

Małgorzata Joanna Staworzyńska¹, Radosław Stachowiak^{1*}, Jacek Bielecki¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW
ul. Miecznikowa 1, 00-096 Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2010 r.

1. Wprowadzenie. 2. Zastosowania wektorów bakteryjnych. 2.1. Wektory jako podstawowe narzędzie do klonowania. 2.1.1. Klasyfikacja wektorów. 2.1.2. Wektory komercyjne, nowe strategie. 2.2. Wektory służące do przenoszenia genów między organizmami. 2.2.1. Transport genów do komórek eukariotycznych. 2.3. Wektory ekspresyjne. 2.3.1. Nadprodukcja białek. 2.3.2. Cechy, które powinien spełniać wektor ekspresyjny. 2.3.3. Przykłady wektorów ekspresyjnych. 2.3.4. Produkcja insuliny. 2.3.5. Produkcja szczepionek nowej generacji. 2.4. Wektory niosące geny reporterowe. 3. Podsumowanie

Applications of bacterial vectors in molecular biology and medicine

Abstract: Bacterial vectors are DNA molecules, that are the basic tool of genetic engineering. They are used as vehicles to transfer and multiply foreign DNA in a target organism. They allow to process genetic modifications in organisms by transfer of genes from one organism to another. Scientists use bacterial vectors to produce proteins, as well as for various types of biological research. The most important criteria to be fulfilled by vectors are: the possibility of autonomous replication within the host cell, possession of selection markers and multiple restriction enzyme site (cloning site), that allow to insert the DNA fragment. Today it is technically possible to construct vectors containing many different properties such as: type of host range, size of DNA fragment that can be inserted into a vector, number of vector copies in the target cell and many types of marker genes that allow to differ between recombinated and not recombinated cells. The most commonly used vectors are plasmids.

1. Introduction. 2. Applications of bacterial vectors. 2.1. Vectors as basic tool for DNA cloning. 2.1.1. Conventional vectors. 2.1.2. Commercial vectors, new strategies. 2.2. Vectors as a tool for gene transfer between organisms. 2.2.1. Gene transfer to eucaryotic cells. 2.3. Expression vectors. 2.3.1. Protein overexpression. 2.3.2. Properties of a successful expression vector. 2.3.3. Examples for expression vectors. 2.3.4. Production of insulin. 2.3.5. Production of new generation vaccines. 2.4. Vectors with reporter genes. 3. Summary

Słowa kluczowe: klonowanie, nadprodukcja białek, wektor bakteryjny

Key words: cloning, protein overproduction, bacterial vectors

1. Wprowadzenie

Stosowanymi w biotechnologii wektorami są różnego rodzaju nośniki DNA, które wykorzystuje się w celu klonowania genów i ich wprowadzania do komórek drobnoustrojów gospodarzy [24]. Jeżeli udałoby się wprowadzić do komórki dowolnego organizmu niczym niechroniony fragment DNA, to wkrótce zostałby on strawiony do pojedynczych nukleotydów. Natomiast wektory pozwalają nie tylko na wprowadzenie fragmentu DNA, ale mają również zdolność do autonomicznej replikacji w danym typie komórek i dzięki temu zapewniają powielanie wprowadzonego fragmentu DNA oraz umożliwiają ekspresję genów w nim zawartych [48].

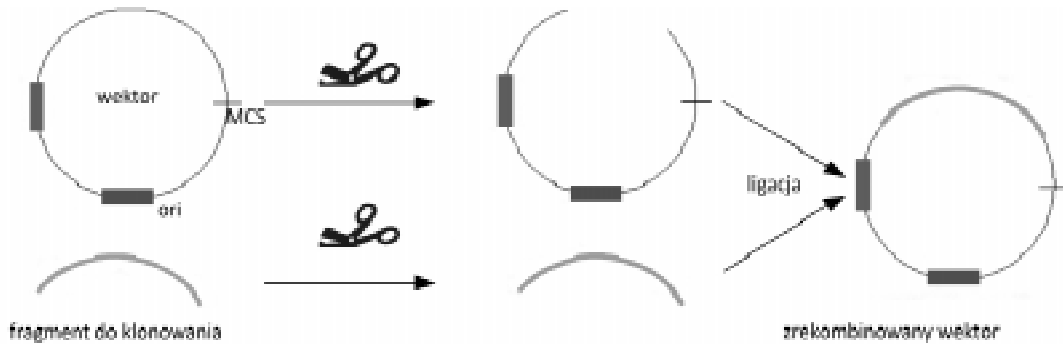
Do czasów opracowania metod inżynierii genetycznej pewne manipulacje polegające na wyodrębnianiu genów i ich przenoszeniu z jednej komórki do drugiej miały bardzo ograniczony zasięg. Eksperymenty wykonywano jedynie na bakteriach, wykorzysta-

tując bakteriofagi i metodę transdukcji. Dopiero wprowadzenie metody rekombinacji i klonowania DNA pozwoliło na przenoszenie materiału genetycznego na większą skalę. Główne etapy takiego doświadczenia, przedstawiono na rys. 1.

Polegają one na wyizolowaniu fragmentu DNA, który ma zostać sklonowany, pofragmentowaniu DNA przy użyciu enzymów restrykcyjnych, połączeniu fragmentów DNA z wektorem za pomocą ligazy i wprowadzaniu cząsteczek rekombinowanego DNA do komórek, w których ulegają one powieleniu [48]. Następnie przeprowadza się selekcję klonów komórek zawierających zrekombinowany DNA, aby można praktycznie wykorzystywać w ten sposób otrzymane klony. Do klonowania stosuje się głównie dwa rodzaje wektorów: plazmidowe (pochodzenia bakteryjnego) i pochodzenia wirusowego. W tej pracy skoncentrowano się głównie na wektorach pochodzenia bakteryjnego.

We współczesnej biotechnologii rekombinowane szczepy drobnoustrojów wykorzystywane są bardzo

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW; ul. Miecznikowa 1, 00-096 Warszawa; tel. 22 554 41312; e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl



Rys. 1. Ogólny schemat klonowania

Wektor zawiera miejsce inicjacji replikacji (ori), marker selekcyjny (np. gen oporności na antybiotyki) oraz miejsce MCS (multiple cloning site), które jest sekwencją DNA zawierającą wiele miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Zarówno wektor oraz klonowany fragment DNA trawione są odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (symbol nożyczek na rysunku), które pozostawiają kompatybilne końce. Następnie przeprowadzana jest ligacja obu fragmentów.

często jako narzędzia produkcyjne. Znajdują one zastosowania w laboratoriach gdzie mogą być używane w celu poznawania funkcji genów lub białek różnych organizmów. W medycynie szczególnie ważnym osiągnięciem jest wykorzystywanie szczepów rekombinowanych do biosyntezy białek lub hormonów ludzkich, które mają duże znaczenie terapeutyczne. Coraz częściej słyszy się też o wykorzystywaniu technik rekombinacji DNA do otrzymywania rekombinowanych szczepionek, które stosuje się do szczepień ochronnych ludzi i zwierząt [24].

Aby wektor był użyteczny, powinien spełnić kilka podstawowych warunków. Musi być zdolny do autonomicznej replikacji w swoim gospodarzu i posiadać miejsca restrykcyjne umożliwiające odpowiednie wstawienie fragmentu DNA. Wektor powinien również nieść gen markerowy pozwalający na selekcję, czyli odróżnienie komórek gospodarza, które pobrały zrekombinowany wektor, od tych, które go nie pobrały [20].

Obecnie dysponujemy dużą gamą wektorów o różnych cechach, takich jak zakres gospodarza, wielkość fragmentu DNA (który może być niesiony przez wektor), liczba kopii plazmidu, miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne, ilość i typ genów markerowych [20]. Ze względu na rodzaj gospodarza można podzielić wektory między innymi na bakteryjne, grzybowe, komórek ssaków, komórek roślinnych, komórek owadów [24]. Wektory możemy też opisywać ze względu na funkcję, jaką spełniają w komórkach gospodarza, na przykład wektory ogólnego stosowania do klonowania genów (np. pBR322, pUC), wektory ułatwiające sklonowanie produktów reakcji PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy; polymerase chain reaction (np. pDrive, TOPO wektory), wektory ekspresyjne do efektywnej syntezy białka (np. seria pGEM), wektory umożliwiające produkcję białek ludzkich (np. zawierające gen insuliny).

W niniejszej pracy przedstawiono podstawowe właściwości wektorów bakteryjnych oraz możliwości,

jakie daje ich zastosowanie. Opisano zarówno wektory klasyczne, które jako pierwsze stosowane były w biotechnologii, jak i najnowsze wektory znajdujące obecnie zastosowanie w różnych dziedzinach. Wymienione są również cechy, jakie powinien spełniać wektor ekspresyjny oraz pokrótce przedstawiono wykorzystanie wektorów bakteryjnych niosących geny reporterowe, umożliwiające prostą obserwację ekspresji innych genów w komórce.

2. Zastosowania wektorów bakteryjnych

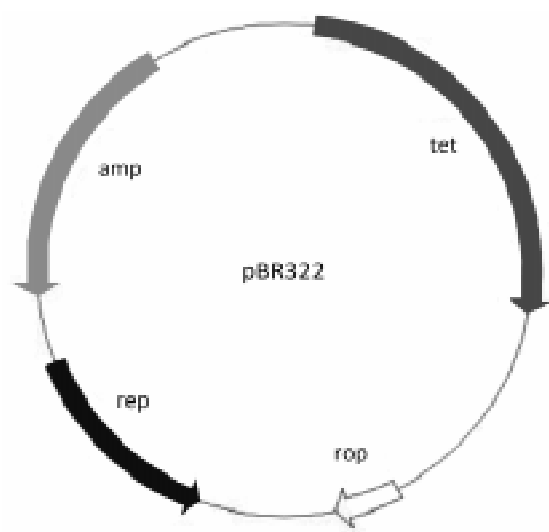
2.1. Wektory jako podstawowe narzędzie do klonowania

Podstawowym zastosowaniem wektorów bakteryjnych jest użycie ich jako narzędzi do klonowania. Pomysł takiego zastosowania powstał wkrótce po tym jak odkryto istnienie białek przecinających DNA w specyficznych miejscach nazywanych enzymami restrykcyjnymi. Enzymy restrykcyjne rozcinają długie cząsteczki DNA na specyficzne fragmenty, którymi można łatwo manipulować. Drugim niezbędnym narzędziem w laboratorium biologicznym są ligazy, czyli enzymy pozwalające na łączenie fragmentów nici DNA. Ligazy katalizują tworzenie wiązań fosfodiesterowych w obszarach zerwania nici DNA przy wykorzystaniu energii ATP lub NAD^+ . Zastosowanie enzymów restrykcyjnych oraz ligaz DNA umożliwia wycinanie fragmentów DNA, a następnie ich ligację z DNA nośnikowym, czyli wektorem oraz późniejszy transfer tak zrekombinowanego DNA do komórek bakteryjnych, gdzie można tworzyć ich setki tysięcy kopii, klonów. To z kolei umożliwia izolację sklonowanych fragmentów DNA na dużą skalę. Duże ilości specyficznych sekwencji DNA mogą być następnie wykorzystywane do różnych celów – izolacji genów, analizy ich organizacji i ekspresji, odczytania sekwencji nukleotydu [2].

Możliwość wyizolowania i sklonowania specyficznych fragmentów DNA otworzyła nowy rozdział w medycynie genetycznej, biologii molekularnej i komórkowej oraz w biochemii. Sklonowanie wybranego fragmentu DNA umożliwiło szukanie mutacji i polimorfizmów związanych z daną chorobą, identyfikowanie ekspresji genów w wybranych tkankach oraz warunków ekspresji genów [28]. Z biegiem czasu stworzono bardzo wiele wektorów służących do klonowania, które stają się coraz bardziej wyspecjalizowane, są zdolne do przenoszenia coraz większych fragmentów DNA i umożliwiają przeprowadzanie skomplikowanych badań [20].

2.1.1. Klasyczne wektory

Wektor pBR322. Jednym z pierwszych najlepiej poznanych i często wykorzystywanych wektorów bakteryjnych był plazmid pBR322 (rys. 2). Jest to mały plazmid (4366 pz), który został skonstruowany przez Bolivarą i Rodrigueza w 1976 roku. Można do niego wstawiać fragmenty DNA do 10 kbp [10]. Zawiera on miejsce inicjacji replikacji origin of replication pozwalające na replikację w jedynym gospodarzu – *Escherichia coli*. pBR322 jest stabilnym plazmidem, normalnie występującym w ilości 20–30 kopii na komórkę (po dodaniu do podłoża chloramfenikolu liczba kopii może wzrosnąć nawet do 1000–3000). Zawiera dwa geny oporności: na ampicylinę (w obrębie genu β -laktamazy) i tetracyklinę. W obrębie genu tetracykliny znajdują się miejsca restrykcyjne *Bam*HI, *Hind*III, i *Sal*I, natomiast w obrębie genu oporności na ampicylinę miejsca restrykcyjne *Pst*I. Oprócz tego



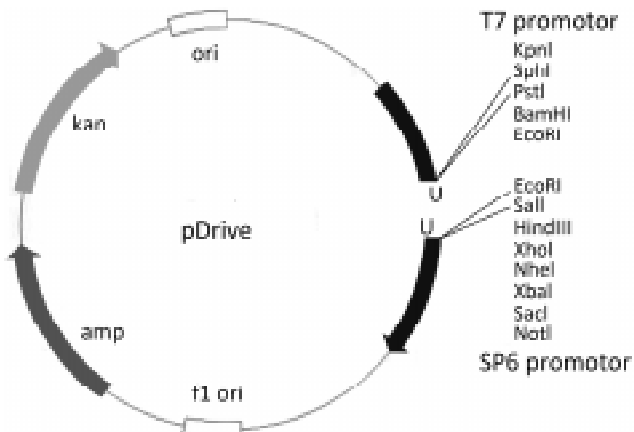
Rys. 2. Mapa plazmidu pBR322

Zaznaczono: rep – replikon pozwalający na replikację plazmidu (z plazmidu pMB1), rop – fragment kodujący białko Rop, amp – gen β -laktamazy niosący oporność na ampicylinę, tet – gen oporności na tetracyklinę.

plazmid pBR322 zawiera też miejsce restrykcyjne *Eco*RI, poza rejonem kodującego DNA [10].

Plazmid pBR322 stał się prekursorem wielu nowszych, coraz bardziej doskonalszych wektorów. Udoskonalone zostały między innymi metody selekcji klonów zawierających zrekombinowany DNA, dodano nowe miejsca umożliwiające klonowanie (MCS – multiple cloning site), zwiększono liczbę kopii plazmidów w komórce oraz skonstruowano wektory wielofunkcyjne, służące do szczegółowej analizy genów [21].

Wektor pUC. Przykładami takich ulepszonych plazmidów są plazmidy pUC18 i pUC19. Wektory te różnią się od siebie jedynie odwrotną orientacją polilinkera w genie *lacZ* [24]. Zostały one skonstruowane na Uniwersytecie w Kalifornii przez naukowców Messinga i Vieira. Przy ich konstrukcji oparto się o plazmid pBR322 i mają one 40% wspólnego z nim DNA. Są to małe plazmidy o wielkości 2686 pz, niosące gen oporności na ampicylinę oraz N-końcowy fragment genu *lacZ*. Miejsce inicjacji replikacji w plazmidach pUC pochodzi, tak jak w przypadku plazmidu pBR322, z plazmidu pMB1 (*rep* pMB1). W plazmidach pUC obecna jest jednak pojedyncza mutacja punktowa w miejscu inicjacji replikacji oraz brak jest genu *rop*. To powoduje, że plazmidy pUC występują w większej liczbie kopii na komórkę (do 500 kopii) niż plazmid pBR322. Ich zaletą w stosunku do pBR322 jest również to, że zawierają polilinkera, w którym znajdują się sekwencje rozpoznawane przez wiele enzymów restrykcyjnych [20]. Kolejną zaletą tych plazmidów jest prostszy sposób selekcji komórek zawierających zrekombinowane DNA. Kolonie komórek zawierających plazmid pUC z dodatkowo wstawionym DNA będą miały bowiem inny kolor, od tych które zawierają sam, niezmieniony plazmid pUC (selekcja na białoniebiskie kolonie). Bezpośrednia selekcja pozytywnych rekombinantów jest możliwa dzięki zjawisku α -komplementacji. W tego typu doświadczeniach stosuje się szczepy bakteryjne, posiadające pojedynczą delecję w genie *lacZ* (mutacja we fragmencie *lacZ* α) kodowanym na chromosomie bakteryjnym. Takie szczepy (np. DH5a) produkują jedynie defektywną formę enzymu β -galaktozydazy. Stosując plazmidy zawierające fragment tego genu (*lacZ* α) następuje komplementacja mutacji na chromosomie, powstaje aktywna forma β -galaktozydazy z podjednostki LacZ Ω kodowanej na chromosomie oraz LacZ α kodowanej na plazmidzie. Aby zaobserwowanie tego zjawiska było możliwe, komórki wysiewa się na podłożu zawierające induktor IPTG (izopropyl- β -tiogalaktopiranozyd) umożliwiający transkrypcję genu *lacZ*, oraz chromogeny substrat dla β -galaktozydazy – związek X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopiranozyd). Kolonie komórek zawierające plazmid z nieprzerwanym



Rys. 3. Mapa plazmidu pDrive firmy Qiagen

Zaznaczono geny: kan – oporności na kanamycynę, amp – gen *lacZ'* niosący oporność na ampicylinę, miejsce inicjacji replikacji oraz promotory T7 i SP6. Na rysunku zaznaczono również miejsce do klonowania, które jest przerwane, a jego sekwencja na końcu 3' zawiera uracyl (U), co pozwala na bezpośrednie użycie produktów reakcji PCR (reakcja PCR z polimerazą Taq) do ligacji z wektorem.

fragmentem genu *lacZ* (*lacZα*) są zdolne do komplementacji i wytwarzają β-galaktozydazę, która powoduje rozszczepienie X-gal, przez co na podłożu selekcyjnym komórki będą zabarwione na niebiesko. Wstawienie fragmentu DNA w miejsce MCS powoduje przerwanie genu *lacZα*, komórki na podłożu selekcyjnym będą wówczas białe, ponieważ nie powstanie funkcjonalna β-galaktozydaza. Natomiast gen oporności na ampicylinę jest markerem pozwalającym na łatwą selekcję bakterii zawierających zarówno plazmid zrekombinowany jak i niezrekombinowany [24, 32].

2.1.2. Wektory komercyjne, nowe strategie

Obecnie wektory do klonowania często tworzone są w laboratoriach różnych firm komercyjnych. Są to wektory skonstruowane tak by w maksymalnym stopniu ułatwić i przyspieszyć pracę w laboratorium, są tworzone do konkretnych zastosowań, jak na przykład wektory do szybkiego klonowania produktów reakcji PCR. Przykładami takich wektorów analizowanymi w pracy są wektory pDrive, pGEM T i pGEM T easy oraz wektory z topoizomerazą.

Wektor pDrive. Wektor pDrive (rys. 3) pozwala na szybkie wykorzystanie produktów reakcji PCR. Fakt, że na końcach niektórych produktów reakcji PCR pozostawiona jest adenozyzna, pozwolił na skonstruowanie wektora, który z wysoką specyficznością hybryduje z produktami PCR. Do reakcji PCR konieczne jest wówczas zastosowanie odpowiedniej polimerazy, która na końcach nowosyntetyzowanych nici dołączy dodatkową zasadę – adenozyne. Polimerazą, która spełnia ten

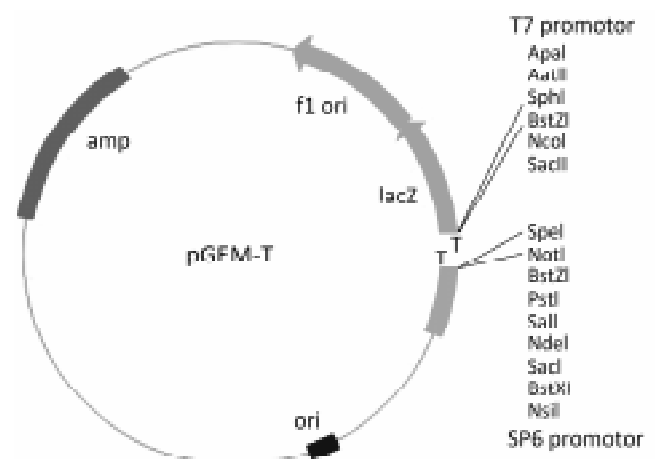
warunek jest polimeraza Taq, wyizolowana z bakterii *Thermus aquaticus* [29]. Nie można stosować natomiast polimeraz takich jak np. polimeraza Pfu z *Pyrococcus furiosus*, która nie dodaje dodatkowej adenozyzny.

Wektor pDrive ma formę liniową i na jego końcach występuje uracyl komplementarny do adenozyzny znajdującej się na zewnętrznych fragmentach produktów po reakcji PCR z wykorzystaniem polimerazy Taq. Konstrukcja wektora znacznie upraszcza procedurę klonowania, ponieważ wektor pDrive jest już przygotowany do bezpośredniego zastosowania w reakcji ligacji z produktem reakcji PCR. Wektor pDrive niesie gen oporności na kanamycynę i ampicylinę. Prostą selekcję umożliwia gen *lacZ'* (selekcja na biało-niebieskie kolonie) [57].

Wektory pGEM T i pGEM T easy. Wektory pGEM T (rys. 4) i pGEM T easy są wektorami o zastosowaniu podobnym do zastosowania wektorów pDrive. Są również narzędziami ułatwiającymi pracę przy klonowaniu produktów reakcji PCR. Oba wektory występują w formie zlinearyzowanej, a na swoich końcach mają dołączoną tyminę, która poprawia wydajność ligacji produktu PCR z wektorem.

W ten sposób zapobiega się recykulacji wektora i zapewnia kompatybilne sekwencje dla produktu PCR namnożonego odpowiednimi, termostabilnymi polimerazami, które na końcach 3' produktu PCR dodają pojedynczą adeninę. Wektory te występują w komórce w dużej liczbie kopii [56].

Wektory TOPO. Kolejnym wektorem ułatwiającym pracę w laboratorium jest między innymi wektor zawierający enzym topoizomerazę I (produkowany jest



Rys. 4. Mapa wektora pGEM T firmy Promega

Zaznaczono geny: amp – oporności na ampicylinę, origin replikacji, *lacZ* oraz promotory T7 i SP6. Zaznaczono również miejsce do klonowania, które jest przerwane, a jego sekwencja na końcu 3' zawiera tymidynę (T), co pozwala na szybką ligację odpowiednich produktów po reakcji PCR z wektorem.



Rys. 5. Zastosowanie wektora TOPO TA w procesie klonowania

Wektor TOPO TA jest zlinearyzowany, a na obu końcach do reszty 3' fosforanowej (oznaczenie P na rysunku) ma dołączoną topoiizomerazę I (TOPO). Topoiizomeraza I rozpoznaje specyficzną sekwencję DNA (miejsca oznaczone *) i pozwala na połączenie wektora TOPO TA z produktem PCR o lepkich końcach (A na rysunku oznacza dodatkową adenozyne), amplifikowanym polimerazą Taq. Po ligacji topoiizomeraza I uwalnia DNA, a wektor TOPO TA zawiera wstawiony produkt PCR.

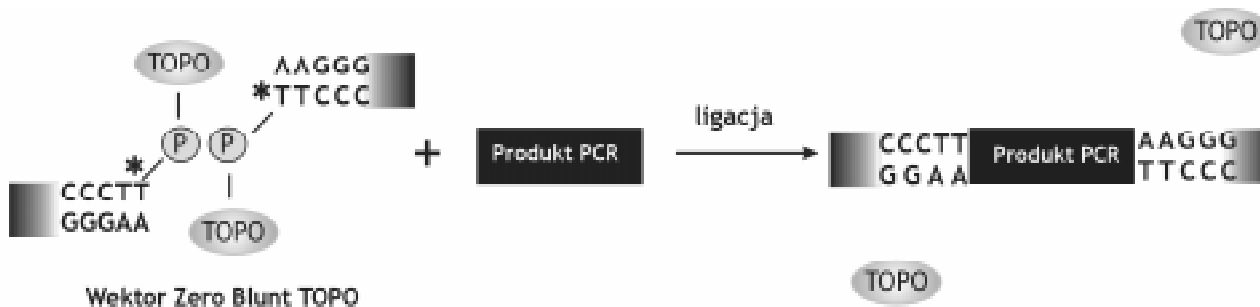
przez firmę Invitrogen pod nazwą TOPO vector). Wektor ten jest zlinearyzowany, a na obu końcach do reszty 3' fosforanowej ma dołączoną wiązaniem kowalencyjnym topoiizomerazę I. Biologiczną funkcją topoiizomerazy I jest nacinanie oraz ponowne łączenie DNA podczas procesu replikacji. Topoiizomeraza I wykorzystywana w TOPO wektorach pochodzi z wirusa ospy krowiej vaccinia virus. Enzym ten rozpoznaje sekwencję 5' (C/T)CCTT 3' i tworzy wiązanie kowalencyjne z grupami fosforanowymi dołączonymi do 3' tyminy. Nacina jedną z nici DNA, pozwalając na rozwinięcie DNA. Następnie enzym religuje końce rozciętych nici i uwalnia DNA. Forma liniowa wektorów TOPO pozwala na proste przeprowadzenie ligacji wektora z kompatybilnymi końcami produktu PCR.

Produkt PCR może być amplifikowany zarówno z użyciem polimerazy Taq (rys. 5), zostawiającej lepkie końce (dodatkowa adenozyne), jak i polimeraz zostawiających tępe końce (rys. 6).

Ligacja następuje w zaledwie po 5 minutach, w temperaturze pokojowej [53].

Wektory BAC. Wektory zwane BAC (bacterial artificial chromosomes) czyli sztuczne chromosomy bakteryjne są bakteryjnymi systemami do klonowania,

których główną zaletą jest możliwość klonowania na nich dużych fragmentów obcego DNA (do 300 kpz). Znakomicie nadają się do tworzenia bibliotek genomowych, pozwalają na zawarcie całego genomu danego organizmu w stosunkowo niewielkiej liczbie klonów. Skonstruowane są one na bazie wektora plazmidowego F występującego powszechnie u *E. coli*. Czynniki F u *E. coli* determinuje płeć bakterii, jest plazmidem o wielkości około 100 kpz, który koduje ponad 60 białek [48]. Wektor BAC ma wielkość 7,5 kpz i z genów, które występowały pierwotnie na wyjściowym plazmidzie, zawiera między innymi geny *parA* i *parB* odpowiedzialne za replikację. Replikacja czynnika F podlega ścisłej kontroli systemów regulujących *E. coli* i w wektorze BAC zapewnia to utrzymywanie jego niskiej liczby kopii. To pozwala na stabilne utrzymywanie dużych insertów DNA oraz obniża ryzyko rekombinacji między fragmentami DNA niesionymi przez wektor. Geny *parA* i *parB* są odpowiedzialne za prawidłową segregację plazmidów do komórek potomnych. Uniemożliwiają one współwystępowanie systemów BAC w pojedynczej komórce, co jest zaletą w porównaniu do wektorów drożdżowych YAC (yeast artificial chromosome; sztuczne chromosomy drożdżowe) [40].



Rys. 6. Zastosowanie wektora Zero Blunt TOPO w procesie klonowania

Wektor Zero Blunt TOPO jest zlinearyzowany, a na obu końcach do reszty 3' fosforanowej (oznaczenie P na rysunku) ma dołączoną topoiizomerazę I (TOPO). Topoiizomeraza I rozpoznaje specyficzną sekwencję DNA (miejsca oznaczone *) i pozwala na połączenie wektora Zero Blunt TOPO z produktem PCR o tępych końcach. Po ligacji topoiizomeraza I uwalnia DNA, a wektor Zero Blunt TOPO zawiera wstawiony produkt PCR.

2.2. Wektory służące do przenoszenia genów między organizmami

Ważnym zastosowaniem wektorów bakteryjnych jest wykorzystanie ich do przenoszenia genów między różnymi organizmami, również takimi, które nie są ze sobą spokrewnione. Wektory umożliwiające przeniesienie DNA w ten sposób nazywane są wektorami wahałłowymi. Zawierają one systemy replikacyjne pozwalające im na replikację w dwóch różnych organizmach. W ten sposób można je przenosić między tymi organizmami bez potrzeby jakiegokolwiek modyfikacji wektora. Jako przykłady można wymienić między innymi wektory mające zdolność replikacji w *E. coli* i *Bacillus subtilis*, w *E. coli* i drożdżach, w *E. coli* i komórkach ssaków oraz wiele innych [25]. Najważniejszymi cechami wektorów służących do przenoszenia genów między organizmami jest oprócz posiadania miejsca inicjacji replikacji dla obu gospodarzy, posiadanie markerów selekcyjnych, dzięki którym można przeprowadzić selekcję zarówno w jednym jak i w drugim gospodarzu.

Aby osiągnąć stabilne utrzymywanie się i ekspresję genów w danym organizmie bądź tkance stworzono wektory integracyjne. Występują one w bardzo niskiej liczbie kopii (na ogół jedna kopia) na komórkę [25]. Wektory te zawierają sekwencje rekombinacyjne, homologiczne do sekwencji w chromosomie gospodarza, które umożliwiają integrację w odpowiednim miejscu w chromosomie.

2.2.1. Transport genów do komórek eukariotycznych

Często zachodzi potrzeba wykorzystania wektorów nie tylko w celu ekspresji genów w różnych komórkach bakteryjnych, lecz również w komórkach eukariotycznych. Wektory bakteryjne na przykład w postaci plazmidu są wtedy nośnikami fragmentu DNA, który ma zostać umieszczony w komórce eukariotycznej. Istnieje jednak również potrzeba użycia kolejnego wektora, który pozwoli na dostarczenie plazmidu do komórki. W tym celu wykorzystywane są zazwyczaj komórki bakteryjne takie jak *Listeria monocytogenes* lub *E. coli* z wklonowanymi genami pochodzącymi od bakterii z rodzaju *Listeria* lub *Yersinia*. Dzięki takim systemom można dostarczyć do komórek eukariotycznych białka [14] lub DNA [11], które mogą również pełnić funkcję indukowania odpowiedzi immunologicznej organizmu (szczepionki nowej generacji) [8].

Dietch i wsp. [7] przedstawiają wykorzystanie atenuowanego szczepu bakterii *L. monocytogenes* w celu dostarczenia przez wektor bakteryjny genu kodującego antygen do cytozolu makrofagów. Gen lizyny faga *L. monocytogenes* znajduje się pod kontrolą promotora genu *actA*, dzięki czemu po wnikięciu do cytozolu makrofagów komórki bakteryjne są lizowane.

Umożliwia to uwolnienie plazmidów – wektorów ekspresyjnych, które znajdowały się w cytoplazmie komórek *L. monocytogenes*. Plazmidy ulegają ekspresji w jądrze makrofagów, a jest to możliwe, ponieważ zawierają eukariotyczne promotory. W ten sposób uzyskano efektywną ekspresję wklonowanych genów reporterowych oraz prezentację antygenów.

Podobne zastosowania są opisane w pracy *Spreng'a* i wsp. [41], gdzie prezentowane są dwa systemy pozwalające na dostarczenie rekombinowanych białek lub DNA do komórek eukariotycznych. Jeden z nich wykorzystuje atenuowane szczepy bakterii gramujemnych, które umożliwiają sekrecję heterologicznych antygenów przez system sekrecji – hemolizyny z *E. coli*. Drugi system opiera się na opisanym powyżej wykorzystaniu bakterii *L. monocytogenes* pozwalającym na dostarczenie wektora ekspresyjnego do cytoplazmy komórek prezentujących antygen, takich jak makrofagi.

Ciekawym przykładem wykorzystania metody inżynierii genetycznej jest indukowanie komórkowej odpowiedzi immunologicznej w komórkach ssaków lub projektowanie szczepionek przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym. *Higgins* i wsp. [14] opisują wykorzystanie bakterii *E. coli* produkującej cytoplazmatyczne, zrekombinowane białko listeriolizyny, które pozwala na dostarczenie innych białek do cytozolu makrofagów w komórkach ssaków. Przy użyciu takiego systemu można dostarczyć do cytozolu dowolne białko, które może być następnie wytwarzane przez *E. coli*, bez potrzeby uprzedniego jego oczyszczenia.

2.3. Wektory ekspresyjne

Wektory bakteryjne mogą być wykorzystywane jako narzędzie do produkcji białek oraz ich ewentualnego późniejszego oczyszczania (wektory ekspresyjne), jak i do analizy lokalizacji białek w komórce – wektory zawierające geny reporterowe, np. gen kodujący zielone białko fluorescencyjne GFP (green fluorescent protein), które będą opisane w kolejnym rozdziale. W różnego rodzaju badaniach nad białkami wektory ekspresyjne mogą być wykorzystywane do produkcji białek do celów poznawczych takich jak analizy funkcjonalne i strukturalne, lub aplikacyjnych – terapia i profilaktyka chorób organicznych i zakaźnych. Umożliwiają one nadprodukcję białek, które na ogół w organizmach żywych występują w ilości niewystarczającej by umożliwić ich izolację na dużą skalę [42].

2.3.1. Nadprodukcja białek

Do nadprodukcji określonego białka niezbędne są trzy elementy – dobrany gospodarz, którym na ogół jest organizm modelowy *E. coli*, właściwy wektor oraz

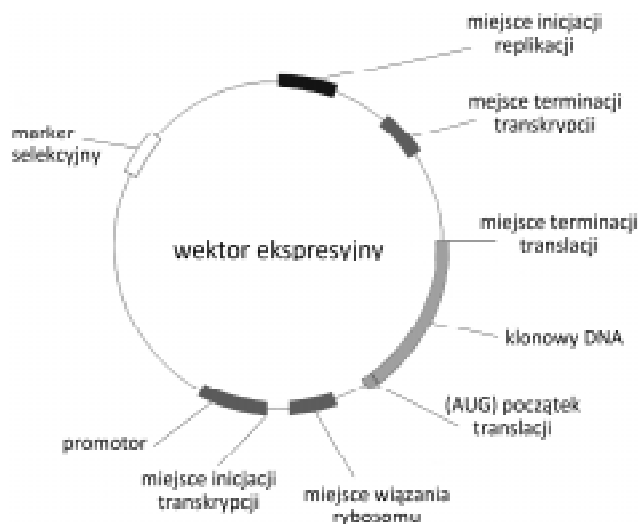
odpowiednio namnożony gen bądź fragment genu, kodujący oczyszczane białko [42]. Właściwy gospodarz wraz z wektorem, który w nim poprawnie funkcjonuje stanowią razem system ekspresyjny [39].

Przy tworzeniu systemu ekspresyjnego nie bez znaczenia jest wybór odpowiedniego gospodarza, który powinien spełniać pewne kryteria. Pożądane jest, aby był zdolny do szybkiego wzrostu na tanich substratach, jego genom powinien być dobrze scharakteryzowany, a używany szczep nie powinien być patogenny. Najczęściej stosowanymi są systemy ekspresyjne, w których gospodarzem jest *E. coli*. Jest to modelowy organizm, dla którego metody hodowli są dobrze opracowane, a jego genom jest scharakteryzowany o wiele lepiej niż innych mikroorganizmów [1]. Gospodarz musi być odpowiednio dobrany w stosunku do genu białka, tak by był on efektywnie ekspresyjny. Ważne jest między innymi, aby nie występowały znaczne różnice w częstotliwości występowania poszczególnych kodonów gospodarza w stosunku do genu białka, mRNA powinno być stabilne, translacja mRNA powinna przebiegać efektywnie [26]. Gospodarz musi umożliwiać poprawne przeprowadzanie procesów takich jak modyfikacje postranslacyjne białek, fałdowanie białek, sekrecję białek do podłoża. Powstające w dużej ilości białko nie powinno być również toksyczne w stosunku do gospodarza [26]. Mimo że *E. coli* posiada bardzo wiele zalet, niejednokrotnie konieczne jest użycie organizmu innego gatunku jako gospodarza. W przypadku, gdy nie możemy jako gospodarza wykorzystać szczepu *E. coli* alternatywą mogą być bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Streptomyces*, czy gatunki *Lactococcus lactis*, *Corynebacterium glutamicum*. Ze względu na pewne modyfikacje postranslacyjne zdarza się, że niezbędnym jest zastosowanie gospodarzy innych niż bakteryjne (np. grzyby z typu workowców lub grzyby strzępkowe, komórki owadzie, mysie lub ludzkie linie komórek ssaczy) [42].

2.3.2. Cechy, które powinien spełniać wektor ekspresyjny

Charakterystyczne właściwości wektorów ekspresyjnych zostały schematycznie przedstawione na rys. 7. Każdy wektor ekspresyjny zawiera sekwencję promotora inicjacji transkrypcji, która jest umieszczona „powyżej” miejsca wklonowania obcego fragmentu DNA.

Za miejscem inicjacji transkrypcji znajduje się sekwencja nazywana miejscem wiązania rybosomu (Shine Dalgarno), poniżej której znajduje się miejsce insercji klonowanego DNA. Na początku fragmentu obcego DNA znajduje się kodon AUG inicjujący translację, a na końcu kodon stop, który jest terminatorem syntezy polipeptydu. Oprócz tych sekwencji wektory posiadają również miejsce inicjacji replikacji oraz



Rys. 7. Cechy charakterystyczne wektora ekspresyjnego

gen umożliwiającą przeprowadzenie selekcji. Szerszą analizę poszczególnych elementów wektorów ekspresyjnych przedstawiono w dalszej części pracy.

Promotor. W eksperymentach służących nadprodukcji białek główny cel stanowi otrzymanie dużej ilości badanego białka. W większości przypadków ważne jest by nadprodukowane białko stanowiło 10–30% wszystkich białek w komórce. W związku z tym zastosowany promotor powinien być silny, ale jednocześnie powinien wykazywać minimalną ekspresję podstawową [26]. Oprócz tego optymalną sytuacją jest gdy indukcja promotora jest prosta i możliwa przy użyciu tanich substratów, które nie są stosowane w standardowych podłożach [13].

Znaczники. Znaczники, które są dołączane do rekombinowanych białek mają na celu ułatwienie ich oczyszczania, detekcji, lub zwiększenia rozpuszczalności. Znacznikiem może być krótki peptyd, domena, bądź całe białko. Znacznik powinien wykazywać duże powinowactwo do złoża, na którym będzie oczyszczane białko, pozwalać na elucję substancjami niskocząsteczkowymi, mieć niewielki wpływ na aktywność i strukturę trzeciorzędową białka, jak i łatwą wykrywalność [45]. Ważnymi cechami znaczników jest również możliwość ich jednoetapowej adsorpcji na złożu, łatwe i specyficzne usunięcie ich w celu otrzymania natywnego białka oraz możliwość zastosowania do różnych białek. Jednak każdy ze znaczników w czasie oczyszczania wymaga specyficznych warunków, które mogą wpływać na właściwości białka. Z tego powodu istnieją różne strategie używane przy produkcji białek na dużą skalę. Jedną z nich jest używanie małych znaczników, które nie powinny wpływać na oczyszczane białko, takich jak: poly-Arg, FLAG-, poli-his, S-tag. W niektórych wypadkach małe znaczniki nie

Tabela I

Cechy charakterystyczne niektórych najczęściej używanych znaczników [wg 43, 45, 32]

Znacznik	Opis i właściwości
Poly-Arg	znacznik poliargininowy, składa się z pięciu do sześciu arginin, oczyszczany na złożu kationowymiennym SP-Sephadex, może wpływać na strukturę trzeciorzędową białka
Poly-His	znacznik polihistydynowy, oczyszczany na złożu niklowym Ni ²⁺ -NTA, lub Co ²⁺ -CMA, umożliwia oczyszczanie w warunkach natywnych i denaturujących, elucja zachodzi w łagodnych warunkach, złożo jest tanie, specyficzność IMAC jest mniejsza niż innych metod chromatografii powinowactwa, nie zwiększa rozpuszczalności białka
FLAG	znacznik wykorzystujący krótki, hydrofilowy ośmioaminokwasowy peptyd, wiąże się do przeciwciała M1, może być przyłączony do białka na C- lub N-końcu, może być używany w różnego typu komórkach, ma wysoką specyficzność, oczyszczanie zachodzi w warunkach niedenaturujących, złożo jest drogie
Strep-tag	znacznik składający się z nonapeptydu, wiąże się do streptawidyny, ma wysoką specyficzność, eluowany w łagodnych warunkach, stosowane złożo jest drogie
S-tag	15-aminokwasowy fragment rybonukleazy A, ma wysoką specyficzność, pozwala na proste wykrycie ilości rekombinowanego białka mniejszych niż 1 fmol, elucja następuje w surowych warunkach, złożo jest drogie, znacznik nie zwiększa rozpuszczalności białka

muszą być usuwane z białka. Czasem lepszą strategią jest użycie dużych peptydów lub białek jako znaczników. Zaletą tego typu znaczników jest nadawanie przez nie białku rozpuszczalności, wadą natomiast, że w większości przypadków muszą być z produkowanego białka usunięte [44].

Niestety nie istnieją znaczniki idealne, które spełniałyby wszystkie pożądane kryteria. Niekiedy optymalnym rozwiązaniem jest więc stosowanie jednocześnie dwóch lub więcej znaczników [47]. W związku z zapotrzebowaniem na różnego rodzaju znaczniki pracowano nad ich konstrukcją już w latach 80 i 90. Biorąc pod uwagę tak dużą ilość kryteriów, które powinny być spełnione przez dobry znacznik nie jest zaskoczeniem fakt, że nadal istnieje potrzeba konstruowania nowych, coraz lepiej nadających się do konkretnych doświadczeń znaczników [45]. Znaczniki, które są najczęściej stosowane zaprezentowano w tabeli I.

Terminatory procesu transkrypcji oraz translacji.

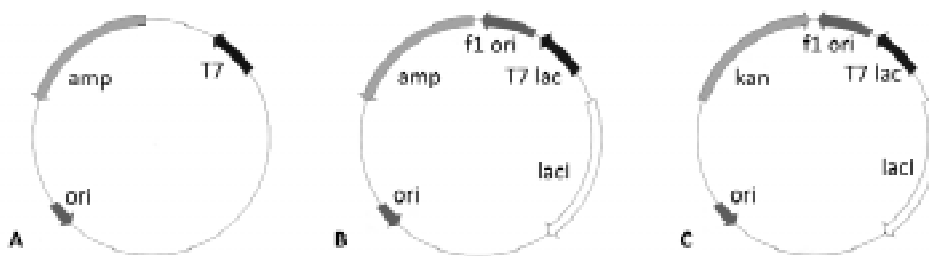
W wektorach ekspresyjnych terminator transkrypcji umieszcza się na ogół poniżej ekspresowanego genu (co zwiększa stabilność plazmidu zapobiegając transkrypcji przez miejsce startu replikacji) [38] oraz powyżej (aby zminimalizować ekspresję podstawową) [13]. W organizmach prokariotycznych terminacja transkrypcji może być powodowana przez dwa mechanizmy: Rho-zależny bądź Rho-niezależny. W mechanizmie Rho-zależnym terminacja transkrypcji zależy od heksamerycznego białka Rho powodującego uwolnienie powstającego mRNA z matrycy [26]. Terminatory Rho-niezależne składają się natomiast z odwróconych sekwencji nukleotydowych, po których następuje ciąg nukleotydów adenylowych. Po przejściu polimerazy RNA przez sekwencję odwróconych powtórzeń mRNA tworzy strukturę szpilki do włosów, co powoduje zatrzymanie się enzymu. Ciąg nukleotydów urydynylo-

wych znajdujący się za sekwencją odwróconych powtórzeń słabo oddziałuje z nukleotydami adenyłowymi na nici matrycowej, przez co polimeraza oddysocjuje. W wektorach ekspresyjnych wykorzystuje się terminatory Rho-niezależne [38]. Największe efekty terminacji translacji uzyskuje się stosując przedłużony kodon stop UAAU lub kilka kolejnych kodonów stop umieszczonych jeden za drugim [35].

Markery selekcyjne. Najczęściej w wektorach ekspresyjnych stosowane są jako markery selekcyjne geny warunkujące oporność na antybiotyki (np. ampicylinę, kanamycynę, chloramfenikol, tetracyklinę). Alternatywnymi strategiami mogą być między innymi systemy trucizna-antidotum (np. system *hok/sok* z plazmidu R1), które zapewniają stabilny rozdział plazmidów między komórkami potomnymi [42].

2.3.3. Przykłady wektorów ekspresyjnych

Plazmid pUB110. Wektor pUB oraz jego pochodne są plazmidami pochodzącymi z bakterii *Staphylococcus aureus* przystosowanymi do wykorzystania w pracach z *B. subtilis*. Ze względu na możliwość używania tych wektorów przy pracy z *B. subtilis* mają one wiele zalet. Mogą być używane do analizy procesu sporulacji, kiełkowania przetrwalników i transformacji. Równocześnie wektory te dają możliwość porównywania systemu ekspresji genów z *B. subtilis* w stosunku do *E. coli*. Zaletą użycia *B. subtilis* jest też fakt, że bakteria ta jest niepatogenna oraz nie występuje w naturalnej mikroflorze człowieka [12]. Ponadto *B. subtilis* jest bakterią dość dobrze poznaną, która nie posiada zewnętrznej błony, co upraszcza sekrecję i oczyszczanie produkowanego białka [9]. Poza tym szczepy *Bacillus* są często używane do produkcji antybiotyków, enzymów, insektycydów, jak i w procesach fermentacji.



Rys 8. Schematyczne mapy różnych wektorów typu pET

Zaznaczono: ori – miejsce inicjacji replikacji, f1 origin, promotor T7, gen *lacI*, *amp* – gen oporności na ampicylinie, *kan* – gen oporności na kanamycynie.
 A: wektory pET-3a-d, pET-12a-c, pET-14b, pET-17b, pET-17xb
 B: wektory pET-21(+), pET-21a-d(+), pET-22b(+), pET-25b(+), pET-31b(+), pET-32a-c(+), pET-32 Ek/LIC, pET-32 Xa/LIC, pET-43.1a-c(+)
 C: wektory pET-24+, pET-24a-d(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28a-c(+), pET-29a-c(+), pET-30a-c(+), pET-30 LIC, pET-33b(+), pET-34b(+), pET-35b(+), pET-36b(+), pET-37b(+), pET-38b(+), pET-39b(+), pET-40b(+), pET-41a-c(+), pET-42a-c(+)

Wektor pUB110 zawiera geny oporności na bleomycynę i kanamycynę. Jest on stabilny w komórkach *B. subtilis*, występuje w liczbie kopii około 50 na chromosom [19]. Gryczan i wsp. [12] wykazali, że jest on utrzymywany w komórkach *B. subtilis*, nawet przy braku kanamycyny w podłożu. Można go izolować na dużą skalę, w *B. subtilis* replikuje się autonomicznie i jest wówczas wysokokopijowy. Ustalono wiele miejsc restrykcyjnych dla tego plazmidu. pUB110 daje się łatwo transformować do komórek gospodarza i pozwala na efektywną selekcję zrekombinowanych komórek [12].

Problematyką pojawiającą się w pracy z *B. subtilis* jako z organizmem do produkcji białek są często: niestabilność strukturalna zrekombinowanego plazmidu oraz niestabilność rekombinowanych białek wydzielanych do podłoża. Przyczyna molekularnej niestabilności jest u nich związana ze sposobem replikacji plazmidów – według modelu toczącego się koła. Powstaje wówczas jednoniciowe DNA oraz krótkie sekwencje powtórzone (direct repeats), co może prowadzić do delecji jednego z dwóch powtórzeń i inwersji fragmentu DNA umieszczonego między nimi. Ta obserwacja doprowadziła do rozwoju grupy wektorów niosących kasetę ekspresyjną umieszczoną w środku genów takich jak *amyE*, *thrC*, *lacA*, *pyrD*. W miejscach w chromosomie, gdzie znajdują się wyżej wymienione geny, wektory te umożliwiają stabilną integrację sekwencji DNA [30].

Kolejnym problemem związanym z pracą z *B. subtilis* jest produkcja przez tę bakterię pozakomórkowych proteaz, które rozpoznają i degradują większość heterologicznych białek wydzielanych do podłoża [9]. Problem ten można rozwiązać przez wprowadzanie mutacji typu null w genach kodujących proteazy. Zostały stworzone szczepy z sześcioma lub nawet ośmioma tego typu mutacjami. Alternatywnym rozwiązaniem tego problemu byłoby zidentyfikowanie i znalezienie gospodarza, który nie wydzielaby proteaz [30].

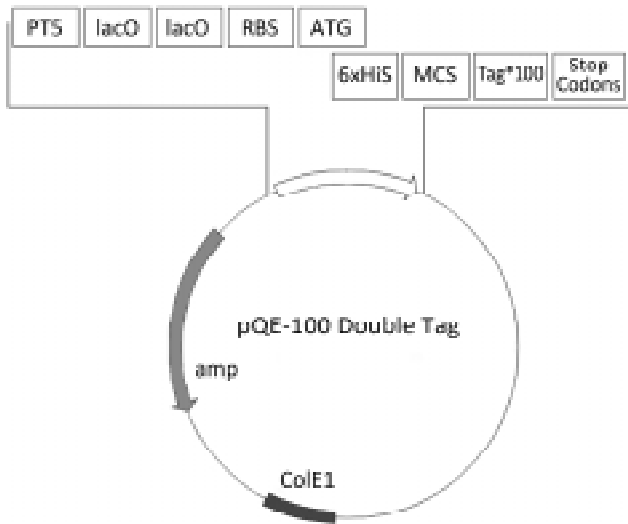
Wektory pET. Wektory typu pET są interesującymi narzędziami wykorzystywanymi do klonowania i nad-

produkcji białek w *E. coli*. Wszystkie są pochodnymi plazmidu pBR322. Są skonstruowane w oparciu o system promotora T7 [43], geny klonowane na tym wektorze znajdują się pod kontrolą sygnałów transkrypcyjnych i translacyjnych pochodzących z bakteriofaga T7. Natomiast ekspresja kontrolowana jest przez operon laktozowy i jej inicjacja następuje przez dodanie IPTG do podłoża.

Istnieje wiele wektorów serii pET (rys. 8), które w zależności od celu wykorzystania, mogą różnić się na przykład sekwencją liderową, sygnałami ekspresyjnymi, miejscami restrykcyjnymi, genami niosącymi oporność na antybiotyki oraz znacznikami dodawanymi do białek. Można wyróżnić dwie główne grupy wektorów pET pełniących funkcje wektorów transkrypcyjnych lub translacyjnych. Wektory transkrypcyjne pozwalają na ekspresję docelowego RNA, ale nie zawierają sygnałów translacyjnych. Są przydatne w wypadku, gdy pożądane jest uzyskanie białek kodowanych przez geny, które posiadają własne sygnały translacyjne. Wektory translacyjne natomiast same zawierają sygnały inicjacji translacji. Wektory pET mogą umożliwiać różnego rodzaju zastosowania, między innymi:

- pET-31b(+) wysokowydajna produkcja peptydów i małych białek
- pET-32a-c produkcja rozpuszczalnych, aktywnych białek w *E. coli*
- pET-33b produkcja docelowych białek nadających się do wyznakowania P³²
- pET-44a-c dodawanie sekwencji Nus•Tag™ oraz N- i C-terminalnej metki His•Tag
- pET-45b(+) dodawanie metki histydynowej przy sekwencji terminalnej białka [52–54].

Wektory pQE. Wektory typu pQE (rys. 9) służą do klonowania i ekspresji genów, są alternatywą dla wektorów typu pET. Umożliwiają one dodanie do badanych białek metki histydynowej. Stworzono również wektory pQE z podwójną metką zawierające, oprócz metki histydynowej w części N-terminalnej, Tag*100 w części C-terminalnej. Wektory te osiągają wysoki



Rys. 9. Mapa plazmidu pQE-100 firmy Qiagen

Zaznaczono: promotor T5 (PT5), operator lac (lac O), miejsce wiązania rybosomu (RBS), kodon startowy (ATG), metka histydynowa (6xHis), miejsce wielokrotnego klonowania (MCS), metka Tag*100, kodon stop, origin replikacji (Col E1), amp – gen oporności na ampicylinę.

poziom ekspresji w *E. coli*, a metkowane może być każde białko.

Metka histydynowa umożliwia oczyszczenie białka na matrycy Ni^{2+} -NTA i jego immobilizację. Z kolei metka Tag*100 w części C-terminalnej jest rozpoznawana przez przeciwciała monoklonalne, co pozwala na bardzo specyficzną detekcję białka (przy użyciu antymysich przeciwciał skoniugowanych z IgG) [58].

Zastosowanie wektorów BAC w nadprodukcji białek. Opracowanie systemów do klonowania BAC miało dość duży związek z projektem odczytania sekwencji ludzkiego genomu Human Genome Project. Przy realizacji tego projektu niezbędne było tworzenie map fizycznych ludzkich chromosomów, które pozwalałyby na izolację, sekwencjonowanie oraz inne manipulacje na fragmentach DNA. Początkowo w odpowiedzi na te potrzeby zostały rozwinięte systemy YAC. Stwarzały one jednak pewne problemy w stosowaniu. Przeszkodą był również fakt, że praca z komórkami drożdżowymi była bardziej skomplikowana niż z dobrze poznanym organizmem modelowym jakim jest *E. coli*. Wykorzystanie systemów BAC ułatwiło prace badawcze i pozwoliło na klonowanie większych niż dotychczas fragmentów DNA [40].

Wektory typu BAC odgrywają ważną rolę przy produkcji białek w komórkach ssaków [3]. Jednym z punktów krytycznych w produkcji rekombinowanych białek jest izolacja pojedynczych komórek, które pozwalają na ekspresję genów i otrzymywanie białka w dużych ilościach. Na ogół stosuje się wektory zawierające promotor, konkretny gen oraz marker selekcyjny. Jednak metoda ta nie jest wystarczająco skuteczna,

ponieważ chromatyna otaczająca miejsce integracji istotnie wpływa na ekspresję genów w takim układzie oraz występuje tendencja do wyciszania ekspresji [50]. W takiej sytuacji korzystne jest użycie systemu do klonowania BAC, ponieważ jest on mniej wrażliwy na stopień upakowania i aktywności chromatyny otaczającej miejsce integracji [3].

2.3.4. Produkcja insuliny

Pierwszym białkiem z organizmu ssaków produkowanym w komórkach bakteryjnych dzięki wykorzystaniu techniki rekombinacji DNA była ludzka insulina [17, 34]. Ludzka insulina jest bardzo ważnym lekiem dla pacjentów chorych na cukrzycę. Insulina produkowana jest przez komórki β wyspy Langerhansa. Bodźcem do jej produkcji jest zwiększone stężenie glukozy we krwi (np. po spożyciu posiłku). Insulina wpływa na komórki efektorowe – miocyty, adipocyty, hepatocyty, przez co zwiększa się transport glukozy do wnętrza komórek i jednocześnie obniża poziom glukozy we krwi. Niedobór insuliny u chorych na cukrzycę powoduje zaburzenia gospodarki węglowodanowej. Zastosowanie w leczeniu chorych ludzkiej insuliny ma znaczną przewagę nad stosowaniem insuliny zwierzęcej (uzyskiwanej od cieląt bądź świń). Insulina zwierzęca wprawdzie nieznacznie różni się od insuliny produkowanej w organizmie ludzkim, ale jej podawanie może powodować u pacjenta produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko insulinie zwierzęcej. W ten sposób działanie takiej insuliny byłoby obniżone oraz mogłoby powodować stan zapalny. Ludzka insulina produkowana w bakteriach jest identyczna do tej, która jest produkowana w organizmie człowieka. Jest więc dużo lepiej tolerowana przez pacjenta.

Prace nad otrzymaniem preparatu ludzkiej insuliny zostały podjęte już w 1978 roku przez współpracujące ze sobą firmy Eli Lilly i Genentech. Fragmenty DNA kodujące łańcuch A i B insuliny zostały oddzielnie wklonowane do plazmidu pBR322 i umieszczone w fuzji z genem β -galaktozydazy [21]. Pierwszym preparatem zawierającym ludzką insulinę dostępnym dla pacjentów był lek lispro, który na rynku ukazał się w 1996 roku. Nadal jednak opracowywane są leki, które mają coraz lepsze właściwości takie jak większa stabilność, mniejsza zmienność, tworzone są analogi o krótkim bądź długim działaniu. Ma to na celu jak najlepsze dostosowanie indywidualnej terapii do pacjenta [46].

2.3.5. Produkcja szczepionek nowej generacji

Jednym z nowoczesnych i bardzo ważnych zastosowań wektorów bakteryjnych jest ich wykorzystanie do produkcji szczepionek nowej generacji. Obecnie nadal znakomitą większość szczepionek, które są sto-

sowane zarówno w medycynie jak i w weterynarii stanowią szczepionki tradycyjne, skonstruowane w oparciu o wykorzystywanie atenuowanych lub zabitych mikroorganizmów albo oczyszczonych toksyn bakteryjnych [37]. Konstruowane są one na ogół poprzez pasażowanie mikroorganizmów patogennych na podłożach stwarzających nieoptymalne warunki wzrostu, bądź przez poddawanie ich mutagenzie chemicznej lub fizycznej. Mutacje powstające w ten sposób w genomie są przypadkowe i zawsze istnieje pewne ryzyko rewersji szczepu do pełnej zjadliwości. Wykorzystanie metod rekombinacji DNA pozwala na wprowadzanie ściśle zdefiniowanych mutacji, co znacznie zmniejsza szansę rewersji szczepu do typu wirulentnego [33].

Nowe strategie tworzenia szczepionek polegają na wykorzystaniu mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie, rekombinowanych białek oraz stosowaniu zarówno wektorów bakteryjnych jak i wirusowych. Dzięki temu staje się możliwe projektowanie szczepionek, które zapewniają wyższą efektywność oraz bezpieczeństwo dla pacjenta [22], a ponadto znacznie redukują koszty [9]. Istotnymi zaletami szczepionek nowej generacji jest zwiększona immunogenność, łatwość przechowywania i podawania, brak konieczności stosowania adiuwantów, możliwość indukcji konkretnego typu odpowiedzi, możliwość immunizacji wieloma antygenami równocześnie i teoretyczna możliwość prezentacji antygenów w natywnej postaci [33].

Bardzo ważnym etapem przy konstrukcji szczepionek jest wybór sposobu umieszczenia heterologicznych genów w komórkach nośnika. Można wykorzystać tu plazmidy, które po dostarczeniu do komórki docelowej będą występowały w cytoplazmie w różnej ilości kopii. Zaletą takiego podejścia jest możliwość, w zależności od liczby kopii plazmidu, sterowania ilością produktu obcego genu. Wadą natomiast to, że plazmidy w warunkach *in vivo* bez presji selekcyjnej nie są stabilnie utrzymywane. Aby ominąć ten problem można zaopatrzyć wektory w geny metabolizmu podstawowego, które komplementują chromosomalne delecje w analogicznych genach. Alternatywnym podejściem jest zastosowanie wektorów, które pozwalają na insercję obcego genu do chromosomu szczepu nośnikowego (co jednocześnie eliminuje problem niestabilności plazmidu). Niestety często zdarza się, że ilość powstającego produktu może być niewystarczająca do indukcji odpowiednio silnej odpowiedzi immunologicznej. Ekspresja obcych genów na ogół kontrolowana jest przez promotory szczepu nośnikowego. Jeśli jest zbyt silna to duża ilość powstającego produktu obcego genu w komórce może być dla niej toksyczna. Z tego względu zostały rozwinięte systemy zawierające promotory, które mogą być aktyw-

wane *in vivo*, dopiero gdy mikroorganizm nośnikowy dotrze do konkretnej niszy ekologicznej gospodarza. Wówczas, nawet jeśli powstanie zabójcza ilość heterologicznego antygeny dla komórki nośnikowej, nie zostanie zaburzona indukcja właściwej odpowiedzi immunologicznej [33].

W celu dostarczenia heterologicznego antygeny do komórek eukariotycznych nie wystarczy jednak sam wektor bakteryjny w postaci plazmidu, potrzebny jest jeszcze jeden wektor, którym jest najczęściej zrekombinowany szczep bakteryjny, pozwalający na dostarczenie plazmidu do cytoplazmy komórki. Szczepem nośnikowym może być prawdopodobnie każdy scharakteryzowany patogen, którego biologia jest dostatecznie dobrze poznana. Wśród szczepów nośnikowych wyróżnia się głównie bakterie należące do gatunków *Mycobacterium bovis* i *Salmonella enterica* oraz rodzajów: *Vibrio*, *Shigella*, *Listeria* [33].

Mikroorganizmem nośnikowym o interesujących właściwościach, które mogą być wykorzystane do konstrukcji szczepionki, jest *L. monocytogenes*. Bakteria ta to Gram-dodatnia pałeczka, która jest fakultatywnie wewnątrzkomórkowym patogenem zdolnym do wnikania, przeżywania oraz namnażania się w komórkach eukariotycznych. Ma ona dość unikalny cykl życiowy, a jej głównym czynnikiem wirulencji jest listeriolizyna O (LLO). LLO kodowana przez gen *hly*, jest pozakomórkowo wydzielaną hemolizyną. Powoduje ona zniszczenie błony fagolizosomu i pozwala bakterii na wydostanie się do cytoplazmy [16]. Przy konstruowaniu szczepionek wykorzystuje się atenuowane delecyjnie szczepy *Listeria*, które są niezdolne do rozprzestrzeniania międzykomórkowego. Poza tym rozwijane są systemy oparte na wykorzystaniu rekombinowanych szczepów, takich jak *E. coli*, *B. subtilis*, *Mycobacterium bovis* i *Salmonella Typhimurium* niosących gen *hly* z *Listeria* [16]. *Listeria* w trakcie infekcji atakuje komórki prezentujące antygen – APC antigen presenting cells. W ten sposób *Listeria* może wywierać bardzo duży efekt na odpowiedź immunologiczną i jest przez to bardzo wygodnym narzędziem przy produkcji szczepionek. Indukowana przez infekcję *L. monocytogenes* odpowiedź immunologiczna obejmuje aktywację neutrofilów, makrofagów, komórek NK, limfocytów CD4⁺, limfocytów CD8⁺ oraz produkcję wielu cytokin [18].

L. monocytogenes może być również wykorzystana w produkcji szczepionek przeciwnowotworowych. Próbę jej skonstruowania podjęła między innymi firma advaxis w celu uzyskania szczepionki przeciwko rakowi szyjki macicy, wywoływanemu przez wirus HPV (*Human Papilloma Virus*) (preparat Lovaxin C, obecnie w fazie testów klinicznych). W bakterii został umieszczony plazmid zawierający gen kodujący wybrany antygen komórki rakowej [51].

2.4. Wektory niosące geny reporterowe

Geny reporterowe to geny kodujące białka, których obecność można w łatwy sposób zbadać w komórce. Metodami inżynierii genetycznej tworzy się ich fuzje z genami bądź promotorami genów, których aktywność jest obiektem zainteresowań. Całość umieszcza się na wektorze ekspresyjnym. Pozwoli on na wyrażenie białka kodowanego przez gen reporterowy w danym układzie. Istnieje wiele różnych genów reporterowych, których aktywność bada się metodami autoradiograficznymi, spektrofotometrycznymi, bio- i chemoluminescencyjnymi. Najczęściej używanymi genami są β -galaktozydaza, acetylotransferaza chloramfenikolu, lucyferaza, β -glukoronidaza, oraz zielone białko fluorescencyjne (GFP) [20].

Geny reporterowe są ważnym narzędziem używanym w medycynie na przykład w celu badania zmian na poziomie komórkowym lub molekularnym związanych z chorobami nowotworowymi w zwierzętach modelowych *in vivo*. Pomagają one w zrozumieniu mechanizmów chorób nowotworowych oraz rozwijaniu efektywnych terapii [6].

Białka fluorescencyjne. Białka fluorescencyjne umożliwiają obserwację ekspresji genów przyżyciowo, np. w organizmie myszy. Coraz częściej dąży się do prowadzenia obserwacji na zwierzętach multireporterowych, w których umieszcza się kilka genów reporterowych w jednym locus. Wtedy bardzo przydatne okazują się wektory typu BAC, ze względu na ich dużą wielkość, która pozwala na bliższą prawdzie obserwację endogennej ekspresji genów. Jako przykłady tego typu wektorów mogą służyć m.in. wektory GM i SP opisane w pracy Maye'a [27], służące do obserwacji ekspresji genów w organizmach myszy: *Trap* (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) w osteoklastach, *Dmp1* (Dentin Matrix Protein-1) i *Ibsp* (Integrin Binding Sialoprotein) w osteocytach i osteoblastach [27].

Najczęściej wykorzystywanym białkiem fluorescencyjnym w badaniach biologicznych jest zielone białko fluorescencyjne – GFP wyizolowane z organizmu meduzy *Aequorea victoria*. Ze względu na swoje właściwości, takie jak stabilność oraz to, że jego chromofor powstaje w wyniku autokatalitycznej cyklizacji aminokwasów, która wymaga jedynie obecności tlenu, jest ono wyjątkowo użyteczne. Białko GFP jest często wykorzystywane między innymi do analizy lokalizacji białek obecnych w żywych komórkach, wzajemnych interakcji białek oraz jako gen reporterowy w monitorowaniu wzoru i poziomu ekspresji genów [4, 5].

Jak dotąd stworzono wiele mutantów białka GFP na przykład: o zwiększonej fluorescencji, emitujących światło o innej długości fali niż dzikie białko GFP, systemy te umożliwiają obserwację nawet do 3 białek na

raz w komórce. Jednak są one tworzone głównie do badań na dużych komórkach eukariotycznych i nie nadają się do użycia w komórkach mikroorganizmów, ze względu na zbyt małą jasność białek GFP w tych komórkach. Aby prowadzić obserwację jednocześnie dwóch białek w komórkach mikroorganizmów potrzeba systemów z wysokofluorescencyjnym białkiem GFP. Seria tego typu systemów została opisana w pracy Lewis'a [23]. Wektory te pozwalają na tworzenie zarówno N- jak i C-końcowych fuzji genów badanych białek z genami reporterowymi *gfpmut1* oraz *gfpuv*. Opisane białka reporterowe mogą być też umiejscowione w tej samej komórce, ponieważ mają różne widma wzbudzenia [23].

3. Podsumowanie

W dzisiejszych czasach rozwój nauki i postęp techniki następuje bardzo szybko. Wiedza genetyczna, posiadana przez nas jak i dostępne technologie pozwalają osiągać cele, które kiedyś były niemożliwymi do realizacji. Wykorzystanie praktyczne badań z takich dziedzin naukowych jak inżynieria genetyczna i biotechnologia spowodowało rozwój przemysłu biotechnologicznego oraz postęp w medycynie. Nic więc dziwnego, że biotechnologia jest obecnie bardzo dynamicznie rozwijającą się dziedziną gospodarki XXI wieku.

Wektory bakteryjne są ważnymi narzędziami biotechnologii, pozwalającymi na wiele istotnych zastosowań. Wykorzystywane są na różnych etapach pracy w laboratorium. Ich najbardziej podstawowym użyciem jest wykorzystanie jako wektorów do klonowania. Stosowanie wektorów pozwala na tworzenie bibliotek genowych różnych organizmów, a w konsekwencji ułatwiło i nadal ułatwia poznanie genomów wielu organizmów jak i przeszukiwanie bibliotek genowych pod kątem znalezienia odpowiednich genów. Wektory bakteryjne są kluczowym narzędziem przy przenoszeniu DNA między różnymi organizmami. Taki transfer genów pozwala na produkcję różnego rodzaju białek w organizmach, które naturalnie ich nie wytwarzają. Godne podkreślenia są przede wszystkim białka o znaczeniu terapeutycznym wykorzystywane w medycynie. Nie bez znaczenia jest też wpływ wektorów bakteryjnych na postęp w przemyśle biotechnologicznym. W laboratorium wektory są również często wykorzystywane przy prowadzeniu wielu rodzajów badań, a bardzo ważnym ich zastosowaniem jest niesienie genów reporterowych umożliwiających obserwację procesów zachodzących w różnych organizmach. Wektory są także wygodnymi systemami kierującymi ekspresją badanych genów. Pozwalają one na utrzymywanie ekspresji na minimalnym poziomie w stanie represji, jednocześnie umożliwiając szybką i prostą indukcję ekspresji genu.

Należy podkreślić, że wektory bakteryjne ułatwiają bardzo wiele aspektów pracy biotechnologa i wiele technik wykorzystywanych w laboratoriach biologicznych na całym świecie, które bez użycia wektorów bakteryjnych nie byłyby możliwe do zastosowania.

Piśmiennictwo

- Baneyx F.: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411–421 (1999)
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: *Biochemia*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2005, s.143, s. 144, s. 152–155
- Blaas L., Musteanu M., Eferl R., Bauer A., Casanova E.: Bacterial artificial chromosomes improve recombinant protein production in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* **9**, 3 (2009)
- Brewczyński K., Fronk J.: Wykorzystanie zielonego białka fluorescencyjnego GFP w badaniach biologicznych. *Post. Biol. Kom.* **31**, 421–440 (2004)
- Brewczyński K., Fronk J.: Zielone białko fluorescencyjne GFP – struktura i właściwości. *Post. Biol. Kom.* **31**, 399–419 (2004)
- Contag C.H., Jenkins D., Contag P.R., Negrin R.S.: Use of Reporter Genes for Optical Measurements of Neoplastic Disease *In vivo*. *Neoplasia*, **2**, 41–52 (2000)
- Dietrich G., Bubert A., Gentshev I., Sokolovic Z., Simm A., Catic A., Kaufmann S.H., Hess J., Szalay A.A., Goebel W.: Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat. Biotechnol.* **18**, 181–185 (1998)
- Dietrich G., Viret J.F., Gentshev I.: Haemolysin A and listeriolysin – two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity. *Int. J. Parasitol.* **33**, 495–505 (2003)
- Ferreira L.C., Ferreira R.C., Schumann W.: *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *An. Acad. Bras. Cienc.* **77**, 113–124 (2005)
- Glick B.R., Pasternak J.J.: *Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. American Society for Microbiology, Washington, 2003, s. 58
- Grillot-Courvalin C., Goussard S., Courvalin P.: Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* **4**, 177–186 (2002)
- Gryczan T.J., Contente S., Dubnau D.: Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **134**, 318–329 (1978)
- Hanning G., Makrides S.C.: Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **16**, 54–60 (1998)
- Higgins D.E., Shastri N., Portnoy D.A.: Delivery of protein to the cytosol of macrophages using *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **31**, 1631–1641 (1999)
- Hoffman R.M., Yang M.: Dual-color, whole-body imaging in mice. *Nat. Biotechnol.* **23**, 790 (2005)
- Jagielski T., Osińska O.A., Bielecki J.: Molekularne determinanty wirulencji *Listeria monocytogenes*. *Post. Mikrobiol.* **45**, 303–313 (2006)
- Johnson I.S.: Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*, **219**, 632–637 (1983)
- Kaufmann S.H.: Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 129–163 (1993)
- Keggins K.M., Lovett P.S., Duvall E.J.: Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1423–1427 (1978)
- Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A.: *Concepts of genetics*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2006 s. 8, s. 460–461
- Ladisch M.R., Kohlmann K.L.: Recombinant Human Insulin. *Biotechnol. Prog.* **8**, 469–479 (1992)
- Leclerc C.: New technologies for vaccine development. *Med. Sci. (Paris)*, **23**, 386–390 (2007)
- Lewis P.J., Marston A.L.: GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene*, **227**, 101–109 (1999)
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (red.): *Mikrobiologia techniczna*. Tom 1. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2008, s. 317, s. 329
- Madigan M.T., Martinko J.M., Brock T.D.: *Brock Biology of microorganisms*. Pearson Prentice Hall, San Francisco, USA, 2006, s. 975, s. 977–978
- Makrides S.C.: Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**, 512–538 (1996)
- Maye P., Stover M.L., Liu Y., Rowe D.W., Gong S., Lichtler A.C.: A BAC-bacterial recombination method to generate physically linked multiple gene reporter DNA constructs. *BMC Biotechnol.* **9**, 20 (2009)
- Miles J.S., Wolf C.R.: Principles of DNA cloning. *BMJ*, **299**, 1019–1022 (1989)
- Mülhardt C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009, s. 93
- Nguyen H.D., Nguyen Q.A., Ferreira R.C., Ferreira L.C., Tran L.T., Schumann W.: Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid*, **54**, 241–248 (2005)
- Nuc P., Nuc K.: Produkcja rekombinowanych białek w *Escherichia coli*. *Post. Biochem.* **52**, 448–456 (2006)
- Pasternak J.J.: *An introduction to Human Molecular Genetics: Mechanisms of Inherited Diseases*. Wiley-Liss, New Jersey, 2005, s. 116–119
- Pawelec D.P., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Atenuowane szczepy *Salmonella enterica* – nośniki heterologicznych antygenów. *Post. Mikrobiol.* **39**, 133–154 (2000)
- Petrides D., Sapidou E., Calandranis J.: Computer-aided process analysis and economic evaluation for biosynthetic human insulin production – A case study. *Biotechnol. Bioengineering*, **48**, 529–541 (2004)
- Poole E.S., Brown C.M., Tate W.P.: The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of *in vivo* translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**, 151–158 (1995)
- Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D.S., Lin S.W., Dunn J.J., Studier F.W.: Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**, 125–135 (1987)
- Roth J.A., Henderson L.M.: New technology for improved vaccine safety and efficacy. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **17**, 585–597 (2001)
- Schumann W., Ferreira L.C.: Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet. Mol. Biol.* **27**, 442–453 (2004)
- Sęktas M.: Ekspresja genów klonowanych w wektorach plazmidowych w zrekombinowanych szczepach *Escherichia coli*. *Kosmos*, **51**, 365–373 (2002)
- Shizuya H., Kouros-Mehr H.: The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J. Med.* **50**, 26–30 (2001)
- Spreng S., Dietrich G., Niewiesk S., ter Meulen V., Gentshev I., Goebel W.: Novel bacterial systems for the delivery of recombinant protein or DNA. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 299–304 (2000)

42. Staroń A., Grabowska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych, heterologicznych białek w komórkach *Escherichia coli*. *Post. Mikrobiol.* **47**, 83–95 (2008)
 43. Studier F.W., Moffat B.A.: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130. (1986)
 44. Terpe K., Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523–533 (2003)
 45. Terpe K.: Protein-Affinität-Tags. *Biospektrum (Heidelb.)*, **4**, 389–391 (2007)
 46. Vajo Z., Fawcett J., Duckworth W.C.: Recombinant DNA Technology in the Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. *Endocr. Rev.* **22**, 706–717 (2001)
 47. Waugh D.S.: Making the most of affinity tags. *Trends. Biotechnol.* **23**, 316–320 (2005)
 48. Węgleński P.: Genetyka molekularna. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2007, s. 110, s. 116, s. 119
 49. Winter P.C., Hickey G.I., Fletcher H.L.: Genetyka. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2004, s. 404
 50. Wurm F.M.: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1393–1398 (2004)
- Źródła internetowe:
51. http://www.advaxis.com/page/technology-how_advaxis_uses_list.html strona internetowa firmy Advaxis, (01.2011)
 52. <http://www.emdchemicals.com/life-science-research> strona internetowa firmy Novagen, (01.2011)
 53. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/PCR-cloning/PCRC-Misc/The-Technology-Behind-TOPO-Cloning.html> strona internetowa firmy Invitrogen, (01.2011)
 54. <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Novagen/C183-000.pdf> strona internetowa firmy Novagen, pET System manual (01.2011)
 55. <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Novagen/C183-002.pdf> strona internetowa firmy Novagen, Protein expression, pET System tutorial (01.2011)
 56. http://www.promega.com/pnotes/58/5189g/5189g_core.pdf strona internetowa firmy Promega, The pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Promega Notes Magazine 58, 36 (1996), (01.2011)
 57. http://www1.qiagen.com:80/hb/qiagenpcrcloningkit_en strona internetowa firmy Qiagen, Qiagen PCR Cloning Handbook, (01.2011)
 58. <http://www1.qiagen.com/literature/qiagennews/0100/0100pro2.pdf> strona internetowa firmy Qiagen, (01.2011)