

STANISŁAW WINIARCZYK, ZBIGNIEW GRĄDZKI, ROBERT PANEK

# Oligonukleotydy antysensowne i perspektywy ich zastosowania w terapii przeciwwirusowej

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Podstawowym elementem strukturalnym żywych organizmów jest komórka, której budowa w całym świecie ożywionym jest podobna. We wnętrzu każdej komórki zawarta jest substancja dziedziczna określająca jej podstawowe cechy strukturalne i funkcjonalne. Chemiczną podstawą dziedziczności jest cząsteczka polimeru deoksyrybonukleotydów (DNA) lub rybonukleotydów (RNA). Informacja genetyczna dotycząca cech strukturalnych i funkcjonalnych komórki jest zakodowana w ściśle określonej sekwencji nukleotydów i zorganizowana jest w podstawowych jednostkach zwanych genami. Dzięki zdolności kwasów nukleinowych do samoodtworzenia się geny zachowują swoją stałość i mogą być przekazywane w niezmienionej postaci następnym pokoleniom. Każda zmiana w budowie chemicznej, czyli mutacja, powoduje powstanie nowego allelu genu, a w niektórych przypadkach zmianę jakościową cechy przez niego kodowanej. Geny określają klasy kwasów rybonukleinowych, właściwości regulacyjne innych genów oraz strukturę białek, w tym białek enzymatycznych, które są katalizatorami reakcji biochemicznych zachodzących w żywych organizmach. W ten sposób geny wpływają na przemianę materii i regulują pośrednio procesy wzrostu i różnicowania się organizmów żywych determinując wszelkie ich właściwości. Odszyfrowanie informacji genetycznej zawartej w genie, prowadzące do ujawnienia się zakodowanej w nim cechy organizmu czy komórki określamy mianem jego ekspresji. W ogólnej strukturze genu wyróżnia się część regulatorową, która decyduje o intensywności ekspresji danego genu oraz część kodującą, która wyznacza sekwencję aminokwasów odpowiedniego białka. W pierwszym etapie ekspresji genu zwanym transkrypcją, informacja genetyczna zawarta w jego strukturze DNA jest przepisywana w komplementarne cząsteczki informacyjnego RNA (mRNA). Gen ulega transkrypcji gdy do jego części regulatorowej przyłączą się specyficzne białka zwane czynnikami transkrypcyjnymi. Powstały kompleks kwasowo-białkowy jest sygnałem dla polimerazy RNA, która łącząc się z kodującą częścią genu syntetyzuje cząsteczki mRNA. W drugim etapie translacji, rybosomy przesuwające się wzdłuż transkryptów mRNA budują przy współdziałaniu

transferowych kwasów nukleinowych (tRNA) łańcuchy białkowe. Właściwy poziom ekspresji genów regulowany jest przez wiele czynników działających w systemach sprzężeń zwrotnych. Zaburzenia tych procesów na którymkolwiek etapie wpływają negatywnie na pojawianie się końcowego, w pełni funkcjonalnego produktu białkowego, co może być przyczyną patologicznych zmian w strukturze lub funkcji komórki. Przykładem mogą służyć protoonkogeny, które w komórkach normalnych są zaangażowane w regulację procesów wzrostu i różnicowania, natomiast w komórkach nowotworowych ulegają nadmiernej ekspresji i są odpowiedzialne za podstawowe cechy fenotypowe transformacji nowotworowej (3).

Jacob i Monod – twórcy teorii modelu operonu nie sprecyzowali jednoznacznie natury czynników regulujących ekspresję genów tworzących operon. Elementami włączającymi i wyłączającymi poszczególne geny mogą być zarówno cząsteczki białkowe jak i RNA. Jednym z wielu opisanych mechanizmów regulujących ekspresję genów u prokariotów jest wytwarzanie micRNA (mRNA interfering complementary RNA), który również określa się mianem anty-sens RNA. Sekwencja cząsteczki tego RNA jest komplementarna do mRNA regulowanego genu. Powstające cząsteczki dwuniciowe (dupleksy) pomiędzy wymienionymi cząsteczkami RNA mogą hamować ekspresję danego genu na poziomie jego transkrypcji lub translacji (8).

Wiedza o genetycznych mechanizmach regulacyjnych tego typu, swoistości parowania zasad purynowych i pirymidynowych połączona z technicznymi możliwościami chemicznej syntezy oligonukleotydów (krótkie odcinki kwasów nukleinowych) i ich analogów stworzyły perspektywę dla rozpoczęcia badań nad opracowaniem nowych sposobów terapii przeciwwirusowej. Wirusy to patogeny, które wnikają do wrażliwych komórek i namnażając się w ich wnętrzu niszczą je lub zmieniają patologicznie. Wykorzystywanie przez wirusy do swego namnażania aparatu transkrypcyjnego i translacyjnego zaatakowanej komórki było do tej pory zasadniczą przyczyną niezadowalających rezultatów prac nad lekami przeciwwirusowymi. Likwidacja zakażenia wirusowego metodami tradycyjnej chemote-

rapii wiąże się ze zniszczeniem zaatakowanej komórki. Z tego względu wszystkie dotychczas wprowadzone preparaty cechowały się małą swoistością i były wymierzone we wszystkie wrażliwe na infekcję wirusową komórki. Kryterium określającym przydatność kliniczną tych środków jest stopień różnicy wrażliwości komórek zdrowych i zaatakowanych na niekorzystny wpływ zastosowanego preparatu. Szczególnym problemem są zakażenia utajone, w których genom wirusa wbudowany jest do genomu komórki, nie działa chorobotwórczo i jest powielany wraz z podziałami komórki. Klasycznym i stosunkowo najlepiej poznanym przykładem są stany utajenia wywoływane przez herpeswirusy. Zmiany chorobowe skóry lub błon śluzowych wywołane aktywnym namnażaniem się tych wirusów w komórkach epitelialnych mogą być wyleczone poprzez zastosowanie acyklowiru, leku należącego do najnowszej generacji analogów nukleozydowych o relatywnie niewielkim szkodliwym działaniu na komórki niezakażone (1). Preparat ten selektywnie aktywowany na drodze fosforylacji przez wirusową kinazę tymidynową obecną w komórkach zakażonych hamuje zwrotnie replikację DNA herpeswirusa. Acyklowir nie jest natomiast substratem dla kinaz komórkowych. Tak dzieje się podczas objawowej, litycznej infekcji. Natomiast w stanie zakażenia latentnego DNA herpeswirusa nie replikuje i gen kinazy wirusowej nie ulega ekspresji. Obecny w tych komórkach i niefosforylowany przez kinazę acyklowir pozostaje nieaktywny, a prowirus wbudowany w genom komórki gospodarza stanowi rezerwuuar, z którego przy sprzyjających okolicznościach dochodzi do nawrotu zakażenia wrażliwych komórek epitelialnych (4). Obecnie istnieje coraz bardziej ugruntowane przekonanie, że odnalezienie „magicznej kuli” zdolnej do przezwyciężenia tych chorób bez wywoływania skutków ubocznych uzależnione jest od poznania molekularnych cech wirusa i komórki oraz ich wzajemnych interakcji. Znaczenie i potrzebę poszukiwania nowych preparatów przeciwwirusowych zwiększa dodatkowo fakt, że występujące wśród niektórych grup wirusów duże zróżnicowanie serotypowe, zmienność i zmienna skuteczność immunizacji wykluczają lub w istotny sposób ograniczają masowe stosowanie szczepień.

Duże nadzieje wiąże się z celowanym blokowaniem ekspresji genów w oparciu o wykorzystanie strategii antysensów (13, 14). Zakłada ona wybiórcze zahamowanie ekspresji genu za pomocą krótkich, syntetycznych fragmentów kwasów nukleinowych, które mogą swoiście hybrydyzować (łączyć się) do komplementarnej sekwencji znajdującej się w chromosomalnym DNA genu lub w cząsteczkach mRNA kodowanych przez ten gen. Jeżeli produkt ekspresji tego genu jest niezbędnym czynnikiem wzrostu komórki lub wewnątrzkomórkowej replikacji wirusa to zaburzenie jego syntezy przez wy-

mienione fragmenty kwasów nukleinowych spowoduje zwolnienie lub całkowite zahamowanie tych procesów. W ten sposób można uzyskać wygaszenie proliferacji nowotworowej lub likwidację zakażenia wirusowego. Pojęcie sensu w biologii molekularnej określone jest przez sekwencję nukleotydów jednoniciowej cząsteczki mRNA przepisanej z genomowego kwasu nukleinowego, która odpowiada kolejności aminokwasów w cząsteczce białka powstającego po jej translacji na rybosomach. Komplementarne do mRNA nici, mające zdolność wiązania się z nim, będą zatem cząsteczkami antysensownymi.

Antysensowne oligonukleotydy (asODN) o długości 10-30 nukleotydów, syntetyzowane chemicznie znalazły zastosowanie jako związki selektywnie blokujące ekspresję genów. Jednoniciowe asODN w odpowiednich warunkach przyłączają się swoiście do komplementarnej sekwencji dwuniciowego DNA tworząc potrójną helisę (ang. triple helix, TH). Powstanie takiej struktury w miejscu wiązania czynników transkrypcyjnych powoduje zahamowanie inicjacji transkrypcji (16). Ponieważ warunkiem niezbędnym utworzenia potrójnej spirali jest konieczność występowania w obrębie genu, którego ekspresję chcemy wyłączyć, odpowiednio długiego odcinka złożonego tylko z zasad purynowych lub pirymidynowych, strategia ta może zostać zastosowana tylko w przypadku nielicznych genów. W najczęściej stosowanej odmianie wykorzystania strategii antysensów dochodzi do wyłączenia ekspresji genu na poziomie cząsteczki mRNA. Syntetyczny oligomer antysensowny po wnikięciu do komórki może swoiście hybrydyzować do komplementarnej sekwencji sensu w cząsteczce mRNA i blokować jej translację na odpowiedni łańcuch polipeptydowy. Oligomer antysensowny wywiera swoje działanie współzawodnicząc z naturalnymi czynnikami biorącymi udział w translacji i rybosomami o miejsce wiązania na cząsteczce mRNA lub aktywuje RNazę H, enzym hydrolizujący tylko nić RNA w utworzonej cząsteczce RNA-asODN (dupleks). Oznacza to, że uwolniony w ten sposób oligonukleotyd antysensowny może cyklicznie wchodzić w kolejne reakcje z docelowymi molekułami docelowego RNA (tzw. tarczy) (17).

Terapeutyczne wykorzystanie oligomerów antysensownych uwarunkowane jest kilkoma kryteriami. Cząsteczki tych związków muszą łatwo przenikać przez błonę komórkową, być stabilne chemicznie, osiągać we wnętrzu komórki stężenie terapeutyczne utrzymujące się odpowiednio długo w czasie, hybrydyzować swoiście do sekwencji tarczy. Oligomery antysensowne są polianionami, które wnikają do komórek w wyniku pinocytozy lub endocytozy zależnej od receptorów. Najskuteczniejsze oddziaływanie antysensownych oligonukleotydów obserwuje się po zastosowaniu technik zwią-

szających przenikalność oligomerów przez błony komórkowe. Spośród wielu substancji łączonych z oligomerami antysensownymi w celu zwiększenia ich dokomórkowego transportu, ostatnio zwraca się szczególną uwagę na liposomy kationowe oraz ich połączenia z peptydami wirusowymi, które są wykorzystywane przez te patogeny podczas wnikania do komórek. W badaniach przeprowadzonych na liniach komórkowych wykazano wydatny wzrost hamowania pojawiania się dużego antygeny T wirusa SV40 przez minimalne koncentracje oligomerów w obecności liposomów. W podobnie przeprowadzonych doświadczeniach uzyskano również wysoką efektywność oligomerów komplementarnych do transkryptów env wirusa HIV (ang. human immunodeficiency virus) (19). Oligomery ze szkieletem fosforanowo-cukrowym syntetyzowane na wzór naturalnie występujących polimerów nukleotydowych są wrażliwe na atak enzymów nukleolitycznych obecnych w tkankach i płynach ustrojowych. Modyfikacja mostka fosfodwuestrowego pomiędzy sąsiadującymi nukleotydami wzmacnia oporność polimeru na endonukleazy. Najczęściej dokonuje się podstawienia jednego z atomów tlenu mostka atomem siarki lub resztą metylową uzyskując w ten sposób pochodne fosfortiolowe i metylofosfonianowe. Przyłączenie do końcowych nukleotydów związków blokujących działanie egzonukleaz np. akrydyny zapobiega degradacji oligomerów od ich końcowych nukleotydów poprzez 3' i 5' egzonukleazy. Zmiany przestrzenne dotyczą wiązania glikozylowego, w którym formę  $\beta$  zmienia się na  $\alpha$ . Oligomery antysensowne rozpoznające specyficznie docelowe sekwencje DNA mogą służyć jako nośniki aktywnych związków. Sprzężenie asODN np. z fenantroliną lub EDTA-Fe powoduje przecięcie DNA w miejscu przyłączenia się asODN (11, 15).

Dużym zainteresowaniem wśród związków zdolnych do rozpoznawania sekwencji DNA cieszą się peptydowe kwasy nukleinowe (PNA). Są one strukturalnymi i funkcjonalnymi analogami kwasów nukleinowych (21). Zasady azotowe wchodzące w skład ich cząsteczek przyłączone są do rdzenia poliamidowego, który jest odpowiednikiem szkieletu fosfocukrowego kwasów nukleinowych. Dzięki obecności zasad azotowych w budowie PNA, posiadają one właściwość komplementarnego wiązania się z DNA i RNA. Modyfikacje podstawowej struktury PNA umożliwiają modelowanie takich ich właściwości jak specyficzność i siłę wiązania, zdolność do penetracji do wnętrza komórki, rozpuszczalność, stopień oporności na peptydazy, rozpoznawanie różnych form przestrzennych DNA, sztywność, hydrofobowość oraz ładunek elektryczny. Zasadniczą i unikatową cechą PNA jest duża stabilność kompleksów PNA-DNA w porównaniu do ich odpowiedników DNA-DNA i DNA-RNA. W środowisku o fizjologicznej sile jonowej duplek-

sy PNA-DNA i PNA-RNA są stabilniejsze niż odpowiadające im dupleksy DNA-DNA i DNA-RNA. Decyduje to o dużej swoistości PNA, która wyraża się wyższą zdolnością rozróżniania niedopasowania sekwencji cząsteczek hybrydowych PNA-DNA w odniesieniu do odpowiadających im cząsteczek DNA-DNA i DNA-RNA (10). Miejsce oddziaływania asODN, czyli wybór optymalnej sekwencji docelowej – tarczy mRNA należy do naistotniejszych elementów decydujących o skuteczności oddziaływania asODN. Dobre wyniki uzyskiwano z oligomerami skierowanymi przeciwko regionom inicjującym transkrypcję mRNA, translację, sekwencjom uczestniczącym w składaniu mRNA i rejonom nieulegającym translacji. Wyboru najbardziej optymalnej sekwencji docelowej w większości przypadków dokonuje się metodą prób i błędów spośród puli wielu asODN skierowanych przeciwko różnym rejonom tej samej cząsteczki mRNA.

Bardzo interesujące wyniki uzyskuje się w badaniach nad przeciwwirusowym działaniem rybozymów, które są specyficznie zbudowanymi cząsteczkami RNA mającymi zdolność nie tylko swobodnego łączenia się z docelowymi cząsteczkami RNA tarczy według reguły komplementarności zasad purynowych i pirymidynowych ale również hydrolizowania ich wiązań fosfodwuestrowych. Uproszczony mechanizm katalitycznego działania rybozymu przedstawia się następująco: po związaniu się antysensownej sekwencji rybozymu z komplementarną sekwencją tarczy RNA następuje wyznaczona miejscem wiązania hydroliza sekwencji tarczy RNA, a następnie dochodzi do uwalniania strawionych produktów i rybozymów, które wchodzi w kolejny cykl z inną cząsteczką RNA tarczy (12).

Wstępnym i zarazem podstawowym warunkiem terapeutycznego wykorzystania strategii antysensów jest swoistość działania oligomerów czy rybozymów, która uzależniona jest od ilości i długości sekwencji częściowo komplementarnych lecz nie identycznych z sekwencją docelowej cząsteczki RNA tarczy. W przypadku onkogenów różniących się od odpowiadających im protoonkogenów tylko jedną mutacją punktową nieswoiste wiązanie cząsteczki antysensownej przynoszące w efekcie niepożądany efekt nie może być w zupełności wykluczone. Problem selektywności rozpoznawania wirusowych sekwencji docelowych przez czynniki antysensowne ma odmienną naturę ze względu na rzadkie występowanie homologicznych sekwencji wirusowych w genomie komórki zaatakowanej. Tworzenie cząsteczek hybrydowych pomiędzy czynnikiem antysensownym, a wirusową sekwencją tarczy pomimo niedopasowania niektórych zasad nie jest elementem o niekorzystnym działaniu. Przeciwnie, wspomniana niepełna komplementarność umożliwia reagowanie jednej cząsteczki antysensownej z grupą spokrewnionych lecz nie identycznych wirusów różniących się np. serotypowo lub genotypowo.

Pierwsze próby hamowania ekspresji genów przy pomocy oligodeoksynukleotydów zostały wykonane w końcu lat siedemdziesiątych i dotyczyły wirusa mięsaka Rousa. Zamecnik i Stephenson wykazali, że antysensowny oligomer, komplementarny do końcowych fragmentów 35S RNA wirusa mięsaka Rousa, wprowadzony do hodowli fibroblastów zakażonych tym wirusem, wywołuje spadek aktywności wirusowej odwrotnej transkryptazy skorelowany ze zmniejszeniem transformacji nowotworowej komórek (20). Dynamiczny rozwój tych badań zaczął się jednak kilka lat później wraz z początkiem automatyzacji chemicznej syntezy DNA. Aktualnie najbardziej zaawansowane prace nad praktycznym zastosowaniem strategii antysensów w terapii przeciwwirusowej dotyczą zakażeń ludzi wirusem HIV-1. Antysensowne oligomery fosforotiolowe weszły już w końcowe fazy badań klinicznych. Natomiast rybozomy zostały już zaakceptowane w USA do wprowadzenia ich w I fazę badań klinicznych (12). W próbach przeprowadzonych na liniach komórek limfocytów zakażonych HIV-1 używano cząsteczek antysensownych wycelowanych w „tarczę”, którą stanowiła sekwencja regionu rev genomu tego wirusa. Wybór sekwencji rev podyktowany był jej wysoką konserwatywnością (brakiem zmienności) w obrębie wszystkich dotychczas wyizolowanych szczepów i faktem, że produkt białkowy tego genu jest niezbędnym czynnikiem umożliwiającym tworzenie się pełnych transkryptów genomu wirusa HIV. Wprowadzenie do hodowli komórek fosforotiolowych oligonukleotydów antysensownych hamowało efekt cytopatyczny i tworzenie się syncytiów. Podobne zmiany, świadczące o zahamowaniu replikacji wirusa, obserwowano po użyciu oligomerów skierowanych przeciwko genowi gag. Stwierdzony efekt inhibicyjny cyklu replikacyjnego wirusa był skutkiem nie tylko komplementarnego łączenia się oligomeru z sekwencją tarczy ale również wynikiem jego działania nieswoistego. Wśród przypuszczalnych mechanizmów leżących u podłoża tego zjawiska wymienia się hamowanie aktywności polimeraz biorących udział w powielaniu wirusowego genomu, blokowanie kontaktu wirionu z komórką poprzez wiązanie się z receptorami komórkowymi lub powierzchniowymi białkami wirusa i blokowanie procesów fosforylacyjnych. W każdym mRNA wirusa HIV-1 znajduje się sekwencja regulatorowa TAR, która wiążąc białko transaktywujące TAT przyczynia się do nasilenia transkrypcji RNA wirusowego. Wykazano, że anty-TAR-asODN utrudniają wiązanie się do tej sekwencji białka regulatorowego TAT i skutecznie hamują ekspresję genów wirusowych i replikację wirusa HIV-1 *in vivo* (9, 18). Cykl replikacyjny retrowirusów w zakażonej komórce wymaga przekształcenia ich jednoniciowego genomowego RNA w dwuniciowy komplementarny DNA (cDNA). Tej konwer-

sji dokonuje enzym wirusa – odwrotna transkryptaza. Zahamowanie syntezy cDNA zapobiega wbudowaniu genetycznej informacji wirusa do genomu gospodarza i przerywa cykl replikacyjny. Antysensowne oligomery niezmodyfikowane i fosforotiolowe hamują syntezę cDNA katalizowaną przez odwrotne transkryptazy wirusów AMV (ang. avian mieloblastoma virus) i HIV. Oligomery fosforotiolowe łączą się z odwrotną transkryptazą wirusa HIV i blokują jego rozwój w zakażonych *de novo* limfocytach. Jest to reakcja niezależna od sekwencji oligomeru i polega na preferencyjnym molekularnym łączeniu się tych oligomerów z enzymem wirusa HIV. Hamowanie aktywności odwrotnej transkryptazy może odbywać się przez komplementarne oddziaływanie niemodyfikowanych oligomerów antysensownych z matrycą wirusowego RNA w miejscu inicjacji transkrypcji lub poniżej tego miejsca. W pierwszym przypadku blokowane jest przyłączenie odwrotnej transkryptazy do RNA, a w drugim przesuwająca się po RNA wirusa odwrotna transkryptaza jest zatrzymywana przez strukturę (hybryda) utworzoną z połączenia jego RNA i oligomeru antysensownego. Oligomery niemodyfikowane indukują aktywność Rnazy H, która doprowadza do degradacji wirusowego RNA (2, 5).

Trwają próby selektywnego blokowania polimeraz herpeswirusowych i wirusa grypy (enzymy syntetyzujące nici kwasu nukleinowego). Wszystkie znane herpeswirusy indukują swoistą dla nich DNA polimerazę, która jest niezbędnym czynnikiem aktywnej replikacji wirusowego DNA w zakażonej komórce. Podobne znaczenie ma polimeraza RNA dla wirusa grypy. Nukleokapsyd herpeswirusa po wnikięciu do jądra zaatakowanej komórki ulega demontażowi i uwolniony genomowy DNA zostaje przepisany na trzy klasy cząsteczek mRNA ulegających przetłumaczeniu na również tyle samo rodzajów białek: bardzo wczesnych ( $\alpha$ ), wczesnych ( $\beta$ ) i późnych ( $\gamma$ ). Geny białek  $\alpha$  spełniają rolę regulatorów wzrostu i są transkrybowane pomiędzy drugą a czwartą godziną replikacji wirusa. Ich ekspresja jest niezbędnym warunkiem wejścia cyklu replikacyjnego wirusa w kolejną fazę. Oligomery antysensowne komplementarne do sekwencji genów kodujących białka  $\alpha$  blokują replikację herpeswirusa w hodowli komórek VERO (6).

Białko PB1 jest niezbędnym elementem transkrypcji i replikacji RNA wirusa grypy. Jego struktura charakteryzuje się najwyższą konserwatywnością budowy w obrębie wszystkich typów wirusa. Antysensowne oligomery przeciwko wirusowi grypy wycelowane w początkową sekwencję genu PB1 hamowały ekspresję tych genów i replikację wirusa w hodowli komórek (7). W przeciwieństwie do oligomerów fosforotiolowych, które swobodnie hamowały replikację, oligomery fosfodwu-

estrowe były nieaktywne w tym samym układzie doświadczalnym. W przebiegu wykonywanych doświadczeń stwierdzono przewagę efektu nieswoistego oddziaływania oligonukleotydów. Efekt inhibicyjny był zależny od długości łańcucha oligomeru i liczby jego wewnętrznych połączeń, a w mniejszym stopniu od jego sekwencji (13). Nieswoiste hamowanie replikacji wirusów nie jest jeszcze dobrze poznane. Oprócz wymienionych już mechanizmów, należy również wskazać na możliwość zaburzeń proliferacji i różnicowania zakażonych wirusem komórek wywoływanych przez nukleozydy i nukleotydy powstające po degradacji asODNs, a zwłaszcza w doświadczeniach prowadzonych na liniach komórkowych, gdzie koncentracje asODNs są wysokie (19).

Zaawansowanie badań nad wykorzystaniem oligomerów antysensownych w terapii przeciwwirusowej nie osiągnęło jeszcze oczekiwanego poziomu. Niemniej jednak, szybki postęp jaki obserwuje się w tej dziedzinie pozwala przypuszczać, że w krótkim czasie celowane blokowanie genów wirusowych będzie stosowane w lecznictwie na zasadach podobnych do celowanej antybiotykoterapii chorób bakteryjnych.

## Piśmiennictwo

1. *Barciszewski J., Łastowski K., Twardowski T.*: Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie, Sorus, Poznań, 1996, s. 241.
2. *Boiziau C., Thuong N. T., Toulme J.*: Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 768, 1992.
3. *Calabretta B.*: Cancer Res. 51, 4505, 1991.
4. *Collins M. K. L.*: Practical molecular virology. Humana Press, Clifton, New Jersey, 1991, s. 175.
5. *Hatta T., Kim S. S. G., Nakashima H., Yamamoto N., Sakamoto K., Yokoyama S., Takaku H.*: FEBS Lett. 330, 161, 1993.
6. *Jacob A., Duval-Valentin G., Ingrand D., Thuong N. T., Helene C.*: Eur. J. Biochem. 216, 19, 1993.
7. *Leiter J. M., Agrawal S., Palese P., Zamecnik P. C.*: Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 3430, 1990.
8. *Lewin B.*: Genes IV, Oxford University Press, 1990.
9. *Liszewicz J., Sun D., Metelew V., Zamecnik P., Gallo R. C., Agrawal S.*: Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 3860, 1993.
10. *Patel D. J.*: Nature, 365, 490, 1993.
11. *Ratajczak M. Z., Skórski T.*: Post. Biol. Kom. 21, 177, 1994.
12. *Szpakiel G., Nedbal W.*: Trends Microbiol. 3, 213, 1995.
13. *Stein C. A., Cheng Y. C.*: Science 261, 1004, 1993.
14. *Stein C. A., Cohen J. S.*: Cancer Res. 48, 2659, 1988.
15. *Stein C. A.*: Leukemia, 6, 967, 1992.
16. *Szklarczyk A.*: Post. Bioch. 39 (4), 221, 1993.
17. *Szklarczyk A.*: Post. Bioch. 40 (3), 166, 1993.
18. *Vickers T., Baker B. F., Cook P. D., Zounes M., Buckheit R. W., Germany J., Ecker D. J.*: Nucleic Acids Res. 19, 3359, 1991.
19. *Wagner R. W.*: Nature 372, 333, 1994.
20. *Zamecnik P., Stephenson M.*: Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 280, 1978.
21. *Zekanowski C.*: Post. Bioch. 41, 32, 1995.

Adres autora: dr hab. Stanisław Winiarczyk, ul. Popieluski 26, 20-052 Lublin

ORGANON TEKNIKA

## Firma ORGANON TEKNIKA

oferuje

immunoenzymatyczne testy  
do wykrywania w żywności antygenów

- ✘ SALMONELLA spp.
- ✘ LISTERIA spp.
- ✘ E. COLI O157:H7

oferujemy także

skomputeryzowaną aparaturę umożliwiającą

- ✓ wykonywanie testów
- oraz
- ✓ gromadzenie i analizę wyników

ORGANON TEKNIKA

Oddział w Warszawie  
ul. Kubickiego 3 m. 2  
02-954 Warszawa  
tel. 0-22 642 00 26/27  
fax 0-22 642 45 05