody immobilizacji enzymów.

Niektóre procesy katalizowane przez unieruchomione enzymy znalazły szerokie zastosowanie praktyczne. Wymienić tu można rozdział racemicznych mieszanin α -aminokwasów, odcięcie bocznego łańcucha penicyliny G w celu otrzymania kwasu 6-aminopenicylanowego, prekursora półsyntetycznych penicylin, czy produkcję syropu fruktozowego poprzez izomeryzację glukozy [12]. Warto dodać, że obok immobilizacji enzymów duże zastosowanie, w tym również praktyczne, znalazły techniki unieruchamiania mikroorganizmów, a ostatnio także komórek roślinnych i zwierzęcych.

Ważnym aspektem praktycznego wykorzystania katalitycznej własności enzymów, zwłaszcza w odniesieniu do substratów trudno rozpuszczalnych w wodzie, jest możliwość **prowadzenia reakcji enzymatycznych w rozpuszczalnikach organicznych**. Powyższe stwierdzenie może się wydawać szokujące dla niektórych biochemików. Wszak rozpuszczalniki organiczne wymieniane są w podręczniku biochemii Karlsona [13] jako jeden z czynników denaturujących białka, a więc pozbawiających enzymy ich katalitycznych właściwości! A jednak już w 1966 roku Price i współpracownicy wykazali, że enzymy: chymotrypsyna [14] i oksydaza ksantynowa [15] stosowane jako zawiesiny w rozpuszczalnikach organicznych takich, jak aceton, furan, benzen, toluen, heksan, chlorek metylenu, czterochlorek węgla czy metanol zachowują aktywność katalityczną. Koncepcję katalizy enzymatycznej w rozpuszczalnikach organicznych rozwinęli w ostatnich trzech latach Klibanov i współpracownicy w odniesieniu do szeregu enzymów z grupy lipaz [16-18], peroksydazy chrzanowej [18] oraz oksydazy polifenolowej [18]. Wykazano, że lipaza z trzustki wieprzowej, wytrącona acetonem i wysuszona w próżni do 0,5% zawartości wody, po zawieszeniu z bezwodnym 2-pentanoniem katalizuje transestryfikację heptanolu maślanem glicerolu z efektywnością niemal identyczną jak w roztworze wodnym. Podobne wyniki osiągnięto również dla lipazy drożdżowej, bakteryjnej i pleśniowej. Badania w roztworze heksanowym wykazały, że dla różnych reakcji transestryfikacji zawiesiny wysuszonych lipaz stosowały się do reguł kinetycznych Michaelisa-Mentena, przy czym aktywność enzymów zależała od pH roztworu wodnego, z którego enzym był wytrącony przed wysuszeniem. Najaktywniejsze były preparaty enzymów wytrącone przy pH optymalnym dla reakcji w roztworze wodnym. Enzymy wykazywały wysoką aktywność w całym szeregu rozpuszczalników organicznych typu węglowodorów, eterów, chlorowanych węglowodorów oraz ketonów. Lipaza z trzustki wieprzowej, po zawieszeniu w rozpuszczalniku organicznym, poza transestryfikacją może katalizować również reakcje estryfikacji, aminolizy, oksymolizy, transacylacji oraz tiotransestryfikacji. Dla niektórych z tych reakcji efekt katalityczny enzymu jest obserwowany wyłącznie w rozpuszczalniku organicznym. Reakcje estryfikacji i transestryfikacji katalizowane lipazą trzustkową oraz drożdżową w rozpuszczalnikach organicznych okazały się wysoce stereoselektywne [17]. Ich zastosowanie pozwoliło na otrzymanie wielu optycznie czynnych alkoholi, kwasów karboksylowych oraz ich estrów w skali preparatywnej.

Jak wytłumaczyć powyższe fakty pamiętając o tym, że woda uczestniczy we wszystkich niekowalencyjnych oddziaływaniach utrzymujących rodziwą, katalitycznie aktywną konformację enzymu? Zdaniem Klibanova [18] decydującą rolę w aktywności enzymu odgrywa kilka monowarstw wody, przylegających bezpośrednio do powierzchni cząsteczki białka; sfera zewnętrzna może być zastąpiona rozpuszczalnikiem organicznym. Oznacza to w wielkościach absolutnych bardzo małą ilość wody, którą trudno usunąć w warunkach liofilizacji w wysokiej próżni. Prawdopodobnie wszystkie enzymy mogą funkcjonować w rozpuszczalnikach organicznych, jeśli znajdzie się optymalne warunki takie, jak wytrącenie enzymu z roztworu o odpowiednim pH,

dostateczne rozdrobnienie wysuszonego enzymu, optymalny dobór rozpuszczalnika etc.

Z technologicznego punktu widzenia korzyści zastosowania enzymów w rozpuszczalnikach organicznych wynikają z:

- wysokiej rozpuszczalności większości związków organicznych w środowisku niewodnym;
- możliwości prowadzenia nowych reakcji, niemożliwych do zrealizowania w roztworze wodnym ze względu na restrykcje kinetyczne bądź termodynamiczne;
- nierozpuszczalności enzymów w większości rozpuszczalników organicznych, co pozwala na ich łatwy odzysk i ponowne użycie, eliminując konieczność immobilizacji.

Wymienione czynniki pozwalają rokować szybki rozwój praktycznej enzymologii zwłaszcza w odniesieniu do zastosowania enzymów jako katalizatorów reakcji organicznych.

Przedstawione metody inżynierii enzymatycznej polegają na usprawnieniu warunków prowadzenia procesów katalizowanych przez enzymy. Obecnie będą omówione metody prowadzące do zaplanowanych zmian własności katalitycznych poprzez modyfikacje strukturalne samych enzymów. Najważniejsze własności enzymów, których optymalizacja może mieć decydujące znaczenie dla ich efektywnego wykorzystania, jako przemysłowych katalizatorów to:

- szybkość maksymalna (V_{max}) i stała Michaelisa (K_n),
- termostabilność i optimum temperatury,
- optimum pH,
- trwałość w rozpuszczalnikach organicznych,
- specyficzność substratowa i procesowa,
- wymagania odnośnie kofaktora,
- odporność na enodpeptydazy,
- regulacja allosteryczna.

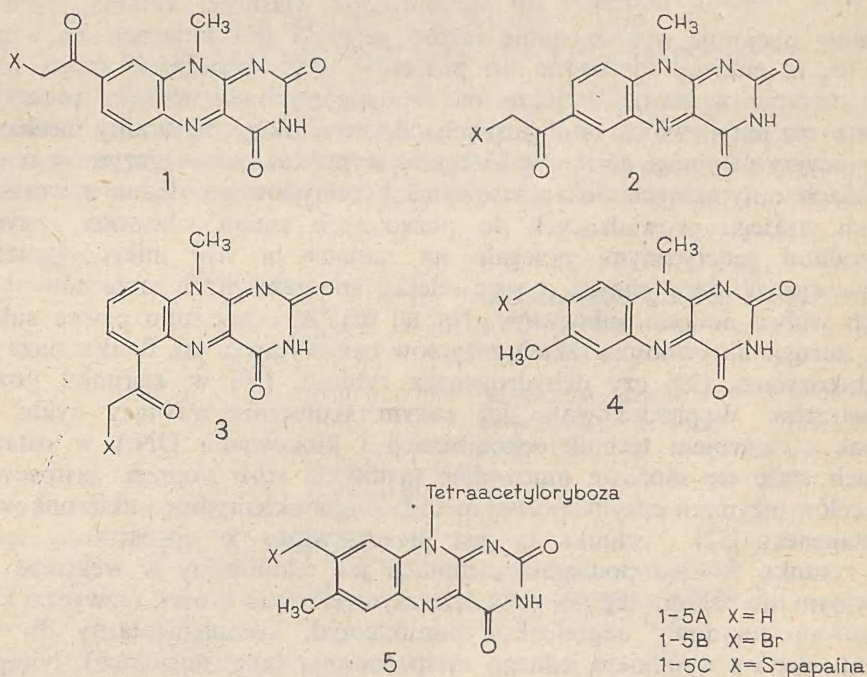
Ponieważ aktualny stan wiedzy w dziedzinie enzymologii nie pozwala na bezpośrednie skorelowanie własności katalitycznych białek z ich strukturą przestrzenną, totalna synteza enzymów mających z góry zaplanowane własności katalityczne jest obecnie niemożliwa. Stosowane podejścia wykorzystują modyfikacje struktury istniejących enzymów celem modelowania ich własności katalitycznych. Jedno z takich podejść zostało zaproponowane pod koniec lat siedemdziesiątych przez Kaisera i współpracowników [19]. Materiałem wyjściowym (matrycą) jest naturalne białko enzymatyczne mające konkretną strukturę przestrzenną. Grupy znajdujące się w centrum aktywnym lub w jego najbliższym otoczeniu są modyfikowane chemicznie a otrzymany produkt, zwany zazwyczaj **półsyntetycznym enzymem**, ma aktywność katalityczną zupełnie różną od wyjściowego. Najczęściej mutację chemiczną przeprowadza się poprzez reakcję odpowiedniego analogu koenzymu, zawierającego reaktywne grupy funkcyjne, z resztami aminokwasowymi znajdującymi się w pobliżu centrum aktywnego enzymu służącego jako matryca. Enzym matrycowy powinien odpowiadać następującym kryteriom:

- łatwa dostępność w czystej formie,

- znana struktura przestrzenna (rentgenograficznie),
- obecność odpowiednio reaktywnych grup funkcyjnych aminokwasów w pobliżu centrum aktywnego,
- znaczna zmiana własności katalitycznych w wyniku kowalencyjnej modyfikacji,
- łatwy dostęp do centrum aktywnego po przyłączeniu analogu koenzymu.

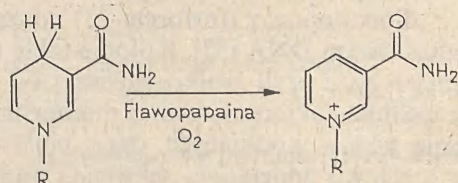
Idealnym modelem spełniającym powyższe kryteria okazał się enzym pochodzenia roślinnego z grupy proteinaz — papaina. Zarówno studia rentgenograficzne, jak i badania w roztworze wykazały, że papaina ma w centrum aktywnym znacznych rozmiarów kieszeń, w której odbywa się wiązanie substratów [20]. Znajdująca się w bezpośrednim sąsiedztwie reszta cysteiny (Cys 25) jest odpowiedzialna za aktywność hydrolityczną enzymu. Analiza struktury przestrzennej papainy, metodą grafiki komputerowej, wykazała, że kowalencyjne przyłączenie cząsteczki koenzymu do grupy tiolowej Cys 25 nie powinno przesłaniać dostępu do miejsca wiążącego substraty, a obecność w ramieniu utrzymującym koenzym grupy karbonylowej może, poprzez wiązania wodorowe z grupami NH aminokwasów Cys 25 i Gln 19, utrzymywać cząsteczkę kofaktora w pozycji korzystnej dla przebiegu procesu katalizy [21]. Jako koenzymy do modelowych badań chemicznej modyfikacji papainy wybrano pochodne flawinowe, które są odpowiedzialne za aktywność katalityczną wielu enzymów z grupy oksydo-reduktaz i mogą brać udział w reakcjach tak od siebie różnych, jak przeniesienie jonu wodorkowego czy hydroksylacja. Same flawiny, oddzielone od reszty białkowej, też wykazują pewną aktywność katalityczną. Zsyntetyzowano pięć flawopapain 1C-5C poprzez alkilowanie grupy tiolowej Cys 25 odpowiednimi bromopochodnymi flawin 1B-5B (rys. 3). Otrzymane półsyntetyczne flawopapainy były testowane na aktywność oksydacyjną, stosując N¹-alkilo-1,4-dihydronikotynamidy jako modelowe substraty (rys. 4). Analiza metodą grafiki komputerowej wykazała, że tego typu substraty będą dobrze akceptowane przez kieszeń wiążącą enzymu. Reakcje były przeprowadzone w warunkach aerobowych z kontrolą kinetyczną oraz stereochemiczną. Wykazano, że flawopapainy 4C i 5C wykazują praktycznie nieznaczący efekt katalityczny wyrażony 3-krotnym wzrostem szybkości reakcji w stosunku do odpowiednich pochodnych flawinowych nie związanych z białkiem 4A i 5A. Znacznie lepsze wyniki osiągnięto w grupie flawopapain zawierających grupę karbonylową w pobliżu wiązania flawiny z resztą tiolową papainy. Półsyntetyczny enzym 1C wykazywał aktywność katalityczną porównywalną z najbardziej aktywnymi oksydo-reduktazami występującymi w przyrodzie, natomiast enzym 2C był porównywalny w swej aktywności z średnio czynnymi naturalnymi enzymami flawinowymi [22, 23]. Enzym 3C okazał się słabym katalizatorem o aktywności porównywalnej z aktywnością modelowej flawiny 3A. Porównanie aktywności katalitycznej flawopapain 1C-3C wykazuje, że już niewielkie zmiany strukturalne w obrębie kowalencyjnie związanej cząsteczki kofaktora flawinowego mogą spowodować jego lepsze dopasowanie do kieszeni wiążącej substraty w enzymie matrycowym, co objawia się w dramatycznym wzroście zdolności katalitycznej półsyntetycznego enzymu. Warto w tym miejscu jeszcze raz podkreślić, że enzym matrycowy (papaina) jest typowym enzymem

hydrolitycznym i dopiero odpowiednie przyłączenie koenzymu flawinowego spowodowało jego aktywność oksydo-redukcyjną. Badania stereochemiczne,



Rys. 3. Półsyntetyczne flawopapainy

obejmujące zarówno substraty nikotynamidowe znaczone izotopami wodoru w pozycji 4 pierścienia dihydropirydynowego, jak i pochodne zawierające chiralne centra węglowe w grupie amidowej wykazały znaczną stereoselektywność działania flawopapain 1C i 2C [24].



Rys. 4. Modelowy układ testujący aktywność flawopapain. R = etyl, propyl, benzyl, cykloheksyl

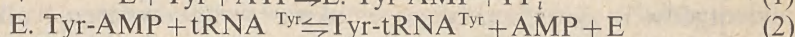
Oprócz opisanej metody podejmowane były także inne próby chemicznej modyfikacji enzymów poprzez zamianę funkcji hydroksylowej w centrum aktywnym na grupę tiolową (bądź odwrotnie), prowadzące do modyfikacji Ser→Cys (bądź Cys→Ser). Niestety, otrzymane półsyntetyczne enzymy takie, jak „tiolo-subtilizyna” [25], „tiolotrypsyna” [26] czy „hydroksypapaina”

[27] wykazywały aktywność katalityczną znacznie obniżoną w stosunku do ich naturalnych prekursorów.

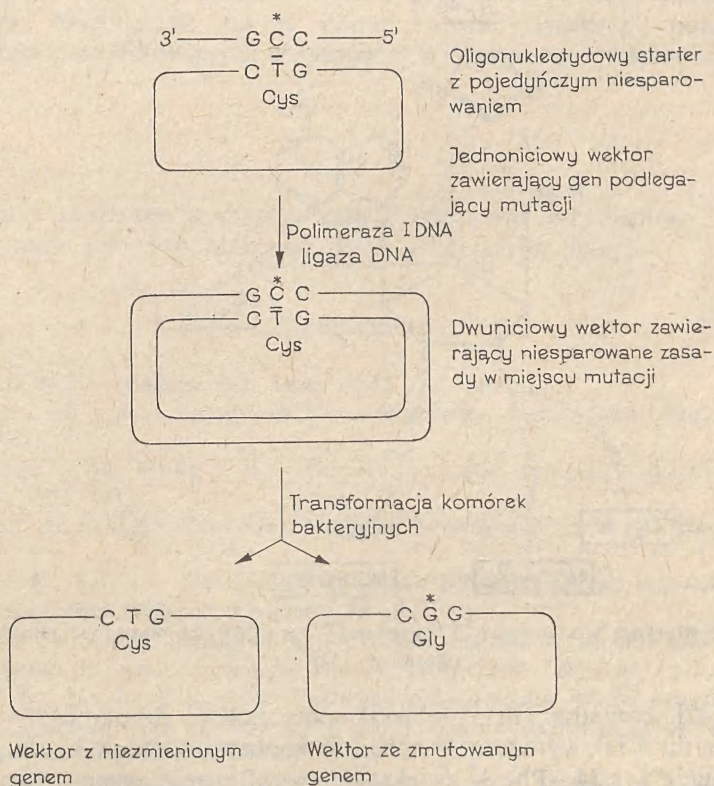
Inne możliwe podejście do modelowania własności katalitycznych enzymów obejmuje wykorzystanie metod genetyki molekularnej. Ze względu na to, iż enzymy niezbędne do procesów technologicznych mogą różnić się znacznie w swojej naturze od występujących *in vivo*, a procesy te często nie mają swoich biologicznych odpowiedników, naturalny mechanizm ewolucyjny nie mógł działać w kierunku wyprodukowania enzymów o własnościach optymalnych do zastosowania przemysłowego. Jedną z wcześniejszych strategii prowadzących do pożądanych zmian własności enzymów metodami genetycznymi polegała na mutacji *in vivo* mikroorganizmów zawierających dany enzym, a więc selekcji spontanicznych mutantów aktywnych wobec nowych substratów. Na tej drodze odniesiono pewne sukcesy np. sterując aktywnością takich enzymów bakteryjnych, jak β -laktamaza [28], β -glukozydaza [29] czy dehydrogenaza rybitolu [30] w kierunku nowych substratów. Wyprodukowano też enzym skutecznie trawiący nylon [31]. Wraz z rozwojem technik rekombinacji i klonowania DNA w ostatnich latach stało się możliwe mutowanie genów *in vitro* poprzez zastosowanie do celów inżynierii enzymatycznej metody oligonukleotydowo-ukierunkowanej mutagenyzy [32]. Technika ta jest przedstawiona w uproszczony sposób na rysunku 5. Gen podlegający mutacji jest klonowany w wektorze bakteryjnym lub bakteriofagowym. Należy zsyntetyzować krótki, zazwyczaj kilkunasto-nukleotydowy oligodeoksyrybonukleotyd, komplementarny do fragmentu genu z wyjątkiem jednego niesparowania (ang. mismatch). Niesparowanie jest tak zaprojektowane, aby zmutować kodon aminokwasu będącego celem mutacji (np. cysteiny CTG) w kierunku kodonu pożądanego aminokwasu (np. glicyny CGG). Taki oligonukleotyd jest hybrydyzowany do jednoniciowego wektora i używany jako starter do replikacji katalizowanej przez polimerazę I DNA w obecności ligazy DNA i mieszaniny czterech trifosforanów deoksyrybonukleotydów. Otrzymanym heterodupleksem DNA (formy „dzikiej” i zmutowanej) transformuje się bakterie. Zmutowane kolonie są identyfikowane metodą hybrydyzacji typu dot-blot, w której mutageny starter znakowany radioizotopowo (fosforem-32) wiąże się preferencyjnie ze zmutowanym, jednoniciowym DNA [33]. Kolonie takie namnaża się uzyskując ekspresję zmutowanego genu czyli białko zawierające np. glicynę w miejscu cysteiny. Tak więc technika ukierunkowanej mutagenyzy pozwala uzyskiwać zaplanowane mutacje genów kodujących dane białko, a co za tym idzie otrzymywać białko o celowo zmienionej sekwencji aminokwasów. Jednak by potencjał tej metody był w pełni wykorzystany niezbędne są informacje o budowie centrum aktywnego enzymu uzyskane technikami rentgenografii strukturalnej.

Zastosowanie metody ukierunkowanej mutagenyzy do celów inżynierii enzymatycznej najlepiej ilustrują prace Fershta i Wintera nad syntetazą tyrozylowego tRNA z *B. stearothermophilus* [34]. Enzym ten katalizuje przyłączenie tyrozyny do tRNA w dwustopniowej reakcji, w której najpierw tyrozyna jest aktywowana przez ATP, dając związany z enzymem adenylan

tyrozyny (równ. 1), który następnie jest atakowany przez cząsteczkę tRNA, dając aminoacylo-tRNA (równ. 2).



Otrzymanie syntetazy w formie krystalicznej umożliwiło wykonanie badań rentgenostrukturalnych z dokładnością do 2,1 Å [35]. Niezwykle cenne informacje uzyskano zwłaszcza dla krystalicznego preparatu enzymu, do którego wprowadzono w drodze dyfuzji pewne ilości tyrozyny oraz ATP.

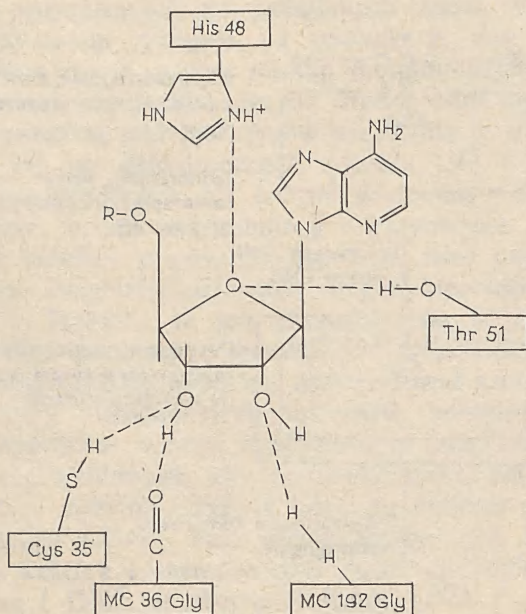


Rys. 5. Oligonukleotydowo ukierunkowana mutageniza

Otrzymana mapa centrum aktywnego wiążącego cząsteczkę utworzonego *in situ* związku pośredniego — adenyłanu tyrozyny — pozwoliła krystalografom zlokalizować niektóre możliwe wiązania wodorowe w otrzymanym kompleksie (rys. 6). Z pomocą komputerowego modelu graficznego enzymu można było wówczas przeanalizować wpływy podstawienia poszczególnych aminokwasów innymi w obrębie centrum aktywnego na oddziaływania enzymu z cząsteczkami substratów i związku pośredniego.

Sekwencja nukleotydowa genu syntetazy została określona z klonu otrzymanego z pomocą wektora pBR322 [36]. Eksperymenty mutagenety

zostały przeprowadzone z genem enzymu, sklonowanym w wektorze bakteriofagowym M13 z użyciem szczepu bakterii *E. coli* JM101. Ponieważ mutacji można jednocześnie poddać nie tylko jeden, ale i większą liczbę nukleotydów w genie, każdy z aminokwasów kodowanego białka może być zmieniony na dowolny, inny aminokwas. Otrzymane mutanty analizowano, przez porównanie z oryginalnym enzymem, klasycznymi metodami kinetycznymi. Wykazano istotną rolę łańcuchów bocznych His 48, Cys 35 oraz Thr 51, jako donorów wiązań wodorowych w stabilizacji związku pośredniego



Rys. 6. Możliwe wiązania wodorowe w kompleksie E-Tyr-AMP na podstawie rentgenografii strukturalnej [34]

E Tyr-AMP [37]. Zamiana Thr 51 → Pro51 spowodowała dramatyczny wzrost powinowactwa do ATP, wyrażony w ponad 50-krotnym wzroście $k_{cat}/K_m(ATP)$ [38]. Podstawienie Tyr 34 → Phe 34 zwiększyło specyficzność enzymu, wyrażoną w 15-krotnym obniżeniu zdolności wiązania fenyloalaniny przy niezmiennym powinowactwie do naturalnego substratu — tyrozyny. Trwają prace nad ustaleniem molekularnych podstaw większej termostabilności enzymu izolowanego z *B. stearothermophilus* w porównaniu z syntetazą izolowaną z *E. coli*.

Innym przykładem modelowania własności katalitycznych enzymów metodą ukierunkowanej mutagenazy są prace prowadzone w laboratoriach amerykańskich firm Genentech oraz Genencor nad enzymem z grupy hydrolaz — subtilizyną [39]. Enzym ten jest stosowany na dużą skalę jako czynny składnik środków piorących. Zbadano własności kilkuset mutantów subtilizyny. Zamiana glicyny-166, znajdującej się w centrum dużej, hydrofobowej kieszeni wiążącej substraty, na inne reszty aminokwasowe wywołała istotne zmiany specyficzności substratowej enzymu. Zastąpienie Gly-166 innymi obojętnymi

aminokwasami z niewielkim łańcuchem bocznym spowodowało wzrost aktywności enzymów w stosunku do niedużych, hydrofobowych substratów. Wprowadzenie jednak aminokwasów z dużym, hydrofobowym łańcuchem bocznym wywołało znaczne obniżenie aktywności enzymu. Zastąpienie Gly-166 aminokwasami niosącymi w łańcuchu bocznym ładunki dodatnie bądź ujemne spowodowało wzrost powinowactwa enzymu w stosunku do substratów naładowanych w komplementarny sposób.

Ukierunkowana mutageneza posłużyła również do modelowania własności katalitycznych innych ważnych enzymów takich, jak karboksypeptydaza, β -laktamaza, dysmutaza ponadtlenkowa, cytochrom C czy dehydrogenaza alkoholowa. Metoda ta ma w opinii autora największy potencjał do poszukiwania modyfikowanych enzymów o zaplanowanych własnościach katalitycznych.

*

*

*

Autor składa serdeczne podziękowania Profesorowi Wojciechowi J. Stecowi za przeczytanie rękopisu niniejszej pracy i krytyczne uwagi.

LITERATURA

1. Doolittle R. F. — *Proteins*. Sci. Amer. 74-83, Oct. 1985.
2. Hasegawa M. — *Biotechnology and chemical industry*. Chem. Econ. Engin. Rev. 17: 26-35, 1985.
3. Whitesides G. M., Wong C.-H. — *Enzymes as catalysts in organic synthesis*. Aldrichim. Acta 16: 27-34, 1983.
4. Wiseman A. (wyd.) — *Handbook of enzyme biotechnology*. Ellis Horwood, London, 1975.
5. Barker S. K., Kay I. — *Principles of immobilised enzyme technology*. Handbook of enzyme biotechnology. Ellis Horwood, London s. 88-110, 1975.
6. Axen R., Porath J., Ernback S. — *Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen bromide*. Nature 214: 1302-1304, 1967.
7. Nilsson K., Mosbach K. — *Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulphonyl chlorides*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 449-457, 1981.
8. Mosbach K. — *Immobilized enzymes in organic synthesis*. Enzymes in organic synthesis. Pitman, London s. 57-66, 1985.
9. Srere P. A., Mosbach K. — *Metabolic compartmentation: symbiotic, organellar, multienzymic and microenvironmental*. Ann. Rev. Microbiol. 28: 61-83, 1974.
10. Mansson M. O., Siegbahn N., Mosbach K. — *Site-to-site directed immobilization of enzymes with bis-NAD analogues*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1487-1491, 1983.
11. Gestrelus S., Mansson M. O., Mosbach K. — *Preparation of an alcohol dehydrogenase-NAD(H)-Sepharose complex showing no requirement of soluble coenzyme for its activity*. Eur. J. Biochem. 57: 529-535, 1975.
12. Weetall H. H., Suzuki S. (red.) — *Immobilized enzyme technology, research and applications*. Plenum Press, New York, 1975.
13. Karlson P. — *Zarys biochemii*. PWN, Warszawa, 1972, s. 74.
14. Dastoli F. R., Musto N. A., Price S. — *Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in an organic medium*. Arch. Biochem. Biophys. 115: 44-47, 1966.

15. Dastoli F. R., Price S. — *Further studies on xantine oxidase in nonpolar media*. Arch. Biochem. Biophys. 122: 289-291, 1967.
16. Zaks A., Klibanov A. M. — *Enzymatic catalysis in organic media at 100°C*. Science 224: 1249-1251, 1984.
17. Kirchner G., Scollar M. P., Klibanov A. M. — *Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents*. J. Amer. Chem. Soc. 107: 7072-7076, 1985.
18. Zaks A., Klibanov A. M. — *Enzyme catalyzed processes in organic solvents*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3192-3196, 1985.
19. Kaiser E. T., Lawrence D. S. — *Chemical mutation of enzyme active sites*. Science 226: 505-511, 1984.
20. Drenth J., Jansonius J. N., Kockock R., Worthers B. G. — *The structure of papain*. Adv. Protein Chem. 25: 79-115, 1971.
21. Drenth J., Kalk K. H., Swen H. M. — *Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain*. Biochemistry 15: 3731-3738, 1976.
22. Levine H. L., Kaiser E. T. — *Oxidation of dihydronicotinamides by flavopapain*. J. Amer. Chem. Soc. 100: 7670-7677, 1978.
23. Slama J. T., Oruganti S. R., Kaiser E. T. — *Smisynthetic enzymes: synthesis of a new flavopapain with high catalytic efficiency*. J. Amer. Chem. Soc. 103: 6211-6213, 1981.
24. Levine H. L., Kaiser E. T. — *Stereospecificity in the oxidation of NADPH by flavopapain*. J. Amer. Chem. Soc. 102: 343-345, 1980.
25. Neet K. E., Nanci A., Koshland D. E. — *Properties of thiol-subtilisin*. J. Biol. Chem. 243: 6392-6401, 1968.
26. Yokosawa H., Ojima S., Ishii S. — *Thioltrypsin*. J. Biochem. 82: 869-872, 1971.
27. Clark P. J., Lowe G. — *Conversion of active-site cysteine residue of papain into a dehydro-serine, a serine and a glycine residue*. Eur. J. Biochem. 84: 293-299, 1978.
28. Hall J., Knowles J. R. — *Directed selective pressure on a β -lactamase to analyse molecular changes involved in development of enzyme function*. Nature 264: 803-804, 1976.
29. Hall B. G. — *Biochemistry* 20: 4042-4049, 1981.
30. Wu T. T., Lin E. C. C., Vanaka S. — *Mutants of Aerobacter earogenes capable of utilizing xylitol as a novel carbon*. J. Bacteriol. 96: 447-456, 1968.
31. Okada H., Negoro S., Kimura H., Nakamura S. — *Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers*. Nature 306: 203-206, 1983.
32. Zoller M. J., Smith M. — *Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors*. Meth. Enzymology 100: 469-500, 1983.
33. Wallace R. B., Schold M., Johnson M. J., Dembek P., Itakura K. — *Oligonucleotide directed mutagenesis of the human β -globin gene: a general method for producing specific point mutations in cloned DNA*. Nucleic Acids Res. 9: 3647-3657, 1981.
34. Fersht A. R., Winter G. P. — *Redesigning enzymes by site-directed mutagenesis*. Enzymes in organic synthesis. Pitman, London, s. 204-213, 1985.
35. Bhat T. N., Blow D. M., Brick P., Nyborg J. — *Tyrosyl-tRNA synthetase forms a mononucleotide binding fold*. J. Mol. Biol. 58: 699-709, 1982.
36. Winter G., Koch G. L. E., Hartley B. S., Barker D. G. — *The amino acid sequence of the tyrosyl-tRNA synthetase from Bacillus stearothermophilus*. Eur. J. Biochem. 132: 383-387, 1983.
37. Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Winter G. — *Site directed mutagenesis as a probe of enzyme structure and catalysis: tyrosyl-tRNA synthetase cysteine-35 to glycine-35 mutation*. Biochemistry 22: 3581-3586, 1983.
38. Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Carter P., Winter G. — *A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering*. Nature 307: 187-188, 1984.
39. Baum R. — *Enzyme research advances protein engineering*. Chem. Engin. News 64(41): 23-25, 1986.

WOJCIECH T. MARKIEWICZ

Zakład Chemii Bioorganicznej PAN
Poznań

CHEMICZNA SYNTEZA FRAGMENTÓW DNA

Wprowadzenie metod rekombinacji DNA *in vitro* znacznie przyspieszyło rozwój współczesnej biologii molekularnej. Techniki rekombinacji DNA stanowią o olbrzymim zainteresowaniu postępem prac w tej dziedzinie i ich wykorzystaniu, również do celów praktycznych — „biotechnologicznych” [1]. Rozpatrując czynniki, których odkrycie i opracowanie złożyło się na powstanie technik określanych wspólnym mianem inżynierii genetycznej, należy wyróżnić:

- odkrycie enzymów restrykcyjnych,
- opracowanie metod szybkiego sekwencjonowania DNA,
- opracowanie metod chemicznej syntezy oligonukleotydów.

Podstawową zaletą chemicznej syntezy fragmentów kwasów nukleinowych jest możliwość przygotowania oligonukleotydów o dowolnej sekwencji, różnej długości łańcucha, a także zawierających np. modyfikowane nukleozydy. W ten sposób możliwe staje się przeprowadzenie precyzyjnych eksperymentów, w których fragment DNA (lub RNA) staje się jednym z reagentów.

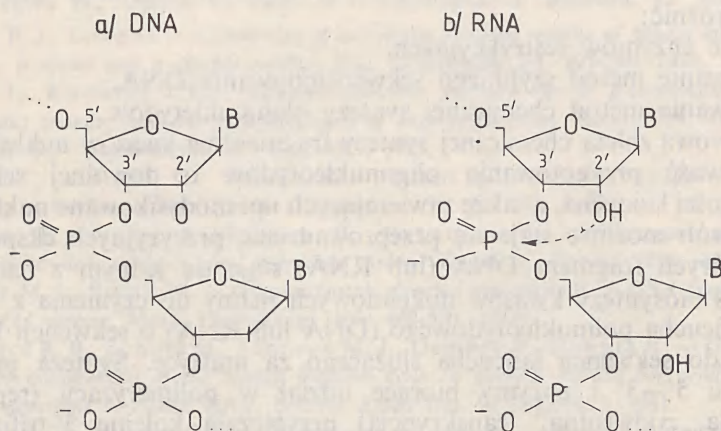
Podczas biosyntezy kwasów nukleotynowych mamy do czynienia z powstawaniem łańcucha polinukleotydowego (DNA lub RNA) o sekwencji kompletarnej do sekwencji łańcucha służącego za matrycę. Synteza przebiega w kierunku $5' \rightarrow 3'$ i enzymy biorące udział w polimeryzacji (replikacja, transkrypcja, „odwrotna” transkrypcja) przyłączają kolejne 5'-trifosforany do grup hydroksylowych $3'$. W obecnie wykorzystywanych chemicznych metodach syntezy fragmentów kwasów nukleotynowych wzrost łańcucha oligonukleotydu przebiega w kierunku $3' \rightarrow 5'$ i syntetyzowane są tylko pojedyncze łańcuchy.

SYNTEZA FRAGMENTÓW DNA

Kluczowym etapem syntezy fragmentów kwasów nukleotynowych jest wytworzenie międzynukleotydowych wiązań $3'-5'$. Powstanie tego wiązania na drodze chemicznej wymaga aktywacji grupy fosforanowej ($3'$) i jej kondensacji z grupą hydroksylową ($5'$) przy jednoczesnym wykluczeniu reakcji z innymi grupami funkcyjnymi występującymi w łańcuchu oligonukleotydu.

Wysoka wydajność powstawania wiązań międzynukleotydowych i wykluczenie niepożądanych reakcji ubocznych mają zasadnicze znaczenie w chemicznej syntezie oligonukleotydów. W syntezie chemicznej stosuje się ochronę grup funkcyjnych, których udział w reakcjach należy wykluczyć (np. 2'-OH, NH_2 puryn i pirymidyn). Z zagadnieniem chemicznej syntezy wiąże się więc problemy wprowadzania grup blokujących, trwałych podczas syntezy łańcucha oligonukleotydowego i dających się — z wysoką wydajnością — usunąć po jej zakończeniu w warunkach nie powodujących degradacji produktu. Podobieństwo reaktywności poszczególnych grup funkcyjnych w kwasach nukleinowych powoduje, że niezbędne było opracowanie wyrafinowanych metod wprowadzania grup ochronnych. Konieczność synchronizacji grup ochronnych poszczególnych grup funkcyjnych jednostki nukleotydowej wchodzącej w skład łańcucha syntetyzowanego oligonukleotydu powoduje, że z bardzo wielu grup ochronnych opracowanych dla potrzeb syntezy fragmentów kwasów nukleinowych stosuje się obecnie tylko kilka ich „zestawów”. Bardziej szczegółowe informacje na temat grup ochronnych można znaleźć w artykułach przeglądowych [2].

Obecność dodatkowej grupy hydroksylowej w położeniu 2' reszty rybozy w RNA w porównaniu z DNA (rys. 1) jest przyczyną bardzo różnych

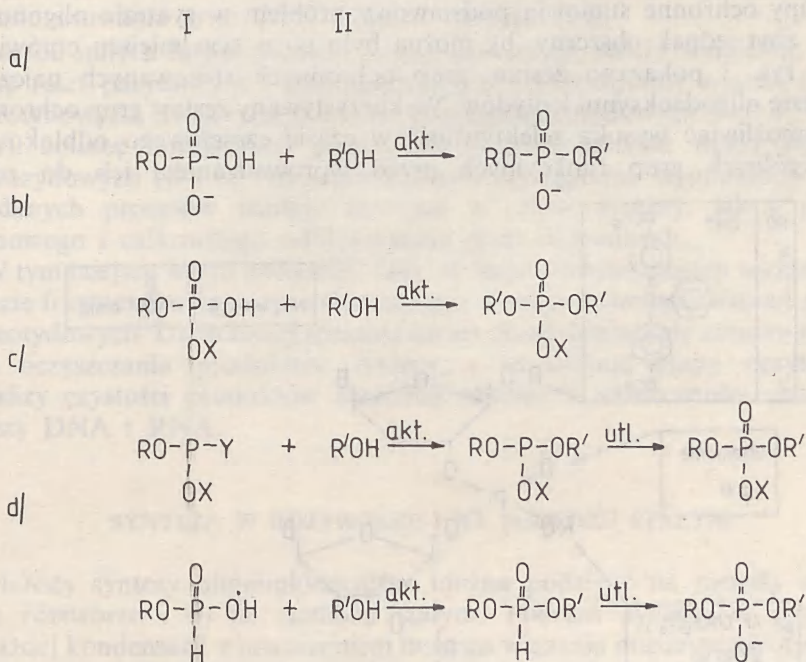


Rys. 1. Fragment łańcucha kwasu nukleionowego: a) DNA, b) RNA; zaznaczono wewnątrzcząsteczkowy atak grupy 2'-OH na atom fosforu, w wyniku którego może nastąpić rozerwanie wiązania międzynukleotydowego lub jego izomeryzacja 3'-5'—2'-5'. B — reszty pirymidynowe i purynowe

właściwości chemicznych tych dwóch typów kwasów nukleinowych (np. odporność na hydrolizę). Znaczne podobieństwo DNA i RNA sprawia jednak, że w tych samych ośrodkach prowadzono badania metodyczne nad chemiczną syntezą zarówno fragmentów DNA, jak i RNA. Obecnie jednakże metody syntezy RNA są gorzej opracowane niż DNA. Można przypuszczać, że rosnące zainteresowanie strukturą i funkcjami RNA przyczyni się również do znacznego postępu w syntezie oligorybonukleotydów.

PODZIAŁ METOD SYNTEZY

Metody chemicznej syntezy oligonukleotydów można podzielić ze względu na sposób wytwarzania wiązań międzynukleotydowych następująco: a) metoda fosfordiestrowa [3], b) metoda fosfortriestrowa [4, 5], c) metoda fosforynowa [6] lub fosforynoamidowa [7], d) metoda H-fosfonianowa lub fosforynodiestrowa [8, 9]. W dwóch pierwszych metodach syntezę wiązań międzynukleotydowych prowadzi się dla nukleotydów, w których fosfor jest pięciowartościowy P^V , tak jak w kwasach nukleinowych. W kolejnych metodach reakcja kondensacji nukleozydu i nukleotydu prowadzi do utworzenia wiązań międzynukleotydowych zawierających trójwartościowy atom fosforu P^{III} , który dopiero w następnym etapie utleniania przekształca się we



Rys. 2. Podział metod syntezy oligonukleotydów ze względu na sposób wytwarzania wiązań internukleotydowych: a) fosfordiestrowa, b) fosfortriestrowa, c) fosforynowa ($Y = Cl$) lub fosforynoamidowa ($Y = NR''_2$), d) H-fosfonianowa lub fosforynodiestrowa. R, R' — reszty nukleozydowe lub nukleotydowe. X — grupa blokująca, R' — grupa alkiłowa. I — składnik nukleotydowy, II — składnik nukleozydowy

właściwy P^V (rys. 2). Należy zwrócić uwagę na fakt, że w skutecznych metodach chemicznej syntezy oligonukleotydów, stosowanych obecnie, wiązania internukleotydowe są chronione za pomocą grup blokujących (metody b, c) lub wskutek występowania w niereaktywnej formie wodorofosfonianowej (metoda d). W procesach biosyntezy kwasów nukleinowych (*in vivo*), które pod względem wydajności i szybkości wciąż przewyższają metody chemiczne, wiązania międzynukleotydowe są „niechronione”. Z che-

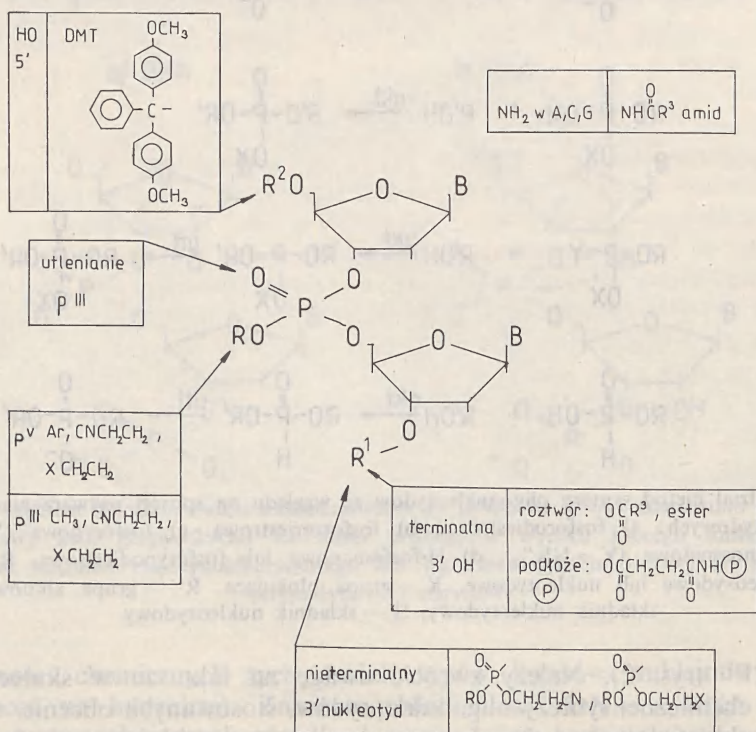
micznego punktu widzenia tę funkcję ochronną, jak również wysoką regiospecyficzność i szybkość syntezy, zapewniają w biosyntezie enzymy — polimerazy. Zarówno w syntezie chemicznej, jak i enzymatycznej niezbędny jest właściwy aktywny czynnik, umożliwiający wytworzenie wiązania między-nukleotydowego: 5'-trifosforan (biosynteza) lub zaktywowany pod wpływem czynnika kondensującego nukleotyd (synteza chemiczna).

Czas wytwarzania wiązań między-nukleotydowych uległ bardzo znacznemu skróceniu od dni (metoda diestrowa) do kilku minut (metody b, c) lub minuty (metoda d).

GRUPY OCHRONNE. REAKCJE UBOCZNE

Grupy ochronne stanowią podstawowy problem w syntezie oligonukleotydów, zbyt jednak obszerny, by można było go w tym miejscu omówić [2].

Na rys. 3 pokazano zestaw grup ochronnych stosowanych najczęściej w syntezie oligodeoksynukleotydów. Wykorzystywany zestaw grup ochronnych musi umożliwiać wysoką selektywność w czasie częściowego odblokowania poszczególnych grup funkcyjnych przed wprowadzaniem ich do reakcji



Rys. 3. Grupy ochronne najczęściej stosowane w syntezie fragmentów DNA, w syntezie w roztworze i na podłożu stałym P. Ar — aryl, A, C, G — reszty adeniny, cytozyny, guaniny; R³ — aryl lub alkil, CH₂CH₂X — grupa usuwana wg mechanizmu β-eliminacji, gdzie X — podstawiony aryl

w kolejnych etapach syntezy. Tak więc problem synchronizacji grup ochronnych jest jednym z czynników decydujących o powodzeniu syntezy. Można go zilustrować na przykładzie grupy ochronnej funkcji 5'-OH, którą najczęściej jest grupa dimetoksytrytylowa (DMT), usuwana w bardzo łagodnych warunkach kwasowych. Nawet te łagodne warunki mogą jednak w niewielkim stopniu prowadzić do rozrywania wiązań N-glikozydowych w nukleozydowych jednostkach purynowych, prowadząc w przypadku długich oligomerów do znacznego wzrostu niepożądanego reakcji ubocznej — depurynacji. Reakcja ta jest szczególnie istotna dla deoksyadenozyny. Jej udział udało się zmniejszyć, wprowadzając innego typu grupy blokujące reszt aminowych adeniny: amidynowe zamiast amidowych [10]. Innym rozwiązaniem zmierzającym do obniżenia udziału niepożądanych reakcji jest modyfikacja warunków reakcji odblokowania. Próbę rozwiązania problemu reakcji depurynacji DNA w czasie usuwania grup DMT opisano ostatnio [11].

Pośród innych niepożądanych reakcji ubocznych należy wymienić: modyfikację reszt purynowych i pirymidynowych, rozszczepianie wiązań między-nukleotydowych, izomeryzacja wiązań między-nukleotydowych 3'-5' → 2'-5' (dla RNA), zmianę konfiguracji przy anomerycznym atomie węgla jednostek nukleozydowych ($\beta \rightarrow \alpha$). Niebezpieczeństwo wystąpienia wymienionych, niepożądanych procesów istnieje zarówno w czasie syntezy, jak i podczas częściowego i całkowitego odblokowania grup ochronnych.

W tym miejscu warto podkreślić fakt, że najistotniejszy postęp w chemicznej syntezie fragmentów kwasów nukleinowych dotyczy tworzenia wiązań między-nukleotydowych. Dużo mniej spektakularnie przedstawiają się zmiany w metodach oczyszczania produktów syntezy, i te właśnie etapy oczyszczania i analizy czystości produktów stanowią obecnie o skuteczności chemicznej syntezy DNA i RNA.

SYNTEZA W ROZTWORZE I NA PODŁOŻU STAŁYM

Metody syntezy oligonukleotydów można podzielić na metody syntezy: a) w roztworze i b) na podłożu stałym. Podczas syntezy w roztworze, po każdej kondensacji z utworzeniem nowego wiązania między-nukleotydowego oligomer wyodrębnia się, oczyszczając od substratów i produktów ubocznych i poddaje następnym kondensacjom aż do uzyskania produktu o pożądanej długości łańcucha. W syntezie na podłożu stałym oczyszczanie produktów pośrednich, usuwanie nadmiaru reagentów jest bardzo proste, ponieważ rosnący łańcuch oligomeru związany jest ze stałym nośnikiem. Produkt poddaje się oczyszczeniu od produktów ubocznych dopiero po zakończeniu całej syntezy i odblokowaniu grup ochronnych. Wysoka wydajność i szybkość reakcji kondensacji w obecnych metodach syntezy oligonukleotydów, a także możliwość pełnej automatyzacji syntezy na podłożu stałym spowodowały, że obecnie większość fragmentów DNA uzyskuje się za pomocą automatycznych syntetyzerów DNA [12]. Urządzenia te pozwalają na szybką i ekonomiczną syntezę małych ilości fragmentów DNA, w ilościach wystarczających do większości eksperymentów biochemicznych. Wydaje się, że synteza w roz-

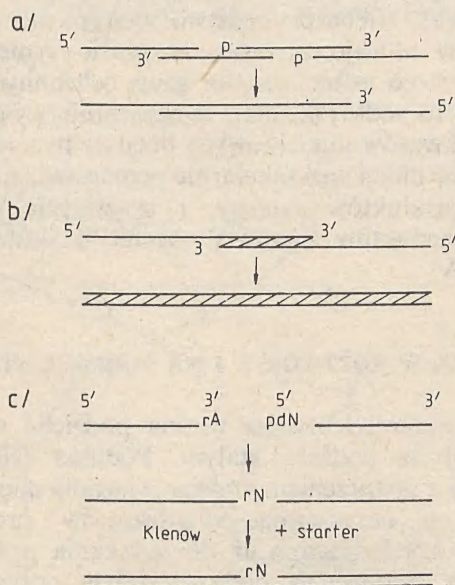
tworze, wciąż lepiej, niż synteza na podłożu stałym, nadaje się do otrzymywania większych ilości oligonukleotydów potrzebnych np. do badań fizyko-chemicznych lub jako diagnostyczne sondy hybrydizacyjne. Automatyzacja syntezy [12, 13], a także opracowanie nowych typów podłoża, pozwalają przypuszczać, że właśnie synteza na podłożu stałym będzie główną drogą otrzymywania fragmentów DNA i RNA.

ZASTOSOWANIA SYNTETYCZNYCH FRAGMENTÓW DNA

Syntetyczne fragmenty DNA znajdują następujące zastosowania w biologii:

- sekwencjonowanie DNA [14, 15],
- sondy hybrydizacyjne [16, 17, 18],
- ukierunkowana mutageniza [19],
- chemiczno-enzymatyczna synteza genów.

Blizsze omówienie zastosowań fragmentów DNA można znaleźć również w artykułach przeglądowych [12, 20]. Wśród interesujących, ostatnich zasto-



Rys. 4. Metody syntezy chemiczno-enzymatycznej dwuniciowych DNA i DNA-RNA z wykorzystaniem enzymów: a) T4 DNA ligaza, b) DNA polimeraza — fr. Klenowa, c) T4 RNA ligaza, DNA polimeraza — fr. Klenowa

sowań syntetycznych oligodeoksynukleotydów należy wspomnieć ich zastosowanie jako hybrydizacyjne sondy diagnostyczne [21, 22]. Lista syntetycznych genów, od czasu opisanie pierwszej chemiczno-enzymatycznej syntezy w 1970 roku [23], ulega systematycznemu wydłużaniu. Omawiając ten ważny dział wykorzystania syntetycznych oligonukleotydów należy wspomnieć o trzech znanych metodach syntezy chemiczno-enzymatycznej dupleksów DNA (rys. 4):

a) z wykorzystaniem T4 DNA ligazy [23].

b) z wykorzystaniem fragmentu Klenowa DNA polimerazy [24]. W tym miejscu należałoby wymienić również bardzo interesującą metodę otrzymywania dupleksów DNA-RNA na drodze chemiczno-enzymatycznej. Wydaje się, że metoda ta znajdzie wkrótce liczne zastosowania w rekombinacji kwasów nukleinowych. Jest to metoda z wykorzystaniem oligodeoksynukleotydów, zawierających terminalny 3'-rybonukleozyd, T4 DNA ligazy i fragmentu Klenowa DNA polimerazy [25] (rys. 4c).

Omówienie zastosowań syntetycznych oligodeoksynukleotydów również w technologii rekombinacji RNA [26], jak i specyficznych problemów związanych z syntezą fragmentów RNA wymagałoby osobnego artykułu.

UWAGI KOŃCOWE

Na zakończenie warto zadać pytanie, czy problem chemicznej syntezy fragmentów kwasów nukleinowych można uważać za rozwiązany? Do rozwiązania pozostają problemy związane z szybkością, selektywnością, efektywnością syntezy, w której wciąż niedoścignym wzorem pozostaje Natura. Synteza fragmentów DNA jest znacznie lepiej opanowana niż RNA. Najdłuższe sekwencje oligodeoksynukleotydów zsyntetyzowane dotychczas mają długość ok. 175 jednostek nukleotydowych. W przypadku oligorybonukleotydów wciąż nie rozwiązany problemem pozostaje opracowanie właściwej grupy ochronnej dla funkcji 2'-OH. Rozwiązanie powyższego problemu, jak i innych nakreślonych w tym przeglądzie, powinno się przyczynić do dalszego wzrostu przydatności syntetycznych fragmentów DNA i RNA w biologii molekularnej.

LITERATURA

1. Fikus M. — *Praktyczne zastosowanie metod rekombinacji DNA in vitro*. Kosmos 34: 153-170, 1985.
2. Amarnath V., Broom A. D. — *Chemical synthesis of oligonucleotides*. Chem. Rev. 77: 183-217, 1977.
3. Khorana H. G., Vizsolyi I. R., Ralph R. K. — *Studies on polynucleotides. XII. Experiments on the polymerization of mononucleotides. A comparison of different polymerizing agents and a general improvement in the isolation of synthetic*. J. Amer. Chem. Soc. 84: 414-418, 1962.
- 3a. Khorana H. G. — *Total synthesis of a gene*. Science 203: 614-625, 1979.
4. Letsinger R. L., Ogilvie K. K. — *A convenient method for stepwise synthesis of oligothymidylate derivatives in large-scale quantities*. J. Amer. Chem. Soc. 89: 4801-4803, 1967.
5. Reese C. B. — *The chemical synthesis of oligo- and polynucleotides by the phosphotriester approach*. Tetrahedron 34: 3143-3179, 1978.
6. Letsinger R. L., Finnan J. L., Haevner G. A., Lunsword W. B. — *Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links*. J. Amer. Chem. Soc. 97: 3278-3279, 1975.
7. Beaucage S. L., Caruthers M. H. — *Deoxynucleoside phosphoramidites — a new class of key intermediates of deoxypolynucleotides synthesis*. Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862, 1981.

8. Matteucci M. D., Froehler B. C. — *Nucleoside H-phosphonates: Valuable intermediates in the synthesis of deoxyoligonucleotides*. Tetrahedron Lett. 27: 469-472, 1986.
9. Garegg P. J., Regberg T., Stawiński J., Strömberg R. — *Formation of internucleotidic bonds via phosphonate intermediates*. Chemica Scripta 26: 280, 1985.
10. McBride L. J., Kierzek R., Beaucage S. L., Caruthers M. H. — *Amidine protecting groups for oligonucleotide synthesis*. J. Amer. Chem. Soc. 108: 2040-2048, 1986.
11. Batkus V. V., Kaushin A. L., Berlin Y. A., Kolosov M. N., Smirnov I. V. — *Cleavage of 5'-O-protecting trityl groups in oligodeoxynucleotide synthesis effect of substrate structure and reaction conditions on detritylation and depurination rates*. Bioorg. Khim. 9: 1518-1530, 1983.
12. Caruthers M. H. — *Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses*. Science 230: 281-285, 1985.
13. Hunkapiller M., Kent S., Caruthers M., Dreyer W., Firca J., Griffin C., Horvath S., Hunkapiller T., Temps P., Hood L. — *A microchemical facility for the analysis and synthesis of genes and proteins*. Nature 310: 105-111, 1984.
14. Godson G. N. — *Methods of DNA and RNA sequencing*. Weissman S. M. (red.), Draeger, New York, str. 69-111, 1983.
15. Smith L. M., Fung S., Hunkapiller M. W., Hunkapiller T. J., Hood L. — *The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis*. Nucleic Acids Res. 13: 2399, 1985.
16. Smith M. — *Methods of DNA and RNA sequencing*. Weissman S. M. (red.), Draeger, New York, str. 23-68, 1983.
17. Gitschier J. — *Characterization of the human factor VIII gene*. Nature 312: 326, 1984.
18. Ohtsuka E., Matsuki S., Ikehara M., Takahashi Y., Matsubara K. — *An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon position*. J. Biol. Chem. 260: 2605-2608, 1985.
19. Hutchinson C. A., III, Phillips S., Edgell M. H., Gillam S., Jahnke P., Smith M. — *Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence*. J. Biol. Chem. 253: 6551-6560, 1978.
20. Stawiński J. — *Zastosowanie syntetycznych fragmentów DNA w biologii molekularnej*. Post. Bioch. 28: 45-69, 1982.
21. Saiki R. K., Arnheim N., Erlich H. A. — *A novel method for the detection of polymorphic restriction sites by cleavage of oligonucleotide probes: application to sickle-cell anemia*. Biotechnology 3: 1008-1012, 1985.
22. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. — *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia*. Science 230: 1350-1354, 1985.
23. Khorana H. G. et al. — *Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast*. Nature 227: 27-34, 1970.
24. Rossi J. J., Kierzek R., Huang T., Walker P. A., Itakura K. — *An alternate method for synthesis of double-stranded DNA segments*. J. Biol. Chem. 257: 9226-9229, 1982.
25. Zeh D., Seliger H. — *Automated preparation of DNA-RNA hybrids and their joining with T4 RNA ligase — an approach to single-strand gene synthesis*. Nucleos. Nucleot. (w druku) i 7th Intern. Round Table „Nucleosides, Nucleotides” Konstanz, RFN, 29.09-3.10.1986.
26. Miele E. A., Mills D. R., Kramer F. R. — *Autocatalytic replication of recombinant RNA*. J. Mol. Biol. 171: 281-295, 1983.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Казимеж Л. Вежховски</i> — Вступительное слово	171
<i>Анджеи Плуценчик</i> — Возможности генной инженерии при получении лекарственных веществ и вакцин	177
<i>Пжемыслав Шафрански</i> — Перспективы вакцины против малярии	189
<i>Малгожата Юнгерман, Рышард Сломски</i> — Наследственные болезни — диагностика методов полиморфизма рестриционных фрагментов ДНК и молекулярных пород	201
<i>Марлена Левандовска</i> — Новые направления развития биотехнологии получения антибиотиков	213
<i>Стагислав Цебрят</i> — Использование целлюлолитических микроорганизмов для утилизации материалов богатых целлюлозой	227
<i>Влодзимеж Загурски, Марек Велнски, Яцек Скжечковски</i> — Виронды — самые простые патогены	247
<i>Анджеи Окрушек</i> — Энзиматическая инженерия использование энзимов в качестве промышленных катализаторов	265
<i>Войцех Т. Маркевич</i> — Химический синтез фрагментов ДНК	281

CONTENTS

Kazimierz L. Wierzchowski — Foreward	171
Andrzej Płucienniczak — Possibilities of genetic engineering in the production of drugs and vaccines	177
Przemysław Szafrński II — Prospects of antimalarian vaccine	189
Małgorzata Jungerman, Ryszard Słomski — Genetic diseases — diagnostics using molecular problems and restriction fragment length polymorphisms	201
Marlena Lewandowska — New directions in the development of biotechnology of the antibiotic production	213
Stanisław Cebrat — Cellulolytic microorganisms in utilization of cellulose rich materials	227
Włodzimierz Zagórski, Marek Welnicki, Jacek Skrzeczkowski — Viroids — the simplest pathogens	247
Andrzej Okruszek — Enzyme engineering and application of enzymes as industrial catalysts	265
Wojciech T. Markiewicz — Chemical synthesis of DNA fragments	281

SPIS TREŚCI

<i>Kazimierz L. Wierzchowski</i> — Słowo wstępne	171
<i>Andrzej Plucienniczak</i> — Możliwości inżynierii genetycznej w dziedzinie otrzymywania leków i szczepionek	177
<i>Przemysław Szafrąński, II</i> — Perspektywy szczepionki przeciw malarii	189
<i>Małgorzata Jungerman, Ryszard Słomski</i> — Choroby dziedziczne — diagnostyka metoda polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA i sond molekularnych	201
<i>Marlena Lewandowska</i> — Nowe kierunki rozwoju biotechnologii otrzymywania an- tybiotyków	213
<i>Stanisław Cebrat</i> — Wykorzystanie mikroorganizmów celulolitycznych do utylizacji ma- teriałów bogatych w celulozę	227
<i>Włodzimierz Zagórski, Marek Welnicki, Jacek Skrzéczkowski</i> — Wiroidy — najprostsze patogeny.	247
<i>Andrzej Okruszek</i> — Inżynieria enzymatyczna i wykorzystanie enzymów jako przemysł- owych katalizatorów	265
<i>Wojciech T. Markiewicz</i> — Chemiczna synteza fragmentów DNA	287

**Tylko prenumerata zapewnia
regularne otrzymywanie
kwartalnika**

K O S M O S

Prenumerata krajowa

Warunki prenumeraty:

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie Nr 1153-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Prenumerata zagraniczna

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do dnia 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny.
- do dnia 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa. Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly

through the
Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland

Our bankers:
BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

Indeks 36260
