

GENŲ INŽINERIJOS PAGRINDAI

PASKAITŲ CIKLAS

<http://www.ibt.lt/lithuanian/GIP.pdf>

ISBN 9986-19-812-7

Biotechnologijos institutas

Prof. Kęstutis SASNAUSKAS

Vilnius -2006

TURINYS

	<i>Skyriaus pavadinimas</i>	<i>Psl.</i>
1.	Genų inžinerijos instrumentai - fermentai	4
1.1.	Restrikcija – modifikacija, restrikcijos endonukleazės	4
1.2.	DNR ligazės	10
1.3.	DNR polimerazės	12
1.4.	RNR polimerazės	20
1.5.	T4 polinukleotidkinazė	20
1.6.	Šarminės fosfatazės	21
1.7.	Nukleazės	21
1.8.	Agarazė	24
2.	Bakterijų plazmidžių replikacija	25
2.1.	Teta tipo replikacija	26
2.2.	Grandinės išstūmimo tipo replikacija	39
2.3.	Riedančio rato tipo replikacija	41
3.	Prokariotų vektoriai	46
3.1.	Prokariotų vektoriai, sukurti bakterijų plazmidžių pagrindu	46
3.2.	Bakterijų dirbtinės chromosomos	55
3.3.	Prokariotų vektoriai λ (lambda) bakteriofago pagrindu. Bakteriofagas λ .	59
3.4.	Prokariotų genų raiškos vektoriai	71
3.5.	Svetimų baltymų sintezė bakterijose	73
4.	Eukariotų vektoriai	78
4.1.	Mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vektoriai	78
4.1.2.	Mielių dviejų hibridų sistema baltymų tarpusavio sąveikai tirti	85
4.2.	Bakulovirusų genų raiškos sistemos	90
4.3.	<i>Vaccinia</i> viruso vektoriai	93
4.4.	SV40 viruso pagrindu sukurti vektoriai	95
4.5.	Adenovirusai ir adenovirusų vektoriai	102
4.6.	Adeno-asocijuoti virusai ir vektoriai	112

4.7.	Alfa virusų vektoriai	116
4.8.	Retrovirusų vektoriai	121
5.	Genų terapija	133
5.1.	Virusinės kilmės vektoriai	133
5.2.	Nevirusiniai genų įvedimo metodai	141
6.	Transgeniniai gyvuliai	143
7.	Transgeniniai augalai	153
7.1.	Genų įvedimo į augalus metodai	153
7.1.1.	Ti plazmidė	154
7.2.	Augalų transgenezės tikslai ir problemos	163
8.	Genų slopinimas dvigrande RNR	169
8.1.	si RNR	169
8.2.	miRNR	178
8.3.	siRNR ryšys su branduoliu	184
8.4.	Biologinės funkcijos	192
8.5.	Augalų virusai ir PTGS reiškiny	193
8.6.	Virusų indukuojamas genų slopinimas -VIGS	196
8.7.	RNRi – naujas, efektyvus molekulinės biologijos įrankis	196
8.8.	RNRi taikymo medicinoje perspektyvos	199
9.	Genų raiškos tyrimo metodai	202
9.1	EST	202
9.2	SAGE	203
9.3	DNR gardelės	205
10.	Genomų tyrimo metodai	211
10.1.	Hibridizacijos metodai	212
10.2.	Fermentiniai metodai	215
10.3.	Nežinomo polimorfizmo paieška	218
11	Aptamerai	220
	Literatūra	225

1. Genų inžinerijos instrumentai - fermentai

1.1. Restrikcija – modifikacija, restrikcijos endonukleazės.

Genų inžinerijos metodų atsiradimą didele dalimi sąlygojo fermentų, vadinamų restrikcijos endonukleazėmis suradimas. Ilgą molekulinės genetikos vystymosi laikotarpį nebuvo galimybių išskirti specifinį DNR fragmentą, nebuvo jokių patogių metodų ir instrumentų, leidžiančių norimoje vietoje perskelti DNR molekulę. Restrikcijos endonukleazės, specifiskai skaldančios DNR buvo surastos tyrinėjant restrikcijos – modifikacijos reiškinių, pastebėtų tiriant bakteriofagų vystymąsi skirtinguose bakterijų *E. coli* kamienuose. Tiriant bakteriofago λ (lambda) vystymąsi *E. coli* kamienuose K (K12), B ir C, buvo pastebėtas bakteriofagų derliaus skirtumas, priklausomai nuo to, kuriame kamienė prieš tai buvo padauginas bakteriofagas. *E. coli* K kamienė padauginti bakteriofagai puikiai dauginosi *E. coli* K ir *E. coli* C kamienuose, tačiau *E. coli* B kamienuose jų derlius buvo maždaug 10^5 kartų mažesnis. Savo ruožtu bakteriofagai padauginti *E. coli* kamienė B, gerai dauginosi *E. coli* B ir *E. coli* C kamienuose, tačiau jų dauginimasis buvo maždaug 10^5 kartų apribojamas *E. coli* K. Bakteriofagai, padauginti *E. coli* C kamienė gerai dauginosi tik *E. coli* C kamienuose, tuo tarpu *E. coli* B ir *E. coli* K kamienuose jų dauginimasis buvo 10^5 kartų apribotas. Iš šių rezultatų buvo padarytos išvados, kad *E. coli* B ir *E. coli* K kamienai turi savo specifines restrikcijos (apribojimo) ir modifikacijos sistemas, o *E. coli* C tokių sistemų neturi. *E. coli* K restrikcijos sistema apriboja bakteriofago dauginimąsi *E. coli* K kamienuose. Tačiau, jeigu bakteriofagas padauginamas *E. coli* K kamienė, jis specifiskai modifikuojamas, o tai įgalina jį daugintis *E. coli* K kamienuose. Analogiskai vyksta *E. coli* B kamienuose dauginamiems bakteriofagams – jie modifikuojami ir tampa nejautriais *E. coli* B restrikcijos sistemai. Tyrinėjant biocheminius restrikcijos – modifikacijos (R-M) mechanizmus, buvo nustatyta, kad bakteriofagų vystymosi apribojimą arba restrikciją nulemia tuose kamienuose randamos endonukleazės, o modifikaciją – DNR metiltransferazės. Šiuose kamienuose endonukleazės ir metiltransferazės atpažįsta tas pačias bakteriofago genomo DNR sekas. Jeigu bakteriofagas padauginamas tame pačiame kamienė, jo DNR bus specifiskai metilinta ir endonukleazė šių bakteriofagų DNR neskaldo. Jeigu bakteriofagas bus padauginas kitame kamienė, jo modifikacija neapsaugos fago DNR nuo restrikcijos, DNR bus skaldoma. Ta DNR, kurią

metiltransferazė spėja metilinti, liks nesuskaldyta, todėl labai nedidelis skaičius fagu sugebės išgyventi. Tokiu būdu buvo surastos R-M sistemos, kurios šiuo metu vadinamos I tipo R-M sistemomis. I tipo R-M sistemos susideda iš 5 subvienetų, S subvienetas, atpažįstantis sistemai specifinę seką komplekse, randamas vienas, be jo komplekse veikia du M subvienetai (dimeras, metilina m⁶A, metilo grupės donoru naudoja AdoMet), metilinantys šią seką, jeigu viena grandinė yra metilinta (po replikacijos) ir du R subvienetai (dimeras), skaldantys DNR, jeigu atpažinimo seka nemetilinta. Jeigu seka nemetilinta, dominuoja restrikcijos endonukleazė, metiltransferazė metilina neefektyviai. Nemetilintos DNR skaldymas yra gana sudėtingas, nes skėlimo vietos nesutampa su atpažinimo tašku. Skėlimo taškas būna įvairiose vietose. Endonukleazė, naudodama ATP energiją juda DNR molekule ir ją skelia už kelių šimtų nukleotidų nuo atpažinimo sekos. Jeigu atpažinimo seka yra metilinta, restrikcijos endonukleazė neskaldo DNR. I klasės R-M sistemų genai žymimi *hsdM* –metiltransferazės (MTazės) genas, *hsdR* – restrikcijos endonukleazės (REazės) genas ir *hsdS* seką atpažįstančio subvieneto genas. Atatinkami baltymai žymimi HsdS, HsdM ir HsdR. I klasės R-M sistemos suradimas neturėjo didesnio praktinio taikymo, nes šio komplekso REazė skaldo DNR nespecifiškai, kiekvieną molekulę kitoje vietoje, nežiūrint į tai, kad jos kompleksas atpažįsta specifinę DNR seką. GI naudojami *E. coli* kamienai paprastai turi *hsdR* mutacijas, nes aktyvi R-M sistema skaldo įvedamą DNR ir tokiu būdu trukdo bakterijų transformacijai.

Didžiulį perversmą biologijos moksluose sukėlė 1970 m. (Kelly, Smith, 1970; Smith, Wilcox, 1970) aprašyti fermentai, pavadinti **II tipo** restrikcijos endonukleazėmis (REazės), specifiškai skaldantys DNR. Sunku įsivaizduoti, kad šie fermentai būtų buvę surasti nepažinus R-M reiškinių. Specifiškai DNR skaldantys fermentai randami kartu su tą pačią seką atpažįstančiomis ir metilinančiomis MTazėmis. Šiuo metu surasta ir charakterizuota virš 3500 tokių sistemų, pasižyminčių daugiau nei 200 skirtingų specifiškumų. Didelė dalis R-M sistemų (apie 30%) buvo rasta ir charakterizuota Lietuvoje, Biotechnologijos institute ir UAB Fermente, vadovaujant prof. A.Janulaičiui.

Kiekvienas mikroorganizmas, turintis REazę, turi ir tą pačią DNR seką atpažįstančią MTazę, priešingu atveju, jo DNR bus neapsaugota ir suskaldyta. Šiuo metu įvairių firmų išleidžiamos REazės pagal naują klasifikaciją skirstomos į atskirus II tipo subtipus, nurodytus lentelėje.

Tipas	Savybės	Pav.	Atpažįstama seka
IIP	Atpažįsta simetrinius (palindrominius) taikinius, skelia atpažįstamos sekos viduje, simetriškai	EcoRI Eco32I BglI NotI Sau3A	G 'AATTC GAT'ATC GCCNNNN'NGGC GC'GGCCCG 'GATC
IIA	Asimetrinė atpažinimo seka	FokI AciI	GGATGN (9/13) CCGC (-3/-1)
IIB	Skelia abiejose (both) taikinio pusėse abi grandines	BcgI	(10/12)CGANNNNNNTGC (12/10)
IIC	Simetrinis arba asimetrinis taikiny. R ir M funkcijos yra viename polipeptide	GsuI HaeIV BcgI	CTGGAG (16/14) (7/13) GAYNNNNRRTC (14/9) (10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)
IIE	Reikalingi du taikiniai, vieną skelia, kitas - efektorius	EcoRII NaeI	'CCWGG GCC'GGC
IIF	Reikalingi du taikiniai, abu skeliami koordinuotai	SfiI SgrAI	GGCCNNN'NGGCC CR'CCGGYG
IIG	Simetrinis arba asimetrinis taikiny, reikalingas AdoMet	BsgI Eco57I	GTGCAG (16/14) CTGAAG (16/14)
IIH	Simetrinis arba asimetrinis taikiny, geno struktūra panaši į I tipo sistemas	BcgI AhdI	(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10) GACNNN'NNGTC
IIM	Subtipas IIP arba IIA, skaldo tik metilintą taikinį	DpnI	GmA'TC
IIS	Asimetriškas taikiny ir skėlimo vieta	FokI MmeI	GGATG (9/13) TCCRAC (20/18)
IIT	Simetrinis arba asimetrinis taikiny, R genai yra heterodimerai	Bpu10I BslI	CCTNAGC (-5/-2) CCNNNNN'NNGG

IIP tipas. Tai pačių populiariausių REazių grupė. Jos dar vadinamos ortodoksinėmis arba tradicinėmis. Šią REazių grupę, pagal taikinio skaldymą papildomai galima suskirstyti į tris grupes:

Skelia palikdamas išsikišusius 5' galus: BamHI G 'GATCC

Skelia palikdamas išsikišusius 3' galus: PstI CTGCA' G

Skelia palikdamas bukus galus: Eco32I GAT'ATC

IIA tipas. Tai fermentai atpažįstantys asimetrines sekas, skeliantys taikinio viduje arba taikinio išorėje. Dažniausiai šio tipo sistemos turi vieną REazės geną ir du MTazių genus, kurių kiekvieno koduojama MTazė metilina skirtingą grandinę. Pasitaiko šio tipo sistemų, turinčių du REazių genus (Bpu10I) arba du sulietus MTazių genus (M.FokI).

IIB tipas. Šiam tipui priklauso fermentai, skaldantys DNR abipus taikinio.

IIC tipas. Šiam tipui priklauso visi fermentai, sudaryti iš hibridinio polipeptido, turinčio skėlimo ir modifikacijos domenų viename polipeptide. Į šią grupę taip pat įeina IIB, IIG, kai kurie IIH tipo fermentai. Jeigu RE aktyvumui nereikia ADO-MET, tokiu s fermentus galima naudoti kaip REazes, jeigu reikia ADO-MET, tokie fermentai krpo DNR nepilnai, nes karpymas konkuruoja su metilimu.

IIE tipas. Šios grupės fermentai sąveikauja su dviem identiškais taikiniais, kurių vienas yra taikiny, o kitas yra alosterinis efektorius. Kaip taisyklė, šie fermentai būna tetramerais, vienas dimeras sąveikauja su taikiniu, kitas su efektoriumi. Efektoriumi gali tarnauti ir nepilnai taikiniui identiška seka.

IIF tipas. Tai fermentai, kurių efektyviam darbui reikalingi du taikiniai vienu metu. Abu taikiniai skeliami koordinuotai.

IIE ir IIF tipų savybių biologinė prasmė galėtų būti apsidraudimas nuo atsitiktinai atsiradusio genome nemetilinto taikinio.

IIG tipas. Į šią grupę įeina fermentai, kurių R ir M domenai sulieti į vieną polipeptidą ir jų aktyvumą įtakoja, stimuliuoja ar inhibuoja AdoMet. Į šią grupę gali įeiti IIA ir IIP fermentai.

IIH tipas. Šie fermentai genetiškai primena I tipo sistemų REazes, bet biochemiškai elgiasi kaip II tipo. Žinomi trys šios grupės fermentų pavyzdžiai (AhdI, PshAI, BcgI).

IIM tipas. Tai DpnI ir panašūs fermentai. Šiai grupei nepriklauso McrA, McrBC nes jie neturi griežtai apibrėžtos atpažinimo ir skėlimo sekos. Pastarieji fermentai priskirti IV tipui. McrA, McrBC taip pat skaldo tik metilintą DNR, tačiau nespecifiškai.

IIS tipas. Šiam tipui priskiriami IIA tipo fermentai, kurie bent vieną grandinę skelia už taikinio ribų (*shifted relatively to the recognition*).

IIT tipas. Šią grupę sudaro heterodimerinės REazės.

Izošizomerai – Reazės, pasižyminčios tuo pačiu sekos atpažinimo ir skėlimo specifiškumu, tačiau išskirtos iš skirtingų mikroorganizmų. Šių fermentų genų nukleotidų seka bei baltymo a.r. sekos skiriasi, tačiau jie atpažįsta ir skelia tą pačią seką. Pav. BcuI, AhiI ir SpeI - skelia T'CTAGA.

III tipo R-M sistemos

Šias sistemas sudaro du genai (*mod* ir *res*) koduojantys baltymus, kurie arba modifikuoja arba skaldo DNR. Skaldymui reikalingi abu subvienetai ir ATP.

Skaldymui fermentas turi sąveikauti su dviem ne-polindrominiais atpažinimo taikiniais, be to, taikiniai turi būti invertuoti substrato molekulėje. Skaldymas lydimas nuo ATP priklausomos translokacijos, kaip ir I tipo fermentuose. Fermentas skelia per specifinį atstumą nuo vieno iš dviejų taikinių. Mod subvienetas gali funkcionuoti nepriklausomai nuo Res ir metilinti DNR m6A. Šios grupės atstovai yra EcoPII, EcoP15I.

IV tipo R-M sistemos

Šios sistemos sudarytos iš vieno ar dviejų genų, koduojančių baltymus, kurie skaldo tik modifikuotą DNR - metilintą, pusiau metilintą, gliukozylihidroksimetilintą DNR.

Šių sistemų atpažinimo sekos dar nėra tiksliai apibrėžtos išskyrus EcoKMcBC, kuri atpažįsta du dinukleotidus RmC (po purino eina metilintas C, m4C arba m5C), kuriuos skiria 40-3000 bp. Skeliama apie 30 bp nuo taikinio.

Izošizomerai - restrikcijos endonukleazės atpažįstančios ir vienodai skaldančios tokią pat DNR seką, tačiau išskirtos iš skirtingų mikroorganizmų. T.y. šias RE koduoja skirtingi genai, jos pasižymi a.r. sekos skirtumais, tačiau enzimatinis aktyvumas yra identiškas.

2006 m. buvo žinoma:

34 skirtingo specifiškumo I tipo RM sistemų (68 sistemos)

258 skirtingo specifiškumo II tipo RM sistemų (3687 fermentai)

5 skirtingo specifiškumo III tipo sistemų

Iš lentelėje pateiktų duomenų matome, kad šiuo metu rasta didžiulė REazių įvairovė. Kaip taisyklė, daugelis REazių skaldo DNR 37⁰C temperatūroje joms specifiniame buferyje. Praktiškai visoms REazėms reikalingi Mg⁺⁺ jonai. REazių aktyvumo vienetas – fermento kiekis per vieną valandą suskaldantis 1 μg DNR. Aktyvumo nustatymui substratu dažniausiai naudojama bakteriofago λ (lambda) DNR.

REazės įgalino iškirpti norimus DNR fragmentus ir su jais atlikti įvairias manipuliacijas, tame tarpe izoliuoti atskirus genus ir juos tyrinėti. REazių skėlimo taikiniai naudojami DNR fragmentų ir genomų kartiravimui - įvairių DNR skėlimo taikinių lokalizacijos nustatymui vienas kito atžvilgiu. Šiuo metu, kada jau žinoma daugelio organizmų genomų sekos, kartiravimą atlieka kompiuterinės programos.

Kiekviena firma, išleidžianti REazes kartu pateikia ir reakcijos mišinius, optimalius kiekvienai REazei, nurodo optimalią temperatūrą, bei kitas, kiekvienam fermentui specifines savybes - jautrumą DamM metilinimui (GmATC) ir DcmM (CmCA/TGG) metilinimui, jautrumą temperatūrai, fragmentų ligavimo reakcijos efektyvumą ir kt. Jau per 30 metų REazės yra vienu pagrindinių šiuolaikinės eksperimentinės biologijos darbo įrankių.

Nikazės – fermentai, atpažįstantys specifinę seką ir skeliantys tik vieną DNR grandinę. Pav. N.Bpu10I atpažįsta

$$\begin{array}{l} 5' \text{ GC}^{\downarrow}\text{TNAGG } 3' \\ 3' \text{ CG ANTCC } 5' \end{array}$$

Nikazės naudojamos viengrandės DNR paruošimui. Įvedus viengrandį trūkį superspiralizuotoje plazmidėje, nikuotą grandinę galima “suvalgyti” ExoIII nukleazės pagalba, tokiu būdu gausime viengrandę, komplementarią nikuotai grandinę.

Nikazės taip pat naudojamos linijinių DNR galų “uždarymui”, suformuojant viengrandes uždarais galais dvigrandes DNR molekules. Tokios būdu kuriami minimalizuoti dvigrandžiai DNR vektoriai imunizacijai DNR pagalba, genų terapijai. Tokie vektoriai, kaip taisyklė turi tik promotorių, geną ir transkripcijos terminacijos / poliadenilimo sritį.

Tam tikslui paruošiama plazmidė, turinti mus dominantį geną, apsuptą invertuotais N.Bpu10I taikiniai, bei pertrauktomis palindromines sekomis tarp invertuotų N.Bpu10I taikinių. Kadangi N.Bpu10 taikiniai yra invertuoti, nikazė įves trūkius skirtingose grandinėse, tokiu būdu molekulės galuose bus suformuoti dideli laipteliai, kurių išsikišusios viengrandės DNR grandinės bus sudarytos iš pertrauktų palindrominių sekų. Bpu10I atpažinimo sekos ir pertrauktų palindromų sekos suformuojamos taip, kad N.Bpu10I suformuoti išsikišę galai per palindromines sekas suformuoja dvigrandę struktūrą, sujungiančią abiejų grandinių galus. T4 DNR ligaze suligujamas trūkis, suformuojami kovalentiškai uždari galai. Gamtoje tokie galai randami tetrachimenu mitDNR. Kad pašalinti nereikalingas plazmidės liekanas, bei nesusiligavusias molekules, mišinys skaldomas restriktaze, skeliančia nereikalingą DNR (vektorių), bet neturinčia taikinių suformuotoje linijinėje DNR. Po to mišinys veikiamas T7 DNR polimeraze (nukleazė!), kuri savo dideliu ekzonukleaziniu aktyvumu pašalina visas linijines DNR, turinčias atvirus galus. Mišinyje lieka tik dvigrandė DNR uždarais galais.

1.2. DNR ligazės

Atsiradus galimybei REazių pagalba iškirpti reikalingą DNR fragmentą, iškilo poreikis tą fragmentą įjungti į kitą aplinką, arba įvesti į kitas DNR struktūras (vektorius), įgalinančias padauginti reikalingą DNR fragmentą. Fermentai, sujungiantys DNR fragmentus, pavadinti DNR ligazėmis, buvo surasti 1968 metais tyrinėjant DNR replikaciją. Nustačius, kad visuose organizmuose, pradedant nuo mikroorganizmų, baigiant žinduoliais, DNR sintetinama fragmentais (Okazaki fragmentai), buvo ieškoma fermentų, susiuvančių Okazaki fragmentus į ištisas chromosomas. Tokiu būdu bakterijose buvo rasta DNR ligazė, o T4 bakteriofagu infekuotose *E. coli* ląstelėse - T4 DNR ligazė. Šiuo metu genų klonavimo praktikoje DNR fragmentų sujungimui daugiausia naudojama T4 bakteriofago DNR ligazė. Šios ligazės fermentinei reakcijai reikalingas kofaktorius ATP, Mg^{++} jonai bei DTT. Fermentas dirba plačiame temperatūrų intervale, darbinė temperatūra nuo $4^{\circ}C$ iki $37^{\circ}C$. Bakterijų ligazės skiriasi nuo T4 DNR ligazės tuo, kad jos kofaktoriumi naudoja NAD^{+} , be to, jos **nesusiuva viengrandžių DNR fragmentų, jeigu nėra komplementarios siuvamiems viengrandžiams DNR fragmentams išsintisinės matricos**. Tuo tarpu T4 DNR ligazė gali sujungti ir viengrandžius DNR fragmentus ir “bukus” DNR galus. Tokiu būdu T4 DNR ligazė yra labai patogus instrumentas sujungti įvairius DNR fragmentus turinčius bukais galus, ar išsikišusius komplementarius galus.

Bakterijų DNR ligazė ilgai neturėjo didesnio pritaikymo, tačiau neseniai termofilinių bakterijų DNR ligazė buvo labai sėkmingai pritaikyta diagnostikoje, sukūrus ciklinę ligavimo reakciją (LCR). Reakcijos principas pavaizduotas paveikslėlyje (Epicentre Technologies, Ampligase). Metodo esmė yra ta, kad fragmentai A, B, C ir D nesusisuuva vienas su kitu be komplementarios matricos. Šiuo metu šis principas taip pat naudojamas ir taškinių mutacijų nustatymui – galinio nukleotido neatitikimas taip pat neleidžia sujungti du fragmentus. Šis principas sėkmingai naudojamas DNR gardelių technologijose mutacijų ir SNP nustatymui, aptamerų identifikavimui, pikomoliarinių baltymų koncentracijų nustatymui.

Ampligase® Thermostable DNA Ligase (cont.)

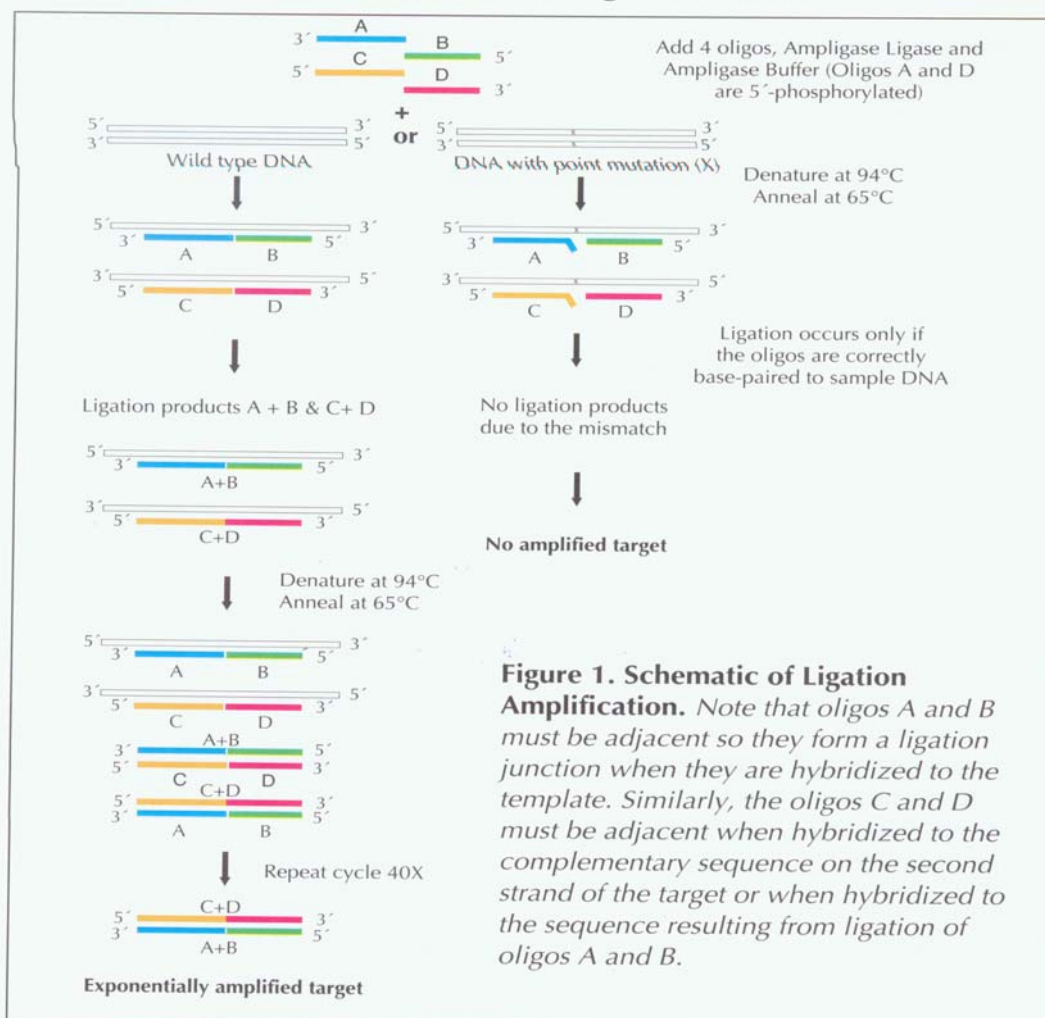


Figure 1. Schematic of Ligation Amplification. Note that oligos A and B must be adjacent so they form a ligation junction when they are hybridized to the template. Similarly, the oligos C and D must be adjacent when hybridized to the complementary sequence on the second strand of the target or when hybridized to the sequence resulting from ligation of oligos A and B.

Template DNA



Figure 2. Ligation Amplification using Ampligase DNA Ligase. Oligonucleotides A, B, C, and D from Figure 1 (25 pmoles each) were incubated as in Figure 1 with 5 units of Ampligase DNA Ligase in 25 µl of 1X Ampligase Reaction Buffer, with (+) or without (-) 0.25 pmole of DNA template. The reactions were cycled 40 times for 1 minute at 94°C and 2 minutes at 65°C, then separated by electrophoresis and visualized with ethidium bromide. In the presence of template DNA, the target sequence is amplified by formation of the ligation products A+B and C+D.

Pav.1.1. Termofilinės bakterijų ligazės panaudojimo schema mutacijos identifikavimui. Tas pats principas naudojamas (kairėje) ir patogeno DNR diagnostikoje

1.3. DNR polimerazės

DNR polimerazė I

DNR polimerazės – fermentai, sintetinantys DNR molekulių kopijas, naudojami daugelyje genų inžinerijos procedūrų. Anksčiausiai charakterizuota ir geriausiai ištirta yra *E. coli* DNR polimerazė I. Šios DNR polimerazės analogai randami praktiškai visuose mikroorganizmuose. Pagrindinė fermento funkcija ląstelėje siejama su reparacija bei Okazaki fragmentų sutvarkymu. Fermentas turi daug skirtingų aktyvumų:

5'-3' DNR polimerazinis aktyvumas;

3'-5' ekzonukleazinis aktyvumas;

5'-3' ekzonukleazinis aktyvumas;

5'-3' atvirkštinės transkriptazės (AT) aktyvumas; (aktyvumas nedidelis, tačiau kai kurių rūšių bakterijų DNR polimerazė I pasižymi gana geru AT aktyvumu);

Ribonuklezės H aktyvumas; (šis fermento aktyvumas skaldo RNR esančią hibridę su DNR, t.y. šalina RNR pradmenis iš Okazaki fragmentų 5' galų). Matomai, šis fermentas ankstesniuose mikroorganizmų evoliucijos etapuose atliko atvirkštinės transkriptazės funkciją, ko dėka mikroorganizmuose buvo pašalinti intronai.

DNR polimerazė I naudojama DNR žymėjimui radioaktyvia žyme grandinės kaitos reakcijos mechanizmu, (angl. *nick translation*). Jeigu su fermentu deoksiribonukleaze I (DNRaze I) dvigrandėje DNR molekulėje įvesime viengrandžius trūkius su tikimybe, kad vienai molekulei teks vienas trūkis, po to, pašalinę DNRazę I, į reakcijos mišinį pridėsime dNTP, kurių vienas ar keli bus radioaktyvus, DNR polimerazė I suras trūkius DNR molekulėse ir savo 5' – 3' ekzonukleaziniu aktyvumu skaldys grandinę nuo trūkio žemyn (5'-3' kryptimi), o polimerazinis aktyvumas prie trūkio metu atsiradusio laisvo 3'-OH galo prijungs priešingai grandinei komplementarius nukleotidus. Tokiu būdu, nukleazinis aktyvumas DNR grandinę skaldys, o polimerazinis sintetins tokią pat grandinę, kartu įjungdamas žymėtus nukleotidus. Šiuo metu šis metodas pakeistas efektyvesniu, vadinamu atsitiktinių pradmenų metodu. Be “nick transliacijos”, DNR polimerazė I gali būti naudojama kDNR antros grandinės sintezėje. DNR polimerazę I galima sėkmingai naudoti ir kaip ekzonukleazę (be dNTP).

DNR polimerazės I didysis fragmentas - Klenow fragmentas

Aktyvumai:

5' – 3' polimerazinis aktyvumas

3' – 5' ekzonukleazinis aktyvumas

DNR polimerazės I 5' – 3' ekzonukleazinis aktyvumas gali būti pašalintas kartu su baltymo N galu skaldant DNR polimerazę I fermentu tripsinu. Pirmas tą parodė danų mokslininkas Klenow. To pasėkoje gaunamas mažesnio dydžio fermentas, pilnai išlaikęs DNR polimerazinį aktyvumą ir 3' – 5' ekzonukleazinį aktyvumą. Toks fermentas vadinamas DNR polimerazės I didysis fragmentas arba Klenow polimerazė arba Klenow fragmentas. Klenow fragmentas ilgą laiką buvo naudojamas DNR sekvenavimo darbuose, dabar pakeistas efektyvesniais fermentais. Klenow polimerazė naudojama DNR galų bukinimui, 3' galo žymėjimui, antros grandinės sintezei tikslinės mutagenzės eksperimentuose ir kDNR sintezės reakcijoje, DNR žymėjimui atsitiktinių pradmenų metodu.

DNR žymėjimas atsitiktinių pradmenų metodu: Žymima DNR sumaišoma su oligonukleotidais pav. šešetukų mišiniu į kuriį įeina visi galimi šešių nukleotidų deriniai. DNR denatūruojama, renatūracijos metu kiekvienas šešetukas žymimos DNR grandinėse susiranda sau komplementarias sekas ir prisijungia vandeniliniiais ryšiais prie DNR grandinės. Į reakcijos mišinį įdedami dNTP, kurių vienas ar keli žymėti, pridama Klenow polimerazė. Kiekvienas šešetukas tarnauja pradmeniu komplementarios grandinės sintezei, tokiu būdu Klenow polimerazė sintetina daug įvairių DNR fragmentų, kurie visi būna žymėti.

T4 DNR polimerazė

Bakteriofago T4 koduojamas fermentas. Aktyvumai ir panaudojimas yra tokie patys, kaip ir Klenow polimerazės:

5' – 3' polimerazinis aktyvumas

3' – 5' ekzonukleazinis aktyvumas

Ekzonukleazinis T4 polimerazės aktyvumas yra apie **400 kartų** didesnis, negu Klenow polimerazės. Fermentas gali būti naudojamas tiems pat tikslams, kaip ir Klenow polimerazė, išskyrus sekvenavimą, nes didelis 3' – 5' ekzonukleazinis aktyvumas efektyviai pašalina įjungtus ddNTP. Dėl didelio nukleazinio aktyvumo T4 DNR polimerazę tikslinga naudoti DNR galų bukinimui, ypač norint užbukinti išsikišusį 3'OH galą: fermento nukleazinis aktyvumas, esant buferyje dNTP nuskaldo išsikišusį galą iki komplementarios grandinės pradžios. T4 DNR polimerazės 3' – 5' ekzonukleazinis aktyvumas yra žymiai didesnis skaldant viengrandę DNR, negu dvigrandę.

T7 DNR polimerazė

Bakteriofago T7 koduojamas fermentas. Aktyvumai ir panaudojimas tokie pat, kaip ir Klenow polimerazės:

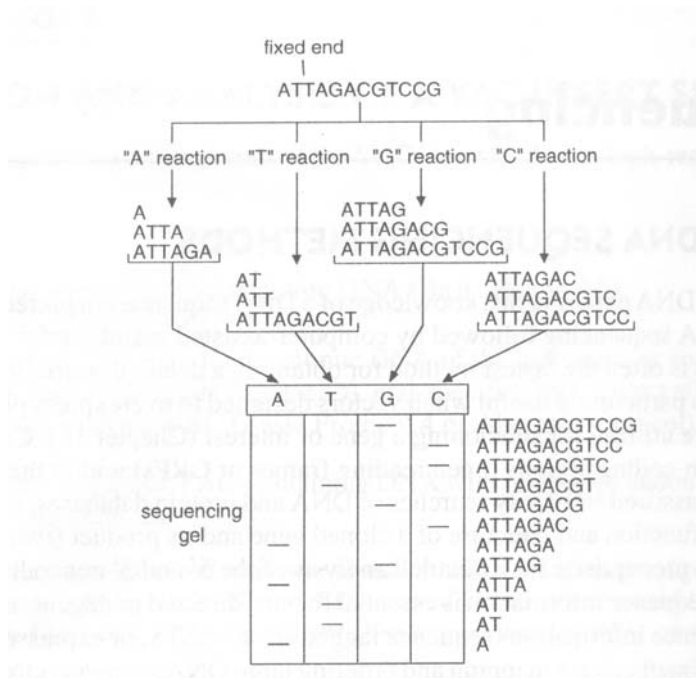
5' – 3' polimerazinis aktyvumas

3' – 5' ekzonukleazinis aktyvumas, skaldo tiek viengrandę, tiek dvigrandę DNR.

Ekzonukleazinis T7 polimerazės aktyvumas yra apie 1000 kartų didesnis, negu Klenow polimerazės. Be to, bakteriofago sintetinio fermento aktyvumui reikalingas šeimininko - *E. coli* ląstelėje sintetinamas nedidelės molekulinės masės (12 kDa, *trxA* geno produktas) baltymas tioredoksinas.

Fermentas tarpe kitų DNR polimerazių išsiskiria gebėjimu sintetinti *in vitro* didelius DNR fragmentus, t.y. šis fermentas pasižymi dideliu *procesyvumu*.

T7 DNR polimerazė naudojama 3' galų žymėjimui, komplementarios grandinės sintezei kryptingos mutagenzės reakcijose, DNR galų bukinimui, komplementarios grandinės sintezei mutagenzėje, antros grandinės sintezei kDNR sintezės reakcijoje, t.y. ten pat, kaip ir Klenow ar T4 DNR polimerazės. Labiausiai naudojamas yra T7 DNR polimerazės variantas su panaikintu ekzonukleaziniu aktyvumu. Ekzonukleazinį aktyvumą galima panaikinti cheminiais metodais, oksiduojant His aminorūgšties liekanas geležies druskomis arba, kas žymiai patogiau, modifikuojant geną, pakeičiant ekzonukleaziam aktyvumui būtinų aminorūgščių kodonus į kitų aminorūgščių kodonais. Mutantinė T7 DNR polimerazė dešimtmečius dominavo DNR sekvenavimo darbuose, šiuo metu ją dalinai išstūmė *Taq* ir kitos termofilinės DNR polimerazės. Pastaraisiais metais sukurta nauja, mutantinė, temperatūrai atspari T7 DNR polimerazės forma vėl plačiai naudojama DNR sekvenavimo darbuose. T7 DNR polimerazę galima naudoti ir kaip nukleazę, į reakcijos mišinį nededant dNTP.



Pav. 1.2. DNR sekvenavimo schema pagal Sanger.

Taq polimerazė

Termofilinių DNR polimerazių suradimas (*Taq* iš *Thermus aquaticus*, *Tth* iš *Thermus thermophilus* ir kitos) ir pritaikymas sukėlė naują revoliuciją šiuolaikinėje biologijoje. 1983 m. K.B.Mullis aprašė DNR kopijų sintezę, panaudojant du pradmenis ir Klenow polimerazę (1993 m. jam paskirta Nobelio premija). Tačiau šis jo atradimas buvo realizuotas žymiai vėliau, panaudojus termofilinę DNR polimerazę. DNR sintezė, panaudojant du priešingos krypties pradmenis, pavadinta grandininė polimerazinė (arba ciklinė) reakcija (PCR). PCR reikalinga du pradmenys, kiekvienai grandinei sintetinti. Pradmenų 5' galai turi riboti norimo susintetinti DNR fragmento dydį. Pradmenys paprastai sintetinami cheminiais metodais, įprastas jų dydis 15-30 nt. PCR panaudojant termofilinę DNR polimerazę, pav. *Taq* DNR polimerazę, išskirtą iš bakterijų *Thermus aquaticus*, arba rekombinantinę *Taq*, išskirtą iš *E. coli*, įgalina DNR sintezės aktą kartoti daug kartų nepridedant papildomai fermento. PCR susideda iš 3 ciklų:

1. DNR denatūracija – 94⁰C
2. Pradmens prilydymas prie kopijuojamos DNR (48⁰C -60⁰C), priklausomai nuo pradmens dydžio ir G/C sudėties. Šioje stadijoje pradmuo suranda

komplementarią DNR grandinę ir prisijungia prie jos, konkuruodamas su priešinga DNR grandine.

3. DNR sintezė – 72⁰C.

Šiuos tris ciklus kartojat 25-30 kartų, iš kelių ng DNR galima gauti pakankamus DNR kiekius įvairioms genų inžinerijos manipuliacijoms. Tokiu būdu, paėmę keletą mikrolitrų kraujo, arba plaukų šaknelę, arba keletą bakterijų, galima padauginti norimą genomo DNR fragmentą, nustatyti jo DNR seką, klonuoti į vektorius ir atlikti kitas manipuliacijas. PCR atliekama specialiuose aparatuose (termocikleriai), kurie pagal norimą programą keičia temperatūrą.

Tokiu būdu, PCR įgalino išskirti norimą, žinomos DNR sekos fragmentą iš įvairiausių organizmų. Tai labai pagreitino šiuolaikinės biologijos progresą. Ypač plačiai PCR reakcija taikoma diagnostikoje: patogenų identifikavimui (bakterijų, virusų), paveldimų ligų diagnostikai - mutacijų nustatymui, DNR sekvenavimui ir kasdieniniuose genų inžinerijos darbuose.

RNR virusų identifikavimui PCR kombinuojama su atvirkštinės transkripcijos (AT) reakcija. Kaip taisyklė, tame pačiame mišinyje atliekamas vienas AT ciklas, kurio metu susintetinama viengrandė DNR, po to atliekama 30-40 ciklų PCR, kurių metu ši DNR padauginama.

Taę polimerazės tikslumas nėra labai didelis, klaidų skaičius sudaro apie $5 \cdot 10^{-5}$. Šios polimerazės 3'-5' egzonukleazinis aktyvumas yra labai nedidelis, todėl ji menkai šalina neteisingai įjungtus nukleotidus. Siekiant padidinti tikslumą, naudojamos termofilinės polimerazės, pasižyminčios stipresniu 3'→5' egzonukleaziniu aktyvumu, pav. *Pfu*, *Vent* DNR polimerazės. Tačiau didelis egzonukleazinis aktyvumas hidrolizuoja susintetintą DNR bei pradmenis, tokiu būdu sukelia papildomų problemų. Šiuo metu labai pasiteisino dviejų polimerazių, pav. *Taq* ir *Pfu* mišinio naudojimas.

Bakteriofago φ29 DNR polimerazė.

Tai neseniai praktikoje pradėta naudoti DNR polimerazė, tačiau jos panaudojimas įgauna labai didelius mastus. Bakterijų *B.subtilis* bakteriofago φ29 genomas sudarytas iš linijinės DNR. Panašiai, kaip adenovirusų atveju bei linijinių DNR plazmidžių atveju, bakteriofagas φ29 koduoja specifinę DNR replikacijos sistemą, susidedančią iš DNR polimerazės ir terminalinio baltymo. *In vivo* terminalinis baltymas saveikauja su DNR polimeraze ir savo C-galu pateikia

komplementariai grandinei dAMP, kuris tarnauja pradmeniu DNR sintezei. Tokiu būdu susintetinta bakteriofago DNR 5'-galuose turi kovalentiškai prijungtą terminalinį baltymą. Tačiau $\phi 29$ DNR polimerazė pasižymi galimybe inicijuoti DNR sintezę ne tik nuo terminalinio baltymo pateikiamo dAMP, bet *in vitro* ir nuo didelės koncentracijos ($50\mu\text{M}$) egzozonukleazėms atsparių oligonukleotidų 3'-OH galų, t.y. nuo tradicinių pradmenų, naudojamų PCR reakcijose. Antra labai svarbi šio fermento savybė yra gebėjimas sintezės metu efektyviai išstumti susintetintą grandinę. Tokiu būdu, naudojant žiedinę matricą, ši polimerazė gali sintetinti labai ilgas DNR molekules, susidedančias iš daugelio kovalentiškai sujungtų žiedinės matricos pasikartojimų. Trečia labai svarbi šios polimerazės savybė yra jos labai didelis procesyvumas. $\phi 29$ DNR polimerazė gali susintetinti labai ilgas DNR molekules. Per trumpą laiką, t.y. per keletą minučių šios polimerazės pagalba galima susintetinti pakankamai daug DNR ir ją naudoti sekvenavimui ir kitiems tikslams.

Vidutinis $\phi 29$ DNR polimerazės procesyvumas – $>70\text{kb}$ per vieną susirišimo su matrica aktą! Tačiau yra duomenų, kad galima gauti net 800 kb ir daugiau. Linijinė DNR sintezės kinetika stebima 2 parų laikotarpyje. Šios polimerazės pagalba galima amplifikuoti plazmides tiesiai iš kolonijos, gautą DNR panaudoti sekvenavimui. Tokiu būdu atkrinta poreikis auginti bakterijas ir skirti plazmidinę DNR sekvenavimui. DNR sintezės greitis $25\text{-}50\text{ nt/sek}$. Panaudojant heksa nukleotidinius pradmenis galima gauti per kelias valandas μg kiekiai DNR iš pg. Tikslumas – viena klaida iš $3 \cdot 10^6\text{ nt}$. Ypač vertinga ši polimerazė genomų sekvenavimui. Kai kurios genomų sekos nesiklonuoja nei į plazmides, nei į kosmides, nei į BAC'us. Tai vadinamos “nuodingos DNR sekos”. Nestabili dažnai būna DNR, susidedanti iš įvairių pasikartojimų, palindrominių sekų, labai turtinga G/C DNR, arba priešingai, labai turtinga A/T DNR. Tokias sekas, $\phi 29$ DNR polimerazės pagalba galima padauginti tiesiai nuo genomines DNR ir sekvenuoti išvengiant klonavimo. DNR padauginimui užtenka 1μ kraujo arba 10 žmogaus ląstelių (MDA - *Multiple displacement amplification*). Genominės DNR amplifikacija $\phi 29$ DNR polimeraze yra labai tolygi, lyginant su PCR amplifikacija. Tarp iš atskirų chromosomų regionų gautų DNR pavyzdžių skirtumai būna labai nedideli ir gaunamos DNR kiekis skiriasi iki 3 kartų, tuo tarpu amplifikacijos efektyvumas PCR naudojant termofilines polimerazes gali skirtis net 4-6 eilėmis.

Terminalinė deoksinukleotid-transferazė

Tai DNR polimerazė, kuri geba prie 3' DNR galo prijungti deoksinukleotidus be matricos. Šio fermento biologinė funkcija – prijungti P nukleotidus V(D)J rekombinacijos metu, kuri vyksta formuojantis antikūnams bręstančiose kraujo B ląstelėse. Gryninamas iš veršio užkrūčio (*thymus*) liaukos arba rekombinantinių *E. coli* producentų.

Fermentas *in vitro* naudojamas:

- Homo- ir hetero- polimerų sintezei
- homopolimerinių galų sintezei
- 3' galų žymėjimui

Homopolimeriniai galai kartais naudojami DNR fragmentų klonavimui. Šiam tikslui, prie linearizuoto vektoriaus 3'-OH galų terminalinės transferazės pagalba prisintetinama kelios dešimtys C nukleotidų. Atatinkamai, prie klonuojamų fragmentų galų prisintetinami oligo G galai. Sumaišius, susiformuoja pakankamai stipri komplementarių oligoC ir oligoG galų sąveika. Įvedus tokį mišinį į ląstelę, reparacijos sistemos suliguoja abi grandines. Šiuose eksperimentuose klonavimui galima naudoti ultragarsu fragmentuotą DNR.

Klonavimas be DNR-ligazės.

Naudojant terminalinę transferazę, galima suformuoti komplementarius klonuojamų fragmentų galus, tokiu būdu galima apsieiti be ligazės. Yra dar keletas klonavimo be ligazės metodų.

Vaccinia viruso topoizomerazės panaudojimas. Invitrogen firma išleidžia TOPO klonavimo rinkinį, į kurį įeina klonavimui paruošta linearizuota plazmidė su vieno T laipteliu. Šis laiptelis neleidžia vektoriui liguotis su savimi. Prie vektoriaus 3' galų yra prijungta *vaccinia* viruso topoizomerazė. Sumaišius taip paruoštą vektorių su PCR metodu gauti fragmentu (PCR reakcijoje dideliu dažnumu fragmento gale įvedamas papildomas A, todėl PCR fragmentai turi išsikišusį A laiptelį) fragmentu, topoizomerazė suformuoja kovalentinę jungtį tarp vektoriaus ir fragmento. Reakcija trunka apie 30 sek.

DNR polimerazių ekznukleazinio aktyvumo panaudojimas. Novagen išleidžia klonavimui paruoštą vektorių rinkinį, su išsikišusiais gana ilgais viengrandžiais laipteliais. Norint klonuoti į tokius vektorius, reikalinga klonuojamų fragmentų

galuose suformuoti vektoriaus galams komplementarius galus. Tai atliekama PCR ir DNR polimerazių ekzonukleazinio aktyvumo pagalba. PCR pagalba prie klonuojamo fragmento galų, specifinių pradmenų pagalba įvedamos sekos, komplementarios vektoriaus išsikišusiems galams, susidedančios iš 3 skirtingų nukleozidų (pav. A, G, C). Tokį DNR fragmentą veikiant pav. T4DNR polimeraze reakcijos mišinyje, savo sudėtyje turinčiame dNTP (dTTP), kurio nėra galų struktūroje. T4-DNR polimerazės ekzonukleazinis aktyvumas skaldys fragmento 3'-galą tol, kol pasieks T. Kadangi reakcijos mišinyje yra dTTP, šioje vietoje skaldymas sustos, nes fermento polimerazinis aktyvumas įstatys T. Tokiu būdu klonuojamajame fragmente galima suformuoti laiptelius, komplementarius vektoriaus laipteliams. Tokio metodo privalumas yra tai, kad vektorius negali liguotis pats su savimi, nes paruošiami skirtingi laipteliai, todėl dauguma išaugusių klonų būna rekombinantiniai.

Šie metodai yra patogūs, kada naudojami komerciniai, firmų paruošti vektoriai, nes vektorių paruošimas yra sudėtingas, atimantis daug laiko.

Atvirkštinė transkriptazė

Tai fermentai, rasti retrovirusuose, įgalinantys viengrandį retrovirusų RNR genomą paversti į dvigrandę DNR molekulę. Fermentas dažniausiai gryninamas iš rekombinantinių *E. coli* producentų. Praktikoje dažniausiai naudojamas pelių (M-MuLV – *Maloney Murine Leukemia Virus*) ir paukščių leukemijos (ALV – *avian leukaemia virus*) virusų kilmės fermentai. Šio fermento RNazės H aktyvumas pašalintas taškine mutacija.

Praktikoje atvirkštinė transkriptazė naudojama *in vitro* DNR sintezei, panaudojant RNR matricą, t.y. kDNR (cDNA – copy DNA - kDNR) sintezei. Šio fermento panaudojimas įgalina subrendusios mRNR seką paversti į dvigrandę DNR, tokiu būdu išskirti koduojančią geno DNR dalį ir toliau su ja atlikti norimas manipuliacijas.

Fermentas naudojamas:

- kDNR sintezei
- RNR virusų diagnostikai (AT-PCR)
- RNR galų kartiravimui pradmenų pratempimo reakcijoje
- Gali būti naudojamas DNR 3' galų žymėjimui bei DNR sekvenavimui

- AT-PCR reakcija – norimų DNR fragmentų sintezei naudojant RNR matricą..

1.4. RNR polimerazės

T7 bakteriofago RNR polimerazė

T3 bakteriofago RNR polimerazė

SP6 bakteriofago RNR polimerazė

Tai bakteriofagų T7, T3 ir SP6 koduojamos RNR polimerazės. Gryninamos iš rekombinantinių *E. coli* producentų. Šios polimerazės skiriasi nuo bakterinių RNR polimerazių pirmiausia tuo, kad susideda tik iš vieno baltymo. Kita svarbi savybė – šios polimerazės atpažįsta tik tam bakteriofagui specifinius, nedidelius (17-19 nt) promotorius ir neskaito bakterijų ar kitų bakteriofagų genų promotorių.

RNR polimerazės naudojamos RNR sintezei *in vitro*. Dauguma populiarių klonavimo vektorių savo struktūroje turi įjungtus minimų polimerazių promotorius. Klonavus į tokį vektorių DNR fragmentą, RNR polimerazės pagalba galima gauti didelį kiekį klonuoto geno RNR kopijų. RNR preparatai reikalingi hibridizacijos eksperimentuose, kuriuose RNR naudojama zonda, įvairiuose priešpriešės RNR (*antisense*) eksperimentuose, RNAi tyrimuose, siRNR ir miRNR sintezei *in vitro* RNR transliacijos eksperimentuose, RNR – baltymų sąveikos tyrimuose, o taip pat įvairiausiuose kituose RNR fizinių ir biologinių savybių tyrimuose.

1.5. T4 polinukleotid-kinazė

Kinazės – fermentai fosforilinantys DNR arba baltymus. T4 bakteriofago polinukleotid kinazė efektyviai fosforilina, tai yra prijungia prie 5' galo fosfato liekaną paimdama ją iš ATP (γ fosfatą). Kinuoti, t.y. fosforilinti 5'-galus yra būtina norint klonuoti chemiškai susintetintus oligonukleotidus, kurių 5' galai paprastai neturi fosfato. Kitas panaudojimas – 5' DNR galų žymėjimas radioaktyviu fosforu. Žymėta DNR reikalinga hibridizacijos eksperimentuose, DNR sekvenavimui ir daugelyje kitų eksperimentų. Žymėjimui naudojamas ATP, turintis radioaktyvų fosforą γ padėtyje. T4 kinazė pasižymi ir 3'-fosfatazės aktyvumu.

1.6. Šarminės fosfatazės

Tai fermentai, kurie nuo DNR 5' galų pašalina fosforo rūgštis (PO_4) liekaną. Fermentai naudojami klonavimo eksperimentuose, vektoriaus nufosforinimui, siekiant, kad vektoriaus molekulė negalėtų užsidaryti neįjungdama papildomo DNR fragmento.

Kitas taikymas – DNR 5' galų žymėjimui – prieš veikiant kinaze reikalinga pašalinti fosfatus 5' galuose.

Populiariausios fosfatazės yra: bakterijų šarminė fosfatazė (BAP - *bacterial alkaline phosphatase*), veršio žarnų šarminė fosfatazė (CIAP - *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*). Šiuo metu sparčiai populiarėja iš krevečių išskiriama šarminė fosfatazė (SAP - *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Jos privalumas yra tas, kad šis fermentas, priešingai bakterijų šarminei fosfatazei, yra pakankamai jautrus temperatūrai ir lengvai inaktyvuojamas aukštoje temperatūroje (65°C).

1.7. Nukleazės

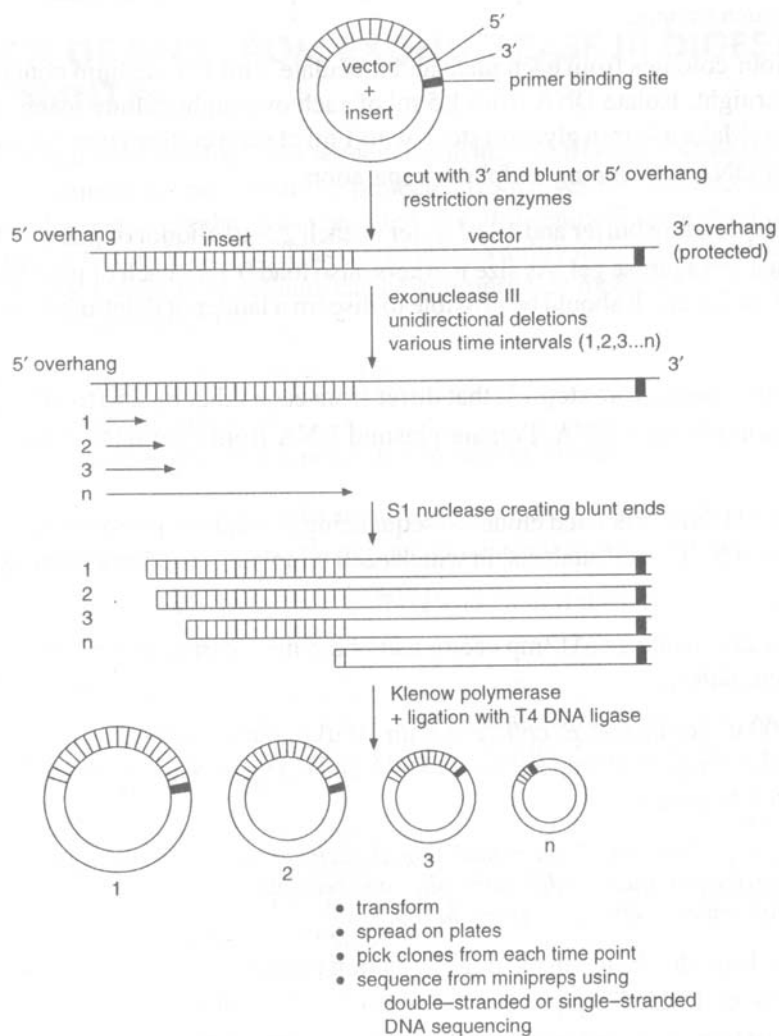
Ekzonukleazė III

Lambda bakteriofago fermentas, dažniausiai valomas iš rekombinantinių *E. coli* producentų, turinčių šio fermento geną ekspresijos plazmidės sudėtyje.

Fermento specifiškumas – 3'-5' ekzonukleazė, t.y. skaldo DNR vieną grandinę tik nuo 3'OH galo. Svarbi šio fermento savybė yra ta, kad jis neskaldo DNR, jeigu DNR 3'OH galas yra atsikišęs. Tokiu būdu, turint DNR fragmentą, kurio viename gale 3'OH paslėptas, kitame išsikišęs, galėsime suskaldyti tik vieną DNR grandinę.

Pagrindinis fermento taikymas – kryptingų delecijų ruošimui DNR sekvenavimo darbams. Taip pat gali būti naudojamas viengrandės DNR gavimui, kryptingoje mutagenezėje. Kryptingų delecijų gavimo principas pateiktas paveikslėlyje.

Pavyzdžiui, PstI- ctgca'g ; EcoRI- g'a.r.ttc ; SphI- gcatg'c ; ExoIII neskaldo PstI ir SphI galų, skaldo EcoRI galą.



Pav. 1.3. Delecijų gavimo schema

Nukleazė BAL31

Gryninama iš *Alteromonas espejiana* arba rekombinantinių *E. coli* producentų. Katalizuoja tolygų abiejų DNR grandinių skaldymą iš 5' ir 3' galų taip pat viengrandės DNR ir RNR degradaciją. Skaldo tiek viengrandes, tiek dvigrandes DNR. Fermentas pasižymi ir endonukleaziniu aktyvumu - skaldo DNR turinčią viengrandį trūkį – skelia sveikąją grandinę priešais trūkį. Fermentas naudojamas DNR trumpinimui, trūkių identifikavimui, delecijų ruošimui. Aktyvumui reikalingi Ca^{++} ir Mg^{++} jonai.

S1 nukleazė

Gryninama iš *Aspergillus oryzae*, rekombinantinių *E. coli* arba mielių *S.cerevisiae* producentų. Neseniai UAB Fermentas pademonstravo, kad mielės labai efektyviai sekretuoja rekombinantinę S1 nukleazę. S1 nukleazė degradoja

viengrandžius DNR fragmentus. Fermentas naudojamas išsikišusių DNR fragmentų pašalinimui, RNR transkriptų kartiravimui, kombinacijoje su ExoIII nukleaze - vienkrypčių delecijų gavimui.

Ribonukleazė H

Gryninama iš *E. coli* producentų. Efektyviai skaldo RNR DNR-RNR hibriduose. Biologinė funkcija – RNR pradmenų pašalinimas Okazaki fragmentuose. Taikoma RNR pašalinimui kDNR sintezėje, prieš sintetinant antrą DNR grandinę.

Ribonukleazė A

Gryninama iš galvijų kasos. Naudojama RNR pašalinimui iš DNR ir baltymų preparatų, RNR – baltymų sąveikai tirti.

Ribonukleazė T1

Gryninama iš *Aspergillus oryzae* arba rekombinantinių *E. coli* producentų. Naudojama RNR pašalinimui, RNR kartiravimui, RNR – baltymų sąveikai tirti. Skelia RNR ties 3'-guanino fosfodiesterine jungtimi.

Mikrokokų nukleazė

Gryninama iš *Staphylococcus aureus* arba rekombinantinių *E. coli* producentų. Fermentas katalizuoja nespecifinę viengrandės ir dvigrandės DNR degradaciją, jeigu nukleorūgštis prieinama iš visų pusių. Naudojama chromatino tyrimams, RNR sekvenavimui, NR degradacijai ląstelių lizatuose.

Deoksiribonukleazė I

Gryninama iš galvijų kasos. Nespecifiškai skaldo viengrandę ir dvigrandę DNR. Dvigrandę DNR skelia ties mažuoju grioviu. Naudojama baltymų – DNR sąveikai tirti, DNR pašalinimui iš įvairių preparatų (baltymų, RNR, T7, T3, SP6 RNR polimerazių pagalba gautų RNR preparatų, DNR pašalinimui prieš AT-PCR), nik-transliacijos reakcijoje viengrandžių DNR trūkių įvedimui (naudojant labai mažas fermento koncentracijas).

Ribonukleazė DICER

Priklauso *E. coli* III tipo ribonukleazių šeimai, skaldo dvigrandę RNR į 21/23 nt fragmentus, paliekant išsikišusius 2nt 3'-OH galus. Naudojama ruošiant *in vitro* siRNR iš ilgų dvigrandės RNR molekulių, paruoštų hibridinant komplementarias RNR, gautas RNR polimerazių pagalva *in vitro*.

1.8. Agarazė

Fermentas dažniausiai skiriamas iš *Pseudomonas atlantica* arba rekombinantinių *E. coli* producentų, skaldo agarą ir agarozę. Fermentas naudojamas DNR ir RNR išgryninimui iš agarozės gelių. Ypač reikalingas didelių DNR fragmentų išgryninimui.

2. Bakterijų plazmidžių replikacija

Plazmidės yra ekstrachromosominiai DNR elementai su kiekvienai būdingu kopijų skaičiumi. Plazmidės rastos visose trijose gyvosios gamtos karalystėse, *Archaea*, *Bacteria* ir *Eukarya*. Atskirais atvejais (*Archaea*) plazmidės gali sudaryti net iki 25% ląstelės genetinės medžiagos. Plazmidžių pagalba genai gali būti pernešami tarp bakterijų rūšių, to pasekoje vyksta gana intensyvūs pokyčiai bakterijų populiacijose. Plazmidžių biologijos vystymąsi ypač skatino pastebėtas greitas genetinių determinantų, koduojančių atsparumą antibiotikams, plitimas tarp patogenų. Šį plitimą daugiausia apsprendė plazmidės ir bakterijų transpozonai, savo sudėtyje turintys genus, apsprendžiančius antibiotikų degradaciją (beta-laktamazės – degraduoja laktamo žiedą penicilino dariniuose), modifikacijas – acetilinimą, fosforilinimą, (chloramfenikol-acetilazė – acetilina ir detoksikuoja chloramfenikolą (levomicetina), kanamicino-fosfotransferazė (fosforilina neomiciną ir kanamiciną) ir kt. ar membranų pralaidumą (tetraciklinui).

Naujas plazmidžių tyrimo etapas prasidėjo siekiant jas pritaikyti genų padauginimui, laikymui ir įvedimui į ląsteles genų inžinerijos eksperimentuose. Plazmidžių genetinė organizacija yra paprasta, jas lengva išskirti ir manipuluoti jomis *in vitro* ir *in vivo*, šios manipuliacijos dažniausiai neturi neigiamos įtakos ląstelei – šeimininkui.

Viena iš svarbių plazmidžių savybių yra jų autonomiška replikacija ir replikacijos bei kopijų skaičiaus auto-kontrolė. Plazmidžių replikacijos reguliacijos kontrolės tyrimai pirmą kartą atskleidė naują genų reguliacijos būdą, paremtą reguliacija priešpriešinė RNR (*antisens*). Kai kurios plazmidės sėkmingai įveikia tarprūšinius barjerus ir tokiu būdu skatina rūšių evoliuciją, kartu patvirtina, kad atskirose rūšyse replikacijos mechanizmai yra labai panašūs. Tai vėliau buvo patvirtinta tyrinėjant chromosomos replikacijos mechanizmus.

Išskiriami trys pagrindiniai plazmidžių replikacijos mechanizmai, pagal kuriuos galima suklasifikuoti didžiąją plazmidžių dalį. Tai (i) **teta (θ) tipo replikacija**, (ii) **grandinės išstūmimo (*strand displacement*)** tipo replikacija ir (iii) **riedančio rato (RR)** replikacija. θ tipo replikacija labai paplitus G^- (neigiamos pagal Gramą) bakterijų tarpe, tačiau sutinkama ir G^+ (teigiamos pagal Gramą) bakterijose, RR replikacija, atvirkščiai, daugiau dominuoja G^+ bakterijose. Grandinės

ištūmimo tipo replikacija sutinkama daugiausia plataus šeimininkų spektro plazmidėse priklausančiose IncQ šeimai (Inc – *incompatibility* - nesuderinamumas). Ketvirta plazmidžių grupė būtų linijinės plazmidės. Jas pagal replikacijos mechanizmą galima būtų suskirstyti į dvi grupes, viena - plazmidės galuose formuojančios uždara segtuko formos struktūrą, kita - plazmidės galuose, prie 5'-galo turi prijungtą baltymą, kuris pateikia pirmą nukleotidą, tarnaujantį pradmeniu, Tokį mechanizmą naudoja ir kai kurie virusai (žinduolių adeno virusai), bakteriofagai (B. subtilis bakteriofagas ϕ 29), eukarijotinės plazmidės (mielių *K.lactis* linijinės DNR plazmidės k1 ir k2).

Genų inžinerijos eksperimentuose daugiausia naudojamos Gram-neigiamos (G⁻) bakterijų *E. coli* plazmidės, todėl daugiausia apie jas ir kalbėsime.

Visos plazmidės turi genetinius lokusus, koduojančius plazmidei specifinius genus bei *cis*-elementus, dalyvaujančius replikacijos kontrolėje. Be šių plazmidės replikacijai būtinų elementų, randami kiti, išgyvenimui nebūtinai elementai, suteikiantys atsparumą antibiotikams ir kitiems cheminiams junginiams, apsprendžiantys plazmidės plitimą tarp rūšių ir rūšies viduje, plazmidės inkorporaciją eukarijotinėje ląstelėje (agrobakterijų plazmidės Ti ir Ri).

Kiekvienos plazmidės replikacijai yra būtina replikacijos pradžios seka, vadinama **replikacijos** ori. Ori seka dažniausiai yra specifiška kiekvienai skirtingai plazmidei, t.y. kiekvienam skirtingam replikonui. Dauguma plazmidžių koduoja baltymą, vadinamą **Rep**, būtiną plazmidės replikacijos iniciacijai. Be šių dviejų elementų, randami papildomi genai ir *cis* elementai, kontroliuojantys replikaciją ir reguliuojantys plazmidės kopijų skaičių.

2.1. Teta (θ) tipo replikacija

Plazmidės, besireplikuojančios θ mechanizmu buvo gerai ištirtos G⁺ bakterijose streptokokuose/enterokokuose (Inc18 grupė), laktokokuose, *Bacillus subtilis* bakterijose, bei G⁻ bakterijose *E. coli*. Replikacijos principas – DNR grandinės perskiriamos ori srityje, sintetinamas RNR pradmuo (pRNR), po to inicijuojama DNR sintezė. Viena grandinė sintetinama ištisai, kita – fragmentais. Tačiau abiejų grandinių *sintezė koordinuota*. Replikacija gali prasidėti nuo vieno, kartais ir nuo kelių ori. Replikacija gali būti vienkryptė arba dvikryptė. Pavadinimas “ **θ replikacija**” kilo iš elektroninės mikroskopijos stebėjimų, kuriuose besireplikuojanti

plazmidė priminė graikiška raidę teta - Θ . Suskaldžius tokias molekules REaze, kerpančia per jau replikavusius taikinius, gaunama Y formos molekulės – “šakutės”. Replikacijos tarpinių produktų EM analizė, karpymas REazėmis bei dvikryptė elektroforezė suteikė informacijos apie replikacijos kryptį, tarpinius produktus, ori ir *ter* (terminacijos) lokalizaciją plazmidės DNR, ryšį tarp vedančios ir atsiliekančios grandinių. Daugumai θ besireplikuojančių plazmidžių iniciacijai reikalingas Rep baltymas, kai kurių plazmidžių ankstyvosios vedančios grandinės sintezei reikalinga DNRPolI.

Ori

Ori galima apibrėžti, kaip minimalų *cis* padėtyje veikiančią DNR fragmentą, užtikrinančią autonomišką plazmidžių replikaciją. Šiame regione DNR grandinės išslydomos ir prasideda vedančiosios grandinės sintezė. Šiame regione lokalizuoti replikacijoje dalyvaujančių baltymų sąveikos taikiniai.

***E. coli* chromosomos ori**

Prieš kalbėdami apie plazmidžių replikaciją, replikacijos reguliaciją, panagrinėsime *E. coli* chromosomos replikacijos iniciaciją bei *E. coli* chromosomos ori sritį, nes daugelis komponentų, naudojamų plazmidžių ir chromosomos replikacijoje yra bendri.

E. coli replikacijos iniciacijos sritis, pavadinta *oriC*, buvo gerai ištyrinėta klonavus šią 245 bp seką. Pradžioje buvo klonuota 2.2 kb fragmentas. Jokių esminių genų šiame fragmente nebuvo rasta. Perkėlus *oriC* sritį iš chromosomos į plazmidės, plazmidžių su *oriC* sritimi replikacijai buvo reikalingi tie patys baltymai, kaip ir *E. coli* chromosomos replikacijai. Tokios dirbtinės plazmidės replikacijos iniciacija yra pilnai koordinuojama su chromosomos replikacija. *OriC* plazmidės, pavadintos minichromosomomis, yra labai patogus *oriC* tyrimų modelis. *OriC* plazmidės gali funkcionuoti ląstelėje greta chromosomos, jų nesuderinamumas su chromosoma pasireiškia tik limitavus (mutacijomis) *DnaA* baltymo kiekį ląstelėje. *OriC* plazmidės yra mažakopijinės ir, kadangi neturi paskirstymo tarp besidalijančios ląstelės mechanizmo, nėra stabilios.

OriC sekos organizacija.

1. Minimali *E. coli* *oriC* seka yra 245 bp., tačiau replikacijos iniciacijai turi įtakos ir aplinkinės sekos.
 2. *OriC* sekoje randami 5 konservatyvūs blokai – nanomerai R1, R2, R3, R4 ir M, sudaryti iš 9 nt. Šie blokai yra beveik identiški, išsidėstę įvairia orientacija. Panašūs blokai rasti ir dar 5 enterobakterijų chromosomų ori sekose. Šių bakterijų genomai evoliucijos eigoje atsiskyrė prieš milijonus metų, tačiau ori sekos pakito mažai. Pakitimai randami tik tose vietose, kurios nėra reikšmingos replikacijai.
- R1, R2, R3, R4 ir M yra - specifinės baltymo *DnaA* atpažinimo ir susirišimo sekos - *DnaA* taikiniai (*DnaA box*). *DnaA* baltymas – *E. coli* pagrindinis replikacijos iniciatorius, absoliučiai būtinas replikacijai prasidėti. *DnaA* baltymo taikiniai – nanomerai, randami ir plazmidžių ori, taip pat kai kurių genų promotoriuose. Kaip taisyklė, šie genai yra susiję su replikacija. Tokiu būdu *DnaA* baltymas

reguliuoja genų, susijusių su replikacija transkripcija, tame tarpe ir savo paties geno *DnaA* geno transkripciją – jo promotoriuje yra DnaA taikynys. Kairėje (5') *oriC* dalyje randami trys tryliktukai, kurie tarnauja dvigrandės DNR atidarymui. Šie 13-tukai yra baltymo DnaB - helikazės susirišimo vieta. Šios sekos yra A/T turtinga, superspiralizuotoje būsenoje lengvai lydosi net be baltymų pagalbos. DnaB yra svarbi ir DnaA baltymo sąveikai.

3. Konservatyviose srityse jokie sekos pakitimai netoleruojami

4. *OriC* sekoje randama 11 GATC sekų pasikartojimų, tuo tarpu tokių sekų tikimybė *E. coli* genome yra tik 1/250bp. Šios sekos nėra atsitiktinės. GATC seka *E. coli* yra metilinama DamM metiltransferazės. Ši MTazė metilina A šeštoje padėtyje (Am6). Galima buvo laukti, kad šios sekos metilinimas yra labai svarbus replikacijai, tačiau paaiškėjo, kad *dam⁻* mutantai yra gyvybingi, neturi ryškesnių replikacijos sutrikimų ir laboratorinėmis sąlygomis auga normaliai. Tačiau paaiškėjo, kad *dam* metilinimas visgi yra labai svarbus chromosomos replikacijai. Nustatyta, kad *in vivo* pusiau metilinta DNR, kuri atsiranda tuojau po replikacijos, negali vėl pradėti naujos replikacijos iniciacijos, kol nebus pilnai užmetilintos abi grandinės. Pusiau metilinta DNR yra surišama su membranomis. Kadangi *oriC* sritis yra labai turtinga *dam* metilinimo taikinių, ši sritis yra labiausiai surišama su membranomis.

Laikas, per kurį *oriC* metilinamas yra apie 10 kartų ilgesnis, negu reikalinga kitų sekų metilinimui. Pusiau metilinta DNR inhibuoja replikaciją, *oriC* yra neaktyvus tol, kol pilnai nemetilinamas, arba visai nemetilinamas (*dam⁻*). Paprastai chromosominė DNR metilinama tuoj po replikacijos ir reparacijos, per pirmas minutes, tuo tarpu *oriC* seka metilinama maždaug po 10 min. Taip pat vėluoja ir promotorių, turinčių DnaA taikinius, metilinimas. Paaiškėjo, kad tai inaktyvuoja šiuos promotorius. Tokiu būdu inaktyvuojamas ir DnaA geno promotorius, todėl DnaA baltymas kurį laiką nesintetinamas. Tuo tarpu ląstelei po DNR pasidalijimo norint vėl pradėti replikaciją, sekančiam replikacijos ciklui reikia dvigubai daugiau DnaA baltymų, nes *oriC* kiekis padvigubėjo.

Kaip vyksta šis lokalus Dam metilinimo sustabdymas? Buvo daug spekuliacijų. Elektroniniu mikroskopu matomas organoidas - membraninis kompleksas vadinamas mezosoma. Šis kompleksas reikalingas taisyklingam dviejų chromosomų padalijimui į dvi seserines ląsteles. Per 10 min. tarp besidalijančių ląstelių išauga sienelė. Taigi, paaiškėjo, kad su membranomis susiriša tik pusiau metilinta DNR, o metilinta arba visai nemetilinta (*dam⁻*) nesiriša. Susiriša būtent *oriC* sritis. Šis surišimas apsaugo nuo metilinimo ir tuo pačiu nuo pirmalaikės replikacijos iniciacijos. Iš membranų frakcijos buvo išskirtas baltyminis komponentas, pavadintas SeqA baltymu, kuris inhibuoja iniciaciją. Šis baltymas susiriša su pusiau metilinta DNR, bet nesiriša su metilinta. Paaiškėjo, kad *in vitro* sistemoje šis baltymas konkuruoja su DnaA. Jeigu SeqA baltymą pridėsime anksčiau DnaA baltymo, jis inhibuos DnaA baltymo susirišimą su pusiau metilinta DNR, nes susiriš pats ir DnaA baltymas nebegalės susirišti. Jeigu pirma pridėsime DnaA baltymo perteklių - replikacijos iniciacija nebus inhibuojama. Inhibitorius apsaugo nuo DnaA susirišimo su *oriC*. *Dam* metilinimas išlaisvina nuo šios inhibicijos. Tai galimas replikacijos iniciacijos reguliacijos būdas. Taigi, *oriC* fiziškai apsaugojamas nuo metilinimo, metilinimas sulaikomas, inhibuojama DnaA geno transkripcija. Neaišku, kas ką sąlygoja, ar tai tiesioginis poveikis į replikacijos pradžią ar ne.

SeqA kiekis membranose priklauso nuo ląstelės ciklo, replikacijos iniciacijos metu jo kiekis membranose yra didžiausias, po to pastoviai mažėja. Toks pat dėsningumas būdingas ir pusiau-metilinto *oriC* sąveikai su membranomis. Po replikacijos iniciacijos sąveika didžiausia, po to *oriC* palaipsniui atpalaiduojamas. Ši koreliacija leidžia teigti, kad SeqA suriša pusiau-metilintą *oriC*. Tačiau kaip tirpus SeqA baltymas tą daro, ilgai buvo neaišku. Neseniai buvo identifikuoti kiti baltyminiai komponentai, dalyvaujantis pusiau-metilintos DNR surišime, kartu su SeqA. Membraninis baltymas SeqB sąveikauja su SeqA, stimuliuoja pusiau-metilinto *oriC* surišimą. Išorinėje membranoje buvo identifikuotas HobH baltymas, taip pat dalyvaujantis pusiau-metilintos DNR surišime. Detalūs HobH tyrimai parodė, kad tai yra nespecifinė rūgštinė fosfatazė, vadinama NAP. NAP pasižymi dideliu giminingumu pusiau-metilintai DNR. Manoma, kad dar ne visi baltymai, skatinantys pusiau-metilinto *oriC* surišimą su membranomis, yra identifikuoti, nes pusiau išgryninti baltymai veikia efektyviau, negu pilnai išgryninti.

DnaA baltymas suriša tiek ADP, tiek ATP, abu šie kompleksai gali susirišti su *oriC*, tačiau tik ATP-DnaA kompleksas geba inicijuoti replikaciją. ATP suteikia reikalingą alosterinę konformaciją. ATP hidrolizė matomai nėra esminė, nes ir nehidrolizuojami ATP analogai gali pakeisti ATP. ADP-DnaA komplekso vertimas į ATP-DnaA *in vitro* yra lėtas, pusperiodis sudaro apie 30 min. inkubuojant ATP pertekliuje. Tačiau *in vivo* prieš replikacijos pradžią ATP-DnaA ryškiai padaugėja, po replikacijos iniciacijos ATP hidrolizuojamas. DnaA baltymas pasižymi ATPaziniu aktyvumu. Mutavus DnaA ATPazinį aktyvumą, stebimas padidintas replikacijos iniciacijos dažnumas. Iš to seka, kad ATP reguluoja DnaA aktyvumą. Išgrynintas DnaA baltymas sąveikauja su fosfolipidais *in vitro*. Prodyta, kad fosfolipidinėje membranoje ADP-DnaA komplekse ADP pakeitimą į ATP katalizuoja rūgštiniai fosfolipidai (kardiolipinas, fosfatidilglicerolis). Tolesni tyrimai parodė, kad tokios (*angl. fluid*) membranos, turinčios rūgštinius domenus, aktyvuoja DnaA. DNA baltymo sąveika su membranomis *in vitro* skatina ADP pakeitimą į ATP. Daugelis eksperimentinių faktų patvirtino, kad membranų fosfolipidai moduliuoja DnaA aktyvumą ir *in vivo*.

Imunofluorescencijos ir imunoelektroninės mikroskopijos tyrimų rezultatai rodo, kad DnaA baltymas yra patalpintas bakterijų membranose. DnaA aktyvacijai svarbios yra nesočios riebalinės rūgštys. Oleino rūgšties biosintezės inhibicija kartu inhibuoja ir replikaciją.

Dam metilinimas svarbus ir reparacijoje, nes ląstelės klaidų taisymo sistemos pagal metilinimą atskiria, kuri grandinė sena, kuri nauja, sužino kurią grandinę reikia taisyti.

5. *OriC* srityje prasideda dviejų genų transkripcija į priešingas puses. Manoma, kad transkripcija gali būti svarbi DNR struktūros pakeitimui. Transkripcija stimuliuoja replikacijos iniciaciją. Genų *mio* ir *gida*, kurių transkripcija prasideda *oriC* srityje, koduojami produktai replikacijai nereikšmingi.

DnaA baltymas yra labai svarbus chromosomos replikacijos iniciacijai. Mutantai (*dna ts*) pasižymi defektyvia replikacija, replikacija neinicijuojama. Kai kurie fagai ir plazmidės turi alternatyvias iniciacijos sistemas, nepriklausomas nuo DnaA. Šiose sistemose DnaA baltymas reikalingas tik kaip pagalbinis. *OriC* replikono funkcionavimui jis būtinas ir nepakeičiamas.

DnaA baltymas, monomeras, 52kDa, suriša ATP ir lėtai jį hidrolizuoja. Šis baltymas specifiskai suriša DnaA taikinius *oriC* srityje ir promotoriuose, kur jis veikia transkripcijos

repressoriumi. Jo struktūroje nėra DNR surišantiems baltymams būdingų struktūrinių motyvų - HTH ar cinko pirštų.

Dna A funkcijų reziumė:

- suriša oriC DnaA taikinius;
- padeda išlydyti dvispiralę grandinę;
- padeda helikazei DnaB prisitvirtinti prie oriC;
- reguliuoja DnaA taikinius turinčius promotorius (repreuoja).

Su oriC susiriša ir daugiau baltymų. Eukarijų DNR yra gražiai supakuota į nukleosomas. Tą atlieka 4 chromatinio baltymai vadinami histonais. Prokarijotuose histonų nėra, bet randami panašiomis savybėmis pasižymintys baziniai baltymai, kurie apengia bakterijų DNR, ją kompaktiškai supakuoja. Šie baltymai vadinami į histonus panašiais baltymais (*histone like proteins*). Vienas iš tokių baltymų yra **HU baltymas**. Tai heterodimeras, susideda iš dviejų polipeptidų, koduojamų skirtingų, bet homologiškų genų HU1 ir HU2 (homologija apie 70%), 19 kDa, 90a.r.. *E. coli* ląstelėje yra apie 20000 tokių heterodimerų. Šie baltymai turtingi Lys, Ala, neturi Cys, Trp, tuo primena histonus. Panašūs baltymai randami visose bakterijose, jie reikalingi DNR supakavimui. HU susirišdamas sulenkia DNR, keičia jos formą. Šis baltymas reikalingas oriC iniciacijai, o taip pat dalyvauja ir kituose procesuose: Mu fago transpozicijoje, specifinėje flagelino promotoriaus inversijoje. Matomai šiuose procesuose yra svarbi specifinė DNR topologija, kurią suteikia HU.

IHF baltymas. Tai kitas visur esantis baltymas, randamas ir oriC. Pavadinimas IHF kilo nuo *integration host factor – paaiškėjus*, kad šis baltymas būtinas λ fago integracijai į *E. coli* chromosomą lizogeninio vystymosi metu. Šis baltymas svarbus bakteriofagų integracijai ir ekscizijai, σ -54 reguliuojamų promotorių transkripcijos aktyvacijai, fago Mu replikacijos sustiprinimui ir represijai, IS10 ir Tn10 transpozicijai, oriC minichromosomų replikacijai. OriC srityje randama IHF susirišimo vieta. Šis baltymas, kaip ir HU, keičia DNR formą, ją sulenkia.

FIS baltymas. Šis baltymas taip pat suriša DNR, reikalingas sekai-specifinėje rekombinacijoje. Tai 98 a.r., homodimeras, kuris suriša dvispiralę DNR.

Hu, IHF, FIS - visur esantys baltymai. Replikacijos iniciacijai svarbiausias yra HU. HU mutantai - labai "nesveiki", auga sunkiai ir lėtai.

Iniciacijos kompleksas

Kaip formuojasi iniciacijos kompleksas? Nuo ko viskas prasideda?

Pirma stadija, analogiškai ϕ X174 replikacijai, tik čia prisiriša ne PriA, o DnaA baltymas prisiriša oriC srityje prie esančių DnaA taikinių - devintukų. Šis kompleksas jau matomas elektroniniu mikroskopu kaip sferinis. Prie oriC prisijungia apie 20-40 DnaA monomerų. Pakeičiama DNR struktūra, DNR išlydoma, pirmiausia išsilydo 13-tukai - helikazės surišimo vietos. DNR tampa jautri S1 nukleazei, o tai patvirtina, kad ji dalinai viengrandė. DNR spiralizuota negatyviai. HU ir IHF stimuliuoja tokio komplekso susidarymą, stabilizuoja DNR sulenkimą. Šis kompleksas vadinamas *atviras (open) kompleksas*. Deletavus 13-tukus kompleksas tampa nestabiliu.

Sekanti stadija – "prepraimingo", arba prieš-pradžios komplekso susidarymas. Prie atviro komplekso prisijungia DnaB - helikazė, kartu su DnaC ir DnaT. DnaC reikalingas tik DnaB prisijungimui, nes šiaip jis inhibuoja DnaB. Šis kompleksas DnaA, DnaB ir HU yra gana stabilus. Be

DnaA baltymo, DnaB helikazė susiriša su DNR labai silpnai, o su ssb baltymu (*single strand binding protein*) padengta DNR helikazė visiškai nesiriša. DNR išlydimas yra dvikryptis nuo *oriC*, nes DnaB helikazė juda į abi puses sudarydama matricą pradmens sintezei. DnaG - praimazė - pradmens polimerazė- sąveikoje su DnaB helikaze pradeda abiejų grandinių pradmenų sintezę, vedančios (pirmaujančios) ir atsiliekančios. Replikaciją vykdo DNRPolIII. Replikacijos šakutės judėjimui reikalingas ssb baltymas, o taip pat girazė, fermentas panaikinant superspiralizaciją, kuri atsiranda DnaB helikazei išvyniojant DNR. DNRPolII ir ribonukleazė H pašalina RNR pradmenis, DNR-ligazė susiuvia trūkius. Replikacijos metu susiformuoja katenuotos molekulės - katenanai. Girazė juos išpainioja ir superspiralيزuoja. Chromosomų superspiralizacija yra negatyvi. Negatyvios superspiralizacijos privalumas yra tas, kad esant tokiai superspiralizacijai DNR grandinės lengvai persiskiria, o tai yra reikalinga transkripcijai. Pozityvi superspiralizacija sutvirtina dvispiralę.

Chromosomos replikacijos pabaiga. E. coli chromosomoje, priešingoje *oriC* pusėje yra *ter* elementas. Tokie elementai randami ir didelėse plasmidėse, kurioms būdinga dvikryptė replikacija. Ši seka sudaryta iš 25 bp. *Ter* sritį atpažįsta ir su ja susiriša geno *tus* produktas baltymas Tus. Šis baltymas yra kontra-helikazė - jis susiriša su DNR ir veikia prieš helikazę DnaB - sustabdo helikazės judėjimą ir DNR išvyniojimo procesą. Pirmaujanti grandinė sintetinama iki *ter* srities, o atsiliekančioji - pradeda sintetinti 50-100bp iki *ter* (Okazaki fr.). Replikacijos šakutė sustoja, replikacijos kompleksas matomai suyra. Tus veikia tik viena kryptimi. Replikacija priešinga kryptimi pašalina Tus baltymą ir baigia replikaciją. Sunku suprasti šio mechanizmo reikšmę ir būtinumą, nes mutantai *ter⁻* arba *tus⁻* nėra letalūs, mutantinių bakterijų augimas niekuo nesiskiria nuo *wt*.

Negatyvi E. coli replikacijos iniciacijos kontrolė.

Jau kalbėjome, kad pakartotinę replikaciją *E. coli* ląstelėse apriboja SeqA, SeqB, NAP baltymai, susirišdami su su membranomis pusiau-metilintą DNR ir tokiu būdu užblokuodami replikacijos *ori*. Tuo metu ląstelėje susiformavę du nukleoidai persiskiria, formuojasi sienelė.

Be *dam* metilinimo, svarbią reikšmę replikacijos iniciacijai turi ATP/ADP santykis. DnaA baltymas naudoja ATP, to pasėkoje ląstelėje ir komplekse su DnaA baltymu kaupiasi ADP. DnaA / ADP kompleksas neužtikrina replikacijos iniciacijos. Taigi, ląstelėje susidaręs ADP turi būti pakeičiamas ATP.

Trečias galimas reguliacijos mechanizmas yra DnaA baltymo kiekis ir galimas jo titravimas. DnaA koncentracija yra labai svarbi replikacijos iniciacijai. DnaA geno transkripcija reguliuojama DnaA baltymu, nes geno promotoriuje (40 kb nuo *oriC*) randamas DnaA taikyns. Po replikacijos, *oriC* kopijų skaičius padvigubėja, todėl naujai iniciacijai reikia dvigubai daugiau DnaA baltymo. DnaA baltymo koncentraciją mažina ir kiti genomo lokusai, surišantys šį baltymą. Neseniai rastas lokusas, pavadintas *datA* (*DnaA titration*), surišantis DnaA. Pademonstruota, kad šis lokusas suriša apie 8 kartus daugiau DnaA baltymo, negu *oriC* (20-40 molekulių). Šis lokusas yra *E. coli* chromosomos 94,6-99,8 min. padėtyje. *Data* lokusas nekoduoja baltymų, jo delecija nesukelia ryškių požymių, tačiau buvo pastebėta, kad šio lokuso mutantuose padidėja chromosomų skaičius. Atrodo, kad *datA* lokusas yra DnaA baltymo rezervuaras, kai *oriC* surišama SeqA baltymo su membranomis,

perteklių suriša *datA* lokusas. *datA*⁻ mutantuose yra daug laisvo DnaA baltymo, tokiu būdu užimamas DnaA taikiny R3 ir aktyvuojamas *oriC*.

Bendrosios plazmidžių ori savybės

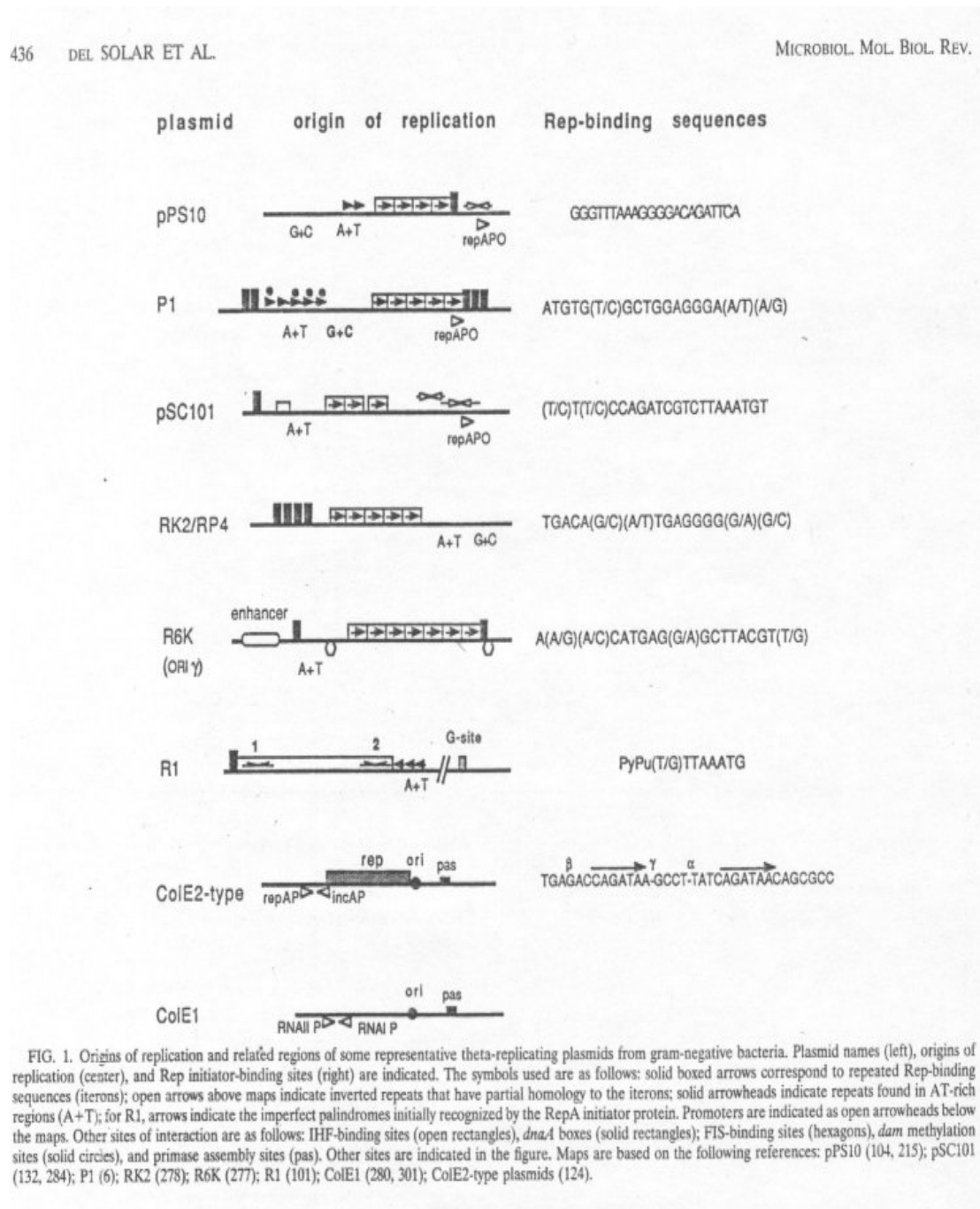
Išskyrus nedideles išimtis, plazmidžių replikacijai būtinas *iniciatorinis* baltymas **Rep** atpažįstantis ir susirišantis su **specifine** ori regione lokalizuota DNR seka. Kaip taisyklė, ori srityje randamas **AT turtingas** regionas su sekų pasikartojimais, kuriuose vyksta replikacijos baltymų susirinkimas ir DNR grandinių perskyrimas – ori atidarymas. DnaA baltymo surišimo taikiniai bei DamM taikiniai, būdingi *E. coli* *oriC*, kartais randami ir plazmidžių ori (P1, pSC101 ir kt.) srityse. Metilinimas nėra būtinas plazmidžių replikacijai, jo rolė daugiau po-replikacinė. Daugumoje replikonų nėra ir DamM taikinių. Įvairių, nuo DNRPolI nepriklausomų replikonų palyginimas parodė, kad Rep surišimo sritis yra potencialiai išlenkiama, tuo tarpu AT turtinga sritis yra tiesi. Šis įgimtas DNR išlenkimas padeda Rep baltymui dar labiau lenkti DNR. Plazmidžių ori srityje taip pat, kaip ir *E. coli* *oriC*, randami baltymų IHF, FIS surišimo taikiniai. Šie visur esantys baltymai suteikia ori sričiai reikalingą architektūrą.

Iteronus turintys ori

Daugeliu atveju plazmidžių ori srityse randami pasikartojantys DNR elementai, pavadinti **iteronais**. Iteronai, kaip taisyklė, yra Rep baltymų susirišimo taikiniai. Jie reikalingi tiek replikacijos iniciacijai, tiek kopijų skaičiaus kontrolei. Reikia pažymėti, kad iteronai randami ne tik θ tipo ori, bet ir kitų replikacijos tipų replikonuose (RR, grandinių išstūmimo). Kartais iteronai randami ir greta ori, šiuo atveju jie tarnauja ne replikacijos iniciacijai, o kopijų skaičiaus reguliacijai.

Iteronai ori srityje išsidėsto tendemiškai, kartais su įterptomis papildomomis sekomis tarp atskirų iteronų. Dažnai iteronus sudaro 11nt atitinkantys pasikartojimai (11, 22 nt, arba 22 nt iteronas – 11 nt tarpas – 22 nt iteronas) ir jie sutampa su DNR spiralės periodiškumu. Tai rodo, kad šiuos iteronus surišantys baltymai išsidėsto toje pačioje DNR molekulės pusėje. Statistinė analizė rodo, kad daugumoje iteronų randamas TCAGpuG šešetukas. Nebūtinai visi ori esantys iteronai yra svarbūs replikacijai. Pav. R6K plazmidei, vieno iš septynių iteronų pašalinimas neturi įtakos replikacijai, tačiau trijų iteronų pašalinimas pilnai pažeidžia plazmidės replikaciją.

Kai kurios plazmidės turi tik po vieną iteroną arba jų visai neturi. Iteronų nėra tokiose populiariose plazmidėse, kaip R1, ColE1.



Pav. 2.1. Paveikslėlyje pateikta įvairių plazmidžių ori srities organizacija.

Rep baltymai

Klasikinis plazmidžių klasifikacijos būdas yra rūšiavimas į grupes pagal tarpusavio suderinamumą būti vienoje ląstelėje kartu. Santykinai tik nedaugelio

plazmidžių replikacija išnagrinėta biochemiškai ir genetiškai iki detalių. Kaip taisyklė, tai pačiai plazmidžių suderinamumo grupei priskiriamos plazmidės turi labai panašias arba identišką replikonų ori seką ir plazmidžių kopijų skaičiaus kontrolės mechanizmus. Patogiausia replikonus lyginti ir klasifikuoti pagal ori nt sekų homologiją ir Rep baltymus koduojančių genų homologiją.

Plazmidžių replikacijos iniciacija paremta Rep – DNR atpažinimu, Rep-DNR, Rep-Rep bei Rep- sąveika su kitais baltymais, dalyvaujančiais replikacijos iniciacijoje bei reguliacijoje. Pagal Rep baltymų homologiją galima sukurti filogenetinį medį, kuris atspindi plazmidžių giminingumą. Rep baltymų analizė parodė, kad dažniausiai jie tarpusavyje arba su kitais baltymais sąveikauja Leu-Zip (LZ- *Leucine Zipper*) pagalba, su DNR sąveikauja HTH (*helix – turn – helix*) motyvais. Leu-Zip elementas dažniausiai randamas Rep baltymų N- dalyje. Leu-Zip elemente esančių Leu pakeitimas į Val susilpnina Rep baltymų tarpusavio sąveiką apie 13 kartų. Rep baltymai paprastai randami pusiausvyroje tarp dimerų ir monomerų. Dimerų perteklius, gautas super-ekspresuojant Rep baltymą, stabdo plazmidės replikacijos iniciaciją. Atrodo, kad su iteronais aktyviai sąveikauja monomerai, o dimerai trukdo. DnaA super-ekspresija nuima Rep super-ekspresijos sukeltą represiją. Gal būt Rep baltymai titruoja DnaA baltymą (?). Genetiniai tyrimai rodo, kad be LeuZip sąveikos galima ir kitokio tipo Rep baltymų tarpusavio sąveika.

Rep priklausoma replikacija

Plazmidės replikacijos iniciacijai dažniausiai yra reikalinga suformuoti kompleksą iš Rep, DnaA, DnaB, DnaG, DNAPolIII ir kitų baltymų. Daugelio θ plazmidžių replikacijos iniciacija panaši į oriC. Rep-DNR kompleksas, analogiškas DnaA-DNR kompleksui palengvina DnaB-DnaC atvedimą, grandinių perskyrimą. Žemiau pateikta keletas detaliai ištirtų pavyzdžių.

pSC101 plazmidė. Šios plazmidės RepA baltymas randamas pusiausvyroje tarp monomerinės ir dimerinės būsenų. Monomerai suriša iteronus ir inicijuoja replikaciją, tuo tarpu dimerai susiriša su netoliese esančiomis invertuotomis sekomis ir represuoja *rep* geno transkripciją. Tokiu būdu Rep baltymas autoreguliuoja savo geno transkripciją. Be plazmidės koduojamo RepA baltymo, pSC101 plazmidės replikacijai reikia ir šeimininko koduojamų DnaA ir IHF baltymų. IHF, sąveikaudamas su AT turtinga seka, lenkia DNR ir tuo padeda DnaA susirišti su DnaA taikinio seka, esančia už 200nt. RepA susirišimas stabilizuoja DnaA susirišimą. RepA-DNR-DnaA kompleksas svarbus ir šių plazmidžių paskirstymui besidalinančiose ląstelėse. Stabilus plazmidžių paveldėjimas apsprendžiamas

par lokuso, randamo greta ori. Šiame lokuse randamas topoizomerazės II veikimo taikinyis apsprendžia ori dalies superspiralizaciją, reikalingą replikacijos iniciacijai.

P1 plazmidė

Šiai plazmidei taip pat reikia RepA ir DnaA baltymų. Iniciacijai reikia RepA monomero sąveikos su penkias iteronais. Šią sąveiką stimuliuoja karštis ir karščio indukuojami šaperonai, kurie padeda formuotis monomerams iš RepA dimerų. Gal būt šaperonai reikalingi ir RepA monomerų aktyvacijai. RepA – DNR sąveikos pasėkoje, dėl DNR lenkimo DNR apsvynioja apie RepA kompleksą, kuriame RepA baltymas sąveikauja su dviem didžiaisiais grioviais, esančiais toje pačioje DNR pusėje. RepA baltymas vienas negali išlydyti DNR. P1 ori yra apsuptas dviem DnaA taikiniams iš vienos pusės ir trimis taikiniams iš kitos ori pusės. Delecinė analizė parodė, kad iš šių penkių DnaA taikinių, plazmidės replikacijos iniciacijai užtenka vieno, kurio seka yra artimiausia oriC DnaA taikinių sekoms, tačiau DNR efektyviausiai išlydoma, kada dalyvauja abu rinkiniai iš abiejų pusių. Replikacijos iniciacijos metu DnaA baltymas atveda DnaB, toliau atvedama DnaG praimazė, kuri inicijuoja replikaciją nuo vienos iš grandinių, tai apsprendžia vienkryptę replikaciją. Efektyviai P1 replikacijai reikalingas penkių GATC sekų, randamų ori srityje *dam* metilinimas.

RK2 plazmidė

Šaperonas CloX reikalingas Rep analogo TrfA sąveikai su penkiais 17nt iteronais. TrfA, kartu su HU išlydo AT turtingą DNR lokusą. DnaA susirišimas su 4 taikiniams padeda atvesti į replikacijos iniciacijos vietą DnaB, pastarasis kompleksas atveda DnaG praimazę. Šios plazmidės replikacijos iniciacijoje DnaA kartu su TrfA reikalingi DnaB atvedimui ir DNR išsvyniojimui. DnaA sąveika padeda atidaryti DNR, bet nėra absoliučiai reikalinga DNR atidarymui. TrfA pasižymi savybe aktyvuoti DnaB. DnaA taikiniai yra priklausomi nuo šeimnininko - vienuose šeimnininkuose aktyvesni vieni, kituose - kiti, nes dažniausiai jų sekos nėra identiškios tradicinėms oriC randamoms sekoms. RK2 plazmidė yra plataus šeimnininkų spektro.

R6K

Ši plazmidė turi kelis ori. Replikacijos iniciacijai reikalingas Rep tipo baltymas π (*pi*), kuris susiriša su (γ) ori. Šis baltymas atpažįsta skirtingas DNR sekas: iteronus, enhanserį, invertuotus pasikartojimus *pir* geno (koduoja π baltymą) promotoriuje ir AT turtingą ori sritį. π baltymas inicijuoja replikaciją nuo trijų skirtingų ori: α , β , ir γ . γ yra centrinis ori, lokalizuotas per 3 kb nuo α ir 1.2 kb nuo β ori. γ turi septynis 22 nt dydžio iteronus, apsuptus FIS sekų ir du DnaA taikinius. Už iteronų randama AT turtinga seka, kuri turi savyje vieną DnaA taikinių ir FIS susirišimo taikinį. B ori seka turi pusę iterono, α ori seka – vieną iteroną. Standartinėmis sąlygomis replikacija yra aktyvesnė nuo α ir β ori sekų, bet jų aktyvumą apsprendžia enhanseris, dalinai persidengiantis su γ ori. π dimeras susiriša su γ ori kiekvienu iš septynių 22nt iteronų ir lenkia vieną iš grandinių, sudarydamas apsvyniojusią struktūrą. Replikaciją nuo γ ori stimuliuoja DnaA baltymas bei IHF, kuris padeda sulankstyti DNR, o tai svarbu iniciacijai ir π ir DnaA sąveikai. Esant normaliam π kiekiui, IHF būtinas replikacijai nuo γ ori. β ori nereikia *DnaA*, γ ir α – reikia. *Pi* baltymas efektyviai rišasi su γ , bet silpnai su α ir β ori sritimis. Manoma, kad iniciacijos kompleksas, susiformavęs γ ori srityje, perkeliamas į α ir β ori.

R1 plazmidė

R1 plazmidė labiausia ištirta tarp IncFII šeimos plazmidžių. R1 plazmidės replikacijos iniciacija apsprendžia plazmidės koduojamas baltymas RepA. R1 plazmidės ori neturi iteronų. Minimalų R1 ori, vadinamą oriR, sudaro 188 nt. Į šį ori įeina DnaA baltymo surišimo taikynys (9 nt), 100 bp seka, reikalinga RepA susirišimui, prie kurios prijungti trys AT turtingi devintukai. RepA surišimo zona dalijama į dvi dalis, kurių viena pasižymi didesniu, kita mažesniu giminingumu RepA baltymui. Abiejose dalyse randami išsigimę palindromai. DnaA surišimo sritis nėra absoliučiai būtina R1 plazmidės replikacijos iniciacijai. Replikacijos tarpinių produktų elektroninės mikroskopijos analizė parodė, kad replikacijos iniciacija vyksta 400 nt žemiau RepA surišimo sekos ir yra atskirta nuo minimalaus ori regiono. Iniciaciją atlieka DnaG praimazė. Taigi, replikacijai reikalinga oriR seka ir RepA baltymas. Kaip minėta, oriR seka neturi iteronų. RepA dimeras nuosekliai atpažįsta šerdį iš dviejų netikslių palindrominių sekų. Šios sekos lokalizuotos toje pačioje DNR pusėje, lenkiamoje DNR dalyje. Susidarius pirminiam kompleksui, suriša dar papildomai RepA baltymo molekules. Susidaręs kompleksas išlydo DNR. *In vitro* replikacijai reikalingas ir DnaA baltymas. DnaA taikynys yra greta RepA susirišimo sekos, tačiau DnaA susiriša tik esant jau susirišusiam RepA. DnaA baltymas, nesant RepA, rišasi labai silpnai, arba visai nesiriša. Kaip minėjome, DnaA nėra absoliučiai reikalingas, tačiau *in vitro* būtinas, o *in vivo* yra kažkuo tai pakeičiamas. Taigi RepA yra pagrindinis faktorius aktyvuojant ori, išlydant DNR ir atvedant DnaB-DnaC kompleksą. Ši sąveika atveda DnaG praimazę, kuri, panašiai kaip G4 faguose (R1 ori labai panašus į bakteriofago G4 ori), inicijuoja pradmens sintezę taške, kuris yra nutolęs per 400 nt žemiau oriR. Manoma, kad DnaG taikynys aktyvuojamas tada, kada atsiliekanči grandinė, inicijuota AT turtingoje sekoje, pasiekia DnaG sritį. Sintezė nevyksta link ori, lieka plyšys, kuris vėliau sutvarkomas. R1 replikacijai reikalingas ir ssb baltymas. Parodyta, kad R1 replikacijos iniciacijai būtinas DnaK šaperonas. Spėjama, kad DnaK šaperonas perskiria RepA dimerus į monomerus, kada RepA dimerai susiriša su DNR.

ColE2, ColE3.

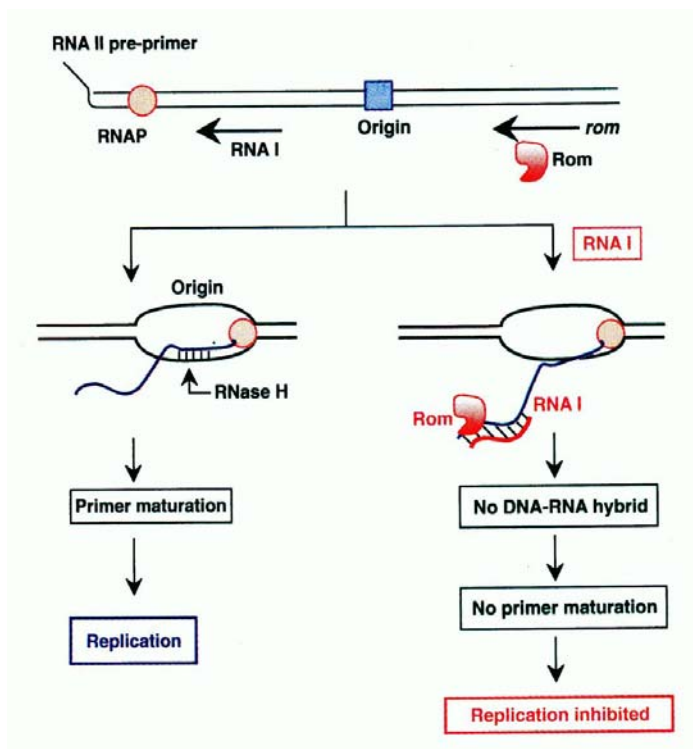
Tai mažos plazmidės, jų replikacijai reikia Rep tipo baltymo, kuris inicijuoja **pradmens sintezę**, tačiau, kaip ir ColE1, vedančios grandinės sintezei reikia DNR PolII. *ssi* (*single strand initiator*) randamas netoli ori. Panašiai replikuojausi ir gram⁺ bakterijų pAMβ1 šeimos plazmidės.

Plazmidžių, kurių replikacijos iniciacijai nereikalingi Rep baltymai, replikacija

Geriausios charakterizuotos tokio tipo plazmidės yra ColE1 ir pMB1. Šios plazmidės pasižymi didele homologija (apie 98%). ColE1 ir pMB1 plazmidžių replikacija ir kopijų skaičiaus reguliacija labai gerai ištirta, šių plazmidžių pagrindu sukurti vektoriai dominuoja nuo pat pirmųjų genų inžinerijos eksperimentų.

ColE1 (ir pMB1) yra mažų daugiakopijinių *E. coli* plazmidžių klasės, besireplikuojančių θ mechanizmu, prototipas. Šios plazmidės replikacijos iniciacijai reikalinga RNR polimerazė, RNazė H, DNR PolII ir DNR PolIII-HE (*HE* – *holo enzyme*). Skirtingai nuo R1 ir daugelio kitų plazmidžių, ColE1 replikacijos iniciacijai

nerieikia plazmidės koduojamų Rep tipo baltymų sintezės, tačiau reikia DNR PolI. ColE1 ori sudaro apie 1kb. Į šią sritį įeina (1) promotorius, apsprendžiantis RNRII sintezę, kuri tarnauja vedančios DNR grandinės sintezės pradmeniu. Šios RNR sintezė prasideda 555 nt aukščiau replikacijos iniciacijos taško; (2) seka užtikrinanti stabilaus DNR-RNRII komplekso susidarymą ir užtikrinanti susidarančio DNR-RNRII hibrido skėlimą Rnaze H. Šio skėlimo pasėkoje suformuojamas RNR 3'-OH galas tarnauja vedančiosios grandinės sintezės pradmeniu fermentui DNRPolI; (4) praimosomos susirinkimo seka *pas* arba *ssiA* formuojanti praimosomą ir atvedanti helikazę DnaB ir primazę DnaG, tuo būdu inicijuojama atsiliekančios grandinės sintezė Okazaki fragmentais. DnaA taikynys esantis greta *pas* sekos gali savo ruožtu inicijuoti sintezę DnaA, DnaB, DnaC komplekso pagalba, analogiškai *oriC*; (5) seka *terH*, terminuojanti atsiliekančios grandinės sintezę ir apsprendžianti vienkryptę plazmidės replikaciją.



Pav. 2.2. ColE1 plazmidės replikacijos iniciacijos schema.

ColE1 replikacija prasideda nekoduojančios RNRII transkripcija. Replikacijos pradžios taškas, lokalizuotas 555 nt žemiau RNRII sintezės iniciacijos pradžios, yra perėjimo iš RNRII į DNR sintezės taškas. Analogiška seka randama ir ColE1 labai artimoje plazmidėje pMB1. Tarpinių produktų elektroninės mikroskopijos analizė patvirtino, kad ColE1 replikacija yra vienkryptė.

Ori taške (555nt žemiau nuo RNR^{II} transkripcijos pražios) RNazė H skelia RNR ir suformuoja 3'-OH galą, tarnaujantį pradmeniu replikacijai. RNazės H suformuotas pradmuo yra tęsiamas apie 400 nt DNR^{polI} pagalba. Sintetinama vedančioji DNR grandinė ant išstumiamos grandinės padeda eksponuoti atsipalaidavusį iš dvigrandės būsenos *pas* elementą, ant kurio formuojasi praimosoma. Susiformavus pas srityje praimosomai, ji translokuojama 5'-3' kryptimi, išvyniodama spiralę ir pradėdama atsiliekančios grandinės sintezę, kuri vyksta Okazaki fragmentais. Šiame taške DNR PolI yra pakeičiama DNR PolIII-HE. Šiam persijungimui yra būtina DNR grandinių sąveikos destabilizacija, kurią atlieka helikazė DnaB, susirišusi su vedančiąja grandimi. Vedančios grandies sintezė vyksta atskirai, nepriklausomai nuo atsiliekančios. Atsiliekančios grandies sintezė tęsiasi link RNR^{II} promotoriaus, bet yra sustabdoma *terH* sekoje, 17 nt aukščiau vedančiosios grandinės iniciacijos taško. Terminacijos mechanizmas nėra aiškus. Ši terminacija apsprendžia, kad ColE1 replikacija yra vienkryptė.

ColE1 (pMB1) plazmidės kopijų skaičių reguliuoja du negatyvios reguliacijos elementai: RNRI, transkribuojama nuo priešingos grandinės, negu RNR^{II}. RNRI sudaro 108 nt, ji yra komplementari RNR^{II} 5' galui. RNR^{II} ir RNRI sąveikos pasėkoje susiformuoja RNR^{II} erdvinė struktūra, neleidžianti RNazei H skelti RNR RNR-DNR hibrido sudėtyje ori srityje. To pasėkoje, transkripcija tęsiasi toliau ir nutrūksta keliasdešimt nukleotidų už ori srities, o replikacija neinicijuojama, RNR^{II} degraduoja. Kitas elementas, negatyviai reguliuojantis kopijų skaičių yra *rop* (*rom*) genas, lokalizuotas žemiau ori. Šis genas koduoja nedidelį Rop (Rom) baltymą, kuris sustiprina RNR^{II} ir RNRI sąveiką. Tokiu būdu, pozityvaus (RNR^{II}) ir dviejų negatyvių faktorių (RNRI, Rop/Rom) sąveikos dėka susiformuoja pastovus ColE1 plazmidžių kopijų skaičius, kuris *E. coli* bakterijose augančiose laboratorinėse sąlygose yra maždaug 20 plazmidžių/genomui.

ColE1 tipo plazmidėms nereikalinga *de novo* baltymų sintezė. Buvo pastebėta, kad šių plazmidžių replikacijos neįtakoja baltymų sintezės inhibitoriai, stabdantys daugelį ląstelės procesų. Panaudojant baltymų sintezės inhibitorių chloramfenikolą, galima pažeisti plazmidės ColE1 replikacijos reguliaciją ir pasiekti labai didelį plazmidės kopijų skaičių, siekiantį net iki 3000 kopijų/genomui.

Plazmidžių replikacijos terminacija.

Replikacijos terminacijos taškas *ter* pirmiausia buvo identifikuotas R6K plazmidėje. Šiame taške terminuojama replikacija, inicijuota nuo ori- α arba ori- β replikacijos iniciacijos taškų. Šis terminatorius veikia laikinu barjeru replikacijai, prasidedančiai ir nuo kitų replikonų. *Ter* sekos buvo rastos ir kitose didelėse plazmidėse (IncFII, R1 ir R100; IncF1, RepFIC), o taip pat ir *E. coli* chromosomoje. Šią seką atpažįsta šeimininko baltymas Tus. *E. coli* Tus baltymas veikia monomerinėje būsenoje, o *B.subtilis* analogas – dimerinėje. Tus baltymas sąveikauja su DnaB. *E. coli* randami ir nedideli baltymai, kurie susiriša su *ter* ir apsaugo nuo Tus susirišimo ir terminacijos. Taigi, terminacija gali būti reguliuojama.

Replikacijos pabaiga

Replikacijai baigiantis susidaro katenatai, turintys plyšius abiejose dukterinėse DNR grandinėse. Katenanai išpainiojami I arba II tipo topoizomerazių pagalba. Topoizomerazė IV dalyvauja plazmidžių ir nukleoido segregacijoje. DNR girazė suformuoja plazmidžių superspiralizuotą formą. Dėl homologinės rekombinacijos, ypač tarp tarpinių plazmidžių replikacijos produktų, susidaro plazmidžių dimerai. Jų išskyrimą vykdo specializuota sistema, kuri yra replikacijos terminacijos proceso dalis. RecA mutantuose dimerai nesusidaro.

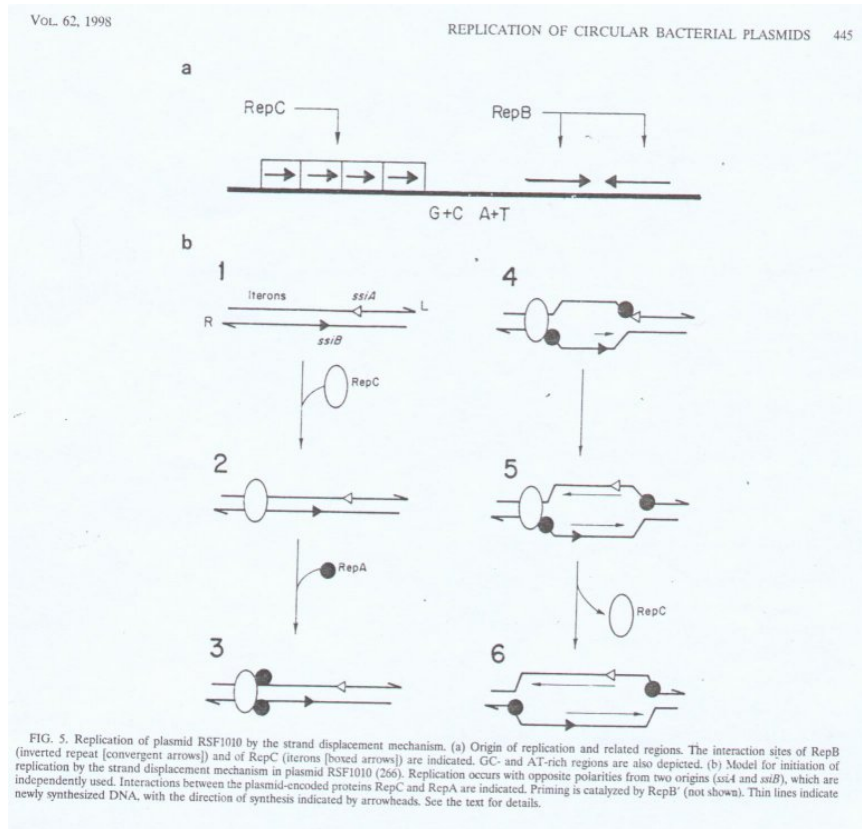
θ replikacija labiausiai paplitusi tarp gram-neigiamų bakterijų (*E. coli*), tačiau sutinkama ir tarp gram-teigiamų bakterijų.

2.2. Grandinių išstūmimo tipo replikacija (strand displacement)

Geriausiai ištirta grandinės išstūmimo tipo replikacija yra plazmidės RSF1010 šeimos plazmidėse (IncQ šeima). Šių plazmidžių replikacijai reikia trijų plazmidės koduojamų baltymų, RepA, RepB ir RepC. Šie baltymai suformuoja replikacijos iniciacijos kompleksą gana sudėtingoje plazmidės ori sekoje, to pasekoje, replikacija gali vykti į vieną ar į kitą pusę grandinės išstūmimo mechanizmu.

Ori.

Šio tipo plazmidžių ori pateiktas paveikslėlyje 5. Ori dydis buvo nustatytas klonuojant.



Pav. 2.3. Replikacijos iniciacija grandinės išstūmimo principu.

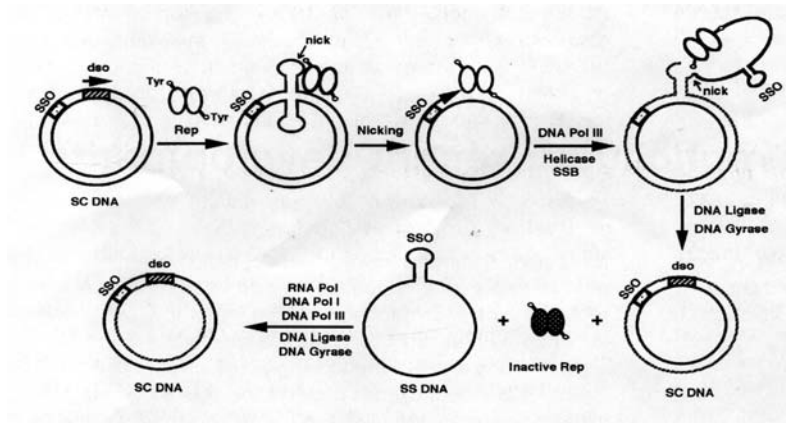
Ori sudaro minimali seka, užtikrinanti plazmidės replikaciją, pateikiant replikacijos baltymus A, B ir C *trans* padėtyje, t.y. kitos plazmidės pagalba. Minimalus ori susideda iš trijų identiškų 20 bp iteronų ir 174-nt regiono, turinčio 28-nt GC turtingą segmentą ir 31-nt AT turtingą segmentą. Kitos šios dalies sekos nėra esminės. Abiejose ori elemento grandinėse, priešingose pusėse randami du nedideli palindromai, vadinami *ssiA* ir *ssiB*, t.y. sekos, kuriose inicijuojama replikacija. Šios sekos sudaro segtuko struktūras, kurios yra esminės replikacijos iniciacijai. RepC baltymas yra tipiškas Rep baltymas, atpažįstantis ir susirišantis su interonais ori sekoje. RepC baltymas susiriša su iteronais dimerinėje būsenoje. Susirišus RepC, prie jo prisiriša RepA, baltymas, kuris yra heksameras, pasižymintis 5'-3' helikazės ir ssDNR ATPazės aktyvumais. RepA helikazė kartu su RepC baltymu užtikrina *ssi* sekos eksponavimą viengrandėje būsenoje, tai yra atidaro AT turtingą seką. RepB baltymas yra praimazė. RepB geno atviro skaitymo rėmelio 5'-gale yra du alternatyvūs iniciacijos kodonai ATG, todėl yra sintetiniai du baltymai, RepB ir RepB' (36 ir 38 kDa). RepB' yra identiškas RSF1010 koduojamam MobA baltymui, kuris dalyvauja konjugatyvinėje imobilizacijoje, o RepB yra praimazė, sintetina RNR pradmenį.

Grandinės išstūmimo mechanizmu besireplikuojančių plazmidžių replikacija yra labai autonomiška, nes **nepriklauso** nuo ląstelės-šeimininko DnaA, DnaB, DnaC ir DnaG baltymų, kuriuos pakeičia RepA (helikazė), RepB (praimazė) ir RepC baltymai. Šio tipo plazmidžių replikacijos iniciacijai yra reikalinga tik šeimininko RNR polimerazė, atliekanti plazmidės koduojamų genų *repA*, *repB* ir *repC* genų transkripciją, *ssb* baltymas ir DNR PolIII-HE. Replikacijos iniciacijoje dalyvauja superspiralizuotos plazmidės. Iniciacija prasideda RepC baltymui susirišant su iteronais. Po to RepA-helikazė susiriša su abiem grandinėmis AT turtingoje sekoje, greta RepC susirišimo vietos ir judėdama 5'-3' kryptimi išlydo DNR ir aktyvuoja *ssi* sekas. RepC sąveika padeda atidaryti DNR greta *ssi*. Segtukų struktūras atpažįsta RepB-praimazė ir inicijuoja replikaciją. Replikacija gali vykti nuo abiejų grandinių nepriklausomai, RepA-helikazė išstumia vieną grandinę ir sudaro D-kilpą.

Jeigu replikacija vyksta iš karto nuo abiejų *ssi*, gaunamos dvi D-kilpos. Replikacija vyksta nenutrūkstamai, jos pasėkoje gaunama viena ar kita grandinė, turinti vieną iš *ssi*, kuris tarnauja antros grandinės sintezės iniciacijai. Šio tipo plazmidės yra plataus šeimininkų spektro, nes joms nereikia daugelio šeimininko baltymų.

2.3. Riedančio rato tipo replikacija

Riedančio rato (RR) tipo replikacija populiari bakteriofagų replikacijoje. Visi žinomi viengrandžiai DNR bakteriofagai replikuojasi šiuo mechanizmu (ϕ X174, M13, F1, Fd). Plazmidės, besireplikuojančios šiuo mechanizmu buvo surastos 1985 m. Iki tol buvo galvota, kad plazmidės replikuojasi tik θ tipo mechanizmu. Geriausiai ištyrinėti RR mechanizmą naudojančios plazmidės yra pT181 bei pLS1 plazmidžių šeimos. RR plazmidžių replikacijos principas panašus į viengrandžių bakteriofagų replikaciją: plazmidės koduojamas baltymas įkerpa superspiralizuotoje dvigrandėje DNR molekulėje vieną grandinę, to pasėkoje atsiradęs laisvas 3'OH galas tarnauja pradmeniu DNR sintezei.



Pav. 2.4. Bendra RR mechanizmo plazmidžių replikacijos schema.

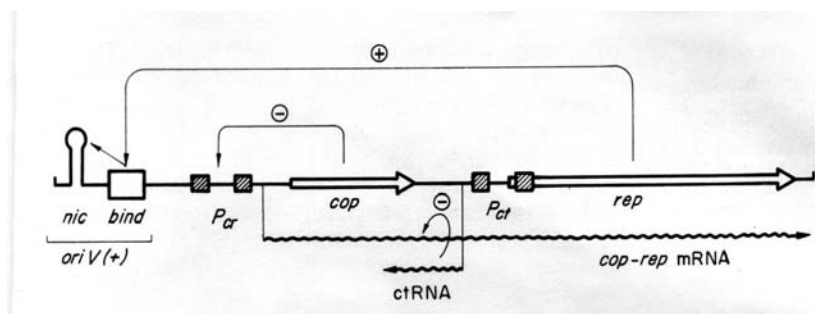
Vedančiosios grandinės sintezė.

Patekus plazmidei į permissyvinių šeimininką, prasideda plazmidės koduojamo Rep baltymo sintezė. Šis baltymas atpažįsta plazmidės sritį *dso* – dvispiralės DNR ori. Šioje srityje lokalizuoti du svarbūs elementai – Rep atpažinimo ir susirišimo sritis ir greta esanti seka, kurią Rep baltymas kerpa. Vienose plazmidėse (pT181) šie du domenai yra greta, kitose, pav. pLS1, atskirti apytikriai 85 nt. Tačiau abiem atvejais, Rep susirišimas keičia DNR konformaciją, išlydo grandines, suformuoja kryžiaus formos struktūras, kurios eksponuoja skėlimo seką. Skėlimo sekos pasižymi gana didele homologija tarp atskirų šeimų. Rep baltymas suriša apie 30 nt DNR seką. Skeldamas, Rep baltymas, panašiai, kaip ir ϕ X174 bakteriofago baltymas A, lieka kovalentiškai susirišęs su 5'-galu sur aktyviame centre esančia tirozino ar. liekana. Tai parodyta pT181 šeimos atveju, tačiau pLS1 šeimoje randama plazmidžių, kuriose ši sąveika laikina. Grandinės skėlimo metu atvedama ląstelės helikazė, būtina DNR grandinių perskyrimui. RR plazmidžių replikacijai naudojamos reparacijos procesuose dalyvaujančios helikazės, pav. UvrD *E. coli* (jos taip pat dalyvauja ir bakteriofagų M13, ϕ X174 replikacijoje). Skėlimo pasėkoje susiformavus 3'OH galui, DNRPolIII vykdo DNR sintezę ratu, kol pasiekiamas trūkio taškas ir susintetinama pilna nauja DNR grandinė, o senoji išstumiamą. Šiuo momentu replikacija yra blokuojama. ϕ X174 bakteriofago replikacijos atveju, tą atlieka fago baltymas C, tuo tarpu plazmidėse tokių baltymų nėra. Matomai tą daro pats Rep baltymas. Toliau seka eilė skėlimo - ligavimo reakcijų, kurių dėka DNR grandinės išskiriamos, išpainiojamos, suformuojama plazmidė su nauja grandine ir išstumiamą viengrandė žiedinė senoji vedančioji grandinė, kuri toliau verčiama į dvigrandę.

Rep baltymai pasižymi konservatyvumu, visuose DNR skėlimo aktuose aktyviame centre dalyvauja ar. Tyr. Tokiu būdu Rep baltymas gali kirpti-liguoti ir užtikrinti visų plazmidžių replikaciją, tačiau to nėra, arba vyksta silpnai, nes viską lemia DNR atpažinimo domenai. Atpažinimo ir DNR skėlimo domenai yra nepriklausomi, tai parodyta mutacinės analizės metodais. Atpažinimo domenai yra labai variabilūs, sudaryti iš maždaug 50 ar., lokalizuoti baltymo C-gale. Iniciacijos metu susidaro stabilus *dso* DNR, Rep ir helikazės kompleksas. Paskutiniai tyrimų duomenys rodo, kad dauguma Rep baltymų yra dimerai, tačiau kiekvienas iš monomerų dimeriniame komplekse turi skirtingą funkciją. Bakteriofago ϕ X174 A baltymas veikia monomerinėje būsenoje, taip pat ir plazmidžių pUB110, pC194. Kai kuriose šeimose (pLS1) Rep veikia heksamero pavidale. pT181 šeimos plazmidėse – dimerinėje būsenoje. pT181 atveju RepC baltymo vieno iš monomerų Tyr-191 dalyvauja DNR grandinės skėlime ir lieka susirišęs kovalentiškai su 5'- DNR galu, tuo tarpu kito subvieneto Tyr-191 skelia DNR apsukus ratą, nors čia jį gali pakeisti ir kitos a.r.. Todėl antro baltymo iš dviejų, esančių dimeriniame komplekse, rolė replikacijos iniciacijoje ir terminacijoje dar nėra visai aiški.

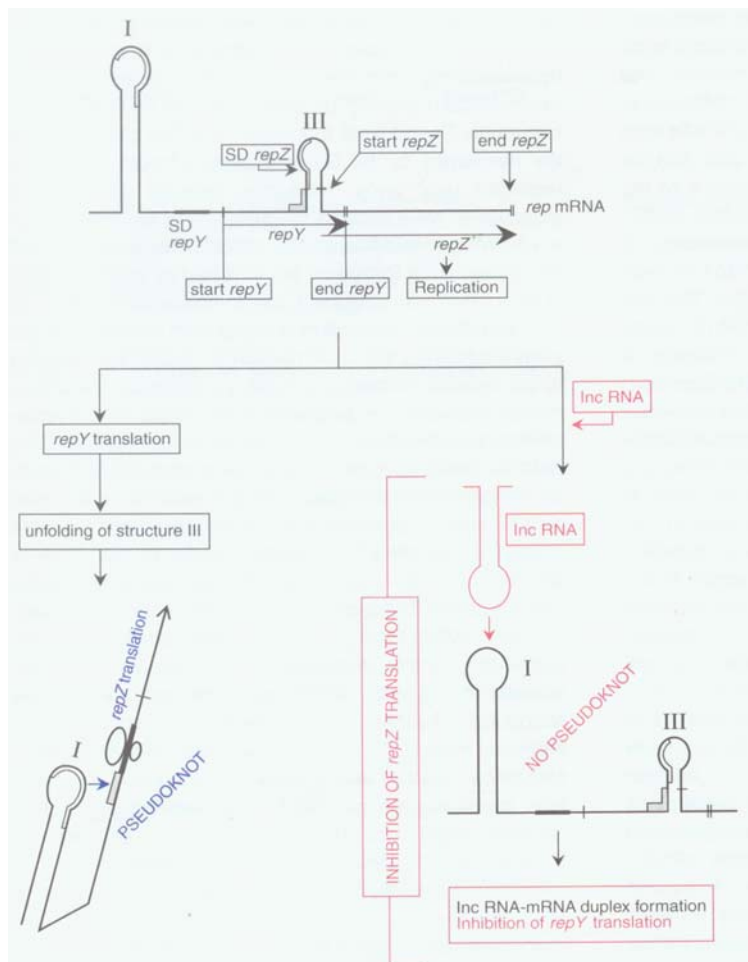
Viena svarbi plazmidžių Rep baltymų savybė, besiskirianti nuo analogiškų bakteriofagų baltymų, yra ta, kad fagų iniciatorius (pav. ϕ X174 – A baltymas) gali re-inicijuoti replikaciją daug kartų, tuo tarpu plazmidžių Rep baltymas inicijuoja replikaciją tik vieną kartą. Po vieno replikacijos rato Rep baltymas yra inaktyvuojamas, nes po kiekvieno replikacijos rato, naujai susintetinta grandinė sintetinama su maždaug 11 nt ilgesnė. Skeliant šis 11 nt fragmentas pasilieka susirišęs su baltymu, todėl toks baltymas pakartotinėje replikacijos iniciacijoje dalyvauti nebegali, nes jo aktyvus centras lieka užimtas. Tokiu būdu replikacijoje dalyvavęs Rep baltymas inaktyvuojamas.

Kopijų skaičiaus reguliacija



Pav. 2.5. Apibendrinta RR mechanizmu besireplikuojančių plazmidžių ori sritis

RR mechanizmu besireplikuojančiai plazmidei patekus į permissyvinią šeiminingą, ląstelės RNR polimerazė pradeda transkripciją nuo promotoriaus P_{cr} , kurio transkriptas koduoja du baltymus, Cop ir Rep . Rep baltymas yra replikacijos iniciatorius, susiriša su atpažinimo taikiniu ori srityje (*bind*) ir įveda viengrandį trūkį susiformuojančioje kryžiaus formos palindrominėje struktūroje (*nic*). Cop baltymas yra P_{cr} promotoriaus represorius. Susikaupus šio baltymo pakankamam kiekiui, P_{cr} transkripcija blokuojama. Tai yra vienas šio tipo plazmidžių kopijų skaičiaus reguliavimo būdas, paremtas Cop baltymo sintezės autoreguliacija. Praktiškai visose plazmidėse yra bent keletas negatyvios reguliacijos mechanizmų, reguliuojančių plazmidės replikacijos iniciaciją, tuo pačiu ir plazmidės kopijų skaičių ląstelėje. RR tipo plazmidėse, antras negatyvus reguliatorius yra priešpriešė (*antisense*) ctRNR (*counter transcription*). Ši RNR transkribuojama nuo P_{ct} promotoriaus ir represuoja Rep baltymo dalį koduojančios mRNR transliaciją, blokuodama SD seką. Šios sąveikos schema pateikta schemeje.



Pav. 2.6. Ori srities reguliacija

P_{cr} ir P_{ct} mRNR sąveikos dėka formuojasi taip vadinami pseudomazgai. Daugumoje plazmidžių ori dalyje prieš Rep koduojančią dalį (aukščiau pateiktame paveikslėlyje RepZ) randamas nedidelis ASR (atviras skaitymo rėmelis, paveikslėlyje RepY). Šių abiejų, RepY ir RepZ, ASR transliacija yra tarpusavyje susijusi. Mažoji ASR RepY SD seka yra eksponuojama ir yra ribosomoms prieinama, tuo tarpu RepZ SD seka yra paslėpta III kilpos tretinėje struktūroje. Jeigu nevyksta sąveika su ctRNR (paveikslėlyje incRNR), vykstant RepY transliacijai, RepY koduojančios dalies gale sustoję ribosomos suardo III kilpą ir tuo įgalina susijungti kilpos I ir kilpos III komplementarioms dalims, suformuojant vadinamą pseudomazgą. Dėka šios sąveikos iš kilpos III struktūros išlaisvinama RepZ SD seka, ko pasėkoje prasideda RepZ transliacija. Jeigu yra ctRNR (incRNR), pastaroji sąveikauja su sau komplementaria I kilpa ir neleidžia suformuoti pseudomazgo, to pasėkoje RepZ SD seka lieka neprieinama, baltymas nesintetinamas. Tokiu būdu pozityvaus (Rep) ir dviejų negatyvių faktorių (Cop ir ctRNR) sąveikoje nusistovi pastovus, tai plazmidei būdingas kopijų skaičius.

Aukščiau buvo minėta, kad pirmą kartą reguliacija priešprieše (*antisense*) RNR buvo pastebėta plazmidėse. Šiuo metu jau aišku, kad toks genų ekspresijos reguliavimo būdas yra paplitęs visose karalystėse, ypač eukarijotuose. Dviejų komplementarių RNR sąveika yra pakankamai sudėtinga. Abi RNR formuoja sudėtingas erdvines struktūras, todėl dažniausiai sąveikoje dalyvauja tik nedidelės molekulių dalys. Šiai sąveikai duotas taiklus angliškas terminas - *kissing*.

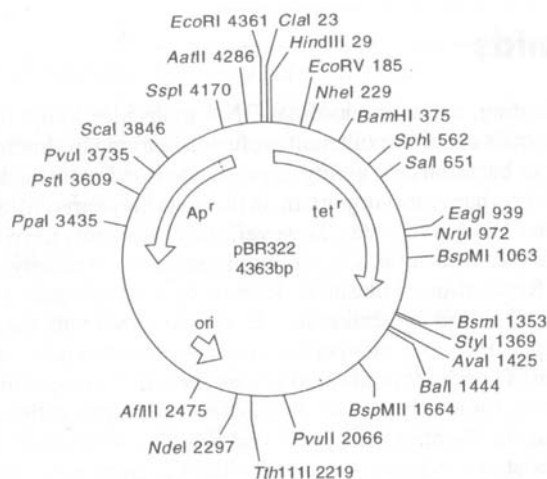
Žinduoliuose, dvigrandžių RNR, didesnių nei 30 nt susiformavimas sukelia interferoninį atsaką, o mažesnės už 30 nt, 21-23 nt dvigrandės RNR (siRNR) sukelia RNR interferencijos reiškinius.

3. Prokarijų vektoriai

3.1. Prokarijų vektoriai, sukurti bakterijų plazmidžių pagrindu

Restrikcijos endonukleazių (REazių) dėka, atsiradus galimybei iškirpti specifinį DNR fragmentą, iškilo problema, tą fragmentą išskirti iš DNR fragmentų mišinio ir jį padauginti, kad galima būtų toliau juo manipuliuoti, įvesti į ląstelę, nustatyti nukleotidų seką ir kt. Šiems tikslams imta kurti specialias DNR konstrukcijas, pavadintas vektoriais. Šioms konstrukcijoms konstruoti buvo panaudotos gamtoje egzistuojančios autonomiškai besireplikuojančios sistemos – plazmidės ir bakteriofagai. Tiek plazmidės, tiek bakteriofagai apie 1973 m. buvo gerai ištyrinėti tuometiniais genetinėmis metodais. Plazmidžių tyrimus skatino tai, kad dauguma plazmidžių pasirodė esą rezistentiško antibiotikams genų nešėjai ir platintojai. Buvo identifikuota daug R-faktorių (*R-resistance*), apsprendžiančių atsparumą antibiotikams, gerai buvo išnagrinėta F – faktoriaus (*F-fertility*) genetika, taip pat kai kurios mažos plazmidės, ColE1, pMB1.

Mažos plazmidės pirmiausia ir buvo panaudotos vektorių konstravimui. Panaudojus ColE1 plazmidės replikoną buvo sukurtas pirmas gana tobulas vektorius pBR322 (4361 bp). Šis vektorius turi du genus *bla* ir *tc*, apsprendžiančius atsparumą ampicilinui (koduoja β -laktamazę) ir tetraciklinui (koduoja membraninį baltymą), turi unikalius restriktazių skėlimo taikinius šiuose genuose. Plazmidės kopijų skaičius ląstelėje sudaro apie 20 plazmidžių /genomui. Klonavimui ir rekombinantinių klonų selekcijai, plazmidę galima skelti REaze, kerpančia vieną iš genų. Svetimo DNR fragmento įjungimas į geno struktūrą, tą geną inaktyvuoja, todėl ši sistema yra gana patogi rekombinantinių klonų atrankai. Kurį laiką tai buvo dominuojantis vektorius genų inžinerijos eksperimentuose.

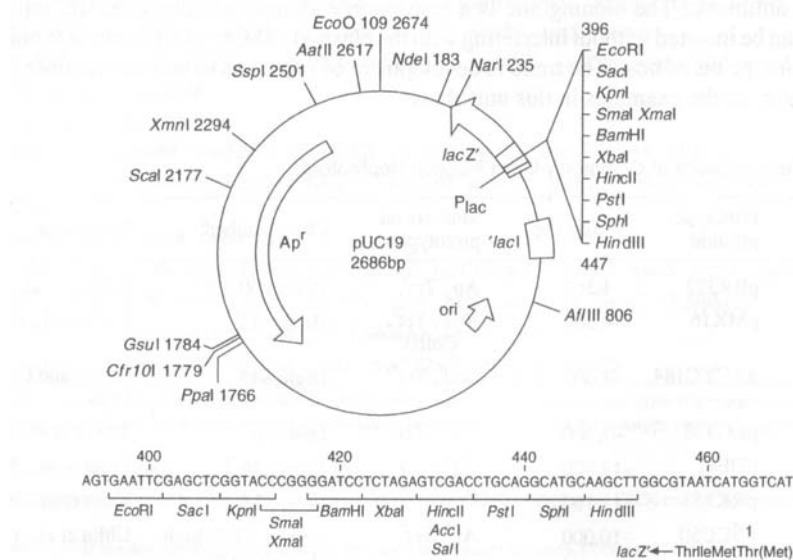


Pav. 3.1. Vektorius pBR322

pUC vektorių šeima

Šiuo metu labiausiai paplitę vektoriai, pradėti sukonstruoti Messing'o laboratorijoje (1985 m) ir iš jų išplitę įvairūs dariniai. Šie vektoriai transformantų selekcijai turi vieną geną, dažniausiai *bla*, apsprendžiantį atsparumą antibiotikui ampicilinui, taip pat *kan*- atsparumas kanamicinui ir neomicinui (kanamicin – fosfotransferazė), *clm* – chloramfenikolui (chloramfenikolo acetilo transferazė). Tokie genai yra būtini **transformantų** selekcijai, t.y. klonų, į kuriuos transformacijos metu pateko plazmidė, atrinkimui. Šių vektorių išskirtinė dalis yra skirta **rekombinantinių klonų** selekcijai tarp transformantų, paimta iš kiek anksčiau sukonstruotų viengrandžių bakteriofagų M13 vektorių ir adaptuota plazmidėms. Ši dalis susideda iš nedidelio *lac* operono fragmento, koduojančio *lac UV5* promotoriaus ir *lacZ* geno 5' galo, koduojančio LacZ baltymo pirmas 146 amino rūgštis. *LacUV5* promotorius yra *lac* operono promotoriaus modifikacija, gauta UV mutagenozės pagalba. Šiame promotoriuje **–34 padėtyje A yra pakeistas į T**. Dėka šios mutacijos promotorius nebereaguoja į katabolinę represiją ir jo atpažinimui tapo nebereikalingas cAMP-2CAP kompleksas. *LacZ* koduojamo baltymo β-galaktozidazės 146 a.r. fragmentas vadinamas α-peptidu. Iš ankstesnių molekulinės genetikos eksperimentų buvo žinoma, kad *E. coli* ląstelėje sintetinant mutantinį β-galaktozidazės baltymą, turintį iškratą 5' geno gale (delecija M15, apimanti 11-41 ar baltymo N-dalyje), β-galaktozidazė yra neaktyvi, todėl indukavus *lac* promotorių sintetiniu induktoriumi IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas), β-galaktozidazė neskaldė specifinio substrato - indikatorinio dažo X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozidas). β-galaktozidazei skaldant šį dažą, bakterijų kolonijos nusidažo ryškiai mėlynai žalia spalva, o neskaldant – kolonijų spalva nesikeičia, lieka kaip ir *wt*

E. coli ląstelių kolonijų spalva. Anksčiau, tyrinėjant *lac* operoną, buvo pastebėta, kad vienoje ląstelėje sintetinant β -galaktozidazę turinčią deleciją M15 (Δ 11-41 ar, ω -peptidas) ir α -peptidą (1-146 ar), pastarasis komplementuoja M15 deleciją ir ląstelėje susiformuoja aktyvus fermentas, skaldantis bespalvį X-gal indikatorinį dažą į spalvotą junginį, ko pasekoje *E. coli* kolonijos nusidažo ryškia spalva. Šis reiškinys buvo pavadintas **α -komplementacija**, nes α -peptidas komplementuoja deleciją ir atstato fermento aktyvumą. Šis komplementacijos principas buvo sėkmingai pritaikytas **rekombinantinių klonų** selekcijai, pirmiausia viengrandžio siūlinio bakteriofago M13 vektoriuose, po to pUC šeimos plazmidžių vektoriuose, vėliau paplito daugumoje kitų įvairiausių šiuolaikinių vektorių. Šioje konstrukcijoje, po ketvirto *lacZ* geno koduojančios dalies tripleto į α -peptido koduojančią DNR seką buvo įterpti sintetiniai įvairios struktūros dariniai, vadinami poli-linkeriai, t.y. chemiškai susintetinti oligonukleotidai, turintys daug skirtingų REazių skėlimo taikinių, tarnaujančių klonavimui. Ši seka yra α -peptido pradžioje ir netrikdo α -komplementacijos. Tačiau, jeigu į šią seką yra įterpiamas papildomas DNR fragmentas, jis arba pažeidžia α -peptido skaitymo rėmelį arba dėl papildomos baltymo sekos įvedimo inaktyvuoja α -peptidą. Toks α -peptidas nekomplementuoja M15 delecijos, todėl kolonijų palva X-gal terpėje nesikeičia.



Pav. 3.2. Vektorius pUC19.

Šiose vektorių sistemose ω -peptidas paprastai pateikiamas F' plazmidės arba lambloidinių integruotų bakteriofagų pagalba, o *E. coli* chromosomoje esantis *lac* operonas yra pašalintas. Tokiu būdu, jeigu į *E. coli* ląstelę, kuri F' plazmidės sudėtyje turi ω -peptidą, vektoriaus pagalba įvesime α -peptidą koduojančią seką, indukavus IPTG pagalba *lac* operono transkripcija, *E. coli* kolonijos, augančios ant agarizuotos terpės su X-gal indikatoriumi nusidažys ryškia žaliai mėlyna spalva. Jeigu į bakteriją pateks plazmidė, kurioje į α -peptidą koduojančią struktūrą buvo įterptas papildomas DNR fragmentas, α -peptidas bus neaktyvus, kolonijos spalvos nekeis. Ši sistema yra labai patogi **rekombinantinius klonų** atrankai tarp **transformantų**. Rekombinantiniai klonai nekeičia kolonijų spalvos, tuo tarpu klonai turintys vektorių, ryškiai nusidažo.

Daugumoje populiariausių daugiakopijinių vektorių replikacijai užtikrinti naudojamas plazmidžių ColE1 (arba pMB1) mutuotas ori, užtikrinantis apie 200 kopijų / genomui skaičių. Toks aukštas kopijų skaičius buvo pasiektas pašalinus *rop/rom* geną bei gavus taškinę mutaciją **G→A pozicijoje 3 nukleotidai prieš RNRI** transkripcijos pradžia. Dėka šios mutacijos pasikeičia RNRI transkripcijos starto taškas, ko pasekoje sintetinama 105 nt RNRI, vietoje 108 nt. Matomai, tai silpnina jos sąveiką su RNRII, susilpnėja represija, kopijų skaičius pakyla. ColE1/pMB1 replikonų skaičius yra apie 20 plazmidžių/genomui. Pašalinus *rop/rom* geną, kopijų skaičius padvigubėja. Mutacija G→A pozicijoje 3 nukleotidai prieš RNRI transkripcijos startą kopijų skaičių pakelia iki 200 ir daugiau. Reikia pažymėti, kad ši mutacija priklauso nuo temperatūros ir realizuojasi tik *rop/rom* mutacijos fone.

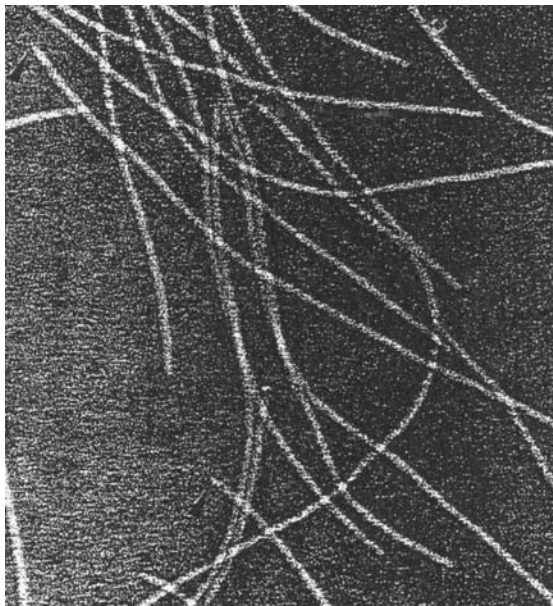
Daugiakopijiniai vektoriai labai palengvina ir atpigina klonavimo darbus, nes įgalina iš kelių mililitrų bakterijų kultūros išskirti pakankamą kiekį plazmidės.

Patogumo dėlei populiariausiuose vektoriuose greta klonavimo taikinių sankaupos įvedami T3, T7 ar SP6 bakteriofagų promotoriai. Šie promotoriai yra nedideli ir labai specifiški, t.y. juos atpažįsta tik konkretaus bakteriofago RNR polimerazė. Promotorių būvimas įgalina esant poreikiai *in vitro* gauti klonuoto DNR fragmento RNR kopijas.

Filamentinių (siūlinių) bakteriofagų vektoriai.

Sanger'ui išstobulinus dideoksi- nukleotidų terminacijos pagrindu sukurtą DNR sekvenavimo metodą, iškilo poreikis lengvai gauti DNR viengrandėje būsenoje. Šiems tikslams buvo sukurti vektoriai filamentinio bakteriofago M13 pagrindu. M13 bakteriofagą sudaro 6400 nt viengrandė DNR, tačiau jo replikatyvinė forma yra

dvigrandė, superspiralizuota DNR. Su M13 bakteriofago replikatyvine forma galima elgtis kaip su plazmide, t.y. karpyti REazėmis, liguoti. Ligatu transformavus bakterijas, į ląstelę patekusi DNR yra transkribuojama, replikuojama, sintetinami bakteriofago baltymai suformuoja bakteriofagą, kuris sekretuojamas į aplinką, nepažeidžiant bakterijos. Jeigu į replikatyvinę formą įvesime papildomą DNR seką, ši seka netrukdo rekombinantinio viengrandžio bakteriofago susiformavimui ir sekrecijai į aplinką. Tokiu būdu, bakterijos infekuotos viengrandžiais bakteriofagais efektyviai sekretuoja į aplinką viengrandžius bakteriofagus, kurių titras gali siekti net 10^{13} /ml., maždaug 10^3 dalelių iš vienos bakterijos per generaciją. Pašalinus bakterijas, iš supernatanto išskiriama bakteriofago viendrandė DNR, kuri gali būti naudojama sekvenavimui, mutagenezei ir kitiems tikslams.

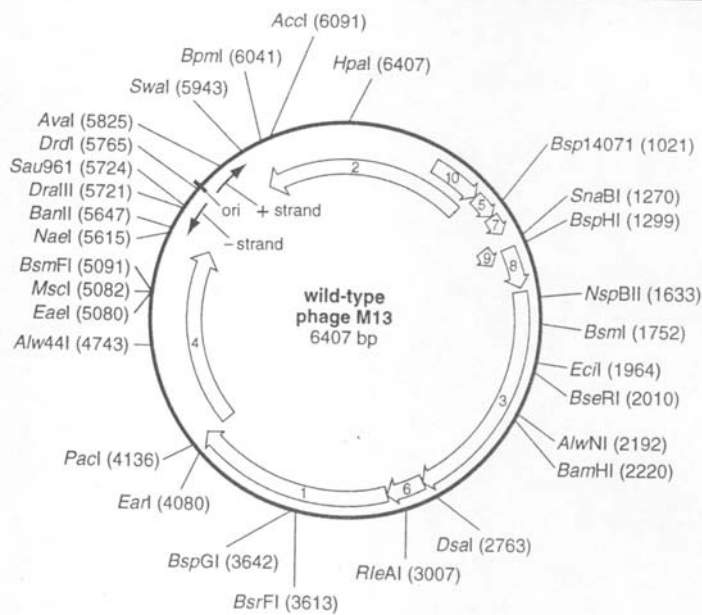


Pav. 3.3. M13 bakteriofago EM nuotrauka.

Viengrandžiai siūliniai DNR bakteriofagai M13, Fd, F1, bendru pavadinimu Ff bakteriofagai (*small filamentous*) pasižymi panašia genomo organizacija ir biologinėmis savybėmis. Visi šie fagai besidaugindami nenužudo bakterijos, bet susiformavusias siūlų pavidalo bakteriofagines daleles sekretuoja į aplinką, nepažeidžiant bakterijos. M13, Fd, F1 bakteriofagai turi 10 genų, koduojančių reguliatorinius ir struktūrinius baltymus:

Genas	Funkcija	Baltymo kopijų
-------	----------	----------------

		kiekis virione
gp1	Morfogenezė	-
gp2	RF replikacija; trūkio įvedimas RF (endonukleazė)	-
gp 3	Adsorbcijos baltymas, reikalingas infekcijai	5
gp 4	Morfogenezė	-
gp 5	SSB – viengrandę DNR surišantis baltymas	-
gp 6	Minorinis apvalkalo baltymas, dalyvauja adsorbciijoje	5
gp 7	Minorinis apvalkalo baltymas, baigia morfogenezę	5
gp 8	Pagrindinis apvalkalo baltymas	2710
gp 9	Minorinis apvalkalo baltymas, baigia morfogenezę	5
gp X	Perjungia sintezę RF→RF į RF→SS	0
IG	Tarpgeninė sritis	

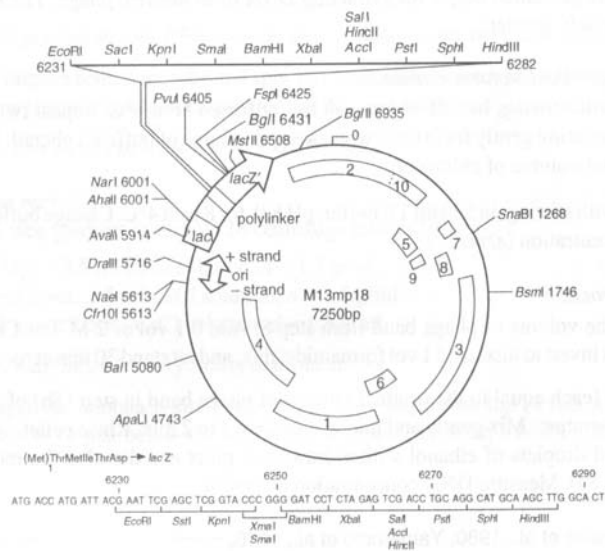


Pav. 3.4. M13 bakteriofagas wt

Ff bakteriofagai dauginasi tik *E. coli* F⁺ kamienuose, nes adsorbcijai prie infekuojamos bakterijos jie naudoja F faktoriaus formuojamus pilius. Viengrandei M13 DNR patekus į ląstelę, *E. coli* RNR polimerazė atpažįsta tarpgeninės dalies (IG) formuojamą sudėtingą struktūrą, sintetina nedidelį RNR pradmenį, kurį pratęsia DNRPolIII. Tokiu būdu susintetinama antra grandinė – suformuojama replikatyvinė forma RF, kuri super-spiralizuojama. Susikaupus dvigrandėms RF, sintezė perjungiamą į viengrandės žiedinės genomines DNR (ss) sintezę, kuri vyksta riedančio rato principu. Gp2 (geno 2 produktas) – endonukleazė skelia (+) grandinę

ori srityje. Susiformavęs 3'OH tarnauja viengrandės DNR sintezės pradmeniu, kurią atlieka DNRPolIII. Apvažiavus pilną ratą, gp2 baltymas nuskelia genomo dydžio DNR, kuri liguojama į žiedą ir pakuojama į siūlinę bakteriofago struktūrą.

Kaip atrinkti bakterijas, turinčias rekombinantinius M13 bakteriofagus? Bakterijos, infekuotos M13 bakteriofagu auga pastebimai lėčiau, negu bakterijos, neturinčios ląstelės viduje besidauginančio bakteriofago. Po transformacijos išsėjus bakterijas ant agarų paviršiaus (0.7% agarė), bakterijos, į kurias nepateko bakteriofago DNR, auga greičiau ir suformuoja ištisą bakterijų sluoksnį – gazoną agarų paviršiuje. Bakterijos, turinčios bakteriofagą auga lėčiau, todėl ištisame bakterijų sluoksnyje galima pastebėti pusiau skaidrias dėmeles, kurias suformuoja lėčiau augančios bakterijos. Iš tokių dėmelių bakterijos steriliu pagaliuku perkeliamos į atskirus mėgintuvėlius, auginamos, iš į terpę sekretuojamų bakteriofagų išskiriama viengrandė DNR. Siekiant palengvinti rekombinantinius bakteriofagus turinčių bakterijų dėmelių atranką, į M13 bakteriofago tarpgeninę sritį buvo įvesta aukščiau aprašyta lacZ sistema. Bakterijos, turinčios M13 fago vektorių su lacZ sistema be klonuotų papildomų sekų, formuoja žaliai mėlynas dėmeles agarizuotoje terpėje su induktoriumi IPTG ir indikatoriumi X-gal, tuo tarpu bakterijos, turinčios rekombinantinius bakteriofagus kolonijų spalvos nekeičia, nes juose buvo inaktyvuotas α -peptidas.

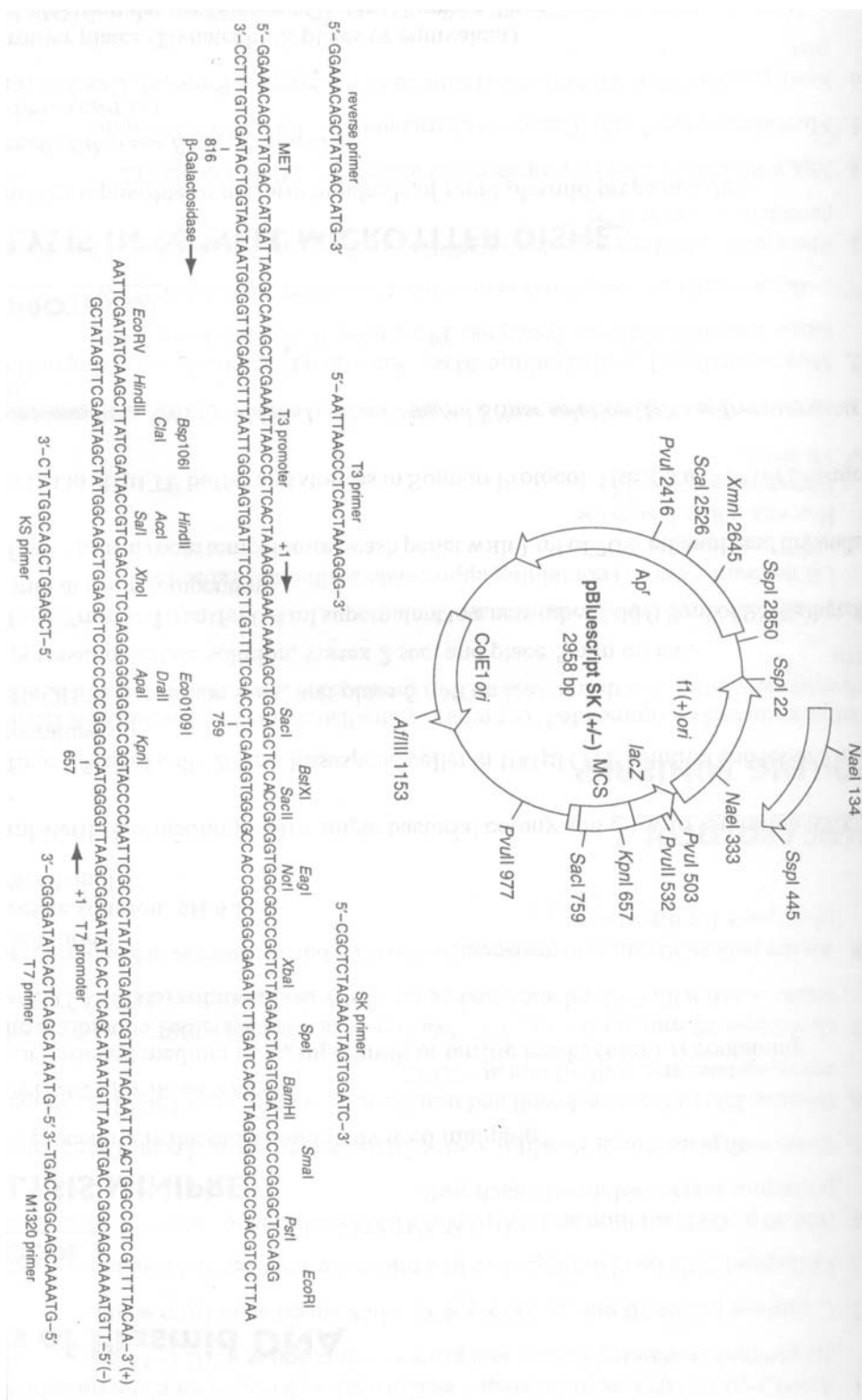


Pav. 3.5. M13 bakteriofago vektorių

Hibridiniai vektoriai

Siekiant supaprastinti ir palengvinti viengrandės DNR gavimo procedūras, buvo sukurti vektoriai, kartu su visais pUC plazmidėms būdingais atributais, turintys

viengrandžių bakteriofagų tarpgeninę (IG) sritį, kuri tarnauja bakteriofago replikacijos iniciacijai ir pakavimui. Bakterijas, turinčias tokią plazmidę, infekavus atitinkamu pagalbiniu bakteriofagu, šio bakteriofago koduojami baltymai atpažins plazmidės sudėtyje esančią tarpgeninę sritį, inicijuos viengrandės DNR sintezę, o ši bus pakuojama į bakteriofago daleles ir sekretuojama į aplinką. Priklausomai nuo tarpgeninės srities orientacijos, gali būti pakuojama (+) arba (-) grandinė. Tokio tipo vektoriuose pažymima, kuri grandinė bus pakuojama ir sekretuojama, pav. pBluescriptII KS(+) . Tokie vektoriai, savyje kombinuojantys plazmidžių ir bakteriofagų savybes dar vadinami fagemidėmis.



Pav. 3.6. Plazmidė – fagimidė pBluescript SK

3.2. Bakterijų dirbtinės chromosomos - BAC.

Gamtoje egzistuoja daug labai didelių plazmidžių, pav. *E. coli* F plazmidė. Ši plazmidė buvo labai plačiai naudojama genetikoje, įvairiuose su konjugacija susijusiuose eksperimentuose. Jos yra stabilios, mažakopijinės, iš ląstelės į ląstelę perduodamos konjugacijos mechanizmu. Pabandžius panaudoti dideles plazmides didelių DNR fragmentų klonavimui, paaiškėjo, kad pagrindinė didelių plazmidžių problema yra jų įvedimas į *E. coli* ląstelę. Didelės plazmidės labai blogai transformuoja bakterijas, naudojant tradicinius *E. coli* transformacijos metodus (Ca^{++} ir 0°C temperatūra). Pritaikius *E. coli* transformacijai elektroporacijos metodą, ši problema buvo išspręsta ir F plazmidės reguliatorinė sritis buvo panaudota vadinamųjų BAC (*bacterial artificial chromosomes*) konstravimui.

F plazmidės reguliatorinė dalis

F plazmidę sudaro apie 100 kb žiedinė DNR, turinti apie 60 genų. BAC konstravimui naudojami plazmidės F elementai, lokalizuoti plazmidės lokuse tarp 47 kb ir 53 kb. Šioje srityje randami genai ir jų koduojamų baltymų atpažįstami elementai, kontroliuojantys replikaciją, kopijų skaičių bei stabilų plazmidės paskirstymą tarp besidalijančių ląstelių.

53 kb- *oriT parC parB parA incC repE incB oriS resD ccdB ccdA fcr oriV repC* -47 kb

Paryškinti elementai paprastai įtraukiami į BAC sudėtį.

OriT - vieta, kurioje įvedamas trūkis konjugacijos proceso pradžioje;

parC, *parB*, *parA* – sritis, atsakinga už plazmidės tolygų paskirstymą tarp besidalijančių ląstelių. *parA* ir *parB* genų koduojami baltymai ParA ir ParB sąveikauja su *parC* lokusu, susiformavęs kompleksas, matomai, sąveikauja su membranų struktūromis ir užtikrina plazmidės stabilų paskirstymą.

IncC ir *incB* sudarytos iš eilės 19 bp pasikartojimų, kuriuos atpažįsta ir suriša baltymas RepE. RepE promotoriuje taip pat randami du invertuoti 19-tukai. Tokiu būdu RepE autoreguoluoja savo geno transkripciją, bei inicijuoja replikaciją nuo vienkryptės replikacijos *oriS*, reguliuoja kopijų skaičių.

OriS – vienkryptės replikacijos pradžios vieta.

ResD baltymas kerpa plazmidę per *fcr* vietą, išpainioja bei perskiria plazmides.

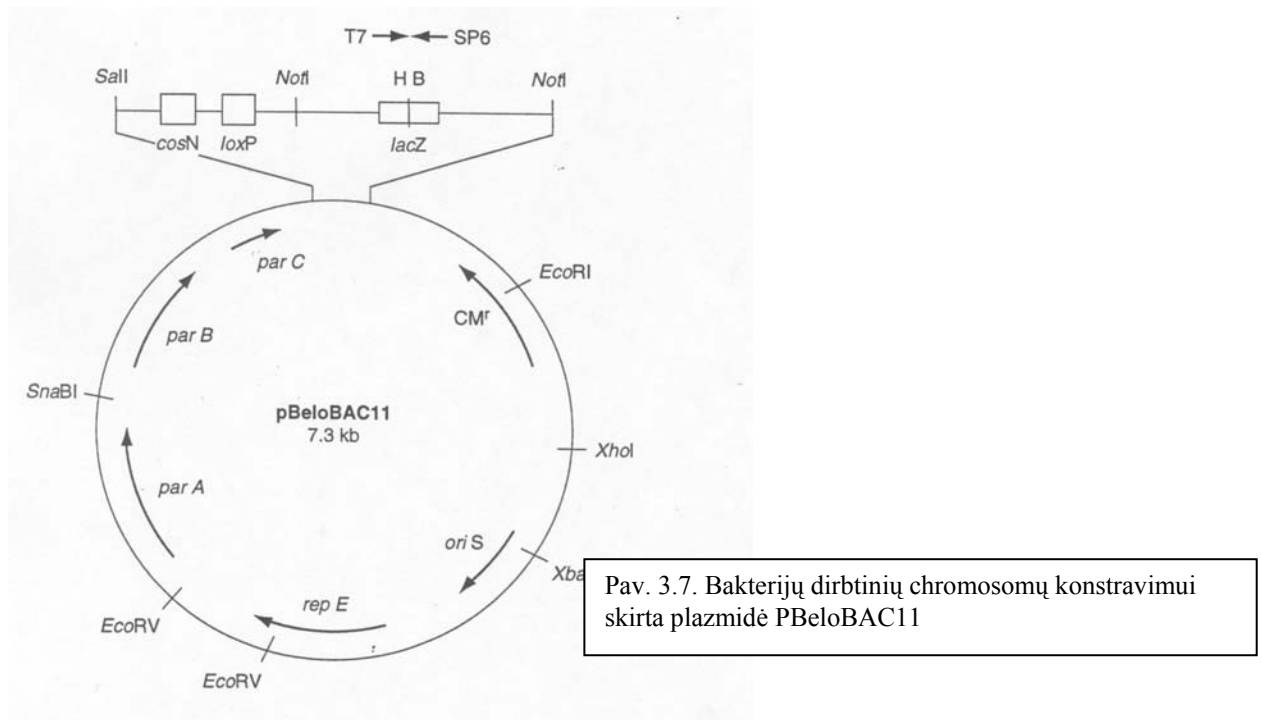
ccdB koduoja toksiną - ląstelės fermento girazės A subvieneto inhibitorių;

ccdA koduoja baltymą, neutralizuojantį CcdB. Plazmidei palikus ląstelę, ląstelėje likę CcdA ir CcdB baltymai degraduoja netolygiai, CcdA degraduoja žymiai greičiau, to pasėkoje išsilaisvina CcdB, inhibuoja girazės A subvienetą ir girazė ima karpyti ląstelės DNR.

Ori V – dvikryptės replikacijos ori.

RepC – dvikryptę replikaciją inicijuojantis Rep tipo baltymas.

F plazmidės pagrindinis ori yra ori S . Būtent ši dalis bei *par* sritis įjungiami į BAC. BAC plazmidės elementai pateikti pBeloBAC11 pavyzdyje. Iš F plazmidės imami elementai, užtikrinantys plazmidės replikaciją, kopijų skaičiaus reguliaciją (*repE* ir ori S), bei paskirstymą (*par* lokusas). Be šių elementų, į BAC vektorius įtraukiami klonavimo taikiniai, tame tarpe labai retai skaldančių REazių taikiniai (NotI atpažįsta aštuonetuką) bei bakteriofagų λ CosN bei P1 LoxP sritys. CosN ir LoxP paskirtis yra atskaitos taškai analizuojant klonuotus didelius DNR fragmentus. Šiuos taikinius atpažįstančius baltymus *in vitro* galima naudoti kaip specifines, labai retai skaldančias endonukleazes. λ baltymas A atpažįsta Cos sritį ir skelia sudarydamas 12 nt laiptelį, o P1 bakteriofago Cre baltymas atpažįsta 34 bp Lox P sritį. Tokiu būdu, panaudojant vieną ar kitą labai retai skaldančią endonukleazę, galima tikėtis, kad suformuotoje dirbtinėje chromosomoje ši nukleazė turės tik vieną ar tik keletą taikinių ir tai labai padės klonuotos DNR analizei.



Pav. 3.7. Bakterijų dirbtinių chromosomų konstravimui skirta plazmidė pBeloBAC11

Maksimalus paskelbtas DNR kiekis, klonuotas į BAC'ą yra apie 1.2 Mb (2001 m.), t.y. maždaug ketvirtis *E. coli* genomo. Tradiciniai BAC'ai yra 100-300 kb. Pažymėtina, kad BAC pagrindu sukurtos dirbtinės chromosomos yra gana stabilios. Norint padidinti BAC kopijų skaičių ląstelėje, *repE* genas prijungiamas prie reguliuojamo promotoriaus. Promotoriaus indukcija, pašalina RepE autoreguliaciją, todėl BAC kiekis ląstelėje pakyla iki 5 kopijų, tai palengvina didžiulių plazmidžių išskyrimą.

Be BAC, naudojamos ir *E. coli* bakteriofago P1 pagrindu kuriamos dirbtinės chromosomos PAC. P1 yra pats stambiausias saikingas bakteriofagas, turintis dvi vystymosi alternatyvas, lizuojantis kelias ir lizogenija. P1 genomą sudaro apie 90 kb. Lizogenijos metu bakteriofagas elgiasi kaip mažakopijinė plazmidė. PAC konstravimui imamas P1 ori sritys bei pakavimo sistemos atpažįstama sritis. Klonuota DNR *in vitro* pakuojama į P1 bakteriofago galvutę panaudojant tam paruoštus *E. coli*/P1 lizatus (defektyvaus P1 lizogeno ekstraktas). Į P1 galvutę galima supakuoti iki 100 kb DNR. Tokiu būdu, naudojant pakavimo sistemas, panašiai, kaip λ kosmidžių atveju, išvengiama transformacijos procedūrų. Pakavimo metu, P1 pakavimo baltymai atpažįsta *pac* sritį, kerpa toje srityje ir supakuoja apie 100 kb DNR. Jeigu DNR netelpa į galvutę, perteklius nukerpamas.

Genominės DNR bibliotekos arba genų bankai

Genominės bibliotekos, sinonimas – genų bankai, konstruojami, norit perkelti visą analizuojamo objekto genomą į plazmidžių rinkinį, persidengiančiais DNR fragmentais, su tikimybe, kad kiekvienas geno genas bus atstovaujamas šiame plazmidžių, bakteriofagų ar dirbtinių chromosomų mišinyje. Genų bibliotekos yra kuriamos atskirų genų izoliavimo tikslais, ypač, jeigu tiriamo organizmo genomas dar nėra sekvenuotas.

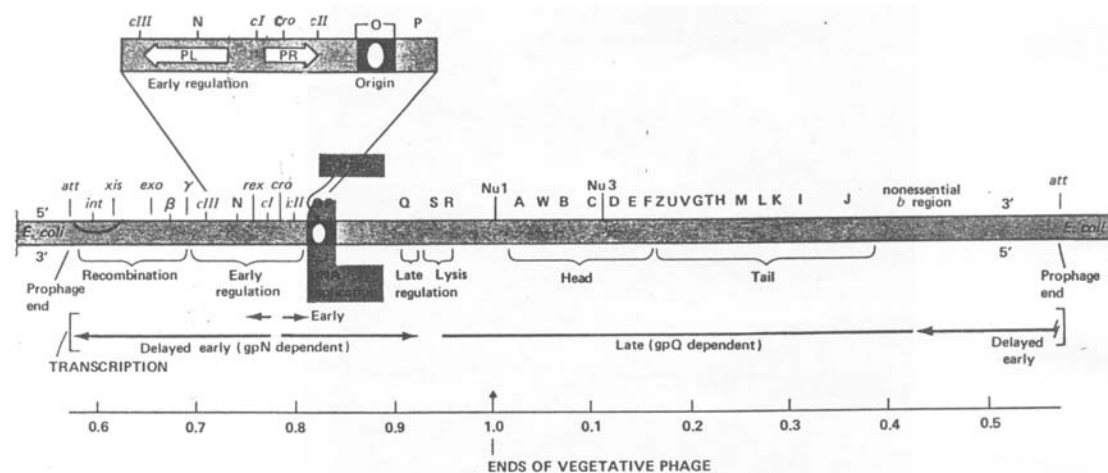
Bibliotekos dydis skaičiuojamas naudojant paprastą statistiką, paremtą Poisson'o pasiskirstymo dėsnium. Norint, kad į genų banką patektų norima seka, reikalinga izoliuoti N klonų. Klonų skaičius apytikriai skaičiuojamas formule:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-(I/G)),$$

kur I – vidutinis klonuotų DNR fragmentų dydis bazių poromis, G- geno dydis bazių poromis, P – tikimybė, kuria norima, kad mūsų ieškomas genas būtų atstovaujamas bibliotekoje.

3.3. Prokariotų vektoriai bakteriofago λ (lambda) pagrindu. Bakteriofagas λ

Bakteriofagas λ ilgą laiką buvo vienas iš populiariausių molekulinės genetikos objektų. Šis bakteriofagas turi dvi vystymosi alternatyvas: (1) lizuojantis vystymosi kelias, kurio metu bakteriofagas po *E. coli* ląstelių infekcijos replikuoja, suformuoja fagines daleles, lizuoja bakteriją ir išeina į aplinką; (2) lizogeninis vystymosi kelias, kurio metu į ląstelę patekusi bakteriofago λ chromosoma – 48502 bp DNR molekulė, yra integruojama į specifinę *E. coli* chromosomos vietą vadinamą *att* sritimi (nuo *attachment*). Integruota λ DNR replikuoja kartu bakterijos chromosoma, tačiau išorinio poveikio (UV, karštis) gali aktyvuotis, iššokti iš chromosomos, imti replikuotis ir suformuoti bakteriofagą. Šios dvi vystymosi alternatyvos buvo patogus modelis genų reguliacijai tirti, be to, ankstesniesiems tyrinėtojams priminė sudėtingesnių organizmų diferenciacijos procesą. Buvo tikimasi, kad išsiaiškinus paprastų organizmų genų veiklos reguliaciją, bus galima suprasti ir sudėtingų organizmų vystymosi mechanizmus. Ilgą laiką buvo populiarus posakis "kas tinka bakteriofagui, tinka ir drambliui". Deja, tai nepasitvirtino, dramblys pasirodė nepalyginamai sudėtingesnis... Tačiau rezultatai, gauti tyrinėjant bakteriofagą λ ir kitus bakteriofagus (T4, ϕ X174, M13 ir kt.) davė daug žinių apie prokariotų genų veiklą, genų aktyvacijos ir represijos mechanizmus, transkripciją, replikaciją. Tokiu būdu, apie 1970 m. bakteriofagas λ buvo vienas iš geriausiai ištirtų molekulinės genetikos objektų. Iškilus poreikiui sukurti vektorius, galinčius pernešti ar padauginti norimus DNR fragmentus, žinios, sukauptos tyrinėjant bakteriofago λ biologiją buvo sėkmingai panaudotos vektorių konstravimui.



Pav. 3.8. Bakteriofago λ profago (integruoto į chromosomą) genolapis.

Pagrindiniai bakteriofago λ genai:

- cI lambda represorius, cI₁₈₅₇ – represoriaus *ts* mutacija, 42°C temperatūroje I₁₈₅₇ represorius tampa neaktyvus;
- cII pozityvus cI ir int transkripcijos reguliatorius, aktyvina promotorius P_{RE}, P_I (int);
- cIII stabilizuoja cII;
- cro* represorius, represuoja P_L, P_R, P_{RM} promotorius;
- int* koduoja integrą (topoizomerazę I); integracijai reikalingas ir *E. coli* *himA*;
- xis* reikalingas fago iššokimui iš chromosomos, kartu su *int* ir *exo* reikalingas homologinei rekombinacijai; kartu su *bet* geno produktu sudaro *red*;
- bet* reikalingas homologinei rekombinacijai;
- gam* inhibuoja *E. coli* RecBCD nukleazę (Egzonukleazę V), būtinas riedančio rato replikacijai;
- kil* ląstelių inaktyvacija;
- N* antiterminatorius, pozityvus ankstyvų genų transkripcijos reguliatorius;
- O* DnaA analogas, reikalingas ori surišimui ir replikacijos iniciacijai, O geno koduojančioje dalyje yra λ ori seka;
- P* DnaC analogas, sąveikauja su O, atveda DnaB. P baltymo pašalinimui iš iniciacijos komplekso reikalinga DnaJ, DnaK ir GrpE šaperoninė sistema;
- Q* antiterminatorius, pozityvus transkripcijos faktorius (S-J genų grupės);
- S* ląstelės lyzė, reguliatorius;
- R* ląstelės lyzė, endolizinas, transglikozilazė;
- Rz* ląstelės lyzė, endolizinas, endopeptidazė;
- Att* (attachment) bakteriofago integracijos sritis, suformuojamas 7 nt laiptelis *attO* dalyje;
- lambda att - att P, sudaryta iš P, O ir P' dalių, 145, 15 ir 75 nt;
- bakterijų att att BOB', sudaryta iš B, O ir B' dalių, 3, 15 ir 5 nt;
- cos* linijinės fago DNR lipnūs galai (12 nt). Patekus bakteriofago DNR į ląstelę, dėka šių galų bakteriofago DNR ciklizuojasi;
- b2* (b - buoyancy) sritis, nebūtina fago vystymuisi;
- Nu1, A, W, B, C, Nu3, D, E, FI, FII, Z, U, V, G, T, H, M, L, K, I, J* - galvutės ir uodegėlės baltymų genai;

Lizuojantis vystymosi kelias

λ bakteriofagas patenka į *E. coli* ląstelę naudodamas maltozės transporto sistemą (*lam* receptorius). Bakteriofago galvutėje randama supakuota linijinė DNR, kurios galuose yra viengrandžiai 12 nt komplementarūs *cos* galai. Bakteriofago DNR patekusi į ląstelę, ciklizuojasi, formuodama žiedinę struktūrą. Bakterijos transkripcijos sistema – RNR polimerazė pradeda transkripciją nuo dviejų stiprių bakteriofago promotorių - dešiniojo promotoriaus P_R ir kairiojo promotoriaus P_L. Nuo P_R promotoriaus transkripcija vyksta į dešinę nuo cI geno, nuskaitomas *cro* genas, o nuo P_L promotoriaus transkripcija vyksta į kairę nuo cI geno, nuskaitomas *N* genas. Tokiu būdu pirmiausia nuskaitomi *cro* ir *N* genai. Už šių genų transkripcija sustoja, nes už jų yra transkripcijos terminatoriai, kuriems įveikti reikalingas pakankamas geno *N* koduojamo baltymo kiekis. Kai ląstelėje susintetinama

pakankamai N baltymo, šis baltymas, kartu su kai kuriais ląstelės – šeimininko baltymais padeda RNR polimerazei įveikti transkripcijos terminatorius. Įveikus terminatorius, prasideda antra transkripcijos fazė, kurios metu transkribuojami uždelstai ankstyvieji genai. Transkripcija nuo P_R baigiasi už Q geno, kur yra lokalizuotas sekantis transkripcijos terminatorius. Šiam terminatoriui įveikti būtinas Q koduojamas baltymas. Susikaupus pakankamai Q baltymo, prasideda vėlyvųjų genų, koduojančių bakteriofago galvutės ir uodegėlės baltymus, transkripcija. Kada susintetinami replikacijai reikalingi baltymai O ir P , šie baltymai susiriša su bakteriofago λ replikacijos ori seka, lokalizuota O gene. Baltymo O funkcija bakteriofago replikacijoje yra analogiška DnaA funkcijai *E. coli* replikacijoje, o P baltymas atlieka DnaC baltymo funkciją. Ori srityje suformuojamas gana stabilus O , P , DnaB baltymų kompleksas. P baltymas atveda DnaB baltymą – DNR helikazę, tačiau jis kartu yra ir helikazės inhibitorius, todėl jį iš prieš-replikacinio komplekso reikalinga pašalinti. P baltymą pašalina šaperonai DnaJ, DnaK, GrpE. Pašalinus P baltymą, DnaB aktyvuoja DnaG – pradmens polimerazę, kuri pradeda pradmens sintezę. Replikacijos iniciacijai būtina transkripcija nuo promotoriaus P_R . Matomai, tai reikalinga DNR grandinių destabilizacijai, perskyrimui. Tokiu būdu prasideda ankstyvoji dvikryptė θ (teta) tipo replikacija, kuri trunka keletą replikacijos ciklų, po to replikacija pereina į vėlyvą, vienkryptę riedančio rato arba σ (sigma) tipo replikaciją, kurios metu sintetinama ilga, susidedanti iš daug tendemiškai “galva”-“uodega” pasikartojančių bakteriofago genominių DNR molekulių. σ (sigma) tipo replikaciją inhibuoja *E. coli recBC* rekombinacijos sistemos egzozukleazė V, kuri degraduoja sintetinamą bakteriofago linijinę DNR. Linijinės DNR apsaugojimui bakteriofagas sintetina baltymą gam, kuris inhibuoja bakterijos egzozukleazę V. Susintetinus vėlyvuosius bakteriofago baltymus, prasideda genomo pakavimas į virusinę dalelę. Bakteriofago koduojamas baltymas A karpą linijinę DNR į genomo dydžio fragmentus per *cos* sekas, kiekvieno DNR fragmento galuose formuodamas 12 nt laiptelius. Tokia linijinė DNR su išsikišusiais “lipniais” *cos* galais supakuojama į bakteriofago galvutę, po to prie galvutės prijungiama bakteriofago uodegėlė. Pakavimui reikalingi A ir *NuI* baltymai, kurie sąveikauja arti *cos* sekų. Susiformavę bakteriofagai lizuoja ląstelę ir pasklinda po aplinką. Lizavimą užtikrina bakteriofago koduojami genų produktai S, R, Rz.

Nėra pilnai žinoma, kaip perjungiamas bakteriofago λ replikacija iš ankstyvosios į vėlyvąją. Šio perjungimo biologinė prasmė siejama su bakteriofago

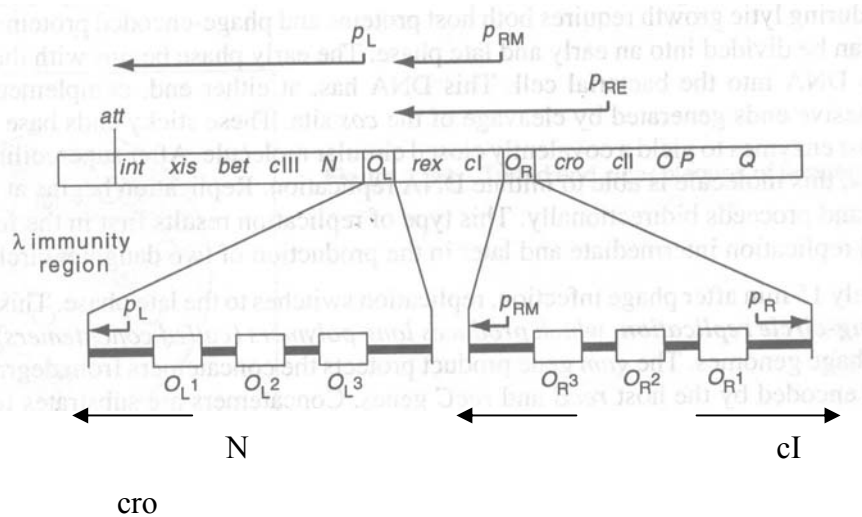
DNR pakavimu į galvutę. Bakteriofago λ pakavimo sistemai DNR molekulėje reikalinga mažiausiai pusantros *cos* sekos, priešingu atveju DNR nepakuojama. Žiedinė DNR turi tik vieną *cos* seką, todėl tokia DNR nepakuojama ir fago nesuformuoja. Jeigu inhibuosime riedančio rato replikaciją inaktyvuodami *gam* geną, bakteriofago išėiga labai smarkiai kris, nes žiedinė DNR, turinti tik vieną *cos* seką, nepakuojama. Susiformuoja tik labai nedidelis bakteriofagų kiekis. Tai paaiškinama žiedinės DNR dimerizacija, kurios metu, dėka dviejų žiedinių DNR molekulių rekombinacijos dalyvaujant ląstelės arba bakteriofago *red* rekombinacijos sistemoms, susiformuoja dimerinės žiedinės DNR molekulės, turinčios po dvi *cos* sekas.

Reziumuojant, bakteriofago lizuojančio vystymosi kelio pasirinkimui yra labai svarbi transkripcija nuo dešinės pusės promotorių, P_R , $P_{R'}$, kurie transkribuoja replikacijos ir struktūrinių baltymų genus. *Cro* represorius, konkuruodamas su *cI*, silpnina transkripciją nuo dešinės ir kairės pusės promotorių, bei uždaro *cI* geno promotorių. P_L ir P_R transkripcijos silpninimas *cro* pagalba labai svarbus vėlyvose vystymosi stadijose, kada prasideda vėlyvųjų genų transkripcija.

Lizogeninis vystymosi kelias

Nedidelė bakteriofagų dalis pasirenka lizogenijos kelią – integraciją į bakterijos genomą. Bakterijoms augant turtingoje terpėje, dominuoja lizuojantis vystymosi kelias, skurdžiomis augimo sąlygomis, santykinai padidėja bakteriofagų dalis, pasirenkanti integraciją į bakterijos chromosomą. Šis pasirinkimas priklauso nuo atskirų genų produktų aktyvumo balanso. Lizogenijai yra absoliučiai būtinas geno *cI* produktas, kuris yra pagrindinių promotorių P_L ir P_R represorius, o savo paties promotoriaus P_{RM} aktyvatorius. Kitas represorius, *cro*, sąveikauja su tais pačiais operatoriais, kaip ir *cI*, tačiau jis inhibuoja ir *cI* geno transkripciją nuo P_{RM} promotoriaus. Lizogenijos kelio pasirinkimui yra labai svarbus *cII* ir *cIII* genų produktų susiformavimas. *cII* genas transkribuojamas nuo P_R promotoriaus, *cIII* – nuo P_L . *cII* baltymas aktyvina transkripciją nuo P_{RE} ir P_I promotorių. *cII* baltymas yra labai nestabilus, labai greitai degraduoja, jo stabilizacijai tarnauja *cIII* baltymas. Nuo promotoriaus P_{RE} sintetinamas transkriptas, koduojantis *cI* baltymą, reikalingas P_{RM} aktyvinimui. Be to, šio transkripto 5' dalis yra komplementari (*antisense*) *cro* mRNR. Tokiu būdu, dėka *cII* ir *cIII* baltymų, nuo P_{RE} promotoriaus susintetinamas transkriptas, koduojantis pirmas *cI* baltymo molekulės, kurios sąveikauja su P_L ir P_R

promotorių operatoriais ir stabdo transkripciją. *cI* sąveika su operatoriais yra gana sudėtinga ir apsprendžiama operatorių struktūros. P_L ir P_R promotorių operatoriai O_L ir O_R kiekvienas susideda iš trijų nepilnai homologiškų 17 nt pasikartojimų – represoriaus surišimo taikinių O_{L1} , O_{L2} , O_{L3} ir O_{R3} , O_{R2} , O_{R1} :



Pav. 3.9. Bakteriofago λ pagrindinė reguliatorinė sritis

N genas transkribuojamas RNR polimerazei susirišant su sritimi, persidengiančia su O_{L1} (rodyklė).

Cro genas transkribuojamas RNR polimerazei susirišant su sritimi, persidengiančia su O_{R1} (rodyklė)

CI genas transkribuojamas RNR polimerazei susirišant su sritimi, persidengiančia su O_{R3} (rodyklė).

Visais atvejais RNR polimerazė konkuruoja su represoriumi *cI*, kuris dimerinėje formoje susiriša su kiekvienu iš operatorių elementų. Tačiau operatorių elementai nėra visiškai identiški ir *cI* giminingumas jiems smarkiai skiriasi. Didžiausias *cI* giminingumas yra operatorių elementams O_{L1} ir O_{R1} . Dėka *cII/cIII* komplekso, aktyvius transkripciją nuo P_{RE} , ląstelėje pasirodo pirmos *cI* molekulės, kurios pirmiausia susiriša su O_{L1} ir O_{R1} elementais ir slopina P_L ir P_R promotorių veiklą. Didėjant *cI* koncentracijai, užimamos ir O_{L2} ir O_{R2} sritys, represija stiprėja. Tačiau *cI* prisijungimas prie O_{R2} padeda RNR polimerazei atpažinti ir susirišti su O_{R3} sritimi ir pradėti *cI* geno transkripciją nuo promotoriaus P_{RM} . Transkripcija nuo P_{RM} promotoriaus didina represoriaus koncentraciją, kuris savo ruožtu slopina P_L ir P_R veiklą ir neleidžia sintetinti bakteriofago produktų, reikalingų replikacijai. Tokiu būdu *cI* represorius represuoja P_L ir P_R veiklą, tačiau aktyvina P_{RM} . Toliau didėjant *cI*

koncentracijai, cI ima rištis ir su O_L3 ir O_R3 sritimis, ko pasėkoje stabdoma P_{RM} promotoriaus veikla. Tokiu būdu, cI veikia savo paties geno transkripcijos autoregulatoriumi, nedidelės cI koncentracijos aktyvina P_{RM} , didelės – slopina. Ląstelėje nusistovi cI koncentracijos pusiausvyra, pakankama P_L ir P_R slopinimui. cII/cIII aktyvatoriai aktyvina ir kitus, lizogenijos susiformavimui reikalingus promotorius. Vienas jų yra P_I promotorius, atsakingas už fermento integrazės (*int*) transkripciją. Integrazė yra reikalinga bakteriofago genomui integruotis į specifinę *E. coli* chromosomos vietą, pavadintą *att* (nuo *attachment*). Integracijoje dalyvauja ir bakterijos baltymas HimA. Integracijos metu vyksta rekombinacija tarp chromosomos ir bakteriofago *att* elementų, suformuojamas 7 nt komplementarus laiptelis O dalyje. Bakteriofago att dalis sudaryta iš trijų elementų, P, O, P' (POP') ir yra žymiai didesnė už analogišką *E. coli* BOB':

	P	O	P'
Bakteriofago <i>att</i>	145 nt	15 nt	75 nt
<i>E. coli att</i>	3 nt	15 nt	5 nt
		B	O B'

Pav. 3.10. Bakteriofago λ att sritys

Pažymėtina, kad bakteriofago *cos* ir *att* elementai nesutampa ir yra skirtingose λ genomo vietose. Integravęsis bakteriofago genomas replikuoja kartu su ląstelės šeimininko chromosoma. Vyksta autoreguliuojama cI represoriaus sintezė, užtikrinanti lizogenijos būseną, bei apsauganti ląstelę nuo kitų λ fagų infekcijos. Lizogenijos metu, be cI geno, transkribuojami ir rekombinacijoje dalyvaujantys *rexA* ir *rexB* genai. cI ekspresija lizogeninėse ląstelėse nėra stipri, cI transkriptas prasideda labai arti nuo iniciacijos kodono AUG, todėl transliuojamas neefektyviai. Be to, vyksta transkripcijos autoreguliacija.

Apšvitinus lizogenines ląsteles UV, ląstelės recA baltymas indukuoja cI represoriaus proteolizę, to pasėkoje prasideda bakteriofago genų transkripcija, Int ir Xis baltymai iškerpa bakteriofago genomą iš chromosomos ir suformuoja žiedinę DNR molekulę.

Kai kurios *E. coli* genų mutacijos labai padidina lizogenijos tikimybę. Pav. *hfl* (*high frequency lisogenization*) mutantuose bakteriofagas pasirenka išimtinai lizogenijos kelią, t.y. integruojasi į genomą. Ištyrus *E. coli hfl* geno funkcijas, paaiškėjo, kad šis genas koduoja proteinazę, kuri efektyviai degraduoja cII baltymą.

Tokiu būdu, cII stabilizacija *hfl* mutantuose užtikrina lizogeniją. Ir atvirkščiai, mutacijos bakteriofago cI, cII ir cIII genuose užtikrina tik lizuojančio kelio pasirinkimą, tokie bakteriofagai *E. coli* gazonė formuoja ryškias, skaidrias dėmeles (c - nuo žodžio *clear*), tuo tarpu *wt* bakteriofago dėmelės nėra visai skaidrios, nes jose auga lizogeninės bakterijos.

Kokios buvo prielaidos panaudoti sąlyginai didelį bakteriofagą vektorių konstravimui?

Pirma prielaida. Seniai buvo pastebėta, kad lizogeniniai bakteriofagai maždaug 10^{-6} dažnumu iš chromosomos iššoka netiksliai ir savo sudėtį įjungia greta *att* sekos esančius bakterijos genomo fragmentus.

E. coli chromosomos sritis, kurioje integruojasi λ bakteriofagas atrodo sekančiai:

nadA aroG gal chlD pgl ***att*** bio uvrB.

Netaisyklingai (ne per *att*) iššokus iš chromosomos bakteriofagai, gaunami bakteriofagai, savo sudėtyje turintys *E. coli* *bio*, *uvrB* genus vienoje pusėje, arba *pgl*, *gal* genus kitoje pusėje. Bakterijos genomo, įjungiamo į bakteriofago struktūrą, dydį riboja bakteriofago galvutės galimybės. Bakteriofagas gali papildomai įjungti ne daugiau, kaip 5-6 % DNR, t.y. apie 2,5 kb. Tokiu būdu *in vivo* eksperimentuose buvo pademonstruotos λ bakteriofago galimybės tarnauti svetimų genų pernešimui.

Antra prielaida. Gryninant bakteriofago λ daleles ultracentrifugavimo cezio chlorido gradiente metodu, buvo pastebėta minorinė bakteriofago frakcija su sumažintu genomu, formuojanti specifinę, lengvesnę frakciją cezio chlorido gradientuose. Ištyrus paaiškėjo, kad ši bakteriofagų frakcija turi didelę iškratą srityje, pavadintoje *b2* (nuo žodžio *buoyancy* - plūduriavimas). Tokie bakteriofagai laboratorinėse sąlygose nesiskyrė nuo *wt*, netgi turėjo dauginimosi privalumų. Iš šių tyrimų paaiškėjo, kad ne visas genomus yra reikalingas bakteriofago vystymuisi. Kilo mintis, kad nebūtiną genomo dalį galima būtų pakeisti kitais, mums reikalingais genais.

Kokiu būdu į didelį (48502 bp) genomą galima būtų įvesti papildomas DNR sekas? Dideli genomai, ne išimtis ir λ , turi daug REazių taikinių. Iš kilo poreikis sukonstruoti bakteriofagus su vienu ar dviems darbui patogiais REazių taikinais. *Wt* bakteriofago DNR turi 5 EcoRI taikinius. Norint sumažinti taikinių skaičių nepažeidžiant genų funkcijų, bakteriofagas buvo daug sykių pakaitomis daugintas *E. coli* kamiene, turinčiame EcoRI R-M sistemą. Panaudojus tokią selekciją, buvo

atrinkti fagai, su sumažintu EcoRI taikinių skaičiumi. Vėliau, panaudojant *in vitro* bakteriofago λ pakavimo sistemas, buvo gauti ir bakteriofagai su sumažintu BamHI ir kitų REazių taikinių skaičiumi. Tokiu būdu buvo sukurti pirmieji λ vektoriai, leidžiantys klonuoti svetimą DNR.

Vektoriai, turintys vieną REazės taikinį įgalino įterpti papildomą seką iki 2,5 kb, t.y. neviršijant **5%** genomo ir ne mažiau kaip **78%** genomo. Pašalinus nereikalingą *b2* dalį, įterpti galima ir žymiai didesnius DNR fragmentus.

Vektoriai, turintys du taikinius įgalino pakeisti bakteriofagai nebūtiną genomo dalį svetima DNR. Pakeitimo vektoriai leidžia klonuoti didelius DNR fragmentus, pakeičiant *b2* dalį, bei už lizogeniją atsakingą genomo nuo *J* geno (17050 nt) iki *N* geno (35710 nt), iš viso apie 18 000 bp.

cosL (48502).....*N* (35710 nt).....***att***.....*J* (17050 nt).....*cosR* (0)

Išmetus visą bakteriofago genomo dalį, atsakingą už lizogeniją bei *b2* sritį, bakteriofagas išgyvena, tačiau praranda galimybę integruotis į bakterijų chromosomą.

Kokiu būdu atliekamas DNR klonavimas λ vektoriuose? Pasirinkus vektorių, jo DNR suskaldoma pasirinkta REaze. Jeigu tai yra pakeitimo vektorius, išgryninami dešinysis ir kairysis pečiai, pašalinant pakeičiamą fragmentą. Dažniausiai pakeitimo vektoriai konstruojami taip, kad kairio ir dešinio pečių suma, pašalinus pakeičiamą fragmentą būtų mažesnė už **78%** bakteriofago genomo. Tokiu būdu, jeigu du pečiai susiliguos tarpusavyje, neįjungdami klonuojamos DNR, jie nebus pakuojami į bakteriofago struktūrą. Išgryninti pečiai sumaišomi su klonuojamos DNR fragmentais ir liguojami. Liguotas DNR mišinys veikiamas bakteriofago pakavimo mišiniu *in vitro*.

Bakteriofago λ pakavimo mišinys paruošiamas dauginant bakterijose defektyvų bakteriofagą, pav. neturintį *cos* sekų ir už bakterijos sienelių lizavimą atsakingų genų, arba naudojant dviejų tarpusavyje komplementuojančių mutantų lizatų mišinį. Tokiose bakterijose susikaups bakteriofago vėlyvųjų genų produktai, reikalingi genomo supakavimui. Tokių bakterijų lizatas labai efektyviai *in vitro* pakuoja *cos* sekas turinčią DNR. Pakavimo sistema iš DNR ligato į bakteriofago

daleles supakuoja DNR fragmentus, kuriuose tarp *cos* sekų yra DNR kiekis tenkinantis pakavimo taisyklę - nuo **78%** iki **105%** bakteriofago genomo.

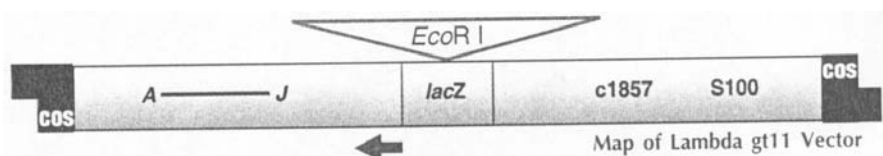
Panaudojant sukauptas genetikos žinias, vektoriai buvo tobulinami, siekiant palengvinti rekombinantų selekciją. Keletas pavyzdžių

- (i) Buvo sukurti ~100% lizogenuojantys λ vektoriai *E. coli hfl* mutantuose. Pasirinkus klonavimo taikinį *cI* gene, rekombinantiniai bakteriofagai tampa tik lizuojantys, o vektoriaus struktūrą atstatę bakteriofagai integruosis į chromosomą. Tokiu būdu, supakavus liguotą DNR ir infekavus ją *E. coli hfl*, dauginsis tik rekombinantiniai bakteriofagai.
- (ii) Laukinis λ bakteriofagas nesidaugina *E. coli* kamienuose, lizogenuotuose bakteriofagu P2 (spi^+ fenotipas – *sensitive to P2 infection*). Tuo tarpu λ bakteriofagai be funkcionuojančių *gam* ir *red* (*exo* ir *bet*) genų P2 lizogenuose vystosi (spi^- fenotipas). Vektoriuose *gam* ir *red* genus patalpinus pakeičiamajame fragmente, rekombinantų atranka atliekama *E. coli* P2 lizogenuose. Tokiomis sąlygomis vystysis tik rekombinantai, kuriuose bus pakeistas *gam* ir *red* turintis DNR fragmentas.

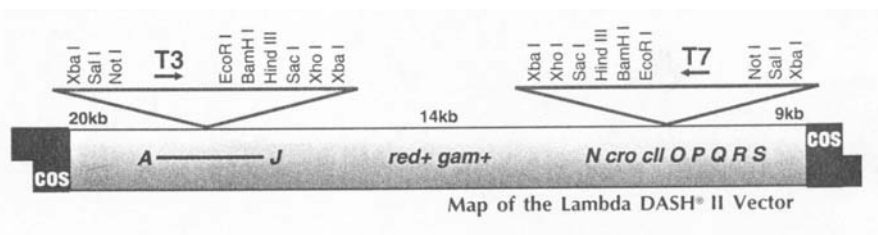
Tai tik keletas pavyzdžių, iliustruojančių kaip žinios apie bakteriofago λ biologiją padeda kurti patogias selekcijos sistemas. Reikia pabrėžti, kad nėra universalus λ vektoriaus, iš jų daugybės reikalinga pasirinkti tą, kuris labiausiai atitinka tikslus. λ vektorių pranašumas yra labai efektyvi pakavimo sistema, leidžianti gauti apie 10^9 - 10^{10} faginių dėmelių /1 μ g DNR. Šių vektorių trūkumas – santykinai sudėtinga juos dauginti, reikia šiek tiek žinoti bakteriofagų biologiją.

Įterpimo vektorius *Lambda gt11 (Stratgene)*. Žemiau pateiktas vektorius skaldomas REaze *EcoRI*, nufosforinamas šarmine fosfataze. Gauti du pečiai naudojami klonavimo darbams. Rekombinantiniai klonai nuo atstatančio struktūrą vektoriaus klonų skirsis spalva – svetimose sekose įterpimas pažeis *lacZ* struktūrą.

Įterpimo vektorius



Pakeitimo vektorius *DASH II (Stratgene)*



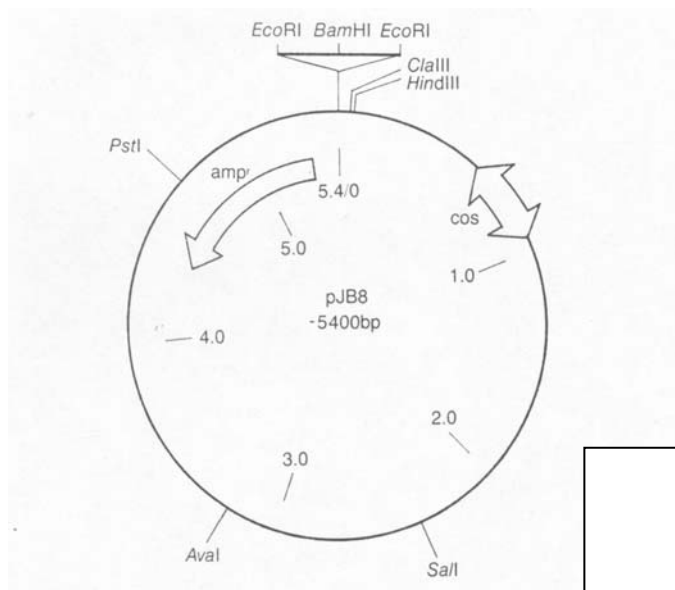
Pav. 3.11. Bakteriofago λ vektorių pavyzdžiai

Vektorius skaldomas REaze, pav. BamHI, išgryninami du pečiai, kairysis ir dešinysis, nufosforinami ir liguojami su klonuojamais DNR fragmentais. *Red-gam* sritis pakeičiama, rekombinantiniai bakteriofagai vystysis *E. coli* P2 lizogene.

Kosmidės

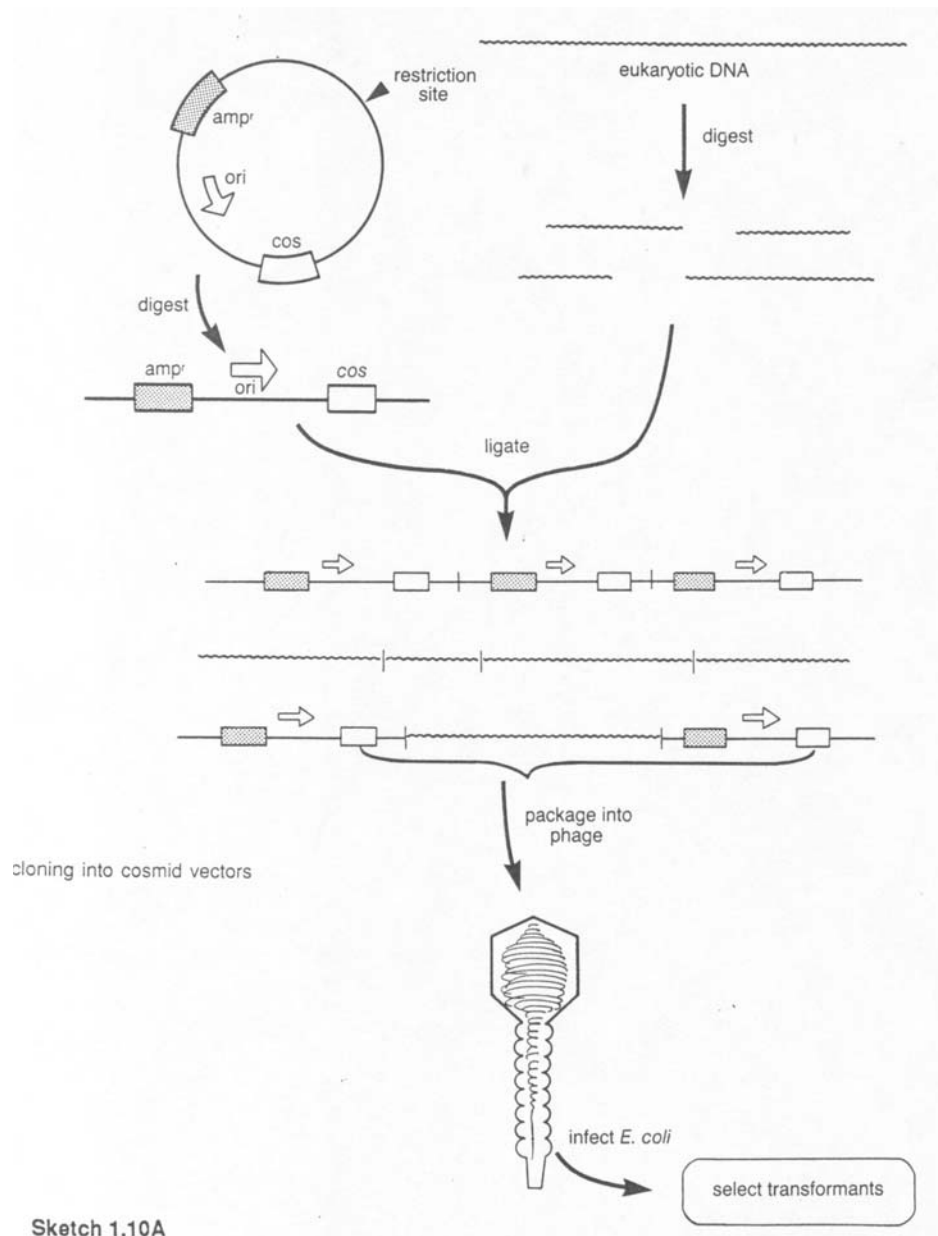
Kosmidės pavadinimas kilęs iš λ cos (*cohesive*) sekų pavadinimo, naudojamų bakteriofago genomo pakavimui. Kosmidės – plazmidės, leidžiančios klonuoti ir dauginti didelius DNR fragmentus. Naudojant įprastus vektorius, patogu dirbti su DNR fragmentais, neviršijančiais 10-15 kb. Didelės plazmidės, ypač daugiakopijinės, sukonstruotos pUC ori pagrindu yra nestabilios, be to, naudojant tradicinius transformacijos metodus, transformuoja blogai. Tuo tarpu λ pakavimo sistema yra labai efektyvi, leidžia supakuoti apie 36-52 kb dydžio DNR molekules. Paaikškėjo, kad ši pakavimo sistema gali supakuoti bet kokią DNR, esančią tarp dviejų tos pačios cos orientacijos taikinių 36-52 kb atstume. Jeigu į tradicinį plazmidinį vektorių įvesime cos seką ir į tokį vektorių liguosime didelis DNR fragmentus ir šį ligavimo mišinį *in vitro* apdorosime λ pakavimo mišiniu, gausime bakteriofagų mišinį, kurių genomus sudarys įvairaus ilgio, nuo 36 iki 52 kb svetima DNR. Šiais bakteriofagais užkrėtus bakterijas, jie suleis savo DNR į bakterijas. DNR, patekusi į ląstelę, dėka lipnių cos galų ciklizuosis ir autonomiškai replikuosis, nes kiekvienas į bakteriofagą patekęs DNR fragmentas savo sudėtyje turės ir bakterijų vektorių.

Kosmidės dažniausiai konstruojamos naudojant plazmidės pBR322 (ColE1) replikoną, nes pUC tipo didelės daugiakopijinės plazmidės yra mažiau stabilios.



Pav. 3.12. Kosmidė pJB8

Pagrindinis kosmidžių privalumas yra galimybė panaudoti efektyvią λ pakavimo sistemą, įgalinančią įvesti į bakterijas sąlyginai dideles DNR molekules. Kosmidžių stabilumui užtikrinti naudojami *recBC sbcB recJ* kamienai.



Pav. 3.13. Klonavimo į kosmides schema.

3.4. Prokariotų genų raiškos vektoriai

Raiškos (ekspresijos) vektoriais vadinami vektoriai, kurie užtikrina klonuoto geno efektyvią transkripciją ir mRNR translaciją. Šiam tikslui konstruojamos plazmidės, turinčios stiprius promotorius. Keletas populiariausių *E. coli* promotorių:

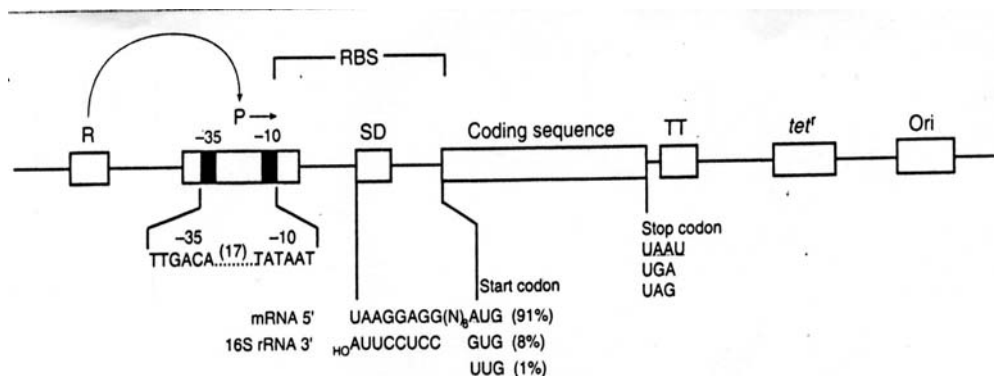
Promotorius	Reguliacija	Induktorius
LacUV5	lacI, lacI ^Q (Q - mutacija apie 10 kartų padidinanti represoriaus kiekį)	IPTG
Trp		Trp badavimas; indolil akrilo rūgštis
tac (hibridinis)	lacI, lacI ^Q	IPTG
araBAD	araC	L-arabinozė
lac-ara	lacI, lacI ^Q ; araC	IPTG, arabinozė
P _L (λ bakteriofagas)	lac / ts857	IPTG, temperatūra
P _R , P _L (λ tendemas)	lac / ts857	IPTG, temperatūra
T7 (bakteriofago T7)	kaskadinė sistema, cI, lac	IPTG, temperatūra

Lentelėje pateikti įvairūs, dažnai naudojami promotoriai. Viena iš svarbiausių sąlygų ekspresijos vektoriams yra griežtai reguliuojami promotoriai. Ši sąlyga yra būtina, nes labai dažnai nekontroliuojama ir stipri geno transkripcija suardo ekspresijos sistemą, dideliu dažnumu deletuojama ekspresijos kasetė, plazmidės subyra, prarasdamos tikslinį geną. Siekiant išvengti nestabilumo, kuriamos griežtai reguliuojamos sistemos, įgalinančios išauginti ląstelių biomą iki indukcijos be pastebimos tikslinio baltymo sintezės. Griežtai reguliacijai kuriamos dvigubos reguliacijos sistemos, pav. ara-lac.

Labai efektyvi yra T7 bakteriofago transkripcijos sistema. T7 bakteriofago RNR polimerazė atpažįsta tik specifinius bakteriofago promotorius. T7 fago promotorių pagrindu kuriamos ekspresijos sistemos paprastai sudaromos bent iš dviejų vektorių. Viename, daugiakopiniame vektoriuje patalpinamas tikslinis genas, prijungtas prie T7 promotoriaus, kitame, suderiname mažakopijiniame vektoriuje arba integruotame į bakterijos genomą vektoriuje, patalpinamas bakteriofago T7 RNR polimerazės genas, prijungtas prie indukuojamo promotoriaus, pav. *lacUV5* ar P_L.

Siekiant reguliuoti T7 RNR polimerazės sintezę, represoriaus genas patalpinamas taip pat daugiakopijinėje plazmidėje, kartu su ekspresuojamu genu, arba atskiroje plazmidėje. Represoriaus perteklius neleidžia sintetinti T7 RNR polimerazę iki indukcijos pradžios. Indukavus T7 RNR polimerazės transkripciją, ląstelėje sintetinama T7 RNR polimerazė suranda T7 fago promotorius ir pradeda labai intensyvią tikslinio geno transkripciją. Naudojant T7 promotorius, tikslinis baltymas gali sudaryti net iki 50% nuo visų *E. coli* ląstelės baltymų. Norint sintetinti labai toksiškus baltymus, siekiant išvengti net minimalios T7 RNR polimerazės sintezės, atskiros plazmidės pagalba įvedami vienas iš dviejų bakteriofago T7 lizocimo genų S arba L. Šių baltymų funkcija yra ląstelės sienelių lizavimas bakteriofago vystymosi baigiamojoje stadijoje, tačiau šie baltymai labai tvirtai susiriša su T7 RNR polimeraze ir ją inaktyvuoja. Tokiu būdu, panaudojus šią S ir L baltymų savybę, visos iki indukcijos pasirodančios T7 RNR polimerazės molekulės yra surišamos. Ląstelės sienelės peptido-glikano tinklo lizavimui reikalingi abu baltymai, todėl vieno iš jų sintezė ląstelės sienelės nesuardo. Tokia kombinacija leidžia ekspresuoti ir labai toksiškus genus, pav. koduojančius REazes ar toksinus. Toksiškus genus klonuoti ir ekspresuoti padeda ir dvigubos reguliacijos sistemos, pav. *ara-lac*, pilnai uždarančios transkripciją.

Stiprūs promotoriai užtikrina efektyvią geno transkripciją. Norint gauti didelius baltymų kiekius, reikalinga ir efektyvi mRNR transliacija. Transliacijos efektyvumą lemia efektyvus ribosomų susirišimas su taip vadinama SD (Shine – Dalgarn) seka, *E. coli* genuose randama 4-8 nt aukščiau ATG kodono. SD seka yra komplementari 16S RNR 3' galui ir tarnauja ribosomų susirišimui. Ideali SD seka būtų UA.R.GGAGG, tačiau daugumoje genų randami tik šios sekos atskiri elementai.



Pav. 3.14. Ekspresuojamo geno kasetės schema.

Transliacijos efektyvumą daug lemia geno struktūroje naudojami kodonai. Efektyviai ekspresuojami genai visose sistemose, prokariotuose ir eukariotuose, naudoja tik optimalius tripletus, kuriems yra pakankamai tRNR. Silpnai ekspresuojamuose genuose sutinkamas labai platus tripletų spektras. Pagal tai, kokie kodonai yra naudojami gene, galima netiesiogiai įvertinti to geno raišką duotame organizme.

Filogenetiškai nutolusiuose organizmuose tripletų panaudojimo dėsningumai yra skirtingi, žmogaus sistemoms optimalūs tripletai nėra optimalūs *E. coli*, todėl dažnai susiduriame su tripletų nesuderinamumu. *E. coli* retai naudojami tripletai:

AGG	Arg	0.14% dažnumu
AGA	Arg	0.21% dažnumu
CGA	Arg	0.31% dažnumu
CUA	Leu	0.32% dažnumu
AUA	Ile	0.41% dažnumu
CCC	Pro	0.43% dažnumu

Žmogaus genuose tripletai AGG, AGA, koduojantys Arg yra gana dažni, todėl norit bakterijose *E. coli* ekspresuoti žmogaus kDNR, turtingą nepopuliarias Arg kodonais, reikalinga pakeisti kodonus, jeigu jų nėra labai daug arba cheminiais metodais persintetinti geną, panaudojant *E. coli* optimalius kodonus. Arg kodonų problemos dažnai išsprendžiamos įvedant į bakterijas papildomą geną argU, koduojantį tRNR_{Arg}.

3.5. Svetimų baltymų sintezė bakterijose

Iš visų šiuo metu naudojamų svetimų (heterologinių) baltymų sintezės sistemų, *E. coli* sistemos yra pigiausios ir paprasčiausios. Sukurta daugybė įvairiausių baltymų producentų, šie baltymai naudojami medicinoje, moksle. Išleidžiama daug *E. coli* kilmės medicininių preparatų – žmogaus augimo hormonas, interferonai,

interleukinai ir daugybė kitų. Dauguma GI naudojamų fermentų (REazės, polimerazės, ligazės) yra gryninami iš *E. coli* producentų.

Siekiant palengvinti baltymų gryninimą, dažnai ekspresijos sistemose apjungiami papildomi elementai, leidžiantys lengvai išgryninti sintetinamą baltymą. Tam tikslui sintetinamas baltymas suliejamas su papildomais inkariniais peptidais, kurie įgalina sulietą baltymą lengvai išgryninti panaudojant įvestam peptidui specifinius, afiniškumu paremtus sorbentus. Populiariausi suliejimui naudojami inkarai - peptidai ar baltymai:

Suliejimo partneris - inkaras (baltymas arba peptidas)	Dydis	Ligandas	Eliucija
Proteinas A	31kDa	H IgG	Žemas pH
Heksa-histidiniai	6 ar	Ni ⁺⁺ chelatiniai sorbentai	Imidazolas/ žemas pH
GST – Glutation-S-transferazė	25kDa	GSH (glutationas)	GSH
FLAG peptidas	8 ar	Mab M1 Mab M2	EDTA/žemas pH Žemas pH
Bio ^C (peptidas, imituojantis streptoavidiną)	13a.r.	Streptoavidinas/ avidinas	Diaminobiotinas

Pasirinkus inkarą, konstruojamas sulietas genas. Pav. jeigu norime gauti baltymą, sulietą su 6His inkaru, galima modifikuoti geną PCR pagalba, įvedant geno gale (5' arba 3') 6 His kodonus. Dar paprasčiau yra naudoti komercines ekspresijos plazmides, kuriose yra įvesti His kodonai. Belieka tik pasirinkti plazmidę ir klonuoti reikalingą geną į pasirinktą REazės taikinį. Plazmidę su modifikuotu genu belieka įvesti į *E. coli*, užauginti biomasę, suardyti ją, lizatą sorbuoti ant Ni-chelatinės dervos. 6His neutraliame pH koordinaciniais ryšiais stipriai susiriš su Ni-sorbentu. Nuplovus visus kitus baltymus, tikslinis baltymas eliuojamas imidazolu arba keičiant pH. Panašūs principai naudojami ir naudojant kitus suliejimo partnerius. Tokiu būdu, naudojant tik vieną gryninimo pakopą, gaunamas pakankamai švarus tikslinis

baltymas. Dažniausiai nedideli papildomi peptidai – inkarai (6His, FLAG, Bio^C) neturi įtakos baltymo biologiniam aktyvumui, todėl tokius sulietus baltymus galima naudoti diagnostikai, fermentinėse reakcijose. Tačiau tokie baltymai netinkami naudoti farmakologiniams tikslams, nes medicininiai preparatai turi būti pilnai identiškai natyviame baltyme. Norit pašalinti gryninimo tikslais įvestą polipeptidą - inkarą, į ekspresuojamo geno konstrukciją įvedama papildomos sekos, koduojančios specifinių proteinazių skėlimo taikinius, arba, kada tai įmanoma, naudojami cheminiai agentai.

Cheminiai reagentai:

Hidroksilaminas	skelia	Asn- ↓ -Gly
CNBr		skelia Met-↓-Xar

Proteinazės:

Enterokinazė	Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-↓-Xar
[H64A] subtilizinas	Phe-Ala-His-Tyr-↓-Xa.r.
IgA proteazė	Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-↓-Thr
Faktorius Xa	Ile-Glu-Gly-Arg-↓Xar
Trombinas	Leu-Val-Pro-Arg-↓-Gly-Ser
GST-proteazė 3C	Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-↓-Gly-Pro
ABP-proteazė 3C-His6	Leu-Glu-Ala-Leu-Phe-Gln-↓Gly-Pro

Cheminis skėlimas yra pigesnis, tačiau retai kada galima panaudoti dėl baltymo struktūroje pasikartojančių skeliamų sekų. Enzimatinis skėlimas yra brangus, nes fermentai yra brangūs, be to, po skaldymo, reikalinga tikslinį baltymą papildomai gryninti nuo fermento bei skėlimo produkto.

ir kt. baltymų savo tretinę struktūrą formuoja keliaudami per ląstelės ER ir Goldži, kur jie modifikuojami, glikozilinami. Bakterijose nėra šių tik eukariotinei ląstelei būdingų struktūrų ir procesų, todėl kai kurie *E. coli* gauti baltymai būna neaktyvūs, arba tik nedidelė dalis pasižymi aktyvumu. Kaip taisyklė, intensyvi baltymo sintezė bakterijose (virš 10%) sukelia baltymų agregaciją ląstelėje į netirpias struktūras, vadinamus įterptinius kūnelius – *inclusion bodies*. Tokius agregatus galima ištirpinti naudojant dideles urėjos guanidino cchlorido koncentracijas, tačiau po ištirpinimo, tik dalis baltymo suformuoja natyvią, aktyvią struktūrą.

Eukariotinėse ląstelėse vyksta labai daug įvairių po-transliacinių baltymų modifikacijų: fosforilinimas, acetilinimas, metilinimas, ubikvitinilinimas, meristilinimas (meristilo riebalų rūgštis (14C) prijungiama prie N-galio Gly), palmitilinimas, sumoilinimas, glikozilinimas. Šių modifikacijų nėra bakterijose, todėl ne visus baltymus įmanoma gauti funkciškai aktyvius, juos sintetinant bakterijose, ypač sudėtingus heterokompleksus, susidedančius iš kelių skirtingų polipeptidų (pav. antikūnai). Daug problemų *E. coli* gali sukelti N-galo formavimas. Eukarijotuose pirma aminorūgštis Met yra efektyviai pašalinama, po to dažnai N-galas įvairiai modifikuojamas. *E. coli* Met šalinamas, priklausomai nuo to, kokia **ar** yra po Met, jeigu tai maža **ar**, pav. Gly, Ala, Ser, Cys, Met šalinamas efektyviai, jeigu po Met eina Thr, Pro, Val – šalinama blogiau. Be to, kada didelė svetimų baltymo ekspresija, peptidazės nespėja šalinti Met. Gaunamas heterogeniškas baltymas, netinkamas medicinai.

Norint gauti autentiškus baltymus, naudojamos sekrecijos į periplazmą sistemos. Sekrecijos metu, nukerpamas signalinis peptidas, kartu suformuojamas autentiškas N-galas. Be to, periplazmoje yra palanki aplinka S-S tiltelių formavimuisi. Tačiau periplazminių baltymų išeiga yra labai maža, lyginant su citoplazminių.

4. Eukarijų vektoriai

4.1. Mielų *Saccharomyces cerevisiae* vektoriai

Kepimo mielės *S.cerevisiae* dar vadinamos eukarijų *E. coli*, tai rodo jų didelį populiarumą. Mielės yra pats paprasčiausias, gerai genetiškai ištyrinėtas eukarijotinis mikroorganizmas. *S.cerevisiae* buvo pirmas eukarijotinis organizmas, kurio genomą buvo pilnai iššifruotas (1996 m.). Nežiūrint geno mažumo, mielėms būdingos visiems eukarijotams bendros savybės. Dauguma ląstelių procesų yra labai panašūs visuose eukarijotuose, ir daugelis eukarijotinės ląstelės procesų ir dėsnimų pirmiausia buvo surasta mielėse. Mielės iki šiol lieka vienu populiariausių genetikos, molekulinės biologijos ir ląstelės biologijos objektu.

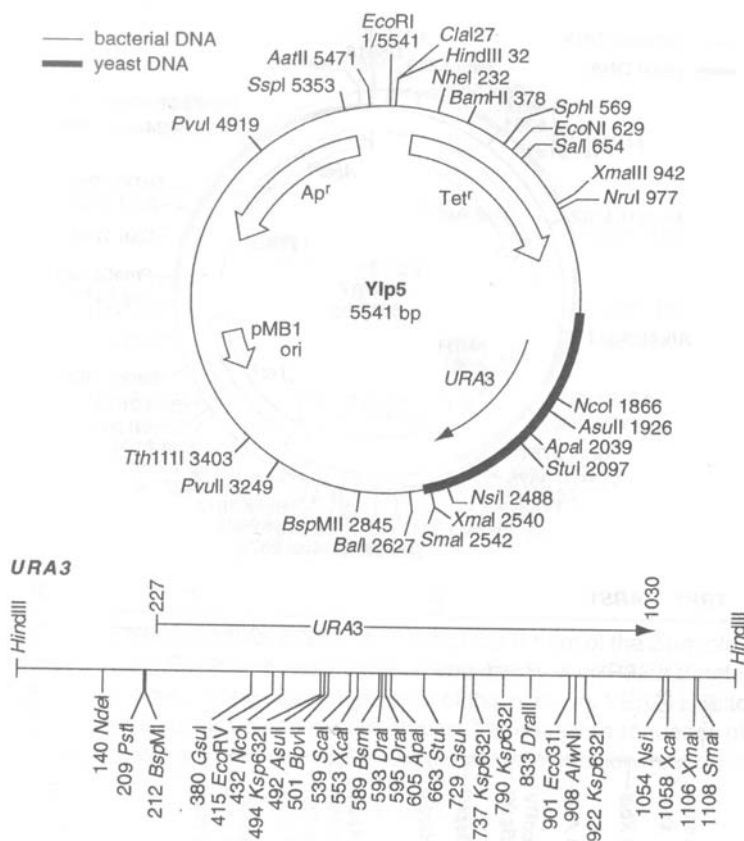
Mielų genetikos ir biologijos žinios leido greitai adaptuoti šį mikroorganizmą genų inžinerijos eksperimentams ir heterologinių baltymų gavimui. Mielės turi daug pranašumų, nes jau labai seniai naudojamos maisto pramonėje, nepatogeniškos, neturi toksinų ir pirogeninių medžiagų. Pramonėje seniai įsisavintos fermentacijos technologijos, leidžiančios gauti didelio tankio kultūras, iki 100-150g sausos biomasės iš litro kultūros. Mielės auginamos santykinai pigiose terpėse. Lyginant su prokariotais, mielės efektyviai sekretuoja baltymus į aplinką, sekrecijos sistema sėkmingai panaudota baltymų gavimui. Mielėse baltymai modifikuojami eukarijotams būdinga maniera: glikozilinami, acetilinami, efektyviai šalinamas N-metioninas, miristilinami, fosforilinami, palmitoilinami, ubikvitinilinami, vyksta proteolitinis baltymų brandinimas, formuojasi multimerai iš heterogenišku subvienetų, baltymai gana efektyviai sekretuojami į aplinką arba ląstelės struktūras. Sekrecijos ir transporto per endoplazminį tinklą ir Goldži metu formuojasi baltymų tretinė struktūra, teisingi S-S tilteliai.

Konstruojant vektorius, viena iš eukarijotinių mikroorganizmų rekombinantinių ląstelių selekcijos problemų buvo ir yra tai, kad eukarijų ląstelės yra atsparios daugeliui antibakterinių antibiotikų. Šiuo metu yra tik keletas anti-eukarijotinių antibiotikų, kuriuos galima panaudoti transformantų selekcijai. Mielų sistemose ši problema buvo išspręsta panaudojant chromosominius aminorūgščių ir nukleotidų metabolizmo genus bei gausias mielų mutantų kolekcijas. Rekombinantų selekcijai sėkmingai buvo panaudoti chromosominiai genai *LEU2*, *URA3*, *LYS2*, *TRP1*, *ADE2* ir kt. naudojant atitinkamus mielų mutantus, *leu2*, *ura3*, *lys2*, *trp1*,

ade2. Kai kurias mielių mutacijas labai lengva selekcionuoti specialiose terpėse, nes *ura3* mutantai auga terpėje su fluor-rotine rūgštimi, tuo tarpu $Ura3^+$ ląstelės neauga, *lys2* mutantai auga terpėje su α -aminoadipatu, $Lys2^+$ - neauga. *ade1*, *ade2* mutantai kaupia raudoną pigmentą, todėl jų kolonijos yra tamsiai raudonos. Apšvitinus mieles UV ir išsėjus jas ant specifinės terpės, lengva selekcionuoti reikalingus mutantus. Šiuo metu transformantų selekcijai jau gana plačiai naudojami ir cheminiai junginiai, antibiotikas G418 (geneticinas) nuo kurio apsaugo kanamicino fosfo transferazė, formaldehidas, nuo kurio apsaugo formaldehido dehidrogenazė ir keletas kitų. Visi mielių vektoriai konstruojami *E. coli* plazmidžių pagrindu, todėl vadinami bifunkciniais, nes funkcionuoja ir bakterijose, ir mielėse.

Mielių vektoriai

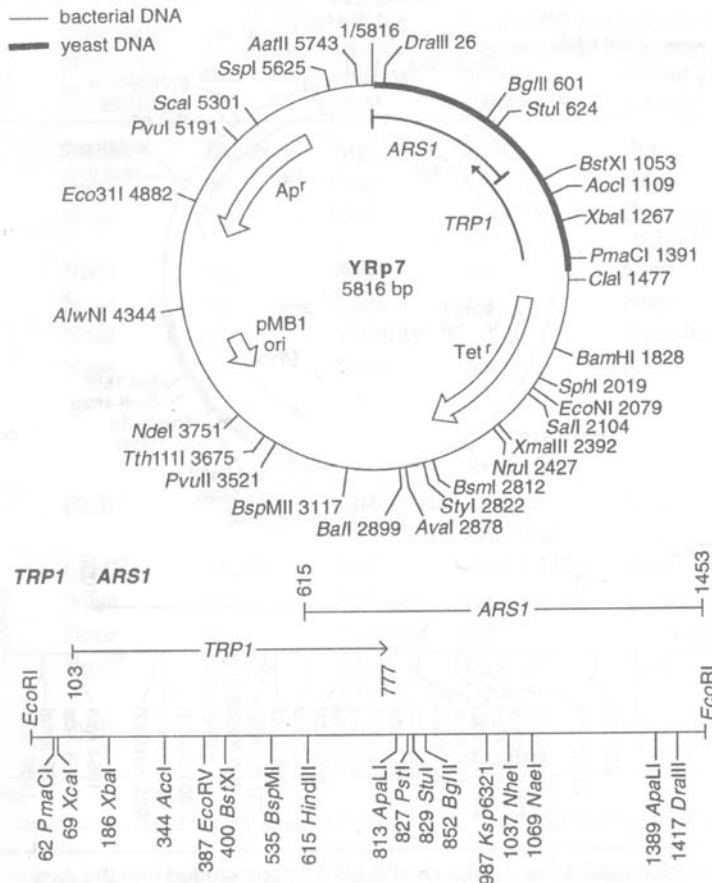
YIp plasmidės (*yeast integrating plasmids*) – vektoriai, kurie turi mielių selektyvų markerinį geną, bet neturi sekos, užtikrinančios plasmidės replikaciją mielėse. Tokiu vektoriumi galima integruoti DNR sekas į mielių genomo homologines dalis, nes mielėse *S.cerevisiae* homologinė rekombinacija vyksta labai efektyviai ir tiksliai. Homologinės integracijos efektyvumą labai padidina plasmidės linearizacija per homologines sekas. Pav. plasmidė YIp5, linearizuota per *URA3* seką (ApaI, StuI ir kt REazės) integruosis į *URA3* geno sritį.



Pav. 4.1. Integratyvinius mielių vektorius

Norint integruoti DNR fragmentą į reikalingą mielių genomo taikinį, užtenka integruojamos DNR galuose PCR pagalba įvesti 25-30nt taikiniui genome komplementarias sekas. Šiuo PCR reakcijos mišiniu transformavus mieles, dauguma išaugusių transformantų turės integruotą DNR. Integratyviniai vektoriai ir integratyvinė transformacija naudojama, kada norima įvesti į vieną iš 16 mielių *S.cerevisiae* chromosomų vieną geno kopiją. Pasirinkus taikiniu rDNR sekas arba Ty elementų DNR sekas, galima gauti daugybinę integraciją į pasikartojančius rDNR (apie 120 kopijų) ar Ty (apie 30 kopijų) genus. Kitas, labai svarbus integratyviųjų vektorių taikymas yra genų inaktyvacijai, t.y. reikiamo geno pašalinimui rekombinacijos būdu. Tam tikslui prie markerinio geno, naudojamo transformantų selekcijai, galų PCR pagalba įvedamos šalinamo geno galams komplementarios sekos. Dėka homologinės rekombinacijos, genas – taikiny s pakeičiamas markeriniu genu.

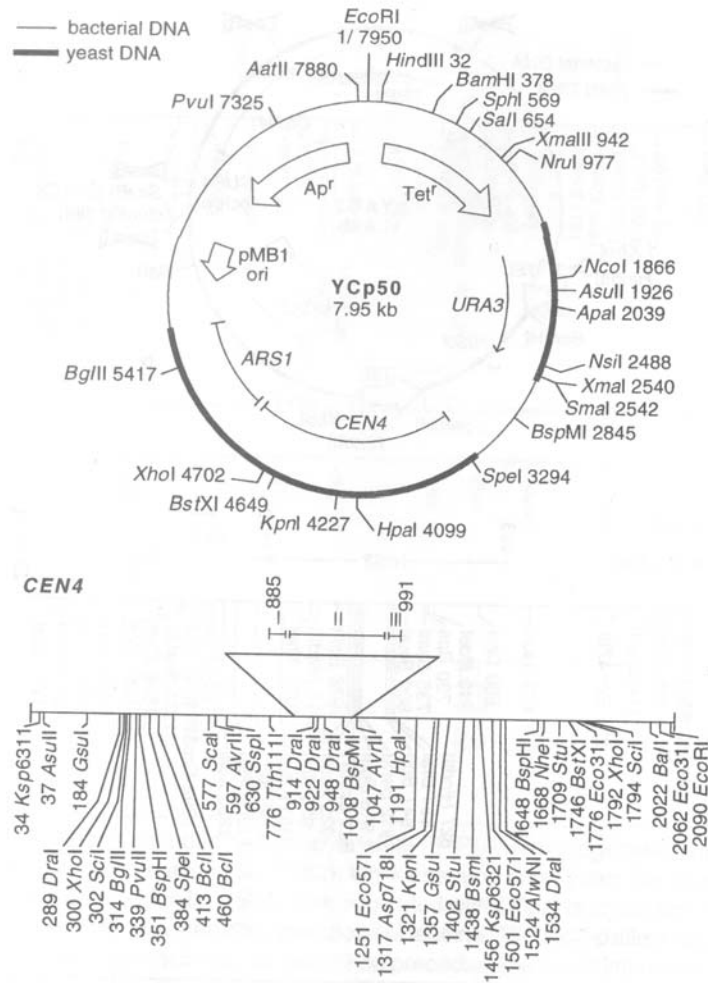
YRp plazmidės – (*yeast replicating plasmid*) turi mielių genomo fragmentą, vadinamą ARS (*autonomously replicating sequence*, ori sinonimas) seką, užtikrinančią plazmidės autonomišką replikaciją.



Pav.4.2. Replikatyvinis mielių vektorius.

Tokios plazmidės labai efektyviai transformuoja mieles, tačiau transformantai būna labai nestabilūs, per viena generaciją, apie 1%-30% (priklausomai nuo *ARS* sekos, kurių mielių genome yra apie 400) ląstelių išlaiko plazmidę, o dauguma praranda. Plazmidė prarandama tiek mejozės, tiek mitozės metu. Nestabilumo priežastis yra netolygus plazmidės pasiskirstymas tarp motininės ir dukterinės ląstelių mielių pumpuravimo metu. Kadangi šios plazmidės neturi paskirstymo tarp pumpuruojančių ląstelių mechanizmo, plazmidė lieka motininėje ląstelėje, ir tik maža dalis patenka į atsipumpuruojančią dukterinę ląstelę. Nežiūrint į tai, kad šios plazmidės replikuoja viena kartą per ląstelės ciklą, jų kopijų skaičius siekia iki 100 kopijų / plazmidę turinčiai ląstelei.

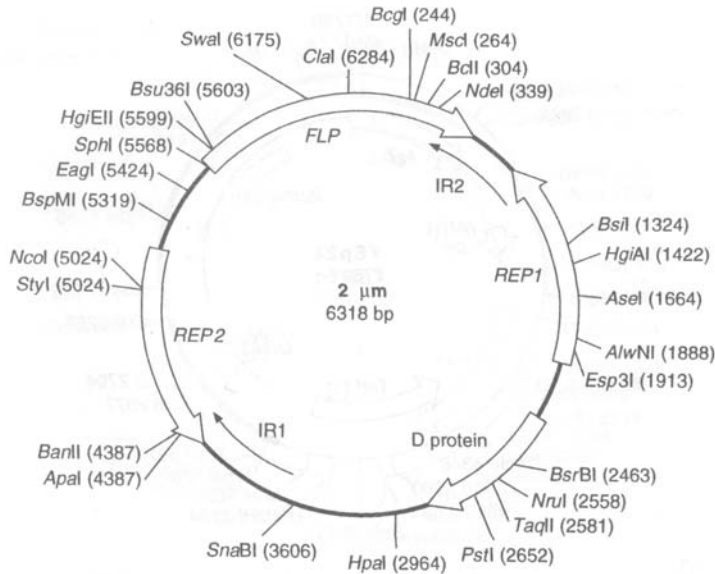
YCp plazmidės – centromeros seką turinčios plazmidės. *S.cerevisiae* centromera yra nedidelė 100-200 nt seka. Tokių sekų įjungimas į YRp plazmidės, padidina jų stabilumą iki 99% ir daugiau, tačiau kopijų skaičius sumažėja iki 1-2 plazmidžių / ląstelei. Tokios plazmidės elgiasi kaip minichromosomos, savo elgesiu imituoja chromosomas, mejozėje segreguoja santykiu 2⁺:2⁻.



Pav. 4.3. Centromerinis vektorius.

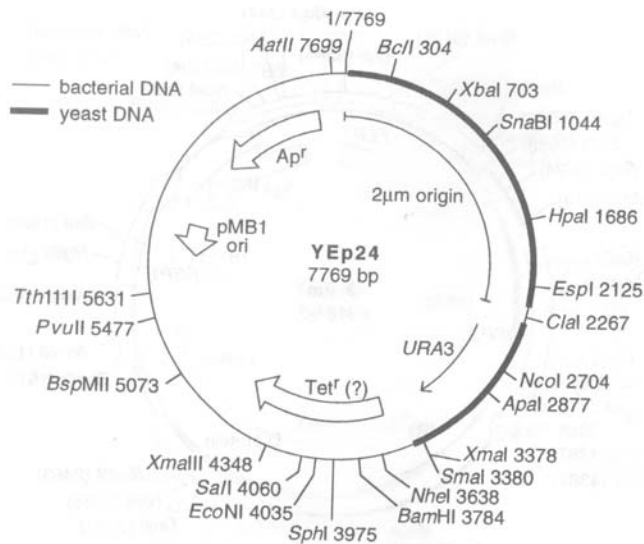
YEp episominės plazmidės sukurtos panaudojant mielių taip vadinamą $2\mu\text{m}$ plazmidę, randamą daugumoje mielių kamienų. Episoma – anksčiau naudotas plazmidės sinonimas. Ši plazmidė užtikrina plazmidžių autonomišką replikaciją, bei pakankamą stabilumą (apie 96%). Šie vektoriai daugiausiai naudojami heterologinių baltymų gavimui, nes vektorių stabilumas ir didelis kopijų skaičius (iki 50/ląstelėi), bei efektyvūs promotoriai užtikrina efektyvią genų raišką, leidžiančią gauti gana didelius heterologinių baltymų kiekius.

$2\mu\text{m}$ plazmidė priklauso vadinamai egoistinių DNR klasei (angl. *selfish DNA*). Ši DNR neturi jokių žinomų funkcijų ląstelėje, o jos struktūra užtikrina plazmidės stabilų palaikymą mielių ląstelėse. Šios plazmidės pasižymi dideliu stabilumu, prarandamos nedideliu dažnumu - apie 10^{-3} per generaciją.



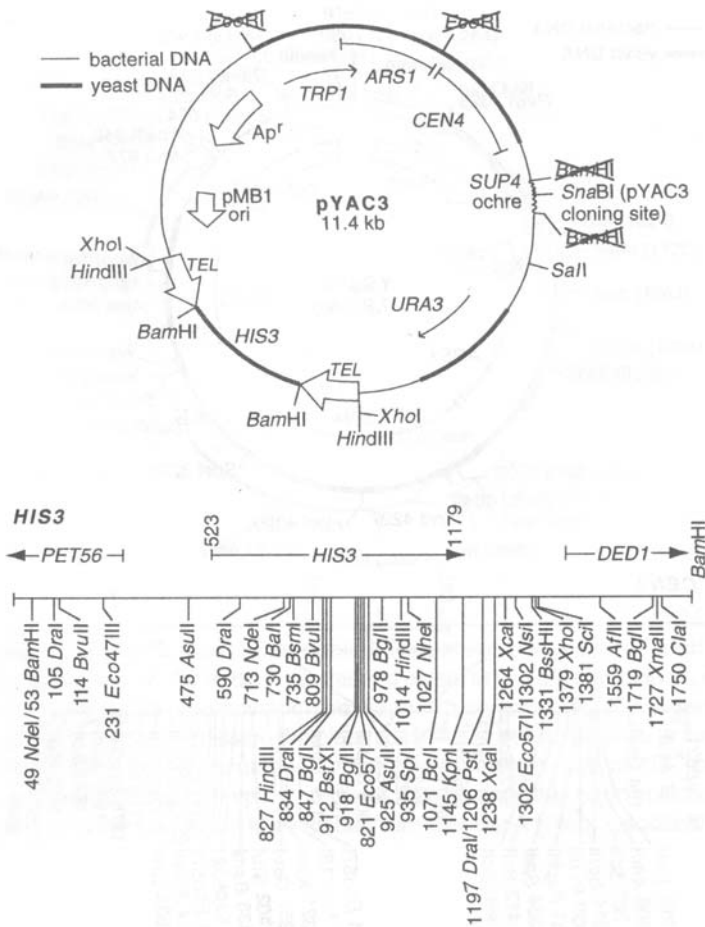
Pav. 4.4. Mielių 2 μ m plazmidė

2 μ m plazmidė koduoja tris baltymus (REP1, REP2, D), užtikrinančius plazmidės tolygų padalijimą tarp motininės ir dukterinės ląstelių, bei turi geną *FLP*, koduojantį specifinę rekombinazę, atliekančią pastovią plazmidžių rekombinaciją per dvi homologiškas invertuotas sekas (IR1 ir IR2). Tokiu būdu ląstelėje visada randamos dvi plazmidės formos, A ir B, besiskiriančios tarp IR1 ir IR2 esančių sekų orientacija. Šios plazmidės kopijų skaičius yra apie 50 plazmidžių / ląstelėje.



Pav. 4.5. Mielių episominis vektorius.

YAC – paskutinė mielių vektorių klasė – **dirbtinės chromosomos** (*yeast artificial chromosome*).



Pav. 4.6. Mielių plazmidės, kurios pagalba kuriama dirbtinė chromosoma, schema

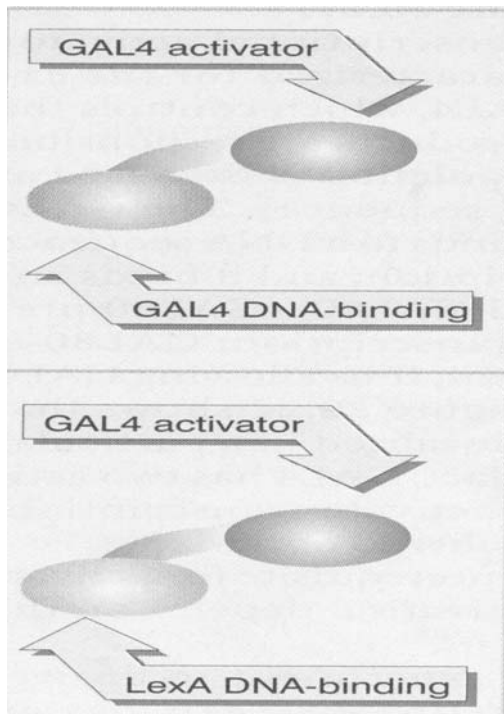
Pabandžius imituoti chromosomos struktūrą, t.y. į linijinę plazmidę patalpinus visus chromosomos atributus, centromeros seką CEN, galuose telomerų sekas TEL, ARS seką ir genetinių markerių selekcijai, pasirodė, kad tokia linijinė struktūra mielėse yra labai nestabili. Tačiau netikėtai paaiškėjo, kad tokios struktūros stabilumas didėja, įterpiant papildomas DNR sekas, t.y. didinant DNR kieki. Linijinės plazmidės, pasiekusios 100 kb dydį tampa pakankamai stabiliomis. YAC talpa siekia 1 Mb, tačiau stabilumas priklauso ir nuo sekų prigimties. YAC naudojami didelių genomų genų bibliotekų konstravimui.

Reikia pabrėžti, kad visi mielių vektoriai yra sukurti naudojant *E. coli* vektorius, įjungiant į šiuos vektorius mielių sistemai reikalingus elementus. Plazmidžių dauginimas, bei visos konstravimo manipuliacijos atliekamos bakterijose *E. coli*.

4.1.2. Mielių dviejų hibridų sistema baltymų tarpusavio sąveikai tirti

Mielių *S.cerevisiae* dviejų hibridų metodas, sukurtas S. Fields ir bendradarbių (Bartel ir kt., 1993; Chien ir kt., 1991; Fields ir Song, 1989; Fritzz ir kt., 1992; Guarante, 1993) yra genetinis metodas, leidžiantis nustatyti baltymų tarpusavio sąveikas *in vivo*. Mielių dviejų hibridų metodas turi daug pranašumų, lyginant su kitais baltymų tarpusavio sąveikos tyrimo metodais (baltymų afininė chromatografija, imunoprecipitacija, baltymų kovalentinis surišimas). Šis metodas ne tik įgalina nustatyti sąveikaujančius baltymus, bet kartu ir atrenka klonuotus šių baltymų genus. Be to, dviejų hibridų metodu galima aptikti ir silpnas bei trumpalaikes baltymų sąveikas, būdingas dideliems ląstelės baltymų kompleksams. Dviejų hibridų sistemoje nereikalinga išgryninti tiriamus baltymus, nereikalingi ir antikūnai prieš šiuos baltymus. Kadangi tyrimas atliekamas *in vivo*, yra didesnė tikimybė, kad tiriami baltymai bus savo natūralioje, aktyvioje konformacijoje. Dviejų hibridų metodas gali būti pritaikytas dviejų žinomų baltymų (t.y. baltymų, kurių genus mes turime arba galime turėti) tarpusavio sąveikai nustatyti. Parodžius, kad du baltymai sąveikauja dviejų hibridų sistemoje, galima atlikti detalesnę analizę sričių, tiesiogiai dalyvaujančių sąveikoje, nustatymui. Kitas svarbus dviejų hibridų metodo pritaikymas – iš dviejų hibridų genų bibliotekos surasti genus, koduojančius baltymus, sąveikaujančius su tiriamuoju baltymu.

Daugelis eukarijotinių transkripcijos faktorių, indukuojančių transkripciją, yra sudaryti iš fiziškai atskiriamų, funkciškai nepriklausomų domenų. Visi transkripcijos faktoriai turi DNR surišantį domeną (angl. *DNA-BD* – *binding domain*), kuris rišasi su specifine promotoriaus seka, ir aktyvinantį domeną (angl. *AD* – *activating domain*), kuris sąveikauja su RNR polimerazės II kompleksu, nukreipdamas jį šalia esančio geno nuskaitymui. Abu domenai yra reikalingi genų aktyvinimui ir visada randami viename polipeptide. Pavyzdžiu gali būti mielių *GAL4* transkripcijos faktorius.



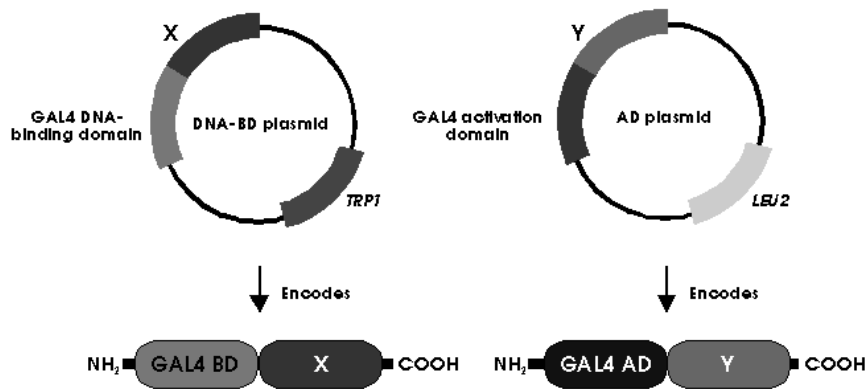
Pav. 4.7. Mielių dviejų hibridų sistemos principas

Jeigu modifikuosime GAL4 geną, DNR surišimo domeną koduojančią dalį pakeisdami bakterijų transkripcijos faktoriaus LexA DNR surišančiu domeno koduojančia dalimi, toks hibridinis transkripcijos faktorius mielėse aktyvuos promotorius, kuriuose bus įvesta LexA susirišimo seka. Tai rodo, kad DNR surišantis domenas ir aktyvuojantis domenas veikia visiškai nepriklausomai.

Naudojant genų inžinerijos metodus, šiuos domenus galima fiziškai atskirti ir nepriklausomai sintetinti vienoje ląstelėje. Fiziškai atskirti, DNA-BD ir AD peptidai tiesiogiai nesąveikauja tarpusavyje ir todėl transkripcijos neaktyvina, tačiau DNA-DB domenas susiriša su jam būdingu promotoriumi. Tačiau jeigu AD peptidas koku nors būdu prijungiamas prie DNA-BD peptido, sąveikaujančio su promotoriumi, susiformavęs kompleksas sugeba aktyvuoti transkripciją. Eksperimentai parodė, kad bet kuris AD domenas gali būti suporuotas su bet kuriuo DNA-BD domenu ir gali aktyvuoti geno, prie kurio rišasi DNA-BD domenas, transkripciją.

Jeigu prie DB domeno geno, sąveikaujančio su promotoriaus specifine DNR seka, prijungsime geną X koduojančią seką, o prie aktyvuojančio domeno koduojančios sekos prijungsime Y baltymą koduojančią seką, jeigu X ir Y baltymai tarpusavyje sąveikauja, per šią baltymas – baltymas sąveiką susiformuos ryšys tarp BD ir AD, tai yra susiformuos transkripcijos faktorius, atvedantis RNRPolII

kompleksą į promotorių in inicijuojantis transkripciją. Norint tokiu būdu tirti baltymų sąveiką, sukurti specialūs vektoriai, vienas skirtas tiriamo baltymo geno X (“masalo”) suliejimui su BD, kitas tiriamo baltymo geno Y (“aukos”) suliejimui su AD.

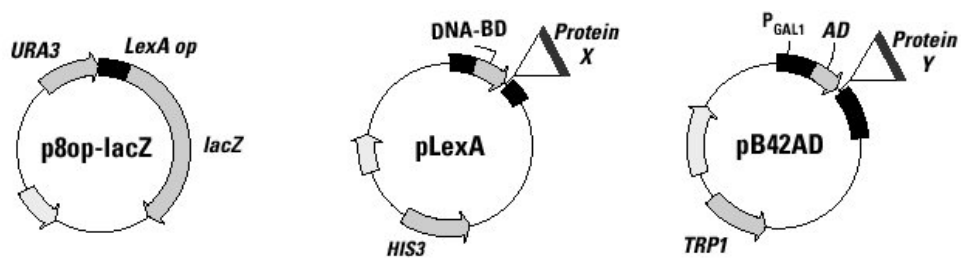


Pav. 4.8. DNA-BD ir AD plazmidžių pavyzdžiai su sukonstruotais sulietais baltymais

Gali būti sukonstruota visa sulietų su AD genų arba kDNR biblioteka, skirta naujų dar nežinomų baltymų sąveikaujančių su “masalu”, paieškai. Įvykus sąveikai tarp “masalo” X ir baltymo Y, du funkciniai domenai, atsakingi už DNR surišimą ir transkripcijos aktyvaciją, surišami, atstatant transkripcijos aktyvacijos funkciją. Kadangi šie du hibridai yra mielių kamienų ląstelėse, turinčiose patogius reporterinius genus (pvz. *E. coli lacZ*, mielių *HIS3* ar *LEU2* genus), prieš kurių promotorius yra DNA-BD domeno surišimo sekos, reporterinių genų išraiška parodo sąveiką tarp “masalo” ir kito hibridinio baltymo (“aukos”).

Siekiant išvengti nereikalingos transkripcijos faktorių sąveikos su visais jų indukuojamų genų promotoriais (pav. *GAL4* aktyvina *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *MEL1* genų transkripciją), dviejų-hibridų sistemoms naudojami hibridiniai transkripcijos faktoriai, kombinuojant bakterijų DB domeną ir mielių AD. Pav. populiarioje komercinėje Clontech MATCHMAKER sistemoje, BD domenas paimtas iš prokarijotinio LexA baltymo, kurio įprastinė funkcija yra SOS genų represija *E. coli* ląstelėse, sąveikaujant su *lexA* geno operatoriaus seka. AD domenas yra 88

aminorūgščių rūgštinis peptidas, aktyvuojantis transkripciją mielėse. Šioje sistemoje naudojami du skirtingi klonavimo vektoriai (pLexA ir pB42AD) skirti genų, koduojančių potencialiai sąveikaujančius tarpusavyje baltymus, suliejimui su minėtais domenais ir tolesnei hibridinių baltymų sintezei mielėse. Tarp baltymo- masalo (tiriamas baltymas, sulietas su BD domenu) ir genų bibliotekos koduojamo baltymo (arba kito tiriamo baltymo -aukos, sulieto su AD domenu) esanti sąveika sukuria naują transkripcijos aktyvatorių, sugebantį susirišti su LexA operatoriumi. Tuomet šis faktorius aktyvina sukonstruotų reporterinių genų, turinčių *lexA* geno operatoriaus sekas promotoriuje, transkripciją. Tokiu būdu baltymų sąveikai suteikiama fenotipinė išraiška – lengvai testuojamo geno transkripcija. Jeigu du hibridiniai baltymai nesąveikauja vienas su kitu, reporteriniai genai nėra nuskaitomi ir nesuteikia mielių ląstelėms naujų fenotipinių požymių. MATCHMAKER LexA sistema naudoja du skirtingus reporterinius genus (*LEU2* ir *lacZ*), reguliuojamus keletu *lexA* operatorių. Šių genų promotoriai skiriasi sekomis, supančiomis *lexA* operatorius ir tai leidžia atmesti teigiamus pagal vieną požymį transformantus, kuriuose aktyvuojantis hibridas tiesiogiai rišasi su promotoriaus seka, esančia šalia *lexA* operatoriaus. Integruotas į ląstelės genomą *LEU2* genas leidžia *Leu*⁻ auktotrofiniam mielių kamienui augti ant SD indukuojančios terpės be leucino, tuo atveju, jeigu plazmidėse yra klonuoti tarpusavyje sąveikaujančius baltymus koduojantys genai. Dėka baltymų sąveikos aktyvintus *lacZ* geno, esančio plazmidėje p8op-*lacZ*, transkripciją, ląstelės pradeda gaminti fermentą β-galaktozidazę, kurios aktyvumas gali būti matuojamas keliais skirtingais metodais. Matuojant šio fermento aktyvumą tirpale, suardžius mielių ląsteles, galima gauti kiekybinį įvertinimą, kuris leidžia palyginti kelių hibridų porų sąveikos santykinį stiprumą.

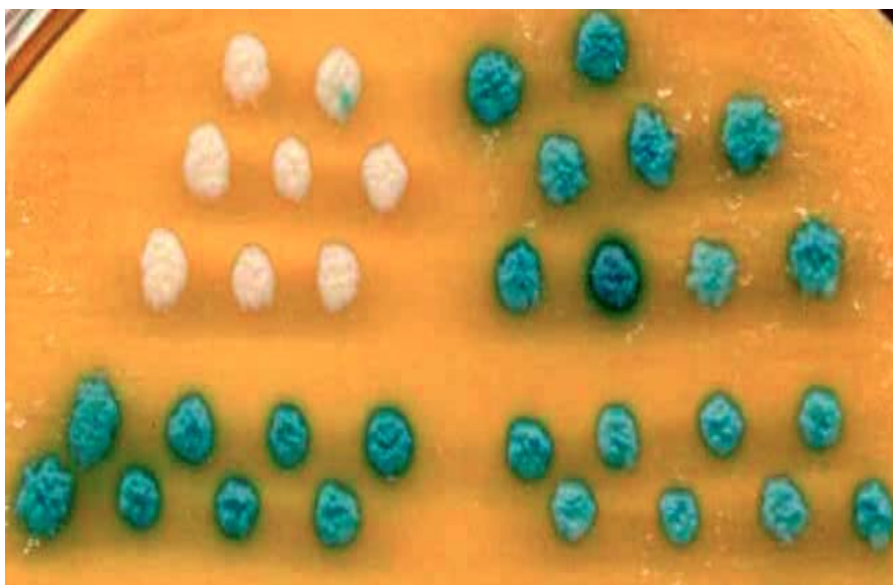


Pav. 4.9. Plazmidės, naudojamos MATCHMAKER LexA dviejų hibridų sistemoje.

Tokiu būdu, tiriant dviejų baltymų sąveiką, pirmiausia tikrinama, ar X ir Y baltymų sąveika aktyvina *LEU2* geno transkripciją, t.y. ar transformantai auga ant terpės be leucino. Po to, augantys be leucino transformantai papildomai tikrinami, ar X-Y sąveika aktyvina *lacZ* transkripciją. Dvigubas tikrinimas padeda išvengti artefaktų, susijusių su hibridinio baltymo sąveika su sekomis greta operatoriaus.

Sąveikos nėra

Sąveika yra



Pav. 4.10. Baltymų sąveikos tyrimas mielių dviejų hibridų sistemoje.

4.2. Bakulovirusų genų raiškos sistemos

Bakulovirusai yra vabzdžių virusai, infekuoją *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera* ir kt. vabzdžių lervos. Labiausiai vabzdžiai jautrūs šiems virusams yra lervų stadijoje. Kartais tai šie virusai buvo naudojami kaip biologiniai pesticidai, apsaugoti augalus nuo lervų. Šie virusai buvo labai gerai ištyrinėti, nes jie yra šilkverpių lervų parazitai, beto, buvo naudojami biologiniais pesticidais. Bakulovirusų genomą sudaro dvigrandė uždara DNR, nuo 80 iki 150bp, priklausomai nuo rūšies. Po replikacijos viruso genomus supakuojamas Arg turtingais viruso baltymais ir suformuoja nukleokapsidą. Nukleokapsidas patalpinamas į lipoproteino apvalkalą ir suformuoja virusinę dalelę, kuri toliau patalpinama į kristalinę matriksą - polihedrą, sudarytą iš viruso koduojamo p30 (apie 30kDa) baltymo. Šios visos struktūros yra gana didelės ir nesunkiai matomos paprastu mikroskopu. Į vieną matriksą gali įeiti nuo vieno iki keturių nukleokapsidų, priklausomai nuo viruso rūšies. Matriksas apsaugo virusą nuo nepalankių sąlygų gamtoje. Virusas išplatina paukščiai. Paukščiui sulesus infekuotą lervą, virusas, dėka matriksą, nežūsta paukščio virškinimo trakte, o iškeliauja į gamtą. Bakulovirusams su paukščių išmatomis pakliuvus ant augalo lapų, juos suėda vabzdžių lervos. Vabzdžio virškinimo traktas pasižymi šarminėmis aplinka, palankia matriksą suirimui ir nukleokapsido atsipalaidavimui. Nukleokapsidas keliauja į branduolį, ten replikuojamas ir pakuojamas į lipoproteinus. Lipoproteininės struktūros padeda nukleokapsidui keliauti per membranų struktūras iš vienos ląstelės į kitą ir toliau replikuotis kitose ląstelėse. Maždaug po 24 val. dauginimosi, pagrindinę infekuotos lervos masę sudaro virusai.

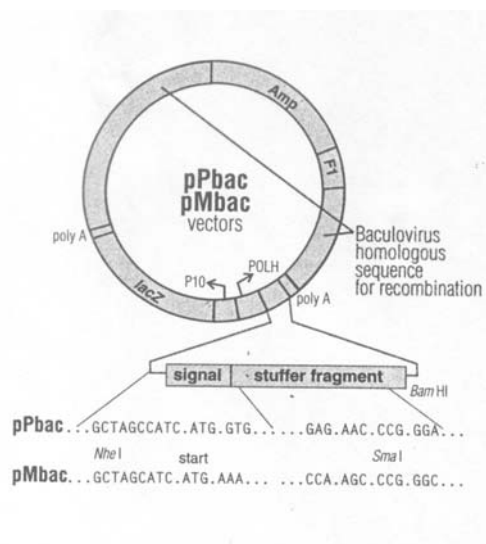
Kaip šie virusai pritaikomi vektoriais įvairių baltymų gamybai? Virusai šiuo metu dažniausiai dauginami ne lervose, o lervų audinių kultūrose. Populiariausios audinių kultūros kilę iš vabzdžių *Spodoptera frugiperda*, *Autographa californica* ir kt. (Sf9 linija, Sf21 linija ir kt.). Šios audinių kultūros auga greitai, nėra reiklios mitybinėms terpėms, joms nereikia CO₂ aplinkos. Norint ląsteles infekuoti virusu, virusas paveikiamas šarmu, pašalinamas matriksas, tada ląstelės endocituoja virusą. Geriausiai ištirti yra šilkverpių *Bombyx mori* bei Kalifornijos liucernos virusai. Jų pagrindu ir kuriami vektoriai.

Vėlyvose viruso vystymosi stadijose intensyviai sintetinami vėlyvieji baltymai, p10 ir p30, jie sudaro apie 50% visų viruso sintetinamų baltymų. p30

koduoja matrikso baltymą. *In vivo* šie abu baltymai nėra reikalingi, virusas vystosi ir be jų, todėl šių baltymų genus galima pakeisti, panaudojant jų stiprius promotorius svetimų genų transkripcijai.

Kokiu būdu pakeičiami genai bakuloviruso genome? Bakulovirusuose pakankamai tiksliai veikia homologinė rekombinacija. Todėl bet kurią norimą genomo dalį galima pakeisti, įstatant norimą geną *in vivo*. Tam tikslui *E. coli* sistemose konstruojamos plazmidės, savo sudėtyje turinčios geną, kurį norime įvesti į bakuloviruso genomą, prijungtą prie bakuloviruso promotoriaus (dažniausiai p30 geno) ir transkripcijos terminatoriaus. Ši ekspresijos kasetė patalpinama tarp bakuloviruso sekų, per kurias turėtų vykti homologinė rekombinacija. Jeigu norime savo konstrukciją integruoti vietoje p30 geno, ją patalpiname tarp p30 geną supančių genų sekų. Transfekavus su tokia DNR lervų ląstelių kultūrą, infekuotą virusu, vyks rekombinacija tarp homologiškų viruso DNR sekų, to pasekoje, sukonstruotas fragmentas įsijungs į viruso genomą. Pradžioje rekombinantinius virusus turinčios ląstelės, t.y. tos ląstelės, kuriose įvyko rekombinacija ir susiformavo rekombinantinis virusas buvo atrenkamos rūšiuojant ląsteles mikroskopu, mikromanipulatoriaus pagalba atrenkant tas ląsteles, kuriose nesiformuoja viruso kristalinė matrikso struktūra, nes rekombinantiniuose virusuose, dėka rekombinacijos, buvo pašalintas p30 genas. Vėliau buvo sukurtos žymiai patogesnės sistemos, leidžiančios rebinantinius virusus turinčias ląsteles atrinkti pagal spalvą. Tam tikslui sukonstruoti virusai, pakeitimo vietoje turintys *lacZ* geną. Virusai patalpinami į BAC, todėl visas manipuliacijas galima atlikti *E. coli*. Įvedus į BAC struktūroje turinčias bakuloviruso genomą ląsteles norimą konstrukciją, dėka homologinės rekombinacijos, pakeičiamas *lacZ* genas, rekombinantinės ląstelės formuoja bespalves kolonijas. Arba atvirkščiai, kartu su ekspresijos kasete į BAC įvedamas ir *lacZ* genas, atrenkamos nusidažę kolonijos. Iš šių kolonijų išskirta BAC transfekuojamos lervų audinių kultūros, jose formuojasi ir dauginasi virusas, kartu labai intensyviai sintetinamas tikslinis baltymas. Tokiu būdu, homologinę rekombinaciją galima atlikti tiek lervų ląstelėse, tiek bakterijose.

Kokie bakulovirusų ekspresijos sistemų privalumai? Vabzdžių lervų kultūros – eukarijotinės ląstelės, joms būdingos visos eukarijotams specifinės modifikacijos, todėl baltymai gaunami modifikuoti, funkciškai aktyvūs ir kas svarbiausia, gana dideli jų kiekiai.



Pav. 4.11. Bakulovirusų vektorių pavyzdys

Invitrogen platinamo vektorių **pPbac** schema. Klonuojamas genas patalpinamas prie **POLH** (polihedrinis – p30). Norint, kad baltymas būtų sekretuojamas, prijungiamas prie signalinės sekos. Plazmidėje, be konstruojamos ekspresijos kasetės, yra **lacZ** genas, kontroliuojamas bakuloviruso **p10** promotoriaus, rekombinantinėms lervų ląstelėms suteikiantis spalvą. Rodyklė rodo kasetę supančias bakuloviruso sekas, per kurias įvyksta homologinė rekombinacija su atitinkamomis sekomis viruso genome. Tokia plazmidė įvedama į vabzdžių lervų ląsteles, infekuotas bakulovirusu arba turinčias bakuloviruso genoma **BAC** arba **PAC** sudėtyje. Kadangi bakterijų plazmidė nesireplikuoja lervų ląstelėse, **Lac Z** sistema, suteikianti ląstelėms spalvą indikatorinėje terpėje atsiranda tik tose ląstelėse, kuriose įvyko homologinė rekombinacija tarp įvestos plazmidės ir bakuloviruso sekų. Tokios ląstelės atrenkamos ir auginamos fermentatoriuose.

4.3. *Vaccinia* viruso vektoriai

Raupų virusai priklauso *Poxviridea* šeimai, *Orthopoxvirus* genčiai, ir yra vieni iš didžiausių ir sudėtingiausių virusų. Šios šeimos atstovas *variola* virusas yra žmogaus raupų sukėlėjas, o vėjaraupius sukelia visiškai skirtingas virusas – *herpesviridea* šeimos virusas *varicella*. *Vaccinia* virusas ilgą laiką buvo naudojamas žmonių vakcinacijai prieš raupus (gyva vakcina, JAV naudota iki 1972 metų).

Vaccinia (*vacca* – karvė) virusai replikuojasi citoplazmoje, todėl turi savo, nuo šeimininko nepriklausomas replikacijos ir transkripcijos sistemas. Kadangi *Vaccinia* virusas naudojamas vakcinacijai prieš raupus, bei yra vienas iš pirmų virusų, pradėtų auginti ląstelių kultūrose, šis virusas labiausiai ištirtas tarp *Poxvirus* šeimos atstovų. Genomą sudaro linijinė, dvigrandė, apie 200 kb DNR, suformuojanti linijinį dupleksą su segtuko formos kilpomis galuose. Paplitę laboratoriniai kamieniai turi invertuotus 10 kb pasikartojimus galuose, šie pasikartojimai duplikuoja 4 viruso genus. Virusų dalelė – virionas sudarytas iš sudėtingos viruso šerdies, supakuojančios genomą, bei supančio lipoproteininio paviršiaus. Virusų šerdyje supakuojami visi baltymai, reikalingi viruso transkripcijai, nes virusas dauginasi citoplazmoje. Ankstyvoji transkripcija, prasidedanti virusui patekus į ląstelę ir yra sąlygojama viruso atsinešamų baltymų. Virusų mRNR yra uždedama kepurė, kuri yra metilinama, po to mRNR yra poli-adenilinama. Visas šias mRNR modifikacijas atlieka viruso koduojami baltymai. Replikacija prasideda praėjus kelioms valandoms po infekcijos. Skaitant vėlyvuosius genus, viruso RNRPol nebeatpažįsta ankstyviems genams būdingų terminacijos signalų UUUUUNU. Todėl vėlesni transkriptai skiriasi nuo ankstyvųjų, vėlyva mRNR yra ilga ir heterogeniška, **5'-gale** randama poliA seka, susidedanti iš maždaug 35 nt. Manoma, kad ši seka atsiranda dėl viruso RNR Pol praslydimo, skaitant konservatyvią AAA seką transkripcijos starto taške.

Vaccinia virusas gali infekuoti daugumą žinduolių ir paukščių ląstelių, su keliomis išimtimis (CHO). Laboratorijose paplitęs *Vaccinia* viruso kamienas Ankara yra šeimininko modifikuotas, replikuojasi tik viščiukų embrijonų fibroblastuose, bet gali infekuoti ir produkuoti baltymus daugumoje ląstelių. Šeimininko modifikuoti (susilpninti – *attenuated*) virusai naudojami vakcinų prieš raupus ruošimui. *Vaccinia* viruso infekcija labai greitai sustabdo šeimininko ląstelės NR ir baltymų sintezę.

Ląstelėje ima dominuoti viruso baltymai, tame tarpe rekombinantiniai, jeigu virusas buvo modifikuotas.

Vaccinia vektoriai dažniausiai naudojami kDNR raiškai. Geno kDNR prijungiama prie viruso promotoriaus. Virusų promotorių naudojimas yra būtinas, nes *Vaccinia* viruso RNR polimerazė atpažįsta tik virusinius promotorius. Ekspresijos kasetė į viruso genomą įvedama rekombinacijos būdu. Tradicinis genų įterpimo taikinytis yra TK genas, kuris nėra būtinas viruso vystymuisi. Virusų TK fosforina ir tuo pačiu aktyvina kai kuriuos nukleotidų analogus – BrdU – 5-bromdeoksiuridiną, ganciklovirą. Šių junginių įjungimas į genomą yra letalus, todėl, ląstelės, kuriose neįvyko homologinė rekombinacija tarp viruso genomo ir kasetės, žūsta terpėje su BrdU ar gancikloviru, o išgyvena ląstelės, turinčios rekombinantinį virusą. Šiuo metu sukurtos ir kitos selekcijos sistemos, paremtos lacZ geno produkto – β -galaktozidazės testavimu. Kita alternatyva – su ekspresijos kasete įvedamas genas, užtikrinantis atsparumą antibiotikams. Terpėje su antibiotiku išauga tik ląstelės, turinčios rekombinantinį virusą.

Šis virusas ilgą laiką buvo naudojamas gyvų vakcinų kūrimui. Tačiau šiuo metu gyvų vakcinų pilnai atsisakoma, paaiškėjus, kad imunodeficito sąlygomis, bet koks virusas tampa pavojingu.

Vaccinia viruso vektoriai sėkmingai naudojami rekombinantinių baltymų gavimui žinduolių ląstelėse. Kuri laiką šio tipo vektorių panaudojimą apribojo stiprių vakcinia viruso promotorių trūkumas. Ši problema buvo sėkmingai išspręsta panaudojus T7 bakteriofago RNR polimerazę ir T7 bakteriofago promotorius. Paaiškėjo, kad T7 polimerazė, sintetinama žinduolių ląstelių citoplazmoje, suranda specifinius promotorius ir efektyviai inicijuoja transkripciją. Tokiu būdu pavyko išspręsti transkripcijos problemą. Išsprendus transkripcijos problemas, paaiškėjo, kad viruso kepavimo sistema nėra pajėgi modifikuoti visus transkriptus, todėl jie neefektyviai transliuojami. Šiai problemai išspręsti naudojami virusų IRES sekos (*internal ribosome entry site*). Eilė citoplazminių virusų (poliovirusas, EMCV, HCV) prieš genus koduojančią dalį turi sudėtingą 300-600 nt ilgio seką, kuri suformuoja struktūrą, susirišančią su ribosomomis ir užtikrinančią efektyvią tokios mRNR transliaciją. IRES sekos šiems virusams pakeičia CAP struktūrą. IRES sekų įvedimas tarp promotoriaus ir geno koduojamos dalies užtikrina efektyvią formuojamos mRNR transliaciją.

4.4. SV40 viruso pagrindu sukurti vektoriai

Aukštesniuosiuose eukarijotuose prokariotinių plazmidžių analogų nerasta, todėl konstruojant vektorius naudojami virusų replikonai.

Vienas tokių gerai ištirtų virusų yra *Polyomaviridea* šeimos atstovas, beždžionių onkovirusas SV40. Jo genomą sudaro 5.2 kb žiedinė, dvigrandė DNR.

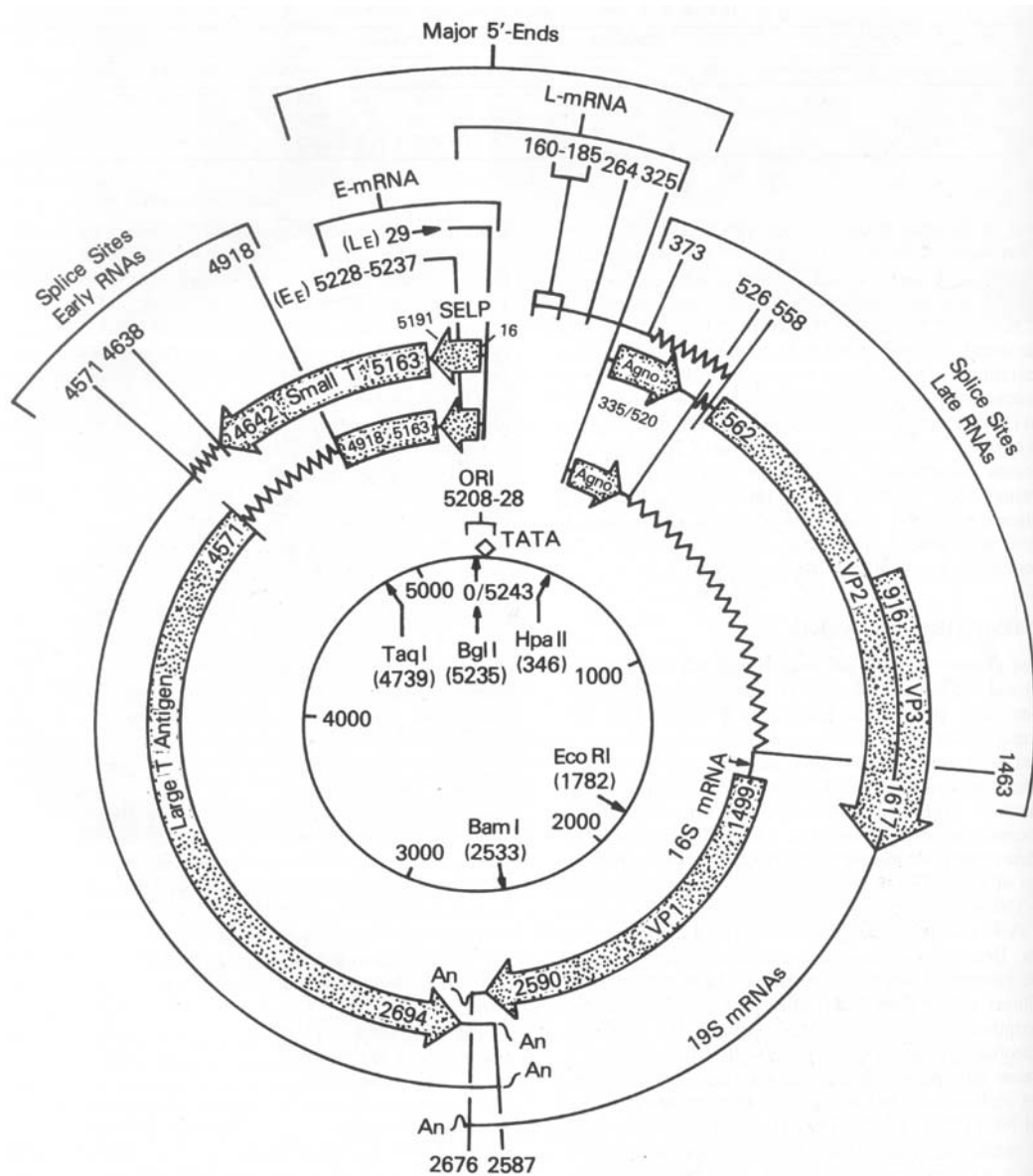


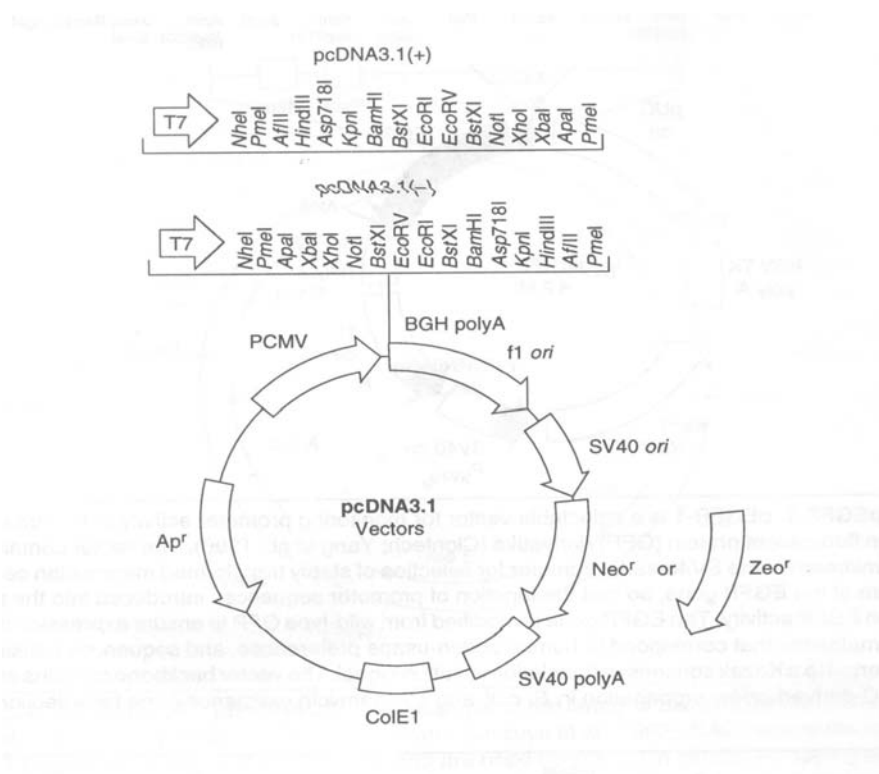
FIG. 2. Genomic organization of SV40 and mouse polyoma virus. A: SV40. The origin of replication and transcriptional regulatory region is at the top. The early region extends counterclockwise and the late region clockwise from the top. The regions encoding viral proteins are shaded. Also shown are the nucleotide positions for the 5' and 3' ends of viral mRNAs and the positions of introns. (From ref. 26, with permission).

Pav. 4.12. SV40 viruso schema

Viruso genomas koduoja 6 baltymus, ankstyvieji genai – didįjį T ir mažąjį T antigenus (*T-tumour*), reikalingus replikacijai. Nepermissyvinėmis replikacijai

sąlygomis (auginant kitame šeimininke, pav. graužikuose), viruso genomas nesireplikuoja, bet gali integruotis į šeimininko genomą. T antigenų raiška integruotame genome, sukelia ląstelės transformaciją. Didysis T antigenas atpažįsta viruso ori seką, atlieka helikazės funkciją – perskiria grandines, atveda α -DNRPol. Be to, T-antigenas auto-reguliuoja ankstyvųjų genų transkripciją. Abu T antigenai turi bendrą N-galą, bet skirtingą C-galą. Mažasis T-antigenas stimuliuoja G1 fazę, stiprina viruso transformacines savybes. T antigenai stimuliuoja replikacijai reikalingų infekuotos ląstelės baltymų sintezę, aktyvina ląstelės ciklą. Vėlyvi genai koduoja paviršiaus baltymus VP1, VP2 ir VP3, bei mažą *agno* baltymą, kurio funkcija nežinoma. SV40 ori sekos šerdį sudaro 64 bp (5209-29 nt), kartu su pagalbinėmis sekomis, ori sudaro (5164 – 72 nt) 151 bp (visas genomas 5243 bp).

Panaudojant viruso ori buvo sukurti vektoriai, skirti laikinai ekspresijai. Jie sudaryti iš bakterijų plazmidės bei SV40 ori sekos. Tokie vektoriai skirti laikinai ekspresijai įvairių audinių kultūrose.



Pav. 4.13. SV40 vektoriaus schema.

Vektorius pcDNA3.1 turi SV40 ori, citomegalo viruso promotorių (PCMV), jaučio augimo hormono geno poliA seką (BGH polyA), neo ar zeo genetinį žymenį selekcijai, prijungtą prie SV40 poliA sekos, bei bakterijų plazmidės atributus (Ap,

ori). Kartais į vektorių nekoduojamą dalį įjungiamas intronas su splaisingo taikiniai. Pademonstruota, kad, įjungus introną, kai kurių (bet ne visų) genų ekspresija žinduolių ląstelėse padidėja net 100 kartų. Padidėjimo priežastys aiškinamos mRNR stabilumo padidėjimu.

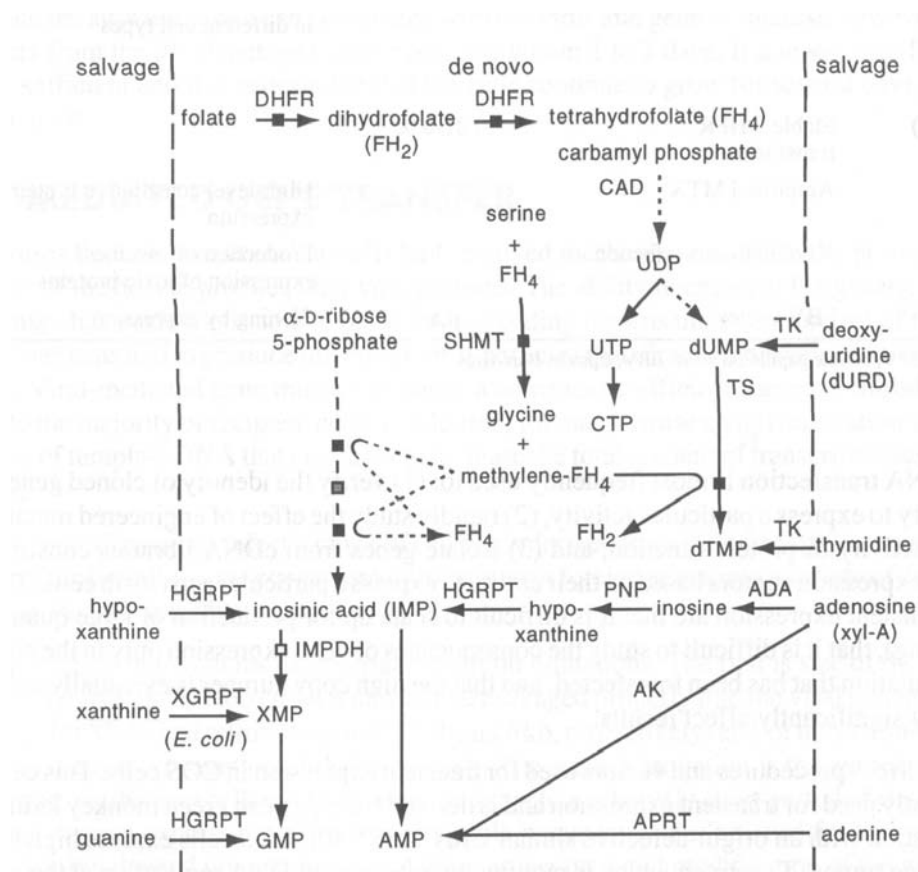
Nustatyta, kad SV40 ori užtikrina bet kokio dydžio DNR replikaciją COS ląstelėse. COS ląstelių kultūra buvo gauta transformuojant Afrikos žaliųjų beždžionių inkstų embrionines ląsteles su SV40 virusu, neturinčiu ori. Šis virusas integravosi į genomą ir dėka pastovios T- didžiojo antigeno ekspresijos, buvo gauta transformuotų ląstelių linija, pastoviai sintetinti T-didįjį antigeną. Tokiose ląstelėse SV40 ori turintys vektoriai replikuojasi, pasiekama gana gera baltymų ekspresija. Kitose žinduolių audinių kultūrų linijose tokie vektoriai nesireplikuoja, tačiau sėkmingai naudojami lakinai ekspresijai gauti. SV40 ori turinčių vektorių trūkumas – replikuojasi tik specializuotose ląstelėse. Panašaus tipo vektoriai konstruojami naudojant kitus, SV40 giminingus, mažus DNR onkovirusus. Gana paplitę vektoriai jaučio papildomos viruso (BPV) pagrindu.

Žinduolių vektorių genetiniai žymenys

Eukariotinės ląstelės yra atsparios daugeliui antibiotikų, naudojamų bakterijų sistemose. Šiuo metu keletas antibiotikų naudojama žinduolių ląstelių transformantų selekcijai. Populiariausias yra G418 (geneticinas) – kanamicino darinys. Atsparumą šiam junginiui užtikrina bakterijų *kan*, *neo* genai, koduojantis kanamicin-fosfotransferazę. Tokiu būdu, *neo*, prijungtas prie eukarijotinių genetinių elementų, bakterijose gali užtikrinti kanamicinui/ neomicinui, o eukarijotuose – G418. Be G418, transformantų selekcijai naudojami antibiotikai hygromicinas B, zeomicinas, clonat'as. Kadangi visi šie junginiai yra labai brangūs, ieškoma būdų sukurti atrankos sistemas be minėtų antibiotikų. Be to, šie antibiotikai buvo surasti palyginti neseniai. Kitas atrankos principas yra chromosominių mutantų ir atatinkamų genų derinys, pirmiausia panaudotas mielėse. Tačiau žinduolių metabolizmo sistemos yra sudėtingesnės ir mutantų gavimas yra komplikuoatas.

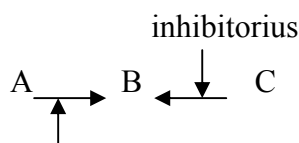
Stabiliai žinduolių ląstelių transformacijai gauti dažnai naudojami genai, apsaugantys nuo citotoksinių junginių. Žinduolių ląstelėje, purinų ir pirimidinų biosintezės keliuose, galutiniai produktai dTMP, GMP, AMP ir kt. gaunami keliais alternatyviais keliais. Jeigu vieną iš šių alternatyvių kelių mutuosime, o kitą inhibuosime specifiniu inhibitoriumi, pav. metotreksatu, ląstelės neaugs terpėje su

inhibitoriumi. Jeigu į tokias ląsteles įvesime vektorių, turintį ląstelės mutaciją kompensuojantį geną, ląstelės augs terpėje su inhibitoriumi.



Pav. 4.14. Purinų ir pirimidinų biosintezės keliai. Ištinės rodyklės žymi vieną reakciją, punktyrinės – kelias reakcijas. Užtušuoti kvadratai žymi reakcijas, kurias inhibuoja metotreksatas. Užstričiuoti kvadratai žymi reakcijas, kurias inhibuoja azoserinas. Neužpildyti kvadratai žymi reakcijas, kurias inhibuoja mikofenolinė rūgštis. DHFR, dihidrofolate reduktazė; CAD – karbamoilfosfato sintetazė, aspartato transkarbomoilazė ir dihidroorotazė; SHMT – serino hidroksimetilo transferazė; TS, tymidilat sintetazė; IMPDH, inosino-monofosfato dehidrogenazė; TK- timidinkinazė; ADA adenosin-dezaminazė; PNP –purinų nukleozidų kinazė; AK – adenosin-kinazė; APRT – adenosin-fosforibasil-transferazė; HGPRT – hypoksantine-guanine fosforibozil-transferazė; XGPT – *E. coli* ksantin-guanin-fosforibozyl-transferazė; FH – tetrahydrofolatas; xylA – 9-beta-D-ksilufuranozil-adeninas.

Principas: pasirenkamas metabolizmo kelias, kuriame ląstelei būtinas produktas B, gali būti sintetinamas dviem keliais, iš pirmtako A ir iš pirmtako C. Gaunama mutacija, pažeidžianti galimybę B gauti iš A, tada parenkamas specifinis inhibitorius, inhibuojantis B susidarymą iš C:



Mutacija

Pavyzdžiui, dTMP gali būti gaunamas iš dUMP (fermentas TS) ir iš timidino (fermentas TK). Mutavus TK, ląstelės bus gyvybingos, augs tradicinėse mitybinėse terpėse, tačiau neaugs terpėse su metotreksatu (ir kitais folinės r. analogais – aminopterinu, ametopterinu), kuris inhibuoja TS. Vektoriaus pagalba į tk⁻ ląsteles įvedus vektorių su TK genu, ląstelės, turinčios plazmidę augs terpėje su metotreksatu. Tokiu būdu galima užtikrinti transformuotų ląstelių atranką ir vektoriaus stabilumą. Tokius genus galima panaudoti vektorinėse sistemose, dirbant su įvairiomis mutantinėmis ląstelių linijomis. Kai kurios ląstelių linijos gautos iš ligonių – mutantų.

Genai – žymenys, naudojami genų raiškos tyrimuose

Norint tyrinėti promotorių veiklą, įvairių *cis* ir *trans* faktorių įtaką genų funkcionavimui, naudojami įvairūs modeliniai, lengvai testuojamų baltymų genai (reporteriniai genai), kurie gali būti suliejami su testuojamu genu arba jo promotoriumi. Modelinių genų produktai – žymenys) gali būti testuojami *in vitro* ir *in vivo*.

***In vitro* naudojami žymenys.** Šiuose tyrimuose reporterinis baltymas analizuojamas ląstelių lizatuose arba ląstelių augimo terpėje. Testavimams naudojami biocheminiai arba imunologiniai metodai.

CAT – chloramfenikolo acetiltransferazė. Genas kilęs iš bakterijų, adaptuotas žinduolių ląstelėms. Patogus, nes žinduolių ląstelėse nėra jam giminingų baltymų, trukdančių testavimui. Testavimas paremtas izotopiniais metodais arba ELISA.

Jonvabalių (*Photinus pyralis*) **liuciferazė** – luc. *luc* genas labai populiarus, jo pagrindu sukurti labai jautrūs testavimo metodai, paremti luc baltymo bioluminiscencija. Reakcijos substratas – luciferinas, ATP, Mg⁺⁺, ir molekulinis O₂.

Ląstelių lizatas, turintis luciferazę, sumaišius su substratu skleidžia labai trumpą blyksnį, kurį fiksuoja luminometras. Metodas labai jautrus, 10-1000 kartų jautresnis už izotopinį CAT testavimo metodą.

***E. coli* β-galaktozidazė.** Tai vienas iš labiausiai paplitusių genetinių žymenų, adaptuotų tiek prokarijotuose, tiek eukarijotuose. Fermentas hidrolizuoja įvairius galaktozidus. Kalorimetriniai *o*-nitrofenilo-β-D-galaktopiranozido (ONPG) ir

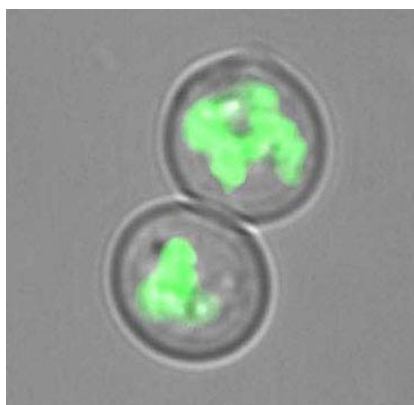
fluorometriniai matavimai 4-metillumbeliferilo- β -D-galaktozido (MUG) leidžia stebėti šio baltymo sintezę įvairiose ląstelėse, tačiau metodų jautrumas nėra didelis ir nusileidžia kuciferazės testavimo metodui.

Sekretuojama šarminė fosfatazė – Šis fermentas lengvai testuojamas augimo terpėje. Tradicinis substratas, naudojamas kalorimetriniuose matavimuose, yra *p*-nitrofenilo fosfatas. Jautrumas padidintas dviejų pakopų sistemoje, naudojant bioluminescentinį substratą D-luciferin-O-fosfatą. Fosfatazės atskeltas fosfatas naudojamas substratu luciferazės testavimui.

GUS – β -glukuronidazė. Bakterijų β -glukuronidazė pirmiausia sėkmingai adaptuota tyrinėjant genų ekspresiją augaluose, vėliau ir gyvulių ląstelėse. Dauguma augalų neturi GUS aktyvumo. GUS aktyvumas testuojamas kolorimetriškai, naudojant substratą X-Gluc. Jautresnis yra fluorescentinis metodas naudojant substratą 4-MUG.

Žymenys naudojami *in vivo*.

GFP – žalias fluorescuojanti baltymas (*green fluorescent protein*). Genas izoliuotas iš medūzų *Aequorea victoria*. GFP labai lengvai matomas fluorescentiniu mikroskopu įvairiausio tipo ląstelėse, naudojamas genų funkcionavimui tirti mikroorganizmuose, augaluose ir gyvulinėse ląstelėse. Šiuo metu sukurti šio baltymo derivatai, suteikiantys ląstelei raudoną (RFP), melsvą (CFP) ir geltoną (YFP) spalvas. Suliejus GFP ar jo derivatų genus, su tiriamuoju genu, galima stebėti tiriamojo baltymo sintezę, lokalizaciją, judėjimą ląstelėje. Žemiau pateikiamame pavyzdyje matome tymų viruso nukleokapsido baltymo, sulieto su GFP sintezė mielėse.

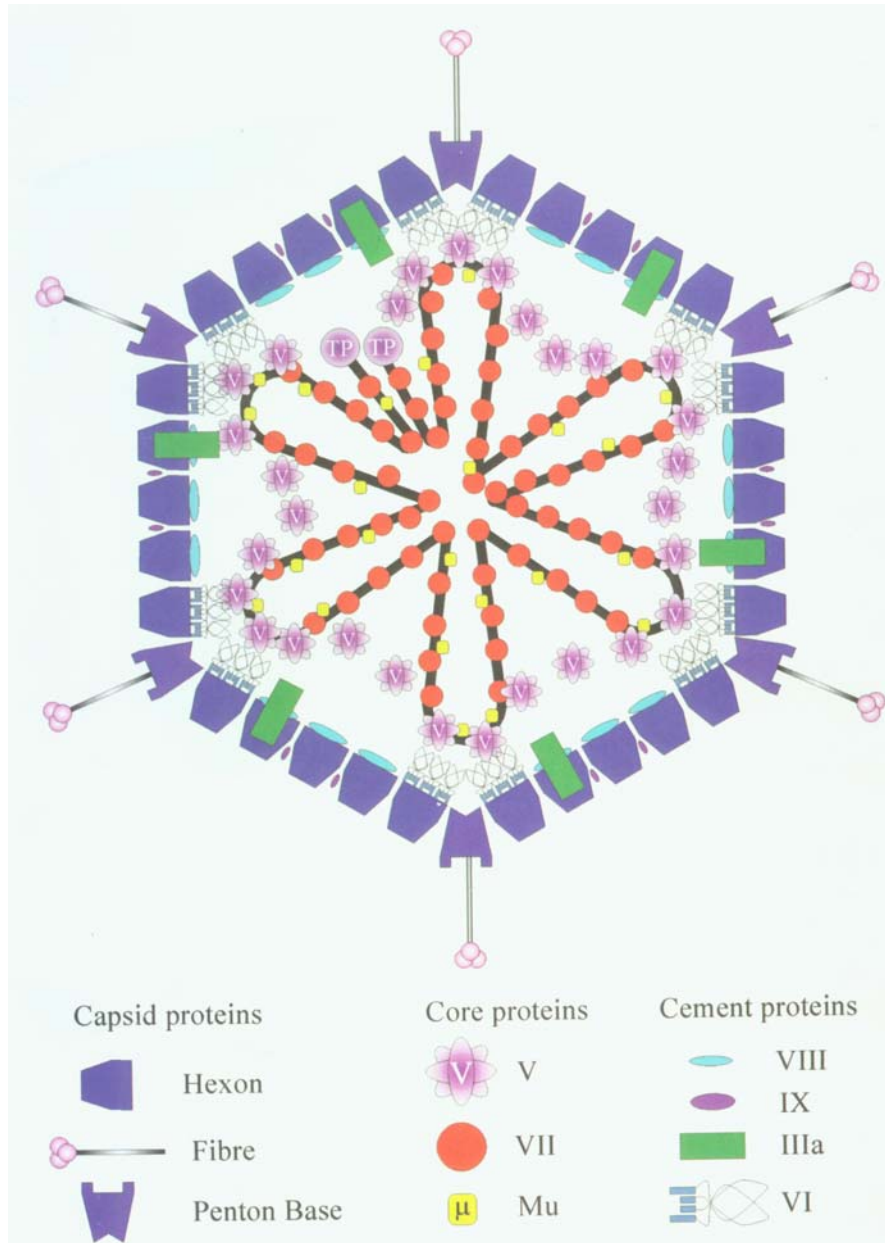


Luciferazė, β -galaktozidazė, taip pat sėkmingai naudojamos ir *in vivo* eksperimentuose.

Patogumo dėlei, įvairios firmos yra paruošę specialius vektorius, įgalinančius lengvai gauti sulietus tikslinius genus su pasirinktu reporteriniu genu. Žymenis pasirenkami, priklausomai nuo bandymų tikslų, jautrumo poreikio.

4.5. Adenovirusai ir adenovirusų vektoriai

Adenovirusų (AdV) infekcija žmonėms sukelia nesunkius peršalimo simptomus. Virusas infekuoja viršutinių kvėpavimo takų epitelines ląsteles, kartais sukelia nepiktybinius auglius. Kai kurie adenovirusų serotipai gali transformuoti ląsteles *in vitro*, sukelti gyvūnams auglius.



Pav. 4.15. Adenoviruso schema

Adenovirusai pasižymi charakteringa morfologija. Viruso paviršių formuoja ikosaedrinis kapsidas, sudarytas iš 3 pagrindinių baltymų: heksono (II), pentono (III) ir atsikišusias išaugas formuojančio fibrilinio baltymo (IV). Be jų, dar randami minoriniai VI, VIII, IX, IIIa ir IVa2 baltymai.

Viruso genomą yra dvigrandė, linijinė 36 kb DNR, galuose turi invertuotus terminalinius pasikartojimus (ITR), prie kurių abiejų 5'- galų prisijungęs terminalinis baltymas (TP). DNR supakuoja bazinis baltymas VII ir mažas peptidas *mu*. Šią struktūrą supa VI baltymas. Virusas savyje turi ir viruso koduojamą proteazę (Pr). Viruso replikaciją atlieka viruso koduojama DNR polimerazė. Replikacijos pradmeniu tarnauja terminalinio baltymo (TP) pateikiamas dAMP.

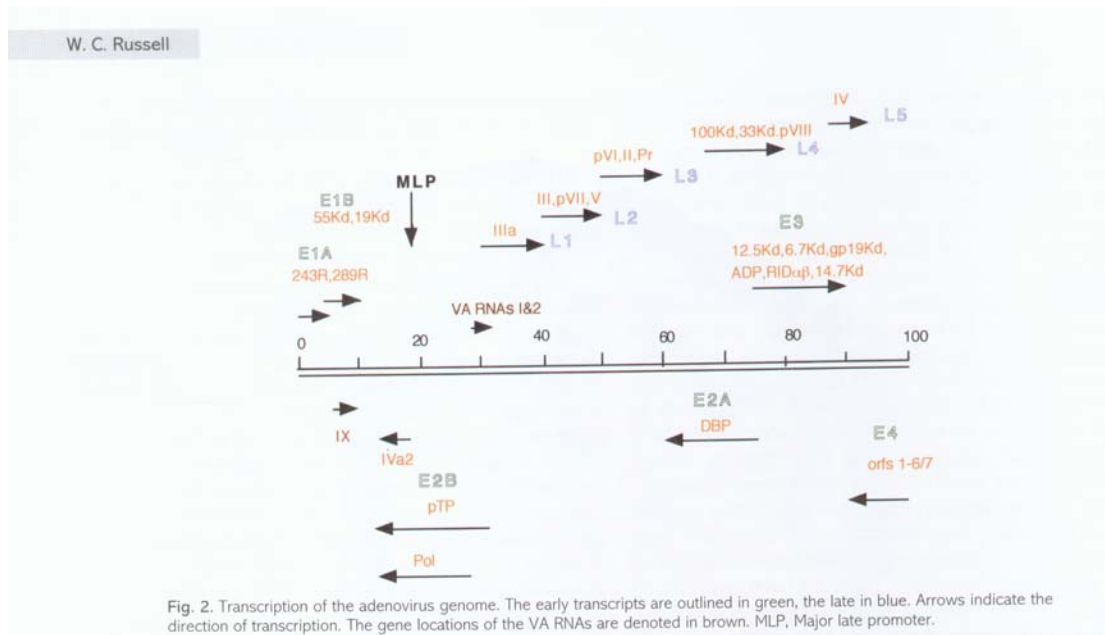
Adenovirusų šeimos virusai gali daugintis įvairiose po-mitotinėse ląstelėse, net labai diferencijuotose ląstelėse, skeleto raumenų, plaučių, smegenų, širdies raumenų ląstelėse, tiek besidalinančiose, tiek ramybės būsenoje esančiose ląstelėse.

Viruso infekcija susideda iš dviejų dalių, ankstyvos ir vėlyvos. Ankstyvojoje fazėje, viruso genomą patenka į branduolį, prasideda ankstyvųjų genų transkripcija. Ankstyvosios fazės viruso baltymai moduliuoja ląstelės funkcijas, paruošia ląstelę virusinės DNR replikacijai bei vėlyvųjų genų transkripcijai ir transliacijai. Tai veda į virusinių dalelių susiformavimą. Ankstyvoji fazė trunka 6-8 val., vėlyvoji 4-6 val.

Virusas patenka į ląstelę naudodamas ląstelės receptorių, su kuriais sąveikauja išsikišusios fibrilinės struktūros. Virusas naudoja tuos pačius receptorių, kaip ir anksčiau identifikuotas *coxsackie B* virusas, todėl dabar šie receptoriai vadinami CAR (*coxsackie/adenoreceptor*). Tai pagrindinis adenovirusų receptorių, tačiau kai kurios adenoviruso serogrupės patekimui į ląstelę naudoja audinių suderinamumo komplekso I imunoglobulinų superšeimos baltymą, dar kitos naudoja sialoglikoproteinus. Virusas į ląstelę patenka endocitozės būdu dalyvaujant klatrinui. Iš endosomų virusas patenka į citoplazmą, jo proteazė apardo apvalkalą, atpalaiduodama nukleokapsidą. Kelionei į branduolį virusas naudoja ląstelės dineiną ir mikrovamzdelių sistemą. Patekus į branduolį, prasideda ankstyvųjų genų, sugrupuotų į keturias ekspresijos kasetes, E1, E2, E3 ir E4 transkripcija, splaisingas ir ankstyvųjų produktų formavimasis.

E1 formuoja du genų produktus, E1A ir E1B. E1A sudarytas iš dviejų baltymų, 289R ir 243R (skaičius parodo ar kiekį). E1A baltymas keičia ląstelės metabolizmą, paruošdamas jį viruso replikacijai. E1A apsaugo nuo imuninio atsako

formavimosi, apoptozės, bei pakeičia ląstelės transkripcijos sistemas, pajungdamas jas virusui. Žemiau išvardintos pagrindinės šio baltymo funkcijos.



Pav. 4.16. Adenoviruso genomo organizacija

Adeno viruso genomas. Ankstyvieji transkriptai pažymėti raide E (E1, E2, E3 ir E4). Vėlyvieji transkriptai transkribuojami nuo vėlyvųjų genų promotoriaus MLP
E1A baltymo savybės:

- Susiriša su p21 ir jam artimais ląstelės ciklo kinazių (CDK) inhibitoriais ir stimuliuoja ląstelės augimą ir dalijimąsi;
- Suriša cikliną A ir E-CDK kompleksus, kurie reguliuoja kelią į DNR sintezės pradžią;
- Suriša p300/CBP šeimos transkripcijos transaktyvatorius (acetyltransferazės), kurie dalyvauja ląstelės ciklo kontrolėje. Moduliuoja acetyltransferazės aktyvumą, tuo įtakoja nukleosomų struktūrą ir matomai, transkripciją;
- Susirišdamas su p300/CBP inhibuoja STAT-1 aktyvumą, reikalingą atsako į interferonus indukcijai, bei inhibuoja kaspazių aktyvaciją, tuo blokuodamas nuo p53 nepriklausomą apoptozę;
- Suriša Rb/p130 šeimos baltymus, kai kurie iš jų yra onkogenai ir yra svarbūs aktyvuojant / represuojant transkripciją, reguliuoja ląstelės ciklą. Iš Rb komplekso atpalaiduoja E2F, o tai aktyvina S –fazės baltymų sintezę, reikalingą virusui ir E2 genų kasetės aktyvinimui;

- Susiriša su CBP acetilazės C-galiniu domenu PLDLS motyvu, neleidamas CBP tuo pačiu domenu susirišti su Rb ir tapti transkripcijos ko-represoriumi;
- Sąveikauja su ląstelės Sur-2 baltymų multi-kompleksu ir aktyvina viruso genų transkripciją;
- Susiriša su TBP ir TAF'ais, tuo moduliuoja transkripciją virusui palankia kryptimi;
- Aktyvina transkripciją ir įvairiais keliais stabilizuoja p53;

W. C. Russell

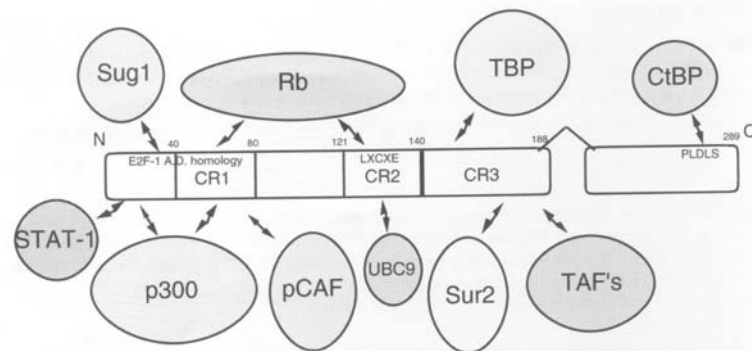


Fig. 3. Binding map of proteins to E1A. The locations have been determined on the basis of *in vitro* studies using deletion and mutational analysis. The abbreviations are explained in Table 1. CR1, CR2 and CR3 are constant regions present in a wide range of adenoviruses. PLDLS and LXCXE etc. are recognition motifs. E2F-1 A.D. homology refers to sequences that can displace E2F-1 from Rb and p300.

Pav. 4.17. Adenoviruso E1A baltymo sąveikos su ląstelės baltymais.

Tai toli gražu dar ne visos E1A funkcijos, tačiau ir tai atspindi evoliucijoje susiformavusius viruso – šeimininko tarpusavio ryšius. Šiuos ryšius moduliuoja ir kiti ankstyvieji viruso baltymai.

E1B 19K baltymas panašus į ląstelės Bcl-2 baltymą, abu šie baltymai sąveikauja su Bax šeimos baltymais ir stabdo apoptozę, nekrozę, prailgina infekuotos ląstelės gyvenimą. E1B 55K baltymas sąveikauja su p53, dėka šios sąveikos, kompleksas nukreipiamas į citoplazmą. E1B neturintys virusai gerai dauginasi vėžinėse ląstelėse su pažeistu p53. Šio atradimo pagrindu konstruojami virusai, žudantis p53⁺ vėžines ląsteles. Apie 50% visų vėžinių susirgimų susiję su p53 geno pažeidimais. E1B 55K baltymas sąveikauja su p53 ir įtakoja jo stabilumą ir lokalizaciją.

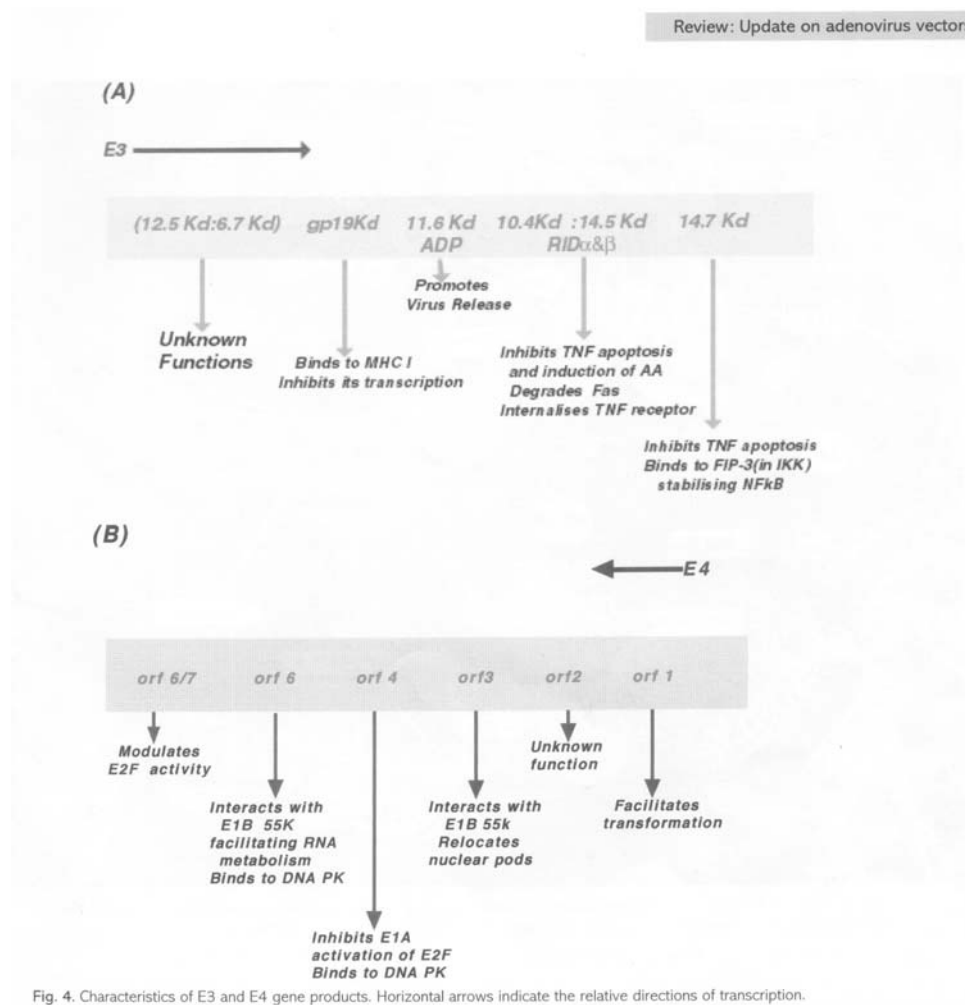
E2 genų produktai koduoja replikacijai reikalingus baltymus, E2A koduoja – DNR surišantį baltymą - DBP, o E2B pTP – terminalinį baltymą ir viruso DNR polimerazę - Pol.

E3 genas nėra reikalingas augant virusui audinių kultūrose, o organizme jis griaua šeimininko apsaugos sistemas. Šio geno vienas produktų vadinamas ADP – *adenovirus death protein*, nes jis palengvina ląstelės citolizę ir viruso išėjimą iš ląstelės.

Kiti E3 baltymai neutralizuoja MHC I antigenų prezentacijos sistemą ir tuo apsaugo infekuotą ląstelę nuo CTL (citotoksiniai T-limfocitų), bei inhibuoja nuo TNF-priklausomą apoptozę. Šie baltymai apsaugo ir nuo CTL lyzės.

E4 kasetės baltymai dalyvauja viruso mRNR metabolizme, sąveikauja su E1B genų produktais, padeda viruso DNR replikacijai, išjungia šeimininko baltymų sintezę. Įdomu, kad daug E1B ir E4 savybių yra priešingos E1A aktyvumui.

E3 ir E4 kasetių baltymų sąveikos ir funkcijos pateiktos pav.



Pav. 4.18. E3 ir E4 baltymų funkcijos ir sąveika

E1, E2, E3 ir E4 nuskaitomi nuo ankstyvųjų promotorių. Vėlyvieji promotoriai ankstyvoje fazėje veikia silpnai. Vėlyvieji genai kontroliuojami pagrindinio vėlyvojo promotoriaus MLP (*major late promoter*). Virusas sintetina ir netransliuojamą RNR – VA RNR. Ši maža RNR susiriša ir inaktyvina dsRNR-indukuojamą protein kinazę, kuri yra svarbi ląstelės interferonų atsako formavimui virusų infekcijos metu.

Vektoriai

Adenovirusai yra patogūs vektoriams konstruoti, nes jie gali infekuoti labai įvairias ląsteles, tame tarpe nesidalijančias ląsteles. Virusus nesunku dauginti ir gauti didelius viruso titrus. Į viruso struktūrą, nepažeidžiant funkcijų galima įterpti apie 2 kb papildomos DNR, t.y. vieną kDNR. Norit įterpti didesnes sekas, reikia pašalinti dalį viruso genomo. Vektoriai naudojami vėžio terapijoje, genų terapijoje, pagalbinei terapijai įvedant genus, padedančius kovoti su liga.

Pirmos generacijos vektoriai

Pirmos generacijos vektoriuose buvo pakeičiamos E1 ir/arba E3 kasetės. Tai leido įvesti iki 6,3 kb papildomos DNR, dažniausiai naudojant heterologinius promotorius. Šalinant E1 kasetę, labai svarbu nepažeisti ITR ir pakavimo seką.

E1 sekos pašalinimas vektoriuose turi privalumą, nes E1 reikalingas E2 transkripcijai, ir toks vektorius neturėtų replikuotis ir sintetinti vėlyvųjų kapsidės baltymų. E1 neturinčius adenovirusų vektorius dauginama 293 ląstelių linijoje (beždžionės inkstų embrioninės ląstelės). Ši linija lengviausiai pakelia E1 baltymų sintezę *trans*. Šiose ląstelėse padaugintas vektorius naudojamas ląstelių ar organo (genų terapija) infekcijai. Deja, paaiškėjo, kad tokio tipo vektoriai yra tinkami tik laikinai ekspresijai. Besidalijančios ląstelės tokį vektorių pameta, nes jis nesireplikuoja. Be to, paaiškėjo, kad jis kažkiek tai replikuoja, ląstelės baltymai dalinai pakeičia trūkstantis E1 produktus ir indukuoja E2 baltymų, būtinų replikacijai sintezę, todėl vektoriai, nors ir silpnai, replikuoja ir sintetina virusinius baltymus. Prieš šiuos baltymus formuojasi imuninis atsakas. Dėl šios priežasties, ląstelės, turinčios vektorių yra gana greitai imuninės sistemos eliminuojamos. Be to, E1B pašalinimas labai susilpnina viruso galimybes priešintis ląstelės apoptozei. Sužinojus šias visas problemas, imta tobulinti vektorius, siekiant minimalizuoti viruso genomo dalį, paliekamą vektoriuje. Be to, virš 50% žmonių populiacijos yra buvę infekuoti adenovirusu, kai kurių šalių armijose yra skiepijama nuo šio viruso, siekiant išvengti

netikėtų peršalimo simptomų, todėl adenovirusų vektorių, produkuojančių viruso baltymus galimybės genų terapijoje pasirodė labai ribotos.

Antros ir trečios kartos vektoriai

Tolesniuose etapuose buvo tobulinamos ląstelių linijos skirtos vektoriaus dauginimui, buvo stengtasi sukurti tokias ląsteles, kurios kiek galima daugiau viruso baltymų pateiktų *trans* tokiu būdu pašalinti galimybę vektoriui replikuotis. Buvo sukurtos ląstelių linijos *trans* sintetinančios E2 baltymus. Tačiau to nepakako, kad pilnai išvengtume vėlyvųjų baltymų sintezės ir imuninės sistemos atakos, todėl vėlesniuose vektoriuose buvo stengiamasi pašalinti kiek galima daugiau viruso genų, konstruojami taip vadinami “*gutless*”, turintys tik ITR ir pakavimo signalą, o visa koduojanti dalis pašalinta. Tokiems vektoriams dauginti naudojamos ląstelių linijos su pagalbinais virusais. Pagrindinė problema yra atsivalyti nuo pagalbinių virusų. Siekiant tokiuose vektoriuose ekspresuoti genus, yra labai svarbu išlaikyti viruso dydžio genomą, t.y. apie 36 kb. Jeigu įvedama nedidelė ekspresijos kasetė (promotorius, genas, transkripcijos terminatorius), papildomai būtina įvesti balastinę DNR, kuri papildytų vektoriaus DNR iki 36 kb. Paaiškėjo, kad vektoriuose naudinga palikti kai kuriuos E4 genus, jie dalinai apsaugo nuo T-ląstelių atsako. Tokiu būdu vektoriai pastoviai tobulinami. Tačiau visais atvejais, adenovirusų vektoriai užtikrina įvairų laiką trunkančią laikiną ekspresiją, bet neužtikrina ilgalaikės transgeno ekspresijos, nes vektorius funkcionuoja greta genomo, nesireplikuoja kartu su genomu. Šie vektoriai gana ilgai funkcionuoja lėtai regeneruojančiuose audiniuose, juos galima naudoti genų įvedimui į kepenis, smegenų ląsteles.

Siekiant sukurti labai stabilus vektorius, skirtus ilgalaikiai ekspresijai, bandoma panaudoti AAV (adeno – asocijuoti virusai) savybę integruotis į specifinę genomo vietą, prijungiant AAV ITR (invertuotos terminalinės sekos) sekas arba retrovirusų LTR sekas. Sukurti eksperimentiniai vektoriai gebantys integruotis (2000 m.).

Adenovirusų vektorių panaudojimas

Vėžio supresorių įvedimas. Apie pusė visų vėžinių susirgimų susiję su p53 geno pažaidomis. Dažnai p53 geno funkcijų atstatymas indukuoja apoptozę, jeigu ji nepažeista. Gana daug vektorių sukurta, skirtų apoptozės atstatymui vėžiniuose audiniuose įvedant p53 geną. P53 kartais kombinuojamas su imunomodulatoriais IL2, ar citotoksinais junginiais (adriamicinas), didinančiais efektą. Baigiami klinikiniai tyrimai naudojant tokius vektorius plaučių, galvos, kaklo, kepenų, plaučių

ir kt. vėžinių auglių gydymui. Tyrimai rodo, kad kartu su p53 naudinga įvesti ir kitus p53 apoptozės kelio genus, nes jie taip pat dažnai būna vėžinėse ląstelėse mutuoti. (ARF, mdm2).

Kitas būdas aktyvuoti apoptozę yra nuo ciklinų priklausančių kinazių inhibicija, nuo kurių priklauso ląstelės ciklas. Paaiškėjo, kad vienas jų, p16 daugumoje vėžinių ląstelių linijų yra mutotas, todėl vektoriai, turintys p16, p15, p21 genus turi geras perspektyvas. Tokiu būdu, vektorių pagalba įvairiais būdais bandoma atstatyti apoptozę vėžinėse ląstelėse. Geri rezultatai gaunami taip pat įvedant ribozymus, skaldančius specifinę mRNR, nukreiptus prieš anti-H-ras pūslės vėžio atveju, anti-Bcl2 prostatos vėžio atveju, anti-HER2 krūties vėžio atveju. Visos šios sistemos gerai dirba *in vitro*, t.y. su vėžinių ląstelių kultūromis, stabdo jų augimą. Su vėžio audiniais visada viskas vyksta žymiai sunkiau, nes reikalinga infekuoti kuo daugiau auglio ląstelių.

Auglius lizuojantys ir jautrumą vaistams didinantys vektoriai

Buvo pastebėta, kad adenovirusas su pašalintu E1B 55K genu gerai replikuojasi vėžinėse ląstelėse su pažeistu p53 genu, todėl tokie virusai gali būti naudojami specifiniam vėžinių ląstelių naikinimui. Onyx firma baigia klinikinius tokio viruso panaudojimo vėžio terapijoje bandymus. Pademonstruota, kad E1B neturintys ir ekspresuojantys IL-2 adenovirusai pilnai sustabdo kasos vėžį pelių modelyje. Normaliose ląstelėse, kad inicijuoti viruso replikaciją, E1B-55 baltymas suriša ir inaktyvuoja p53. Vėžinės ląstelės, neturinčios p53, leidžia replikuotis E1B-55 neturinčiam virusui, o normaliose ląstelėse toks virusas nesireplikuoja. Toks virusas vėžinių ląstelių kultūrose dauginasi apie 100 kartų efektyviau, negu normaliose ląstelėse.

Stengiamasi taip pat modifikuoti viruso paviršiaus baltymus, kad virusas infekuotų norimas ląsteles.

Kitas kovos su vėžinėmis ląstelėmis modelis paremtas įvedimu į ląstelę fermentų, aktyvuojančių citotoksinius vaistus. Pavyzdžiui, jeigu į vėžines ląsteles įvesime TK (HSV timidin-kinazė), ląstelėse sintetinamas HSV-TK fermentas aktyvuos - fosforilins nukleotidų analogą ganciklovir'ą, kuris nužudys tas ląsteles.

CD (citozino dezaminazė) genas naudojamas tiesiosios žarnos karcinomai gydyti kombinuojant kartus su 5-fluorocitozinu. Bandoma kombinuoti abu, TK ir CD genus ir jų aktyvuojamus junginius. Akivaizdu, kad tokių gydymo metodų sukūrimui yra

labai svarbu sukurti vektorines sistemas, infekuojančias tik vėžines ląsteles. Teigiami rezultatai gauti, bandant sukurti virusą besidauginantį tik vėžinėse ląstelėse. Įvairios strategijos naudojamos tokių vektorių kūrimo. Paaikškėjo, kad E1A genus, būtinus viruso replikacijai, prijungus prie vėžinėms ląstelėms specifinio promotoriaus (PSA – *prostate-specific antigen*; TRP – *tyrosinase related protein 1*; CEA – *carcinoembryonal antigen*; AFP – *α-fetoprotein*; HIF-1 – *hypoxia-inducible factor*; MUC1 – *mucin* ir daug kitų promotorių) virusas dauginasi tik to tipo vėžinėse ląstelėse. Stengiamasi sustiprinti promotorius, įvedant specifinių transkripcijos faktorių atpažįstamas sekas. Taip perkonstruoti virusai vėžinėse ląstelėse dauginasi iki 10000 kartų geriau, lyginant su normaliomis. Išlieka problema infekuoti kuo daugiau auglio ląstelių.

Priešvėžinės vakcinės. Gydomoji strategija remiasi bandymais sukelti imuninį atsaką prieš vėžines ląsteles ekspresuojant įvairius imunomoduliatorių genus arba vėžinėms ląstelėms specifinius antigenus. Citokinai, pvz. IL2 stimuliuoja CTL atsaką, didina NK (natūralūs kileriai) aktyvumą. IL2 padidinta ekspresija stabdo vėžio vystymąsi modelinėse sistemose. Bandoma kombinuoti kartu ekspresuojant IL2 ir vėžiui specifinius antigenus, siekiant sukelti stiprų atsaką prieš vėžinį antigeną.

Siekiant sukelti stiprų CTL atsaką prieš vėžinius antigenus, adenoviruso pagalba į išskirtas ligonio dendritines ląsteles *in vitro* įvedamas antigeno genas, dendritinės ląstelės gražinamos ligoniui atgal.

Genų terapija. Naudojant adenovirusų vektorius, aprašyta daug genų terapijos eksperimentų. Daug pastangų dėta panaudoti adenovirusus cistinės fibrozės gydymui, įvedant sveiką geną į kvėpavimo takų epitelines ląsteles. Cistinė fibrozė yra palyginti dažnas paveldimas susirgimas (1/3000 kaukazoidų tarpe), susijęs su mutacija CFTR gene, ko pasekoje sumažėja Cl⁻ jonų pralaidumas ir padidėja Na⁺ patekimas, sutrinka vandens patekimas į sekretus, kvėpavimo takai blogai valosi, labai padažnėja bakterinės *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomonas aeruginosa* infekcijos. Vidutinis ligonių amžius siekia 20 m., ligoniai miršta nuo kvėpavimo takų infekcijų. Manoma, kad cistinė fibrozė buvo kompozitoriaus F. Šopeno ankstyvos mirties priežastis. Dauguma tyrimų parodė, kad adenovirusai (Ad2/5 serotipai, daugiausia naudojami vektorių konstravime) blogai infekuoja diferencijuotas kvėpavimo takų epitelio ląsteles, nes jose nėra CAR receptoriaus. Kitas panaudojimo barjeras yra plaučiams specifinių Th-ląstelių atsakas, pademonstravęs būtinybę į vektoriaus konstrukcijas įtraukti E4 genus. Be to, paaikškėjo, kad kvėpavimo takų epitelis išskiria anti-

mikrobinius peptidus, natūralius inhibitorius, kurie pasižymi ir anti-virusiniu poveikiu.

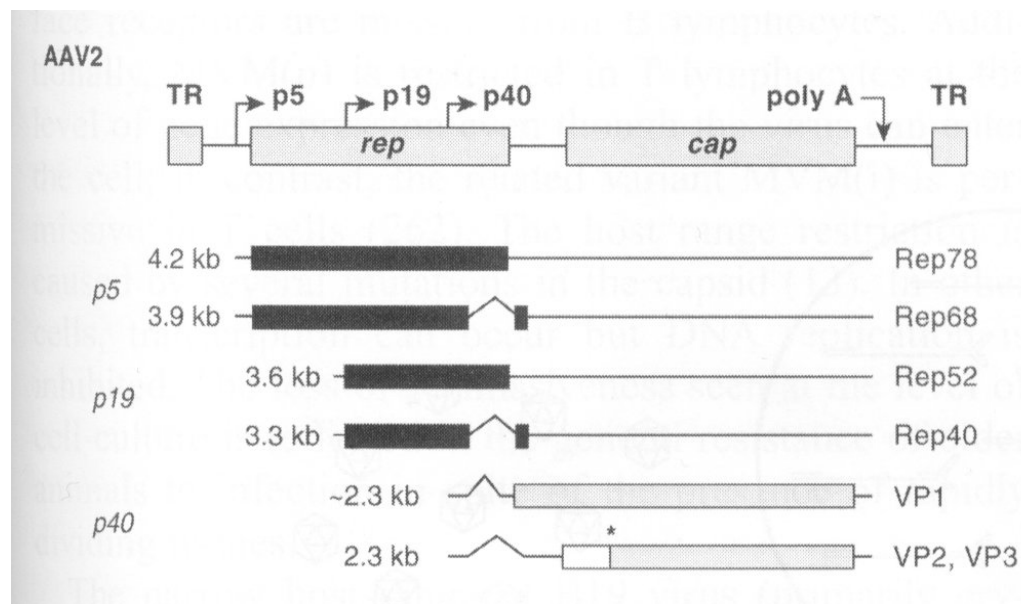
Daug eksperimentų atlikta siekiant įveikti raumenų distrofiją, susijusią su mutacija distrofinu gene. Pelių modeliuose pavyko gauti mini-distrofino ekspresiją pelių raumenyse, tačiau geno funkcionavimas nebuvo ilgalaikis pagrindinai dėl imuninės sistemos poveikio prieš vektorius ir transgeną, nes vektorius infekuoja ir dendritines ląsteles. Raumenų ląstelės taip pat neefektyviai infekuojamos dėl receptorių stokos.

Dauguma eksperimentų pademonstravo, kad adenovirusų panaudojimas genų terapijoje yra gana ribotas. Todėl vektoriai įvairiai modifikuojami, siekiant pašalinti jų neigiamas savybes. Vektoriai išbandyti daugelio paveldimų ligų modeliuose, glikogeno saugojimo sutrikimų atveju (įvedamas glukozydazės genas), krešėjimo faktoriaus VIII deficito atveju (faktorius VIII), OTC atveju (OTC – ornitino-transkarbamilazė, reikalinga baltymų azoto pertekliaus pašalinimui; OTC deficitas veda prie amonio jonų kaupimosi kraujotakos sistemoje, tai sukelia encefalopatiją, smegenų pažeidimus, išstinka koma.), *Leishmania* infekcijos atveju (IL-12), motorinių neuronų sutrikimo atveju (neurotropinis faktorius) ir daugelyje kitų. Nežiūrint išvardintų trūkumų, šie vektoriai randa pritaikymą ten, kur reikalinga neilga efektyvi transgeno ekspresija, pavyzdžiui gydant kraujagyslių ir koronarinių arterijų sutrikimus.

Auglius lizuojančių vektorių sukūrimas teikė daug vilčių sukurti naujas, efektyvias kovos prieš vėžį priemones. Šios priemonės yra intensyviai kuriamos, tobulinamos bandomos. Rezultatai, gauti su vėžinėmis ląstelių kultūromis yra tikrai daug žadantys, tačiau klinikiniai bandymai su ligoniais demonstruoja, kad tokių vektorių klinikinis efektas, deja, yra labia ribotas.

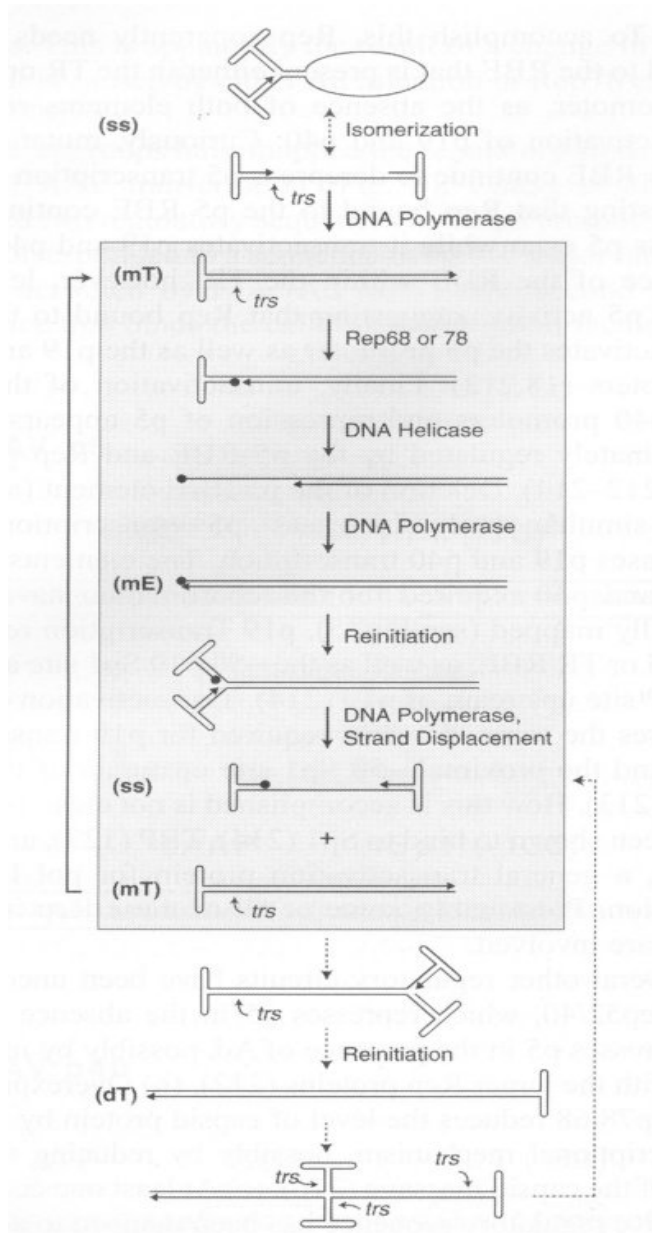
4.6. Adeno-asocijuoti virusai ir vektoriai

Adeno-asocijuoti virusai (AAV) priklauso Parvovirusų šeimai *Parvoviridea*. Vektorių konstravimui dažniausiai naudojamas AAV2. AAV infekcija nesukelia jokių pastebimų ligos simptomų. AAV yra vieni iš mažiausių DNR virusų, jų genomą sudaro 5 kb viengrandė DNR, kurios galuose, kurių DNR galuose yra TR (*terminal repeats*) sekos, ribojančios viruso genomą, jose taip pat randamas ir pakavimo signalas, būtinas viruso DNR supakavimui į viruso kapsidę.



Pav. 4.19. Adeno-asocijuotų virusų genomai ir transkripcija. TR – terminaliniai pasikartojimai; p5, p19, p40 – viruso promotoriai.

Koduojamoje dalyje randamos dvi genų grupės, *rep* ir *cap*. Dėka alternatyvaus splaisingo susidaro po kelis kiekvieno geno produktus. *Rep* koduoja baltymus, kontroliuojančius replikaciją ir integraciją, *cap* – struktūrinius viruso komponentus. Šie virusai infekcijos metu pasidaugina ląstelėje ir integruojasi į specifinį 19 chromosomos lokusą. Virusų replikacijai reikalingas pagalbininkas AdV virusas. AAV pasižymi labai plačiu šeimininkų ratu bei dideliu tropizmu, t.y. gali infekuoti daug skirtingų audinių.



Pav. 4.20. Parvovirusų replikacijos schema

Viruso DNR replikacija vyksta viengrandės DNR išstūmimo mechanizmu. AAV DNR molekulės galai yra identiški, sudaryti iš palindrominių struktūrų, kurios suformuoja segtuko formos struktūras. Palindrominiai invertuoti terminaliniai pasikartojimai 3'-gale panaudojamos replikacijos metu. DNR polimerazė pratęsia 3'OH galą iki kitame gale esančios dvigrandės segtuko struktūros. Arti terminalinio palindromo segtuko struktūroje baltymai Rep 78/68 įveda trūkį specifinėje sekoje (*trs* – *terminal resolution site*, AAV – 124 nt). Šie baltymai turi ir helikazės – ATP-azės aktyvumą, reikalingą grandinės išstūmimui. Trūkis sukuria naują laisvą 3'OH galą, galintį tarnauti tolesnei replikacijai. Segtuką su trūkiu išardo helikazė, o tai įgalina

ląstelės DNR polimerazei sintetinti pilną dvigrandę DNR, kurios abi grandinės, dėka palindrominių terminalinių pasikartojimų, suformuoja segtukus, kiekvienos grandinės galuose – taip vadinamas “triušio ausis”. 3'-OH galas tarnauja naujos grandinės sintezei, kurios metu išstumiamas viengrandė, genomą atitinkanti DNR, kuri pakuojama į viruso struktūrą, o susintetinta dvigrandė DNR su vienu kovalentiškai uždaru galu kartoja replikacijos ciklą. Jeigu viename gale kovalentiškai uždaros molekulės neperskiriamos prieš baigiant grandinės išstūmimą, kitame gale gali susiformuoti dimerinė molekulė iš dviejų genomų invertuotoje orientacijoje (galva-galva arba uodega-uodega). AdV viruso E2 produktas DBP (*DNA binding protein*) reikalingas DNR sintezės procesyvimui padidinti. Virusų replikacijai nereikalinga ląstelės α -DNR polimerazė (praimazė), tačiau reikalingi RPA, RFC, PCNA baltymai ir viena iš DNR polimerazių, delta ar epsilon. Be šių baltymų, reikalingas HMG1, surišantis kryžiaus formos palindrominius segtukus ir stimuliuojantis viengrandžio trūkio įvedimą, kurį atlieka Rep 78/68. Infekavus organizmą dideliu viruso kiekiu, stebima apie 10% viruso integracija į 19 chromosomos specifinį lokusą. Ištyrinėjus integruotus virusus, nustatyta, kad integracija vyksta per TR sekas, bet nėra vienoda visuose integruotuose virusuose, dalis TR sekų deletuojama. Dažnai tendemiškai integruojamos kelios AAV genomo kopijos. Manoma, kad TR sekos yra nestabilios integruotoje būsenoje ir yra dalinai deletuojamos. Auginant infekuotas ląsteles buvo pastebėtas TR kitimas integruotoje būsenoje. Integracija vyksta kelių šimtų nt lokuse. Integracija yra lokusui specifinė, bet nėra sekai specifinė, nes integruojasi įvairiose lokuso vietose, vykstant nehomologinei rekombinacijai. 19 chromosomoje randama apie 70% integruotų AAV. Integracijos lokusas arti rekombinacijos taikinių yra labai turtingas G+C porų, kurios sudaro apie 82% šio lokuso. Be to, randama 10 tendemiškų pasikartojimų, sudarytų iš 35 nt minisatelitų. Tokie pasikartojimai rasti 60 genomo vietų, ir visi 19 chromosomoje. Šiame lokuse randama dar daug tendemiškų pasikartojimų, turinčiu po 11-12 homologiškų nukleotidų.

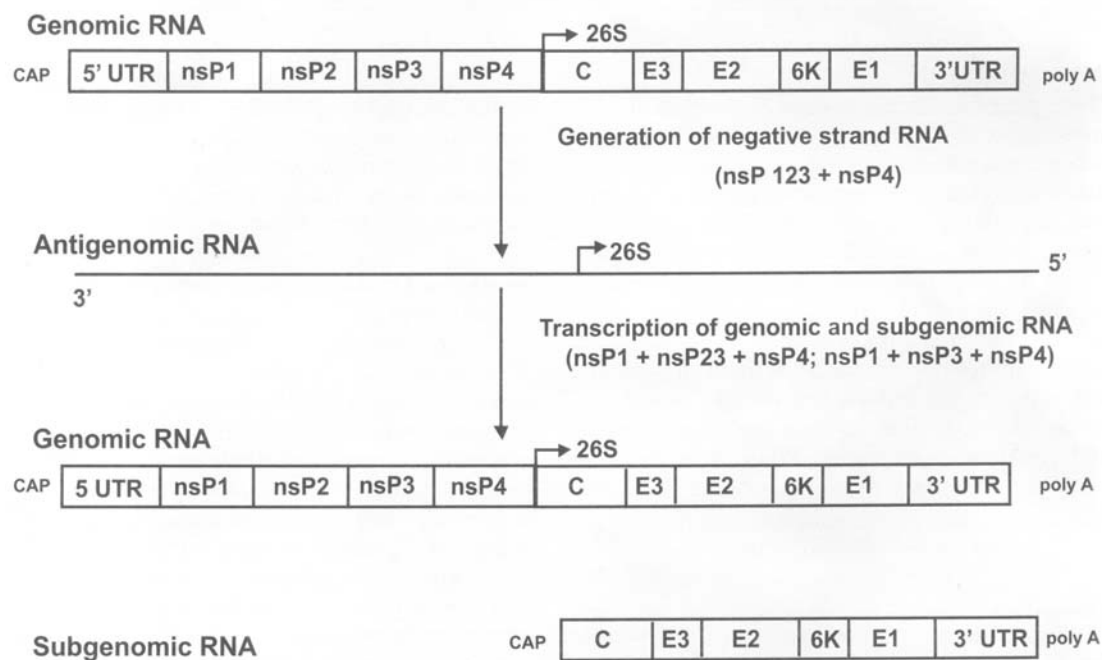
Infekavus be pagalbinio AdV viruso, AAV replikuojasi labai blogai ir dideliu dažnumu integruojasi į 19 chromosomą. Infekavus ląsteles su AdV, AAV genomas iššoka iš chromosomos ir pradeda viruso vystymosi ciklą.

Gana efektyvi ir stabili viruso integracija į genomą leido jį panaudoti vektoriumi terapeutinių genų įvedimui į žmogaus ląsteles. Sukurtos pakavimo ląstelės pateikiančios *rep* ir *cap* baltymus *trans*, todėl į vektoriaus sudėtį būtina įjungti tik TR sekas. Panaudojant šį vektorių pavyko gauti ilgalaikį geno funkcionavimą raumenyse,

smegenyse, kepenyse įvairiuose gyviuose, pelėse, šunyse, beždžionėse. Bėda, kad *rep* baltymai yra citotoksiški, todėl sunku prigaminti didelius viruso kiekius, be to, viruso replikacijai reikalingas pagalbinis virusas AdV. Kita problema – dydis. Kol kas galima įvesti iki 2,4 kb. Tačiau neseniai parodyta, kad šie virusai konkatemerizuojasi ir integruojasi tendemiškai, todėl įmanoma integruoti didelį geną dalimis, atskirais vektoriais, turinčiais splaisingo signalus. Dėka splaisingo, iš kelių virusų susirenka funkcionali mRNR. AAV TR sekos panaudotos konstruojant Ad virusą, galintį stabiliai integruotis į genomą, panašiai, kaip AAV. Tai atveria naujas AdV vektorių panaudojimo galimybes.

4.7. Alfa-virusų vektoriai

Alfa- virusai priklauso *Togaviridae* šeimai. Šiuo metu žinoma bent 24 skirtingi šios šeimos virusai, pasižymintys panašia genomo organizacija, sekų panašumu, struktūra bei serologija. Alfa-virusų genomas susideda iš vienos viengrandės (+) RNR molekulės, maždaug 12 kb dydžio. Alfa-virusų virionai yra maždaug 60 nm skersmens, sferinės formos, susidedantys iš šeimininko membranos lipidinio sluoksnio, kuriame išsidėstę 80 glikoproteininių viruso baltymų suformuotos smailės (spikes). Labiausiai ištyrinėti ir genų inžinerijos praktikoje adaptuoti yra *Sindbis* (SIN) virusas, *Semliki Forest* virusas (SFV), *Venezuelan equine encephalitis* - VEE – Venesuelos arklių encefalito virusas, ir keletas kitų. Virusų pavadinimai atspindi jų izoliavimo vietą: *Sindbis* yra vietovė Egipte, *Semliki forest* - vietovė Afrikoje. Virusus platina moskitai, paukščiai, graužikai, arkliai. SFV pelėms ir arkliams sukelia encefalitus. SIN virusas gali būti artritų priežastimi žmonėms ir kitiems gyvūnams, nes šis virusas dauginasi jungiamajame ir antkaulio audiniuose. Alfa-virusų genomas susideda iš (+) RNR, kurios galuose randamos 5' ir 3' netransliuojamos dalys, 5'UTR ir 3'UTR (*untranslated repeats*) bei du ASR (atviri skaitymo rėmeliai), koduojantys du poli-baltymus, kurie po translacijos sukarpomii į funkcionalius virusinius baltymus.



Pav. 4.21. Alfa virusų genomo organizacija ir replikacija

Pirmasis ORF sudaro 2/3 genomo nuo 5' galo, koduoja 4 nestruktūrinius baltymus, vadinamus nsP1, nsP2, nsP3 ir nsP4. Nestruktūriniai baltymai yra transliuojami tiesiai nuo genominės RNR. Šie baltymai atsakingi už (+) RNR grandinės vertimą į (-) grandinę, po to – negatyvios grandinės transkripciją ir naujos (+) genominės RNR suformavimą.

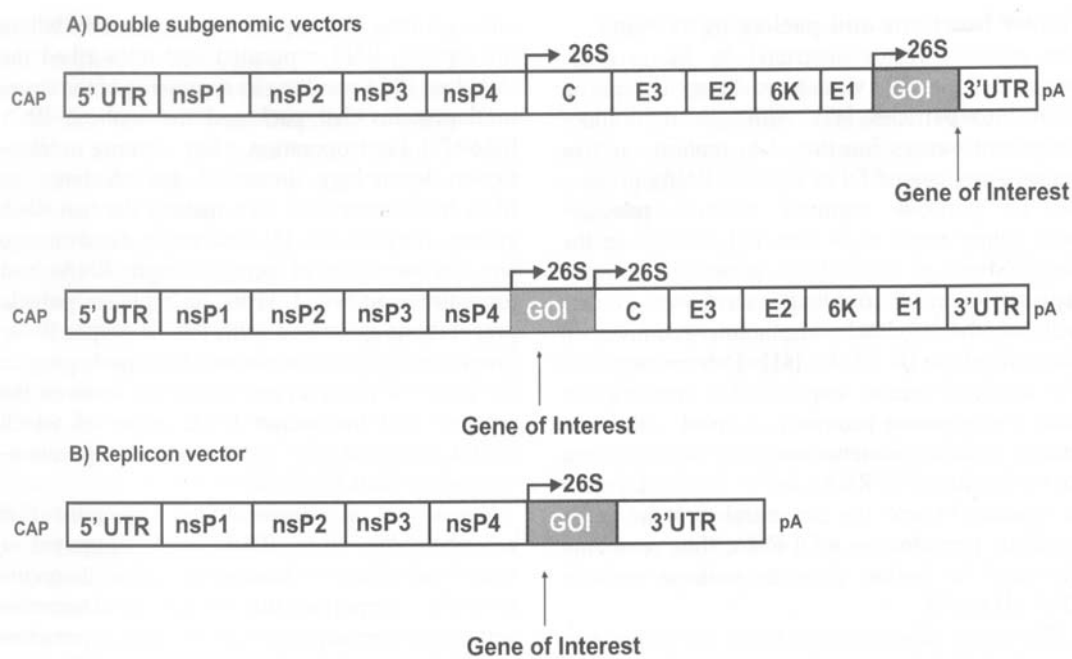
Virusui patekus į ląstelę, jo RNR transliuojama, sintetinami replikacijai reikalingi baltymai (nsP), jie sintetina (-) RNR grandinę, kuri tarnauja naujos genominės (+) RNR sintezei, bei subgenominės RNR sintezei nuo 26S promotoriaus.

NsP1 (*nonstructural protein P1*) koduoja kepavimo baltymą, atsakingą už virusinės RNR, sintetintos ląstelės citoplazmoje, kepavimą. NsP2 yra RNR susirišantis baltymas, pasižymintis NTPaziniu aktyvumu, primenančiu helikazių aktyvumą ir proteaziniu aktyvumu. Jo funkcija, matomai, yra RNR grandinių perskyrimas ir poli-proteinų specifinis proteolitinis sukarpymas. NsP3 yra fosfo-baltymas, reikalingas replikacijos metu, tačiau jokių fermentinių aktyvumu nepasižymi. NsP4 baltymas yra nuo RNR priklausanti RNR polimerazė, atsakinga už viruso RNR replikaciją ir transkripciją. nsP1 arba nsP2 genuose, priklausomai nuo viruso rūšies, randamas ir RNR pakavimo signalas, tai yra specifinė RNR seka, kurią atpažįsta viruso C baltymas ir supakuoja visą RNR. NsP poli-baltymo sukarpymas į mono-baltymus būna ne visada pilnas. Replikacijos iniciacijoje dalyvauja nsP4 ir ns123 poli-baltymas. Vėliau formuojasi tarpinis kompleksas nsP4, nsP23 ir nsP1. Šis kompleksas yra aktyvus su abiem RNR grandinėmis, (+) ir (-). Pilnai suskaldytas baltymas formuoja patį stabiliausią kompleksą nsP1, nsP2, nsP3 ir nsP4, kuris veikia tik ant negatyvios RNR grandinės ir sintetina genominę RNR.

1/3 genomo nuo 3' galo koduoja poliproteiną, susidedantį iš kapsido baltymo C, atsakingo už RNR supakavimą, bei 4 glikoproteinų, formuojančių virusinės dalelės paviršių – E3, E2, 6K ir E1. Šie baltymai transliuojami nuo sub-genominės RNR, atsirandančios po to, kada RNR polimerazė susintetina (-) - anti – genominę RNR. Ši RNR tarnauja naujos genominės RNR sintezei, bei sub-genominės RNR sintezei. Sub-genominės RNR sintezė inicijuojama nuo 26S promotoriaus.

Istoriškai, alfa-virusų vektorių konstravimas prasidėjo *paaiškęjus*, kad šis virusas formuoja defektyvias virusines daleles (*defective interference* - DI), kurių replikacijai reikalingas pilnavertis pagalbinis virusas. DI dalelių analizė parodė, kad jų formavimuisi reikia mažiausiai trijų viruso genomo komponentų – 5'UTR, 3'UTR ir pakavimo signalo. Buvo pabandyta DI dalelėse ekspresuoti reporterinį geną.

Paaikškėjo, kad gaunamas labai geras reporterinio baltymo sintezės lygis. Tada buvo pradėta konstruoti įvairius vektorių variantus su įvairiais alfa-virusais. Vektorius galima suskirstyti į dvi dideles grupes: (1) pilnos sudėties vektoriai, turintys visą viruso genomą ir papildomai įvestą tiriamąjį geną, prijungtą prie virusinio promotoriaus 26S (A).

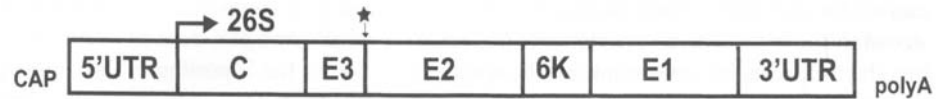


Pav. 4.22. Vektoriai alfa virusų pagrindu

(2) Replikoniniai vektoriai (B), susidedantys tik iš nestruktūrinių genų koduojančios dalies, prijungus 3'UTR. Tiriamas genas, prijungtas prie 26S promotoriaus įterpiamas tarp nsP4 ir 3'UTR. Toks RNR vektorius pasižymi replikacinėmis savybėmis ląstelės citoplazmoje. Norint besireplikuojančią RNR supakuoti į virusinę dalelę, reikalingas pagalbininkas – sub-genominė RNR, patalpinta tarp 5' ir 3' UTR. Pagalbininkas gali būti ištisą ORF2 koduojanti RNR su 5' ir 3' UTR arba padalinta į dvi dalis, pav. 5'UTR – C- 3'UTR ir 5'UTR-E3, E2, 6K, E1 – 3'UTR. Toks pagalbininko padalijimas apsaugo nuo pilnaverčio viruso susiformavimo, kas nedideliu dažnumu stebima naudojant sistemą, susidedančią tik iš dviejų RNR – vektoriaus ir pagalbininko. Infekavus replikoninio vektoriaus RNR virusinių dalelių pagalba arba *in vitro* gauta RNR (elektroporacijos būdu įvedama į ląsteles), ši RNR yra transliuojama, translacijos produktas – RNR polimerazė daugina šią RNR, ji kepuojama ir transliuojama.

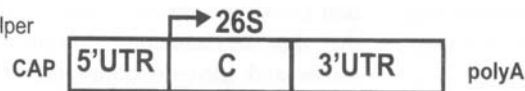
A. Single RNA helper system

Structural protein helper

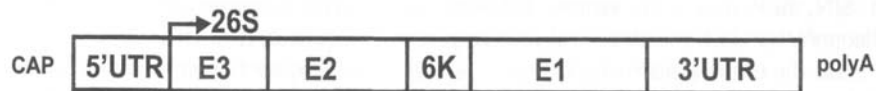


B. Double RNA helper system

Capsid helper



Glycoprotein helper

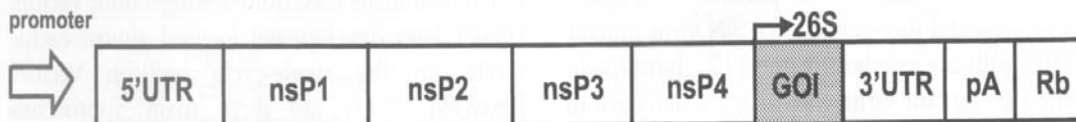


Pav. 4.23. Pagalbinės struktūros, pateikiančios viruso baltymus *trans*.

Tokiu būdu gaunama sistema citoplazmoje gaminanti RNR. To pasėkoje, įvedus nedaug RNR, galima gauti pakankamai daug produkto. Vektorių ir pagalbininkus galima įvesti ir DNR plazmidžių pagalba. DNR molekulėse viruso RNR koduojančios dalys prijungiamos prie RNR pol II promotoriaus. DNR patekus į branduolį, RNR-pol II transkribuoja RNR, ši modifikuojama ir transportuojama į citoplazmą, kur yra transliuojama. Susisintetinus RNR polimerazė atpažįsta šią RNR ir pradeda ją replikuoti. Tokiu būdu ląstelės citoplazmoje RNR dauginama ir transliuojama.

DNA-based replicon vector

RNA Pol II promoter



Pav. 4.24. DNR vektorius

Šios sistemos yra labai perspektyvios naujų vakcinų kūrimui. Įvedus labai mažą RNR kiekį, dėl replikacijos RNR pasidaugina ir to pasėkoje ląstelėse susintetinama pakankamai daug baltymo, reikalingo imuninio atsako sukėlimui. Jeigu

tokia RNR patenka į specializuotas antigeną prezentuojančias ląsteles, gaunamas labai geras ląstelinio imuniteto atsakas.

Siekiant vektorių nukreipti į norimas ląsteles, galima modifikuoti viruso paviršiaus glikoproteinus. Labai originalus modifikacijos būdas buvo pademonstruotas japonų (Ohno, Iijima ir kt.). Jie į glikoproteino sudėtį įjungė *Staphylococcus aureus* baltymo pA dalį, atsakingą už IgG surišimą. Jau seniai buvo nustatyta, kad *S.aureus* pA nespecifiškai ir labai efektyviai suriša žmogaus IgG. Tokiu būdu buvo suformuotas virusas, kuris suriša IgG. Paveikus tokį virusą *in vitro* su IgG, specifiniais kokiom nors ląstelėmis, šie IgG apkimba virusinę dalelę ir nuneš ją *in vivo* prie ląstelių, kurių paviršiaus komponentus jie atpažįsta. Kovai su vėžinėmis ląstelėmis buvo sukonstruotas vektorius, koduojantis TK geną. Jo paviršių paveikus IgG gautus prieš vėžinei ląstelei specifinius antigenus, šie nuneša virusinę dalelę prie vėžinių ląstelių, virusas jas infekuoja, tokiu būdu vėžinėse ląstelėse prasideda TK sintezė. Tokios ląstelės tampa jautriomis ganciklovirui.

Alfa-virusai infekuoja daugelio gyvūnų, tame tarpe žmogaus ląsteles ir sukelia nežymius susirgimo simptomus. Žmonės paprastai neturi antikūnų prieš šį virusą, todėl nėra pavojaus, kad imuninė sistema sunaikins vektorių. Alfa –virusai pasižymi tam tikru tropizmu limfiniams mazgams, todėl gana efektyviai infekuoja antigenus prezentuojančias ląsteles ir imuninis atsakas būna stiprus ir subalansuotas. Alfa-virusų vektorių galimybės, konstruojant įvairias vakcinas, pademonstruotos įvairiuose gyvūnų modeliuose. Vakcinacijai galima naudoti alfa-viruso pagrindu sukonstruotą RNR supakuotą į viruso baltymus arba nuogą RNR. RNR vakcinosis yra labai saugios, nes nėra pavojaus, kad RNR integruosis genomą. Pagrindinis šių sistemų privalumas yra antigeno sintezė ląstelėse, o tai užtikrina efektyvų CTL atsaką.

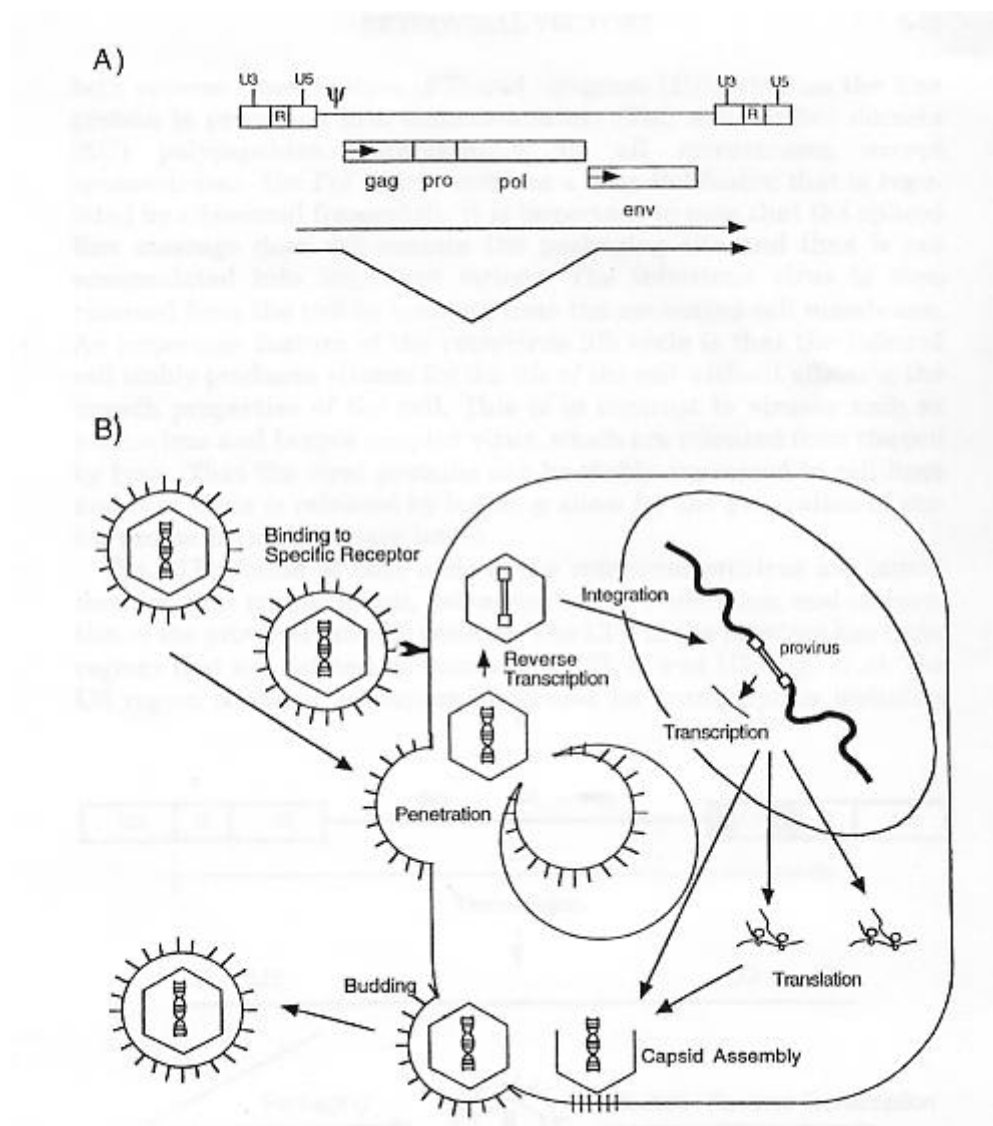
4.8. Retrovirusų vektoriai

Retrovirusų (RV) šeima *Retroviridea*, susideda iš daugelio visuose stuburiniuose randamų RNR virusų. Retrovirusų šeima skirstoma į tris pošeimius, *Oncovirinea* (ALV, MLV), *Lentivirinae* (SIV1, HIV1), *Spumavirinea* (HSRV). Retrovirusų genomą sudaro 10-15 kb viengrandė RNR. Virione randamos dvi identiškios RNR molekulės. Virusui patekus į ląstelę, viruso genomine RNR, viruso atsinešamos atvirkštinės transkriptazės (AT) pagalba verčiama į dvigrandę DNR, o pastaroji integruojama į genomą. Dažniausiai virusai integruojami į aktyvų genomą. Retrovirusai yra vieni iš populiariausių genų terapijos vektorių. Dauguma genų terapijos eksperimentų ir klinikinių taikymų atlikta su retrovirusų vektoriais (MLV – murine leukemia virus). Šių vektorių privalumas yra tai, kad su jais lengva manipuliuoti *in vitro*, gaunamas sąlyginai aukštas vektorinių retrovirusų titras, retrovirusų vektoriai gali pernešti santykinai nemažą genetinės informacijos kiekį, jie stabiliai integruojasi į genomą, dažniausiai nesukeldami jokių patogeninių požymių. Retrovirusiniai vektoriai gali infekuoti daug skirtingų ląstelių ir audinių tipų, tai yra pasižymi dideliu tropizmu. Retrovirusų vektorių trūkumas yra tai, kad jie gali infekuoti tik besidalinančias ląsteles (išskyrus lentivirusus), jų titras būna žemesnis, lyginant su adenovirusų vektoriais ar HSV vektoriais. Integracijos į genomą metu, retrovirusų vektoriai gali sukelti mutacijas, ko pasekoje ląstelės gali transformuotis.

Dabartiniuose klinikiniuose tyrimuose dominuoja MLV pagrindu sukurti vektoriai, tačiau labai aktyviai dirbama su lentivirusų pagrindu sukurtais vektoriais, nes jie gali infekuoti ir ramybės būsenoje esančias ląsteles. Retrovirusų (MLV) vystymosi ciklo schema pateikta paveikslėlyje. (A) Šioje schemeje pavaizduotas integruotas į žinduolio chromosomą MLV genomas, kuriame nurodyti pagrindinius baltymus koduojantys genai, Gag – vidiniai struktūriniai baltymai, Pro – proteazė, Pol – atvirkštinė transkriptazė (AT), Env – paviršiaus baltymai. Rodyklės rodo baltymo sintezės pradžia. Retrovirusuose, kaip ir daugumoje kitų RNR virusų, sintetinami dideli poli- baltymai, kuriuos sukarpo viruso koduojama proteazė į funkcionalius polipeptidus. Env baltymas sintetinamas naudojant splaisingo metu susiformavusią mRNR.

(B) šioje dalyje pavaizduotas MLV ciklas. Virusas susiriša su jam specifiniu ląstelės paviršiuje esančiu receptoriumi, su kuriuo tiesiogiai sąveikauja Env baltymas. Šios

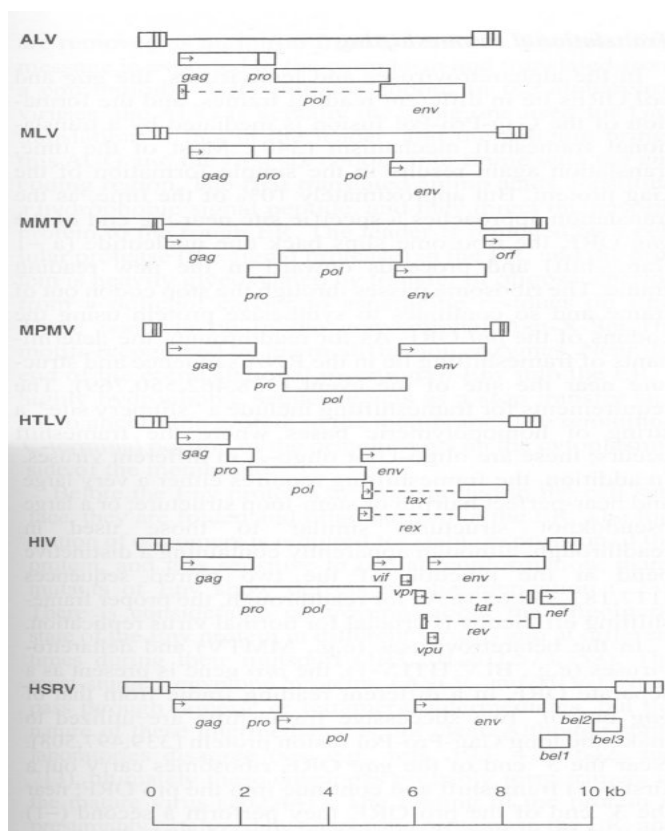
sąveikos dėka, viruso Env susilieja ir įsiskverbia į ląstelės vidų endosomų sistemos pagalba.



Pav. 4.25. MLV retrovirus vystymosi ciklas.

Viruso RNR, atsipalaidavusi iš viruso struktūros AT pagalba verčiama į DNR provirusą. Retrovirusai savo struktūroje visada turi supakavę AT ir tRNRlysi, tarnaujančią pradmeniu AT DNR sintezėje. Būtent viruso atsinešta AT ir atlieka provirusinės DNR sintezę. Ląstelės dalijimosi metu, kada suardoma branduolio sienelė, provirusinė DNR pasiekia šeimininko branduolį ir viruso integrazės pagalba integruojama į genomą. Integrazė, kaip ir AT yra koduojama Pol geno, viruso atsinešama į ląstelę viruso struktūroje. Branduolyje integruotas provirusas transkribuojamas, jo mRNR splaisuojama, transportuojama į citoplazmą translacijai.

Sintetinami viruso Gag, Pol, Env baltymai pakuoja pilno ilgio nesplaisinguotą viruso transkriptą suformuodami virusinę dalelę, kuri atsipumpuoja nuo ląstelės išorinės membranos ir išeina į aplinką. Virusų RNR pakavimui yra būtina specifinė viruso nukleotidų seka, vadinama psi (ψ) – pakavimo signalu. Splaisiuota Env RNR neturi pakavimo signalo, todėl nepakuojama. Virusų brendimo metu viruso poli-baltymai skaldomi į mažesnius – Gag skaldomas į MA (matriksą), CA (kapsidą), NC (nukleokapsidą) baltymus, kurie, kartu su 2 RNR molekulėmis sudaro struktūrinę viruso vidinę dalį. Kartu supakuojama pradmeniu tarnaujanti šeimininko tRNRlys, integrazė, AT. Pol poli-baltymas skaldomas į AT ir IN (integrazė), o Env poli-baltymas į TM (transmembraninis baltymas), SU (paviršiaus baltymas). Visuose retrovirusuose, išskyrus spumovirusus, Pol yra transliuojama kartu su Gag, kaip sulieti Gag – Pol struktūra, o Pol sintezė reguliuojama ribosomų translacijos fazės poslinkiu.



Pav. 4.26. Paveikslėlyje pateikti įvairių RV genomų organizacijos pavyzdžiai. Dėžutės vaizduoja atvirus skaitymo rėmelius, kurie koduoja atskirus baltymus ar poli-baltymus, kurie vėliau sukarpomi. Visi retrovirusai turi tris genų grupes *Gag*, *pol* ir *env*, koduojančias:

ALV –avian leukemia virus

MLV –murine leukemia virus

MMTV -mouse mammary tumor virus

MPMV -Mason-Pfizer monkey virus

HTLV -*humanT-lymphotropic virus*
 HIV –*human immunodeficiency virus*
 HSRV – *human spumavirus*

Retroviruso genomo galuose randamos LTR (*long terminal repeats*) sekos yra svarbios transkripcijai. LTR sekos yra svarbios poliadenilinimui, replikacijai ir proviruso DNR integracijai. LTR dydis svyruoja nuo 300 iki 1200 nt, priklausomai nuo viruso. LTR sudaryta iš trijų elementų, U3 (unikali 3'-galo seka), R (repeat – pasikartojanti seka), U5 (unikali 5'-galo seka). U3 sekoje lokalizuotas stiprus viruso promotorius ir enhanseris, kurie užtikrina efektyvią viruso genomo transkripciją proviruso būsenoje. Transkripcija prasideda nuo R srities. Tokiu būdu viruso RNR 5'-galas turi R ir U5 elementus, o 3'-galas – U3 ir R elementus, nes transkripcija baigiasi R gale prieš U5. Replikacijos metu, proviruso struktūroje 5'-gale papildomai atsiranda U3, o 3'-gale – U5 elementai.

Aukščiau pateiktas MLV vystymosi ciklas yra būdingas visiems retrovirusams, tačiau didesnieji retrovirusai – lentivirusai turi savo ypatumų, todėl panagrinėsime ir vieną pagrindinių lentivirusų pošeimės atovų HIV1 savybes.

HIV1 viruso vystymosi ciklas. HIV virusai, naudodamiesi ląstelių paviršiuje esančiais CD4 imunoglobino baltymo N-galo domenu ir vienu iš chemokinių receptorių, CXCR4 arba CCR5 (koreceptoriai), susiriša su ląstelėmis, patenka į ląstelę. Virusų RNR, atsipalaidavusi nuo virusų paviršiaus baltymų, replikuoja, virsdama į dvigrandę DNR, kuri transportuojama į branduolį ir integruojama į chromosomą. Dažniausiai integracija vyksta į aktyvų chromatiną. Integruota DNR transkribuojama ląstelės transkripcijos aparato, pilnas transkriptas pakuojamas į viruso baltymus, susiformavę virusai palieka ląstelę ir infekuoja kitas ląsteles.

Žemiau pateiktas lentiviruso HIV1 vystymosi ciklas bei HIV1 baltymai ir jų funkcijos

Gag	koduoja vidinius baltymus
Pol	koduoja AT, proteazę, integrazę
Env	koduoja paviršiaus baltymus, pirmtakas gp160 formuoja gp120 ir gp41

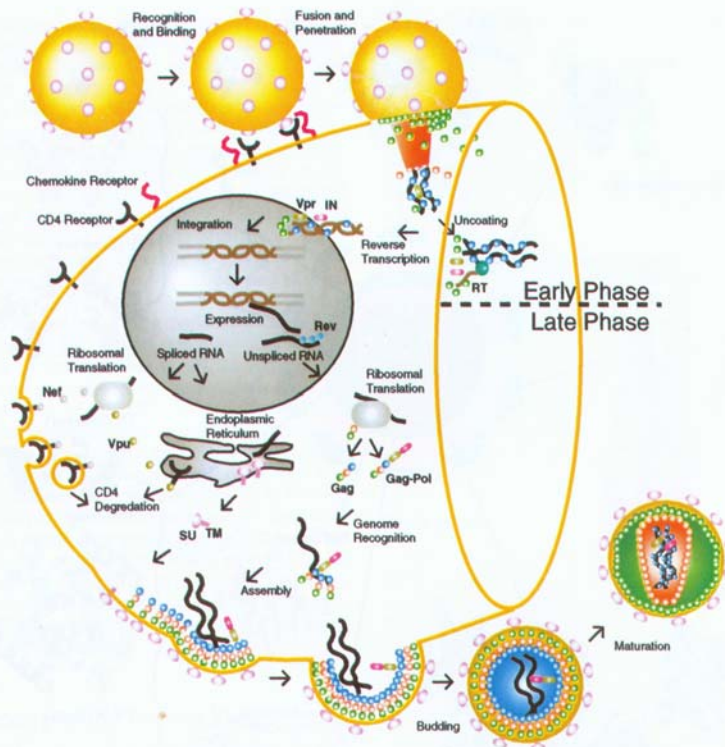


Figure 2. General features of the HIV-1 replication cycle. The early phase (upper portion of the diagram) begins with CD4 recognition and involves events up to and including integration of the proviral DNA, and the late phase includes all events from transcription of the integrated DNA to virus budding and maturation.

Pav. 4.27. HIV1 viruso vystymosi ciklas

HIV1 virione randami baltymai ir jų funkcijos:

SU paviršiaus glikoproteinas, gp120 (Env koduoja gp160, kuris skaldomas į gp41 ir gp120)

TM transmembraninis baltymas, gp41

MA matrikso baltymas, p17, apie 2000 kopijų (Gag)

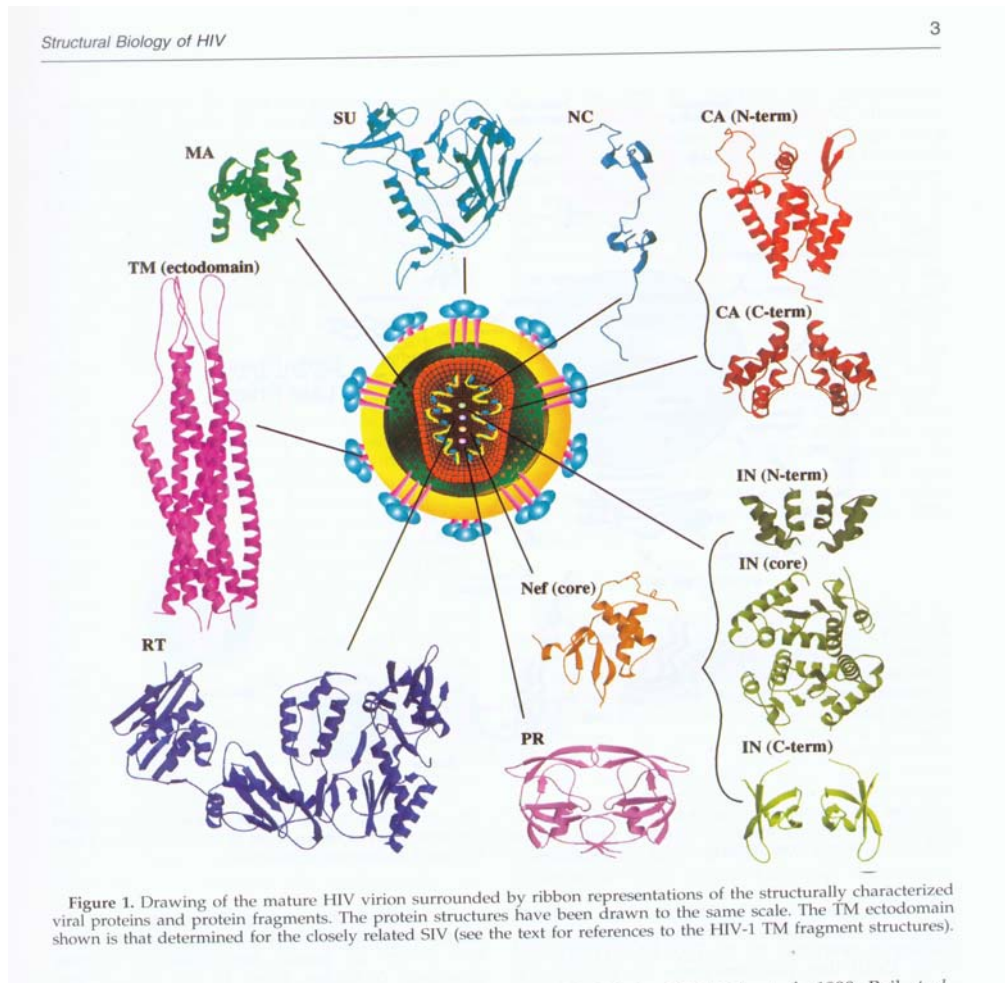
CA kapsido baltymas, p24, apie 2000 kopijų (Gag)

NC nukleokapsido baltymas, p7, apie 2000 kopijų (Gag)

PR proteazė, suskaldo Gag poliproteiną į MA, CA, NC

RT Atvirkštinė transkriptazė (Pol)

IN integrazė (Pol)



Pav. 4.28. HIV1 baltymai

Nef pašalina CD4 receptorius nuo ląstelės paviršiaus, nukreipia į endosomas degradacijai, apsaugo nuo imuninio atsako, mažina MHC I klasės ekspresiją, indukuoja apoptozę;

Vif reikalingas kai kuriose, bet ne visose ląstelių linijose; viruso struktūroje randama iki 100kopijų; būtinas kepenų ląstelių infekcijai;

Vpr nuveda į branduolį pre-integracinį kompleksą, sąveikauja su importinu- α ; sustabdo ląstelės ciklą G2 fazėje; indukuoja ląstelių diferenciaciją; inhibuoja apoptozę;

Ląstelės baltymai HMG-I(Y)

Pradmuo -tRNRlys

Regulatoriniai HIV1 baltymai:

Rev perjungia ankstyvą transkripciją (mažų, splaisinguotų RNR) į vėlyvą, pilno ilgio ir vieno splaisingo RNR; susiriša su ląstelės eksportinu ir ilgomis RNR, RRE (*Rev response element*) domenu ir GTP turinčiu Ran eksporto faktoriumi ir

transportuoja RNR į citoplazmą, po to grįžta atgal (turi NLS); stabilizuoja ilgą transkriptą;

Tat transkripcijos aktyvatorius, koduojamas trumpų RNR, susiriša su TAR domenu, atveda cikliną T, CDK9, histonų acetilazes – aktyvina viruso promotorių; išreguliuoja apoptozę; didina HIV1 ko-receptorių kiekį ląstelės paviršiuje; mažina IL2, didina IL6 sekreciją;

Vpu pašalina CD4 iš endoplazminio tinklo, kad netrukdytų Env baltymų translokacijai, nukreipia CD4 į Ubi-degradacijos kelią

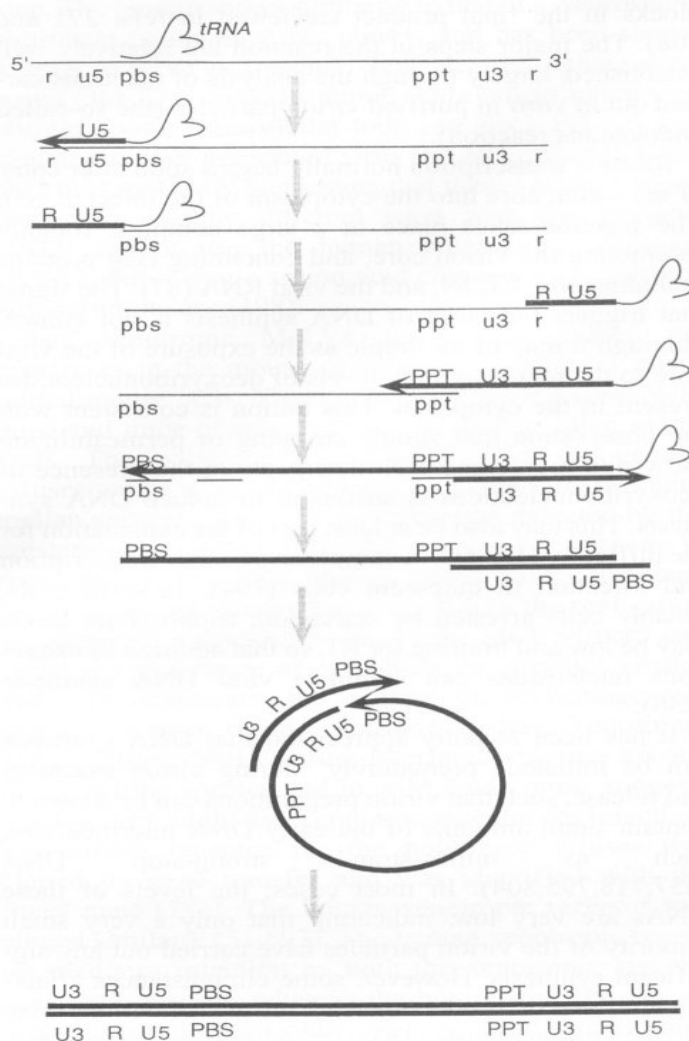
HIV1 receptorius - imunoglobino CD4 N-galas, koreceptoriai - chemokinių receptoriai CXCR4 ir CCR5. Viruso paviršiaus baltymui gp120 (SU) susirišus su CD4 receptoriumi, kinta gp120 konformacija, to pasėkoje jis ima papildomai sąveikauti ir su koreceptoriumi. *H. sapiens* populiacija su modifikuotu CCR5 yra nejautri HIV1 infekcijai. Lietuvoje yra apie 12% CCR5 mutacijos heterozigotų ir virš 1% homozigotų.

Tat, Rev, Nef koduojami trumpų splaisinguotų ankstyvųjų RNR Pilno ilgio, turinčios funkcionalius intronus, RNR koduoja gag ir gag-pol (gag-pol sintetinis dėl fazių poslinkio)

Vieno splaisingo akto ilga RNR koduoja Env, Vpu, Vif, Vpr

Retrovirusų replikacija.

RV replikacija pradeda viruso AT naudodama pradmeniu Lys-tRNR. AT ir Lys-tRNR virusas atsineša su savimi. Lys-tRNR prisijungia prie PBS (*primer binding site*) sekos. tRNR 3'-galas tarnauja replikacijos pradmeniu. AT sintetina DNR iki viruso RNR galo, kuri baigiasi R – seka. Baigus sintezę, RNazė H suskaldo RNR DNR-RNR hibrido sudėtyje, todėl viruso RNR sutrumpėja iki pbs sekos. Susintetinta DNR peršoka prie kito RNR galo, prisijungia prie komplementarios 3'-gale esančios r sekos ir AT tęsia DNR sintezę. Pasiekus PPT - poli-purinų traktą, RNazė H kerpa RNR, suformuodama 3' galą, kurį DNR AT naudoja antros DNR grandinės sintezei, jau naudojant DNR matricą. DNR sintezė vyksta dviem kryptimis, susintetinami du DNR fragmentai, kurių galuose yra komplementarios PBS sekos.



Pav. 4.29. Retrovirusų replikacijos schema

Viruso DNR molekulės dar kartą peršoka, susijungdamos komplementariomis PBS sekomis. Susiformavusi struktūra tarnauja dvigrandės DNR sintezei. Lentivirusų dvigrandė DNR transportuojama į branduolį ir integruojama, kitų retrovirusų DNR į branduolį gali patekti tik mitozės metu, kada branduolio membraninės struktūros suardomos. Todėl retrovirusai, išskyrus lentivirusus, infekuoja tik besidalijančias ląsteles ir negali infekuoti nesidalinančių ląstelių.

Tyrinėjant vėžį sukeliančius RV, buvo pastebėta, kad šie virusai gali dalį savo genomo pakeisti ląstelės genomo fragmentu. Onko-retrovirusuose randami ląstelės – šeimininko genai, atsakingi už vėžio sukėlimą, vadinami *v-onc*, jų atitikmenys chromosomoje - *c-onc*. Tyrinėjant onko-retrovirusus buvo identifikuota daug baltymų – onkogenų, kurių koduojančios sekos perkėlimas į RV sukelia ląstelių transformaciją. Tokiu būdu RV yra natūralūs vektoriai, galintys nedideliu dažnumu

įsijungti į savo struktūrą ląstelės genus. Tai paskatino RV panaudoti vektorių konstravimui.

RV, skirtingai nuo AdV virusų (adeno virusų), integruojasi į infekuotos ląstelės genomą. Tai užtikrina žymiai ilgesnį, tačiau silpnesnį ekspresijos lygį. Pirmieji RV vektoriai - pirmos kartos vektoriai, kuriuose įvestas transgenas kontroliuojamas LTR lokalizuotame promotoriumi (U3). Kaip taisyklė, transgenas, įvestas tokių vektorių pagalba funkcionuoja iki kelių dienų, po to nutildomas. Žmogaus ir kitų žinduolių genome apie 8% DNR sudaro įvairios neaktyvios retrovirusinės kilmės struktūros, tame tarpe LTR sekos. Jeigu pridėti įvairius retrotranspozonus LINE's, SINE's bei DNR transpozonus, tokios sekos sudaro apie 45% genomo. Visos šios sekos, tame tarpe promotoriai, yra neaktyvios, reguliuojamos epigenetiškai. Šis genų nutildymo fenomenas dar nėra pilnai ištirtas, siejamas su LTR sekų inaktyvacija dalyvaujant chromatiną pertvarkančioms sistemoms, šios sekos metilinamos ir heterochromatizuojamos. Todėl LTR promotorių nudojimas nėra perspektyvus.

RV patenka į branduolį tik mitozės metu (išskyrus lentivirusus), todėl RV vektoriai gali infekuoti tik besidalijančias ląsteles. Gana komplikotas yra šių vektorių nukreipimas į specifines ląsteles. Tačiau virusų tropizmas gali būti nesunkiai keičiamas modifikuojant *env* geną, formuojantį viruso paviršių. Pirmos kartos vektoriai ekspresuoja ir dalį savo baltymų, kurie mažiau imunogeniški, lyginant su AdV, tačiau vis tiek yra imuninės sistemos taikiniai, todėl infekuotos ląstelės su transgenų palaiptumui sunaikinamos.

RV vektorius patogų naudoti *ex vivo*, todėl iki šiol RV vektoriai daugiausia ir yra naudojami *ex vivo*, t.y. iš organizmo paimamos ląstelės, pav. kraujas arba kaulų čiulpu ląstelės, paveikiamos RV vektoriumi ir gražinamos atgal į organizmą. RV ir AAV (adeno-asocijuoti virusai) vektorių pagalba įvestų transgenų funkcionavimo laikas yra ilgiausias. Tobulinant šiuos vektorius, buvo sukurtos pakavimo linijos, kurios vietoje RV viruso paviršiaus baltymo *env* pateikiamas VSV-G (*vesicular stomatitis virus*) G baltymas. Šis baltymas efektyviau pakuoja viruso RNR *in vitro* ir praplečia vektoriaus spektrą. Šiuo metu didelis progresas pasiektas tobulinant RV vektorius lentivirusų pagrindu, tokių kaip HIV, SIV (*simian immunodeficiency virus*). Šie vektoriai yra intensyvaus tyrimo stadijoje. Lentivirusų vektorių panaudojimo pagrindinė problema yra baimė dėl jų saugumo. Daroma viskas, kad išvengti bet kokios galimybės iš vektoriaus susiformuoti aktyviam HIV virusui.

RV vektoriai konstruojami įterpiant papildomus genus į retroviruso genomą vietoje kokių nors viruso genų. Būtina palikto LTR sekas, pakavimo signalą, PPT sritį. Visą kitą geno dalį galima pateikti *trans* padėtyje, tai yra papildomų pagalbinių virusų arba plazmidžių pagalba sukuriama taip vadinama pakavimo ląstelių linija, kurios sintetina visus reikalingus viruso baltymus, bet neturi pilno RV geno, kurį galėtų supakuoti ir suformuoti virusines daleles. Į tokias ląsteles įvedus plazmidę su LTR sekomis, pakavimo signalu, PPT seka, tarp LTR sekų esantys genai yra transkribuojami nuo LTR U3 srities promotoriaus, transkriptas pakuojamas į virusines daleles, kurios pumpuruojamos į aplinką. Tokiu būdu gaunamos RV dalelės, turinčios svetimus genus. Pakavimo sistema pavaizduota Pav. 4.29.

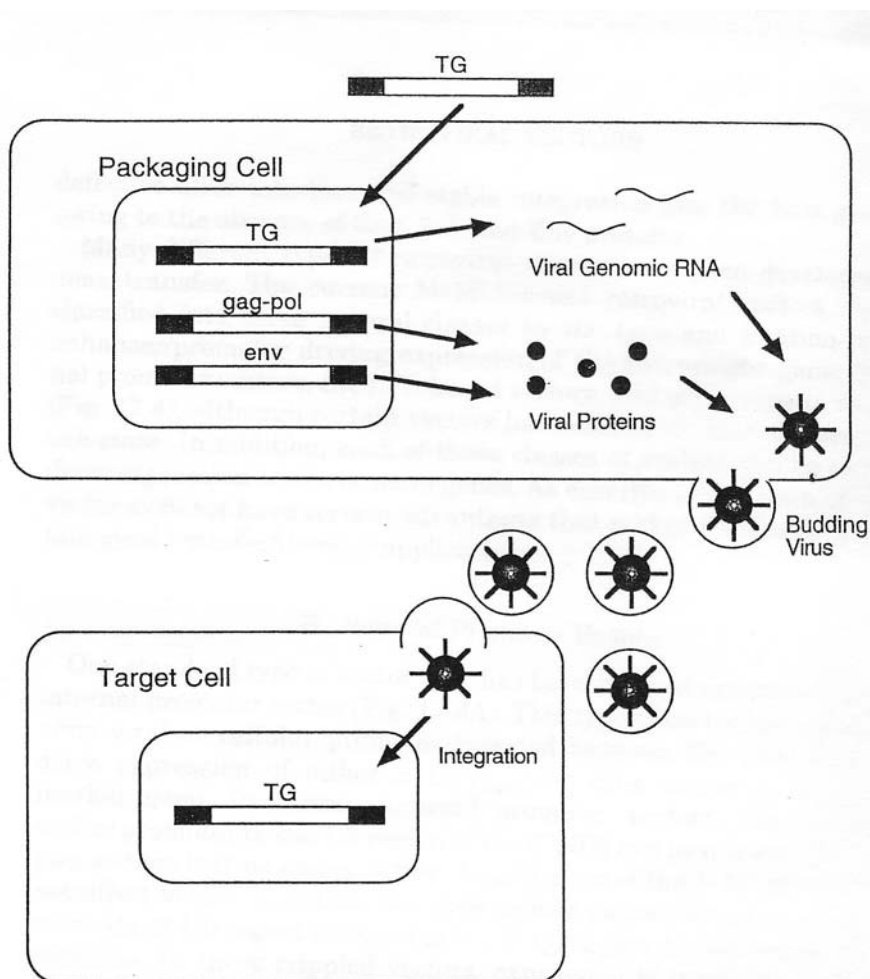


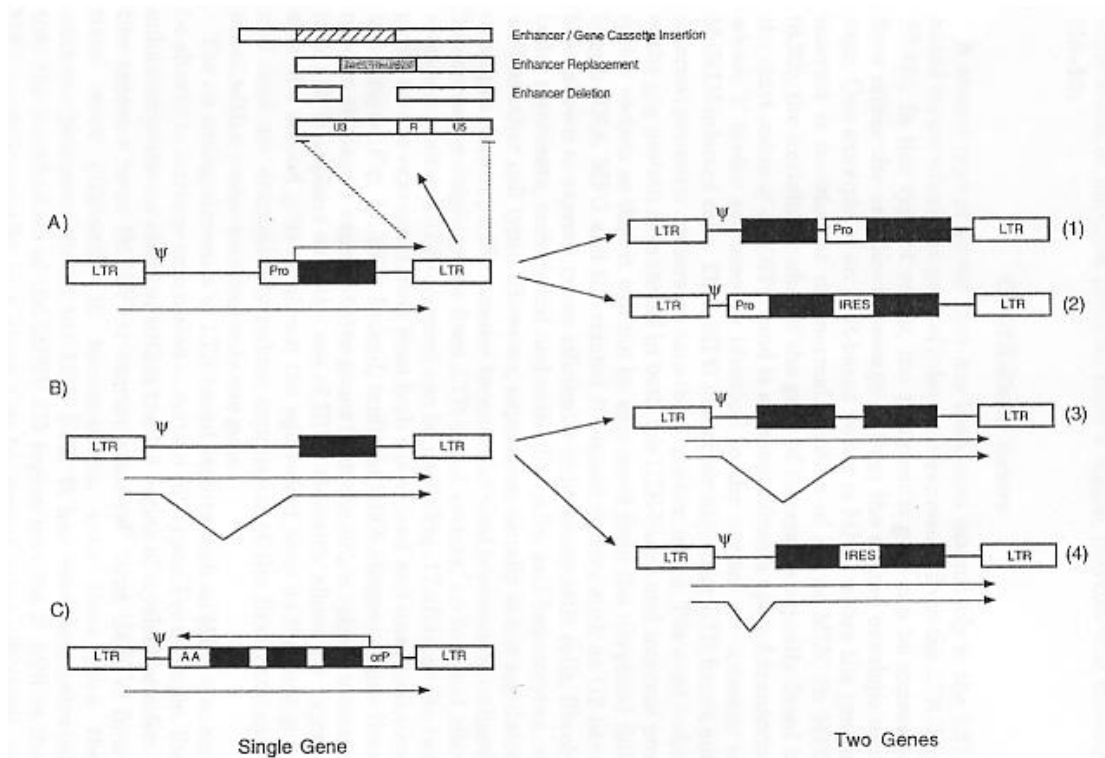
Fig. 17.9. Diagram of the three general types of retroviral vectors. (A) internal packaging system. (B) packaging cell system. (C) packaging cell system with a packaging signal.

Pav. 4.30. Retrovirusų vektoriaus funkcionavimas

TG – tikslinis genas (*target gene*) patalpinamas struktūroje tarp LTR. Kartu su genu šioje struktūroje yra pakavimo seka bei PPT seka. Gag-Pol ir Env pateikiami

dviejų skirtingų retrovirusų struktūrų pagalba. Tai daroma todėl, kad iš pagalbinių elementų nesusiformuotų RV. Gag-Pol ir Env koduojami baltymai supakuoja įvesto vektoriaus transkriptą ir suformuoja virusines daleles, kurios išgryninamos ir panaudojamos tikslinių ląstelių ar organų infekcijai. Infekcijos metu viruso nešama RNR verčiama į DNR ir integruojama į genomą.

Žemiau paveikslėlyje pateikti trijų RV vektorių kartų vektorių pavyzdžiai.



Pav. 4.31. RV vektorių pavyzdžiai. (A) Vektoriai su vidiniu promotoriumi; (B) Vektoriai naudojantys LTR promotorių; (C) Vektoriai su genų kasete bei savo promotoriaus-enhanserio sistema. Paveikslėlyje parodytos vieno ar keleto genų ekspresijos sistemos. Juodos dėžutės vaizduoja genų koduojančias sekas, baltos – intronus ir nekoduojančias sekas. A.R. – poliadenilinimo sekos. Pro – promotorius, užtikrinantis TG transkripciją. IRES – (internal ribosome entry site) užtikrina antro geno, esančio toje pačioje RNR molekulėje, transliaciją. Paveikslėlyje taip pat pavaizduotos galimos LTR sekų modifikacijos. Modifikavus 3'galo LTR U3, po atvirkštinės transkripcijos ši seka atsiduria LTR 5'-gale.

Lentivirusų vektoriai

Lentivirusų vektoriai konstruojami tais pačiais principais, kaip ir kitų RV. Jų talpa yra didesnė, nes virusai didesni, be to, jie infekuoja ir ramybės būsenoje esančias ląsteles. Lentivirusų RNR pakavimui taip pat panaudotas VSV-G baltymas (*vesicular stomatitis virus*), o tai padidina vektoriaus tropizmą, t.y. įgalina vektorių infekuoti daugiau skirtingų ląstelių, ląstelių infekavimui tampa nebereikalingi CD4 receptoriai.

Ląstelės infekcijai HIV1 virusu yra būtini bent du paviršiaus baltymai, kuriuos virusas panaudoja prisijungimui. Tai CD4 baltymo imunoglobino N-galo domenas, su kuriuo susiriša viruso SU (gp120) baltymas ir vienas iš chemokinių receptorių, CXCR4 arba CCR5. Sukurtos pakavimo linijos, *trans* pateikiančios visus viruso susiformavimui reikalingus baltymus. Siekiant išvengti natyvaus viruso susiformavimo, į naujausios kartos vektorius įeina tik 5% viruso genomo (pakavimo signalas, modifikuotos LTR sekos dalis, kur promotoriaus U3 seka pakeičiama kitais promotoriais ir PPT – polipurinų traktas, būtinas replikacijai bei patekimui į branduolį), o pakavimo ląstelėse palikta tik 25% lentiviruso genomo. Tokiu būdu kuriami saugūs lentivirusų vektoriai, be HIV infekcijos pavojaus. Lentivirusai turi daug privalumų, lyginant su kitais RV – jie turi papildomus baltymus, kurie jų DNR susintetintą citoplazmoje nukreipia į branduolį, kur ji integrazės pagalba integruojasi į chromosomą. Kitų RV DNR patenka į branduolį tik mitozės metu. Tokiu būdu, lentivirusų vektoriai sugeba infekuoti ir nesidalijančias ląsteles, tame tarpe nervines ląsteles. SIV panaudojimas yra dar perspektyvesnis, nes beždžionių virusas dar sumažina galimus pavojus.

5. Genų terapija

Genų terapija, t.y. gydymas, ligos eigos sulėtinimas arba apsaugojimas nuo susirgimo funkcionalių genų įvedimu į organizmą, yra tam tikra revoliucija medicinoje. Pirmieji genų terapijos bandymai atlikti praeito dešimtmečio pradžioje. Pastaraisiais metais pasirodė daug publikacijų, skirtų pirmo genų terapijos dešimtmečio rezultatų apžvalgai, rezultatų įvertinimui, perspektyvų apžvalgai.

Genų terapija gali būti taikoma tiek įgimtų, tiek įgytų ligų gydymui. Šiuo metu jau žinoma keli šimtai genų, kurių mutacijos sukelia paveldimus susirgimus. Tokių genų skaičius sparčiai didėja, nes žmogaus genomą ir genų funkcijas tiriamos nepaprastai greitai, pasirodė pirmi genomo apžvalginiai straipsniai (2001, Vasario 16-17 *Nature* ir *Science* publikacijos, 2003 m. - užbaigtas genomą, 2004 papildomai paskelbta euchromatino DNR), bet praeis, matomai, dar daug metų, kol viskas bus sudėliota į vietas, nes žinduolių genomą žymiai sudėtingesnis, lyginant su mielių, ne tik nukleotidų porų skaičiumi, bet ir genų organizacija. Šiuo metu monogeninių ligų ir išaiškintų atitinkamų genų turime tikrai pakankamai, todėl reikalinga sugebėti įvesti atitinkamus sveikus genus į reikiamus organus, reikiamus audinius ir priversti juos ten funkcionuoti.

Genų įvedimo metodai:

Genų įvedimo sistemas ir metodus galima suskirstyti į (1) virusinės kilmės vektorius, (2) nevirusinės kilmės DNR įvedimo sistemas tame tarpe fizinius DNR įvedimo metodus.

5.1. Virusinės kilmės vektoriai

Virusai evoliucionavo kartu su žmogaus organizmu, prisitaikė efektyviai infekuoti įvairias ląsteles ir pajungti ląstelės sistemas savo komponentų sintezei. Idealus virusinis vektorius genų terapijai būtų viruso struktūra išlaikiusi galimybę efektyviai infekuoti ląsteles, tačiau nesintetinti viruso baltymų, kurie skatina viruso replikaciją, turi toksišką poveikį bei sukelia CTL atsaką. To siekiama šalinant viruso genus, jų produktus pateikiant *trans* pakavimo ląstelių linijose. Paliekami tik tie viruso elementai, kurie būtini *cis* padėtyje, tai nukleorūgščių pakavimo signalai, replikacijai būtini signalai, kaip taisyklė, galinės kartotinės sekos. Šios sekos būtinos

sukonstruotų struktūrų replikacijai, jų supakavimui į virusinę dalelę, integracijai į šeimininko chromatiną. Ekspresijos kasetė su terapeutiniu genu klonuojama į viruso “pagrindą”, t.y. minimalią viruso genomo struktūrą, pakeičiant virusinius genus. Pašalinti genai, reikalingi replikacijai ar viruso dalelės formavimui pateikiami pakavimo ląstelėse *trans*. Pakavimo ląstelės transfekuojamos vektoriaus genomu bei pakavimui reikalingomis defektyviomis viruso konstrukcijomis, formuojančiomis *trans* reikalingus produktus. Tokiu būdu pakavimo ląstelėse suformuojamas vektorių turinčios virusinės dalelės. Recombinantinės virusinės dalelės gryninamos, įvertinamas jų kiekis bei grynumas. Viena iš pagrindinių rekombinantinių virusinių dalelių charakteristikų yra galimybė gauti aukštus jų titrus, virusinių dalelių stabilumas, bandymų atsikartojamumas. Šiuo metu labiausiai paplitę yra penkios vektorių klasės, sukurtos AdV, AAV, onko-retrovirusų -RV, lentivirusų ir HSV (*herpes simplex-1 virus*) virusų pagrindu. Kiekviena vektorių klasė pasižymi skirtingomis savybėmis, priklausomai nuo poreikio, pasirenkamas vienas ar kitas vektorius. Pagal galimybę integruotis į genomą, vektorius galime suskirstyti į dvi grupes, RV, lentivirusai ir AAV (10%) integruojasi į genomą. AdV, HSV1 ir AAV (90%) funkcionuoja kaip ekstrachromosominiai elementai episominėje būsenoje. AAV priklauso abiem klasėms, nes apie 10% jų integruojasi į 19 chromosomos specifinę vietą, tačiau didelė dalis lieka episominėje būsenoje.

Vektoriai, kurie negali integruotis, naudojami laikinai geno raiškai gauti besidalijančiose ląstelėse, arba ilgalaikiai raiškai – nesidalijančiose ląstelėse. Norint gauti pastovią geno raišką proliferuojančiose ląstelėse, naudojami integruojantys vektoriai. Tačiau susiduriama su problema, kad integruotų vektorių transkripcija po tam tikro ląstelių generacijų kiekio įvairiais mechanizmais yra nuslopinama. Klinikiniuose tyrimuose daugiausiai naudojami onko-RV vektoriai, ypač bandymuose *ex vivo* infekuojant kraujodaros (*haematopoietic*) kamienines ląsteles. Pagrindinis šių vektorių trūkumas yra jų galimybė infekuoti tik besidalijančias ląsteles. Šis trūkumas buvo neseniai įveiktas, prijungus prie RV matrikso baltymo NLS (*nuclear localization signal*) – į branduolį nukreipiantį signalą. Tokiu būdu jau rastas būdas, kaip modifikuoti tradicinius RV vektorius ir infekuoti ramybės būsenoje esančias ląsteles. Tokie vektoriai gali infekuoti kraujodaros kamienines ląsteles be papildomo proliferacijos stimuliavimo citokiniais.

Lentivirusų vektoriai naudojami daugiausiai ramybės būsenoje esančių ląstelių infekcijai (kraujodaros kamieninės ląstelės, nervinės ląstelės, smegenų ląstelės). Jie

nesukelia ryškaus uždegiminio atsako, o tai sumažina ir imuninio atsako formavimąsi prieš vektorių ir vektorių turinčias ląsteles.

Vektoriaus tropizmas, transgeno ekspresijos laikas ir vektoriaus imunogeniškumas yra bene svarbiausios vektorių savybės. AdV vektoriai, kaip taisyklė, yra imunogeniški, sukelia uždegiminį atsaką, jų pagalba įvedamas genas dažniausiai funkcionuoja trumpai. Tačiau šie vektoriai randa taikymą gydant kraujagyslių ir koronarinių arterijų sutrikimus, kur reikalinga tik laikina geno raiška. Taip pat vėžio atveju, kada vektoriaus imunogeniškumas ir toksiškumas padeda sunaikinti vėžines ląsteles. Šiuo metu jau bandomi ir mažo imunogeniškumo AdV vektoriai, juose pašalinta didžioji genomo dalis.

AAV vektorių sistemos gali pasitarnauti ilgai ekspresijai, todėl gana intensyviai vystomos. Šie virusai gali infekuoti nesidalijančias ląsteles, be to nesukelia jokių pastebimų ligos požymių, nesukelia uždegiminės reakcijos. Pagrindinis jų trūkumas yra maža talpa. Šį trūkumą bandoma įveikti tendemiškai integruojant kelis virusus, tokiu būdu formuojant geną iš dalių, kurios sujungiamos RNR lygyje dėka splaisingo signalų.

HSV-1 (*Herpes simplex virus*) virusas yra pats didžiausias ir sudėtingiausias iš genų terapijoje naudojamų virusų. Šių vektorių privalumas yra didelė talpa, bei galimybė infekuoti nervines ląsteles. HSV-1 reziduoja nervinėse ląstelėse. Nesireplikuojantys HSV-1 kilmės vektoriai gali talpinti iki 40 kb svetimą DNR, t.y. vieną pilną vidutinio dydžio geną. Jų talpa dar padidinta kuriant amplikoninius vektorius, sudarytus iš bakterinės plazmidės, turinčios HSV-1 ori sritį ir viruso pakavimo signalą. Tokia struktūra supakuojama į virusinę dalelę (principas panašus į kosmides). Neseniai su tokiu vektoriumi buvo gauta hypoksantino fosforiboziltransferazės geno ekspresija audinių kultūrose. Šio geno dydis yra 115 kb.

Pastaruosiu metu intensyviai konstruojami hibridiniai vektoriai, stengiantis viename vektoriuje apjungti kelių vektorių gerąsias savybes. AAV pasižymi galimybe integruotis į 19 chromosomos specifinį lokusą. Buvo pabandyta šią savybę perduoti AdV. Tam reikalingi AAV Rep baltymai bei AAV ITR sekos. Buvo gauti AdV ir HSV amplikonai, integruojantys AAV būdu. Tokie vektoriai dar yra pradinėse tyrimų stadijose.

Labai daug įvairių vektorių konstruojama kovai su vėžinėmis ląstelėmis. Tai vektoriai, selektyviai besireplikuojantys vėžinėse ląstelėse. Tokie vektorių tyrimai sudaro apie 64% visų genų terapijos klinikinių tyrimų. Daug įvairių skirtingų metodų

naudojama vėžinių ląstelių naikinimui. Tai vektoriai, turintys anti-angiogenetinius faktorius, stabdantys kraujagyslių tinklo vystymąsi auglyje, vektoriai, turintys vėžio supresijos genus, tokius kaip p53, imuno-stimulatorinius genus ar tiesiog vektorius, kurie lizuoja ląstelę. Dauguma onkolytinių virusų sukonstruota AdV ir HSV-1 pagrindu. Manoma, kad “virusų terapija” jau greitai bus naudojama klinikose.

HSV-1 viruso mutantas, neturintis TK geno, būtino jo replikacijai, žymiai geriau replikuojasi vėžinėse ląstelėse, nes jose paprastai yra padidinta ląstelės TK ekspresija. Tokiu būdu virusas naikina vėžines ląsteles. Iš tokių vektorių šalinami ir kiti genai, siekiant sukurti optimalų antivėžinį vektorių. Pav. pašalinus ICP34.5 baltymą koduojantį geną, atsakingą už apoptozės inhibiciją, infekuotos ląstelės greičiau žūsta. Pašalinus kitą replikacijai reikalingą geną, koduojantį ribonukleazę-reduktazę, taip pat padidėja viruso tropizmas vėžinėms ląstelėms, nes vėžinėse ląstelėse padidintas pastarasis aktyvumas.

Konstruojant antivėžinius vektorius, didžiausi pasiekimai ląstelių kultūrose gauti AdV vektoriaus pagalba. Tam tikslui sukurti AdV be E1B-55kDa geno. Šis genas blokuoja infekuotoje ląstelėje apoptozę. Tokie virusai nesidaugina sveikose ląstelėse, nes sukelia apoptozę, tačiau gerai dauginasi vėžinėse ląstelėse, kuriose apoptozė blokuota (pav. dėl p53 geno mutacijos). Parodyta, kad tokie vektoriai gana efektingai naikina vėžines ląsteles. Kitas populiarus ir efektyvus vektoriaus variantas – E1A genas, kuris būtinas viruso replikacijai, prijungiamas prie vėžinei ląstelei arba audiniams specifinių promotorių. Pav. PSA (prostato specifinis antigenas), kalikreino 2 promotorius, AFP (alfa –fetoproteinas), TRP1 – tyrosinazės genas specifinis melanocitams, albumino promotorius – kepenims ir daugelis kitų specifinių konkrečiam vėžiniam audiniui arba organui, promotorių. Tokiu būdu sukurtas sąlyginai besireplikuojantis virusas, specifinis tam tikroms ląstelėms. Laukinio tipo AdV infekuoja visas ląsteles, turinčias CAR receptorių (coxsackie/ adenovirus receptor). Pastaruoju metu sukurti vektoriai 10000 kartų efektyviau dauginasi vėžinių ląstelių, negu normalių ląstelių audinių kultūrose (2001 m. kompanija Onyx pradėjo klinikinių tyrimų III fazę). Matomai, AdV tipo vektoriai bus naudojami trumpalaikiai ekspresijai. Jeigu bus sukurti efektyvūs integracijos mechanizmai, galimybės prasiplės. Dažnai viruso-terapija kombinuojama su kitomis terapijos priemonėmis ir duoda teigiamus rezultatus.

Pagrindinė genų terapijos problema yra imuninė sistema. Dažnai organizmas jau buvo susidūręs su genų terapijai naudojamu virusu, todėl vektorius ar vektorių

turinčios ląstelės greitai sunaikinamos. Be to, įvedamas transgenas gali būti priimamas kaip svetimas, todėl prieš jį formuosis imuninis atsakas. Siekiant išvengti imuninio atsako prieš vektorių, stengiamasi pašalinti maksimaliai daug viruso genų, konstruojant sudėtingas pakavimo sistemas, pateikiančias viruso baltymus *trans*, kuriami taip vadinami *gutless* arba *helper dependent* vektoriai.

Dažnai tas pats vektorius skirtingiems asmenims sukelia skirtingą uždegiminį ir imuninį atsaką. Iki šiol neužmirštama nesėkmė 1999 m. rugsėjo mėn. JAV Pensilvanijos universitete klinikiniuose tyrimuose, gydant įgimtą ornitino transkarbamylazės (OTC) deficitą. OTC yra kepenų fermentas, pašalinantis azoto perteklių, susidarantį iš baltymų ir aminorūgščių. Amonio susikaupimas kraujotakoje sukelia encefalopatiją, smegenų pažeidimus, komą. OTC pilna blokada sukelia mirtį tuoj po gimimo, tuo tarpu dalinė blokada leidžia išgyventi griežtos dietos sąlygomis. Bandymuose dalyvavo 18 savanorių, sergančių švelnia OTC deficito forma. Vienas iš dalyvių, 18 m. amžiaus Jese Gelsinger gavo didžiausią vektoriaus dozę – 3.8×10^{13} AdV virusinių dalelių (be E1 ir E4 genų) į kepenų arteriją. Jo antikūnų prieš AdV titro duomenys neišsiskyrė iš kitų eksperimento dalyvių. Moterys, gavusios 3.6×10^{13} AdV dozę pernešė be komplikacijų, tuo tarpu J.Gelsingeriui po 4 val. pakilo temperatūra, kitą dieną ėmė reikštis kepenų pažeidimo simptomai, prasidėjo plintanti kraujo koaguliacija kraujagyslėse. Jis mirė nuo daugelio organų pažeidimo. Tuo tarpu kiti dalyviai tyrimus pakėlė sėkmingai. Ši nesėkmė ilgam sustabdė genų terapijos bandymus JAV. Skrodimas parodė, kad nors virusas buvo suleistas į kepenų arteriją, didelis jo kiekis buvo rastas kraujotakoje, susikaupė blužnyje, limfiniuose mazguose, kaulų čiulpuose, sukėlė uždegiminę reakciją, privedusią prie kraujo koaguliacijos. Buvo suabejota naudojamų gyvulinių modelių patikimumu.

Paraleliai Paryžiuje 2000 m. (*Science*, 2000m. balandžio mėn.) aprašyti sėkmingi eksperimentai gydant SCID-X1 (*severe combined immunodeficiency*), su X chromosoma susijusį sutrikimą, blokuojantį T ir natūralių kilių (NK) ląstelių diferenciaciją dėl mutacijos γc citokino receptoriaus subvienete, kuris yra bendras kelių interleukinų (IL-2, -4, -7, -9, -15) receptoriams. Ši mutacija pertraukia signalo, būtino *lymphoid progenitor cells* augimui, diferenciacijai, ir išgyvenimui. Tokie kūdikiai – berniukai, vadinami *bubble-boys* – balioniniai berniukai, nes jie auginami specialiuose sterilumą užtikrinančiuose balionuose.

Schemoje žemiau pateiktos γc citokino receptoriaus funkcijos.

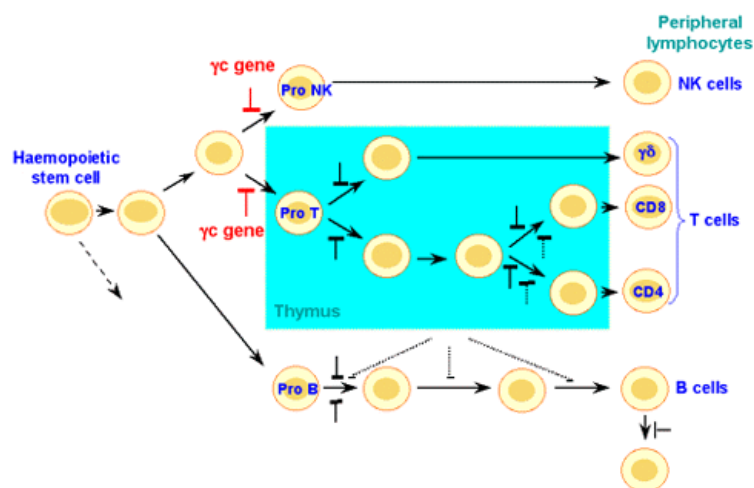


Figure 1 Hereditary abnormalities of the immune system (\perp) perturbing lymphocyte development.

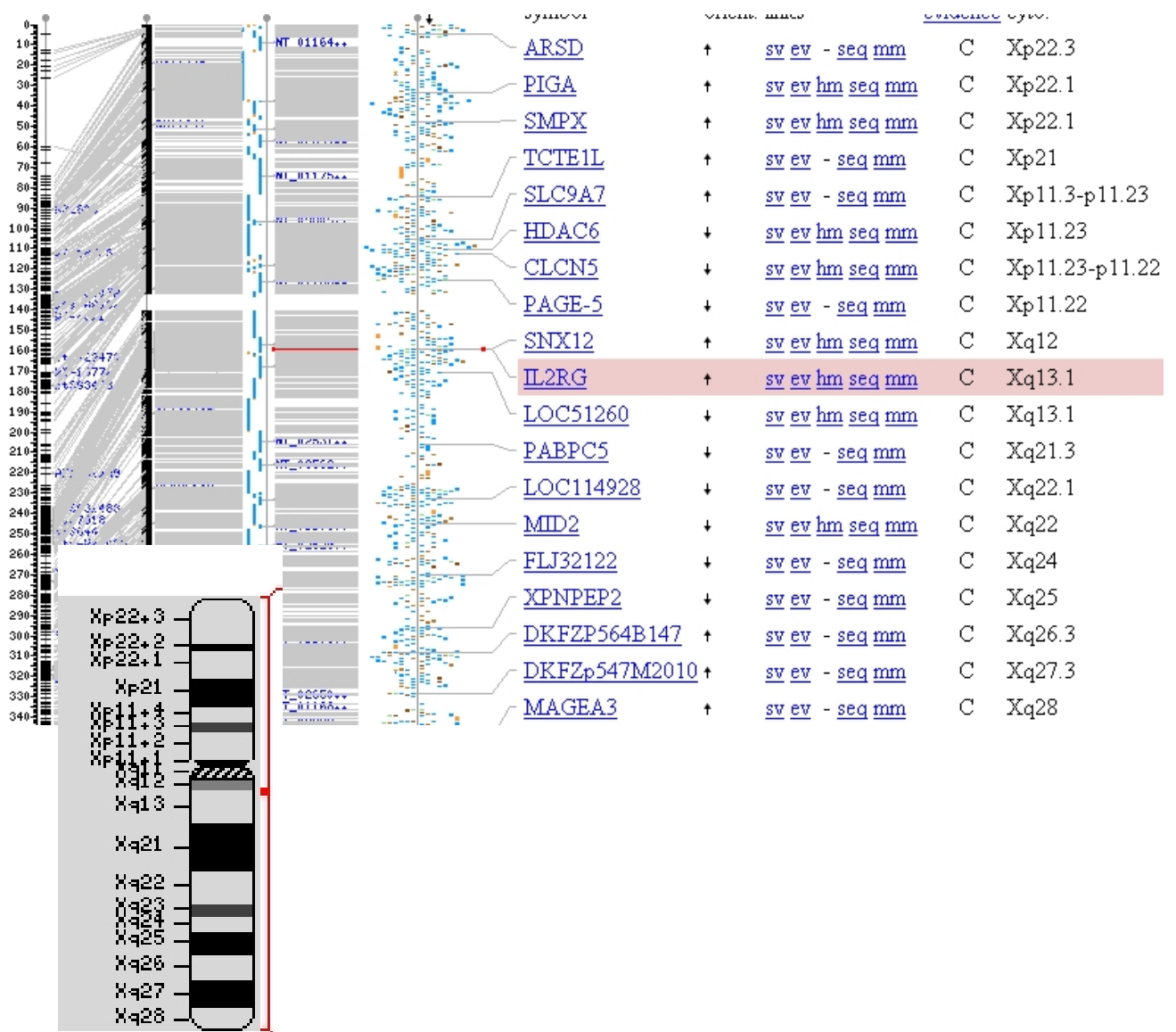
Pav. 5.1. Citokinių receptoriaus γc funkcijos



Pav. 5.2. Buble Boy.

Hematopoetinės kamieninės ląstelės $CD34^+$, išskirtos iš kaulų čiulpu (19×10^6 - $17 \times 10^6/\text{kg}$) buvo stimuliuotos citokiniais ir *ex vivo* infekuotos pelių retroviruso MLV vektoriumi, turinčiu žmogaus γc receptoriaus geną ir gražintos atgal 1-11 mėn. amžiaus trims kūdikiams. Po 10 mėn konstatuota, kad visiems vaikams T, B ir NC

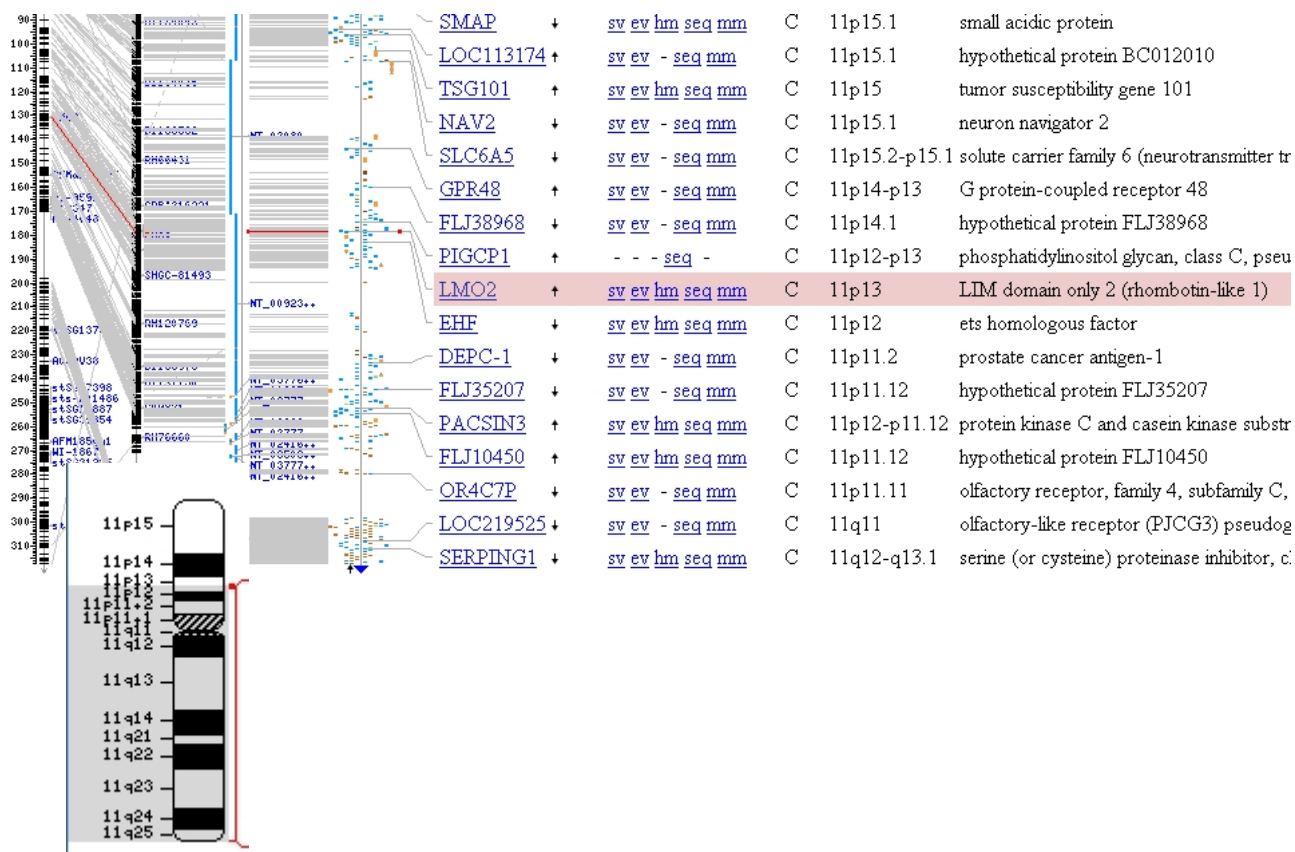
ląstelių kiekis yra toks pat, kaip bendra.r.mžių. Buvo bijomasi, kad genai neišsijungtų, tačiau jie iki šiol (2005 m.) funkcionuoja. Panašų eksperimentą 2002 m. sėkmingai pakartoja anglai, vėliau italai. 2002 metų gale Prancūzijoje paaiškėjo, kad iš 10 sėkmingai atliktų kūdikių gydymo variantų, dviems išsivystė leukemija. Vėžinės T-ląstelės susiformavo abiem atvejais dėl vektoriaus insercijos į LMO2 geno aplinką. Neseniai panaši insercija buvo rasta ir pas trečią gydytą ligonį, tačiau jam leukemija neišsivystė.



Pav. 5.3. *H.sapiens* X chromosoma

LMO2 genas yra 11 chromosomoje (LIM-only 2), jis priskiriamas protoonkogenų grupei. Vektoriaus integracija koreliavo su ląstelių hiperprolifracija

ir aktyvavo LMO2 geno transkripciją. Šis genas yra svarbus hematopoezėje ir leukemogenezėje, geno koduojamas baltymas yra apjungianti hemopoetinių genų regulatorinio baltymų komplekso dalis, šis baltymas veikia ir transkripcijos faktoriumi, yra svarbus ląstelių proliferacijoje.



Pav. 5.4. *H.sapiens* 11 chromosoma

Aprašytuose genų terapijos eksperimentuose hematopoetinės kamieninės ląstelės buvo rekonstruotos įvedant citokinų receptorių ir patyrė daug ląstelės dalijimusi kuriant pilnavertį T-ląstelių repertuarą. Buvo stipri selekcija modifikuotų ląstelių proliferacijai. Matomai, LMO2 aktyvacija labai sustiprino šių klonų galimybę proliferuoti ir privedė iki malignacijos. Reikia pastebėti, kad leukemija neišsivystė vyresniems kūdikiams, gydytiems virš 3 mėn. amžiaus. Reikia pažymėti, kad nė vienas iš šių berniukų nemirė. 2004 m. tokių išgydytų berniukų jau buvo virš 20.

Daug eksperimentuojama gydant kitą SCID formą, sukliamą ADA (adenozino dezaminazės) mutacijos. Šią mutaciją galima kompensuoti reguliariomis fermento injekcijomis arba funkcionalaus ADA geno įvedimu.

Hemofilija (A ir B) taip pat patogus modelis genų terapijai. Sukurti transgeniniai šunys ir pelės neturintys faktoriaus IX (B). Kitas pelių hemofilijos

modelis – beta-tasalemija (A), sukelta globinų lokusų pakenkimais. Pirmos fazės klinikiniai tyrimai su ligoniais atliekami, įvedant faktorių IX koduojantį geną AAV pagalba į raumenis.

Daug dirbama gydant cistine fibrozę, paveldimą susirgimą dėl mutacijų CFTR gene, koduojančiame baltymą *cystis fibrosis transmembrane conductance regulator*, reguliuojantį H₂O ir Cl⁻ jonų apykaitą (formuoja cATP reguliuojamą Cl⁻ kanalą) kvėpavimo takų epitelio ląstelėse, taip pat įtakojantį Na⁺ apykaitą (hyperabsorbicija), bei antibakterinių baltymų sekreciją. Mutacijų pasėkoje formuojasi tirštesnės gleivės, jos sunkiau valomos, kolonizuojamos bakterijų. Ligoniams yra būdingi dažni kvėpavimo takų uždegimai. Šia liga sutinkama maždaug 1/3000 dažnumu baltaodžių tarpe. Atlikta daug bandymų, naudojant RV, AdV vektorius. Pagrindinė problema yra mažas infekcijos efektyvumas. Paaiškėjo, kad gleivinė gana patikimai apsaugo kvėpavimo takų epitelį nuo virusų, tame tarpe vektorių infekcijos. Siekiant padidinti infekcijos vektoriumi efektyvumą, pradėti konstruoti vektoriai, naudojant kvėpavimo takų virusus, kurie pasižymi savybe infekuoti kvėpavimo takus.

Genų terapija – jaunas mokslas šiuo metu vystosi nepaprastai sparčiai. Susiduriama su daug iki tol nežinomų, nelauktų problemų, tokių kaip genų nutildymas retrovirusų sudėtyje, genų nutildymas, integravus daug geno kopijų, chromatinio modifikacijų problemos ir daugelis kitų. Kol kas genų terapija – vienas iš labiausiai pažinimą stimuliuojančių procesų. Nesėkmės skatina ieškojimus.

5.2. Nevirusiniai genų įvedimo metodai

Nuoga DNR

Nuogą DNR galima naudoti injekcijoms į odą arba į raumenis ir tokiu būdu gauti gana efektyvią laikiną genų ekspresiją. DNR patekimas į branduolį nėra visiškai aiškus, bet faktas, kad ji ten patenka ir kurį laiką funkcionuoja, iki kelių dienų. To pakanka suformuoti humoralinį ląstelinį atsaką. Ląstelinis atsakas formuojasi, jeigu DNR patenka į dendritines arba kraujo ląsteles, kurios geba prezentuoti ląstelėje sintetinamą antigeną. Lyginant su AdV ir AAV, genų pristatymas į ląsteles, naudojant nuogą DNR, mažai efektyvus, tačiau laikinai ekspresijai tinkamas. Paaiškėjo, kad nemetilintas CpG sekas turinti DNR pasižymi stipriomis adjuvanto savybėmis, stimuliuoja uždegiminius citokinus, tačiau tokie adjuvantai netinka

chroniškų ligų atveju. Tikriausiai galima įvesti ir besireplikuojančią DNR, tuo prailginti genų funkcionavimą.

Kad pagerinti DNR patekimą į ląstelę, DNR padengiama įvairiais junginiais.

Katijoniniai lipidai

Katijoniniai lipidai dėka elektrostatinės sąveikos padengia DNR ir padeda jai susiliesti su ląstelių membranomis, ryškiai pagerina DNR patekimą *ex vivo*. Tokios sistemos išbandytos įvedant DNR tiesiai į kvėpavimo takų epitelines ląsteles, leidžiant į plaučių venas cistinės fibrozės atveju. II fazės klinikiniai tyrimai atliekami, siekiant užmušti vėžines ląsteles. Šiuo atveju, laikina ekspresija patenkina.

Kondensuotos DNR dalelės

Katijoniniai polimerai geba DNR sukondensuoti, panašiai, kaip chromatiną, apsaugoti nuo degradacijos. Šiems tikslams naudojamas polilizinas, polietileniminas. Atskirais atvejais parodyta, kad šis metodas veikia geriau, už nuogą DNR, bet tik keletas tokių atvejų aprašyta *in vivo*. Problema tame, kad susiformuoja per dideli agregatai, tai trukdo patekti į ląstelę ar audinį. Ląstelėje tokios struktūros patenka į endosomas, iš kurių reikia išsivaduoti endosomas ardančių agentų pagalba (chloroquine). Privalumas – paprastas preparatų paruošimas, jų stabilumas.

Injekcija be adatos

Norint, kad DNR efektyviau patektų į ląstelę, naudojami *gene-gun*, kuris suspaustu heliu šauna aukso dulkes su adsorbuota DNR į paodį. Kitas būdas - dideliu slėgiu spaudžiamas tirpalas. Tai ypač pagerina imuninį atsaką vakcinacijos metu su nuoga DNR. Paodyje DNR patenka į dendritines ląsteles, kurios pasižymi APS.

Elektroporacija

In vitro, ex vivo DNR įvedimui sėkmingai gali būti taikoma elektroporacija.

6. Transgeniniai gyvuliai

Rekombinantinių DNR technologijų sukūrimas įgalino izoliuoti individualius genus bei perkelti juos į norimą organizmą. Tokiu būdu tapo įmanoma įveikti evoliucijos eigoje susiformavusį genetinės informacijos mainų tarp rūšių barjerą.

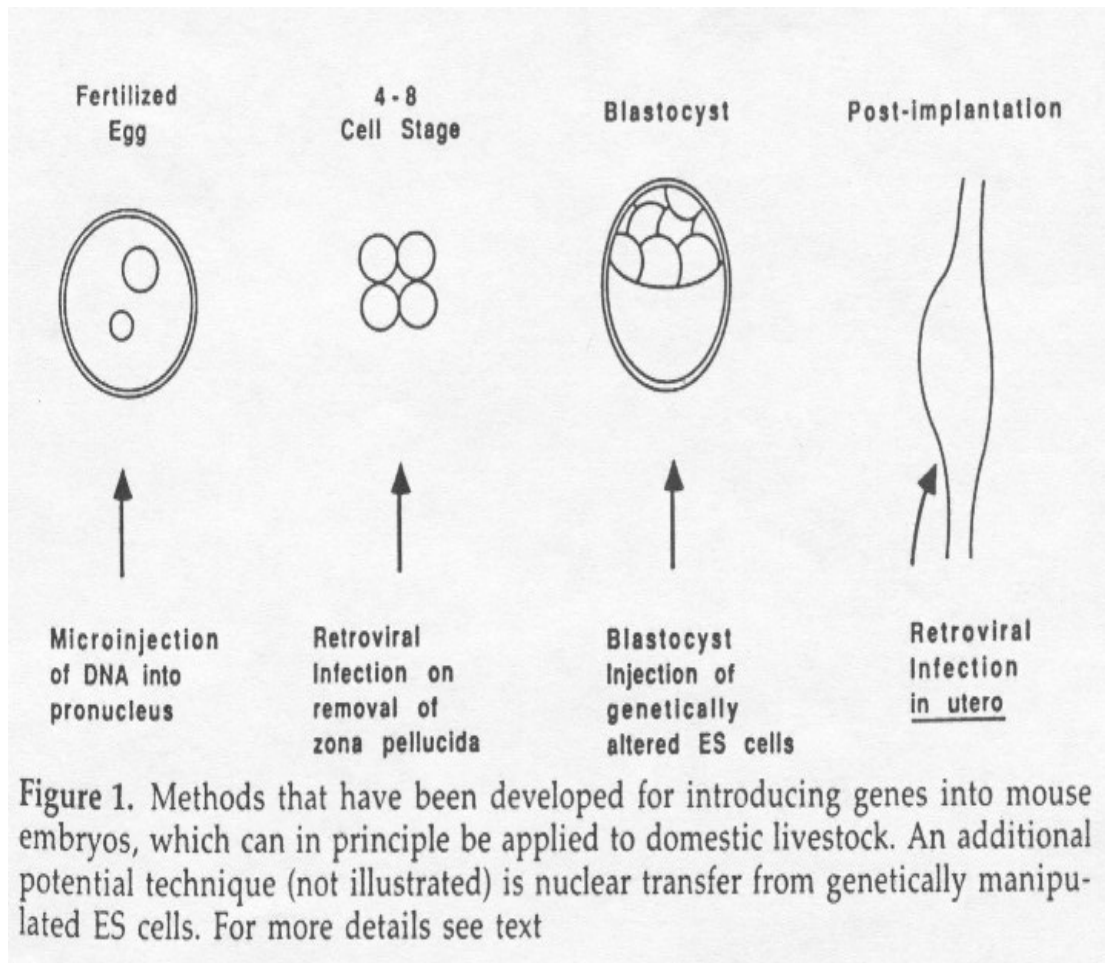
Genetiškai modifikuoti gyvūnai galėtų atnešti didelę naudą tiek žemės ūkiui, tiek medicinai. Todėl transgeninių gyvūnų kūrimas prasidėjo prieš keletą dešimtmečių, o pagrindiniai metodai konstravimo principai buvo sukurti jau daugiau kaip prieš dešimt metų ir nelabai pasikeitė iki šiol. Kuriant transgeninius gyvulius yra labai svarbi įstatyminė bazė, kontroliuojanti ir ribojanti tokius tyrimus, siekiant išvengti gyvulių kankinimo.

Pagrindiniai transgeninių gyvulių konstravimo principai ir patyrimas sukauptas pelių modeliuose. Vektorių pagalba genai dažniausiai įvedinėjami (1) į apvaisintą kiaušialąstę, (2) į apvaisintą kiaušialąstę po keleto pasidalijimų, 4-8 ląstelių stadijoje, (3) blastocystos stadijoje, įvedant genetiškai modifikuotas embrijonines kamienines ląsteles (EK), o veiksmingiausias metodas yra blastocystos stadijoje pakeisti blastomeros stadijoje esančias ląsteles genetiškai modifikuotomis EK ląstelėmis.

EK ląstelių izoliavimas ir kultivavimo įvaldymas labai supaprastino transgenezės technologijas. EK (*embryonic stem cell lines* – ES). Šios ląstelės kilę tiesiogiai iš blastocystos, dauginamos kaip kultūra, gali būti transportuojamos. Šios ląstelės yra pluripotentinės ir gali vystytis į visas ląstelių linijas embrione, jeigu jos, pašalinus diferenciacijos inhibitorius, įnjektuojamos į blastocystą. EK gali būti palaikomos kaip stabilios ląstelių kultūrų linijos. Į tokias ląsteles įvairiais būdais (virusiniais vektoriais, elektroporacija ir kt.) galima įvesti reikalingus genus, atrinkti ląsteles, kuriose įvestas genas funkcionuoja, pastarąsiais padauginus įvesti į pelės blastocystą.

Ne visų gyvūnų EK ląstelių technologijos taip išvystytos, kaip pelių. Pastaraisiais metais ypatingai daug dirbama su kamieninėmis įvairių organizmų ląstelėmis, siekiant jas panaudoti transgenezėje, organų regeneracijai ir kitiems tikslams. Darbai su žmonių kamieninėmis ląstelėmis griežtai kontroliuojami įstatymų.

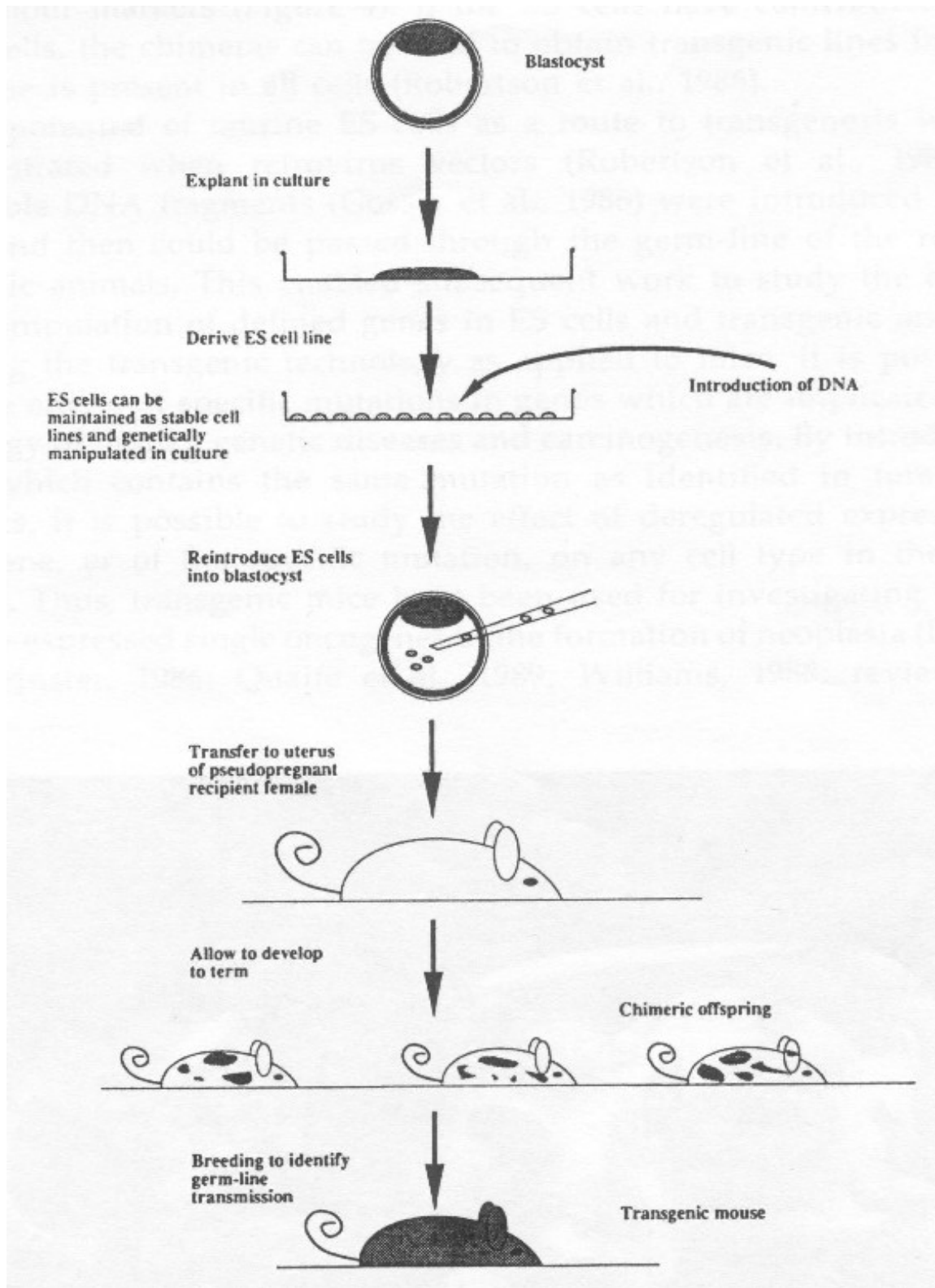
Transgeninės pelės konstravimo schema pateikta paveikslėlyje.



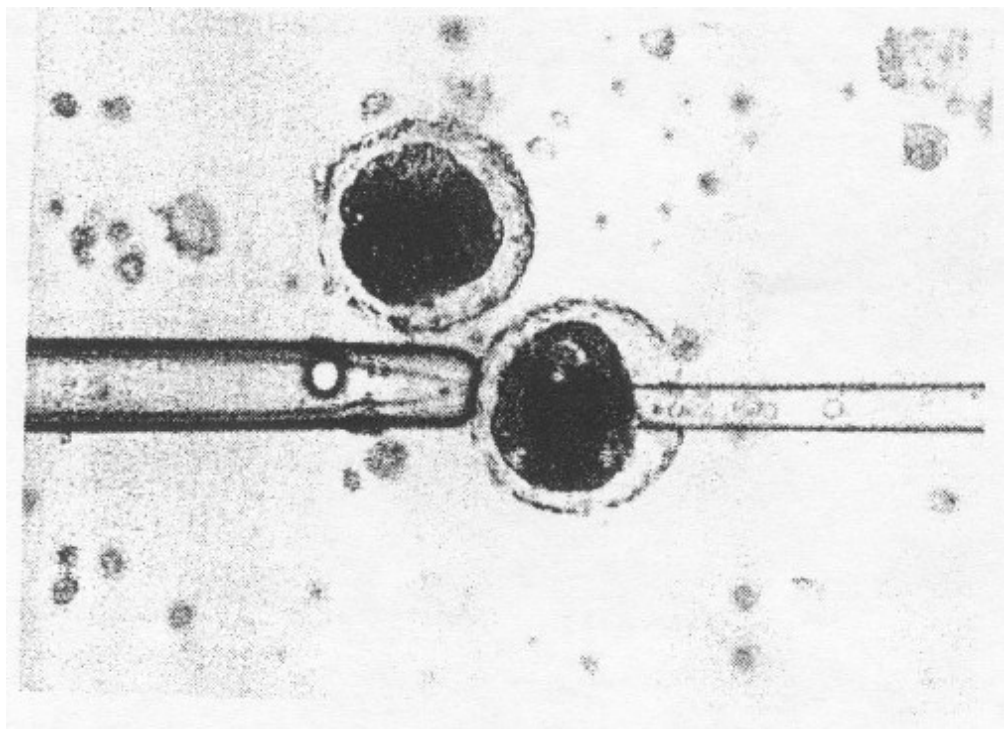
Pav. 6.1. Genų įvedimo schemos

Paveikslėlyje pateikta genų įvedimo schema į pelių embrionus įvairiose stadijose. Panašios schemos naudojamos ir naminių gyvulių atveju. Paveikslėlyje nėra dar vienos, populiarios metodikos – branduolio perkėlimas iš genetiškai modifikuotos EK ląstelės.

Sekančioje schemoje pavaizduota EK ląstelių izoliavimas ir panaudojimas transgeninių pelių gavimui. EK ląstelės kilę iš blastocystos ląstelių, paverstų kultūra. Modifikuotos EK įvedamos į embriono blastocystos ertmę ketvirtoje dienoje po pelės apvaisinimo. Tai atliekama specialia pipete ir mikroinjektoriumi. Injekuota blastocysta perkeliama į pseudo nėščios pelės gimdą, kuri yra hormonais suderinama blastocystos implantacijai. Alternatyvus kelias yra EK įvedimas į embrioną.



Pav. 6.2. Trasgeninés pelés konstravimo schema



Pav. 6.3. Paveikslėlyje viršuje fotomikrogramoje matome EK ląstelių mikroinjekciją į kiaulės blastocystą. Pipetė kairėje laiko blastocystą. Pipetė su EK yra dešinėje pusėje. Pipetė su EK yra įvedama į blastocystą ir ląstelės injekuojamos.

Patogumo dėlei, eksperimentuose naudojamos skirtingų spalvų pelės. Jeigu EK linija gauta iš baltų pelių, recipientu naudojama juoda pelė. Gimę balti peliukai bus transgeniniai.

Transgeniniai gyvūnai yra kuriami tiek mokslo tikslais, tiek praktiniais tikslais. Labai daug darbų buvo atlikta siekiant pagerinti maisto produktų kokybę ir išeią. Pelių modeliuose sukūrus transgenezės metodus, jie buvo išbandyti gyvuliuose.

Jau seniai buvo žinoma, kad augimo hormono (AH) injekcijos labai skatina kiaulių, avių, karvių ir kitų gyvulių augimą bei pieningumą. Daug eksperimentų buvo atlikta su kiaulėmis ir avimis, siekiant pagreitinti jų augimą įvedant papildomai daug augimo hormono genų kopijų. Pelių modelyje buvo pademonstruota, kad pelės, turinčios žiurkės ar žmogaus AH papildomus genus, reguliuojamus metalotioneino promotoriumi (indukuojamas sunkiaisiais metalais – Zn^{++}) augo greičiau, užaugo dvigubai didesnės. Atlikus panašius bandymus su kiaulėmis, paaiškėjo, kad kiaulės auga panašiai, kaip kontrolinės, yra kaulingos, turi daugiau raumenų, mažiau lašinių, nevaisingos ir labai liūdno išvaizdos, t.y. nesveikos išvaizdos, jautrios stresams,

letargiškos. Kiaulėms buvo įvesta daug kopijų AH genų, kontroliuojamų įvairiais promotoriais. Ne visi genai funkcionavo, kai kurias atvejais AH kiekis buvo net mažesnis, lyginant su kontroliniais gyvuliais. Padidintas AH kiekis buvo stebimas tik nedaugelyje gyvulių. Panašūs rezultatai buvo gauti ir su avimis, transgeninės avys augo panašiai, arba lėčiau už kontrolines. Po tokių eksperimentų buvo labai sugriežtinti darbo su gyvuliais įstatymai, sukurtos bioetikos taisyklės, draudžiančios kankinti gyvulius, kurti gyvulius su kenčiančio gyvulio išvaizda.

Tuo metu, kada buvo atliekami šie bandymai, buvo manoma, kad žinduoliuose, kaip ir *E. coli* bei *S.cerevisiae*, geno kopijų skaičiaus didinimas turėtų didinti to geno produkto kiekį. Pastaraisiais metais, pastebėjus RNRi reiškinių ir ištyrinėjus šio reiškinių dėsninumus, tapo žinoma, kad homologiškų genų kopijos slopina genų raišką.

Gana daug sėkmingų gyvulių buvo sukonstruota panaudojant pieno baltymus koduojančių genų promotorius, siekiant sukurti gyvulius su pakeista pieno sudėtimi. Bandoma sukurti gyvulius, kurie kartu su pieno baltymais, produkuotų formacijos pramonei reikalingus baltymus. Iki šiol nepralenktas rekordas, pasiektas 1991 metais (Wright ir kt.), kada buvo sukonstruota transgeninė avis, žmogaus α 1-antitripsino producentas. Ši avis piene produkavo 35 g/l α 1-antitripsino. Tai sudaro maždaug pusę visų pieno baltymų. Geno ekspresijai buvo panaudotas avies β -laktoglobulino geno promotorius, funkcionuojantis tik pieno liaukose. Reikia pastebėti, kad tokie sėkmingi rezultatai pasiekiami labai retai, stebimas didžiulis heterologinių baltymų sintezės lygio skirtumas tarp atskirų transgeninių gyvulių. Tobulo gyvulio – heterologinio baltymo producento, sukonstravimas reikalauja daug lėšų. Sukonstravus gyvulį – heterologinių baltymų producentą, iškyla problema gauti jo palikuonis, išlaikančius reikalingas savybes. Kryžminimo metu, kaip taisyklė, šios savybės prarandamos. Iš kilo natūralus gyvulių klonavimo poreikis. Neatsitiktinai pirmas klonuotas gyvulys buvo avis.

Daug praktinių rezultatų pasiekta, gerinant galvijų pieno kokybę, įvedant žmogaus genus, koduojančius *H.sapiens* motinos pienui būdingus baltymus. Motinos piene yra apie 3000 kartų daugiau lizocimo (apie 400 μ g/ml), lyginant su karvės pienu (0.130 μ g/ml). Lizocimas neleidžia daugintis bakterijoms. Motinos piene taip pat yra žymiai daugiau laktoferino - apie 1.7 mg/ml laktoferino, tuo tarpu karvės piene tik 0.02-0.2 mg/ml. Laktoferinas padidina geležies kiekį piene, tai labai svarbu naujagimiams, bei pasižymi stipriomis antibakterinėmis savybėmis. Žmogaus piene

yra Tokiu būdu, atliekami bandymai, siekiant karvės pieno sudėtį priartinti prie *H.sapiens* pieno. Svetimi genai į EK ląsteles paprastai įvedami naudojant virusinius vektorius arba nuogą DNR.

Kita transgeninių organizmų konstravimo kryptis yra skirta pažinimui, siekiant išsiaiškinti genų funkcijas organizmo lygyje, bei tirti įvairius reiškinius organizmo lygyje. Šiuose bandymuose dažniausiai atliekamas ne naujų genų įvedimas, bet atvirkščiai, geno pašalinimas, siekiant išsiaiškinti pašalinto geno funkciją ir reikšmę. Genų pašalinimui arba inaktyvavimui naudojama specifinė terminologija: geno funkcijos nutraukimas vadinamas geno nokautu. Norint nokautuoti geną, reikalinga homologinės rekombinacijos būdu tiriamą geną arba jo dalį, t.y. pagrindinius egzonus pakeisti koki nors genetinį požymį koduojančia DNR. Genetiniu markeriu tokio tipo eksperimentuose dažniausiai naudojamas atsparumo neomicinui genas (koduoja amino glikozid-3'-fosforibosil transferazę, izoliuotas iš Tn5) užtikrina atsparumą kanamicinui ir neomicinui bakterijose ir G418 antibiotikui eukariotuose). Žinduoliuose specifinė homologinė DNR sekų rekombinacija, priešingai mielėms, yra labai neefektyvi. Homologinės rekombinacijos tikimybė yra tik apie $10^{-3} - 10^{-7}$. Todėl imamasi įvairių gudrybių, siekiant atskirti ląsteles, kuriose įvyko homologinė rekombinacija, nuo ląstelių, kuriose DNR įsistatė atsitiktinai.

Norint gauti homologinę rekombinaciją ir tokiu būdu nokautuoti tikslinį geną, konstruojama DNR, galuose turinti nokautuojamam genui homologiškas sekas, apie 10-15 kb iš abiejų galų. Tarp šių homologiškų sekų patalpinamas selekcijai naudojamas genas – dažniausiai *neo*. Tokia konstrukcija nedideliu dažnumu integruosis į tikslinį geną ir jį inaktyvuos. Tačiau didžioji dalis DNR integruosis atsitiktinai. Siekiant atrinkti homologinius rekombinantus, prie vienos iš homologinių nokautuojamam genui sekų prijungiamas genas, koduojantis toksišką geną, pav. choleros ar difterijos toksinų genas arba virusų TK geną. Jeigu vyksta nehomologinė rekombinacija, ji vyksta per įvestos DNR galus, nes DNR galai yra žymiai rekombinogeniški. Tokiu atveju, kartu su įsistatančia DNR į ląstelės genomą įvedamas ir toksiškas genas. Jeigu tai toksino genas, jis užmuš ląsteles, kuriose šis genas integruosis ir ekspresuojasi. Jeigu tai virusų TK genas, tokios ląstelės žus auginamos terpėje su gancikloviru arba BrdU. Tačiau tose ląstelėse, kuriose rekombinacija vyko per homologines sekas, įvedamos sekos gale esantis toksiškas genas nebus įjungiamas į genomą, todėl tokios ląstelės nežus auginamos terpėje su gancikloviru ar BrdU. Tokiu būdu atrenkamos EK, kuriose įvyko homologinė

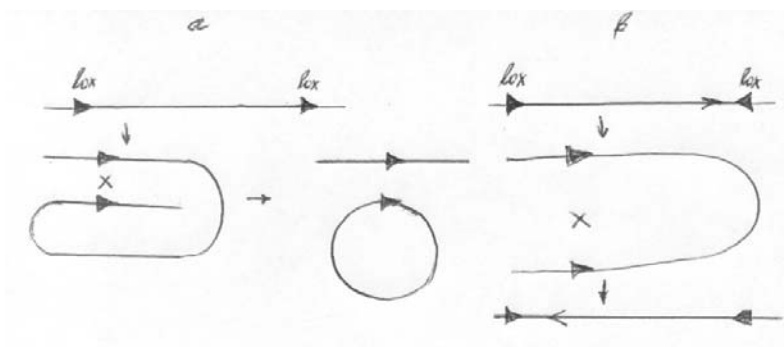
rekombinacija. Tokios ląstelės įvedamos į pelės blastocystą, gaunama transgeninė pelė, turinti pažeistą tiriamąjį geną.

Iš mikroorganizmų genetikos seniai žinoma, kad kai kurių genų mutacijos yra letalios. Konstruojant transgenines peles, buvo pastebėta, kad kai kurie embrionai žūsta įvairiose embriogenezės stadijose. Reiškia, tiriamas genas funkcionuoja embriogenezės stadijose ir yra būtinas embriono vystymuisi. Norint sužinoti, ar toks genas yra svarbus vėlesnėse vystymosi stadijose, reikalinga išmokti išjungti geną duotu organizmo vystymosi momentu, konkrečiame organe. Norint sukurti sistemas, leidžiančias išjungti geną duotu momentu, panaudota mikroorganizmų specifinės rekombinacijos sistemos: (1) mielių *S.cerevisiae* 2mμ plazmidė turi *FLP* rekombinazę, kuri atlieka rekombinaciją per specifines sekas; P1 bakteriofagas turi *cre / lox* sistemą (*cre* – causes of crossing over; *lox* – locus of crossing over). *FLP* ir *Cre* baltymai priklauso fermentų – integrazių klasei..

P1 *cre* baltymas atpažįsta *lox* seką, kuri atrodo sekančiai:

5'-ATAACTTCGTATA atgtatgc TATACGAAGTTAT

Lox seka susideda iš 2 priešingos krypties 13 bp pasikartojimų (paryškinta). Rekombinazė *cre* susiriša su šiais 13-tukais. Viduryje esanti seka – šerdis, nedalyvauja atpažinime, tačiau šioje sekoje vyksta rekombinacija.

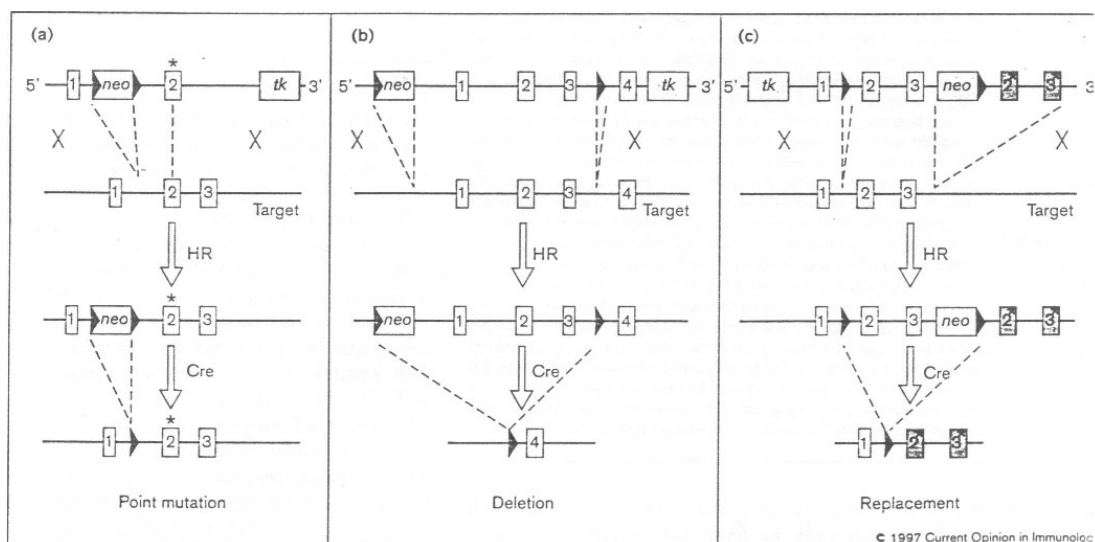


Pav. 6.4. Cre/lox rekombinacija

Šios sekos **orientacija** apsprendžia rekombinacijos kryptį. Jeigu *lox* sekos išsidėstę tendemiškai, rekombinacijos dėka, seka tarp dviejų *lox* sekų pašalinama. Jeigu *lox* sekos yra priešingos krypties, rekombinacijos dėka seka tarp *lox* sekų yra apsukama.

Tokiu būdu, indukuojant *cre* rekombinazės sintezę, galima pašalinti tarp *lox* sekų patalpintą geną.

Praktikoje daroma taip: konstruojama pelė, turinti *cre* geną, prijungtą prie lengvai indukuojamo promotoriaus, specifiško organui, kuriame tirsime geno funkcionavimą. Konstruojama kita pelė, turinti mus dominantį geną arba jo dalį, patalpintą tarp *lox* sekų. Sukryžminus dvi peles, gaunama dvigubai transgeninė pelė. Indukavus *cre* promotorių, tarp *lox* sekų esantis genas pašalinamas.



Pav. 6.5. Transgeninių organizmų konstravimo schemas

Paveiksliuke pavaizduotas *cre* / *lox* sistemos panaudojimas specifinių sekų pašalinimui. A. Taškinės mutacijos įvedimas į geną – taikinį. Taškinė mutacija egzone 2 ir *lox* sekų apsuptas *neo* genas introne įvedami homologinės rekombinacijos būdu (HR). Neo genas pašalinamas indukavus *cre*. B. Delecijos konstravimas. Deletavimui skirta geno dalis patalpinama tarp *lox* sekų (paveikslėlyje 1,2 ir 3 egzonus). Egzonai pašalinami, kartu su *neo* genu indukavus *cre* sintezę. C. Geno dalies pakeitimas.

Transgenezės technologija įgalina išjungti geną norimu laiku ir tokiu būdu tyrinėti jo funkcijas. Šiuo metu jau sukurta daug tūkstančių įvairių transgeninių gyvūnų siekiant nustatyti atskirų genų – baltymų reikšmę. Dažnai rezultatai neduoda tiesioginio, paprasto atsakymo. Pasitvirtina mintis, kad evoliucijos eigoje susiformavo viena kitą kompensuojančios funkcijos, įgalinančios organizmui išgyventi, jeigu viena kuri funkcija pažeidžiama.

Iš transgenezės eksperimentų gaunama labai daug informacijos apie paveldimas ligas. Pav. Huntingtono liga yra sukeliama CAG tripletų ekspansijos huntingtino gene. Šio geno nokautas pasireiškia jau embriogenezėje, todėl neduoda

atsakymo apie geno funkcijas suaugusiame organizme. Dėl glutamino kilpos susidarymo, baltymas gali prarasti įprastą funkciją arba įgyti naują funkciją. Šiuo metu jau žinoma, kad glutamino kilpos sąveikauja su kitais baltymais, to pasekoje pažeidžiama eilės svarbių genų transkripcija.

Proteazėms atsparūs baltymai – prionai sugeba funkcionalių homologiškų baltymus versti į proteazėms atsparią prioninę formą ir tokiu būdu daugintis. Pelės, neturinčios Pr geno yra gyvybingos. Tai reiškia, kad baltymo prionizacija, t.y. funkcijos netekimas, nėra ląstelių žuvimo priežastis. Šiuo metu jau žinoma, kad ląstelės žūsta dėl agreguotų baltymų susikaupimo, bet ne dėl Pr baltymo funkcijos praradimo.

Ypač sėkmingai transgenezė naudojama imuninės sistemos tyrimuose. Imuninė sistema funkcionuoja organizmo lygyje, todėl transgenezė tiriant imuninės sistemos dėsnius yra ypač vertinga. Transgenezės metodais buvo patvirtintos pagrindinės imunologijos dogmos. Žemiau pateikiamas vienas iš ankstyvesnių klasikinių transgenezės eksperimentų. Vienas iš fundamentalių imuninės sistemos principų yra tai, kad imuninė sistema nereaguoja su savo baltymais ir audiniais (*self-tolerance*). Pagal dabartines teorijas, vykstant organizmo vystymuisi, atsiranda limfocitai ir kartu su organizmo vystymusi vyksta savęs apmokymas (*self-learning*). Šio proceso metu vyksta atranka limfocitų, nereagujančių į savo baltymus. Vyksta T ir B limfocitų selekcija, atmetant tuos, kurie reaguoja su savais audiniais ar baltymais. Kaip reaguos imuninė sistema, jeigu įvesime geną, kurio evoliucijos eigoje organizmas neturėjo? Kaip jis priims svetimo geno koduojamą baltymą, kaip savą ar svetimą? Transgenezė duoda atsakymus. Buvo sukonstruotos pelės, turinčios vištos lizocimo geną. Paaiškėjo, kad pelės šio geno koduojamą baltymą priima kaip savo. Tęsiant šiuos eksperimentus, buvo sukonstruota pelė, turinti jau suformuotus antikūnų genus, koduojančius antikūnus prieš lizocimą. Kas bus, jeigu viename organizme suvesime antigeną (lizocimą) turinčias ląsteles ir imunines ląsteles, turinčias po V(D)J rekombinacijos jau persigrupavusius L ir H grandinių imunoglobino genus ar TCR geną, pasiruošusius atpažinti antigeną. Sukryžminus tokias dvi peles paaiškėjo, kad imuninės ląstelės nereagavo į antigeną. Imuninės sistemos ląstelės antikūnų nesekretavo į kraują, jos kažkoku būdu buvo funkciškai inaktyvuotos, nors savo paviršiuje ir turėjo anti-lizocimo- Ig. Panašūs eksperimentai dažnai neatsako tiesiai į klausimą, kaip dažniausiai būna, iškelia dešimtis naujų klausimų. Transgenezė suteikia galimybę aiškintis problemas ir dėsningumus organizmo lygyje.

Transgenezė suteikė labai daug žinių tiriant įvairius onkogenus, t.y. genus, kurių funkcijos pažeidimas arba padidinta funkcija gali sukelti ląstelių transformaciją. Tokių genų jau identifikuota keli šimtai. Dauguma jų susiję su ląstelės ciklo reguliacija, transkripcija, signalo perdavimu.

Transgenezė ypač intensyviai naudojama kuriant įvairių ligų modelius pelėse. Tobulų modelių sukūrimas įgalina sėkmingai ieškoti gydymo priemonių. Sukurti eilės chroniškų ligų (chroniškas hepatitas) modeliai, virusinių ligų modeliai, modeliai vakcinų efektyvumui tirti ir daugelis kitų.

Transgeninės pelės, turinčios žmogaus imuninę sistemą – L ir H grandines koduojančias genomo dalis, yra nepakeičiamos humanizuotų mokloninių antikūnų gamybai.

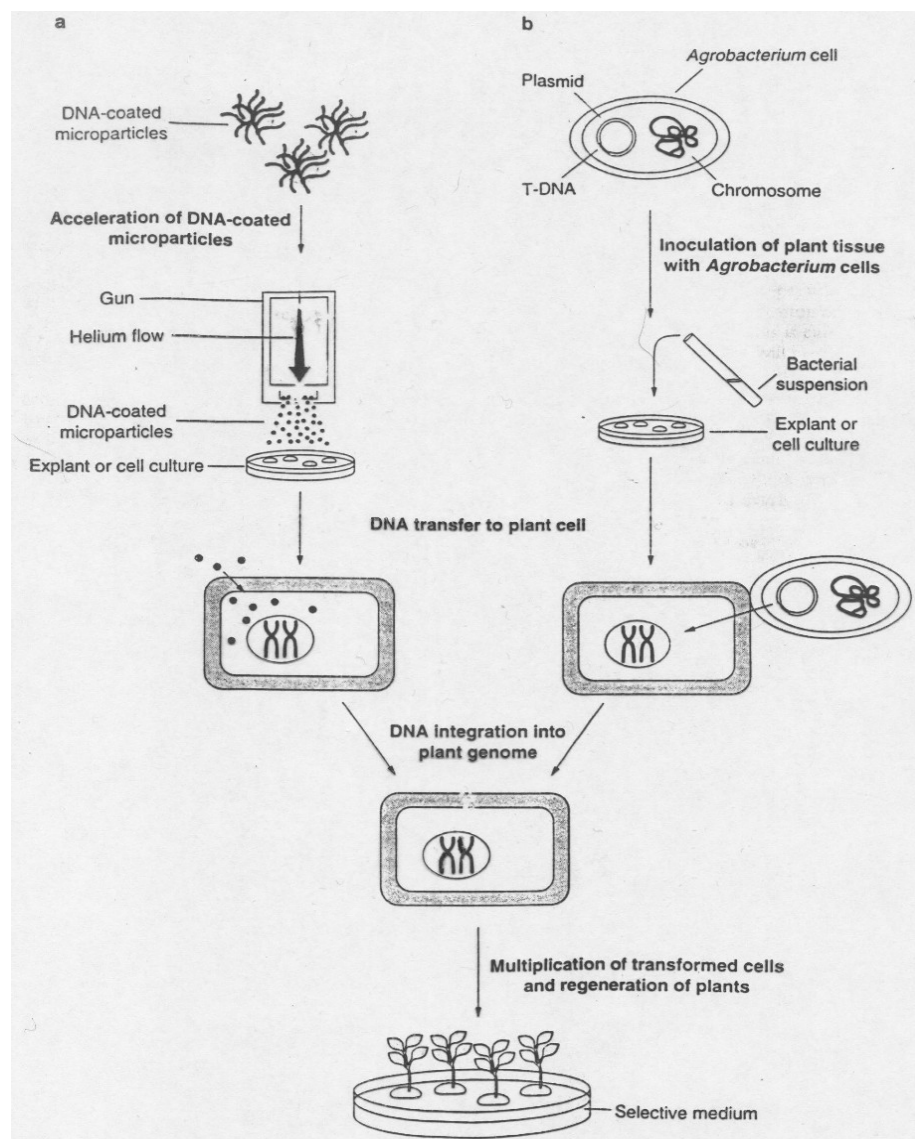
Aplinkos užterštumo ir cheminių junginių mutageniškumo tyrimams labai patogios yra transgeninės pelės, turinčios integruotą λ bakteriofago genomą, turintį savo sudėtyje bakterijų β -galaktozidazės geną. Po ekspozicijos su teršalais, iš tokių pelių išskiriama DNR ir pakuojama su λ bakteriofago pakavimo sistema. Pakavimo sistema yra labai efektyvi, pelių DNR ji suranda bakteriofago genomus, supakuoja į bakteriofagines daleles. Šiuos bakteriofagus išsėjus ant permisivių bakterijų gazono terpėje su X-Gal indikatoriumi ir IPTG induktoriumi, skaičiuojamos bespalvės ir spalvotos dėmelės. Bespalvės dėmelės formuoja bakteriofagas, kurio sudėtyje esanti β -galaktozidazė buvo mutuota. Tokiu būdu, bespalvių ir spalvotų dėmelių santykis atspindi tiriamos aplinkos ar medžiagos mutageniškumą.

7. Transgeniniai augalai

Pirmas transgeninis augalas sukonstruotas 1983 m. Nuo to laiko transgeninių augalų konstravimas įgavo labai plačius mastus. Sukonstruota daugybė naujų augalų veislių bei daugybė įvairių medžiagų, naudojamų farmacijos ir maisto pramonėje, producentų.

7.1. Genų įvedimo į augalų ląsteles metodai

Pagrindiniai genų įvedimo į augalus būdai yra du: (a) mechaninis, naudojant vadinamas genų patrankas (*gene gun*), kurių pagalba, DNR absorbuota ant inertiško nešėjo (pav. aukso dulkių) suspaustu heliu mechaniškai išaunama į augalo ląsteles.



Pav. 7.1. Genų įvedimo į augalus schemas.

Naudojant selekcijai skirtus genus (*neo*), atrenkamos ląstelės, kuriose reiškiasi genetinis markeris (*neo*), jų tarpe tiriama tikslinio geno ekspresija. Transformuotos ląstelės suformuoja kalusą, iš kurio išsivysto augalas.

(b) Kitas būdas paremtas gamtoje vykstančiu genų perdavimo mechanizmu iš agrobakterijų (*Agrobacterium tumefaciens*).

7.1.1. Ti plazmidė

Ti plazmidė randama agrobakterijose *Agrobacterium tumefaciens*, (*Agrobacterium risogenes* - Ri plazmidė - *root induction*). Ti – (*tumor induction*) plazmidė sukelia auglius dviskilčiuose augaluose. Ti plazmidė yra dvigrandė, žiedinė DNR, jos dydis svyruoja tarp 200 - 800 kb. Agrobakterijų, turinčių plazmidės, klasifikacija, paremta požymiais, kuriuos suteikia plazmidė. Iš agrobakterijos *Agrobacterium tumefaciens* pašalinus Ti plazmidę ir įvedus Ri plazmidę, gausime *Agrobacterium risogenes*.

Agrobakterijų Ti tipo plazmidės galima suskirstyti į 4 dideles grupes, pagal tai kokį opiną jos sintetina ir matabolizuoja. Opinai yra arginino dariniai.

Nopalino plazmidės

Oktopino plazmidės

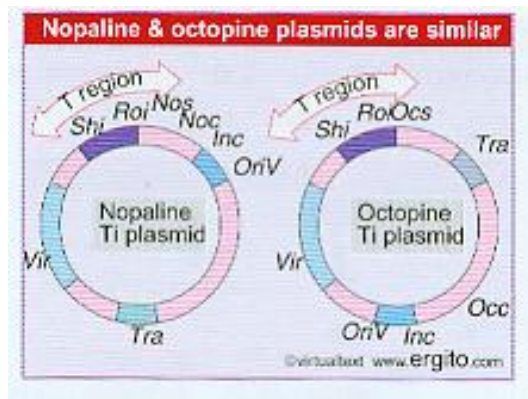
Agropino plazmidės

Ri plazmidės

Ti plazmidė sudaryta iš dviejų struktūriškai ir funkciškai besiskiriančių dalių - T ir *vir*. Visose agrobakterijų Ti plazmidėse *vir* dalyje randami *vir*, *tra*, *inc* genai bei oriV sritis. Didelė *vir* genų grupė užtikrina plazmidžių suteikiamą bakterijų virulentiškumą. *Tra* genai užtikrina plazmidės pernešimą tarp bakterijų konjugacijos mechanizmu, *inc* – apsprendžia Ti plazmidžių nesuderinamumą, oriV – replikacijos pradžios vieta.

Ti plazmidės T dalis (nuo žodžio *transfer*) yra apie 10 - 30 kb dydžio, lokalizuota tarp dviejų 25 nt pasikartojančių, beveik identiškų sekų – riboženklių (*border*). Infekcijos metu T dalis yra pernešama į augalo ląstelę ir integruojama į augalo genomą. Ši dalis yra atsakinga už auglio vystymosi indukciją augaluose. Kai kuriose Ti plazmidėse randama keletas T dalių. *Vir* dalis yra atsakinga už bakterijų virulentiškumą ir Ti plazmidės T dalies pernešimą bei integraciją į augalo ląstelę. T dalyje genai organizuoti eukarijotams būdinga maniera, kiekvienas genas turi savo individualų promotorių ir yra pritaikytas funkcionuoti augalo ląstelėse. *Vir* dalyje

genai organizuoti prokarijotams būdinga maniera, dauguma jų organizuoti į operonus. T dalyje randami genai *Shi* (*shoot induction*), *Roi* (*root induction*), *nos* - nopalininėse plasmidėse atsakingas už nopalino sintezę, *noc* – atsakingas už nopalino katabolizmą, arba *ocs* genas – oktopino plazmidėse atsakingas už oktopino sintezę bei *occ* – atsakingas už oktopino metabolizmą. Opiniai – neįprastos aminorūgštys. Oktopinas - arginino ir pirovynuogių rūgšties darinys, produkuojamas oktopininių Ti plazmidžių, nopalinas - arginino ir α -keto-glutarato rūgšties darinys, produkuojamas nopalininių Ti plazmidžių. T-dalyje esantys genai taip pat sintetina indolilacto rūgštį iš triptofano, bei vieną iš augalų citokininų. Tiek citokininai, tiek indolilactorūgštis yra augalų fitohormonai, kurių perteklius stimuliuoja ląstelių mitotini aktyvumą ir auglių susidarymą. Šioje dalyje yra lokalizuoti ir genai, atsakingi už augalo ląstelės de-diferenciaciją.

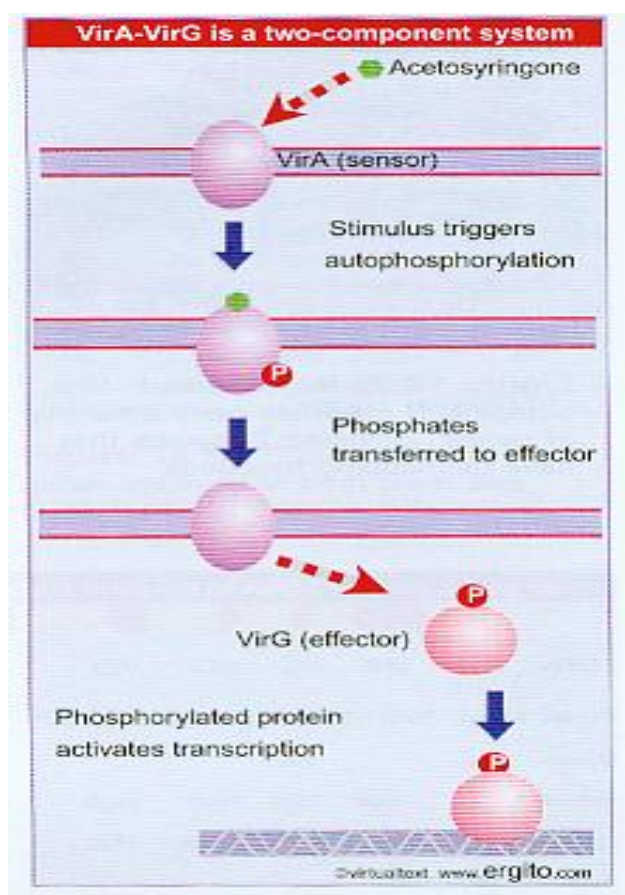


Pav. 7.2. Ti plazmidės

Infekavę augalą ir integravę Ti plazmidės T dalį į genomą, agrobakterijos augale indukuoja auglį, kuris gamina opinus. Opiniai agrobakterijoms tarnauja efektyviu azoto ir anglies šaltiniu.

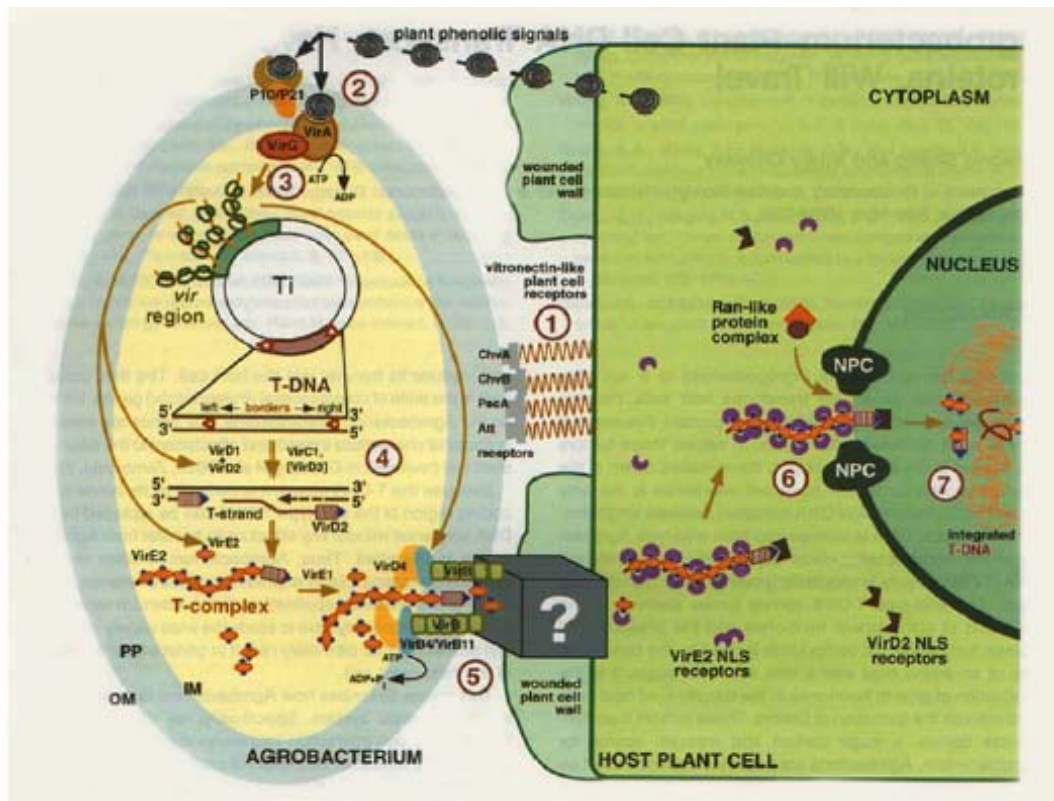
Ti plazmidės *vir* genų grupė susideda iš 25 genų, apjungtų į *vir* operonus: *virA* - koduoja acetosiringono receptorių VirA, *virB* – koduoja baltymus Vir1-11 formuojančius kanalą tarp bakterijos ir augalo ląstelių, *virG* – koduoja transkripcijos faktorių VirG, *virC* – koduoja baltymus VirC1-2, *virD* – koduoja baltymus VirD1-2, *virE* – koduoja baltymą VirE2. *virB*, *virC*, *virD*, *virE* ir *virG* operonai kartu sudaro sritį, vadinamą *vir* regulonu, kurios transkripcija yra reguliuojama VirA/VirG dviejų komponentų sistema. *virA* geno produktas baltymas VirA lokalizuotas ląstelės paviršiuje, o VirG baltymas – ląstelės vidinėje dalyje, prie ląstelės membranos. VirA ir VirG baltymai kontaktuoja. Pažeistos augalo ląstelės gamina fenolinį junginį

acetosiringoną (fenolas su trimis COCH_3 grupėmis). VirA baltymas yra acetosiringono receptorius. Sugavęs acetosiringoną, VirA baltymas – transmembraninė kinazė, autofosforilinasi. VirA fosforilinimas iššaukia VirG baltymo, esančio ląstelės viduje, fosforilinimą. Fosforilinimas reiškia, kad arti yra pažeistas augalas, kurį galima infekuoti. Fosforilintas VirG tampa aktyviu transkripcijos faktoriumi, kuris, susijungdamas su *vir* operonų promotoriais, aktyvina jų transkripciją. *virB* operono, susidedančio iš 11 genų, koduojami baltymai suformuoja transmembraninį kanalą tarp bakterijos ir augalo ląstelės.

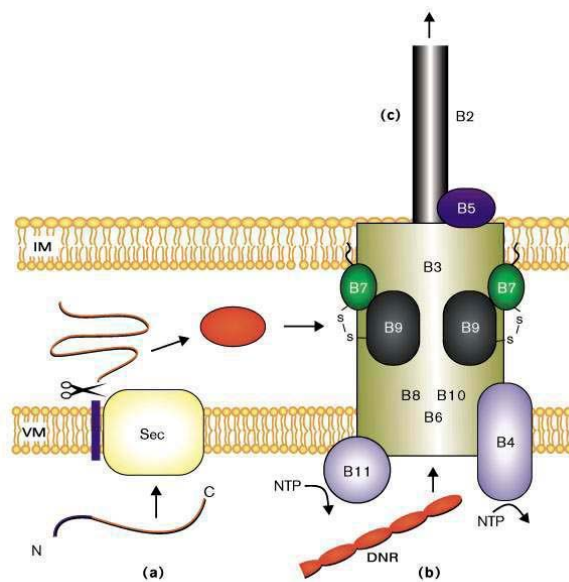


Pav. 7.3. VirA/G sąveika

Ši transporto sistema pavaizduota paveikslėlyje. Ji yra identiška taip vadinamai IV tipo baltymų sekrecijos sistemai, randamai daugelyje patogenų.



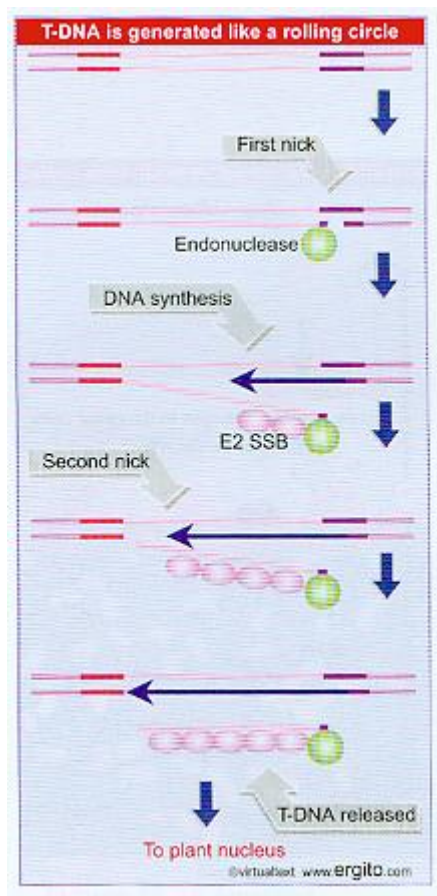
Pav. 7.4. Agrobakterijos ir augalo ląstelės sąveikos schema



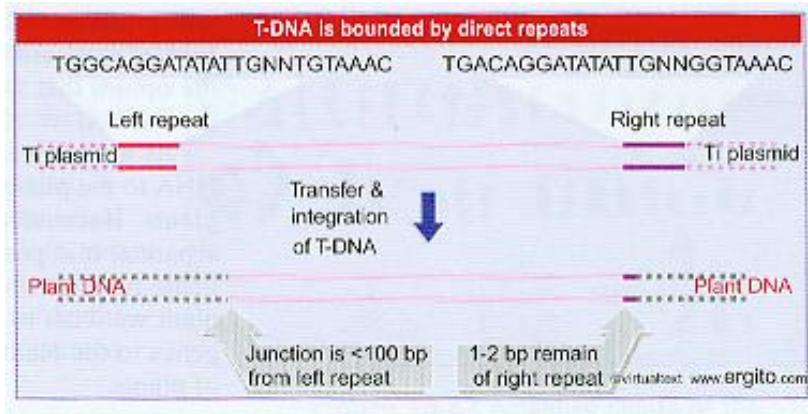
Pav. 7.5. IV tipo sekrecijos sistema

Skirtingai nuo kitų patogenų, agrobakterijose IV tipo sekrecinė sistema tarnauja ne baltymų transportui į infekuojamą ląstelę, o baltymais padengtos viengrandės DNR transportui į augalo ląstelę. Susiformavus tarpląsteliniam kanalui,

virD operono produktai, baltymai VirD1 ir VirD2 įkerpa vieną T dalies DNR grandinę ties dešiniuoju riboženkliu. Baltymas VirD2 kovalentiškai susiriša (29 Tyr) su šios DNR 5'-galu. Viengrandė DNR padengiama Ssb baltymo analogu VirE2 baltymu. VirD2 veda DNR grandinę per kanalą į augalo ląstelę. Baltymai VirD2 ir VirE2 turi branduolio lokalizacijos signalus (NLS). Šie baltymai būtini DNR transportavimui ir integracijai. Transportuojama DNR grandinė nukerpama ties antruoju riboženkliu. Teigiama, kad pašalinus antrąjį riboženklių, į augalo ląstelę pernešama visa Ti plazmidės grandinė. Tačiau pernešamos DNR 3'-galas nėra aiškus. Kadangi 3'-gale nėra genetinių žymeklių, tikslus 3'-galas nėra aiškus, jis varijuoja. Yra duomenų, kad kartais pernešama ir dalis Vir srities. Augalo ląstelėje T DNR integruojama į genomą atsitiktinai, tačiau, kaip taisyklė, į aktyvų genomą. T DNR augalo ląstelėje aktyviai transkribuojama augalo RNR polIII, sintetinami baltymai, reikalingi augalo ląstelės transformacijai ir opinų sintezei ir katabolizmui. Opinus bakterijos naudoja azoto ir anglies šaltiniu, be to, opinai indukuoja Ti plazmidžių *tra* operoną, ko pasėkoje, Ti plazmidė konjugacijos mechanizmu pernešama į plazmidės neturinčius agrobakterijų kamienus.



Pav 7.6. Ti plazmidės T dalies pernešimas



Pav. 7.7. T –DNR integracija

Dviskilčius augalus transformuoja ir Ri plazmidės turintys *A. risogenes* kamieniai. Augalai, užkrėsti šiomis bakterijomis pasižymi padidintomis šaknijimosi savybėmis, jie formuoja labai daug šaknų, todėl plazmidė ir vadinama Ri - *root inducing*. Ri plazmidžių organizacija panaši į Ti plazmidžių, jų *vir* dalys yra panašios, o T- skirtingos. Ti ir Ri plazmidžių *vir* dalis, atsakinga už genų pernešimą į augalo ląstelę pasižymi tam tikra homologija su kitų bakterijų (*E. coli*) konjugatyvinių plazmidžių *tra* operonais, atsakingais už plazmidės konjugaciją. Bakterijų konjugacijos ir agrobakterijų T – dalies pernešimo mechanizmai yra panašūs, genai dalyvaujantys šiuose procesuose pasižymi homologija. Tai evoliuciškai susiję procesai.

Ti plazmidėse, *vir* dalies genų produktai perneša tarp riboženklių esančią T-DNR. Eksperimentiškai buvo patvirtinta, kad T-dalies koduojami baltymai ar T DNR sekos T-DNR pernešime nedalyvauja. *Vir* koduojamų baltymų sistema mechaniškai iškerpa, perneša ir integruoja į augalo ląstelės genomą bet kokią tarp dviejų riboženklių esančią DNR. Tai įgalino šią gamtoje esančią ir efektyviai funkcionuojančią sistemą panaudoti genų įvedimui į augalų ląsteles. Pakeitus Ti plazmidės T dalį reikiamaiais genais, šie genai plazmidės pagalba gali būti įvedami ir integruojami į augalo genomą. Be to, auglį sukeliančių genų pašalinimas iš T dalies, apsaugo augalą nuo kenksmingo plazmidės poveikio.

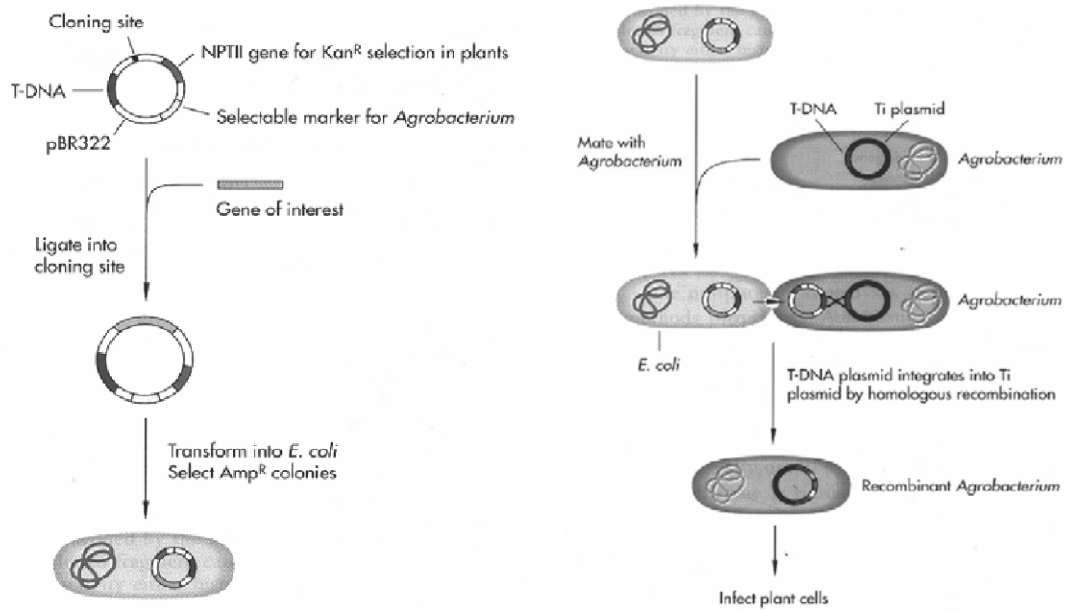
Augalo ląstelių, įgavusių naujus genus, atrankai reikalingi genetiniai žymenys, leidžiantys dauginti tik genetiškai modifikuotas ląsteles. Populiariausi markeriai yra neomicino fosfotransferazę koduojantis genas (iš *E. coli* transpozonų Tn601 ar T5), apsprendžiantis atsparumą, kanamicinui, neomicinui ir G418, *E. coli htp* genas, koduojantis higromicino fosfotransferazę, apsprendžiantis atsparumą higromicinui,

betaino dehidrogenazės genas, apsprendžiantis atsparumą aldehydai betainui ir kt. Šiuo metu transgeniniuose augaluose, kurie skirti maisto produktams, jau uždrausta naudoti genetinius markerius, sukeliančius atsparumą antibiotikams, todėl šie žymenys šalinami..

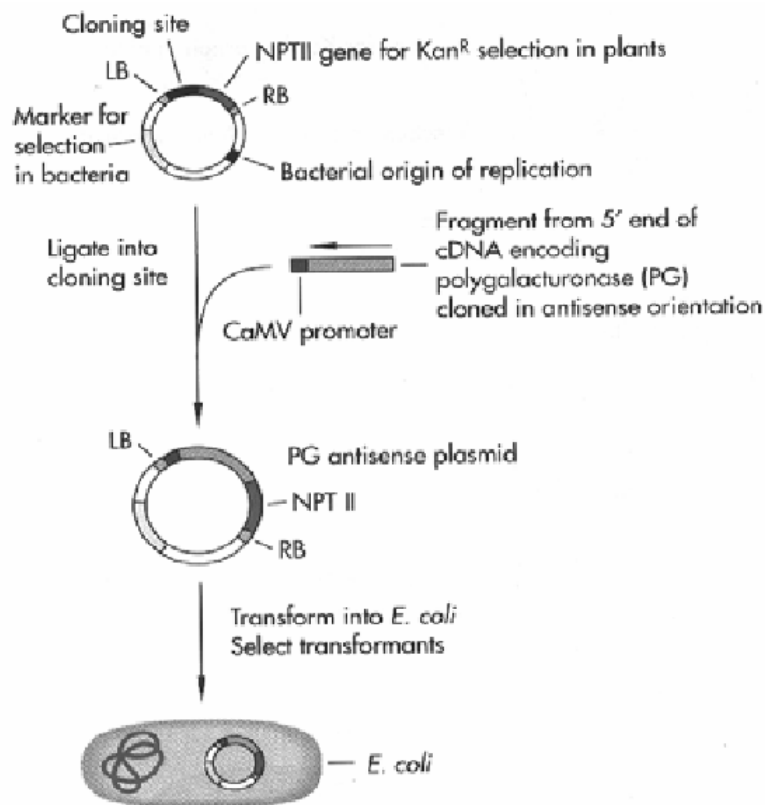
Transgeną, kartu su selekcijai skirtu genu - žymeniu, įvedus į Ti plazmidės T-dalį ir tokiomis bakterijomis infekavus pažeistą augalą, šie genai integruojami į augalo genomą. Augalo fragmentus auginant ant terpės su antibiotikais (*kan*, *neo*, ar kt.) modifikuotos ląstelės suformuoja kalusą, o nmodifikuotos ląstelės žūsta. Iš kaluso gana efektyviai išsivysto modifikuotas augalas.

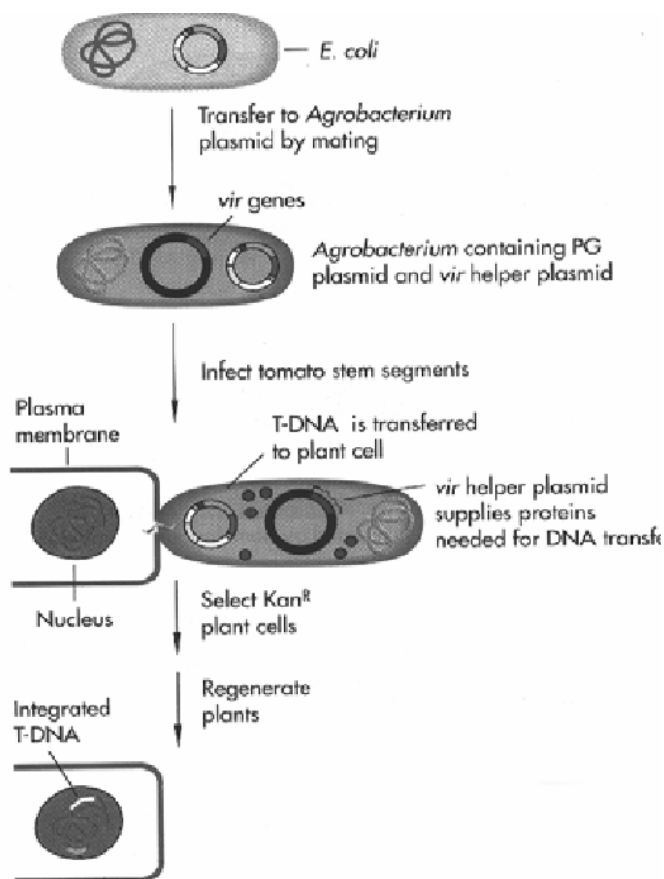
Ti plazmidė yra labai didelė, todėl su ja manipuluoti *in vitro* praktiškai negalima, todėl genų įvedimas atliekamas *in vivo* rekombinacijos būdu. Tam tikslui, *E. coli* plazmidžių pagrindu, konstruojama integracijai skirta struktūra. Įvedimui skirti genai bei markerinis genas patalpinami tarp T-DNR homologiškų sekų. Tokią plazmidę konjugacijos būdu galima įvesti į agrobakterijas, naudojant konjugatyvinių plazmidžių sistemą. *E. coli* plazmidė agrobakterijose nesireplikuoja, todėl auginant ant selektyvios terpės, lengvai atrenkamos agrobakterijos, kuriose *E. coli* plazmidė rekombinavo su Ti plazmide, ko pasekoje Ti plazmidė įgavo geną, koduojantį atsparumą selekcijai naudotam antibiotikui. Tokiu būdu "sukonstruojamos" modifikuotos Ti plazmidės, kuriose T genai pakeičiami transgenais ir atsparumą antibiotikams apsprendžiančiais genais.

Dar paprastesni metodai sukurti naudojant dviejų besireplikuojančių plazmidžių sistemą. Vienoje iš pagalbinių plataus spektro plazmidžių, besireplikuojančių *E. coli* ir agrobakterijose patalpinama *vir* dalis, kitoje plazmidėje sukonstruojama modifikuota T-dalis, turinti transgenus. *E. coli in vivo* rekombinacijos dėka, modifikuota T dalis įvedama į pagalbines plazmides, turinčias *vir* dalį, o pastaroji, konjugacijos arba transformacijos būdu įvedama į agrobakterijas. Rekombinantinių agrobakterijų konstravimo schemų yra gana daug, keletas jų pateikiama žemiau.



Pav. 7.8. Viena iš rekombinantinių agrobakterijų konstravimo schemų, paremta rekombinacija.





Pav. 7.9. Rekombinantinių agrobakterijų gavimas panaudojant binarinius vektorius.

Analogiškos vektorinės sistemos sukonstruotos ir Ri plazmidžių pagrindu.

Genų įvedimas agrobakterijų pagalba gamtoje vyksta tik dviskilčiuose augaluose, tačiau eksperimentuose pamažu adaptuojami ir vienskilčiai (ryžiai, kviečiai, kukurūzai). Agrobakterijų šeiminių ratas gana siauras, bet jis plečiamas modifikuojant bakterijas. Agrobakterijų metodo privalumai augalų transgenezėje yra paprastumas, tikslus genų pernešimas, didelis transformacijos dažnis, gana retas transgeno nutildymas, galimybė įvesti didelius DNR fragmentus (>150kbp). Trūkumai – sunkumai transformuojant vienskilčius augalus bei galima įvesti genus tik į genomine DNR. Vienskilčių transformacijai naudojami vektoriai turintys po kelias *virB*, *virC*, *virG* kopijas, MAR sekas, intronus markeriniuose genuose. Agrobakterijų pagalba galima transformuoti ir mieles, *Aspergillus* šeimos pelėsinis grybus, net žinduolių ląsteles.

Ti plazmidžių galimybės ir panaudojimo spektras plečiasi. Pademonstruota, kad ląstelės invazijos efektyvumas priklauso ne tik nuo Ti plazmidės, bet ir nuo *Agrobacterium* šeiminių. Identifikuota daug bakterijų genų, būtinų Ti plazmidės invazijai į augalo ląstelės. Parenkami ir konstruojami *Agrobacterium* kamienai, leidžiantys infekuoti ir vienskilčius augalus.

Mechaninio arba biolistinio genų įvedimo metodas tinka ir vienskilčiams, ir dviskilčiams augalams, be to šis metodas leidžia įvesti genus ir į organelių genomą. Chloroplastuose dažnai gaunamos žymiai didesnės heterologinių baltymų išėigos. Tačiau biolistiniu metodu nepavyksta įvesti didelių DNR fragmentų, transformacijos dažnis yra mažas, genų ekspresijos lygis sunkiai atkartojamas. Matomai, norint įvesti genus *Agrobacterium* sistemos pagalba į organelas, reikalinga pakeisti branduolio lokalizacijos signalą NLS į chloroplastų lokalizacijos signalą.

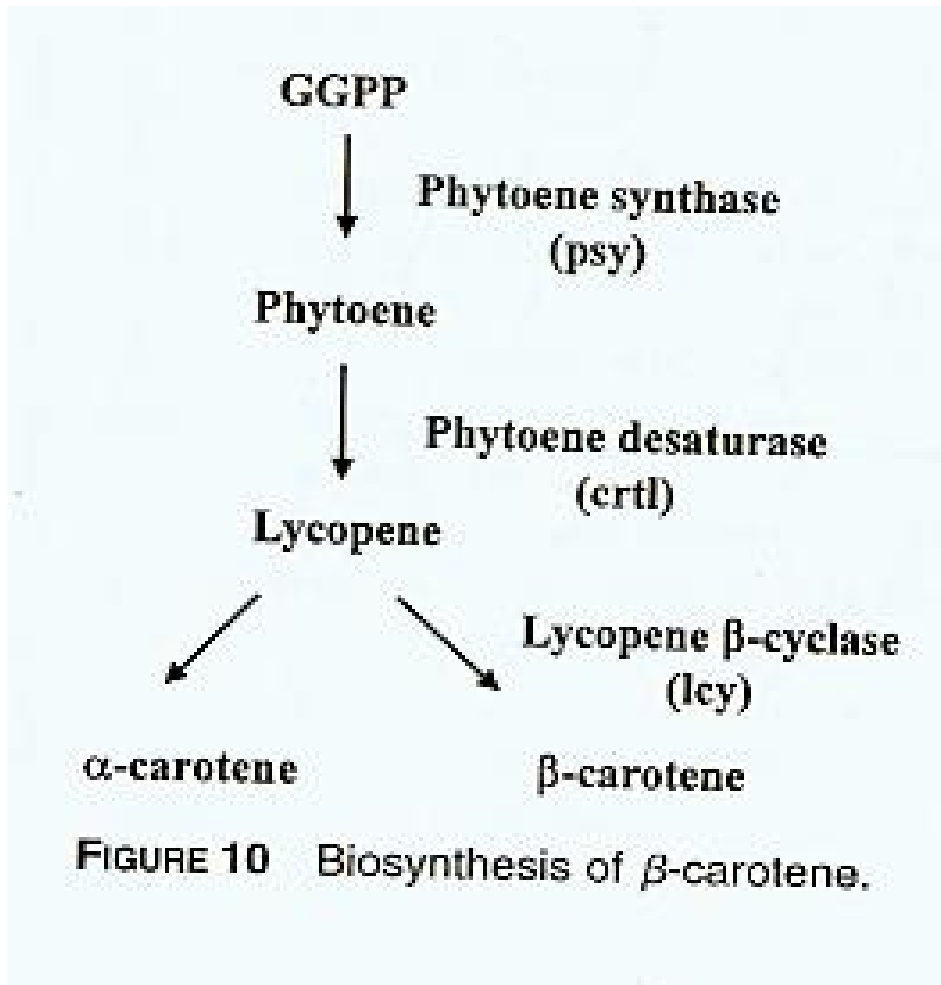
7.2. Augalų transgenezės tikslai ir problemos

Transgeniniai augalai kuriami įvairiais tikslais. Siekiant pagerinti augalų technologines savybes, kuriami augalai, atsparūs herbicidams, atsparūs virusams, atsparūs vabzdžiams, atsparūs šalčiui ir kitiems stresams. Didžioji dalis iki šiol sukurtų transgeninių augalų veislių yra arba atsparios herbicidams (apie 73%) arba vabzdžiams (18%). Kuriami augalai atsparūs populiariausiems, visus augalus naikinantiesiems herbicidams: Roundup® (glifozatas) N-(fosfometil)glicinas, Liberty® (glufozinatas) 2-amino-4-(hidroksimetilfosinil) butano rūgštis ir kt. Genai, koduojantys fermentus, skaldančius herbicidus (GME – glyphosate oxidoreductase, CP4 - enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) imami dažniausiai iš bakterijų (*agrobacterium*, *achromobacterium* ir kt.), modifikuojami prijungiant augalams specifinius promotorius, bei signalus, nukreipiančius baltymą į chloroplastus.

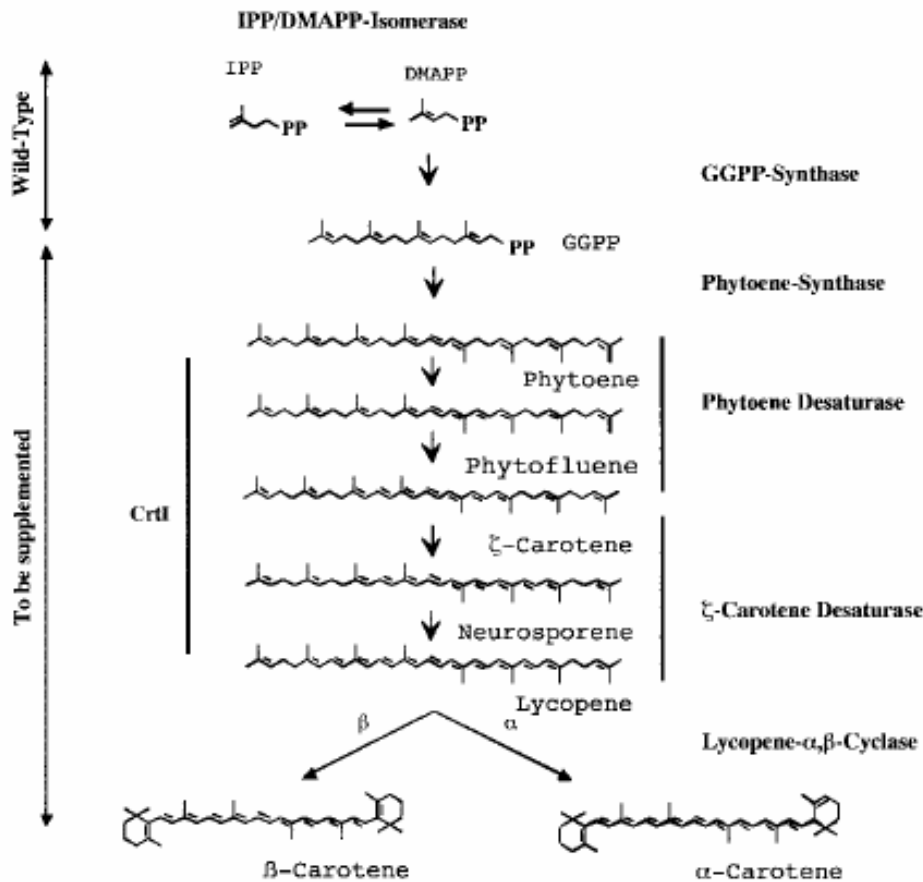
Kuriant vabzdžiams atsparius augalus, dažniausiai naudojami bakterijų *Bacillus thuringiensis* Cry (Bt) baltymus koduojantys genai. Įvairios *Bacillus thuringiensis* sintetina skirtingus Cry baltymus. Šie baltymai suskyla vabzdžių žarnyne susidarant toksinui, kuris sudaro poras membranose, tačiau atskirų *Bacillus thuringiensis* Cry baltymai toksiški tik atskirų rūšių vabzdžių lervoms, pav. CryA baltymas toksiškas *Lepidoptera* atstovams. Žinduoliams šie baltymai yra netoksiški. Konstruojant vabzdžiams atsparius augalus, *Cry (Bt)* genas prijungiamas prie promotorių, funkcionuojančių lapuose ir įvedamas į augalą. Vabzdžių lervos, paragavę tokių lapų žūsta.

Siekiant pagerinti augalo maistines savybes, kuriami vitaminais, geležimi, nesočiomis riebalų rūgštimis praturtinti augalai. Vienas iš geriausių pavyzdžių yra “auksiniai” ryžiai, sintetinantys karotenus – vitamino A pirmtakus. Ryžiai sintetina GGPP – geranylgeranyldifosfatą, tačiau neturi trijų sekančių fermentų, reikalingų

karotenuų sintezei. Konstruojant aukšinius ryžius, buvo įvesti papildomi trys genai, koduojantys fitoeno sintetazę (*phytoene synthase - psy*), fitoeno desaturazę (*phytoene desaturase - crtI*) ir likopeno β-ciklazę (*lycopene β-cyclase - lcy*).



Pav. 7.10. β-karoteno biosintezės schema



Pav. 7.11. Auksinių ryžių konstravimo schema.

Be šių aukščiau aprašytų populiarių pavyzdžių, sukurta daug kitokių augalų veislių pasižyminčių padidintu atsparumu stresams (šalčiui, sausrai ir kt.), pagerintomis maistinėmis savybėmis (padidintas nesočių riebalinių rūgščių kiekis, padidintas lizino kiekis ir kt.), sukurti įvairių metabolitų bei kvapiųjų medžiagų producentai.

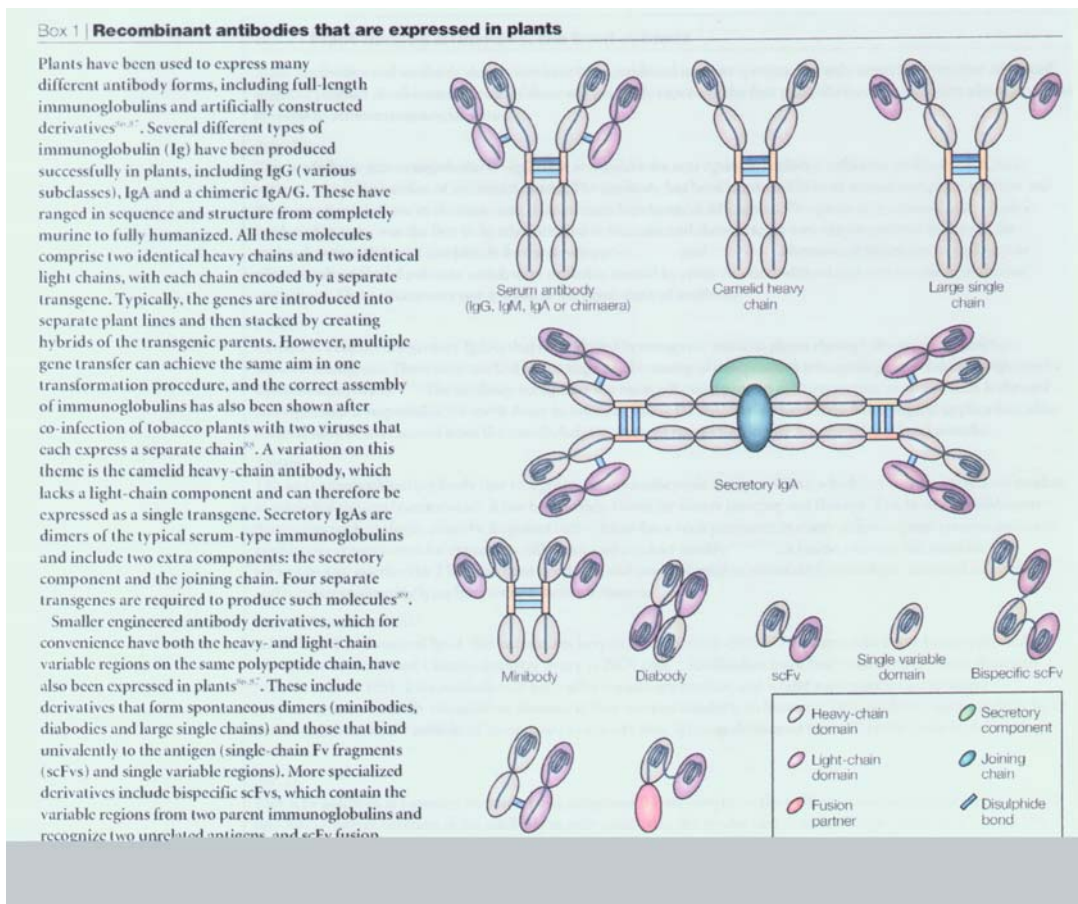
Augalai yra sėkmingai ir intensyviai naudojami heterologinių baltymų produkcijai farmacijos pramonėje kaip alternatyva bakterijoms, mielėms ir audinių kultūroms. Transgeninių augalų privalumai:

- Etiniai – prieš gyvulius
- Galima įvesti daug genų, suformuoti sudėtingus funkciškai aktyvius baltymus susidedančius iš kelių skirtingų subvienetų, pavyzdžiui surinkti antikūnus iš

skirtingų grandinių (bispecifinius). Augaluose susirenka sudėtingi multimeriniai baltymai, susiformuoja aktyvi konformacija.

- Santykinai lengva ir pigu auginti – užsėti laukus.
- Augaluose vyksta visos eukarijotams būdingos baltymų modifikacijos.
- Augaluose galima baltymus saugoti (imunoglobulinai bulvių gumbuose 0°C temperatūroje per 18 mėn. išlaiko 50% aktyvumo).
- Augalai neturi audinių kultūroms būdingų pavojų: žmogui pavojingų virusų, kraujo patogenų, žinduolių vėžinio genomo elementų.

Pastaraisiais metais ypač didelis dėmesys skiriamas imunoglobulinų produkcijai arba įvairių antikūnų darinių: Fab (*fragment antigen binding*), scF (*single chain fragment*) ir tt. gamybai. Antikūnų poreikis yra labai didelis, ypač humanizuotų antikūnų, skirtų vėžio terapijai. JAV vėžio terapijai vienam ligoniui vidutiniškai reikia 10-200mg, iš viso reikia apie 130 kg/metams (2002 m.). Apyvarta apie 1 milijardas USD.



Pav. 7.12. Antikūnai ir jų fragmentai, efektyviai sintetinami augaluose

Heterologinių baltymų derlius augaluose dažniausiai nėra labai aukštas, tačiau pakankamas, todėl augalų naudojimas technologiškai ir finansiškai pateisinamas. Pav. pilno imunoglobino IgG baltymo išėiga naudojant žiedinio kopūsto mozaikos viruso (CaMV) promotorių 35S sudaro 0.35%—1.3% nuo visų baltymų augalo lapuose. ScFvs kiekis lapuose gautas iki 6.8% (apie 0.5mg/1g lapų). Žmogaus augimo hormono HGH sintezė tabako lapuose sudaro apie 7% visų baltymų, žmogaus serumo albumino – iki 11 % baltymų. Dažniausiai gaunama geresnė išėiga tų baltymų, kurie lokalizuoti citozolyje, negu ER. Svetimi baltymai, įstrigę ER, gali sukelti stresus (*ER overcrowding stress*, *unfolded protein response* ir kt.). Tačiau baltymams, kuriems reikalingos modifikacijos, transportas per ER dažnai yra būtinas aktyvios konformacijos suformavimui. Daugiausiai heterologinių baltymų gavimui naudojamas tabakas. Kviečiai, ryžiai, kukurūzai naudojami mažiau, nes jie turi daugiau toksinų, negu tabakas. Sparčiai plinta ir augalų ląstelių kultūros – jos auginamos fermentatoriuose, pigiose terpėse. Šiuo metu heterologinių baltymų gavimui labai sėkmingai naudojami stiprią laikiną ekspresiją užtikrinantys įvairūs virusiniai augalų vektoriai, įvedami į augalus Ti-plazmidės pagalba.

Galimi pavojai:

1. Vabzdžių populiacijos pasikeitimas – augalai, turintys *Bacillus thuringiensis bt* geną yra toksiški daugumai vabzdžių lervų. Cry (Bt) baltymas lervos virškinimo trakte skaldomas į toksiškus polipeptidus. Žinduoliams bt nepavojingas. Tiesioginis pavojus – išnaikinus nereikalingas lervas, išnaikinamos ir nekenksmingų vabzdžių lervos. Tačiau chemikalai daro tą patį, bet labiau teršia gamtą. Chemikalais taip pat sunaikinamos ir žemėje esančias lervas. Netiesioginis pavojus – sunaikinus lervas, bus pakenkta grobuonims, tiek paukščiams, tiek vabalams, jie neteks maisto. O chemikalai?
2. Atsparumo herbicidams išplitimas GMO augalams kryžminantis su *wt* artimais augalais (pav. rapsas su svėre). Eksperimentai su rapsu rodo, kad rapsas pats išplisti kaip piktžolė negali. Genetinės informacijos perdavimas piktžolėms neatmetamas, nors kol kas nefiksuotas. Iki šiol transgeniniai augalai auginami šalyse su aukšta agrikultūra, kur piktžolės neauginamos.

Europoje transgeniniai augalai auginami labai menkai, sutinkamas labai didelis tradicinės žemdirbystės pasipriešinimas. Amerikoje transgeniniai augalai

plinta greitai. Viena iš priežasčių - Amerikoje – žemės ūkis yra atskirtas nuo gamtos, Europoje – žemės ūkis yra susiliejęs su gamta, be to yra žemės ūkio produktų perteklius. Amerikoje žemės ūkio produktai sudaro žymią ekonomikos dalį, transgeniniai augalai dar labiau sustiprina Amerikos ekonomiką.

3. Augalai atsparūs virusams stimuliuoja naujų virusų atsiradimą, atsparumo mechanizmų įveikimą, pagreitina virusų evoliuciją. Galima sukurti atsparumą virusams įvedant specifinių antikūnų genus, arba naudojant siRNR technologijas tada pavojus mažėja.

4. Galimi nenumatyti, neprognozuojami rezultatai – bet koks įsikišimas į gamtą – pavojingas. Tačiau žmogus per visą savo evoliuciją tik tą ir daro.

5. Konkuruoja su chemijos pramone.

6. Galima sukurti nuodingus augalus (kaimynams....)

Nauda:

1. Gamtos taršos sumažėjimas pesticidais (medvilnė).

2. Saugojama dirva, nenualina piktžolės.

3. Maisto problemų išsprendimas Afrikoje ir kt.

4. Padidintas derlius.

5. Dirvos renovacija – išgydymas nuo teršalų su teršalus metabolizuojančiais GMO augalais, verčiant į mažiau toksiškus junginius. Sunkiuosius metalus kaupia.

Nei pavojai, nei nauda nėra absoliutūs, reikalingi įstatymai, kontrolė.

8. Genų slopinimas dsRNR

8.1. siRNR

Maždaug prieš 15 metų, (pirmos publikacijos 1990), tyrinėjant į transgeninius augalus įvestų genų funkcionavimą, buvo pastebėtas nelauktas reiškinys: įvedus į augalą geną, turintį homologą ląstelėje, įvestas genas nefunkcionuoja ir kartu nuslopina savo homologą augalo genome. Šis reiškinys pirmiausia buvo pademonstruotas petunijose ir pavadintas **ko-supresija**. Eksperimento metu buvo tikėtasi įvedus spalvą apsprendžiančio geno papildomas kopijas, gauti petunijų žiedus, pasižyminčius intensyvesne spalva, tačiau buvo gauti visiškai balti žiedai.

1995 m. dirbant su kirmėlėmis *Caenorhabditis elegans*, naudojant *antisense* RNR technologiją buvo bandyta slopinti *par1* geno ekspresiją. Tyrinėtojų nuostabai, toks pat slopinimo efektas buvo gautas ir kontrolinėse kirmėlėse, kurioms buvo įvesta *sense* mRNR. Eksperimento idėja buvo paprasta, antisense RNR turėtų susirišti su mRNR ir inhibuoti jos translacią. Tyrinėjant šį reiškinį buvo pastebėta, kad geno slopinimo priežastimi buvo ne *antisense* ar *sense* RNR, o dvigrandės RNR priemaišos. Dvigrandė RNR, kurios priemaišos buvo abiejuose RNR preparatuose indukavo jai komplementaraus geno slopinimą. Reiškinys buvo pavadintas **RNR interferencija - RNRi**. Tyrinėjant šį reiškinį buvo pastebėta, kad RNR interferencija yra labai specifiška ir slopina tik tą geną, kuriam dvigrandė RNR yra pilnai komplementari. Genų raiškos slopinimas dvigrandė RNR yra labai efektyvus, geno ekspresija nuslopinama 90% ir labiau. Slopinimas vyksta dažniausiai po-transkripciniame lygyje ir susijęs su specifinės mRNR degradacija. Slopinimas, indukuotas vienoje kirmėlės *C.elegans* dalyje persiduoda ir į kitas kūno dalis, persiduoda ir palikuonims. Slopinimui reikalingi labai maži dvigrandės RNR kiekiai.

Tyrinėjant šio reiškinio paplitimą įvairiose sistemose, homologinių transgenų pagalba arba dvigrandės RNR pagalba indukuotas genų nutildymas buvo pademonstruotas įvairiuose organizmuose, *Neurospora crassa*, *Drosophila*, *protozoa*, žinduoliuose - pelėse, vėliau (2002m.) ir žmonių ląstelėse. Šis reiškinys buvo pavadintas *transcriptional gene silencing* – TGS, kada, atskirais atvejais, buvo pastebėta, kad homologinės sekos slopina genų veiklą transkripcijos lygyje ir *post-transcriptional gene silencing* – PTGS, kada slopinimas vyksta po transkripcijos. PTGS sinonimas - *Drosophila* stebimas RNAi (*RNA interference*). Bendresnis pavadinimas HDGS – *homology dependent gene silencing*. TGS vyksta branduolyje,

PTGS – citoplazmoje. PTGS mechanizmas - labai greita specifinės mRNR degradacija. Parodyta, kad ši degradacija vyksta citoplazmoje.

PTGS metu daugelyje atvejų transkripcija nėra sutrikdoma, tuo tarpu TGS metu slopinama transkripcija, modifikuojamas chromatinas. Ir vienu ir kitu atveju viską lemia dvigrandė RNR -dsRNR. Šio reiškinio mechanizmas intensyviai yra tyrinėjamas, gali būti, kad panašus mechanizmas veikia X chromosomos nutildyme, transvekcijoje, imprintinge, transpozonų, pasikartojančių sekų, endogeninių retrovirusų inaktyvacijoje ir daugelyje kitų su genų slopinimu ir homologija susijusių reiškinų įvairiuose eukariotuose, taip pat ir diferenciacijos procesuose. Genų ir chromatino struktūros reguliacija dvigrande RNR stebima visuose eukarijotuose, pradedant mielėmis *S.pombe*, grybais *Neurospora.*, išskyrus paprasčiausias mieles (*Saccharomyces, Kluyveromyces*) bei zebražuvę. Reikia pažymėti, kad reguliacija dsRNR mechanizmu kiekvienoje rūšyje turi savo ypatumus, skirtingą dalyvaujančių genų ir baltymų skaičių.

Tyrinėjant RNRi reiškinį, daugelyje objektų buvo pademonstruota, kad dvigrandė RNR (dsRNR) indukuoja įvairius epigenetinius reiškinius, tame tarpe genų veiklos slopinimą eukarijotuose bei homologiškos mRNR degradaciją. Tyrinėjant šio reiškinio mechanizmus, labai pasitarnavo belastelinės sistemos. *In vitro* sistemose, naudojant *Drosophila melanogaster* embrionų ekstraktus, buvo pastebėta, kad pridėjus radioaktyvią 500nt dvigrandę RNR, pastaroji fragmentuojama į 21-23 nt dydžio fragmentus. Tai rodo, kad ekstraktai nespecifiškai skaldo dsRNR į vienodo dydžio dsRNR fragmentus. Šie RNR fragmentai buvo pavadinti **siRNR** (*short interfering RNA*). Dvigrandė RNR yra skaldoma į 21-23 nt dvigrandžius RNR fragmentus, nepriklausomai nuo to, ar sistemoje yra komplementari mRNR. Skaldymui naudojama ATP energija. Nesant sistemoje ATP, skaldymas sulėtėja apie 6 kartus. Susidarę dsRNR fragmentai turi 2 nt išsikišusius viengrandžius laiptelius su 3'-OH išsikišusiam gale ir fosfatu paslėptame gale. 5'-fosfato pašalinimas arba jo būvimas 3'-gale inhibuoja RNRi efektus.

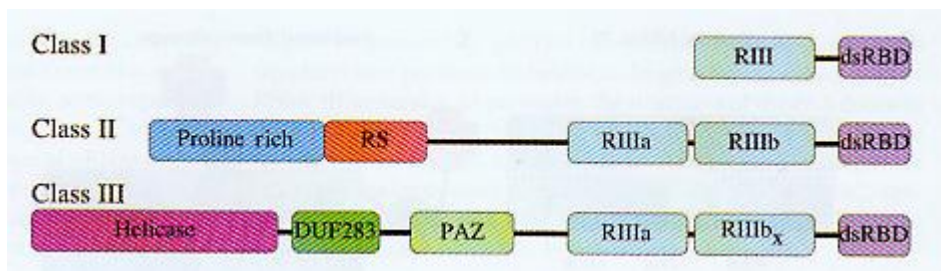
OH-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-P

P-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-OH

Tokiu RNR skaldymu pasižymi RNazės III šeimos fermentai. Buvo padaryta išvada, kad šios šeimos atstovai dalyvauja siRNR formavime. Tyrinėjant *Drosophila*

melanogaster embrionų ekstraktus buvo identifikuota šios šeimos ribonukleazė, pavadinta **Dicer**. Ši ribonukleazė turi du domenų, homologiškus *E. coli* RNazei III, RNR surišantį domeną bei helikazės būdingą domeną. *In vitro* šis fermentas skaldo dvigrandę RNR į 21-23 nt fragmentus. Dicer reikšmė buvo patvirtinta *in vivo* eksperimentuose. Dicer mutantuose yra pažeidžiamas genų slopinimas dvigrandę RNR. Taip pat šis procesas pažeidžiamas įvedus dvigrandę RNR, komplementarią Dicer geno sekai. Dicer tipo nukleazės buvo rastos ir kituose eukariotuose, tame tarpe žmogaus ląstelėse. Žmogaus Dicer skiriasi nuo *Drosophila melanogaster*, nes neturi helikazės domeno.

Šiuo metu žinomos trys RNazės III šeimos ribonukleazių klasės. I klasė – bakterijų ir mielių RNazės III; II klasė – Drosha ribonukleazė, lokalizuota ir veikianti branduolyje, randama tik pas gyvūnus; III klasė - Dicer ribonukleazė ir jos homologai, rasti visuose eukariotuose, išskyrus *S.cerevisiae* ir joms artimas mieles.



Pav. 8.1. RNazės III šeima (RS –Arg Ser turtingas domenai; dsRBD –dvigrandę RNR surišantis domenai)

Pirmos klasės RNazės yra mažiausios, turi vieną ribonukleazės III domeną ir dsRNR surišantį domeną. II klasės Drosha tipo ribonukleazės turi du ribonukleazinius domenų III, dsRNR surišantį domeną, prolinu turtingą domeną bei Arg-Ser turtingą domeną. III-klasės Dicer tipo ribonukleazės turi du ribonukleazės III domenų, dsRNR surišantį domeną, helikazės būdingą domeną, DUF283 domeną ir PAZ domeną. PAZ domenai – konservatyvus su nukleorūgštimis sąveikaujantis domenai. PAZ domeno pavadinimas kilo iš baltymų pavadinimų, kuriuose šis domenai buvo pirmiausiai pastebėti – Piwi, Argonaute ir Zwille.

Tolesni tyrinėjimai parodė, kad siRNR įeina į baltyminio komplekso sudėtį, kuris ir apsprendžia komplementarios mRNR degradaciją. Tokiu būdu, siRNR padeda kompleksui ląstelės citoplazmoje surasti komplementarią RNR, kurią reikia suskaldyti. Baltyminis kompleksas, kuriame randama siRNR buvo išgrynintas ir pavadintas RISC – *RNA induced silencing complex*. Kiekvieno organizmo kompleksas skiriasi savo komponentais. Pirmiausia buvo charakterizuotas *Drosophila*

RISC. Į šio komplekso sudėtį įeina Argonaute-2 baltymas (Ago2), priklausantis didelei argonautų arba PPD baltymų šeimai (*PAZ – PIWI domains*). Argonautų šeimos baltymai išsiskiria dviem struktūriniais domenais, PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*) domenu, dalyvaujančiu baltymų ir nukleorūgščių sąveikoje ir PIWI domenu C-gale. PIWI domenas yra konservatyvus domenas, sutinkamas Ago šeimos baltymuose, struktūriškai panašus į ribonukleazės-H domeną. Neseniai pademonstruota, kad būtent šis domenas ir yra atsakingas už siRNR komplementarios mRNR degradaciją. Ago baltymai absoliučiai būtini RISC formavimuisi.

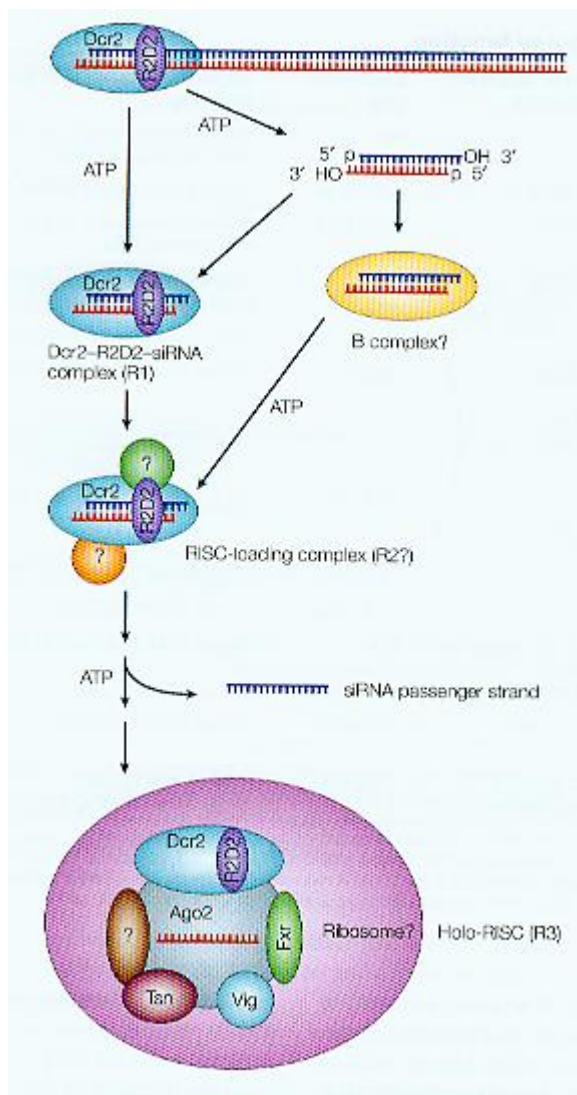
Genų pavadinimas (Ago2 – nuo argonautai) susijęs su *Arabidopsis* mutantais, kuriuose argonautų genų mutacijos sukelia žiedų vystymosi defektus. Tokių mutantinių žiedų užuomazgos primena “argonautų šalmus”, iš to kilo mutantų ir genų pavadinimas. RISC kompleksuose taip pat randami baltymai, turintys helikazės motyvus. Helikazės matomai reikalingos dvigrandės siRNR grandinių perskyrimui. Ago2 baltymo analogas, grybuose *Neurospora crassa* pavadintas Qde1, *C.elegans* – Rde1. Žmogaus RISC kompleksas susideda iš baltymų eIF2C1 – Ago1 ir eIF2C2 – Ago2, jie yra ir elongacijos iniciacijos faktoriai, taip pat priklauso Ago baltymų šeimai. Naudojant imunoprecipitaciją, kartu su žmogaus RISC kompleksais išsodinami baltymai Gemin 3 ir Gemin 4. Gemin 3 turi helikazės būdingą DEAD domeną, matomai tai yra RNR helikazė. Tokiu būdu, žmogaus RISC kompleksas susideda mažiausiai iš 4 baltymų, eIF2C1 ir eIF2C2 bei Gemin 3 ir Gemin 4.

Įvairūs organizmai turi skirtingą kiekį *AGO* genų. *Drosophila* rasti 5 genai, pelių genome – aštuoni, kirmelėse net 24 genai. Ne visi Ago baltymai pasižymi nukleaziniu aktyvumu. Ago1, Ago3, Ago4 yra inertiški, t.y. neturi nukleazinio aktyvumo. Pademonstruota, kad žinduoliuose Ago2 baltymas skaldo RNR, tuo tarpu kitų Ago baltymų ir atitinkamų kompleksų funkcija, matomai, yra kitokia, pavyzdžiui translacijos represija neskaldant mRNR (miRNR).

Dicer nukleazė, kaip ir Ago baltymai turi PAZ domeną. PAZ domenai tarnauja baltymų sąveikai komplekse bei sąveikai su Dicer suformuotu mažos dvigrandės RNR išsikišusiu 3'-OH galu bei paslėptu 5'-fosfatu. *In vitro*, paveikus mikrokokine nukleaze RISC kompleksą, gautą inkubuojant dvigrandę RNR su drozofilų embrionų ekstraktais, RISC komplekso aktyvumas dingsta, nežiūrint į tai, kad komplekse išlieka RNR, baltymų apsaugota nuo nukleazės poveikio. Tokį kompleksą paveikus šarmine fosfataze, aktyvumas atsistato. Iš šių eksperimentų paaiškėjo, kad komplekso

aktyvumui svarbu, kad RNR 3'-galas nebūtų fosforilintas. Mikrokokinė nukleazė, skaldydama RNR, 3'-gale palieka fosfatą, o šarminė fosfatazė šį fosfatą pašalina.

Remiantis įvairių tyrimų duomenimis, buvo sukurtas RISC veikimo ir RNR interferencijos (RNRI) – slopinimo mažomis RNR modelis. Dvigrandė RNR, patekusi į ląstelę arba susiformavusi ląstelėje, atpažįstama nukleazės Dicer komplekso ir skaldoma į 21-23 nt dvigrandžius fragmentus, t.y. siRNR. Dicer nukleazė randama komplekse kartu su dsRNR surišančiu baltymu. Susiformavusi maža dvigrandė siRNR per tarpinius kompleksus (RLC – *RNR loading complex*) įjungiami į RISC kompleksus. Tarpiniai kompleksai, paveikslėlyje pavaizduoti R1, R2, sudaryti iš Dicer, dsRNR surišančio baltymo ir keleto dar necharakterizuotų baltymų.



Pav. 8.2. RISC komplekso formavimas

Susiformavę RISC kompleksai siRNR pagalba ieško komplementarios RNR, suradę ją - skaldo. Pastebėta, kad RISC kompleksai gali skaldyti ir *sense*, ir *antisense* RNR. Tai reiškia, kad RISC kompleksas turi abi siRNR grandines, arba egzistuoja du

RISC kompleksai. RISC kompleksų analizė parodė, kad juose yra tik **viengrandė** siRNR. Matomai, helikazės perskiria dvigrandę siRNR, viena jų lieka RISC komplekse. Paaiškėjo, kad RISC kompleksas pasirenka vieną iš dviejų mažos dvigrandės RNR grandinių. Pasirinkimą nulemia termodinaminės dsRNR savybės. Vienas iš dviejų siRNR duplekso galų termodinamiškai yra mažiau stabilus dėl A/T ir G/C porų kiekių skirtumo. Termodinamiškai silpnesnio galo 5'-fosfatą turinti grandinė yra paliekama RISC komplekse, o kita grandinė pašalinama. PAZ domene yra kišenė, kuri atpažįsta išsikišusį 3-OH dviejų nukleotidų galą, sąveikai su galu būtinas ir 5-fosfatas. Grandinės pasirinkimą lemia ir dsRNR degradacijos kryptis. dsRNR skaldoma iš galų, todėl Dicer PAZ domenas susiriša su jau suformuotu išsikišusiu galu. Tokiu atveju pasirenkama grandinė turinti 5'-fosfatą. Tuo tarpu jeigu į ląstelę ar ląstelių ekstraktą įvesime *in vitro* suformuotus siRNR dupleksus, grandinės pasirinkimą lems termodinamika.

Genų ekspresijos slopinimo įvairaus ilgio RNR dupleksais palyginimas pademonstravo, kad slopinimas 27 nt dupleksu arba didesne dvigrande RNR yra žymiai efektyvesnis, lyginant su 21-23 nt dupleksu. Tyrimai parodė, kad visais šiais atvejais RISC komplekse buvo randama vienoda 21-23 nt RNR. Daroma išvada, kad pats dvigrandės RNR skaldymo procesas yra svarbus RISC komplekso formavimuisi. Dicer, atliekanti skaldymą, t.y. 21-23 nt RNR formavimą, nepalieka RNR, o kartu su 21-23 nt RNR patenka į RISC kompleksą. *In vitro* suformuota ir į ląstelę įvesta 21-23 siRNR taip pat patenka į RISC kompleksą, bet ne taip efektyviai, lyginant su Dicer skaldymo metu formuojama siRNR. Tai labai svarbu įvairiuose *in vitro* eksperimentuose. Žinduolių ląstelėse dvigrandė RNR didesnė nei 30nt indukuoja interferoninį atsaką, todėl žinduoliams optimalu naudoti 27 nt dupleksus.

RNR interferencija vyksta citoplazmoje, to pasėkoje specifinė mRNR degraduojama, tuo tarpu branduolyje ši mRNR sintetinama ir yra stabili. Yra duomenų, kad RISC kompleksas "skanuoja" iš branduolio transportuojamą RNR. Panaudojus fluorescuojančiais dažais žymėtą siRNR, pastebėta, kad ji lokalizuojasi aplink branduolį. Iš to daroma išvada, kad iRNR sistema tikrina iš branduolio išeinančią RNR. Detalesnė analizė parodė, kad nuo dsRNR priklausomas mRNR skaldymas žinduolių ląstelėse vyksta taip vadinamuose GW kūneliuose (GW bodies arba P-bodies). GW baltymas (GW182) turintis daugybinius glicino (G) ir triptofano (W) pasikartojimus, yra tipiškas su RNR sąveikaujantis baltymas, dalyvaujantis mRNR degradacijoje. Šis baltymas lokalizuotas specifinėse citoplazmos vietose,

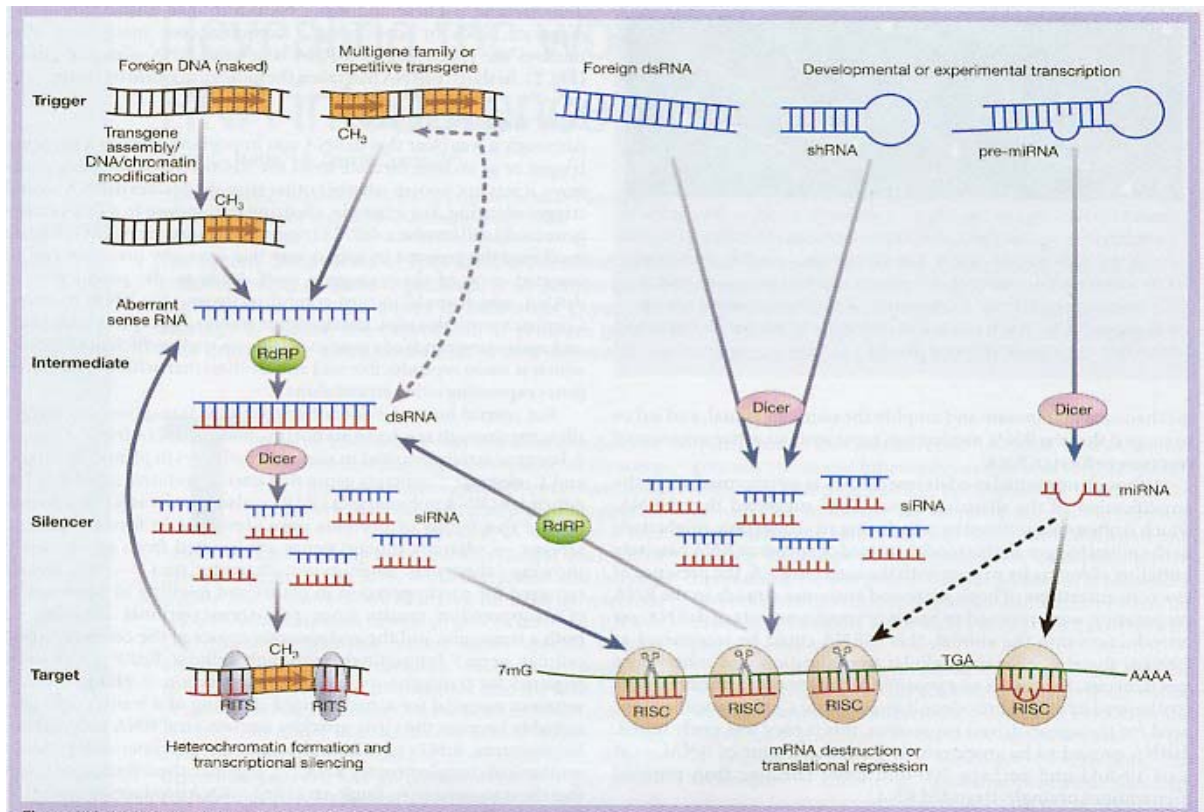
pavadintose GW arba P kūneliais. Šie kūneliai sudaryti iš transliacijos požiūriu represuotų mRNR-baltymų kompleksų. Neseniai pademonstruota, kad GW baltymo geno mutacijos slopina ir siRNR poveikį (*Drosophila*, kirmėlės). Baltymų tarpusavio sąveikos bei lokalizacijos tyrimai parodė, kad Ago2 ir GW sąveikauja ir randami kartu GW/P kūneliuose. Aiškėja, kad siRNR mechanizmai yra susiję su kitais mRNR degradacijos mechanizmais.

Tyrinėtojų nuostabą sukėlė faktas, kad kelios dsRNR molekulės, įvestos į kirmėles, sukelia ilgai trunkantį efektą, persiduodantį kelioms kartoms. Buvo paskaičiuota, kad *C.elegans* 25 siRNR molekulės nuslopina, t.y. sudegraduoja apie 1000 mRNR molekulių. Dar daugiau, į kirmėlę įvesta siRNR plinta po visą gyvūno kūną, persiduoda palikuonims. Tik kelios siRNR molekulės reikalingos inicijuoti RNAi, o tai reiškia, kad mažos siRNR veikia arba katalitiškai, arba amplifikuojamos. *C.elegans* įvedus *unc-22* (raumenų baltymo genas) genui homologišką dsRNR, hermofroditinės kirmėlės generuoja RNRi ir F2 generacijoje. Tai patvirtina katalinį veikimą arba amplifikaciją. Šią reakciją katalizuoja daugelyje organizmų rastas fermentas RpRpol (*RdRpol -RNA directed RNA polymerase*). Žinduoliuose tokios polimerazės nėra.

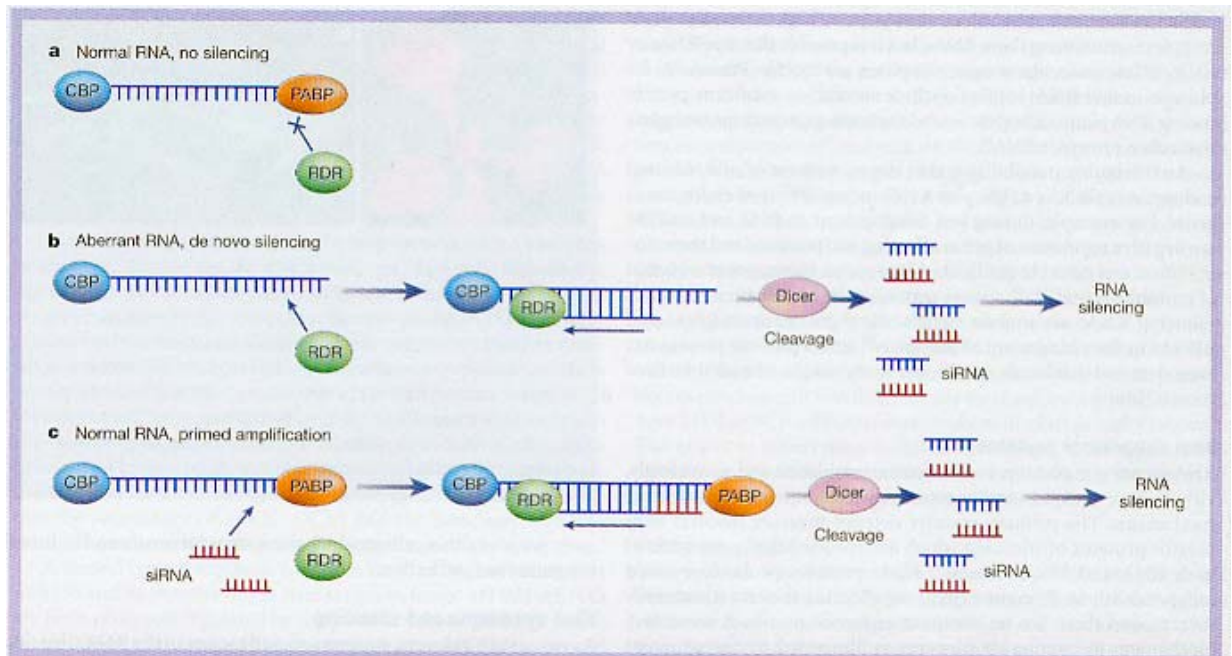
Galima išskirti du galimus amplifikacijos būdus: (1) kada RISC kompleksas degraduoja mRNR, degradacijos metu turėtų formuotis nauja siRNR, nes RISC kompleksas išskelia mRNR fragmentą, kuris gali būti įjungtas į kitą RISC kompleksą ir tęsti degradaciją. Atrodo, kad taip vyksta žinduolių ląstelėse. Kitas amplifikacijos būdas yra dalyvaujant RNR priklausomai RNR-polimerazei (RpRpol). Paaiškėjo, kad daugelyje gyvūnų ir augalų tokia polimerazė egzistuoja (nėra žinduoliuose). Tokiu būdu, siRNR gali tarnauti pradmeniu sintetinant mRNR komplementaria grandinę. Susidaranti dsRNR karpoma į siRNR, kuri dalyvauja slopinime. Šis reiškinys pavadintas degradacine polimerazine cikline reakcija (*degradative PCR*). Tokiu būdu, į ląstelę patekusi arba ląstelėje susiformavusi dsRNR skaldoma Dicer nukleazės kompleksu į siRNR, kuri gali tarnauti pradmeniu kitų dsRNR sitezei. Tokiu būdu siRNR padauginama. Mutacijos RpRpol gene pažeidžia siRNR efektą. Augaluose pastebėta, kad RpR-pol mutacija pašalina transgenų slopinimą, tačiau neturi įtakos atsparumui virusams. RNR virusai turi savo RpRpol, kuri replikacijos metu suformuoja dvigrandę viruso RNR, todėl jiems ląstelės RpRpol nereikalinga. Tokiu būdu, daugelyje organizmų, efektyviam geno slopinimui reikalinga to geno mRNR ir RpRpol. Tiesiogiai RpRpol reikšmė buvo pademonstruota *C. elegans* panaudojus dvi

konstrukcijas, sintetinančias RNR, turinčias bendrą seką. Viena RNR buvo sudaryta iš X sekos – X-RNR, kita RNR buvo sudaryta iš X+Y sekos – XY-RNR. Šių sekų slopinimas atliktas, naudojant siRNR prieš Y seką. Jeigu vyksta dsRNR sintezė panaudojant siRNR pradmeniu, turėtų būti sintetinama dvigrandė YX RNR ir susidarytų X-specifinė siRNR. Šiame bandyme buvo pastebėta ir X RNR degradacija, kas patvirtina RpRpol dalyvavimą signalo amplifikacijoje. Toks mechanizmas patvirtintas augaluose, kirmelėse *C. elegans*, grybuose *N. crassa* ir kt. Žinduolių ląstelėse bei *Drosophila* RpRpol nerasta. Genomų analizė parodė, kad šiuose organizmuose geno, koduojančio RpRpol nėra. Organizmuose, kuriuose RpRpol yra svarbi, t.y. kuriuose vyksta komplementarios RNR grandinės sintezė, panaudojant pradmeniu siRNR, labai svarbus yra siRNR 3-OH galo būvimas, nes šis galas tarnauja pradmeniu. Tuo tarpu organizmuose, neturinčiuose RpRpol, siRNR 3-galo struktūra nėra tokia svarbi. Tačiau reikia pažymėti, kad nežiūrint amplifikacijos nebūvimo, tiek žinduolių ląstelėse, tiek *Drosophila* RNRi procesas yra efektyvus. Kiekvienas RISC kompleksas dalyvauja maždaug 10 mRNR molekulių skaldyme.

Pažymėtina, kad augale *Arabidopsis* rasti net 6 (RDR1-6) genai, koduojantys RpRpol. Pademonstruota, kad PTGS dalyvauja RDR1 geno koduojamas fermentas. Rdr2 polimerazė yra svarbi endogeninių transpozonų ir kitų pasikartojančių sekų slopinime, Rdr1 dalyvauja atsparumo virusams formavime.



Pav. 8.3. siRNR biogenezė ir veikimas.

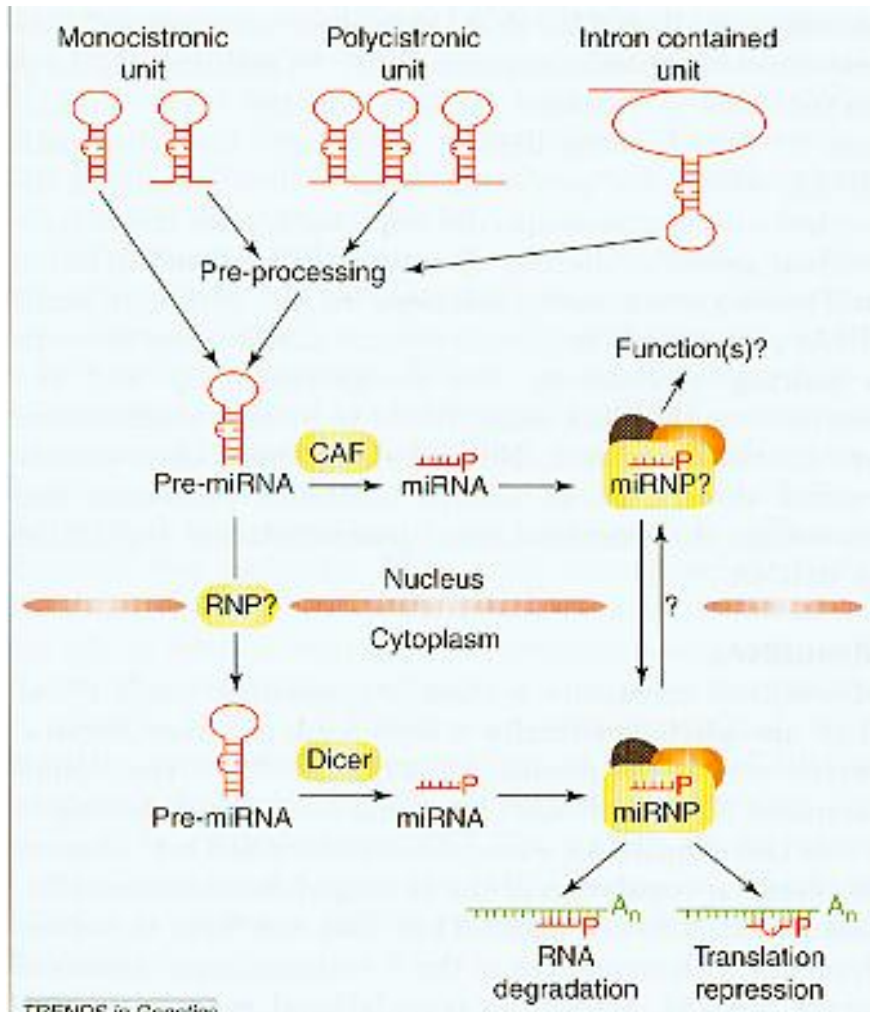


Pav. 8.4. siRNR signalo dauginimas RpRpol (RDR)

8.2. miRNR

Mikro-RNR - neseniai rasta nauja RNR klasė, susidedanti iš nedidelių RNR sekų. Šios RNR randamos bestuburiuose, stuburiniuose ir augaluose. Pirmiausia kirmėlėse *C. elegans* buvo rastos mažos trumpalaikės arba laikinos RNR - stRNR (*small temporal RNA*) lin-4 ir let-7, susijusios su vystymosi procesų reguliacija. Subrendusi stRNR susideda iš maždaug 21–25 nt ir gali sudaryti nepilnus dupleksus su atskirų genų netransliuojama 3' mRNR dalimi. Šios sąveikos pasėkoje yra inhibuojama mRNR translacija. Genomų analizė parodė, kad tokių RNR atskiruose organizmuose gali būti šimtai, jų funkcija daugelyje atvejų nėra žinoma. Buvo manoma, kad stRNR veikimas nesusijęs su siRNR. Tačiau neseniai pastebėtas šių dviejų reiškinių ryšys.

miRNR paprastai yra 20-25 nt viengrandė RNR, susidaranti iš ilgesnės segtuko formos RNR pirmtako. Gyvūnuose RNR pirmtakas koduojamas 60-70 nt nepilnai komplementarių invertuotų pasikartojimų. Augaluose pirmtakai randami apie 3 kartus ilgesni, negu gyvūnų ląstelėse ir sudaro kartais taisyklingas dvigrandes struktūras. Dauguma miRNR koduojamos tarpgeninėse genomo srityse, transkribuojamos nuo autonomiškų promotorių, tačiau kai kurios miRNR koduojančios sekos yra sukauptos į grupes genomo regionuose ir yra transkribuojamos vieno ilgo policistroninio pirmtako pavidale, kuris sukarpomas į pre-miRNR 60-70 nt branduolyje. Atskirais atvejais pastebėta, kad miRNR yra introninės kilmės, t.y. iškerpama iš introninės RNR (15% žmogaus intronų yra konservatyvūs). Pirminis miRNR transkriptas formuoja segtuko formos struktūras, kurias branduolyje skaldo ribonukleazė Drosha. Po skaldymo, susiformavęs apie 70 nt nepilnai komplementarus dupleksas transportuojamas į citoplazmą, kur toliau skaldomas Dicer tipo nukleazių. Drosha nuo Dicer skiriasi savo domenų struktūra. Be to, vienas iš RNazės III domenų Drosha gali būti neaktyvus, nes turi pakeitimus aktyviajame centre. Drosha randamas tik branduolyje, ypač branduolėlyje. Anksčiau šio fermento vienintelė funkcija buvo pre-rRNR procesingas.

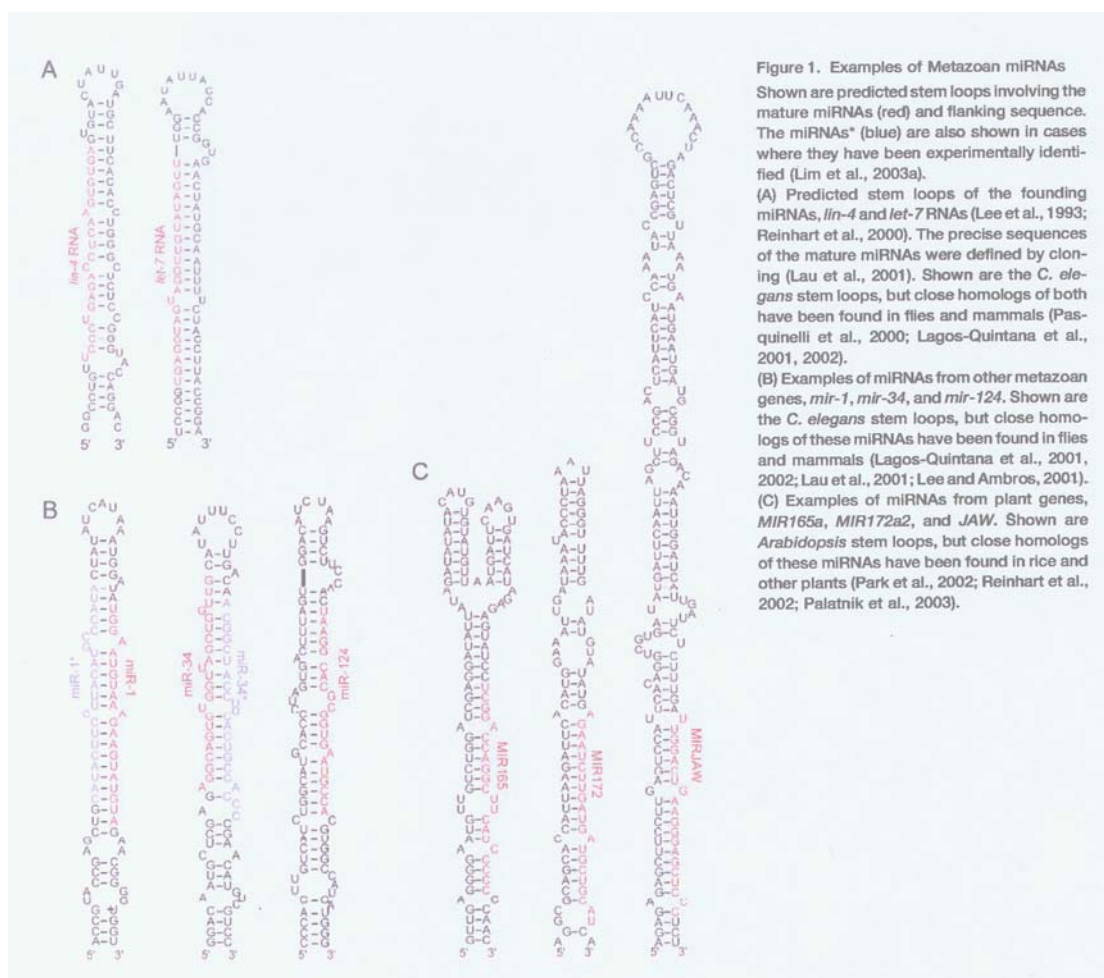


Pav. 8.5. miRNR formavimasis

Drosha nukleazė randama daugelyje organizmų, žinduoliuose, kirmelėse, musėse, tačiau nerandamas *S.pombe* bei augaluose. Manoma, kad augaluose miRNR pirmtako skaldymą branduolyje atlieka viena iš Dicer nukleazių, lokalizuota branduolyje. Augaluose *Arabidopsis* rasti net 4 genai, koduojantys Dicer tipo fermentus. Vienas jų Carpel factory – CAF (carpel – vaislapėlis) dalyvauja miRNR formavime branduolyje. Drosha, kaip ir Dicer suformuoja 2 nt išsikišusi 3'-OH galą. Baltymas *exportin-5* kartu su Ran-GTP sistema transportuoja pre-miRNR į citoplazmą. Citoplazmoje Dicer suformuoja maždaug 22nt nepilnai komplementarų dupleksą.

Žinduoliuose pre-miRNR transportuojama į citoplazmą, kur toliau karpoma Dicer sistemos į subrendusią viengrandę 21nt miRNR. Neseniai daugelis žmogaus ląstelės miRNR buvo rastos 15S kompleksuose į kurių sudėtį įėjo Gemin 3, Gemin 4 ir eIF2C2, tai yra RISC komplekso komponentai, sudarantys miRNP – mikro

ribonukleoproteininį kompleksą. Žmogaus *let-7* miRNR homologas taip pat yra šio komplekso komponentas. Pademonstruota, kad šis kompleksas gali indukuoti pilnai komplementarios RNR skaldymą. Šie duomenys leido daryti prielaidas, kad miRNP yra žmogaus RISC ir gali indukuoti tiek RNR skaldymą, kada mi-siRNR yra pilnai komplementari, tiek translacijos reguliaciją, kada miRNR nėra pilnai komplementari.



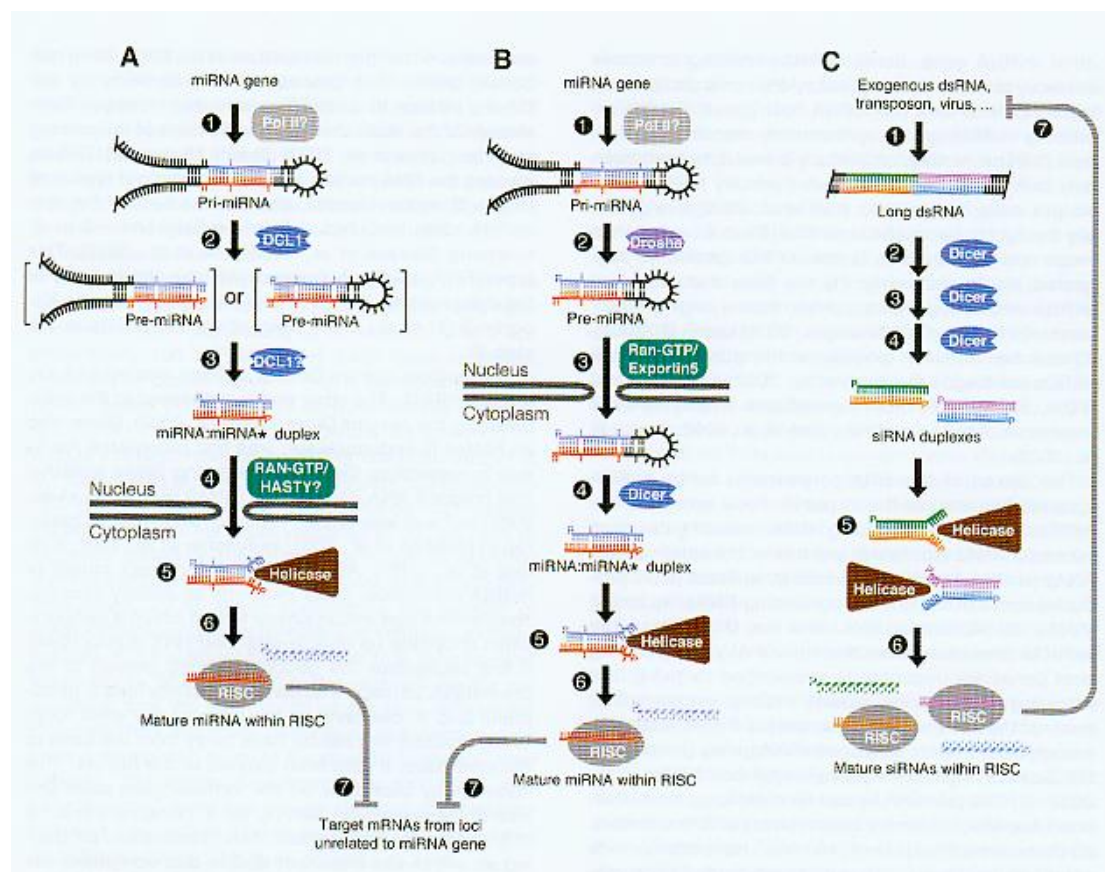
Pav. 8.6. Įvairių miRNR pirmtakai

Augaluose pastebėti skirtingumai, lyginant su gyvūnais. *Arabidopsis* miRNR formavime dalyvauja CAF baltymas, Dicer homologas. Pre-miRNR *Arabidopsis* sunkiai detektuojama, tuo tarpu subrendusi miRNR detektuojama lengvai. CAF geno mutantuose yra mažai miRNR, tačiau randama daugiau pirmtako, paprastai nedetektuojamo *wt*. Daroma išvada, kad CAF veikia branduolyje ir formuoja miRNR transkripcijos metu. Subrendusi miRNR transportuojama į citoplazmą RNP komplekso pavidale arba gali veikti branduolyje.

Augalų *Arabidopsis* ir ryžių genome lengvai buvo identifikuotos sekos, komplementarios arba dalinai komplementarios miRNR, t.y. potencialius miRNR

taikiniai. Pilnai komplementari miRNR veikia kaip siRNR, t.y. indukuoja komplementarios RNR skaldymą į siRNR, o nepilnai komplementari dalyvauja translacijos reguliacijoje. Gyvūnuose tokios sekos taip pat randamos. Paskutiniaisiais metais buvo identifikuota daug naujų miRNR genų bei jų taikinių baltymus koduojančių genų 3'-dalyje.

Tokiu būdu, aiškėja, kad miRNR ir siRNR turi daug bendro, jų generavime dalyvauja daug tų pačių komponentų, dalyvauja tie patys kompleksai.



Pav. 8.6. miRNR biogenezė. (A) Augalų miRNR biogenezė ir sąveika su taikiniu, savo kilme nesusijusiu su miRNR. Pre-miRNR yra labai trumpalaikės, sunkiai pastebimos yra postuliuojamos, augaluose nedetektuotos (skliaustuose) miRNR (raudona) įjungiami į RISC kompleksą, tuo tarpu priešinga grandinė degraduojama; (B) Metazoa miRNR biogenezė; (C) Gyvūnų siRNR biogenezė ir slopinimas lokuso, iš kurio siRNR susiformavo.

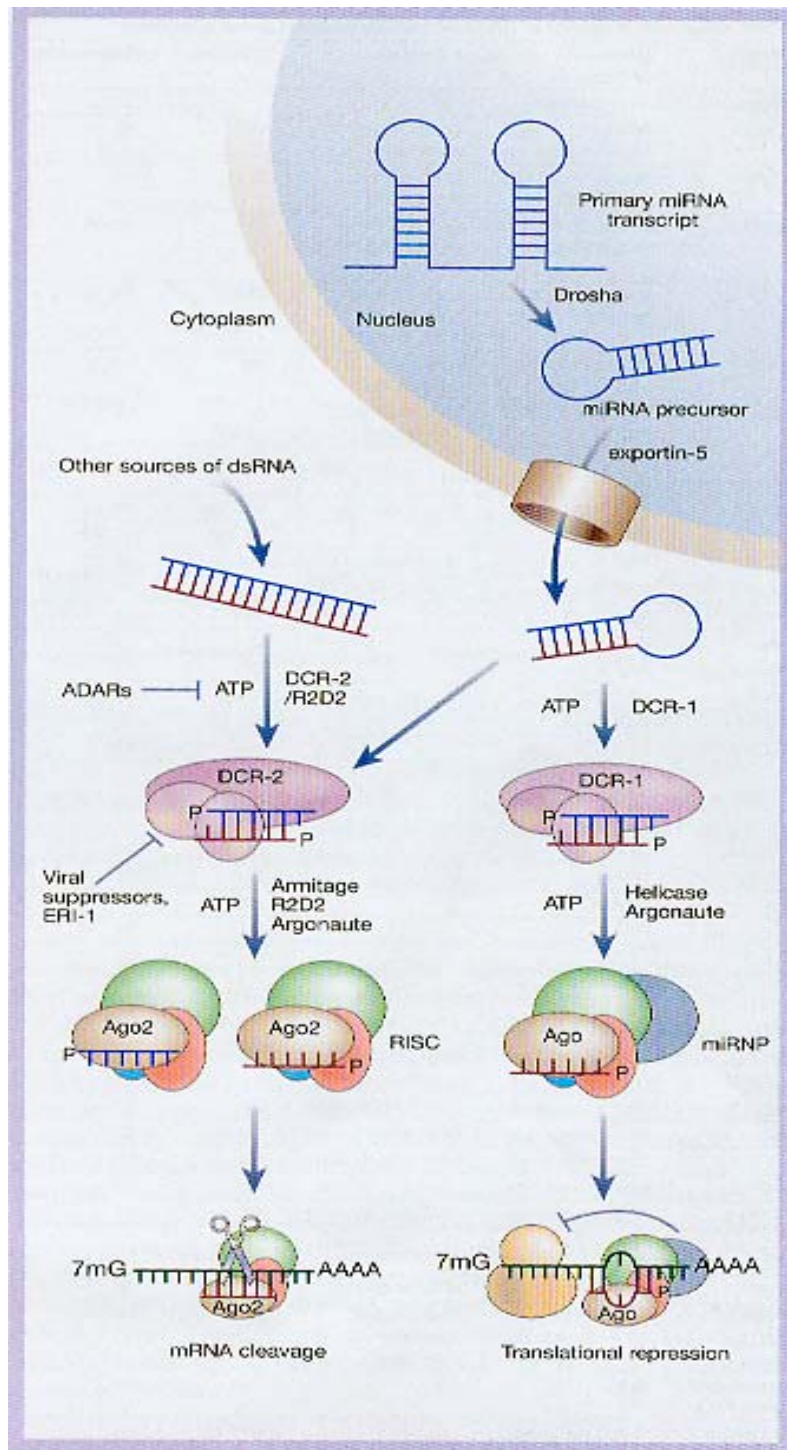
Augaluose dauguma identifikuotų miRNR beveik arba pilnai komplementarios mRNR taikiniui, todėl manoma, kad augaluose miRNR gali indukuoti mRNR skaldymą, o ne translacijos slopinimą. Arabidopsio ir ryžių genomuose nustatyta daug komplementarių miRNR – mRNR porų. Dauguma žinomų augalų miRNR turi taikinius transkripcijos faktorių genuose. Gal būt todėl augaluose mutacijos susiję su miRNR biogeneze (AGO1, CAF...) smarkiai įtakoja vystymąsi. Manoma, kad tokiu

būdu miRNR diferenciacijos procese degraduoja neberekalingų transkripcijos faktorių mRNR. Toks mechanizmas yra greitesnis, lyginant su transkripcijos represija.

miRNA	Target Gene(s)	Biological Role of Target Gene(s)
Insects		
miR-7	<i>Dm HLHm3</i> basic HLH transcriptional repressor	Interprets Notch-mediated decisions in neuronal development
	<i>Dm hairy</i> basic HLH transcriptional repressor	Interprets Notch-mediated decisions in neuronal development
	<i>Dm m4</i> Brd family protein	Interprets Notch-mediated decisions in neuronal development
miR-14 family	<i>Dm grim</i> antagonist of caspase inhibitor	Promotes apoptosis
	<i>Dm reaper</i> antagonist of caspase inhibitor	Promotes apoptosis
	<i>Dm sickle</i> antagonist of caspase inhibitor	Promotes apoptosis
Mammals		
miR-1	<i>Hs</i> Brain-derived neurotrophic factor (<i>BDNF</i>)	Growth factor; neuronal development
	<i>Hs</i> Glucose-6-phosphate dehydrogenase (<i>G6PD</i>)	Oxidative stress resistance
miR-19a	<i>Hs</i> PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase (<i>PTEN</i>)	Tumor suppressor gene
miR-23a	<i>Hs</i> Stromal cell-derived factor 1 (<i>SDF-1</i>)	Growth & localization of hematopoietic progenitor cells
	<i>Hs</i> <i>BRN-3b</i> POU-domain transcription factor	Neuronal development
miR-26a	<i>Hs</i> <i>SMAD-1</i> transcriptional co-modulator	Regulates TGF-dependent gene expression
miR-34	<i>Hs</i> <i>Delta1</i> transmembrane protein	Activates Notch during cell-fate decisions
	<i>Hs</i> <i>Notch1</i> transmembrane receptor for Delta	Cell-fate decisions during development
miR-101	<i>Hs</i> <i>ENX-1</i> polycomb gene	Proliferation of hematopoietic cells and other gene regulation
	<i>Hs</i> <i>N-MYC</i> basic HLH transcription factor	Proto-oncogene; cell differentiation & proliferation
miR-130	<i>Hs</i> Macrophage colony stimulating factor-1 (<i>MCSF</i>)	Mononuclear phagocytic lineage regulation
Plants		
miR170/171	<i>At</i> <i>SCL6-III, -IV</i> & related transcription factors	Related to genes for root radial patterning
miR156/157	<i>At</i> <i>SPL2</i> & related transcription factors	Related to genes for floral meristem identity
miR160	<i>At</i> <i>ARF10, ARF17</i> & related transcription factors	Related to genes for auxin response & development
miR167	<i>At</i> <i>ARF8</i> & <i>ARF6</i> transcription factors	Related to genes for auxin response & development
miR164	<i>At</i> <i>CUC1, CUC2</i> & related transcription factors	Shoot apical meristem formation & organ separation
miR169	<i>At</i> <i>CBF-HAP2</i> DNA-binding proteins	unknown
miR162	<i>At</i> <i>DCL1</i> Dicer-like RNase III	miRNA biogenesis

The metazoan regulatory targets listed were predicted computationally then supported experimentally. The plant regulatory targets listed

Iš lentelėje pateiktų duomenų matome, kad miRNR reguliuoja genus susijusius su vystymusi, meristema.



Pav. 8.7. Si ir mi RNR veikimo modelis.

8.3. siRNR ryšis su branduoliu

Augaluose pastebėta, kad nuo RpRpol priklausomas slopinimas gali plisti nuo slopinimą indukavusios homologinės dsRNR srities į nehomologines sritis. To nepaaiškina paprasta amplifikacija 5'-3' kryptimi panaudojant homologišką siRNR. Galimas reiškinio mechanizmas yra sąveika dsRNR, indukavusios slopinimą su transgeno DNR branduolyje, ko pasėkoje pertvarkoma chromatino struktūra. Manoma, kad dėl chromatino permodeliavimo gaunama netipiška (*aberrant*) mRNR, kuri tarnauja matrica dsRNR sintezei panaudojant siRNR pradmeniu. Kai kuriuose augaluose pademonstruota, kad transgeno sukeltas PTGS koreliuoja su transgeno DNR metilinimu. Chromatino metilinimas gali būti priežastimi netipiškų RNR sintezės. Parodyta, kad DNR metiltransferazės mutantai ir kai kurie SWI/SNF mutantai pasižymi pažeistu PTGS. Postuluojamos netipiškos RNR prigimtis nėra aiški. Parodyta, kad sojose ir tabake PTGS galima indukuoti su transgenu, kuris sintetina ribozimo pagalba sutrumpintą mRNR, neturinčią poliA galo. Tokia RNR paprastai lieka branduolyje. *Drosophila* ADH PTGS priklauso nuo argonautų šeimos baltymo PIWI, kuris lokalizuotas branduolyje. *S. pombe* RpRpol randama asocijuota su centromerine DNR. Taigi, kaupiasi, duomenys, rodantys galimą PTGS –RNRi ryšį ir su branduoliu.

Galima spėti, kad *Arabidopsis* RpRpol ir argonautų baltymų pagalba branduolyje netipiška RNR verčiama į dsRNR (be pradmens?), kuri Dicer pagalba skaldoma į siRNR branduolyje arba eksportuojama į citoplazmą, kur veikia citoplazminis Dicer kompleksas. Matomai, transportas į citoplazmą būtinas, nes dsRNR, gauta nuo invertuotų transgenų, veikia žymiai stipriau, kada eksportuojama (turinti poliA signalą). Gal būt RpRpol veikia sensoriumi, tikrina RNR kokybę, nes pastebėtas RNRi ryšys su stop-kodonus turinčios mRNR degradacija. Panašus modelis galėtų būti taikomas ir aiškinant ko-supresiją, indukuojamą papildomomis geno kopijomis, taip pat transpozonų veiklos slopinimą. Skirtinguose objektuose stebimi skirtingumai gali būti paaiškinami skirtingu atskirų RNRi reiškinyje dalyvaujančių baltymų genų skaičiumi. *Arabidopsis*, *C.elegans*, *Neurospora* RdRP baltymus koduoja multigeninės genų šeimos, *Drosophila* ir pas žmones nerastas nė vienas RpRPol genas. Matomai, *Arabidopsis*, *C.elegans*, *Neurospora* RdRP atskirų genų produktai gali dalyvauti atskirose stadijose. Pažymėtina, kas *C.elegans* RdRPol

homologo RRF3 mutacija padidina jautrumą RNAi, kas rodytų, kad šis genas veikia negatyviai į RNAi.

RNRi reiškinį gali sukelti ryškiai **padidinta** normalios RNR sintezė, nepilnos RNR (nepilnas transkriptas) pasirodymas, neefektyvi transliacija, RNR pasirodymas ne ten, kur reikia. Matomai, branduolyje nėra atsitiktinai pasirodančių ir atsitiktinai keliaujančių RNR. Esamos tvarkos pažeidimai dėl RNR pertekliaus, RNR sintezė ne ten, kur ji normaliai sintetinama, sukelia RNRi efektą. Sinezė *sense* ir *antisense* RNR branduolyje nebūtinai sukelia RNRi, priklauso nuo to, kokiose vietose sintezė vyksta, šios RNR nebūtinai susitinka ir suformuoja dsRNR. RNR kompartmentalizacija nėra gerai ištirta, tačiau daug duomenų patvirtina, kad tai yra svarbu. *Trypanosoma brucei* ir *C.elegans* parodyta, kad egzogeniškai įvedus *sense* ir *antisense* RNR, sukeliami RNRi. Tas pats stebima ir augaluose.

Kirmėlėse ilgos dsRNR injekcija greitai sunaikina homologiškus transkriptus citoplazmoje, tačiau atitinkamų transkriptų kiekis ryškiai mažėja ir branduolyje. Tai rodo, kad įvykiai citoplazmoje veikia transkripciją branduolyje. dsRNR homologiška geno intronams taip pat slopina geno transkripciją. Tai rodo, kad nesubrendusi RNR, kuri randama išimtinai branduolyje taip pat yra RNAi taikiny. Dumbluose *Chlamydomonas reinhardtii* MUT6 (RNR helikazė) baltymas, reikalingas PTGS procesui, lokalizuotas branduolyje. Parodyta, kad šis MUT6 baltymas reikalingas transpozonų nepoliadenilintų transkriptų degradacijai branduolyje. Taigi, kažkokie tai kompleksai, analogiški identifikuotiems citoplazmoje, gali būti ir branduolyje. Gal būt, RISC panašus kompleksas gali būti importuojamas iš citoplazmos į branduolį.

Tačiau didžioji pre-mRNR dalis yra atspari Dicer poveikiui branduolyje, matomai todėl, kad yra apsaugota baltymų kompleksais ir yra transportuojama į citoplazmą RNP pavidale. Tokiu būdu branduolyje RISC gali degraduoti tik jam prieinamą RNR, tai yra blogai supakuotą, netipišką RNR ar pasirodžiusią “ne vietoje”.

Žmogaus ląstelėse, dabartiniais duomenimis RNRi veikia tik citoplazmoje. Nepastebėta, kad RNR degradacija branduolyje būtų susijusi su RISC komponentais, tačiau dalis RISC komplekso galėtų veikti branduolio porose ir kontroliuoti transportuojamą RNR. Žmogaus RISC kompleksą sudarantys baltymai Gemin 3 (helikazė) ir Gemin 4, randami tiek citoplazmoje, tiek ir branduolyje. eIF2C2 /Ago2 randamas pagrindinai Golgi ir ER. Pilno RISC komplekso ar kompleksų lokalizacija žmogaus ląstelėse mažai ištirta.

Arabidopsis turi 4 į Dicer panašius genus - homologus. Vienas jų Carpel factory – CAF (carpel – vaislapėlis) dalyvauja miRNR formavime branduolyje. Taigi, bent jau *Arabidopsis* dsRNR gali būti karpoma ir branduolyje ir citoplazmoje. Pademonstruota, kad transgeninė ne-poliadenilinta segtuko formos RNR, susintetinta branduolyje, lieka branduolyje ir skaldoma į siRNR. Tomatuose viroido RNR, RNRpolIII transkribuojama branduolyje, gali būti verčiama į siRNR. Tokiu atveju, virusų HC-pro sistema, lokalizuota citoplazmoje negali inhibuoti siRNR susidarymo. Visa tai patvirtina apie galimą RNRi reiškinio lokalizaciją ir branduolyje. Be to, pademonstruota, kad *Arabidopsis* viena iš 6 RpRpol (RDR 2) dalyvauja transpozonų ir kitų pasikartojančių sekų slopinime.

Table 1 | Proven and possible RNA silencing genes in *Arabidopsis*

	Gene name	Locus	Function
<i>Argonautes (ago)</i>	<i>AGO1</i>	At1g48410	
	<i>AGO2</i>	At1g31280	
	<i>AGO3</i>	At1g31290	
	<i>AGO4</i>	At2g27040	Chromatin silencing
	<i>AGO5</i>	At2g27880	
	<i>AGO6</i>	At2g32940	
	<i>AGO7/ZIPPY</i>	At1g69440	Developmental timing
	<i>AGO8</i>	At5g21030	
	<i>AGO9</i>	At5g21150	
DCL	<i>PINHEAD/ZWILLE</i>	At5g43810	Meristem identity
	<i>DCL1/CAF/SIN1</i>	At1g01040	miRNA processing
	<i>DCL2</i>	At3g03300	Viral resistance
	<i>DCL3</i>	At3g43920	Chromatin silencing
	<i>DCL4</i>	At5g20320	
RDR	<i>RDR1</i>	At1g14700	Viral defence
	<i>RDR2</i>	At4g11140	Chromatin silencing
	<i>RDR3</i>	At2g19910	
	<i>RDR4</i>	At2g19920	
	<i>RDR5</i>	At2g19930	
	<i>RDR6/SDE1/SGS2</i>	At3g49500	PTGS viral defence
Two tandem dsRNA-binding domains	<i>HYL1</i>	At1g07900	miRNA biogenesis
	At2g28380		
	At5g41070		
	At3g62800		
Chromatin level silencing	<i>ME1</i>	At5g49160	CpG methylation
	<i>DDM1</i>	At5g66750	Chromatin remodelling
	<i>DRM1</i>	At1g28330	CpNpN methylation
	<i>DRM2</i>	At1g15380	CpNpN methylation
	<i>CMT3</i>	At1g69770	CpNpG methylation
Others	<i>SGS3/SDE2</i>	At5g23570	PTGS viral defence
	<i>SDE3</i>	At1g05460	PTGS viral defence
	<i>SDE4</i>		PTGS/chromatin silencing
	<i>HEN1</i>	At4g20910	miRNA processing/stability, PTGS, viral defence, chromatin silencing
	<i>HASTY</i>	At3g05040	Exportin 5, miRNA transport?

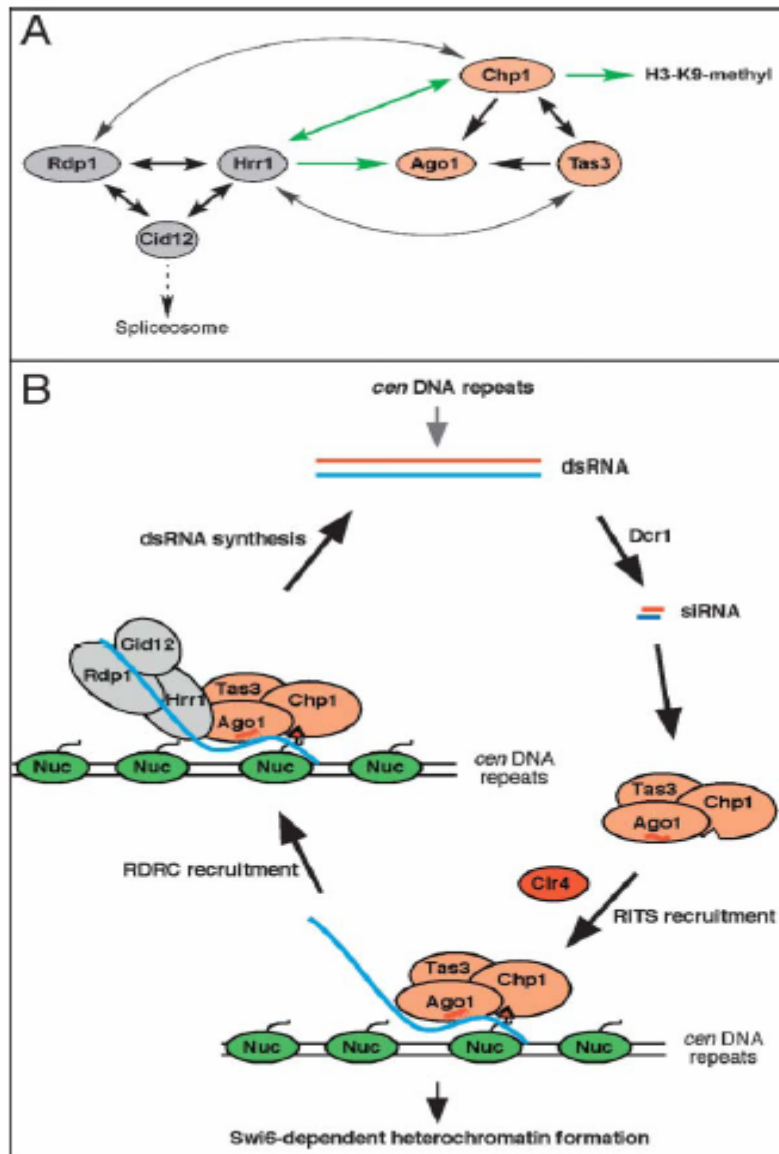
Pav. 8.7. *Arabidopsis* genai, koduojantys siRNR komponentus.

Detalūs pastarųjų metų tyrimai, naudojant virusų RNAi supresorių sistemas ir tabako bei *Arabidopsis* RNAi sistemos mutantus, parodė, kad RNAi pasėkoje susidaro dviejų tipų siRNR, besiskirianti savo dydžiu, 21-23 nt ir 24-26nt. Didesnės siRNR 24-26nt susidarymas koreliuoja su retroelementų slopinimu branduolyje ir jų genų metilinimu. Retrotranspozonomams specifinė siRNR randama išimtinai tik 24-26nt. Priešingai, trumpesnė 21-23 nt siRNR koreliuoja su sekai specifinės transgenų mRNR degradacija. Ilgas ir trumpas siRNR gali gaminti skirtingi Dicer kompleksai, susidedantys iš skirtingų Dicer homologų, kurie lokalizuoti branduolyje (ilgesnėms siRNR) arba citoplazmoje (trumpoms siRNR). Kai kuriuose augaluose parodyta, kad dsRNR indukuoja homologiškų DNR sekų metilinimą branduolyje, net tuo atveju, jeigu homologinė dsRNR seka yra tik citoplazmoje. Pav. transgenas branduolyje ekspresuojamas naudojant CMV viruso promotorių 35S. Augalo infekcija CMV virusu sukelia ekspresuojamo geno slopinimą ir metilinimą, nors CMV yra išimtinai citoplazminis virusas. Šiam atvejui dar neparodyta, kokia siRNR produkuojama, maža ar ilgesnė. Ryšys tarp RNAi ir chromatinio modifikacijų pademonstruotas ir kituose organizmuose. 2002 m. pasirodė daug publikacijų, rodančių, kad siRNR indukuoja chromatinio pokyčius. Parodyta kas siRNR indukuoja specifinių genų chromatinio histono H3-K9 metilinimą, ko pasėkoje toks chromatinas susiriša su HP1 (*heterochromatin protein 1*) ir formuojamas heterochromatinas. H3 K9 metilinimas veda prie atatinamos DNR sekos metilinimo, kas užtikrina paveldimą genų slopinimą.

Tyrinėjant *Arabidopsis sde4* mutaciją (2005 m.), fenotipiškai susijusią su PTGS ir slopinimo chromatinio lygyje procesais, buvo identifikuotas Sde4 baltymas. Paaiškėjo, kad šis baltymas yra homologiškas RNRpolIII didžiausiam subvienetui. Genomo analizė parodė, kad be šio geno, *Arabidopsis* genome yra papildomas genas, homologiškas RNRpolIII antrajam pagal dydį subvienetui. Postuluojama, kad šie baltymai sudaro RNRpolIV pagrindą. Spėjama RNRpolIV funkcija - heterochromatinio transkripcija. RNRpolIV transkribuoja pasikartojančias sekas, tarnspozoninius pasikartojimus, centromerines sekas, o RpRpol šiuos transkriptus verčia į dvigrandę RNR, kuri skaldoma branduolyje lokalizuotos Dicer nukleazės (DCL3) ir indukuoja chromatinio slopinimą, H3-K9 metilinimą ir DNR metilinimą. Kituose organizmuose tokia schema dar neminama. Gal tai tik augalams būdingas reiškinys.

Aukščiau minėtus reiškinius yra sudėtinga tyrinėti, nes pagrindiniai modeliniai objektai, kirmėlės ar augalai, turi po daug genų, kurių funkcijos gali persidengti, todėl dažnai mutacijų poveiki sudėtinga interpretuoti. Mielės *S.pombe* turi visų RNRi reiškinyje dalyvaujančių genų po vieną kopiją, tai įgalina žymiai lengviau tyrinėti atskirų komponentų funkcijas. Tyrimai *S. pombe* padėjo suprasti dsRNR ir chromatino ryšį. Pademonstruota, kad mutacijos RNR polimerazės (RpRpol), dicer, argonautų genuose ryškiai sumažina chromatino histono H3-K9 metilinimą ir heterochromatino asociaciją su heterochromatino baltymu SWI6 (*S. pombe* HP1 analogas). Šie tyrimai parodė, kad siRNR, atsiradusi dėl dsRNR, kilusios transkribuojant centromerinius pasikartojimus (!), skaldymo, veikia centromerų sekoms specifiniu gidu H3-K9 metilinimui, kuri atlieka *S.pombe clr4* histonų metilazė (H3-K9 specifinė). Tyrinėjant heterochromatino ir siRNR reiškinių sąveiką, buvo biocheminiais metodais identifikuotas kompleksas, pavadintas RITS (*RNA induced initiation of transcriptional silencing*). *S. pombe* šis kompleksas susideda bent iš 3 baltymų. Šiame komplekse randamas Ago1, vienintelis šių mielių Argonautų šeimos atstovas, baltymas Chp1 – chromodomeną turintis centromerą surišantis baltymas, reikalingas histono H3-K9 metilinimui centromeriniuose pasikartojimuose. Į šį kompleksą įeina ir naujas, nežinomos funkcijos Tas3 baltymas, tačiau turintis homologą pelėse OTT baltymą (*ovary and testes transcribed*). Šis kompleksas randamas susijęs su centromeriniu heterochromatinu, tačiau ši sąveika yra priklausoma nuo H3-K9 metilinimo. H3-K9 metilinimo pažeidimas (*clr4* mutacija) keičia kompleksą, jame neberandama siRNR.

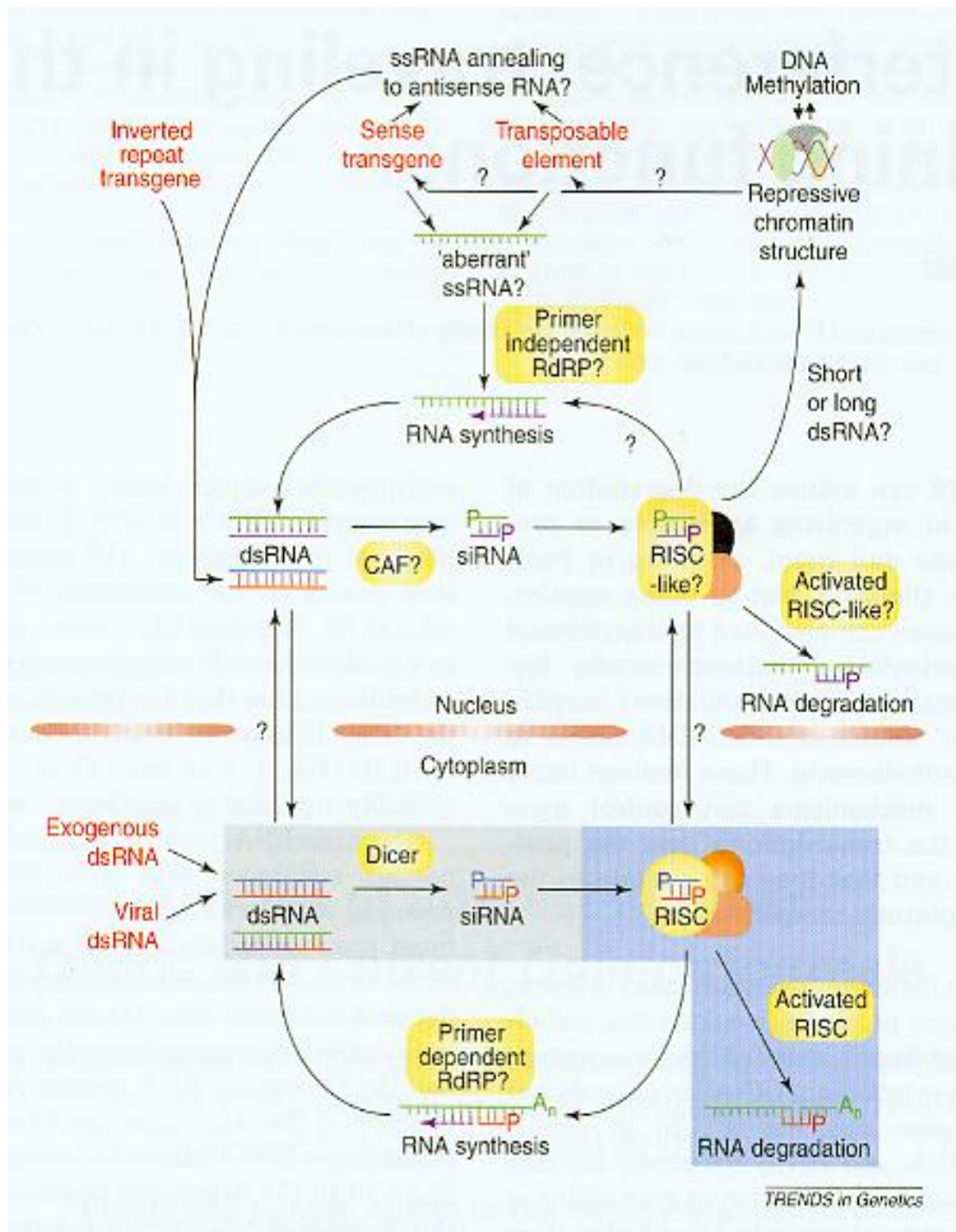
Neseniai *S. pombe* izoliuotas kitas su siRNR reiškiniu susijęs kompleksas, pavadintas RDRC (*RNA directed RNA polymerase complex*). Šis kompleksas taip pat svarbus centromerinio heterochromatino formavimui. RDRC kompleksą sudaro RpRpol (*rdp*), helikazė (*hrr1*) ir poli(A) polimerazė (*cid12*). Pademonstruota, kad RDRC kompleksas fiziškai sąveikauja su RITS kompleksu. Postuluojama, kad RITS pateikia RDRC kompleksui transkriptus, kuriuos RDRC dauginą, formuodamas dsRNR. Ši dsRNR skaldoma į siRNR. Tokiu būdu suformuojamas ciklas, dauginantis signalą.



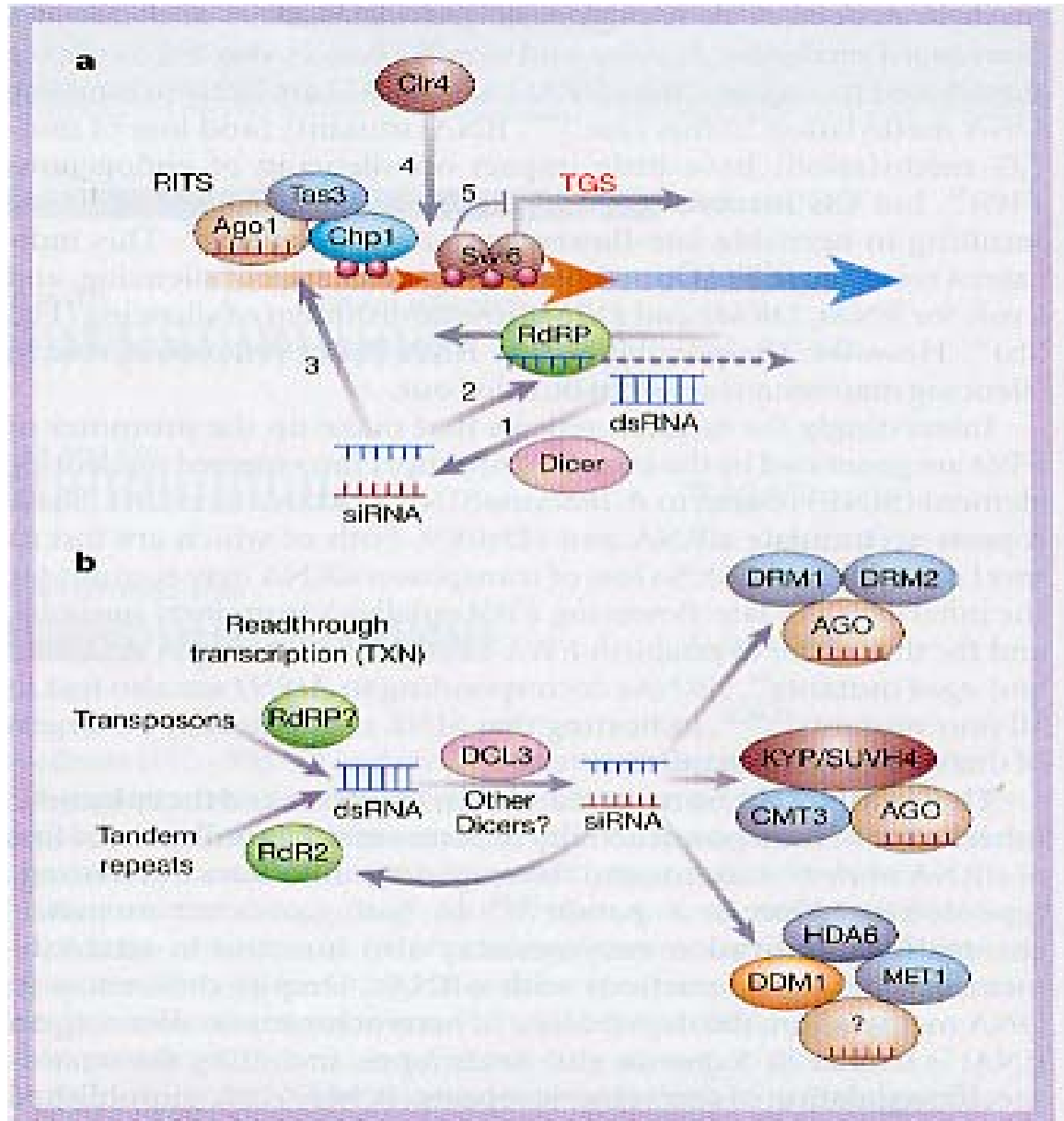
Pav. 8.9. RNRi kompleksai ir jų sąveika su heterochromatinu mielėse *S.pombe*.

A. RITS ir RDC kompleksų komponentų - baltymų tarpusavio sąveika. Tiesios rodyklės - baltymų sąveika parodyta masių spektrometrija ir tyrinėjant išgrynintų baltymų mišinius; lenktos linijos - sąveika pademonstruota imunoprecipitacijos metodais. B. Kompleksų sąveikos modelis.

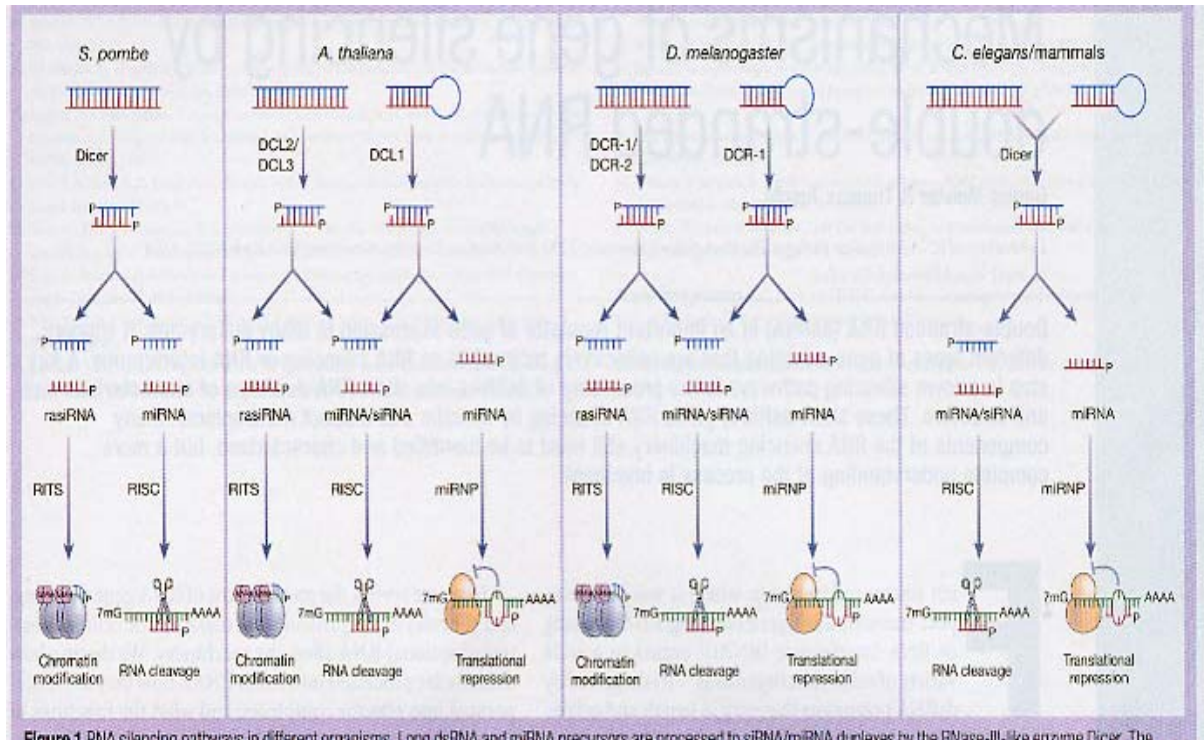
Tokiu būdu mielėse *S. pombe* parodyta, kad heterochromatino formavimuisi reikalinga RNRi sistema, bei heterochromatinui specifinė RNR.



Pav. 8.9. Galima siRNR veikimo schema citoplazmoje ir branduolyje.



Pav. 8.10. (a) Slopinimas mielėse *S.pombe*. Centromerine seka transkribuojama wt kamienuose ir verčiama į siRNR. Susiformavusi siRNR yra amplifikuojama RpRpol. (b). Augaluose didžiąją dalį besiformuojančios siRNR sudaro transpozonų ir tendemiškų pasikartojamų koduojama RNR. Ši RNR verčiama į siRNR. Bent trys genų grupės identifikuotos, kurių produktai gali formuoti kompleksus, indukuojančius heterochromatino formavimą. 1. DRM genai, koduojantys DNM3 metilazes, atliekančias de novo metilinimą. 2. Antra grupė sudaryta iš CMT3 - chromo metilaze, metilinančia CNG sekas ir histonų metilazių, metilinančių H3-K9.3. 3. Trečia grupė turi Dnm1 tipo DNR metilazę MET1, kuri palaiko GC metilinimą, bet gali ir de novo metilinti dalyvaujant siRNR. Į šią grupę įeina ir histonų deacetilazė, matomai reikalinga H3-K9 metilinimui.



Pav. 8.11. Apibendrinta si/mi RNR veikimo schema įvairiose sistemose.

8.4. Biologinės funkcijos

Pagrindinės PTGS ir RNRi funkcijos yra:

Gynybos nuo virusų infekcijos sistema. Augaluose apie 90% visų virusų yra RNR virusai, dauguma jų replikuojasi citoplazmoje. Tarpinė replikacijos forma yra dsRNR. Taigi, PTGS skaldo šią RNR ir apsaugo nuo virusų infekcijos. Tai yra lyg savotiška augalų imuninė sistema, nukreipta prieš virusus. Kita labai svarbi RNRi funkcija eukarijotuose yra transpozonų ir retro-elementų aktyvumo slopinimas. Trečia funkcija – genų veiklos reguliacija vystymosi metu. Daugelis miRNR reguliuojamų augalų genų dalyvauja vystymosi procese.

Šiuo metu atrodo, kad tie patys baltyminiai komponentai yra atsakingi už miRNR ir siRNR formavimą ir tolesnį funkcionavimą. Rezultatas – RNR degradacija ar translacijos reguliacija priklauso nuo komplementarumo lygio. Žmogaus ląstelėse miRNR 15SRNP kompleksas yra ir RISC, tuo tarpu kituose organizmuose, kuriuose randamos poligeninės RISC komponentų sistemos, šie procesai gali būti atskirti. *C.elegans* stRNR ir siRNR kompleksuose dalyvauja skirtingi argonautų šeimos

baltymai. *Arabidopsis*, kuriuose randama keletas Dicer šeimos baltymų, procesai vyksta ir citoplazmoje ir branduolyje.

Pamažu aiškėja ir kita siRNR funkcija – heterochromatino formavimas, transpozonų ir kitų pasikartojančių sekų slopinimas.

8.5. Augalų virusai ir PTGS

PTGS ir TGS yra augalų priemonė, kovai su viruso RNR replikacija. Augaluose pastebėtas reiškinys, vadinamas RMVR (*RNA mediated virus resistance*) (1993 m). Dougherty parodė ryšį tarp virusų infekcijos ir RMVR. Buvo pademonstruota, kad virusui homologiškos RNR (*sense* arba *antisense*) ekspresija stabdo viruso vystymąsi. Buvo patvirtinta, kad tai yra analogiškas RNRi atvejis. Tyrinėjant sinergistines virusų infekcijas, pastebėta, kad užkrėtus augalą dviem virusais, abiejų virusų vystymasis būna ryškiai efektyvesnis, negu kiekvieno atskirai. Tai vedė prie viruso koduojamų PTGS mechanizmų įveikimo sistemų atradimo. Paaiškėjo, kad virusai koduoja baltymus, kurie sąveikauja su PTGS sistema, ją inaktyvina ir tokiu būdu užtikrina viruso vystymąsi.

RNRi reiškinio stebėjimams augaluose sukurtos labai patogios sistemos: Jeigu į PVX virusą, sudarytą iš 5 ORF, kurių pirmas ORF atsakingas už replikaciją, likusieji ORF reikalingi judėjimui, įterpsime papildomą geną (tarp 4-5 ORF pavyzdyje), šis genas nepažeis kitų pagrindinių dviejų funkcijų. Įvedus į virusą konkretų augalo geną ir infekavus augalą bus stebimas augalo chromosominės geno kopijos slopinimas. Dar patogesnės sistemos paremtos GFP. Integravus GFP į augalo genomą, UV šviesoje tokie augalai švyti žaliai, GFP nustelbia raudoną chlorofilo švytėjimą UV šviesoje. Vektoriaus pagalba įvedus kitą GFP kopiją, atsiranda raudonos dėmės, kurios plinta po visą lapą ir augalą - vyksta komplementaraus geno slopinimas RNRi mechanizmu. Buvo pastebėta, kad tokį augalą infekavus virusu, RNRi silpnėja, nes virusai turi savo sistemas, padedančias įveikti RNRi. Šiuo metu jau žinoma keletas virusinių sistemų, skirtų RNRi įveikimui.

HC-pro. PVX (potato virus X) ir potivirusai (*potyvirus*) koduoja fermentą HC-Pro (*helper component protease*). Šis genas užtikrina viruso patogeniškumą, yra virulentiškumo enhanseris. Trys nepriklausomos grupės parodė, kad HC-Pro inhibuoja RNRi. Analogiški genai rasti kituose potivirusuose - *rice yellow mottle sobemovirus* – P1 baltymas, *African cassava mosaic geminivirus* – AC2 baltymas.

Visais atvejais stebimas sumažėjimas 21-23 siRNR susidarymo. Spėjama, kad HC-pro sąveikauja su calmodulinui giminingais baltymais.

Cmv2b. CMV virusas (*cucumber mosaic virus*) koduoja baltymą 2b, kurio funkcija tokia pat, tik, matomai, mechanizmas kitoks. Įvestas į aukščiau minėtas GFP slopinimo sistemas, jis neatstato GFP slopinimo audiniuose, kuriuose slopinimas jau įvyko, tačiau apsaugo naujai išaugusius lapus nuo RNAi. Analogiškai veikia Tav2b (*tomato aspermy cucumovirus*), p19 (*tomato bushy stunt tombusvirus*) baltymai.

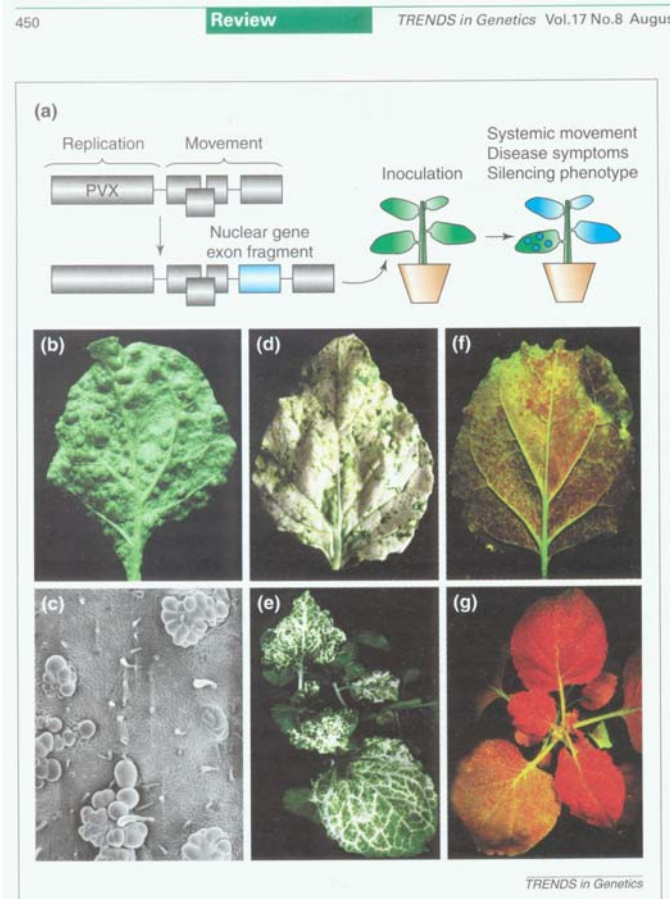


Fig. 1. Virus-induced gene silencing (VIGS). Like RNAi in animals¹⁰, VIGS is a powerful tool for both reverse and forward genetics in plants, allowing rapid identification of gene function. High-throughput virus inoculation procedures allow screening of several thousand individual genes within a couple of months. (a) Schematic of the VIGS principle, illustrated here with potato virus X (PVX). The grey boxes represent the open-reading-frames (ORF) found in the PVX genome. The first ORF encodes the machinery necessary for replication in single cell, while the remaining ones are required for movement. Insertion of additional sequences into the PVX genome does not impair these two functions. (b–e) VIGS of endogenous genes in *N. benthamiana*. (b–c) VIGS of the cellulose synthase, an essential component of the cell wall. (b) Virus-infected silenced tissues appear 'blistered'. (c) Electron microscopy reveals that these blisters are cells that cannot accommodate the turgor pressure (see also Ref. 71). (d–e) VIGS of phytoene desaturase, a key enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway that produces photoprotective pigments in plants. Loss of these pigments results in photobleaching and causes the tissues to turn white. (f–g) VIGS of a GFP transgene. (f) VIGS of GFP occurs in primarily infected cells and is manifested as the appearance of fluorescent red spots on a green leaf background (GFP), under ultraviolet (UV) illumination. The red colour is from chlorophyll fluorescence under UV. Each dot results from the expansion of a viral primary lesion. (g) Extensive VIGS of GFP caused by systemic infection of the virus inoculated in (f).

Pav. 8.12. GFP sintezė ir slopinimas augaluose.

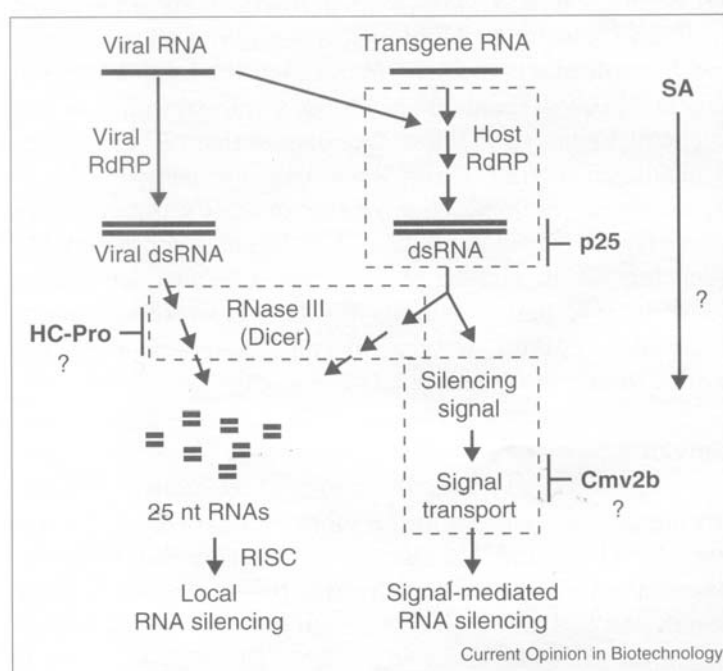
Virusų genomų analizė parodė, kad CMV 2b genas – naujai evoliucionavęs, lyginant su kitais genais. Genas 2b yra viruso adaptacijos prie šeimininko RNRi

sistemos pasekmė. Tomatų viruso Tav 2b genas įvestas į CMV vietoje CMV 2b įgalina CMV infekuoti 7 naujas rūšis. Matomai Tav 2b efektyviau supresuoja PTGS. Šiuo metu jau parodyta, kad arti 20 virusų turi 2b – HC-Pro tipo mechanizmus. Taip pat parodyta, kad 2b ir HC-Pro veikia skirtingose viruso vystymosi stadijose. HC-Pro veikia ir tada, kai RNRi jau įvykusi, tuo tarpu CMV 2b supresuoja RNRi iniciaciją. Neseniai buvo pademonstruotas trečias RNRi supresijos tipas, kuris veikia tik augalo lapo gyslose, matomai neleidžia virusui plisti. CMV2b turi efektyvų NLS, šio baltymo susikaupimas branduolyje supresuoja RNRi, tai rodo, kad RNRi reguliuojama branduolyje, o veikia (RNR degradacija) citoplazmoje.

Virusai turi ir kitokias apsaugos sistemas, viena iš jų yra virusų koduojami dsRNR surišantys baltymai. Šie baltymai efektingai atpažįsta dsRNR, bet nesąveikauja su DNR. Susirišdami su dsRNR jie apsaugo ją nuo ląstelės gynybos sistemų.

Virusų sistemos, nukreiptos prieš ląstelės – šeiminingo RNAi sistemą veikia skirtinguose lygiuose, tai pavaizduota paveikslėlyje:

Figure 1



Targeting distinct stages of RNA silencing pathways by viral suppressors (see text for details). RdRP, RNA-dependent RNA polymerase; RISC, RNA-induced silencing complex. (The figure was adapted from [13] and [24] with permission.)

Pav. 8.13. Virusų sistemos, slopinančios RNRi poveikį.

Virusų sistemas, slopinančias šeimininko RNRi mechanizmus, įvedus į augalus, pastebėta, kad ryškiai padidėja transgeno funkcionavimas ir išeiga. Atskirais atvejais pastebėtas iki 50 kartų heterologinio baltymo sintezės padidėjimas. Tačiau tokie augalai tampa labai jautrūs įvairiems virusams.

8.6. Virusų indukuojamas genų slopinimas - VIGS

Jeigu į augalą įvesime transgeną, ekspresuojantį viruso genomo fragmentą, infekcija su homologišku virusu nutildys transgeno ekspresiją, tačiau taip pat silpnės ir viruso vystymasis. Transgeninių augalų konstravime naudojant labai stiprų CMV 35S promotorių, tokių augalų infekcija CMV virusu slopina transgeno funkcionavimą. O tai jau didelė problema, nes dauguma naujų veislių sukurta naudojant šį ir kitų virusų promotorius. Taigi, dauguma šiuo metu naudojamų transgeninių augalų yra jautrūs virusų, kurių promotoriai panaudoto transgeno ekspresijai, infekcijai.

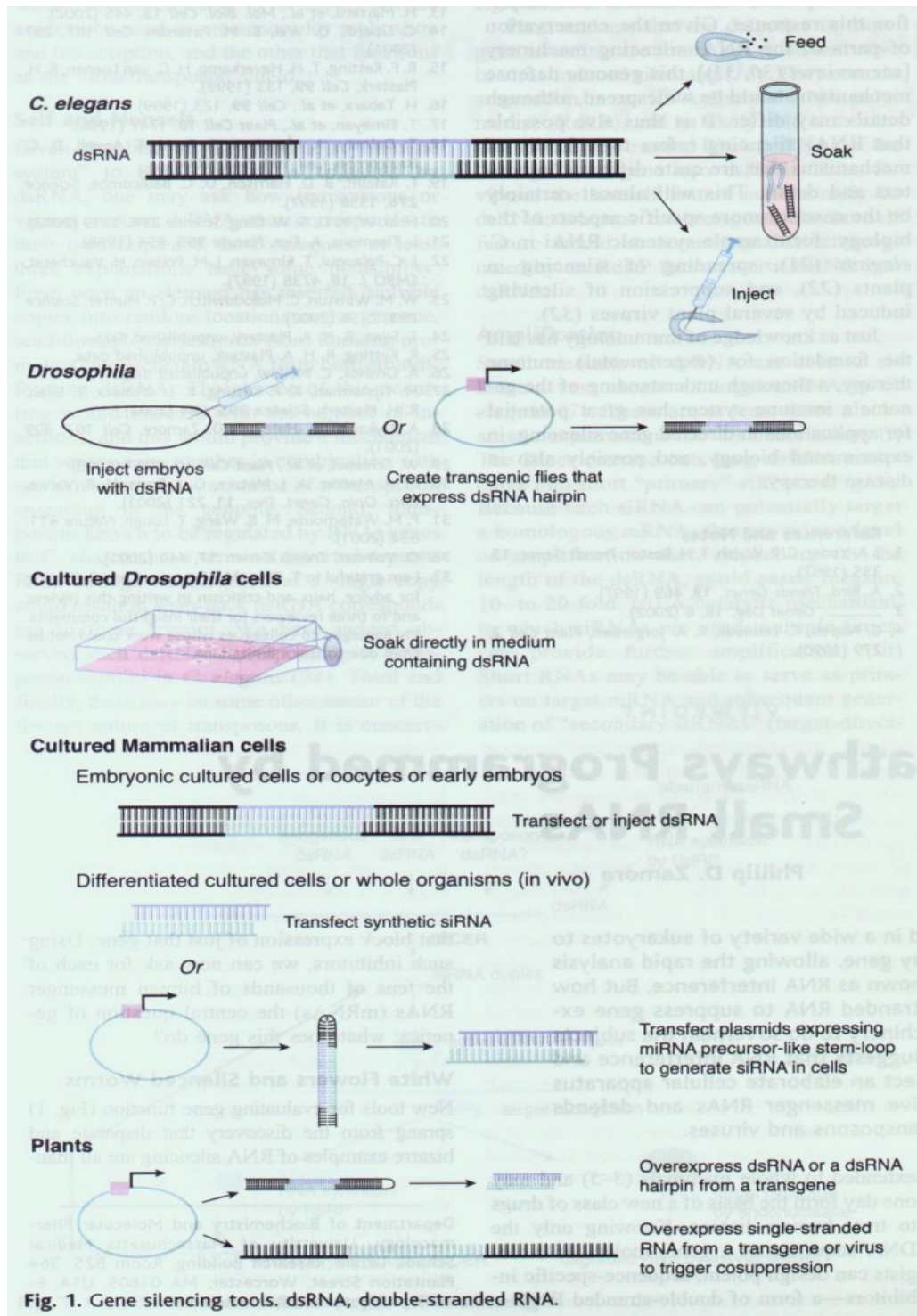
Augalai turi ir kitas gynybos sistemas: R genai koduoja baltymus, sąveikaujančius su *avr* (avirulence) viruso lokusu ar virusiniais baltymais. Paprasčiausias aiškinimas, kad dėka šios sąveikos paleidžiamas signalas gynybai (Ca^{++} , apoptozė).

8.7. RNRi – naujas, efektyvus molekulinės biologijos metodas

RNRi reiškinio supratimas leido kurti naujus metodus, leidžiančius tyrinėti genų funkcionavimą. Visi ankstesni genų inaktyvinimo metodai buvo paremti mutantų gavimu ar jų konstravimu. Tuo tarpu RNRi mechanizmai leidžia gauti tą patį fenotipinį efektą įvedant tiriamam genui komplementarią dsRNR. Tai yra žymiai greičiau ir paprasčiau.

Dvigrandę RNR galima gauti įvairiais būdais: (1) Klonuoti geną į pBS tipo plazmidę, turinčią T7, T3 ar SP6 promotorius ir *in vitro* susintetinti abi RNR grandines, kurias sumaišius susiformuos dvigrandė RNR. (2) Galima cheminiais RNR sintezės metodais susintetinti mažas siRNR; (3) Galima sukonstruoti geną, turintį invertuotą pasikartojimą. Tokio geno transkriptas suformuoja segtuko formos RNR, kuri veikia taip pat, kaip ir dsRNR. Tokį geną vektoriaus pagalba įvedus į ląsteles ar organizmą, transkribuojamo geno mRNR suformuos segtuko formos RNR, kuri bus verčiama į siRNR. Su kirmelėmis *C.elegans* elgiamasi dar paprasčiau - viską galima atlikti *in vivo*. Sukonstravus *E. coli* plazmidę, kurioje tikslinis genas patalpintas iš

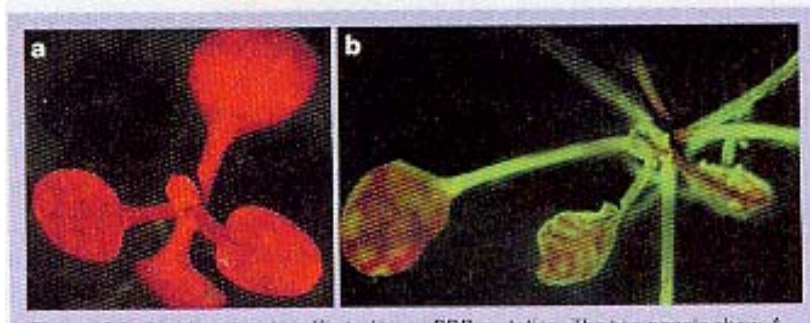
abiejų pusių tarp T7 promotorių ir indukavus T7 polimerazės sintezę, *E. coli* gaminsis dvigrandė RNR. Auginant kirmėles terpėje, turinčioje tokias *E. coli* bakterijas, bakterijos kirmėlių žarnyne yra virškinamos, o atsipalaidavus dsRNR įveikia žarnyno sienelių barjerus ir tampa RNRi sistemos taikiniu. Tokiu būdu, auginant kirmėles ant agaro terpės, kurioje auga *E. coli* turinčios *C.elegans* miozino geną, patalpintą tarp funkcionuojančių promotorių abiejuose geno galuose, susidaranti dsRNR išjungia *C.elegans* miozino geną. To pasėkoje, kirmėlės nebegali šliaužti ir auga krūvelėmis, kaip kad bakterijų kolonijos. Naudojant tokius metodus labai greitai buvo gauti *C.elegans*, *Drosophila* ir kt. organizmų genų nokautai, sukurtos *E. coli* bibliotekos, turinčios įvairių genų nokautavimui skirtų konstrukcijų rinkinius. *C.elegans* tokiu būdu buvo ištirta 16757 genai iš 19427. RNRi tapo vienu pagrindiniu genų funkcijų tyrimo metodu.



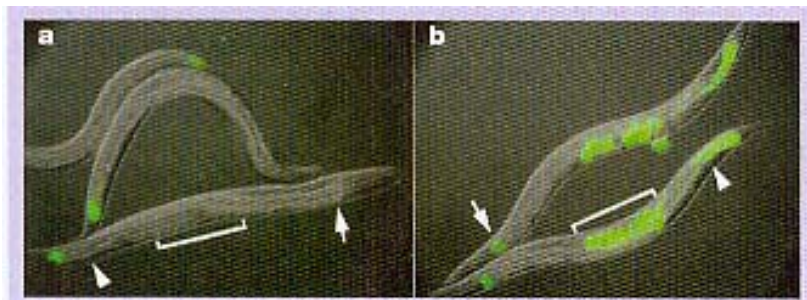
Pav. 8.14. Genų slopinimas kirmelėse

Šie metodai buvo perkelti ir į žinduolių ląsteles. Buvo pademonstruota, kad tiek pelių, tiek žmogaus ląstelėse dsRNR efektyviai slopina komplementarų geną. Šio metodo panaudojimą žinduolių sistemose riboja imuninė sistema. Jau seniai žinoma, kad žinduoliuose dsRNR sukelia imuninės sistemos atsaką, stimuliuoja interferonų sintezę. Tačiau, buvo pastebėta, kad imuninė sistema atpažįsta tik didesnę negu 30nt RNR. Tuo tarpu dsRNR mažesnė negu 30nt sėkmingai slopina genų funkcionavimą,

nesukeldama nespecifinio imuninio atsako. Žinduoliams skirtos siRNR sintetamos cheminiais metodais, arba sintetinama ilga dsRNR ir *in vitro* karpoma Dicer tipo RNaze į 21-23 siRNR. Efektyvus būdas yra sintetinti dvigrandę RNR *in vivo* panaudojant RNRpolIII promotorius. Ši polimerazė leidžia sintetinti tikslaus dydžio nedideles RNR. Naudojami du promotoriai sintetinant dvi komplementarias RNR arba vienas promotorius, sintetinant segtuko formos RNR. Tokias sistemas galima įvesti į ląsteles ar organizmą, naudojant įvairius žinduoliams skirtus vektorius.



Pav. 8.15. GFP slopinimas RNRi kelio mutantuose. (a) wt turintis įvestus du GFP transgenus, raudonai UV šviesoje švyti chlorofilas, GFP sintezė blokuota. (b) Augalas turintis RpRpol mutaciją, UV šviesoje žaliai švyti GFP.



Pav. 8.16. (a) GFP sintezės slopinimas wt kirmelėse, maitinamose bakterijomis, sintezuojančiomis GFP dsRNR. Signalas nepasiekė tik keletu ląstelių žarnyne, kirmelės gale ir prie galvos. (b) mutante siRNR signalas neslopinamas.

8.8. RNRi taikymo medicinoje perspektyvos

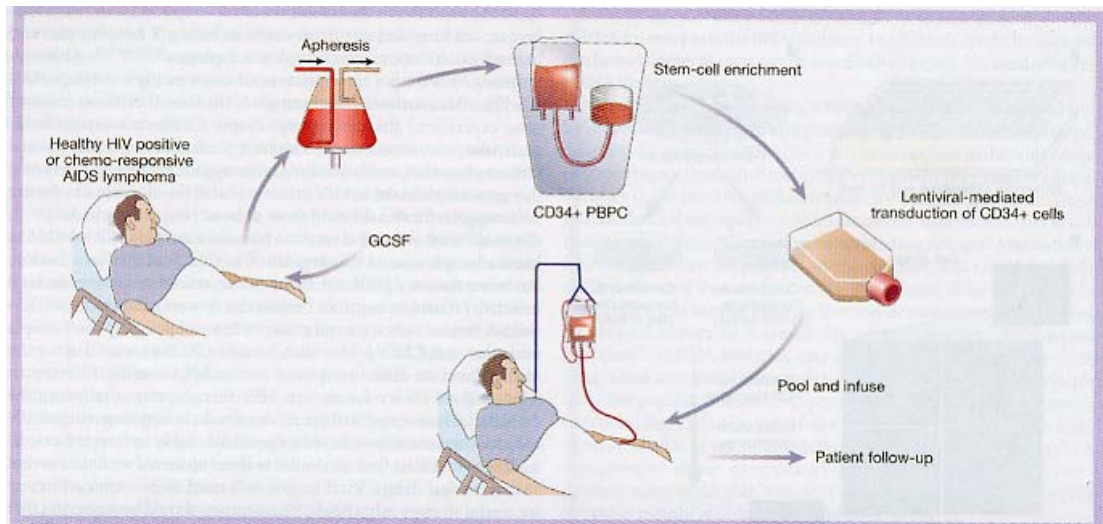
RNRi pasižymi nepaprastai dideliu specifiskumu ir degraduoja tik komplementarią RNR. Jeigu ląstelėje nėra taikinio, siRNR lieka visiškai inertiška ir nepasižymi jokiais šalutiniais, nespecifiniais efektais, skirtingai nuo daugumos farmakologinių priemonių. Akivaizdu, kad AIDS, gripo, HCV ir kt. infekcijų gydymas reikalauja naujų priemonių, nes tradiciniai metodai neduoda reikiamų rezultatų.

Kaip minėjome, žinduolių ląstelėse dsRNR sukelia imuninį atsaką. Nežiūrint to, pademonstruota, kad kai kurių virusų replikacijos metu dvigrandė RNR susiformuoja. Tokie virusai sintetina ir dsRNR surišančius baltymus, kurie apsaugo dsRNR nuo imuninės sistemos atpažinimo, tokiu būdu išvengia imuninio atsako.

Dauginantiems šiems virusams, įvairiais būdais susidaro dsRNR, vieniems replikacijos pasėkoje, kitiems – dėl persidengiančių genų transkripcijos. Šių dsRNR virusai apsaugo surišdami savo baltymais. dsRNR indukuoja serino/treonino PKR, kuri indukuoja IFN α/β atsaką. Šis atsakas stabdo virusų vystymąsi ir infekuotų ląstelių proliferaciją. PKR turi du domenų, reguliatorinį ir katalitinį. Reguliatorinis domenas yra dsRNR atpažįstantis domenas, apimantis du mažuosius dsRNR griovius. Atpažinimui yra svarbios 2'OH grupės, būdingos ribozėms. PKR neatpažįsta baltymais padengtos dsRNR. PKR sistemos išvengimui, daugelis virusų turi dsRNR surišančius baltymus: *Vaccinia* virusas – E3L; HIV/*H.sapiens* – TRBP-*transactivating responsive element binding protein* (PKR inhibitorius, komplementuoja E3L); Influenza A – NS1A (inhibuoja CPSF, būtina ląstelės mRNR 3'-galo brendimui); Influenza B – NS1B (blokuoja interferonų indukuojamą ubikitino šeimos baltymą ISG15); Reovirusai – rho3 (supresuoja RNRi); HCV – E2 baltymas inhibuoja PKR.

Žinduolių sistemose buvo pademonstruota, kad RNRi galima taikyti daugeliui ląstelių tipų, tačiau ne visuose ląstelių tipuose atsakas būna vienodas. Žinduolių sistemose paprastai naudojama jau suformuota siRNR arba *in vivo* sintetinama maža RNR. Tai daroma siekiant išvengti interferoninio atsako.

Naudojant siRNR technologijas, buvo pasiektas ryškus virusų dauginimo silpnėjimas žinduolių ląstelių kultūrose. Pav. žmogaus hepatito C (HCV) RNR kiekis per 4 dienas sumažėjo net 80 kartų. Įvairiose *in vitro* sistemose, naudojant įvairius virusus buvo pademonstruotas efektyvus virusų vystymosi slopinimas. Sekantis etapas – šias slopinimo sistemas perkelti į organizmo lygį.



Pav. 8.17. HIV infekcijos gydymo schema. Ligonis stimuliuojamas GCSF, kuris mobilizuoja kraujodaros kamienines ląsteles į periferiją. Iš ligonio kraujo, naudojant afininės chromatografijos, kolonėles surenkamos CD34 kamieninės ląstelės, paveikiamos lentivirusų vektoriumi, koduojančiu antiHIV RNR. Ląstelės gražinamos atgal ligoniui.

9. Genų raiškos tyrimo metodai

Ilgus dešimtmečius dominuojančiu genų raiškos tyrimo metodu buvo vadinama Northern RNR-DNR hibridizacija, pagal analogiją Southern'o DNR-DNR hibridizacijai, skirtai genomo analizei. Northern hibridizacija įgalino vienu metu stebėti vieną ar keletą genų, leido palyginti geno funkcionavimą kitų genų atžvilgiu, bei to paties geno funkcionavimą skirtingomis sąlygomis, skirtinguose audiniuose. Prasidėjus intensyviems genomų analizės tyrimams, nustačius pirmųjų organizmų pilnus genomus (*S. cerevisiae* – 1996 m.) iškilo poreikis sukurti metodus, įgalinančius vienu metu paraleliai stebėti visų genų arba bent daugelio genų funkcionavimą. Šiam tikslui buvo būtina sukurti didelio našumo (high-throughput) metodus kartu juos automatizuojant ir miniatiūrizuojant.

Šiais laikais sukurta gana daug įvairių masinės paralelinės genų ekspresijos tyrimo metodų, kurių keletą apžvelgsime detaliau.

1. EST sekų analizė (Expressed Sequence Tags).
2. SAGE metodas (Serial Analysis of Gene Expression).
3. DNR gardelės (DNA chips, DNA arrays, DNA microarrays).

9.1 EST

EST tyrimai prasidėjo gana seniai, ypač intensyvūs jie buvo paskutiniame praeito šimtmečio dešimtmetyje. Šių tyrimų tikslas buvo identifikuoti funkcionuojančius genus, bei įvertinti jų funkcionavimo lygį. Metodo esmė: iš įvairių organų, audinių ar organizmų vystymosi stadijų išskirta mRNR buvo verčiama į kDNR, klonuojama į vektorius ir masiškai sekvenuojama. Kadangi kDNR genų kopijos dažnai būna nepilnos dėl AT bei antros grandinės sintezės problemų, 3'- galų sekvenavimas šiuo atveju geriausiai charakterizuoja genų ekspresiją. Šios sekos vėliau labai padėjo identifikuojant genus žmogaus genomo projektuose, nes EST buvimas, nepriklausomai nuo sekos ilgio, liudija, kad genas yra transkribuojamas, tai yra kad jis funkcionuoja. Masiškai sekvenuojant kDNR kartu nustatomas ir genų ekspresijos lygis – daug vienodų kDNR sekų liudija, kad genas intensyviai transkribuojamas, retos kDNR sekos atspindi silpną geno ekspresiją. Tokiu būdu genų bankuose buvo sukaupta milijonai nusekvenuotų kDNR sekų. Toks tyrimo metodas reikalauja labai daug darbo sąnaudų ir resursų. Siekiant pagreitinti tyrimus, buvo kuriami nauji, efektyvesni metodai. Vienas jų – SAGE, efektyviai naudojamas iki šių dienų.

Metodo principas:

Paruošiama tiriamo organizmo kDNR biblioteka. kDNR sintezės metu, pirmos grandinės sintezei AT pagalba naudojamas biotinilintas oligoT pradmuo. Kaip taisyklė, biotinas prijungiamas AT reakcijoje naudojamo pradmens – oligoT 3'-gale. kDNR skaldoma smulkiai skaldančia restrikcijos endonukleaze (AE – anchoring enzyme). Pasirenkama tokia restrikcijos endonukleazė, kuri skelia kiekvieną kDNR. Tą galima patikrinti iš genomo analizės duomenų, jeigu tiriamo organizmo genomas sekvenuotas. Šiam tikslui pasirenkama 4 nukleotidus atpažįstanti restrikcijos endonukleazė. Tokios restrikcijos endonukleazės skaldo DNR maždaug kas 250 nt. Restrikcijos endonukleazė pasirenkama atsižvelgiant į tiriamo organizmo genomo G+C/A+T santykį. Pavyzdyje buvo naudojama restrikcijos endonukleazė NlaIII, skelianti CATG' seką. Iš suskaldytos DNR daugybės skirtingų fragmentų mišinio, streptoavidinu padengtų rutuliukų pagalba išžvejojami kDNR galai, kurių 3' galas baigiasi biotinilinta poliA seka, o 5'-galuose yra AE nuskelta seka. Išgryninti fragmentai padalijami į dvi dalis. Prie abiejų dalių liguojami skirtingi linkeriai A ir B, susidedantys iš trijų elementų: (i) Komplementaraus NlaIII restrikcijos endonukleazės skėlimo galo, reikalingo linkerių ligavimui su išgrynintais fragmentais; (ii) Dideliu atstumu nuo atpažinimo sekos skeliančios restrikcijos endonukleazės (TE – tagging enzyme) atpažinimo taikinio; (iii) A ir B linkeriams specifinių sekų, skirtų PGR amplifikacijai, panaudojant linkeriams A ir B specifinius pradmenis. Po ligavimo atliekamas skaldymas pasirinkta restrikcijos endonukleaze TE. Pavyzdyje buvo naudota restrikcijos endonukleazė FokI, atpažįstanti GGATG seką ir skelianti DNR 9/13 nt atstumu žemiau atpažinimo sekos. Šiuo metu naudojami neseniai surasti nauji fermentai, skeliantys dar toliau už atpažinimo sekos. Po skaldymo TE restrikcijos endonukleaze, susiformavę galai užbukinami juos pripildant Klenow DNR polimerazės pagalba. TE fermentas, skeldamas už 13 nt nuo atpažinimo sekos, atskelia DNR fragmentą, į kurį įeina AE fermento atpažinimo seka (4 nt) ir 9 nt charakteringi kiekvienai reakcijos mišinyje buvusiai kDNR. Tolesnė veiksmų seka yra skirta šių 9 nt fragmentų identifikavimui.

Patogumo dėlei gauti fragmentai liguojami tarpusavyje, t.y. sumaišomi A ir B fragmentų mišiniai. Po ligavimo, mišinys PGR – amplifikuojamas naudojant A ir B specifinius pradmenis. Amplifikacija vyksta tolygiai, todėl visi DNR fragmentai padauginami proporcingai. Po amplifikacijos DNR vėl skaldoma AE fermentu, kuris nuskelia anksčiau priliguotus linkerius, paliekant tik dvigubus devintukus. Dvigubi

devintukai gryninami, liguojami tarpusavyje ir klonuojami į plazmides. Gauti klonai masiškai sekvenuojami. Po sekvenavimo, analizuojami devintukai. Identiškų devintukų kiekis charakterizuoja atitinkamo geno transkripcijos intensyvumą.

SAGE metodas leidžia be brangių įrengimų, naudojant paprastas procedūras gauti informaciją apie tiriamo organizmo genų funkcionavimą. Šis metodas gali būti sėkmingai taikomas organizmams, kurių genomai jau sekvenuoti.

Panaudojant kitas IIS tipo restrikcijos endonukleazes (MmeI TCCRAC NNN...20/18) sukurtas patobulintas SAGE metodas, pavadintas LongSAGE. MmeI skelia 20 nt už atpažinimo sekos, todėl įgalina surinkti transkriptų žymenis 21 nt ilgio, o tai jau beveik unikali seka net žinduolių genomuose. 21nt gaunamas kombinuojant MmeI atpažinimo seką TCCRAC ir NlaIII CATG:

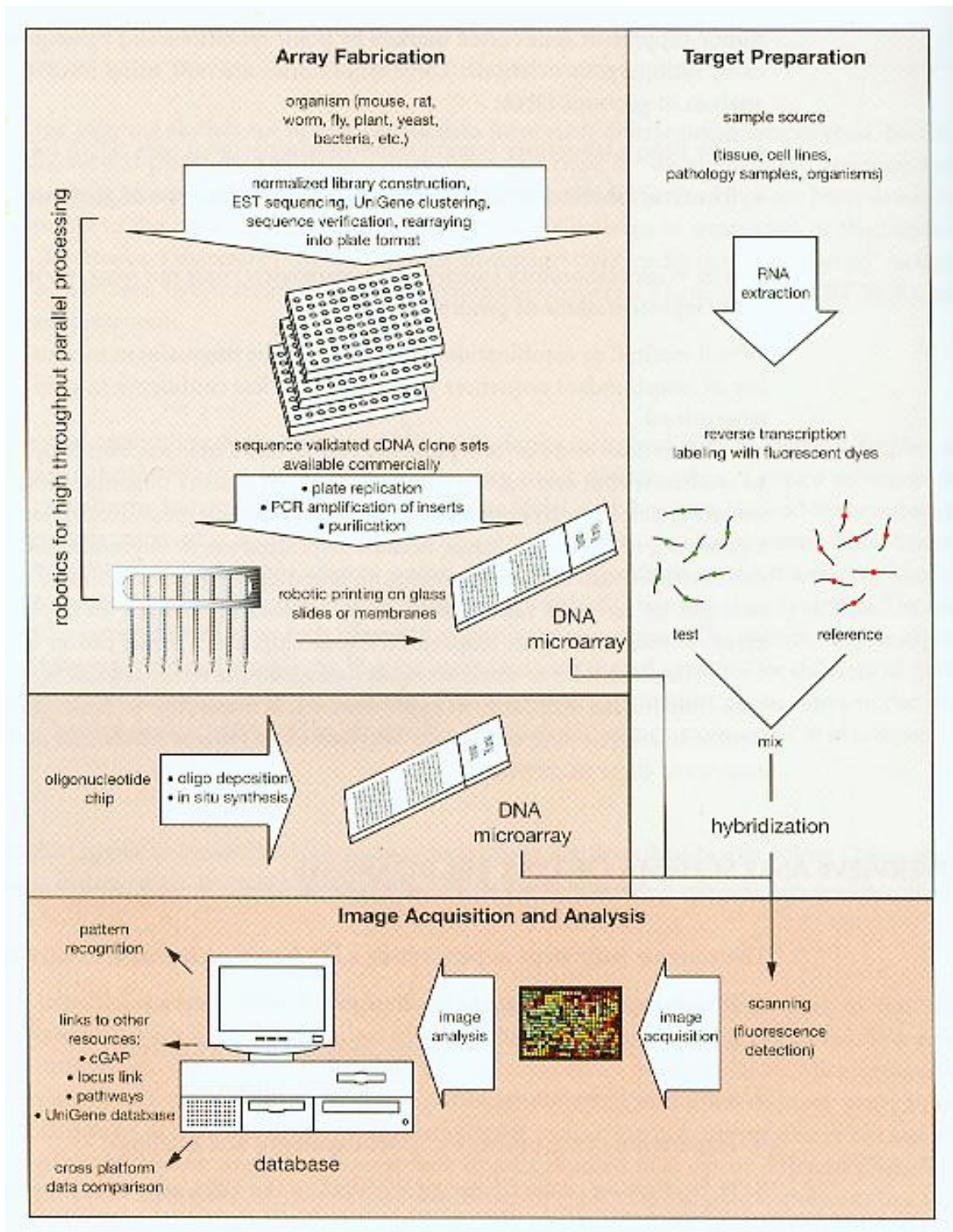
Pav. Suskaldžius NlaIII kDNR, siuvamas linkeris 36N...TCCGACATG, kurio gale yra MmeI ir NlaIII taikiniai, persidengiantys vienu nukleotidu (C).

9.3. DNR gardelės (DNA arrays, DNA microarrays; DNA chips)

DNR gardelių technologija yra vienas iš efektyviausių ir sudėtingiausių genomų tyrimo metodų. Šis metodas buvo kuriamas kaip atsakas į didėjantį iššifruotų genomų skaičių ir didžiulį poreikį vienu metu stebėti visų organizmo genų funkcionavimą. Tam tikslui genų kopijos - kDNR pavidale arba sintetiniai oligonukleotidai arba PGR reakcijos produktai, reprezentuojantys tiriamų genų pasirinktas dalis, roboto pagalba užnešami griežtai nustatyta tvarka ir imobilizuojami ant stiklo ar kitokio kieto aktyvuoto paviršiaus, suformuojant mikrogardelę. Paprastai į vieną tašką užnešama 10-50 nl DNR tirpalo. Tokiu būdu suformuojamos gardelės, talpinančios viename cm² tūkstančius skirtingų DNR pavyzdžių. Galima gardeles formuoti tiesiai ant aktyvuoto stiklo paviršiaus sintetinant (auginant) oligonukleotidus (Affymerix firma, JAV). Suformuotos gardelės hybridizuojamos su fluorescuojančiais dažais pažymėta RNR arba DNR. Po hybridizacijos, lazerio pagalba įvertinamas fluorescencijos signalas kiekviename taške. Genų ekspresijos lygis įvertinamas kompiuterinių programų pagalba palyginus fluorescencijos signalus. DNR gardelių pagalba įvertinta žmogaus genų ekspresija visuose audiniuose normos atveju, t.y. paruošti sveikų ląstelių sveikame organizme transkripcijos lygio standartai. Šie duomenys yra labai vertingi, kada norima išsiaiškinti patologijos procesą transkripcijos lygyje. Vieni iš reikšmingiausių šios technologijos panaudojimo

pavyzdžių yra visų žinomų vėžinių ląstelių transkripcijos palyginimas, genų kurių transkripcija pakinta vėžio atveju, padidėja ar sumažėja, identifikavimas. Išsiaiškinus tokių genų funkcijas, kuriami nauji gydymo metodai.

DNR gardelių technologijos taikomos tik organizmams, kurių genomai jau nusekvenuoti, nes gardelių paruošimui reikalingos kiekvieną geną reprezentuojančios DNR sekos. Gardelių formavimui naudojama kDNR, PCR amplifikavimo produktai ar sintetiniai oligonukleotidai. Jeigu naudojami oligonukleotidai ar genų PCR – amplifikuoti fragmentai, kompiuterinių programų pagalba parenkamos nepersidengiančios ir pagal G+C/A+T santykį suderinamos sekos, siekiant kad visų gardelėje esančių sekų lydimosi (hibridizacijos) temperatūra būtų kiek galima artimesnė. Gardelių ruošimo schemas pateiktos Pav.9.2.



Pav. 9.2. DNR gardelių ruošimo principai

Paruošta gardelė hibridizuojama su tiriamais NR pavyzdžiais, pažymėtais fluorescenciniais dažais. Tai gali būti mRNR, išskirta įvairiausių biologinių šaltinių, tai yra ląstelių kultūrų, organų, klinikinių biopsijos preparatų, histologinių pavyzdžių.

Detalios protokolus apie hibridizacijos pavyzdžių paruošimą, fluorescuojančių dažų įjungimą ir hibridizacijos procesą galima rasti įvairių daugelio gardeles ruošiančių firmų ar laboratorijų dokumentuose.

Keletas adresų:

Stanfordo universitetas www.cmgm.stanford.edu/pbrown

A.Einstein College of Medicine

www.sequence.aecom.yu.edu/bioinf/microarray_protocol.html

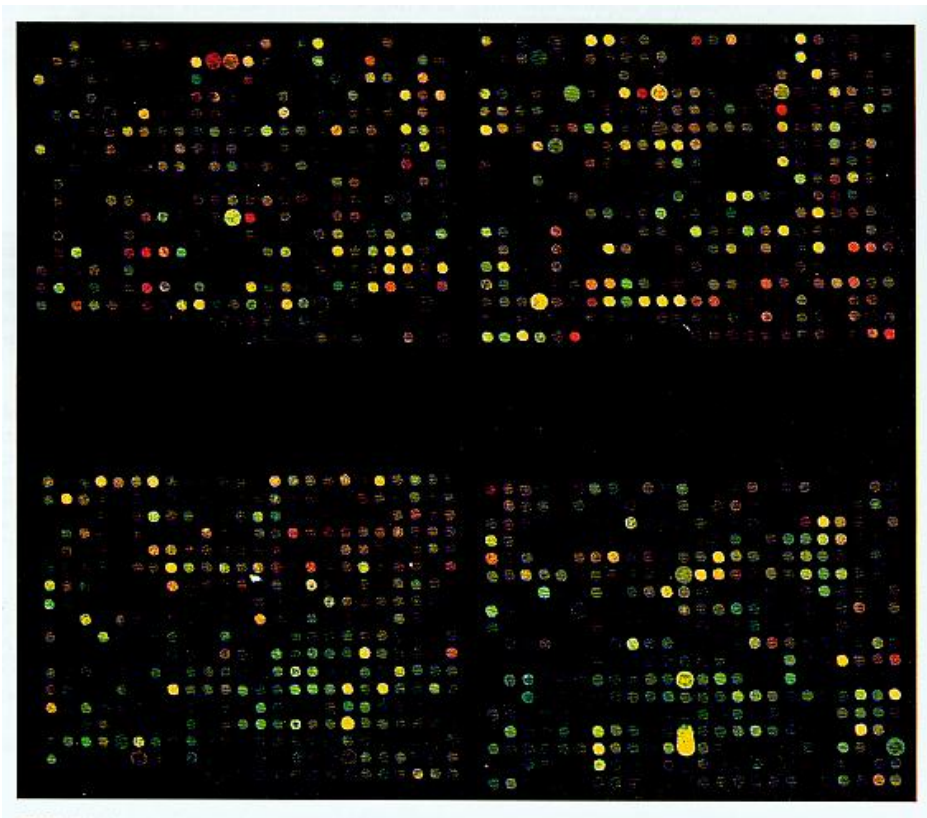
NHGRI www.nhgri.nih.gov/DIR/LCG/15K/HTML/protocol.html

Cold Spring Harbor Lab. www.nucleus.cshl.org/wigler

Collection of protocols www.protocol-online.net/molbio/DNA/dna_microarray.htm

TIGR protocols www.tigr.org/tdb/microarray

Po hibridizacijos, gardelė yra skanuojama, įvertinamas kiekvieno sėkmingai susihybridinusio pavyzdžio fluorescencijos signalas. Populiariausi fluoroforai yra Cy3 (žalias) ir Cy5 (raudonas). Paprastai hibridizacijai skirti pavyzdžiai dalijami į dvi dalis, kiekviena dalis žymima skirtingu fluoroforu, po to vėl sumaišoma. Fluorescencijos signalo analizės pavyzdys pateiktas paveikslėlyje.

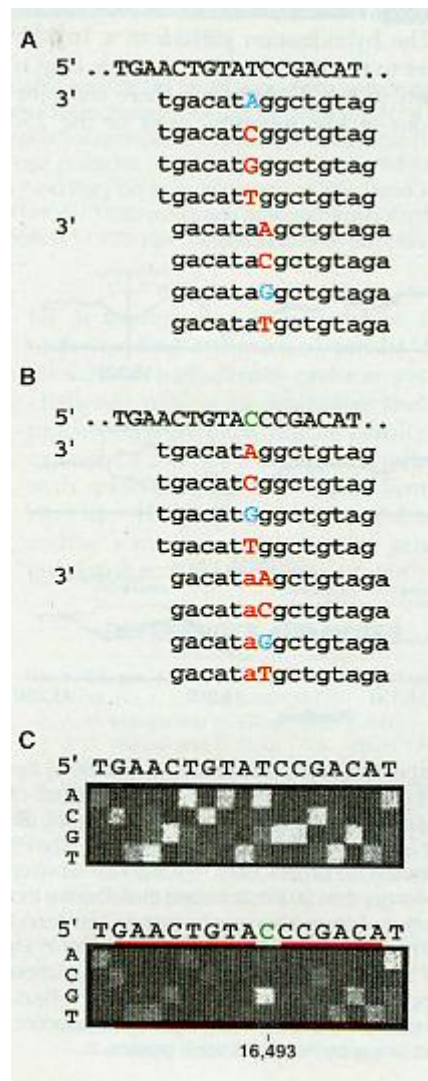


Pav. 9.3. Analizuojamos gardelės pavyzdys

Dviejų fluoroforų mišinys duoda skirtingus signalus, priklausomai nuo susihybridinusios NR kiekio.

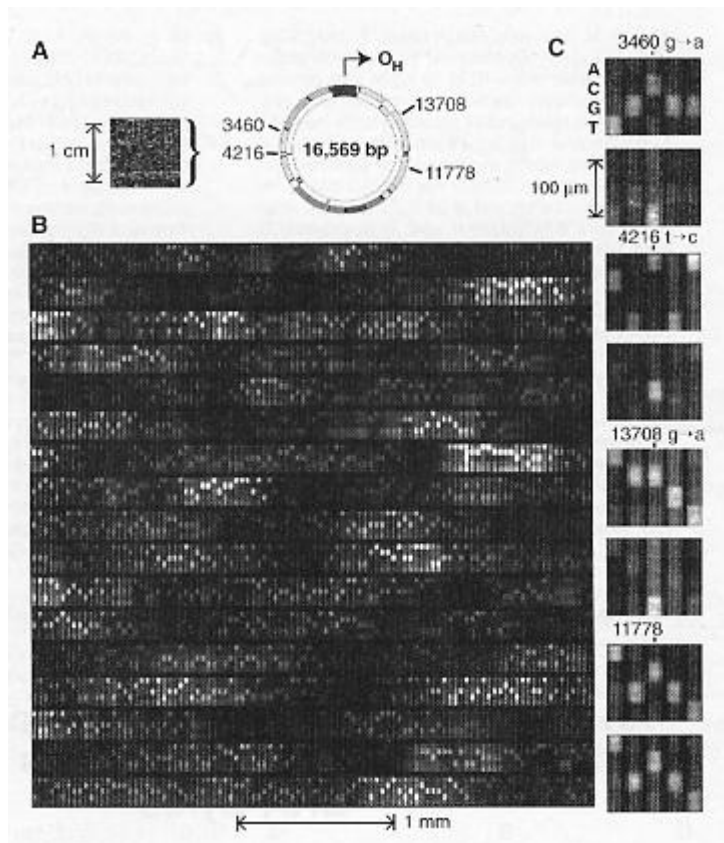
Reikia pažymėti, kad metodas pasižymi didelėmis paklaidomis, dažnai, naudojant skirtingų gamintojų paruoštas gardeles ir skirtingas gardelių ruošimo technologijas, gaunami nesutampantys rezultatai. Todėl patikimais rezultatais laikomi tie, kurie besiskiria maždaug 2 kartus. Genų ekspresijos rezultatus, gautus naudojant gardelių technologijas, rekomenduojama patikrinti dar ir kitu, nepriklausomu metodu, dažniausiai PGR realiame laike (RT-PCR – *real time PCR*).

DNR gardelių technologijos taip pat naudojamos ir daugelyje kitų hibridizacija paremtų eksperimentų: mutacijų identifikavimui, SNP analizėje. Žemiau pateiktame pavyzdyje pademonstruota, kaip gardelių technologija dar 1996 m. buvo panaudota žinomos DNR sekos, žmogaus mitDNR persekvenavimui.



Pav. 9.4. Žinomos DNR sekos persekvenavimas

Gardelės formavimui buvo sintetiniai oligonukleotidai – 15 tukai, po keturis kiekvienai sekai, slenkant po vieną nukleotidą. Kiekvieno ketvertuko viduryje buvo skirtingas nukleotidas. Tokiu būdu, kiekviena pozicija buvo atstovaujama keturiais skirtingais nukleotidais. Penkioliktukas, kurio seka pilnai atitinka mitDNR seką, duoda intensyviausią hibridizacijos signalą, lyginant su kitais trimis oligonukleotidais. Paveiklėlyje viršuje (A) pademonstruotas oligonukleotidų sintezės principas, o (B) pateiktas pavyzdys, kada sekvenuojamoje sekoje randamas sekos neatitikimas, C vietoje T. Šiuo atveju, su taikiniu hibridinsis jau kitas oligonukleotidas, kurio sekam pilnai atitiks taikinį (C). Žmogaus mitDNR sudaryta iš 16569 nt, todėl gardelei suformuoti reikėjo $16596 \times 4 = 66384$ oligonukleotidų. Žemiau pateiktas šio eksperimento kompiuterinės analizės iliustracija.



Pav. 9.6. Analizuojamos gardelės vaizdas

Dešinėje (C) poromis pateiktos trys wt ir mutantinė sekos (Leber paveldima nefropatija sergančio ligonio mitDNR), ketvirtoje poroje, dvi wt sekos.

10. Genomų tyrimo metodai

21 amž. molekulinė biologija labai keičiasi. Šie pokyčiai susiję su genomų tyrimais. 2001 m. paskelbti pagrindiniai žmogaus genomo tyrimų rezultatai, vėliau paskelbta (2003 - 2004 m.) detali atskirų chromosomų analizė. Žmogaus genomo tyrimai parodė, kad atskirų rasių ar tautų genomai yra labai artimi, skirtumai sudaro mažiau 0.1 % tačiau tarp individų stebimas polimorfizmas. Šiuo metu (2005 m.) jau identifikuota virš 7 milijonų vieno nukleotido skirtumų – vieno nukleotido polimorfizmų – SNP (*single nucleotide polymorphism – snip*). Tyrinėjant polimorfizmą, pastebėtas atskirų lokusų sukibimo netolygumas (*linkage disequilibrium*). Tai rodo, kad genomas paveldimas dideliais blokais, o krosingoveris tarp homologinių chromosomų dažniausiai vyksta “karštuose taškuose” tarp šių blokų, t.y. meiotinė rekombinacija nėra visiškai atsitiktinė. Palyginus žmogaus ir šimpanzės genomus, paaiškėjo, kad šių labai artimų genomų „blokų“ ribos ir „karšti“ rekombinacijos taškai nekoreliuoja, nežiūrint didelės genomų homologijos. Susiejus tam tikrą genomo dalį ar bloką su kokia nors paveldima liga ar polinkiu, galima ieškoti genetinio žymens, kurio būvimas koreliuoja su patologijos požymiu. Tokiais genetiniais žymenimis bandoma panaudoti SNP. Stengiamasi identifikuoti SNP, koreliuojančius su tam tikru fenotipu, pav. polinkiu į patologiją. SNP gali būti patologijos priežastimi, pav. mutacija ekzone, arba žymeniu, sukibusiu su fenotipu. Tokių specifinių SNP identifikavimas leistų prognozuoti individo savybes, polinkius, riziką tam tikrai patologijai, jautrumą ar atsparumą vieniems ar kitiems vaistams ir tt. Idealus atvejis, kad vienas ar keletas SNP charakterizuotų tam tikrą fenotipinį požymį ar polinkį. Šiuo metu vyksta intensyvi žmogaus genomų SNP analizė, stengiamasi surasti SNP koreliuojančius su individo savybėmis. Reikalinga tarp milijonų SNP atrinkti tuos, kurie galėtų teikti informaciją apie fenotipą. 2005 m. jau identifikuota virš $7 \cdot 10^6$ SNP. Manoma, kad 200 000 su fenotipais susietų SNP turėtų užtekti pilnam individo genomo charakterizavimui.

Be SNP, pastaruoju metu pasirodė publikacijos, skirtos genų kopijų skaičiaus polimorfizmo tyrimams – CNP (*copy number polymorphism*). CNP variabilumas galėtų būti puikia atskirų populiacijų charakteristika.

SNP analizei kuriami įvairūs, greiti metodai, leidžiantis vienu metu identifikuoti daug SNP ir tokiu būdu charakterizuoti individą. Šiuo metu jau surinkta

informacija apie daugelio su vėžiu susijusių genų polimorfizmą. Žinomos mutacijos BRCA1 (nuo *breast cancer*), BRCA2, APC ir kt. genuose, koreliuojančios su polinkiu į vėžinius susirgimus. SNP naudojamas ir vėžinių ląstelių identifikavimui, t.y. vėžiniam genomui būdingų mutacijų suradimui audinyje. Kadangi vėžinės ląstelės paprastai sudaro tik dalį tiriamo auglio audinio, metodai turi leisti pastebėti mutacijas sveikų ląstelių mišinyje. Nauji SNP ieškomi įvairiais būdais persekvenuojant genomus. Žinomų SNP suradimui naudojami metodai, paremti hibridizacija arba fermentinėmis reakcijomis.

10.1. Hibridizacijos metodai

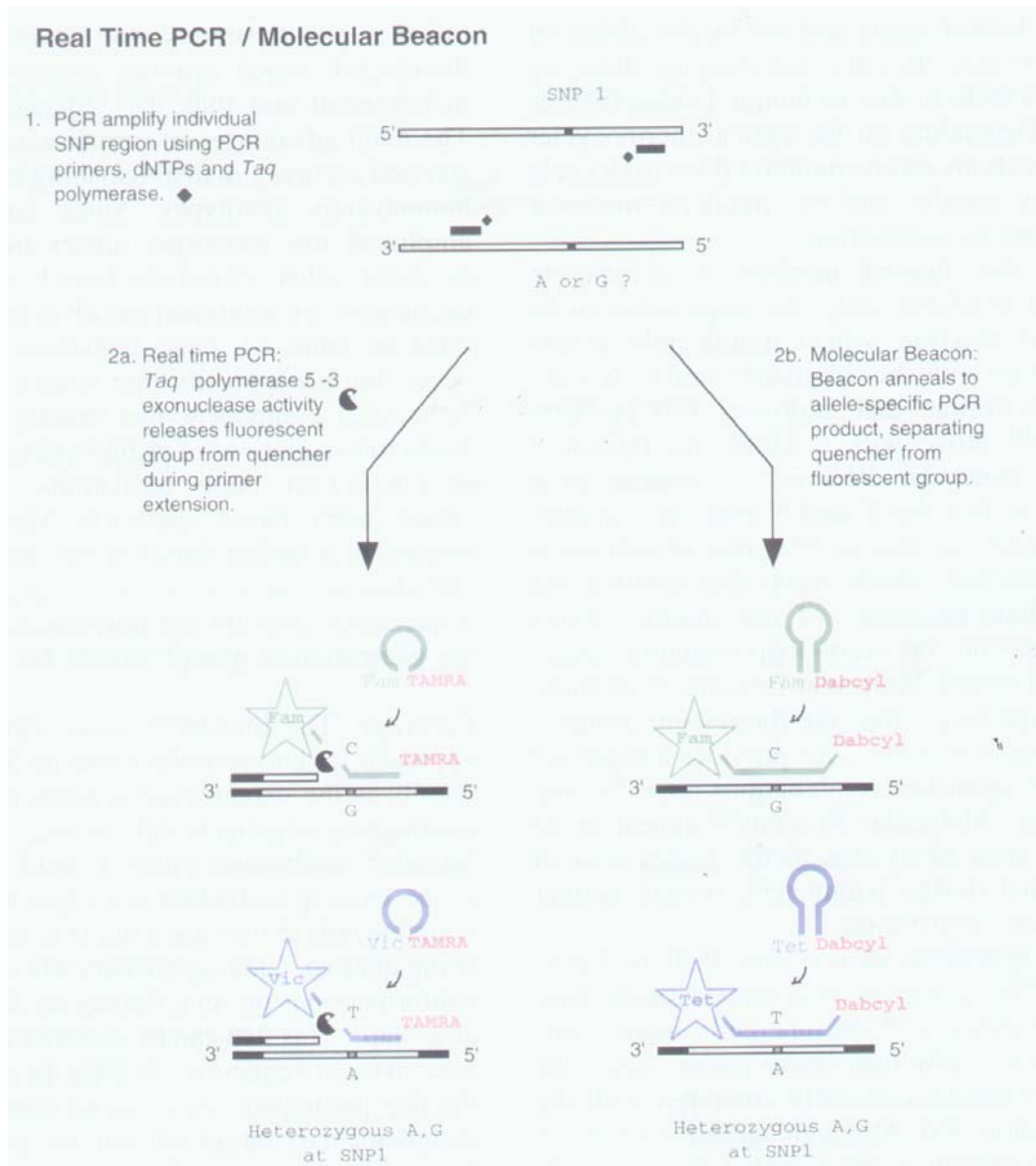
Mikrogardelės. Mikrogardelių pagalba, naudojant hibridizaciją, galima persekvenuoti geno dalis ir identifikuoti SNP. Tam tikslui tiriami lokusai amplifikuojami PCR pagalba, fragmentuojami, žymimi specifiniais dažais, hibridinami su mikrogardele. Tokiu būdu, vienu eksperimentu galima gauti informaciją apie tūkstančius SNP. Nors teoriškai, šis metodas atrodo labai patogus ir perspektyvus, tačiau praktika rodo, kad šiuo metodu 97% tikslumu pastebima 65% SNP, gana didelis klaidingų teigiamų (*false-positive*) rezultatų skaičius (11-21%). Reikia pažymėti, kad metodai sparčiai tobulinami.

PCR realiaame laike (RT-PCR, *Real-time PCR*). Tai PCR reakcija, kurios metu susidarantis produktas fiksuojamas laike, tokiu būdu stebimas produkto didėjimas. Paprasčiausias metodas stebėti DNR sintezę laike yra pridėti interkaliuojančių dažų, kurie fluorescuoja tik susirišę su dvigrande DNR. Vienas populiariausių dažų yra SYBR. Galima naudoti ir EtBr. PCR reakcijos metu atliekamas fluorescencijos testavimas tais ciklo momentais, kada DNR būna dvigrandėje būsenoje. Tokiu būdu gaunama produkto didėjimo kreivė.

Žymiai tobulesni PCR reakcijos metu susidarančių produktų testavimo metodai paremti hibridizacija. Viena tokių technologijų paremta naudojant taip vadinamą Taqman, leidžia stebėti PCR produkto atsiradimą realiaame laike. Tiriamas lokusas amplifikuojamas PCR pagalba. Amplifikacijos mišinyje yra taip vadinamas Taqman oligonukleotidas, kuris hibridinasi su SNP apimančia seka DNR sintezės temperatūroje (70°C). Taqman oligonukleotido galuose yra: 5'-gale fluorescuojantis dažas (Fam – karboksifluoresceinas), 3'-gale – fluorescencijos gesintojas TAMRA (karboksitetrametilrodaminas). Be to, oligo nukleotido 3'-galas blokuojamas, kad jis

negalėtų tarnauti pradmeniu. Abu junginiai, dažas ir gesintojas, yra tokiaame atstume, kuris užtikrina fluorescencijos gesinimą. DNR amplifikacijos metu, prie kiekvienos naujai susintetintos komplementarios DNR grandinės Taqman oligonukleotidas prisiriša tik tuo atveju, jeigu jis yra pilnai komplementarus. Prisirišusį oligonukleotidą Taq-polimerazė savo 5' → 3' egzozonukleaziniu aktyvumu skaldo, ir atskelia oligonukleotido 5'-gale pritvirtintą fluorescuojantį dažą, tokiu būdu atskiria jį nuo oligonukleotido 3'-gale esančio fluorescencijos gesintojo. Tokiu būdu, jeigu Taqman oligonukleotidas pilnai atitinka tiriamąją seką, DNR amplifikacijos metu tirpale didėja fluorescencija, kurią aparatas fiksuoja. Tokiu būdu "realiame laike", t.y. PCR reakcijos metu pavyzdys ima švytėti arba ne. Pagal tai sprendžiama, ar tiriamajame lokuse yra SNP, ar ne. Kadangi didžioji SNP dalis yra autosomose, SNP gali būti vienoje iš dviejų chromosomų. Norint tą identifikuoti, naudojami du oligai, su skirtingais dažais ir gesintojais. Tokiu būdu viename mėgintuvėlyje galima testuoti keletą ar net keliolika SNP vienu metu.

Analogiškai, vietoj Taqman sistemos, SNP detekcijai naudojami ir taip vadinami molekuliniai švyturiai (*molecular beacon*). Molekulinis švyturys – oligonukleotidas su komplementariais galais, formuojančiais segtuko formos struktūrą. Šio oligonukleotido galuose, kaip ir Taqman sistemoje, yra fluorescuojantis dažas ir gesintojas. Kada oligonukleotidas yra segtuko formoje, gesintojas yra pakankamai arti dažo, todėl fluorescencija nevyksta.



Pav. 10.1. PCR realiame laike schema

PCR realiame laike - molekulių švyturių metodas. PCR produktas detektuojamas naudojant linijinius oligonukleotidus (Taqman tipo, 2a) arba molekulinis švyturius -2b. Fam- karboksifluoresceinas, TAMRA – karboksitetrametilrodaminas, Dabcyl – dimetilaminofenilazo benzoine rūgštis, Vic – Privatus Appl. Biosystem kompanijos fluorescuojantis dažas, Tet - tetrachloro-6-karboksifluoresceinas.

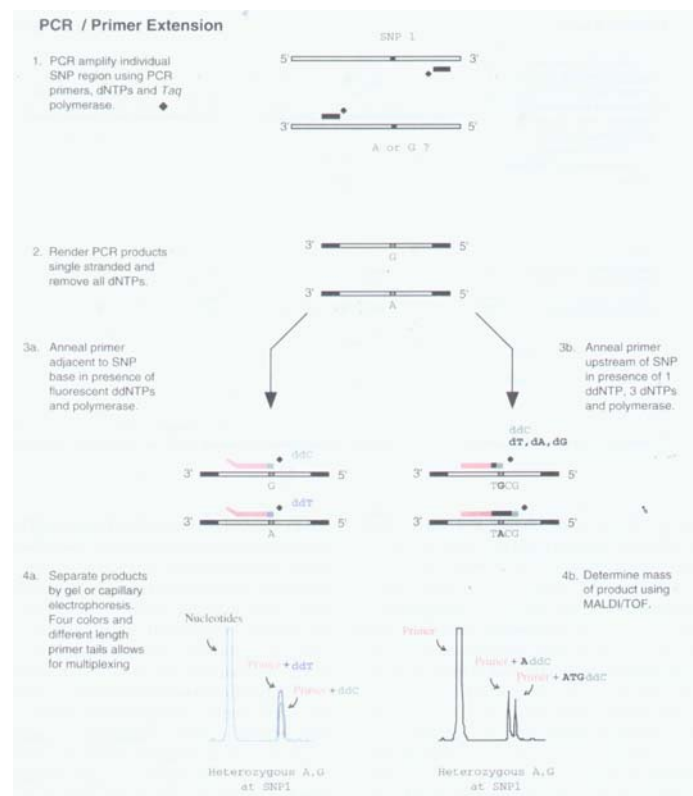
Kada mišinyje dėl PCR amplifikacijos atsiranda DNR, švyturio dalis, esanti tarp segtuką formuojančių galų, hibridinasi su naujai susintetintomis DNR grandinėmis. Hibridizacijos metu suardoma segtuko struktūra ir atskiriami dažas ir gesintojas. Jeigu naujai sintetinama DNR pilnai komplementari švyturio sekai,

švyturys efektyviai hibridinasi, reakcijos mišinys ima fluorescuoti. Vieno nukleotido neatitikimas neleidžia švyturiui hibridintis su taikiniu, švyturys lieka segtuko struktūros formoje. Abiem aprašytais atvejais viską lemia hibridizacijos efektyvumas, kada vieno nukleotido skirtumas lemia, vyks hibridizacija, ar ne. Švyturių atveju, vyksta konkurencija, tarp švyturio hibridizacijos su taikiniu ir švyturio galų tarpusavio hibridizacijos formuojant segtuką. Vieno nukleotido skirtumas lemia, kuri hibridizacija ima dominuoti.

10.2. Fermentiniai metodai.

Pradmens pratęsimas.

Pradmens pratęsimo metodas yra vienas paprasčiausių. Reakcijos metu, DNR polimerazės pagalba įjungiamas arba neįjungiamas vienas nukleotidas. Oligonukleotidas turi būti komplementarus tiriamos sekos aplinkai, o jo 3'-galas turi baigtis tiksliai ties analizuojamu nukleotidu. Jeigu paskutinis 3'-galo nukleotidas yra komplementarus, DNR polimerazė įjungia sekantį nukleotidą, jeigu nekomplementarus – neįjungia. Įjungimui naudojami fluorescuojančiais dažais žymėti ddNTP. Praktikoje, tiriamas lokusas amplifikuojamas, reakcijos mišinyje yra ir testavimui naudojamas oligonukleotidas. Oligonukleotido įjungimas testuojamas elektroforetiškai arba masių spektrometrijos pagalba.



Pav. 10.2. Pradmens pratęsimo metodas

PCR/ Pradmens prailginimo reakcija. Vieno nukleotido prijungimas detektuojamas naudojant skirtingais dažais pažymėtus ddNTP arba masių spektrometijos pagalba.

Skaldymas nukleaze.

Nukleaze paremtas metodas. Naudojamas fermentas nukleazė *Cleavase VIII*, kuri skelia persidengiančias DNR grandines. Naudojami du oligonukleotidai, vienas *wt*, kitas - atitinkantis mutaciją. Jie abu persidengia ties tiriamo nukleotido pozicija ant matricos. Jeigu abu oligonukleotidai ties persidengiančiu nukleotidu yra komplementarūs matricai, nukleazė nuskelia vieno iš oligonukleotidų galą.

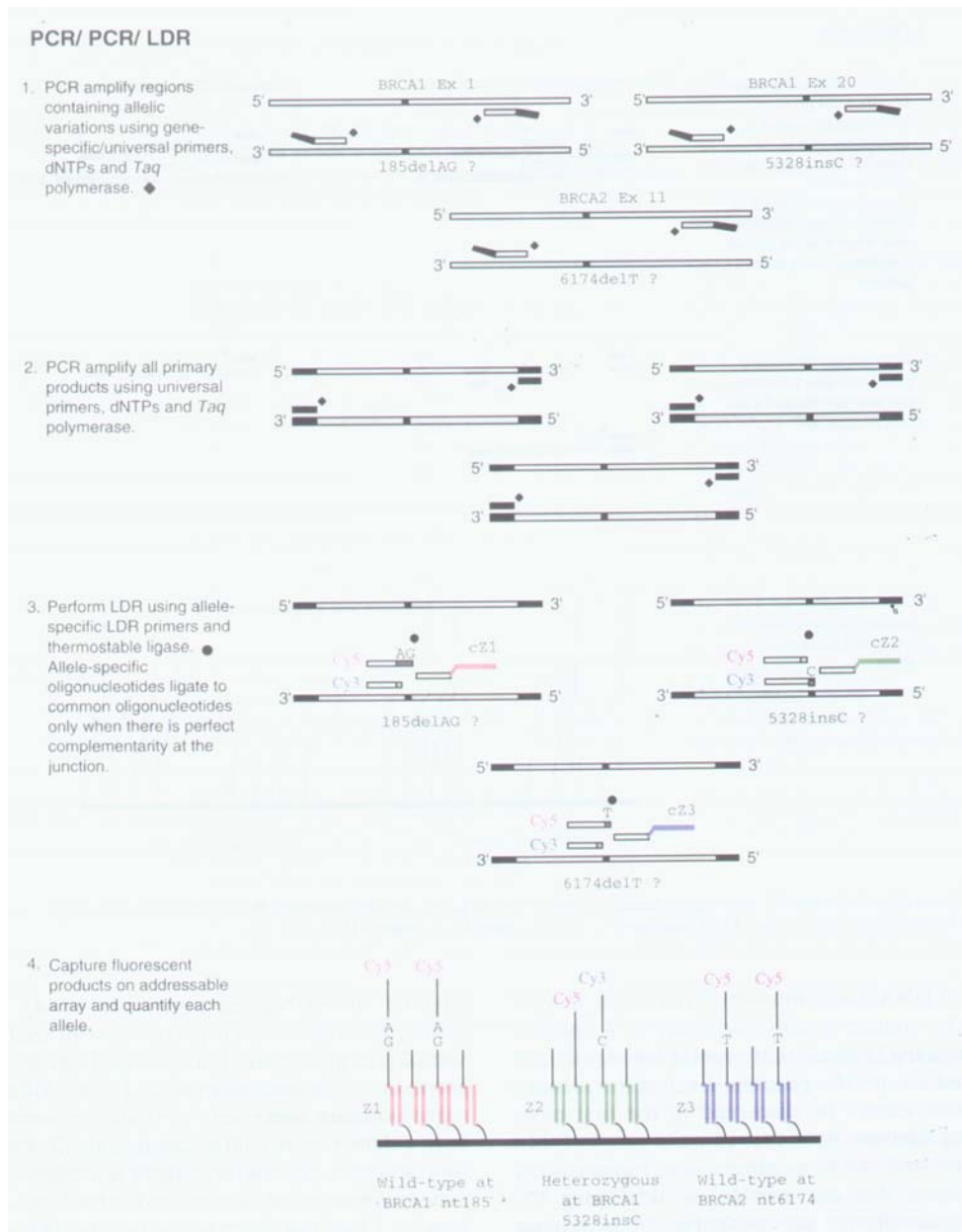


Pav. 10.3. Skaldymas nukleaze

Abiejų oligonukleotidų yra perteklius, todėl jie gali daug kartų jungtis su tuo pačiu taikiniu. Tokiu būdu signalas amplifikuojamas.

Ligavimas

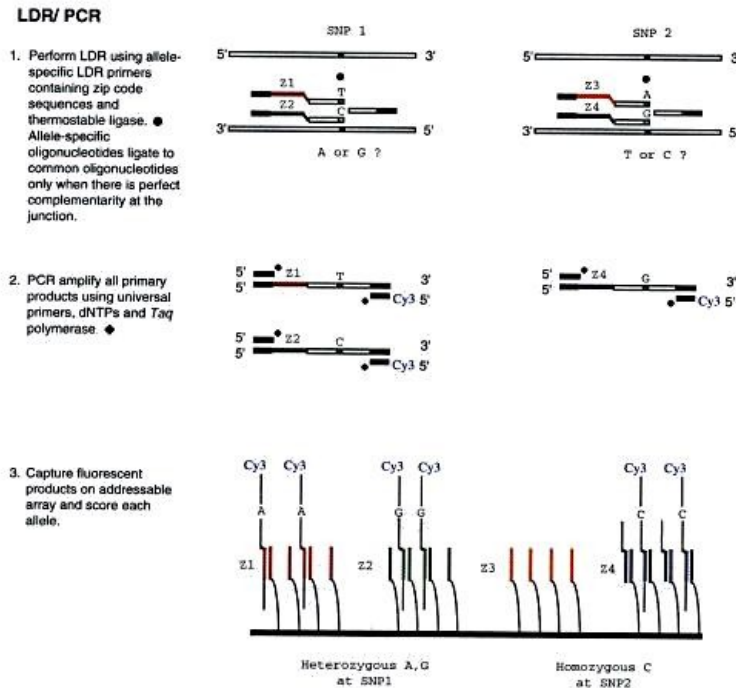
Ligavimo reakcija paremtuose metoduose naudojama termostabili bakterijų DNR ligazė, įgalinanti atlikti ciklinę ligavimo reakciją. Šiame metode naudojami du oligonukleotidai, vienas su kitu susijungiantys ties tiriamu nukleotidu. Jeigu abiejų oligonukleotidų galai, vieno 3', kito 5' yra komplementarūs matricai, ligazė juos suliguoja. Ligavimo produktų atsiradimą galima testuoti elektroforetiškai, arba panaudojant riedančio rato amplifikaciją ir švyturių kombinaciją. Šiuo atveju reakcija atliekama tiesiai ant tiriamos DNR, amplifikuojamas ir išryškintas ligavimo produktas.



Pav. 10.4. PCR/PCR/ligavimo panaudojimas SNP nustatymui

PCR/PCR/ligavimo reakcija. Šiame pavyzdyje atliekamos dvi PCR amplifikacijos, po to, DNR gardelių pagalba detektuojami ligavimo produktai (LDR – *ligation detection reaction*).

Kitas panašus metodas pateiktas sekančiame paveikslėlyje. Šiuo atveju, amplifikuojamas ligavimo produktas. Amplifikacijos produktas turi detekcijai skirtą “adresą”, kurio pagalba susekamas mikrogardelių pagalba.



Pav. 10.5. Ligavima /PCR

10.3. Nežinomo polimorfizmo paieška.

Nežinomo polimorfizmo paieškai naudojami tiesioginio sekvenavimo arba hibridizacija paremto persekvenavimo metodai. Jeigu ieškoma polimorfizmo vėžiniame audinyje, kuriame vėžinės ląstelės sudaro nedidelę dalį nuo visų ląstelių, tiesioginio sekvenavimo metodas nėra geras.

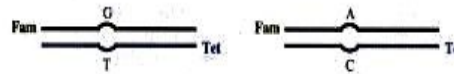
Mutacijų paieškai konkrečiame lokuse sėkmingai naudojamas metodas, paremtas heterodupleksų elektroforetine analize. Lokusas amplifikuojamas, fragmentai denatūruojami, po to lėtai renatūruojami, ko pasėkoje suformuoja heterodupleksus. Vieno nukleotido neatitikimas heteroduplekse keičia tokio heteroduplekso judrumą poliakrilamido gelyje denatūruojančiose sąlygose. Papildomų juostų atsiradimas rodo polimorfizmą. Toliau polimorfizmas patvirtinamas sekvenuojant amplifikuotą fragmentą arba klonuojant ir sekvenuojant.

Naujų SNP paieškai sėkmingai tarnauja mikrogardelių technologija, metodo jautrumas prilygsta tiesioginiam sekvenavimui.

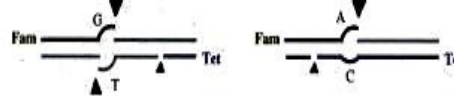
Polimorfizmui nustatyti naudojamas ir skaldymo nukleazėmis metodas, paremtas kai kurių reparacijoje dalyvaujančių nukleazių gebėjimu atpažinti ir skaldyti DNR ties nesuporuotais nukleotidais. T4 bakteriofago endonukleazė VII bei MutY nukleazė skelia DND-DNR heterodupleksą ties nesuporuotais nukleotidais. Skaldymo produktai analizuojami elektroforetiškai. Tiriamas lokusas amplifikuojamas, DNR denatūruojama po to renatūruojama, susiformuoja heterodupleksai. Fermentas skelia ties nesuporuotais nukleotidais. Elektroforegramose atsiranda papildomos mažesnės molekulinės masės juostos.

Mismatch scanning Assay. (Endo V / DNA Ligase)

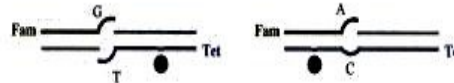
1. PCR amplify gene using primers with different fluorescent labels and Taq DNA polymerase. Denature and reanneal PCR products to form heteroduplexed DNA.



2. Preferentially nick DNA one base to the 3' side of mismatches using thermostable Endonuclease V.

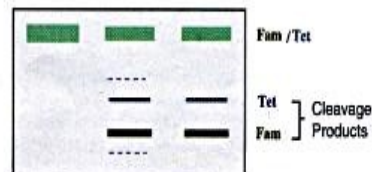


3. Add thermostable DNA ligase to re-seal background nicks at perfect match regions.



	1.	2.	3.
EndoV	-	+	+
Ligase	-	-	+

4. Separate fluorescent products on a DNA sequencer (using length standards) to approximate site of mismatch.



Pav. 10.6. Heterodupleksų analizė

Kad padidinti tikslumą ir išvengti nespecifiško skaldymo padarinių, šis metodas patobulintas, kartu naudojant nukleazę ir bakterijų DNR ligazę. Kombinacija termostabilios Endo V ir termostabilios DNR ligazės leidžia pašalinti visus nespecifinius įkirpimus vietose, kurios yra komplementarios, tuo tarpu įkirpimas ties nekomplementaria seka nebus liguojamas, nes nekomplementarių matricai nukleotidų bakterijų DNR ligazė neliguoja. Jautrumo padidinimui, amplifikacijos metu naudojami pradmenys, pažymėti fluorescuojančiais dažais.

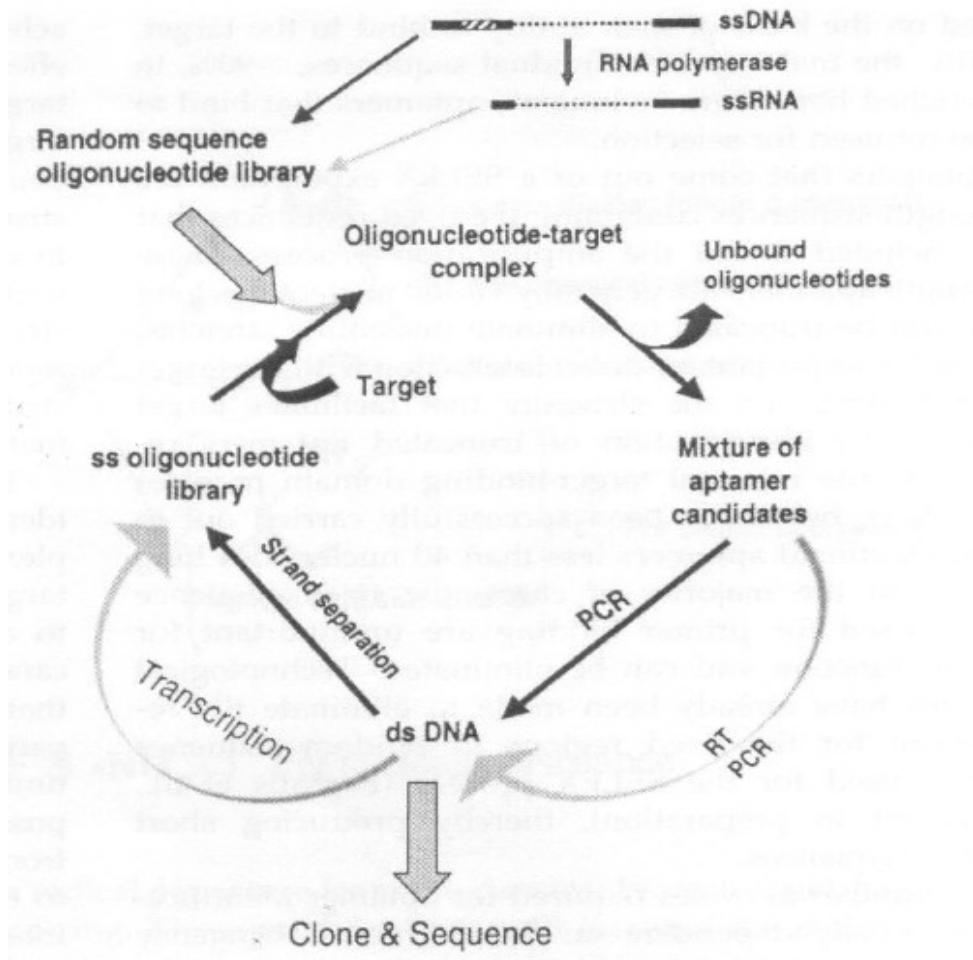
11. Aptamerai

Aptamerai yra oligonukleotidai, gauti *in vitro* evoliucijos metodais, specifiskai atpažįstantys baltymus ar kitokias makromolekules. Pirmą kartą aprašyti 1990 m. *In vitro* evoliucijos procedūra, pavadinta SELEX (*systemic evolution of ligands by exponential enrichment*) leidžia atrinkti viengrandes nukleorūgštis, specifiskai sąveikaujančias su ligandu, makromolekule ar net su santykinai maža molekule.

Gamtoje specifinėmis atpažinimo savybėmis pasižymi antikūnai, susiformuojantys imuninio atsako metu. Antikūnai labai plačiai naudojami diagnostikoje ir terapijoje. Aptamerai yra nauja, dirbtinių molekulių sistema, taip pat, kaip ir antikūnai, specifiskai atpažįstanti ligandus. Aptamerai yra antikūnų imitacija. Žodis „aptameras“ kilęs iš lotyniško *aptus* – atitikti, pritapti. Aptameras, kaip ir antikūnus tikimasi sėkmingai panaudoti diagnostikoje ir terapijoje.

SELEX procesas pradedamas su atsitiktinėmis sekomis, gautomis naudojant DNR cheminę sintezę. DNR oligonukleotidų mišinio sudėtingumas ir įvairovė priklauso nuo atsitiktiniu principu sintetinamų oligonukleotidų nukleotidų skaičiaus.

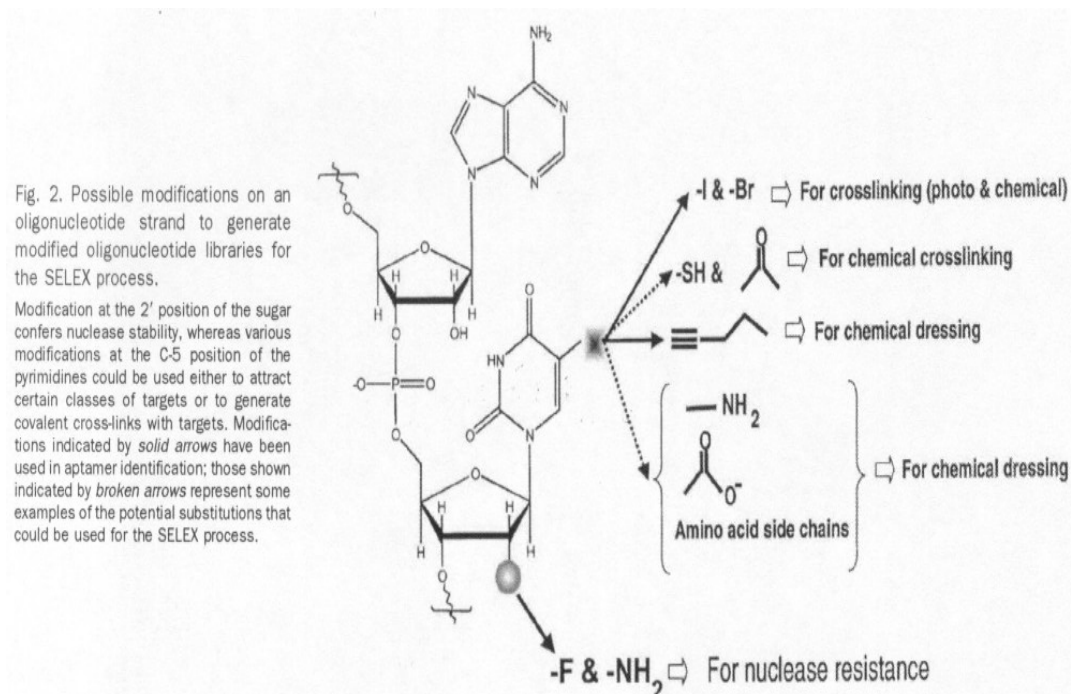
Teoriškai, biblioteka turinti 40 nt galimų atsitiktinių nukleotidų regioną, bus sudaryta iš $4^{20}=1.2 \times 10^{24}$ individualių molekulių, besiskiriančių bet vieno nt pozicija. Praktikoje, sintezės metu šis skaičius gaunamas mažesnis, sintetinant 1 μmol skalėje gaunama $10^{14} - 10^{15}$ individualių DNR sekų. Galimybė surasti reikiamą retą seką, sąveikaujančią su pasirinktu taikiniu yra nedidelė, todėl atliekama ieškomų sekų amplifikacija ir jų tolesnė evoliucija. Schema pateikta žemiau:



Pav. 11.1. SELEX proceso schema

Atsitiktinės sintezės produktai inkubuojami su taikiniu, pasirinktame buferyje ir pasirinktoje temperatūroje. Šioje stadijoje atrenkamas labai nedidelis molekulių, sąveikaujančių su taikiniu, kiekis. Šios molekulės atskiriamos nuo pagrindinės frakcijos. Dažniausiai taikiny – baltymas imobilizuojamas ant nitroceliuliozinės membranos ir per šią membraną filtruojamas oligonukleotidų mišinys. Nedidelė dalis susilaikiusių oligonukleotidų nuplaunama, pakartotinai amplifikuojama ir vėl selekcionuojama sąveikoje su taikiniu. Šis procesas kartojamas 8-15 ciklų, kol atrenkamos aukšto giminingumo molekulės. Praturtinta biblioteka klonuojama į plazmides, sekvenuojama, tokiu būdu sužinomos sąveikaujančių molekulių nukleotidų sekos. Po to kiekviena individuali seka tikrinama, kaip ji sąveikauja su taikiniu. Tradicinė aptamero struktūra yra apie 70 - 80 nt ilgio seka, kurios galai yra pastovūs, skirti amplifikacijai PCR pagalba, o viduryje yra dalis, specifiskai sąveikaujanti su taikiniu.

Aptamerai gali pasižymėti labai dideliu specifiskumu, todėl, atskirais atvejais gali pakeisti monokloninius antikūnus. Aptamero sukūrimas trunka 2-3 mėn. ir yra automatizuotas. Sukurti aptamerai modifikuojami, įvedant chemines grupes, užtikrinančias atsparumą biologinėse sistemose.



Pav. 11.2. NR modifikacijos

Modifikacijos ribozės 2'-pozicijoje apsaugo nuo nukleazių poveikio (F, NH_2). Modifikacijos pirimidinų C-5 pozicijoje naudingos tarpmolekuliniams (I , Br , SH , NH_2) susiuvimui tarnaujančių grupių įvedimui. Aptamerai, atsparūs nukleazėms, ypač RNR yra perspektyvūs diagnostikai ir terapiniam panaudojimui. DNR aptamerai ir be modifikacijų yra santykinai stabilūs.

Tyrinėjant aptamerus paaiškėjo, kad viengrandės nukleorūgštys pasižymi labai plačiomis galimybėmis formuoti skirtingas antrines ir tretines struktūras. Galimų termodinamiškai stabilių struktūrų skaičius viršija peptidų sekų galimybes. Šiuo metu sukurti aptamerai, atpažįstantys labai skirtingus taikinius, metalų jonus, organinius dažus, aminorūgštis, antibiotikus, nukleotidus ir jų analogus, peptidus. Taikinių skaičius didėja, tai fermentai, augimo faktoriai, antikūnai, transkripcijos faktoriai, lektinai, virusinės dalelės. Aptamerų giminingumas ir specifiskumas jau prilygsta antikūnams. Aptamerus galima pastoviai tobulinti, kol surandamas optimalus, interesus tenkinantis darinys. Pav. tarp aptamerų, atpažįstančių L-citruliną, toliau juos

tobuliant, buvo rasti aptamerai, atpažįstantys L-argininą, bet nebesąveikaujantys su L-citrulinu.

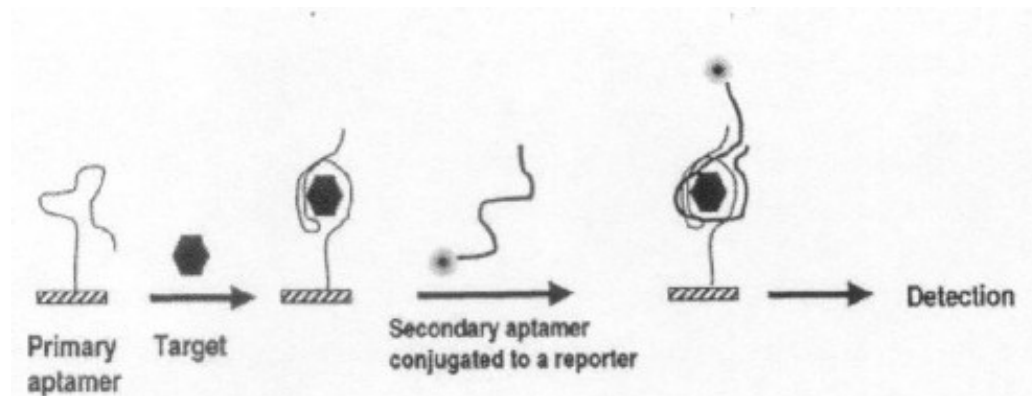


Fig. 5. Aptamer-based assay using a secondary aptamer that specifically recognizes primary aptamer-target complex.

A format of a heterogeneous assay is shown. The target is captured by the primary aptamer immobilized on a solid support to form a target-aptamer complex, which is then specifically recognized by the secondary aptamer conjugated to a suitable reporter molecule. The same concept could also be used in homogeneous assay format, such as FP, in which the change in fluorescence characteristics of a fluorophore conjugated to the secondary aptamer is measured upon binding to the primary aptamer-target complex.

Pav. 11.3. Aptamerų panaudojimas diagnostikoje

Diagnostikai reikalingi aptamerai, galintys susirišti su dviem taikiniaiis, taip pat, skirtingi aptamerai, susirišantys su skirtingomis to paties taikinio vietomis ir tarpusavyje nekonkuruojantys. Paaiškėjo, kad tokią aptamerų įvairovę galima gauti, naudojant tuos pačius selekcijos principus.

Terapeutikoje aptameras gali susirišti su specifiniu taikiniu ir blokuoti jo funkciją. Ši galimybė pademonstruota blokuojant VEGF (*vascular endothelial growth factor*), pagrindinį pozityvų angiogenezės reguliatorių.

Aptameras bandoma naudoti pratekančioje citometrijoje, atrenkant reikalingas ląsteles. Aptamerai yra labai perspektyvūs įvairių biosensorių kūrime, nes jie įvairiuose biologiniuose skysčiuose gali atpažinti ir surišti ieškomas molekules. Tokių biosensorių privalumas prieš imunosensorius turėtų būti didesnis jų stabilumas.

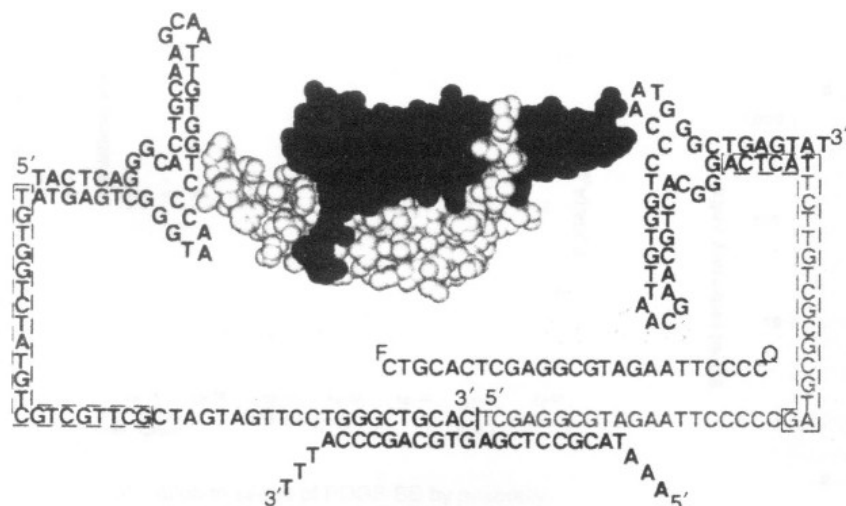
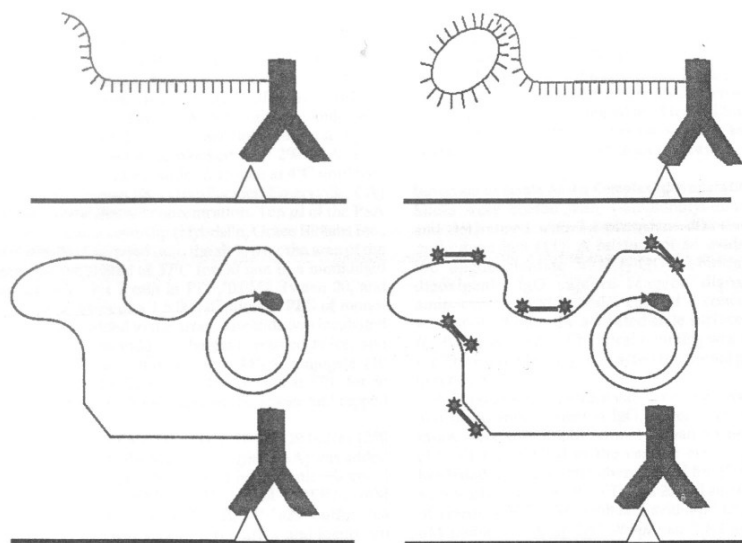


Figure 1. Schematic view of the homodimeric PDGF-BB (ref. 23) bound by two aptamer-based proximity probes, A1 and A2, for detection by proximity ligation. The sequence of the aptamer 41t specific for the PDGF B-chain⁸ is shown in black, sequence extensions to be joined by ligation upon hybridization to a common connector oligonucleotide are shown in blue (A1) and red (A2), and primer sites for PCR are boxed. A probe for real-time detection of PCR products via the 5'-nuclease assay is shown in green with a 5' FAM fluorophore and a 3' TAMRA quencher.

Pav. 11.4. Aptamerų panaudojimas diagnostikoje

Baltymo molekulės greitai denatūruoja dėl karščio, pH, druskų, chelatinių agentų ir kt., todėl netinka daugkartiniam naudojimui. Aptamerai, dėka savo stabilumo, leidžia kurti daugkartinio naudojimo biosensorius.

Aptamerai gali būti patalpinami ant kieto paviršiaus, gali būti pažymimi įvairiausiais būdais, fluoroforai gali būti įkomponuojami dar selekcijos metu, naudojant žymėtus nukleotidus.



Pav. 11.5. Signalų stiprinimas amplifikuojant DNR φ29 DNR polimeraze.

Kuriant įvairias detekcijos sistemas, kombinuojant monokloninius antikūnus ir aptamerus, sukurtos sistemos, 100-1000 kartų jautresnės už antikūnų sistemas. Šio didelio jautrumo pagrindas yra galimybė amplifikuoti labai silpnus signalus, panaudojant PCR arba riedančio rato principą panaudojant ϕ 29 DNR polimerazę bei molekulinis švyturius, amplifikuotos DNR vizualizacijai.

Lietratūroje aprašyti ir praktikoje taikomi aptamerai:

Aptamerai – specifiniai fermentų inhibitoriai:

Stabdantys krešėjimą – antikoguliantai, svarbūs po operacijų

Trombiną surišantys

Ribonukleazės H inhibitoriai

Stabdantys signalo perdavimą

Apsaugo receptorių nuo nepageidautinos sąveikos su antikūnais

HCV IRES surišantys – stabdo HCV RNR transliaciją

Literatūra:

Knygos

1. D.S.T. Nichol. Introduction to genetic engineering. II edition. Cambridge University Press, 2002. ISBN 0 521 00471.
2. Transgenic plants. Methods and protocols. In: Methods in molecular biology, vol.286.Ed. L.Pena. Humana Press, New Jersey, 2004. ISBN: 1-58829-263-0.
3. Plant biotechnology and transgenic plants. Eds. K-M. Oksman-Caldentley and W.H. Barz, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002. ISBN: 0-8247-0794-X.
4. Molecular cloning. A laboratory manual. J. Sambrook and D.W. Russel. III edition. Vol. 1, 2, 3 and 4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 2001. www.MolecularCloning.com.
5. Short protocols in molecular biology, IV edition. Eds. F.M.Ausubel, R.Brent, R.E.Kingston, D.D.Moore, J.G.Seidman, J.A.Smith, K.Struhl. John Willey & Sons, New York, 1999. ISBN 0-471-32938-X.
6. Katalogas Fermentas Life Science. Molecular biology catalog & product application guide, 2004-2005 ir 2006/2007. www.fermentas.com
7. Sliesaravičius, A ir Stanys, V. 2005. Žemės ūkio augalų biotechnologija. Enciklopedija, Vilnius, ISBN 9986-433-36-3.

Periodinė spauda:

8. Pingpoud, A., Jeltsch. Structure and function of type II restriction endonucleases. Nucl. Acids Res., 2001, 29, 3705-3727.
9. Nelson, J.R. et al. TempliPhi, ϕ 29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. Biotechniques, 2002, 32, S44-S47.

10. Soliar, G., et al. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62, 434-464.
11. Khan, S.A. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997, 61, 442-455.
12. Chattoraj, D.K. Control of plasmid DNA replication by interons: no longer paradoxical. *Mol. Microbiol.*, 2000, 37, 467-476.
13. Compton, S.T. et al. An improved method for routine preparation of intact artificial chromosome DNA (340 – 1000 kb) for transfection into human cells. *Nucl. Acids Res.*, 1999, 27, 1762-1765.
14. Durbin, R. Gene expression systems based on bacteriophage T7 RNA polymerase. *Gene expression system*, Acad. Press, 1999, 9-44.
15. Makrides, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *E. coli*. *Microbiol. Rev.*, 1996, 60, 512-538.
16. Schlessinger, D. Yeast artificial chromosomes: tool for mapping and analysis of complex genomes. *TIG*, 1990, 6, 248-258.
17. Kost, T.A., Condreay, J.P. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, 1999, 10, 428-433.
18. Rayner, J.O. et al. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.*, 2002, 12, 279-296.
19. Gelvin, S.B. *Agrobacterium* –mediated plant transformation: the biology behind the „gene-jockeying“ tool. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 2003, 67, 16-37.
20. Ma, J.C.C., Drake, P., Christou, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genetics*, 2003, 4, 794-805.
21. Steward, C.N., et al. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nat. Rev. Genetics*, 2003, 806-817.
22. VandenDriessche, T. Et al. Oncoretroviral and lentiviral vector mediated gene therapy. *Methods in Enzymology*, 2002, 346, 573-589.
23. Kim, S.H. et al. Retroviral vectors. *Adv Virus Res.*, 2000, 55, 545-563.
24. Ramachandra, M. et al. Re-engineering adenovirus regulatory pathways to enhance oncolytic specificity and efficacy. *Nature Biotechnology*, 2001, 19, 1035-1041.
25. Frisch, S.M., Mymryk, J.S. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, 3, 441-454.
26. Somia, N., Verma, I.M. Gene Therapy: Trials and tribulations. *Nat. Rev. Genetics*, 2000, 1, 91-99.
27. Arya, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. www.future-drugs.com, 2005, ISSN 1473-7159.
28. Kirk, B.W. et al. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30, 3295-3311.
29. Tuerk, C., Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249, 505-510.
30. Rhind, S.M. et al. Human cloning: can it be made safe? *Nature Rev. Genetics.*, 2003, 4, 855-864.

