

Ferrytyna — ekwiwalentem żelaza w zapobieganiu i leczeniu anemii

Niedobór żelaza w żywieniu prowadzi do anemii. Schorzenie to jest bardzo poważnym problemem dotyczącym aż 30% ludności świata, szczególnie zamieszkującej Azję. Istnieją co prawda rośliny uprawne znane z bardzo wysokiej zawartości żelaza, takie jak np. szpinak czy rośliny motylkowe. Niestety, zawierają one także np. kwas szczawiowy i fitynowy, co zmniejsza ich bioprzyswajalność. Próbowano także zwiększyć zawartość żelaza w roślinach uprawnych hodując je w kulturach hydroponicznych bogatych w jony żelazawe. Jednakże metoda ta jest bardzo kosztowna i nie pozwala na akumulację tego pierwiastka tylko w określonych, zaplanowanych częściach rośliny. Poza tym, nadmiar żelaza w środowisku zahamowuje rozwój roślin. W związku z tym zastosowanie hodowli hydroponicznej jest niemożliwe na szerszą skalę.

Czyżby naukowcy japońscy znaleźli na to radę? Postanowili oni wzbogacić

w żelazo najpopularniejszą w Azji roślinę jadalną — ryż. Japończycy wykorzystali do tego celu ferrytynę. Ferrytyna jest bowiem białkiem magazynującym żelazo i zapewniającym jego dostępność dla podstawowych potrzeb komórki. Składa się ona z 24 homogennych lub heterogennych podjednostek, zgromadzonych w duży kompleks białkowy (tzw. apoferrytynę), wewnątrz którego magazynowane jest żelazo w formie wodorotlenku żelazowego w połączeniu ze zmienną ilością fosforanów. Białko to występuje we wszystkich organizmach żywych (bakteriach, roślinach i zwierzętach). Znane są także sekwencje aminokwasowe ferrytyny pochodzącej z różnych organizmów. Choć homologia tych sekwencji pomiędzy ferrytynami roślinnymi i zwierzęcymi (w tym ludzką) jest dość niska (39 – 49% jeśli włączymy peptyd tranzytowy, a 56 – 66% bez tego peptydu) to jednak molekularna konformacja tego białka i jego pojemność dla żelaza są konserwatywne. Nie powinno zatem być kłopotów z przyswajaniem ferrytyny roślinnej przez organizm ludzki, a co się z tym wiąże, z przyswajalnością zawartego w niej żelaza. We wcześniejszych badaniach nad mechanizmem regulacji biosyntezy tego białka wykazano, że jest ona regulowana w zależności od ilości wewnątrzkomórkowego żelaza, którego wysoki poziom stymuluje specyficznie biosyntezę ferrytyny. Przy czym u zwierząt dominuje regulacja na poziomie translacji, podczas gdy u roślin przeważa regulacja na poziomie transkrypcji.

Z danych tych wynika, że zwiększenie (za pomocą inżynierii genetycznej) zawartości ferrytyny w roślinach uprawnych może pomóc rozwiązać problem niedoboru żelaza w diecie.

Naukowcy japońscy zbadali możliwość wprowadzenia genu ferrytyny sojowej do ryżu za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* (patologicznej bakterii glebowej, która ewolucyjnie wytworzyła system genetycznej kolonizacji roślin). W tym celu ferrytynowe cDNA wyizolowane z 1 g liścieni soi kilka dni po skielkowaniu amplifikowano za pomocą metody RT-PCR (*reverse transcriptase* PCR). Użyte primery były komplementarne do sekwencji ferrytyny sojowej. Następnie otrzymany fragment cDNA ferrytyny wklonowano do wektora pCR II. Porównanie sekwencji cDNA z sekwencją ferrytyny sojowej genu wykazało 95% identyczności w konserwatywnych regionach. Następnie ferrytynowe cDNA wbudowano do zmodyfikowanego plazmidu. Do pokierowania ekspresją genu ferrytyny sojowej użyto ryżowego promotora dla glutelin Glu B-1 (frakcji białek zapasowych bielma, stanowiących jeden z głównych składników glutenu). Tak skonstruowany plazmid wprowadzono do *Agrobacterium tumefaciens* za pomocą metody elektroporacji. Stransformowane *Agrobacterium* użyto do infekcji 3-tygodniowych siewek pochodzących z dojrzałych nasion ryżu. Rośliny te hodowano 6 tygodni na pożywce z dodatkiem czynnika selekcyjnego w celu odrzucenia niestransformowanych egzemplarzy, a potem przez 5 tygodni na pożywce regeneracyjnej. Z liści stransformowanych roślin izolowano całkowity DNA w celu potwierdzenia obecności w ekstrakcie wprowadzonego genu ferrytyny sojowej, a co się z tym wiąże — pozytywnej transformacji ryżu. Wykorzystano do tego celu PCR, a uzyskany produkt poddano elektroforezie i porównano wielkość fragmentów DNA z wzorcem (genem ferrytyny sojowej). Stransformowane rośliny (pozytywne

wynik tego testu) aklimatyzowano przez 3 tygodnie na standardowych pożywkach, po czym transplantomano je do gleby. Transgeniczny ryż rósł w szklarni w $+ 30 \pm 3^\circ\text{C}$ w warunkach 12 h światła/12 h ciemności aż do zbiorów.

Ostatecznym jednak potwierdzeniem stabilnej transformacji roślin jest analiza molekularna obecności wprowadzonego DNA przeprowadzona na potomstwie generatywnym (rośliny pokolenia T_1 i T_2). W trakcie mejozy są bowiem eliminowane wszystkie nietrwałe połączenia w obrębie DNA. Taka analiza została również przeprowadzona. Totalne DNA wyizolowane z liści potomstwa T_1 i T_2 poddano hybrydyzacji do znakowanej izotopem sondy wprowadzonego genu (cDNA ferrytyny sojowej). Dla skontrolowania ekspresji wprowadzonego genu całkowity RNA wyizolowany z nasion i liści roślin pokolenia T_1 i T_2 poddano reakcji RT/PCR, a następnie analizowano otrzymane cDNA. W badaniach tych wykazano, że transgeniczne rośliny zawierały od jednej do kilku kopii wprowadzonego genu przypadającą na haploidalny genom. Stwierdzono jednocześnie, że ekspresja genu ferrytyny sojowej w ryżu była tkankowospecyficzna. Kopie wprowadzonego genu ulegały bowiem ekspresji głównie w bielmie nasion. Następnie w celu potwierdzenia ekspresji genu ferrytyny sojowej w ryżu — syntezy funkcjonalnej ferrytyny „sojowej” z niedojrzałych nasion pokolenia T_1 wyekstrahowano całą pulę białkową. Otrzymany ekstrakt analizowano stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym z SDS, po czym wykonano transfer białek (rozdzielonych na żelu) na membranę PVDF (*western blotting*). Następnie dokonano immunodetekcji białek związanych z membraną z użyciem poliklonalnych króliczych przeciwciał skierowanych przeciwko ferrytynie sojowej. Jest to jedna z powszechnie stosowanych metod specyficznego wykrywania białka. W wyniku tej analizy wykryto prążek o ciężarze cząsteczkowym ok. 28 kDa, a zatem odpowiadający cięższej podjednostce ferrytyny sojowej, co potwierdziło akumulację ferrytyny „sojowej” w nasionach ryżu. Zaobserwowano również inny prążek — ok. 32 kDa, który odpowiada prekursorowi tego białka (podjednostki ferrytyny powstają bowiem w wyniku modyfikacji posttranslacyjnej z formy prekursorowej). Oba prążki (32 kDa i 28 kDa) otrzymano również w homogenacie białkowym z soi, ale nie zaobserwowano ich w homogenacie z nasion nietransformowanego ryżu.

W celu zbadania rozmieszczenia ferrytyny w nasieniu, wykonano odcisk połówki nasienia na membranę nitrocelulozową, a następnie immunodetekcję białek przy użyciu wspomnianych już przeciwciał. Okazało się, że najwyższą akumulację ferrytyny wykazywało bielmo nasienia. Również zawartość żelaza w bielmie była znacznie wyższa ($3,4 \pm 0,5 \mu\text{g}/10$ ziaren), niż w zarodku ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{g}/10$ ziaren). Statystyczna analiza otrzymanych wyników wykazała znaczącą różnicę w średniej zawartości żelaza w bielmie roślin transformowanych i nietransformowanych ($p = 0,02$), ale nie w zarodkach tych roślin ($p = 0,64$). Zastosowany do kontroli ekspresji genu ferrytyny sojowej promotor glutelin spowodował zgodnie z oczekiwaniem bielmospecyficzną akumulację ferrytyny, a dzięki temu, bielmospecyficzny wzrost zawartości żelaza w transgenicznym ryżu.

Naukowcy japońscy odnieśli sukces. Zawartość żelaza w nasionach pochodzących z transgenicznego ryżu była trzykrotnie wyższa niż w nasionach

nietransformowanych. Poziom żelaza w nasionach transgenicznych wahał się bowiem od $13,3 \pm 2,8$ do $38,1 \pm 4,5$ $\mu\text{g/g}$ suchej masy, podczas gdy w nasionach nietransgenicznych wynosił od $8,6 \pm 3,3$ do $14,3 \pm 3,0$ $\mu\text{g/g}$ suchej masy.

Podobne badania przeprowadzono także na tytoniu. Jednakże system „ryżowy” okazał się znacznie wydajniejszy.

Uzyskane wyniki stwarzają szansę ograniczenia występowania anemii na świecie. Komercyjne zastosowanie opisaney metody wzbogacania ryżu w żelazo pozwoliłoby bowiem skutecznie zapobiec niedoborowi tego pierwiastka w żywieniu.

Joanna Smól

Opracowano na podstawie:

Goto F. i wsp., (1999), *Nature Biotechnology*, 17, 282–286.

Praca w ramach grantu KBN nr 0386.

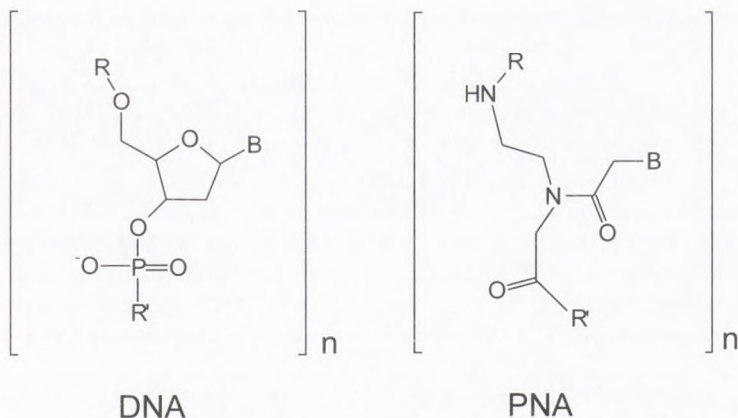
PNA jako nowe narzędzie w biologii molekularnej

PNA oznacza peptydowy kwas nukleinowy (*peptide nucleic acid*) czyli polimer zasad nukleinowych i aminokwasów. PNA jest odkryciem ostatnich lat. Uzyskuje się go na drodze syntezy analogicznej do syntezy peptydów. Równocześnie wykazuje on wiele właściwości zbliżonych do dobrze już poznanych kwasów nukleinowych, przede wszystkim wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania poprzez hybrydyzację komplementarnych kwasów nukleinowych.

DNA jest to polimer zbudowany z jednostek monomerycznych — deoksyrybonukleotydów. Każdy z nich składa się z zasady azotowej, reszty cukrowej i grupy fosforanowej. Szkielet DNA stanowią cząsteczki deoksyrybozy połączone resztami fosforanowymi. Grupa 3'-hydroksylowa reszty cukrowej jednego nukleotydu jest połączona wiązaniem fosfodiesterowym z grupą 5'-OH następnej reszty cukrowej, itd. Jedynym zmiennym elementem struktury DNA jest sekwencja czterech zasad (A, G, T, C). Kolejność zasad w DNA zapisywana jest w kierunku 5' → 3'.

W strukturze PNA zamiast deoksyrybozy i reszty fosforanowej jest N-2-aminoetyloglicyna. Jej cząsteczki łączą się wiązaniami peptydowymi i stanowią szkielet całej makrostruktury. Natomiast zasady azotowe, które tutaj również są zmiennym elementem, dołączone są do aminokwasowych atomów azotu poprzez wiązania acetylowe (rys. 1). Sekwencje zasad w PNA odczytuje się w kierunku odpowiadającemu kierunkowi aminokwasów w białkach czyli od N- do C-końca. Związek ten otrzymuje się syntetycznie z wydajnością 80-90%. Chcąc uzyskać produkt o wyższej czystości można zastosować oczyszczanie na HPLC oraz oznaczenie składu metodą spektrometrii masowej (1,2,9).

PNA charakteryzuje się wieloma właściwościami zbliżonymi do DNA, ale również szeregiem właściwości chemicznych i fizycznych, które odróżniają obie molekuly. Wśród cech wspólnych szczególne znaczenie ma zdolność tworzenia wiązań typu Watson-Crick prowadząca do powstania dupleksów z komplementarnymi oligonukleotydami. Jest to ważne w wykorzystaniu PNA jako sondy molekularnej do oznaczania sekwencji DNA i RNA. Możliwe jest również tworzenie trypleksów (PNA)₂-DNA poprzez wiązania Watson-Crick-Hoogsten (3,9) oraz wiązań kowalencyjnych między oligomerami PNA a szeroką gamą ligandów. Na tej podstawie wyróżnia się dwie grupy związków: chimery i koniugaty (1,2,4). Chimera jest układem, w którym peptyd jest związany z PNA dzięki czemu posiada dwa segmenty działające niezależnie od siebie. Przykładem chimery PNA-peptyd jest H-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-Ado-Ado-Ado-TGT-ACG-TCA-CAA-CTA-Gly-NH₂ (4). Z kolei koniugaty zło-



Rys. 1. Budowa chemiczna monomerów DNA i PNA, gdzie B oznacza zasadę azotową

zone są z peptydowego kwasu nukleinowego i związku o zdefiniowanych właściwościach np. biotyny, fluoresceiny, rodaminy, EDTA, itd. Koniugaty są formą sondy molekularnej znakowanej nieradioaktywnie i wykorzystywanej przy analizie sekwencji nukleotydowych w DNA (1).

Z właściwości fizycznych jakie dało się zaobserwować, PNA, w przeciwieństwie do kwasów nukleinowych, może tworzyć stałe połączenia z komplementarnymi DNA i RNA w roztworach o wyższym stężeniu soli. W przypadku roztworów o niskim i średnim stężeniu soli (500 mM Na⁺) stabilność termiczna PNA-DNA jest zdecydowanie wyższa aniżeli DNA-DNA (1). Kolejną istotną właściwością fizyczną tej molekule jest dobra rozpuszczalność w wodzie i buforach o stężeniu jonowym poniżej 1 M Na⁺. W pojedynczych przypadkach zauważa się odstępstwa od tej reguły, szczególnie, gdy łańcuch zawiera dużo zasad purynowych (zwłaszcza guaniny) lub gdy obecne są wyłącznie sekwencje pirymidynowe (1,3). Wiadomo również, że PNA, pomimo strukturalnych podobieństw do DNA, nie jest substratem dla enzymów modyfikujących kwasy nukleinowe, jak również nie może pełnić funkcji primera dla polimeraz. Tę właściwość wykorzystano w reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR) do wykrywania pojedynczych mutacji w DNA (1,6,7). Zasada tej zmodyfikowanej metody, nazwanej „PCR clamping”, opiera się na tym, że w środowisku reakcji, obok primerów dla polimerazy DNA, znajduje się PNA w wysokim nadmiarze molowym. Primery są komplementarne zarówno do dzikiego typu allelu, jak i allelu posiadającego mutację. Natomiast PNA jest tak skonstruowany, by wiązać się jedynie z nicią, w której występuje pojedyncza mutacja. Jeżeli powielana nić DNA będzie zawierać taką mutację, wówczas PNA, będący w nadmiarze, wygra konkurencję z PCR-primerem i zablokuje amplifikację kwasu nukleinowego. Jest to możliwe, ponieważ, jak wspomniano, peptydowy kwas nukleinowy nie może być starterem dla polimerazy DNA.

Kariera PNA w laboratoriach naukowych jest zdecydowanie zbyt krótka, początki sięgają roku 1991, aby mówić o pełnym wykorzystaniu tego związ-

ku. Skupiono się przede wszystkim na określaniu sekwencji kwasów nukleinowych i ich pojedynczych mutacji stosując do tego celu odpowiednio zmodyfikowane metody analityczne (*Southern/northern blotting*, PCR). Metoda *Southern blotting* w ogólnym zarysie polega na trawieniu DNA enzymami restrykcyjnymi, rozdzieleniu powstałych fragmentów metodą elektroforezy żelowej i związaniu ich z komplementarną sondą molekularną. W klasycznym wydaniu sondę stanowił oligonukleotyd znakowany izotopem ^{32}P lub ^{35}S w miejscu nukleotydowego atomu fosforu. Modyfikacja tej metody polega na zastosowaniu jako sondy sekwencji PNA znakowanej związkami łatwymi do identyfikacji, np. enzymem czy fluoresceiną (1,5,8). Jednym z ciekawszych przykładów badań wykorzystujących hybrydyzacyjne właściwości PNA są badania nad ludzkimi chromosomami (8).

Ogólnie rzecz biorąc, PNA wykazuje mniejsze podobieństwo do DNA, niż początkowo mogło się wydawać. Ze względu na różnice w budowie i właściwościach powinno się raczej ten pierwszy traktować jako naśladowcę drugiego, a nie jego analog. Konsekwencją tego jest fakt, że badania nad PNA i DNA mogą przebiegać niezależnie od siebie dając naukowcom szerokie pole do działania. Unikatowe właściwości PNA, które już poznano, a przede wszystkim te, które nie są jeszcze odkryte, mogą w niedalekiej przyszłości przyczynić się do szerszego ich wykorzystania w technologii molekularnej.

Olimpia Witczak i Magdalena Kwiatkowska

Opracowano na podstawie:

1. Ørum H., Koch T., Egholm M., (1997), *Laboratory Methods for the Detection of Mutation and Polymorphisms in DNA*, 123-133.
2. Ørum H., Nielsen P. E., Jørgensen M., (1995), *Research Reports*, 9, 3, 472-480.
3. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., (1993), *Nature*, 365, 566-568.
4. Koch T., Naesby M., Wittung P., (1995), *Tetrahedron Letters*, 36, 38, 6933-6936.
5. Perry-O'Keefe H., Xian-Wei Yao, Coull J. M., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 14670-14675.
6. Ørum H., Nielsen P. E., Egholm M., (1993), *Nucleic Acids Research*, 21, 23, 5332-5336.
7. Mrozkiewicz P. M., Cascorbi I., Brockmøller J., (1997), *Pharmacogenetics*, 7, 303-307.
8. Lansdorp P. M., Verwoerd N. P., van de Rijke F. M., (1996), *Human Molecular Genetics*, 5, 5, 685-691.
9. Egholm M., Christensen L., Dueholm K. L., (1995), *Nucleic Acids Research*, 23, 2, 217-222.

Praca w ramach grantu KBN nr 0386.