

NAGY DNS TARTALMÚ LIPOSZÓMÁK KIFEJLESZTÉSE EUKARIÓTA SEJTEK
HATÉKONY TRANSZFORMÁCIÓJÁRA

Doktori értekezés

Készítette:

Szelei József

Szeged

MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT, BIOKÉMIAI INTÉZET

1989

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Venetianer Pál akadémikusnak, hogy értekezésem elkészítését az MTA SZBK Biokémiai Intézetében lehetővé tette.

Köszönöm dr. Duda Ernőnek, témavezetőmnek a szellemi segítségét és kritikai észrevételeit, amelyek nélkül nem készülhetett volna el ez az értekezés.

Köszönettel tartozom az EMLŐS-csoport tagjainak, különösen Galiba Ferencnének a technikai segítségért és a hasznos tanácsokért, valamint a LIPID-csoportból dr. Horváth Ibolyának aki a foszfolipidek analízisének nagy segítségünkre volt.

Végül szeretném megköszönni feleségem magértő türelmét és áldozatvállalását az otthoni munkában, amivel lehetővé tette, hogy energiám nagy részét a dolgozat elkészítésére tudtam fordítani.

RÖVIDÍTÉSEK

Ad.: adenovírus.

Ap^r: ampicillin rezisztencia gén.

ATP: adenzin-trifoszfát.

Ca-foszfát: kalcium-foszfát.

CH: koleszterin /cholesterol/.

CHO: kínai hörcsög petefészekből izolált sejtvonal /chinase hamster ovary/.

CMGT: kromoszómákkal végrehajtott génátvitel /Chromosome-mediated gene transfer/.

CP: kalcium-foszfát-DNS koprecipitációs módszer.

CPMV: lóbab mozaikosodását okozó vírus /cowpea mosaic virus/.

dcf.: differenciál centrifugálás.

DEAE-dextrán: dietilaminoetil-dextrán.

DMEM: szövettenyésztett sejtek tápoldata /Dulbecco modified minimal essential medium/.

DMGT: tisztított DNS-sel végrehajtott génátvitel /DNA-mediated gene transfer/.

DMSO: dimetil-szulfoxid.

DNS: dezoxiribonukleinsav.

E. coli: ~~Escherichia coli~~ baktérium.

EDTA: etiléndiamintetraecetsav.

EtBr: etídium-bromid.

fl.: foszfolipid.

G418: geneticin-szulfát, antibiotikum.

gl. s.: glicerín sokk.

HAT szelekciós közeg: hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó tápoldat, amely lehetővé teszi a hipoxantin-guanin foszforibozil transzferáz és a timidin-kináz pozitív sejtekre való szelekciót.

HeLa: emberi daganatos méhből izolált sejtvonal.

HEPES: N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-2-etánszulfonsav.

HGPRT: hipoxantin-guanin foszforibozil transzferáz enzim.

ink.: inkubálás.

lacZ: az *E. coli* β -galaktozidáz génje.

LB: baktérium szaporítására szolgáló tápoldat /Luria-Bertani medium/.

LMTK⁻: egér timidin-kináz hiányos L (fibroblasztból származó) sejtvonal.

LUV: nagy egyfalú lipid vezikulum /large unilamellar vesicle/.

MLV: több falú lipid vezikulum /multilamellar vesicle/.

NPTII: neomicin-foszfotranszferáz II enzim /neomycin phosphotransferase II/.

PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat /phosphate buffered saline/.

PK: proteináz-K.

PPO-POPOP: 2,5-difenil-oxazol - 1,4-di-/2-(5-fenil)-oxazoil/-benzol.

PS: foszfatidil-szerin /phosphatidylserine/.

REV: fordított fázisú rendszerből párologtatással képezett liposzómák /reverse-phase evaporation vesicle/.

RNS: ribonukleinsav.

RSVE: Sendai vírus peplonjának rekonstrukciójával nyert vezikulumok /Reconstituted Sendai Virus Envelopes/.

SDS: nátrium-dodecil-szulfát /sodium-dodecylsulphate/.

SM: fág tárolására és hígítására szolgáló oldat /storage medium/.

sup: szupresszor gén.

SUV: kis, egyfalú lipid vezikulum /small unilamellar vesicle/.

SV40: majom veséből izolált DNS tumorvírus /papova/.

T: az SV40 vírus T fehérjéje.

Tc^r: tetraciklin rezisztencia gén.

TE: TRIS-EDTA alapú DNS hígító puffer.

TMV: dohány mozaikosodását okozó vírus /tobacco mosaic virus/.

Tn5: transzpozon-5.

tr⁺: transzformáns.

UV: ultraibolya hullámhosszúságú fény /ultraviolet/.

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	1.
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4.
II. 1. A genetikai transzformációról általában	4.
II. 2. Eukarióta sejtek transzformációja a kalcium-foszfát DNS koprecipitációs módszerrel	8.
II. 3. Liposzómás géntranszfer	11.
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16.
III. 1. Liposzómák	16.
III. 2. Műveletek DNS-sel és fágokkal	20.
III. 3. λ gtWESneo rekombináns fág készítése	21.
III. 4. Szövetkultúra	22.
IV. KISÉRLETI EREDMÉNYEK	26.
IV. 1. Kisérletek nagy molekulatömegű DNS hatékony bezárá- sára liposzómába	26.
IV. 1. 1. A DNS méretének hatása a liposzómába való bezár- hatóságra	26.
IV. 1. 2. λ cI857Sam7 fág liposzómába való bezárhatóságának vizsgálata	29.
IV. 1. 3. További vizsgálatok a DNS-ek liposzómába zárható- ságára	29.
IV. 2. Eukarióta sejtek genetikai transzformációja	42.
IV. 2. 1. LMTK ⁻ sejtek transzformációja	42.

IV. 2. 2. HeLa sejtek transzformációja a kalcium-foszfát koprecipitációs és a hagyományos liposzómás /REV/ módszerrel	44.
IV. 2. 3. Transzformáció LUV-ba zárt fággal	48.
V. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	55.
V. 1. Nagy molekulatömegű DNS liposzómába zárása	55.
V. 2. Szövettenyésztett sejtek transzformálása	58.
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	67.
VII. IRODALOM	70.

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Idegen DNS eukarióta sejtbe juttatása a molekuláris biológia egyik fontos eszköze lett az utóbbi évtized során. Ez tette először lehetővé a génexpresszió szabályozásának vizsgálatát, számos eukarióta gén azonosítását és jellemzését. Nagy remények fűződnek hozzá, hogy továbbfejlesztésével lehetséges lesz a génterápia, valamint mezőgazdaságilag hasznosabb növények és állatok létrehozása.

A géntranszfer technikák számos típusát fejlesztették ki, s alkalmazták sikerrel a laboratóriumi vizsgálatok során. Időközben azonban több hátrányos tulajdonságukra is fény derült: pl. a legelterjedtebb módszer /a kalcium-foszfát-DNS koprecipitációs/ csak bizonyos sejttípusokra alkalmazható megfelelő hatékonysággal, a DEAE-dextrán módszerről ugyanez elmondható, s a hatékonysága legtöbbször még alacsonyabb. A nagy hatásfokkal működő módszerek közül a vírusvektorok a rekombinációra való hajlamosságuk miatt veszélyesek lehetnek, míg a mikroinjekciós módszer a nagy ügyesség mellett leginkább igényli a jó műszerezettséget és igen lassú.

Az a felfedezés hogy a liposzómák képesek képződésük során a vizes fázisban oldódó anyagok bezárására, s azokat a sejtmembránnal kölcsönhatva a sejtekbe bejuttatni, vetette fel a lehetőségét annak, hogy tanszformációs rendszerként használják fel őket. A liposzómák géntranszferhez való felhasználásánál előnyös a viszonylag egyszerű preparálásuk, az hogy hosszú ideig tárolhatók stabilan,

kevéssé toxikusak és védik a bezárt nukleinsavat a nukleázok degradáló hatásától. Mivel bizonyos paramétereik /mint nagyság, felületi töltés és a lipid kettősréteg fluiditása/ változtatható, különböző kísérleti feltételek között alkalmazhatók. Glikolipideket a membránjukba építve és lektineket felhasználva növelhető a sejtekhez való kötődésük, felszínükre ellenanyagot kötve pedig specifikus sejteket célozhatunk meg velük.

Azonban az eddig kifejlesztett liposzómás géntranszfer módszerek a modellként használt szövetkulturás sejtekkel kisebb, /vagy legalábbis nem nagyobb/ transzformációs frekvenciát értek el mint a hagyományosan használt, egyszerű transzformációs technikák. Ugyanakkor léteznek olyan kísérletek, amelyek igazolják azt az elvárást, hogy a más módszerekkel alig transzformálható sejtvonalak liposzómás mechanizmussal megfelelően transzformálhatók /szuszpenzióban növekvő sejtvonalakba génbevitel RSVE-vel, vagy a növényi sejtek transzformálásánál az egyik legjobban működő technika a liposzómás/. Másrészt a liposzómás gyógyszerbevitel laboratóriumi és klinikai vizsgálata egyre több biztató lehetőségét tárja fel a megfelelően tervezett liposzómák rutinszerű létrehozásának, s a szervezetbe bevitt liposzómák célzott helyre juttatásának.

Mindezt figyelembe véve, ahhoz hogy a liposzómák valóban hatékony géntranszfer rendszerként legyenek használhatók, alapvetően szükséges lenne a transzformációs frekvencia növelése. Ennek érdekében munkánk során a következőket vettük figyelembe: 1/ Mivel egy eukarióta gén nagy DNS darabot foglal le a kromoszómában /exon-intron szekvenciák és az upstream, downstream szabályozó helyek

miatt/ így a bevitt idegen gén megfelelően szabályozott működéséhez nagy DNS molekulákkal szükséges transzformálni. Valamennyi eddig használt géntaszfer módszer hatékonysága csökken a növekvő DNS-mérettel; /a liposzómás módszerek közül egyedül a REV képes nagy DNS molekulák bezárására, de az ekkor alkalmazott ultrahangozás miatt a DNS egyik vagy mindkét szála törik/. 2/ A sejtbbe jutott liposzóma tartalom legnagyobb része nem ér intakt állapotban a sejtmagba, az intracelluláris /liposzómás/ degradáció miatt, az eddig kidolgozott liposzómás géntaszfer módszerek esetében.

Munkánk célkitűzései mindezen problémák megoldásának elősegítésére a következők voltak:

- 1/ Új módszer kidolgozása a DNS liposzómába zárására, amelynek segítségével:
 - a/ a liposzómák jelentős része tartalmazni fog DNS-t,
 - b/ és a nagy molekulatömegű DNS-nek is jelentős százaléka lesz intakt állapotban beépíthető a liposzómákba.
- 2/ Megnövelni a liposzómába zárt DNS védettségét a liposzómák sejten belüli kinyílása esetére.
- 3/ Megvizsgálni, hogy a nagyobb bezárási hatékonyság és a nagyobb védettség eredményez-e transzformációs frekvencia növekedést és ez hogyan viszonylik a legáltalánosabban használt transzformációs rendszerhez, a kalcium-foszfát-DNS koprecipitációs módszerhez.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II. 1. A genetikai transzformációról általában

Genetikai transzformációnak nevezzük a genetikai információ átvitelét, szemben a citológiai /más néven onkogén/ transzformációval, amikor a sejt daganatos növekedésűvé való átalakulása következik be. Az öröklődő tulajdonság csupasz DNS segítségével történő átvitelét /transzformáció/ először baktériumokban fedezték fel (1), s ezt követően széles körben használták fel a prokarióták genetikájának tanulmányozására, úgy hogy az eredeti "eljárást" jelentősen megváltoztatták. Új módszerek kifejlesztését nagyban elősegítette, hogy felfedezték, illetve jobban megismerték a genetikai rekombinációt nem meiózissal és zigótaképzéssel létrehozó törzsekben a paraszexuális szaporodás /és rekombináció/ transzformáción kívüli egyéb formáit: vírusoknál a "kevert fertőzést", baktériumoknál a transzdukciót és az ivaros jellegű konjugációt, míg egyes gombáknál a pozitív és negatív jellegű hifafonalak összenövésekor keletkező dikarion, illetve az ezt követő magfúzióval a heterokarion képzést és az ezután bekövetkező szegregációt. Mindezen genetikai rekombinációs lehetőségeket terjesztették ki a génmanipulációs kísérletekben: kezdetben paraszexuális ciklus beiktatásával /pl. a magasabbrendű fajoknál inter- és intraspecifikus sejtfúzióval/, majd később a mesterségesen megváltoztatott genetikai anyag átvitelével.

Prokarióták esetében a géntranszfer hatásosságának javítására főképpen a DNS sejtfalon való átjutását kellett megnövelni. Ezt el lehetett érni mesterségesen átalakított, csak bizonyos körülmények között szaporodó fágok /un. fágvektorok (2)/ alkalmazásával. Ekkor a fágvektor DNS-ében az életéhez nem esszenciális DNS szakaszokat cserélik ki a vizsgálandó prokarióta, vagy eukarióta DNS-re az *in vitro* DNS rekombináció módszereivel, majd a rekombináns fág DNS-t "mesterségesen" bepakolják, részlegesen tisztított fágfehérjék segítségével és az így kapott életképes fágokkal fertőzik nagy hatékonysággal a baktérium sejteket. Létezik olyan módszer is amely közvetlenül a fág DNS bevitelén alapul, (3) de ezt inkább csak a baktériumok természetes extrakromoszómális elemeiből /plazmidok, episzómák/ létrehozott plazmidvektorok (4) esetében használják. A baktériumsejt transzfomációja csupasz DNS-sel a baktériumsejt kalcium-ionokkal való kölcsönhatásán alapul. A transzfomációs hatásfok tovább növelhető egyéb sejtfallazítókkal, valamint a baktériumsejt életképességét növelő anyagokkal (5). A plazmidvektorok általában 10 kb-nál kisebb, a fágvektorok /típusaiktól függően/ 2-23 kb-os DNS fragmentek klónozására használatosak. Nagyobb DNS darabok esetében a kozmidvektorok (6) használatosak, amelyek egy tipikus plazmidvektor szekvencián /antibiotikum-rezisztencia gén, plazmid replikációs origó, egyedi restriktációs enzim hasítóhelyek a nem esszenciális DNS szakaszban/ kívül tartalmazzák a lambda fág ligált ragadós végeit /un. cos-szakasz/, így megfelelő nagyságú idegen DNS-ek mesterséges beépítésével *in vitro* fágpakolásra alkalmas DNS hozható létre. A baktériumsejtek megfertőzése után az idegen DNS

plazmidszerűen szaporítható tovább.

A génátviteli kísérleteknél nélkülözhetetlen a keletkező rekombináns genomok kiválasztása. Ehhez olyan fenotípus szükséges amely jól detektálható vagy szelekciós előnyt biztosít a rekombináns genomok számára. Mindez elérhető ha mutáns genomokkal dolgozunk /pl. aminosav vagy nukleinsav anyagcsereút mutánsok/, amikor a bevitt gén /gének/ vad fenotípusú egyedek létrehozását segítik elő /komplementáció vagy rekombináció révén/ vagy pedig olyan domináns gének felhasználásával /pl. antibiotikum rezisztenciát biztosító gének/ amelyek szelekciós előnyt adnak a transzformált egyedeknek vagy bejutásuk jól mérhető /pl. lacZ-rendszer/.

A géntranszfer terminológiájában megkülönböztetik a donor sejtet, amely a transzformáló genetikai anyagot szolgáltatja, a recipiens sejtet amely azt felveszi, s az így képződő transzformált sejtet, amely tartalmazza a recipiens sejt genomját, plusz a donor által szolgáltatott genetikai anyag változó mennyiségét /ezt gyakran transzgenomnak nevezik/. Az szerint, hogy a donor genetikai anyag izolált kromoszómák formájában van, beszélnek kromoszóma közvetített géntranszferről /CMGT/, illetve ha az tisztított DNS, akkor DNS által közvetített géntranszferről /DMGT/ vagy DNS transzfekecióról /ha a DNS vírus eredetű/.

Míg a prokariótáknál a genetikai állomány és a sejtszerveződés viszonylagos egyszerűsége miatt a sejtfal gátló hatásának leküzdése elegendő nagyságrendű génátvitelt biztosít, addig az eukariótáknál más a helyzet. A sejthártya specializációi, finoman szabályozott jellege, a sejtkompartmentalizáció és a sejtmag megléte mind bonyo-

lultabbá teszik az idegen DNS felvételét. Így érthető, hogy a kezdeti géntranszfer kísérletek, amelyeket a baktérium transzformáció mintájára csupasz DNS-sel végeztek olyan alacsony hatásfokúak voltak, hogy a megfelelő deléciós mutánsok hiánya miatt nem voltak megkülönböztethetők a reverzió frekvenciájától. A korá 1960-as években elvégzett sikeres DNS-közvetített géntranszfer (7) sokáig nem volt reprodukálható, mivel nem ismerték fel a Ca-foszfát-DNS koprecipitátum jelentőségét a transzformációban, ami az adott esetben egy szerencsésen megválasztott puffer /foszfát-p./ és a használt spermin preparátum Ca^{2+} -ion szennyeződése (8) révén keletkezett. Az itt alkalmazott (7) 8-azaguanin és a HAT szelekciós rendszer megnyitotta az utat a keletkezett ritka transzformánsok izolálása felé. Ezt használta kísérleteiben McBride és Ozer (9), amint izolált metafázisos kromoszómákat /HGPRT⁺ CHO sejtekből/ vittek be HGPRT⁻ egérsejtekbe, s képesek voltak az igen alacsony frekvenciájú 10^{-7} - 10^{-6} tr⁺/sejt/ géntranszfert is észlelni.

Mivel heterológ rendszert használtak, az eukarióta géntranszfer történetében először tudták kimutatni a transzformáns génterméket: a donor CHO-sejtek HGPRT-jét, elektroforetikus tulajdonsága és az ioncserés kromatográfia elúciós profilja megkülönbözteti a recipiens egér sejtek HGPRT-jétől.

II. 2. Eukarióta sejtek transzformációja a kalcium-foszfát-DNS koprecipitációs módszerrel

Az első egzakt és sikeres kísérleteket a tisztított ("csupasz") DNS transzformációs hatásfokának növelésére eukarióta sejteknél 21 évvel ezelőtt végezték el (10). Mind McCutchanék SV40 DNS-sel végzett kísérleteiben, mind a közel egyidőben végzett polióma (11) és majom adenovírus (12) DNS-t használó kísérletekben DEAE-dextrán kezeléssel növelték a vírus DNS transzformációs hatásfokát. Azonban ez a módszer jelentősen alacsonyabb hatásfokú volt a nagyobb molekulatömegű lineáris DNS-re /pl. Ad.1, Ad.5: 0,1-0,5 fertőző egység /1 ug DNS/, mint a kisebb molekulatömegű cirkuláris vírus DNS-re /SV40, poliómavírus: 10^5 - 10^6 fertőző egység/1 ug DNA/. Nagyobb hatékonyságot hozott a Graham és van der EB által bevezetett Ca-foszfát-DNS koprecipitációs módszer (13), illetve ennek módosítása (14). Ennél a technikánál a DNS oldathoz Ca^{2+} ionokat adnak, majd ezt keverik a meghatározott pH-ra pufferelt foszfát oldathoz, s így megfelelő szerkezetű és finomságú DNS-Ca-foszfát koprecipitátumot kapnak, ez adható a szövetkultúra sejtjeihez. Az így elérhető géntranszfer frekvencia a teljes donorsejt DNS-t használva 10^{-8} - 10^{-6} tr⁺/sejt, míg klónozott és tisztított marker géneket használva 10^{-6} - 10^{-4} . Ha a legjobb recipiens sejtvonalakat használjuk /pl. egér Ltk⁻/ akkor 10^{-5} ill. 10^{-3} - 10^{-2} is elérhető a legoptimálisabb feltételek mellett.

A Ca-foszfát koprecipitációs módszer mint általában a többi DNS által közvetített géntranszfer egy több lépésből álló olyan folya-

mat (15), amikor a szelektált gének /és ha van karrier DNS akkor az is/ részlegesen degradálódhatnak és a recipiens sejt nukleuszában nagy molekulatömegű DNS-sé kapcsolódhatnak. Ezen nagy molekulákat /kb. 50 kb-tól akár 500 kb-ig/, amelyeket transzgenomoknak neveznek, elsődlegesen a külsőleg adott DNS alkotja. Mindegyikük tartalmazhatja egy vagy inkább több kópiáját a szelektált génnek, nem szelektálható szekvenciákhoz kapcsolódva, melyek attól függően, hogy mit viszünk be a szelektált gének mellett, lehet karrier DNS vagy kotranszformációban felhasznált nem szelektálható gén /génék/. Mindegyik klonálisan szelektált recipiens sejtpopuláció tartalmazhat egy vagy inkább több különböző típusú transzgenomot. A transzgenomok kezdetben nemstabil formában léteznek, valószínűleg függetlenül a recipiens sejt kromoszómájától. Nem szelekciós körülmények között az elvesztésük igen gyors: 3-10% generációként. A sejtgenerációk képződése során ezen nemstabil populációkból keletkezhetnek /szelekciós körülmények között inkább/ olyan származékok, amelyekben a transzfomált gén/-ek/ relatíve stabil asszociációban van a sejtgenommal /a kromoszómákhoz kapcsolódva/. De még ezen sejtvonalakban is a transzformált gének sokkal hajlamosabbak az átrendeződésre és az elvesztésre mint a recipiens sejt saját génjei.

A Ca-foszfát koprecipitációs módszer a legelterjedtebb viszonylagos olcsósága és egyszerűsége miatt. Azonban a képződő konkatamerek miatt a kópiaszám változó /esetenként több száz vagy ezer is lehet/. Ennek következtében a szelektált génre stabil transzformánssokban fokozott mértékben lépnek fel átrendeződések, metilációk és

egyéb inaktivációk. Így az elvárt, szabályozott génexpresszió nehezen érhető el. További hátránya hogy szuszpenzióban növekvő /nem letapadó/ sejteknél igen rossz hatásfokú /a transzformációs frekvencia $10^{-8} - 10^{-5}$ tr⁺/sejt/, de a letapadó szövetkultúrában növekvő sejttypusok közül sem sok olyan van, amelynél a transzfer frekvenciája jónak mondható / $10^{-4} - 10^{-3}$ /. Míg a DEAE-dextrános módszer és a pH=6,9-nél végzett Ca-foszfát-DNS koprecipitációs módszer inkább a rövid idejű /tranzient expressziós/ kísérletekben használatos, addig a pH=7,1-nél kapott Ca-foszfát-DNS precipitátum a stabil transzformációs kísérletekben /amikor nem egy viszonylag rövid ideig tartó, átmeneti génexpressziót mérnek, hanem hosszabb idő alatt szelektálják ki a bevitt gént tartalmazó klónokat/. Ehhez hasonlóan stabil transzformációra használatos az Ishiura és mtsai által kifejlesztett módszer (16), amelyben a beinni kívánt DNS-t hordozó rekombináns fág-részecskéket Ca²⁺-ionok jelenlétében meghatározott pH-jú foszfáttal Ca-foszfát csapadékba viszik, majd ezt hozzák össze a transzformálni kívánt sejtekkel. Ezen módszernél szintén kívánatos a sejtek kalcium-foszfát-tűrő képessége és a megfelelően fogékony recipiens sejt vonalak alkalmazása. A transzformáció frekvenciája hasonló a Ca-foszfát-DNS koprecipitációs technikához ugyanazon szelekciós génre és ugyanarra a sejt vonalra vonatkoztatva / $10^{-4} - 10^{-3}$ /. Ennek továbbfejlesztett változata (17) pedig meg is haladja a Ca-foszfátos módszert / $10^{-3} - 10^{-2}$ /, s az egysejtnyi bevitt génre /DNS-re/ jutó hatásfok is nagyobb mint a kalcium-foszfát módszernél / $10^3 - 10^4$ tr⁺/1 µg DNS szemben a $10^{-1} - 10^3$ tr⁺/1 µg DNS-sel/.

II. 3. Liposzómás géntranszfer

Liposzómák /más néven lipidvezikulumok/ egy vagy több lipid ket-tősrétegből /két molekularéteg/ felépülő, zárt, szubmikroszkópikus ill. mikroszkópikus gömböcskék, amelyek belsejében a képződésük so-rán, a környezetükből bezárt vizes oldat van. Liposzómákat először Bangham állított elő több mint 25 évvel ezelőtt (18). Kezdetben a liposzómákat mint a sejtmembrán leegyszerűsített modelljét, első-sorban ionszállítási, permeabilitási kérdések vizsgálatára használ-ták fel.

Új fejezetet nyitott a liposzóma kutatásban és gyakorlati alkal-mazásban az, hogy felismerték a liposzómák sejtekkel való kölcsön-hatási képességét. Ennek sokféle, egymással összefüggő és ezidáig nem teljesen tisztázott formája létezik: a/ szinte minden sejtí-pus felületéhez hozzákötődhetnek; b/ ennek során lipideket juttat-hatnak egyoldalúan vagy cserével a sejtmembránba; c/ anyagokat en-gedhetnek ki belsejükből amit a sejt felvehet; d/ a megkötött lipo-szómát a sejt felveheti endocitózissal vagy e/ fúzionálhat vele. Mindezek során tehát a liposzóma membránjában vagy belsejében levő anyagok bejuthatnak a vele kölcsönható sejt membránjába vagy cito-plazmájába. Ennek alapján a liposzómák gyógyászati alkalmazása köze-li sikerrel kecsegtet a nagyon mérgező gyógyszerek /pl. sejtes pa-razita ölő szerek, rák elleni gyógyszerek/ felhasználási terüle-tén, azáltal hogy a szervezet nagy részével nem érintkezik a mér-gező rakományuk és koncentrált adagokat juttathatnak be a parazi-tákba ill. a beteg szövetekbe. Azt hogy a hagyományos úton bejut-

tatott gyógyszereknél hatásosabbak és kevésbbé mérgezőek számos állatkísérlet és egyes klinikai vizsgálatok is igazolják (19).

Ezzel ellentétben igen kevés sikert értek el az öröklődő, enzimhiányos betegségek gyógyításában, oly módon, hogy megpróbálták a kísérleti állatokba vagy a szövettenyésztett sejtekbe a hiányzó enzimet liposzómába zárva bejuttatni. Ennek úgy tűnt, hogy sikeres alternatívája lesz a hiányzó enzimeket kódoló nukleinsavak liposzómával való sejtbe juttatása azáltal, hogy az egyszer stabilan beépülő DNS biztosítja a megfelelően magas és szabályozott szintű enzimtermelést. Mivel az 1970-es évek végén létező géntranszfer technikák igen alacsony hatásfokúak voltak, nagy figyelem fordult a liposzómák felé a géntranszfer frekvenciájának növelése céljából is (20).

Az első kísérleteket, amelyek igazolták, hogy a liposzómák képesek nukleinsavak sejtbe való juttatására, Ca^{2+} -EDTA kelációs módszerrel végezték poliovíruson (21). Ezt követően sikerült kimutatni biológiailag aktív RNS (22, 23) és DNS (24, 25) liposzómába való bezárását, majd ezek sejtbe juttatását és ottani kifejeződésüket. Azt, hogy a liposzómák rugalmasan alkalmazható szállító rendszerek, bizonyította az is, hogy teljes kromoszómákat (26) sőt még izolált sejtmagokat (27) is beléjük lehetett zárni és ilyen módon a sejtekbe bejuttatni.

Mindezen kísérletek során bebizonyosodott, hogy az enyhe ultrahangozással vagy egyszerű mechanikai kevergetéssel előállított többrétegű /MLV/ vezikulumok (28), vagy az erőteljes ultrahangozással képzett kis, egyrétegű liposzómák /SUV/, (29) nem alkalmasak

nagyobb méretű nukleinsav molekulák bezárására (30) kis belső térfogatuk /0,5-5 μ l/ μ mol lipid/ miatt. Egyébként még az általuk bezárható kisebb molekulákat is általában kis hatásfokkal /0,5-5%/ zárják be. Ennek kiküszöbölésére fejlesztették ki a nagy, egyrétegű vezikulákat /LUV/. Előállításukra több módszer létezik: a/ Ca^{2+} -EDTA kelációs (29), b/ éter injekciós (31), fordított fázisból szerves oldószer elpárologtatással /REV, 32/ és a detergens dialízissel történő (33) módszerek. Csupasz DNS és RNS bezárására egyre inkább használt módszer a REV, mivel szinte valamennyi lipidre alkalmazható, igen magas a bezárási hatékonysága /10-40%/, valamint igen kis térfogattal is elvégezhető a műveletek /általában 0,05-5 ml/. A Ca^{2+} -EDTA kelációs eljárást is alkalmazták DNS és RNS bezárására, de ennek bezárási hatékonysága kisebb /5-15%/ és ez is jelentősen csökken a DNS molekulák tömegének növelésével (34), valamint csak akkor használható, ha a lipidben többségben vannak a negatív töltésű /általában foszfatidil-szerin/ molekulák. Előnye viszont a REV-vel szemben az, hogy nem kívánja meg a bezárandoó anyag ultrahangozását, ami a nagyobb molekulatömegű DNS-ek töréséhez vezethet (35).

A liposzómás géntranszfer technika nemcsak a nukleinsav bezárási hatékonyság növelése révén fejlődött, hanem a liposzóma-sejt kölcsönhatás tanulmányozása olyan lehetőségek felismerését hozta, amelyekkel a liposzóma tartalom sejtbe való hatékonyabb szállítását lehetett elérni: a/ foszfatidil-szerin alapú liposzómák bizonyultak a leghatékonyabbnak mind az állati (36, 37), mind a növényi (39, 40) sejtekbe való nukleinsav transzfer szempontjából; b/

Koleszterin beépítése a liposzómába növeli a liposzóma stabilitását, s így a géntranszfer hatásfokát (37, 38). c/ Különböző elő-, és utókezelések /a recipiens sejttípustól és a liposzómát felépítő foszfolipidektől függően/ jelentősen növelhetik a transzformált sejtek arányát (38, 40, 41).

Az elért eredmények azonban csak részlegesek voltak. A létező többi transzformációs rendszernél /nem tekintve most a szinte 100%-os hatásfokú retrovírus transzformációt és a 20 %-os hatásfokot is elérhető mikroinjekciót/ csak olyan esetben értek el nagyobb hatásfokot, ha a beviendő nukleinsavnak /ami RNS volt/ a citoplazma volt a kifejeződési helye: akár állati sejteknél pl. poliovírus-sal (23), akár növényi sejteknél /TMV- és CPMV-vel (39)/. Más esetekben az elért hatásfok alatta maradt a többi technikának vagy legalábbis nem lett jobb: pl. annak ellenére hogy kb. ezerszeres hatásfok növekedést értek el a sejtek klorokvin elő-, és 25%-os glicerinnel való utókezelésével az egyszerűen PS-CH REV-be zárt SV40 DNS-hez képest. Az így elért infektivitás nem érte el a DEAE-dextrán módszert /habár a Ca-foszfátét jelentősen meghaladta (40)/. Figyelemre méltó volt hogy a bevezetett kezelésekkel párhuzamosan nőtt a megfertőzött sejtek aránya /ezt T-specifikus ellenanyag tesztet használva mutatták ki/. Ez (37, 40) azt jelenti, hogy ezek a kezelések növelik a liposzómába zárt DNS sejtekbe juttatását, s így közvetve vagy más közvetlenebb módon is a DNS-sejtmagba jutásának valószínűségét.

A további vizsgálatok (42) egyértelművé tették, hogy a liposzómák /legalábbis a foszfatidil-szerin alapúak/ nagyjából endo-

citózissal jutnak be a sejtekbe /ezt erősíti fel a glicerín kezelés/, s azon liposzóma tartalom amely valamilyen módon elkerüli a lizoszómákban a degradációt, rendelkezik számottevő lehetőséggel a transzformáció, vagy a transzfekció megvalósítására. A klorokvin valamilyen módon /pH-t növelve, vagy más direktebb módon/ gátolja a lizoszómás lebontó enzimeket, így megnövelve a bejutott nukleinsav élettartalmát, nagyobb esélyt ad annak a sejtmagba jutásra.

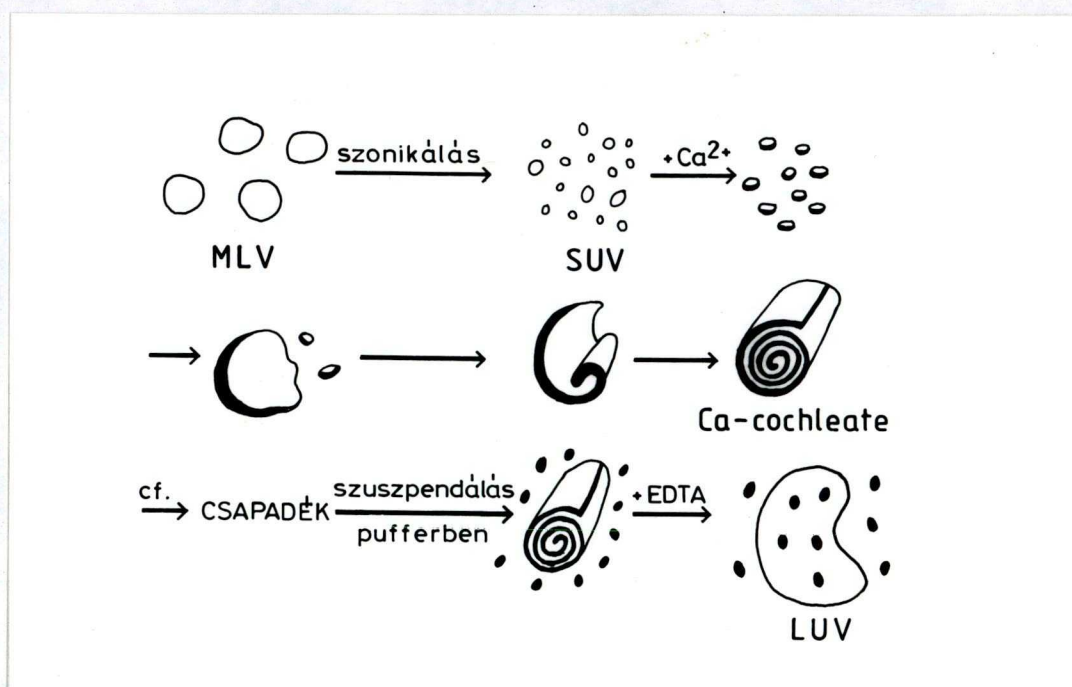
Ahogy a liposzómába zárt SV40 DNS-sel végzett infekciós kísérletek eredményei nem haladták meg a legjobban működő hagyományos transzfekciós rendszer /DEAE-dextrán/ hatásfokát, úgy az önálló replikációs origóval nem rendelkező un. marker /vagy rezisztencia/ génekkel elért hatásfok sem érte el a Ca-foszfát módszerét. Pl. (43) ha a REV-be HSVI TK gént /pAGO plazmid tartalmazta/ zártak be, s glicerín sokkot alkalmaztak 30'-cel a liposzóma és a sejt együtt inkubálása után, akkor a HAT szelekciós közegben mért stabil transzformáció frekvenciája csak 2×10^{-4} volt, szemben az 5×10^{-4} -es Ca-foszfáttal /DEAE-dextráné közel 0/. Annak ellenére, hogy a tranzient expressziós kísérletek azt mutatták, hogy a liposzómás módszerrel a sejtek legalább 10 %-a felvette és átmenetileg kifejezte a TK-gént / ^3H -timidin beépüléssel mérve/, míg a Ca-foszfáttal csak 3 %, a DEAE-dextránnal pedig 0,1 - 1 %.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III. 1. Liposzómák

Foszfatidil-szerint és a többi foszfolipidet marha agyból preparáltuk Folch (44) módszerével. Tisztaságukat kétdimenziós vékonyréteg kromatográfiával ellenőriztük, Horváth Ibolya segítségével. A koleszterin gyári /SIGMA/ készítmény volt.

LUV-ot /1. ábra/ Papahadjopoulos és mtsai (29) alapján készítettük, némi módosítással: a kloroformban oldott foszfolipidet vákuumban beszárítottuk /Rotary evaporatort használva/, majd a kloroform maradékát N_2 -árammal eltávolítottuk. A lipidet felvettük NHT pufferben /150 mM NaCl, 2 mM L-His, 2 mM TES, pH=7.4/, /vortex néhány percig/ 10 μ mol/ml-es végkoncentrációban. SUV-ot állítottunk elő N_2 -áram alatt való szonikálással /Branson típusú ultrahangozó 5-15 $^{\circ}$ C közötti vízfürdő, 5-20 perc/. A megmaradt nagyméretű, több lipid kettősrétegű /MLV/ vezikulumokat kicentrifugáltuk /Eppendorf centrifuga, 20', hidegszoba/. A felülúszóhoz CNHT puffert /0,1 M $CaCl_2$ NHT-ben/ adtunk (10 μ mol foszfolipidre 50-100 μ l-t/, s egy órára át inkubáltuk 37 $^{\circ}$ C-on, lezárt Eppendorf csőben. Az így képződő fehér csapadékot /Ca-kohleát/ Eppendorf centrifugában kiülepítettük. /10', hidegszoba/, s a felülúszó eldobása után vortexszel összekevertük 100 μ l olyan pufferben, amelybe előzőleg beleoldottuk a bezárni kívánt anyagot /DNS esetében NHTE: 0,4 mM EDTA NHT-



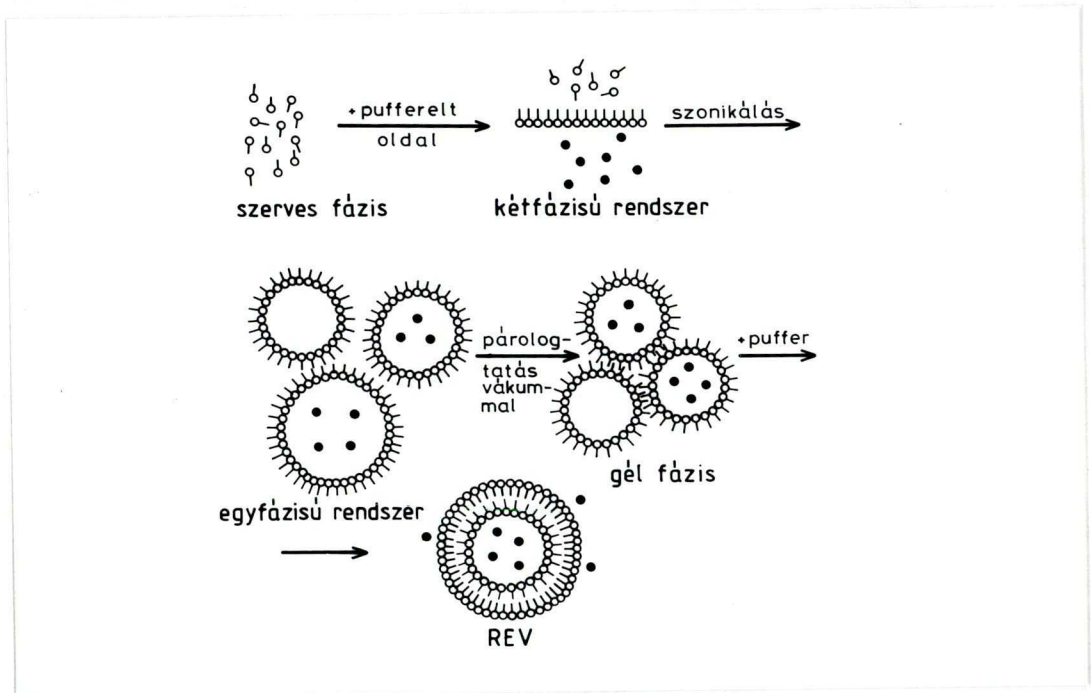
1. ábra: LUV képzése Papahadjopoulos és mtsai (29) alapján. A szárított foszfatidil-szerin alapú lipid vizes fázisban való felvételekor sok falú /egy fal molekulárisan egy lipid kettősrétegnek felel meg/ nagy vezikulumok keletkeznek /MLV/, amelyekből ultrahangozással egyfalú, kis vezikulumokat hozhatunk létre. Ezeket Ca²⁺-ionokkal spirálisan feltekeredett lipidlemezekké /Ca-kohleát/ alakíthatjuk, amelyekből, ha elvonjuk a Ca²⁺-ionokat, egyetlen lipidkettősréteggel határolt, nagy belső térfogattal rendelkező képződmények alakulnak ki.

ben, fág esetében MNHT: 5 mM MgSO_4 NHT-ben/. Ezt követően részletekben /vortexszel megkeverve és 37 °C-on inkubálva/ 500-1000 μl ENHT-t /0,2 M EDTA NHT-ben/ adtunk hozzá és végül még 30'-en keresztül inkubáltuk 37 °C-on.

REV-et /2. ábra/ Szoka és mtsa (32), valamint Straubinger és mtsa (41) alapján preparáltuk: 10 μmol foszfolipidet /340 μl kloroformban oldva/ összekevertünk 100 μl NHTE-vel /benne DNS/ vagy 100 μl MNHT-vel /benne fág/ majd addig ultrahangoztuk /ultrahangos mosogató néhány perc, vagy a Branson-féle ultrahangozóval 10-30''/ amíg stabil, egyfázisú rendszer nem alakult ki. Ezután forgó evaporátorban, növekvő vákuumban /előbb 3-400 Hgmm, majd a fázisátalakuláskor 5-600 Hgmm, végül 600 Hgmm felett/ eltávolítottuk a kloroformot. /A gélfázis kialakulásakor 500 μl NHTE-t adtunk, vortexszettünk és tovább folytattuk a kloroform elpárologtatását/.

A be nem zárt anyagok elválasztása a liposzómáktól differenciálcentrifugálással történt Dimitriadis (22) eljárását módosítva: mind a LUV-hoz, mind a REV-hez további 1 ml ENHT-t adtunk, 37 °C-on, 30'-en át inkubáltuk, majd NHTE-vel kb. 20 ml-re hígítva, steril centrifuga csövekben 38000 g-vel centrifugáltuk /30', 5-15°C/ A csapadék felszuszpendálása után a centrifugálósos mosást megisméltük. Végül a liposzóma csapadékot 1 ml NHTE-ben vettük fel és 5 °C felett tároltuk.

Megjegyzendő, hogy a foszfolipid tartalom mérése alapján (45) a kiindulási foszfolipidnek átlagosan 35-50%-át kaptuk vissza a liposzóma preparátum mosására szolgáló centrifugálások után. A legna-



2. ábra: REV preparálása Szoka és mtsa (32) alapján. A nagyobb térfogatú szerves oldószerben oldott lipid és a kisebb térfogatú vizes oldószerben oldott, bezárni kívánt anyag összeöntésével kialakított kétfázisú rendszert ultrahangozzák, s így egy relatíve stabil, egyfázisú rendszer alakul ki. Ebben fordított orientációjú, egy lipidréttegű vezikulumok keletkeznek, amelyeknek a belsejében van a vizes oldat. Elpárologtatva a szerves oldószert /egy közbűlső, gélfázison keresztül/ alakulnak ki a nagy, egy vagy néhány lipid kettősréttegű liposzómák.

gyobb lipidveszteség a Ca-kohleát csapadék kicentrifugálása után volt mérhető, míg az MLV eltávolítása és a liposzóma mosások kisebb mértékben járultak hozzá a lipid veszteséghez. Koleszterin adása /20-50 mol % között/ csökkentette a foszfolipid veszteséget.

III. 2. Műveletek DNS-sel és fágokkal

A felhasznált baktériumtörzsek /HB101 - plazmidokhoz; NM259 - fágokhoz; BHB2688 és BHB2690 - fág pakoló elegyek készítéséhez/ az SZBK Biokémiai Intézetének törzsgyűjteményéből származtak. A λ CI857Sam7 fágot Sain Bélától, a λ gtWES- λ B (46) és az EMBL4 vektor fágokat (47) Duda Ernőtől kaptuk, a pAG60 (48) plazmidot Dr. A. C. Garapin küldte el csoportunknak. A munkánk során felhasznált restrikciós endonukleáz enzimeket /EcoRI, BamHI, SalI, HindIII/ az SZBK Biokémiai Intézetében preparálták az irodalomban leírt eljárások részleges módosításával.

Valamennyi rekombináns DNS-sel való műveletet /plazmid DNS tisztítás, plazmiddal baktériumsejtbe való transzformáció, fág tisztítás, fág DNS tisztítás, *in vitro* fág DNS pakoló elegy készítése és fág DNS pakolása, restrikciós enzimekkel való emésztések, DNS fragmentumok ligálása, 32 P ATP-vel való DNS jelölés/ a Maniatis és mtsai által megírt kézikönyv (49) alapján végeztük el.

A λ CI857Sam7 fágot indukcióval, a többi fágot az "egyszerű lízissel" preparáltuk. Mind az alkalikus lízissel preparált plazmi-

dokat, mind a fág részecskéket CsCl egyensúlyi gradiens centrifugálással tisztítottuk meg. A DNS fragmenteket ^{32}P -ATP-vel, a 3'-végek feltöltésével jelöltük a Biokémiai Intézetben preparált E. coli DNS polimeráz I Klenow fragmentjével. ^{125}I -dal a DNS-t Comberford (50), a fág fehérjéit Greenwood és mtsai (51) alapján jelöltük meg.

A liposzómába zárt DNS mennyiségének meghatározását izotópos jelölés esetén ^{32}P ill. ^{125}I / alikvótok aktivitásának mérésével végeztük PPO-POPOP-toluol szcintillációs koktélaban /1% Triton X-100-at használva és 1 napot várva a liposzóma degradációhoz/.

Nem jelölt DNS esetén a mintákból alivótokat vettünk és brómfenolkék tartalmú mintapufferben /2 % SDS-sel kiegészítve/, 10'-cen át 68 °C-on inkubáltuk, majd 0,7 % agaróz tartalmú gélen megfuttattuk őket. EtBr festés után összehasonlítottuk az UV-fluoreszcencia intenzitásokat, az ismert koncentrációjú plazmid ill. fág DNS hígítási sorával, s így kaptuk meg a bezárt DNS mennyiségét.

Fehérjét a zavaró tényezők /lipid, puffer, só/ kiküszöbölésére, Peterson (52) módszerével határoztuk meg.

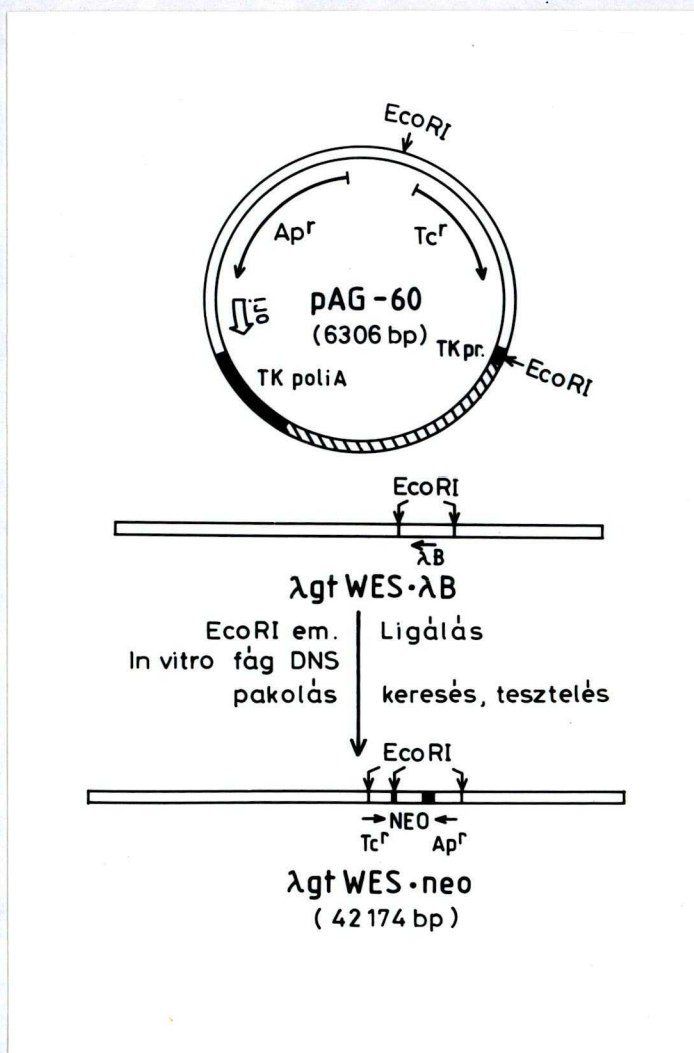
III. 3. λ gtWESneo rekombináns fág készítése

A liposzómába zárt lambda fág eukarióta sejtekbe való transzformálhatóságának vizsgálata céljából létrehoztunk egy eukariótákban működő, markergénnel ellátott rekombináns fágot /3. ábra/. Ehhez a pAG60 plazmidot (48) használtuk fel, amelynek EcoRI-gyel részlege-

sen emésztett /linearizált/ formáját izoláltuk és az ~~EcoRI~~ emésztett λ gtWES- λ B vektor fág (46) tisztított karjai közé ligáltuk a középső fragment / λ B/ helyére. A ligátumot ~~in vitro~~ DNS pakoló eleggyel fágba pakoltuk. Ezzel fertőztük az NM259-es baktérium törzsből készített indikátor sejteket. A keletkezett plakkokat SM (49) pufferbe szedtük ki, s alikvótjukat Q358 / λ gtWES számára lízist nem megengedő supE gazda/ baktériummal vizsgáltuk. A teljes pAG60-at tartalmazó rekombináns fágok képessé tették a baktériumot hogy rövid lappangási idő után ampicillin /100 ug/ml/, kanamicin /25 ug/ml/ és tetraciklin /12,5 ug/ml/ tartalmú LB-ben nőjön. Így elvégezve az elsődleges szűrést, a pozitívnak bizonyuló fágokat felszaporítottuk NM259-ben / λ gtWES számára lízist megengedő supF gazda/ s restrikciós emésztéssel vizsgáltuk olyan klónra, amely átrendeződés nélkül egy példányban tartalmazta a pAG-60-at a megfelelő helyre beépülve. A pAG60 és a belőle kialakított λ gtWESneo fág az eukarióta sejtekre hatékony kanamicin homológára, a G418-ra /riboszóma működést gátol/ ad rezisztenciát, azáltal hogy benne a HSVI TK génjének promótere /ami általában minden emlőssejtben működik/ hajtja meg a Tn5 transzpozonból kieszedett neo gént /NPTII; neomicin foszfortranszferáz II, vagy más néven amino-glikozid foszfortranszferáz II; APH(3')II (53)/.

III. 4. Szövetkultúra

Humán eredetű HeLa sejteket és egérből származó LMTK⁻ sejteket



3. ábra: λ gtWESneo fág kialakítása. pAG60 plazmidot részleges **EcoRI** emésztéssel /Ap^r és a Tc^r gén között/ linearizálva beépítettük a λ gtWES- λ B vektor fág "**EcoRI** karjai" közé.

10% hőinaktivált FCS-ot /HUMÁN; Budapest/ tartalmazó DMEM-ben /SERVA; Heidelberg/ /kiegészítve 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel/ 3-5%-os CO₂-tartalmú termosztátban növesztettük, 37 °C-on.

A Ca-foszfát precipitációval történő emlőssejt transzformációt Graham és van der EB (13), valamint Wiegler és mtsai (14) alapján végeztük el a következőképpen: 20 µl TE-ben oldott DNS-t steril desztillált vízzel 125 µl-re egészítettük ki, majd 125 µl 0,5 M-os CaCl₂-ot adtunk hozzá. Ezt a keveréket /részletekben/ 250 µl HEPES pufferben /50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂PO₄, pH=7,05-7,15/ oldott foszfáthoz adtuk, buborékolatással kevertettük, majd szobahőmérsékleten hagytuk állni 25-30'-cet. Az előző napon tripszinezéssel szétosztott sejteket /5x10⁵/60 mm-es petri csésze/ fiziológiás sóval /0,9 % NaCl/ megmostuk, majd hozzáadtuk a 0,5 ml-nyi Ca-foszfát-DNS precipitátumot. A lemezeket félórán át szobahőmérsékleten tartottuk, időnként rázogatva. 3,5 ml tápoldatot helyeztünk a lemezekre és a szövettenyésztő termosztátban inkubáltuk őket. 3,5-4 óra után leszívtuk a tápoldatot a lemezekről és 90 /HeLa/ ill. 120''-ig /LMTK⁻/ 25 % glicerinnel sokkoltuk a sejteket. A glicerint leszívása után kétszer mostunk PBS-sel, majd tápoldatot helyeztünk a sejtekre. 48 óra után a sejteket letripszinezítettük és 1/5-1/10 részt egy-egy 10 cm-es lemezre vittük át és 400 /HeLa/ ill. 500 (LMTK⁻) µg/ml G418 /GIBCO/-tartalmú tápfolyadékban tartottuk őket, amelyet 3-4 naponta cseréltünk. 5-10 nap alatt a nem transzformált sejtek kipusztultak, a transzformáns kolóniák pedig

14-21 nap alatt akkorára nőttek /50-200 sejt/, hogy leszedhetőkké váltak a további vizsgálatokra, ill. 10 % formaldehides fixálás után, 1 % kristályibolyával megfestve számolhatók lettek.

Liposzómákkal való transzformáció esetén a Ca-foszfáthoz hasonlóan az előző napon 5×10^5 sejtet raktunk ki tripszinezéssel 6 cm-es lemezekre. A liposzómákat 0,9 % NaCl-dal megfelelő koncentrációra hígítva 300 μ l végtérfogatban adtuk a 0,9 % NaCl-dal mosott sejtekhez, a petri csészére óvatosan rétegezve. 20-30 perces, 37 °C-os inkubálás után vagy 2 ml tápoldatot mértünk rájuk és ezeket 3,5 órán keresztül hagytuk állni 37 °C-os termosztátban, majd glicerin sokkot alkalmaztunk, vagy egyből sokkoltunk glicerinnel. A továbbiakban a szelekciót a Ca-foszfát módszernél leírtak szerint hasonlóan végeztük el.

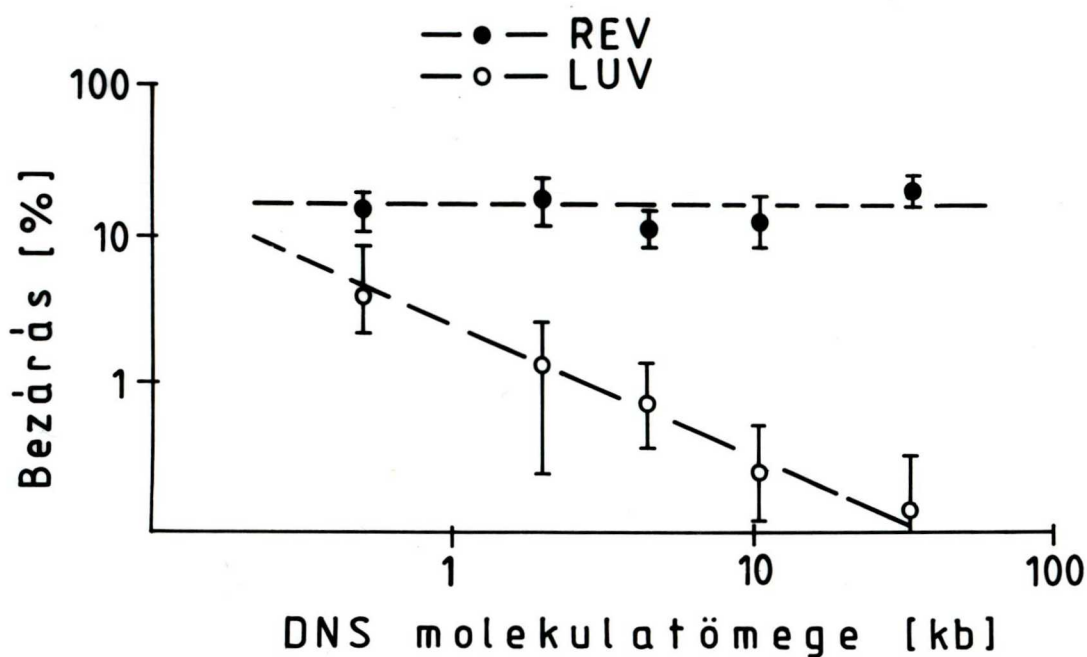
Ha nem alkalmaztunk glicerin sokkot, akkor mind a Ca-foszfát, mind a liposzomás transzformáció esetében a sejteket a transzformáló anyag hozzáadása után 3,5-4 órával PBS-sel mostuk és 4,5 ml tápoldattal inkubáltuk tovább.

IV. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

IV. 1. Kísérletek nagy molekulatömegű DNS hatékony bezárására liposzómába

IV. 1. 1. A DNS méretének hatása a liposzómába való bezárhatóságra

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a DNS méret hatását a liposzómába való bezárhatóság szempontjából, különböző molekulatömegű DNS fragmenteket állítottunk elő a λ CI857Sam7 fág DNS-ének *Sa*II és *Hind*III restrikciós endonukleázokkal való emésztésével, majd a külön-külön izolált 499, 2028, 4371, 15258 és 32745 bp-os fragmenteket a 3'-végeiken megjelöltük ^{32}P -ATP-t használva, átlagosan 10^6 cpm/ μg spec. aktivitással/. Az ebből vett alikvótokat használtuk az 5 μmol foszfatidil-szerinből képezett liposzómákra /LUV ill. REV/. A különböző molekulatömegű DNS-ek LUV-ba való bezárhatósága nagy különbségeket mutatott /4. ábra/: szelekciós előny mutatkozik a Ca-kohleátos módszer esetén a kisebb molekulatömegű DNS-re és a nagy molekulatömegűt már elhanyagolható mértékben zárja be. Úgy tűnik, hogy a vizsgált tartományban a kettős logaritmikus ábrázolás lineáris összefüggést tár fel a bezárhatóság és a molekulanagyság között. A REV képzése esetén /5. ábra/ nincs hasonló összefüggés. Különböző nagyságú /0.5-32,7 kb-os/ DNS molekulákat nagyságuktól függetlenül 9-23 %-os eredménnyel sikerült bezárni.



4. ábra: A DNS fragmentek nagyságának hatása a liposzómába /LUV ill. REV/ való bezárhatóságra.

LUV /-o-/: 10 μ g λ cI857Sam7 fág DNS-ből ~~SalI~~ és ~~HindIII~~ enzimekkel kapott emésztés, izolálás és Klenow-jelölés /kb. 10^6 cpm/ μ g DNS spec. akt./ után a 300 μ l NHTE pufferben felvett 499, 2028, 4371, 15258 és 32745 bp-os fragmentek 100 μ l-es alikvótjait kevertük össze kohleát-cilinderek csapadékával /10 μ mol lipid, 50 mol% PS, 50 mol% CH/. Ehhez 100-200 μ l-es részletekben adtunk ENHT pufert /közben enyhén vortexszeltünk/ míg a csapadék fel nem tisztult. Ezt a szuszpenziót további 30'-cen át inkubáltuk 37 $^{\circ}$ C-on.

Reverse fázisú vezikulák /REV; -●-/ képzése esetén a jelzett DNS oldat ugyanazon mennyiségeit ultrahangoztuk fürdő-típusú

4. ábra folytatása:

ultrahangozóban /hasonló lipid mennyiséggel és összetétellel/. A szerves oldószert Rotary evaporátorral eltávolítottuk és a képződött liposzóma szuszpenziót NHTE pufferben hígítottuk.

A szabad DNS-t a differenciál centrifugálás kétszeri ismétlésével távolítottuk el, s a radioaktivitást toluol alapú szcintillációs koktéltban mértük /1 % Triton X-100-at használva a liposzóma lízisére/.

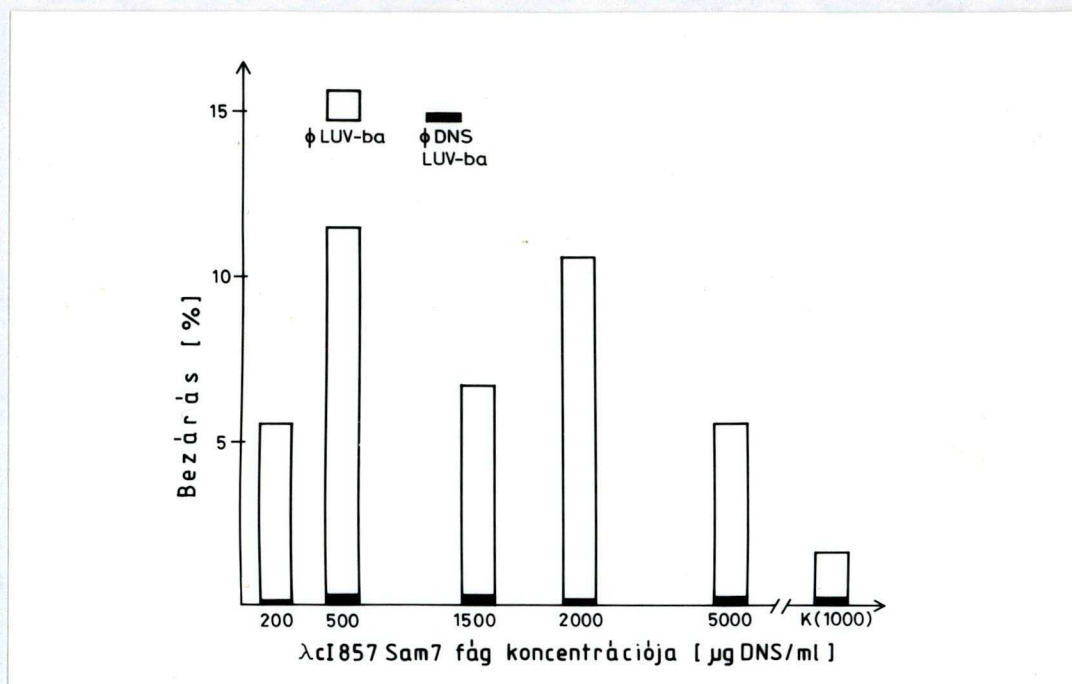
A jelölt DNS harmadik részét /100 μ l/ előre elkészített és differenciál centrifugálással egyszer megtisztított LUV-hoz kevertük és 30' inkubáció után /1 ml-re kiegészítve NHTE pufferrel/ majd kétszer differenciál centrifugáltuk. A liposzómába zárást százalékosan fejeztük ki, úgy hogy a liposzómába zárt anyagmennyiséget elosztottuk a mosási felülúszók és a liposzómába zárt anyagmennyiség összegével, s megszoroztuk 100-zal. A liposzóma frakcióhoz asszociálódó aktivitást /0,16-1,09 %/ kivontuk a LUV-val és REV-vel kapott adatokból. Három kísérletsorozatot végezve a mérések számtani átlagát és a legnagyobb ill. legkisebb értékét tüntettük fel.

IV. 1. 2. λ cI857Sam7 fág liposzómába való bezárhatóságának vizsgálata

Úgy gondoltuk, hogy a csupasz, lineáris DNS kompaktabb szerkezetűvé tételével a DNS LUV-ba való bezárhatósága megnövelhető. Mivel a természetben előforduló kompakt szerkezetű DNS legkönnyebben kezelhető típusa a fág, ezért megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a λ cI857Sam7 fágnak és tisztított DNS-ének liposzómába való bezárhatóságát különböző DNS koncentrációknál /5. ábra/. Jó bezárási hatékonyságokat kaptunk a fág használata esetén, amelyeket a fág koncentrációja nem befolyásolt /legalábbis a vizsgált 200-5000 μ g fág DNS/ml-es tartományban/: 5,5 - 11,6 %-os volt a bezárás. A csupasz fág DNS viszont semmilyen vizsgált koncentrációnál nem volt számottevő mértékben bezárható, mivel a liposzómával asszociált DNS mennyisége hasonló volt a kontrolnál kapott értékkel. Ezt erősítették meg a jódozott fág DNS-sel végzett kísérletek is /1. táblázat/.

IV. 1. 3. További vizsgálatok a DNS-ek liposzómába zárhatóságára

Mivel a vad λ mbdánál kisebb molekulatömegű λ gtWESneo fág jóval nagyobb bezárási hatékonyságot mutatott, megvizsgáltunk több különböző fágot a LUV-ba való bezárhatóság szempontjából (2. táblázat). Arra hogy vajon a fágok a bezárás során és után megőrzik-e integritásukat megnéztük, hogy a DNS bezárásával párhuzamosan hogyan vál-



5. ábra: Koncentráció hatása a fágba zárt és a csupasz DNS liposzómába zárhatóságára.

Különböző /200, 500, 1500, 2000 és 5000 μ g/ml-es DNS koncentrációknál vizsgáltuk a csupasz és a fágfejben lévő λ cI857Sam7 DNS LUV-ba /5 μ mol PS, 5 μ mol CH egy liposzóma készítési reakcióra/ való beépíthetőségét. A DNS mennyiségét agaróz gélelektroforézis után mértük koncentráció sorozattal összehasonlítva, ahogy az "Anyagok és módszerek"-ben leírtuk. A be nem zárt fág jobb szeparációja érdekében az első mosási eljárás előtt proteináz-K kezelést alkalmaztunk /25 μ g/ml-es koncentrációban a kb. 20 ml-es NHTE pufferben; 37 $^{\circ}$ C, 30'/. Kontrolként /K/1000// az előre elkészített és egyszer centrifugálással mosott LUV-hoz adtuk a fág /ill. fág DNS/ 1 mg/ml-es MNHT-s oldatának 100 μ l-ét és 100 mM EDTA-s közegben 37 $^{\circ}$ C-on, 30'-en át inkubáltuk 25 μ g/ml proteináz-K-val, majd az előzőekhez hasonló módon szeparáltunk.

DNS konc. ($\mu\text{g/ml}$)	Liposzóma-asszociált fág DNS (%)
50	0,50
100	0,27
200	2,45
500	0,89
1500	0,62
2000	0,57
5000	0,35
K(1000)	0,38

1. táblázat: ^{125}I -jelölt $\lambda\text{CI856Sam7}$ DNS liposzómába való bezárhatósága különböző DNS koncentrációknál.

A jódtól izotóppal jelölt fág DNS mennyiségi eloszlását alikvótok aktivitásának mérésével végeztük a liposzóma mosási frakciókból és a liposzómás frakciókból, hasonlóan az 4. ábránál leírtakhoz.

Fág (bp)	Liposzómához asszociált fág DNS (%)	
	Proteináz-K kezelés	Nincs PK kezelés
λ gtWES λ B (40725)	44-51 /2/	40-59 /2/
λ gtWESneo (42174)	29-44 /3/	48-61 /6/
EMBL4 (43225)	15-25 /2/	29-42 /2/
λ gtWESneo ⁻ 10 (48480)	14-20 /2/	21-32 /2/
λ cI857Sam7 (48502)	6-12 /5/	8-20 /4/

2. táblázat: Különböző molekulatömegű fágok liposzómába /LUV/ zárhatósága, //-ben a kísérletek száma.

Minta		DNS bezárása (%) Fehérje bezárása(%)	
λ cI857Sam7 fág LUV-ba	PK-	15,8 (8-20)	5,7 (4-7) /4/
	PK+	8,1 (6-12)	3,6 (2-6) /5/
λ cI857Sam7 fág LUV-val	PK-	3,7 (3-5)	5,2 (4-6) /3/
	PK+	1,5 (1-3)	1,4 (0-3,5) /3/
λ cI857Sam7 fág REV-be	PK-	19,1 (9-29) $\Rightarrow$ 3,4	43.2 (19-67) /2/
	PK+	11,5 (7-16) $\Rightarrow$ 2,7	10,8 (8-14) /2/
λ cI857Sam7 fág	PK-	4,1 (3-5)	1.2 (0.0-3,5)/3/
	PK+	1,5 (1-2,7)	0,0 (0-0,0) /3/

3. táblázat: λ cI857Sam7 fág liposzómába zárhatósága. A DNS tartalmat agaróz gélen való hígítással, a fehérjét Peterson módszerével (52) mértük; ()-ben a kapott szélsőértékek, //-ben a kísérletek száma. A nyillal $\Rightarrow$ / jelzett érték a kiindulási DNS-hez hasonló nagyságú DNS arányát mutatja az össz-DNS-hez viszonyítva.

Minta	DNS bezárása (%)	Fehérje bezárása(%)
λ gtWESneo fág LUV-ba PK- PK+	54,5 (48-61) 36,7 (29-44)	23,5 (18-28) /6/ 12,2 (7-18) /3/
λ gtWESneo fág LUV-val PK- PK+	29,2 (16-34) 18,8 (16-22)	23,5 (18-28) /3/ 4,5 (2-7) /3/
λ gtWESneo fág REV-be PK- PK+	20,3 (8-41) $\Rightarrow$ 7,2 11,5 (7-16) $\Rightarrow$ 2,6	30,4 (14-42) /4/ 4,3 (3-5) /3/
λ gtWESneo fág PK- PK+	6,2(2,7-10,4) 0,7 (0-1,5)	2,4 (0,0-3,8)/3/ 0,2 (0.0-0,5)/3/

4. táblázat: λ gtWESneo fág liposzómába zárhatósága. A DNS tartalmat agaróz gélen való hígítással, a fehérjét Peterson módszerével (52) mértük; ()-ben a kapott szélsőértékek, //-ben a kísérletek száma. A nyillal $\Rightarrow$ jelzett érték a kiindulási DNS-hez hasonló nagyságú DNS arányát mutatja az össz-DNS-hez viszonyítva.

Minta	Kicentrifugálható fágok titere (%)	
	Össztiterre	Kiindulásra
PK- λcI857Sam7 fág LUV-ba	22,1	$2,1 \times 10^{-3}$
PK+ λcI857Sam7 fág LUV-ba	17,9	$7,6 \times 10^{-4}$
PK- λcI857Sam7 fág LUV-val	15,5	$1,6 \times 10^{-3}$
PK+ λcI857Sam7 fág LUV-val	5,5	$5,8 \times 10^{-4}$
PK- λcI857Sam7 fág REV-be	21,8	$2,8 \times 10^{-5}$
PK+ λcI857Sam7 fág REV-be	61,6	$4,9 \times 10^{-6}$
PK- λcI857Sam7 fág	0,04	$6,2 \times 10^{-6}$
PK+ λcI857Sam7 fág	2,2	$5,7 \times 10^{-7}$

5. táblázat: λcI857Sam7 fág titereinek változása a liposzómák-
kal való kölcsönhatás során. A táblázatban a differenciál centrifu-
gálás csapadékából mért titert tüntettük fel az összes kapott ti-
ter és a bevitt titer $/2-3 \times 10^{12}$ plakk; kiindulásra/ százalékában.
A titrálást a reakciók után egy nappal végeztük el. Hasonló körülmények között inkubált fág össztitere centrifugálások nélkül 1 % alá csökkent PK kezelés nélkül is.

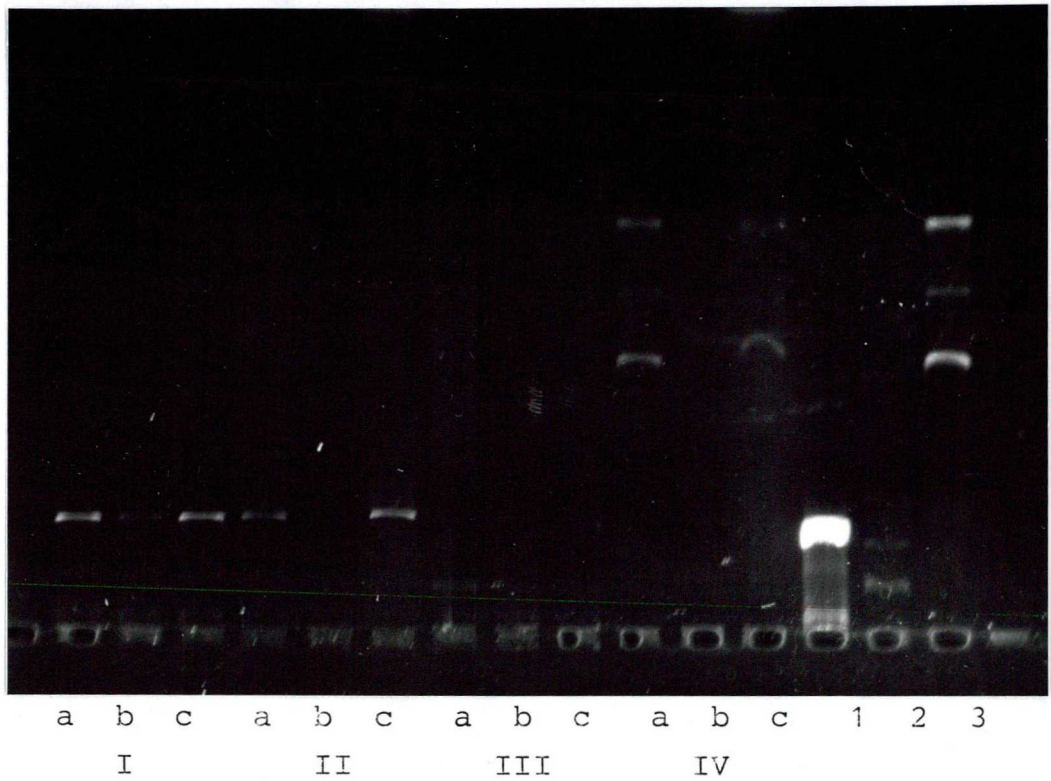
Minta	Kicentrifugálható fágok titere (%)	
	Össztiterre	Kiindulásra
λ gtWESneo fág LUV-ba	PK-	12,4-18,9
	PK+	2,7-4,2 $\times 10^{-2}$
λ gtWESneo fág LUV-val	PK-	10,7-37,2
	PK+	0,3-1,0 $\times 10^{-2}$
λ gtWESneo fág REV-be	PK-	2,8-14,5
	PK+	0,9-4,4 $\times 10^{-2}$
λ gtWESneo fág	PK-	21,0-58,0
	PK+	1,3-3,5 $\times 10^{-3}$
λ gtWESneo fág	PK-	0,5- 4,6
	PK+	0,1-3 $\times 10^{-3}$
λ gtWESneo fág	PK-	1,0-9,2 $\times 10^{-3}$
	PK+	0,3-8,0 $\times 10^{-6}$

6. táblázat: λ gtWESneo fág titereinek változása a liposzómákkal való kölcsönhatás során. A táblázatban a differenciál centrifugálás csapadékából mért titert tüntettük fel az összes kapott titer és a bevitt titer /2-3 $\times 10^{12}$ plakk; kiindulásra/ százalékában. A titrálást a reakciók után egy nappal végeztük el. Hasonló körülmények között inkubált fág össztitere centrifugálások nélkül 12-21 %-ra csökkent, míg PK-val kezelve 1,5-5 %-ra.

Minta	DNS bezárása (%)	Kísérletek száma
pAG60 DNS LUV-ba	1,5 (0,6-2)	3
pAG60 DNS REV-be	20,0 (17-25) ⇒ 12,6	3

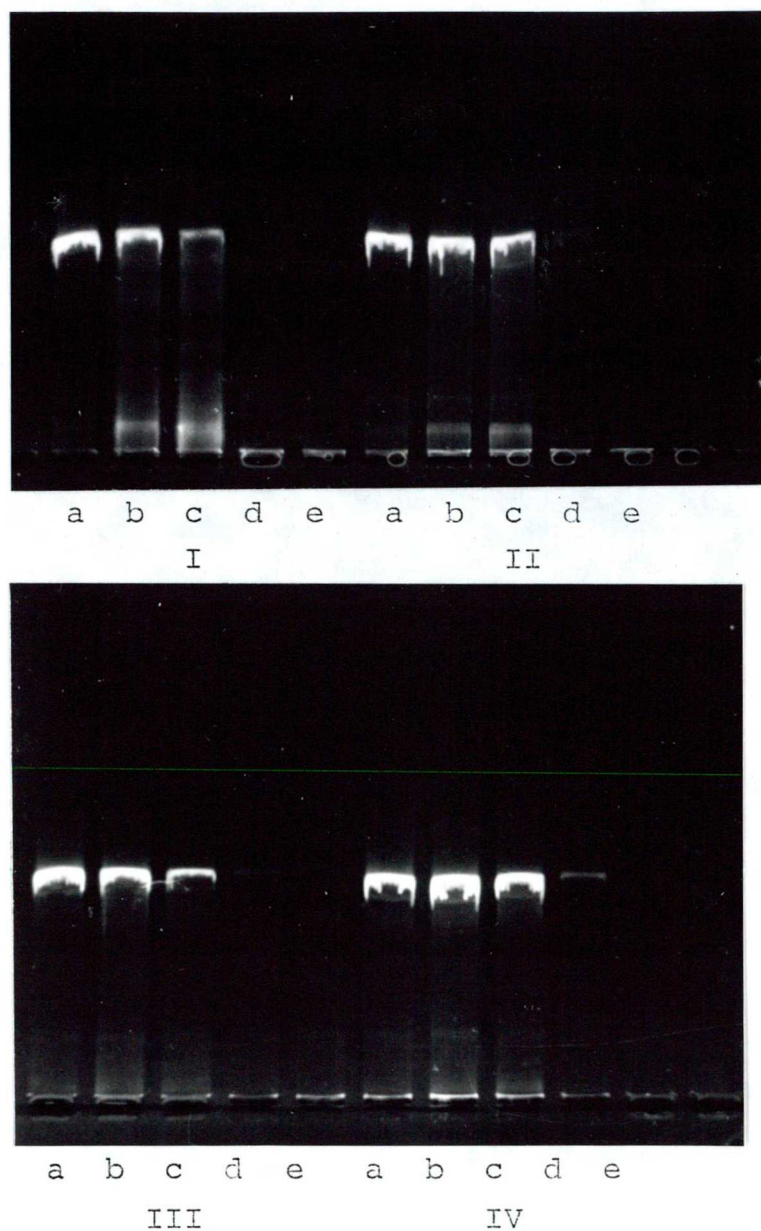
7. táblázat: pAG60 liposzómába zárhatósága. A nyíllal jelzett /⇒/ érték a kiindulási DNS-hez hasonló nagyságú DNS arányát mutatja az össz-DNS-hez viszonyítva, a ()-ben pedig a szélsőértékek.

tozik a fehérje mennyisége /3. és 4. táblázat/, valamint a fág titere /5., 6. táblázat/. A következő táblázat /7./ a pAG60 plazmid LUV-ba és REV-be zárhatóságát mutatja. Mint az 5., 6 és 9. táblázat mutatja, a REV módszer esetén elért magas bezárási hatékonyságok a nagy molekulatömegű DNS-sel megtévesztőek, mert agaróz gélen nézve a közel eredeti nagyságú DNS aránya jóval kisebb. Mindezt jól demonstrálja a 6. ábra, ahol EtBr festéssel vizsgáltuk ezt a jelenséget. Az első három minta a LUV módszerrel bezárt λ gtWESneo fágot mutatja, a második három pedig a REV-be való bezárást. Míg a LUV esetében a DNS méretében nincs változás és a bezárt DNS közelítőleg annyi mint a nem bezárt /azonos hígítások révén/, addig a REV esetében kenődés figyelhető meg, ami a DNS degradálódását mutatja, és jóval kevesebb DNS záródik be /a LUV-énak kb. 1/20-a/, mert a hígítás II/c esetében csak 20x, míg I/c-nél 400x és azonos fág mennyiségből indultunk ki a bezárás során. Ugyanezen ábrán mutatjuk be azt is, hogy a REV módszernél a csupasz DNS-nél a DNS nagyságától erősen függ a degradálódás mértéke, hiszen míg egy 11,5 kb-os plazmid /III/a-c/ esetén szinte alig látható bezárás és igen kifejezett az első felülúszóban, addig a 2,7 kb-os pUC18 DNS esetén jóval nagyobb az intakt plazmid aránya a liposzómákban. A következő /7./ ábrán azt mutatjuk be hogy a DNS liposzómába zárásának mérésére igen fontos a minták SDS-es, 68 °C-os kezelése az agaróz gélre való felvitel előtt. Jól látható, hogy a csíkok ílymódon élesebbek, hiszen a DNS egyenletes futását zavaró liposzómát /és fágok használata esetén a fágfejet/ szétromboljuk ezzel a kezeléssel. Ezen az ábrán látható az is hogy a REV módszer esetén is jobb a fág

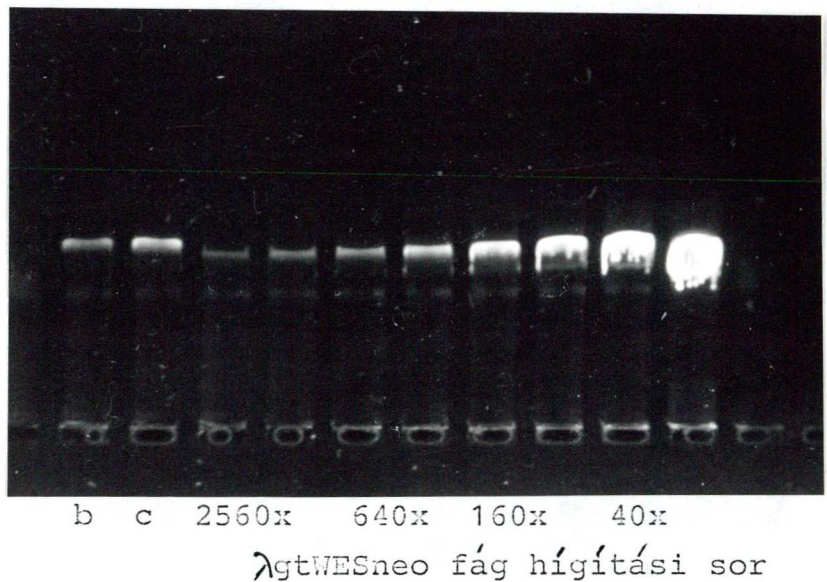
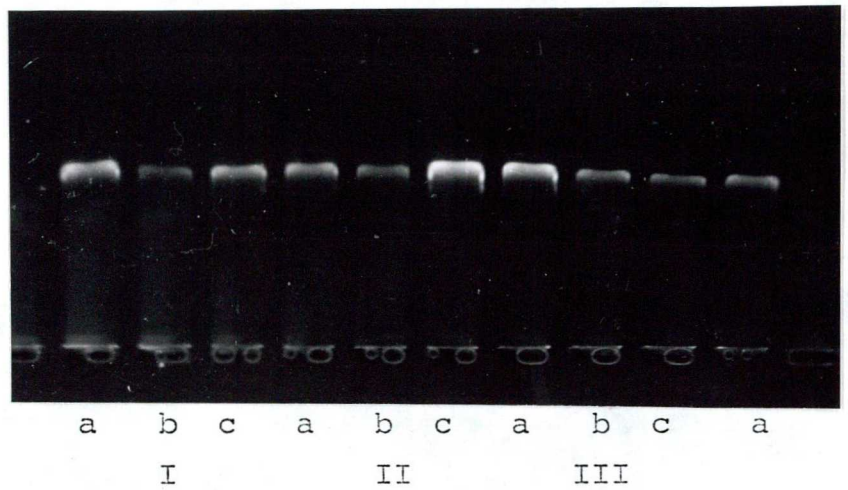


6. ábra: A LUV és a REV képzési körülményeinek hatása a bezárni kívánt DNS-re.

I: λ gtWESneo fág LUV-ban, II: λ gtWESneo fág REV-ben, III: pNMFCat REV-ben, IV: pUC18 REV-ben, 1: λ gtWESneo fág DNS 50x híg.; 2: pNMFCat 50x híg.; 3: pUC18 50x híg.; a: fu/1/, 400x híg.; /kiv.: III. 20x híg./; b: fu/2/, 400x híg. /kiv.: III. 20x híg./; c: csap.: 20x híg. /kiv.: I. 400x híg., III. 10x híg./; λ gtWESneo: 42174 bp, pNMFCat: 11414 bp, pUC18: 2686 bp, A futtatás 0,8%-os agaróz gélen történt.



7. ábra: A liposzómába zárt DNS agaróz gélen való elektroforézise különböző körülmények között. I. minta-puffer /50% gl., 250mM EDTA, 0,15% bróm-fenolkék/; II. I+ 68 C, 10 perc; III. I+ 2% SDS; IV. III+ 68 C, 10 perc; a: λ gtWESneo DNS; b: λ gtWESneo fág; c: λ gtWESneo fág LUV-ban /2x töménység/; d: λ gtWESneo fág REV-ben /5x t./; e: λ gtWESneo DNS REV-ben /5x t./;



8. ábra: λ gtWESneo fág LUV-ba zárhatóságának mérése agarózgél /0,8%-os/ elektroforézissel.

I: λ gtWESneo fág LUV-ban, PK+; II: mint I., de PK-; III: λ gtWESneo fág LUV-val inkubálva, PK+; IV: mint III., de PK-;

a: fu/1/, 2x híg.; b: fu/2/, 2x híg.; c: csap. 1,5x híg.;

használata csupasz DNS helyett, mert így a DNS nagyobb része marad intakt állapotban. A 8. ábra a bezárás mérését demonstrálja az agaróz gélelektroforézises módszerrel: λ gtWESneo fág megfelelő hígítási sora mellett futtatva a liposzóma mosási felülúszókat és a liposzómákat a 6. ábránál ismertetett körülmények között, majd összehasonlítva, mely csíkok felelnek meg a hígítási soron a liposzómába bezárt DNS koncentrációnak, kiszámíthatók a DNS mennyiségek. A mosási felülúszók és a csapadék hígítási aránya 2 a 1,5-hez ami 400x ill. 300x hígítást jelent a kiindulási DNS-hez képest. Látható, hogy az előre elkészített liposzómához adott fág esetén a liposzómához asszociált fág DNS mennyisége kisebb mint amikor elvégeztük a bezárást.

IV. 2. Eukarióta sejtek genetikai transzformációja

IV. 2. 1. LMTK⁻ sejtek transzformációja

Az egér L sejtvonalaának tk⁻ típusa /LMTK⁻/ a szakirodalom alapján (54, 55) egyike a legjobban transzformálható sejtvonalaknak. Ezért először a liposzóma transzformációs rendszerünk hatékonyságának vizsgálatára LMTK⁻ sejteket használtunk fel /8. táblázat/. 10-20 μ g pAG60 plazmid-DNS-t használva a kalcium-foszfát koprecipitációs módszer néhányszor 10^{-3} -os nagyságrendet mutatott. Telítési liposzóma koncentráció felett /200 nmol PS/ 5×10^5 sejt/, s a Ca-foszfátos módszernél alkalmazott glicerol sokkolás-

Módszer	pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt	Transzformációs frekvencia	
		glicerín sokk	nincs sokk
CP	pAG60 DNS (11,2 μg)	$1-4 \times 10^{-3}$	$3-9 \times 10^{-4}$
CP	$\lambda\text{gtWESneoDNS}$ (0,8-3,0 μg)	$0,4-2,6 \times 10^{-4}$	-
LUV	$\lambda\text{gtWESneo}$ fág (0,2 μg)	$1,5-5,5 \times 10^{-4}$	$0,9-2 \times 10^{-3}$

8. táblázat: LMTK⁻sejtek transzformációja. A liposzómával való transzformáció során 200 nmol foszfolipidnek megfelelő liposzómát alkalmaztunk 5×10^5 sejtre, ami 0,2 μg pAG60-nak megfelelő $\lambda\text{gtWESneo}$ fág DNS-t zárt be, míg a kalcium-foszfát módszerrel /CP/ transzformált $\lambda\text{gtWESneo}$ fág DNS 5-20 μg -ja 0,8-3,0 μg pAG60 DNS-nek felelt meg. -: Nem vizsgáltuk.

sal valamivel kisebb volt a frekvencia. Glicerin sokk nélkül a LUV-ba zárt fág meghaladta a 10^{-3} -os nagyságrendet. Ez annál is érdekesebb volt, mert tisztított fág DNS-sel a Ca-foszfátos módszert használva a frekvencia $/0,4-2,6 \times 10^{-4}/$ 5 - 20 μg fág DNS-sel. Más liposzóma transzformációs körülményekkel /közvetlenül a transzformáció után alkalmazott glicerin sokk/ a glicerin sokk nélkülihez képest kb. további kétszeres növekedés volt elérhető.

IV. 2. 2. HeLa sejtek transzformációja a kalcium-foszfát koprecipitációs és a hagyományos liposzómás /REV/ módszerekkel

A továbbiakban a kísérleteket egy a kalcium-foszfátos koprecipitációval relatíve alacsony hatásfokkal transzformálható sejtvonallal végeztük, amelynek pAG60-nal való transzformációját az irodalomban már korábban közölték (48). A kapott eredmények a 9. táblázatban láthatók. Egy kis $/0,1 \mu\text{g}/$ és egy nagyobb $/5,6 \mu\text{g}/$ DNS mennyiséggel elvégezve a transzformációt glicerin sokk nélkül is, a kapott értékek 3-4-szer kisebbek voltak a glicerin sokkos megfelelőjüknél. Tisztított $\lambda\text{gtWESneo}$ fág DNS-sel a transzformáció frekvenciája valamelyest kisebb volt /11. táblázat/.

A pAG60 plazmid CsCl-dal tisztított, több mint 50 % szuperhelicális formát tartalmazó preparátumát viszonylag nagy hatásfokkal sikerült a REV-be bezárni $/60 \mu\text{g}$ plazmidból kiindulva $14,8 \mu\text{g}$ -ot kaptunk $8 \mu\text{mol}$ PS-ben a mosások után/. Ennek 400 nmol -jával transzformálva, glicerin sokkal /vagy anélkül/ $3-4 \times 10^{-5}$ -es transzformá-

DNS/lemez (μg)	Transzformációs frekvencia
11,2	$2,5 \times 10^{-4}$
5,6	$2,3 \times 10^{-4}$
0,5	$1,0 \times 10^{-4}$
0,1	$3,0 \times 10^{-5}$

9. táblázat: HeLa sejtek transzformációja kalcium-foszfát koprecipitációs módszerrel. /3,5 órával a transzformáció után 25 % glicerinrel sokkoltuk a sejteket/.

nmol foszfolipid/ lemez	μg DNS/ lemez	glicerín sokk	transzformációs frekvencia
400	0,74	+	3×10^{-5}
		-	4×10^{-5}
50	0,09	+	$1,5 \times 10^{-5}$
		-	3×10^{-5}
5	0,009	+	1×10^{-5}
		-	$1,5 \times 10^{-5}$

10. táblázat: HeLa sejtek REV-be zárt pAG60-nal való transzformációja.

Módszer	pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt	Transzformációs frekvencia	
		glicerín sokk	nincs sokk
CP	pAG60 DNS (5,6-11,2 μg)	$2,5 \times 10^{-4}$	$0,9 \times 10^{-4}$
	$\lambda\text{gtWESneo}$ DNS (1,5-3,0 μg)	$1,1 \times 10^{-4}$	$5,1 \times 10^{-5}$
REV	pAG60 DNS (0,5-0,7 μg)	3×10^{-5}	4×10^{-5}
	$\lambda\text{gtWESneo}$ fág (0,30 μg)	$3,1 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$
	$\lambda\text{gtWESneo}$ DNS (0,10 μg)	$1,4 \times 10^{-5}$	$0,8 \times 10^{-5}$

11. táblázat: A kalcium-foszfát és a REV módszer hatékonyságának összehasonlítása HeLa sejtek esetében.

ciós frekvenciát értünk el. Kisebb mennyiségű foszfolipidet felhasználva /ugyanolyan DNS-liposzóma aránynál/ a hatásfok valamelyest csökkent /10. táblázat/. A kalcium-foszfát és a REV módszer hatékonyságát mutatja a 11. táblázat összehasonlítva őket a maximálisan elérhető efficienciájuknál.

IV. 2. 3. Transzformáció LUV-ba zárt fággal

4 mg/ml-es fág oldattal készítve a LUV-ot kb. 220 μg fág DNS asszociált 4 μmol PS-LUV-hoz a mosások után. Különböző mennyiségű liposzómával vizsgáltuk a transzformációs folyamat hatásfokát /12. táblázat/. Glicerín sokkot alkalmazva az elért maximális transzformációs frekvencia kb. kétszerese volt a kalcium-foszfáttal elérhetőnek. Glicerín sokk nélkül találtunk egy koncentráció optimumot /10-50 nmol foszfolipid/ 5×10^5 sejt/, ahol a transzformációs frekvencia több mint egy fél nagyságrenddel meghaladta a kalcium-foszfát módszert. Kisebb koncentrációjú fág oldatból kiindulva /0,64 mg fág DNS/ml/ kisebb DNS koncentrációjú liposzómát kaptunk /35,2 μg λ gtWES DNS/ 4 μmol PS/. 200 nmol PS-nek megfelelő LUV-val elvégezve a transzformációt /glicerín sokkot alkalmazva/ kisebb hatásfokot kaptunk /13. táblázat/.

Az előre elkészített LUV-hoz adott fág transzformációs képessége igen alacsony volt, sőt ha nem távolítottuk el a liposzómához nem asszociált fágot centrifugálással, akkor további csökkenés következett be (14. táblázat/.

nmol foszfolipid/ lemez	µg pAG60 DNS lemez	glicerín sokk	transzformációs frekvencia
200	1,65	+	$5,1 \times 10^{-4}$
		-	$0,5 \times 10^{-5}$
80	0,66	+	$4,1 \times 10^{-4}$
		-	3×10^{-5}
36	0,26	+	$7,6 \times 10^{-5}$
		-	$1,5 \times 10^{-4}$
20	0,17	+	$2,6 \times 10^{-5}$
		-	$1,4 \times 10^{-3}$
2	0,07	+	$1,2 \times 10^{-4}$
		-	$7,1 \times 10^{-4}$
4	0,02	+	$0,1 \times 10^{-4}$
		-	$0,2 \times 10^{-4}$

12. táblázat: HeLa sejtek transzformációja különböző mennyiségű liposzómával. 1 µmol foszfolipidnek megfelelő liposzóma 55 µg λgtWESneo fág DNS-t tartalmaz.

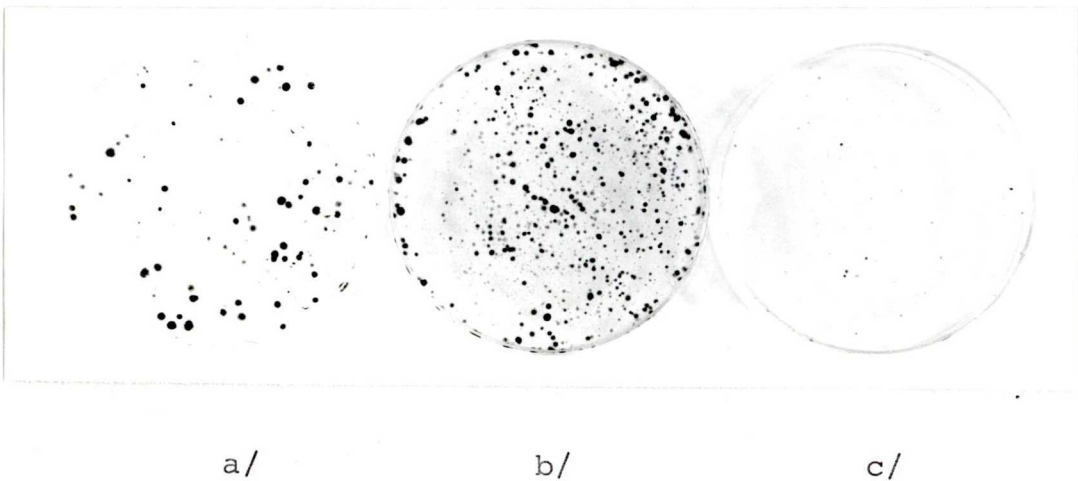
$\mu\text{g DNS/lemez}$	Transzformációs frekvencia
0,26	$1,8 \times 10^{-4}$
1,65	$5,1 \times 10^{-4}$

13. táblázat: HeLa sejtek transzformációja különböző DNS koncentrációjú liposzómákkal. 5×10^5 sejtre (egy lemez) 200 nmol foszfolipidet használtunk.

Módszer	pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt	Transzformációs frekvencia	
		glicerín sokk	nincs sokk
(200nmol fl.) LUV	λ gtWESneo fág (1,7 μ g)	$5,1 \times 10^{-4}$	$0,5 \times 10^{-5}$
(20nmol fl.)	λ gtWESneo fág (0,17 μ g)	$2,6 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-3}$
LUV + fág (6 óra ink., dcf.) (60nmol fl.)	λ gtWESneo fág (0,17 μ g)	$3,5 \times 10^{-5}$	6×10^{-5}
LUV + fág (5' ink., dcf.) (60nmol fl.)	λ gtWESneo fág (0,5 μ g)	$0,5 \times 10^{-5}$	0

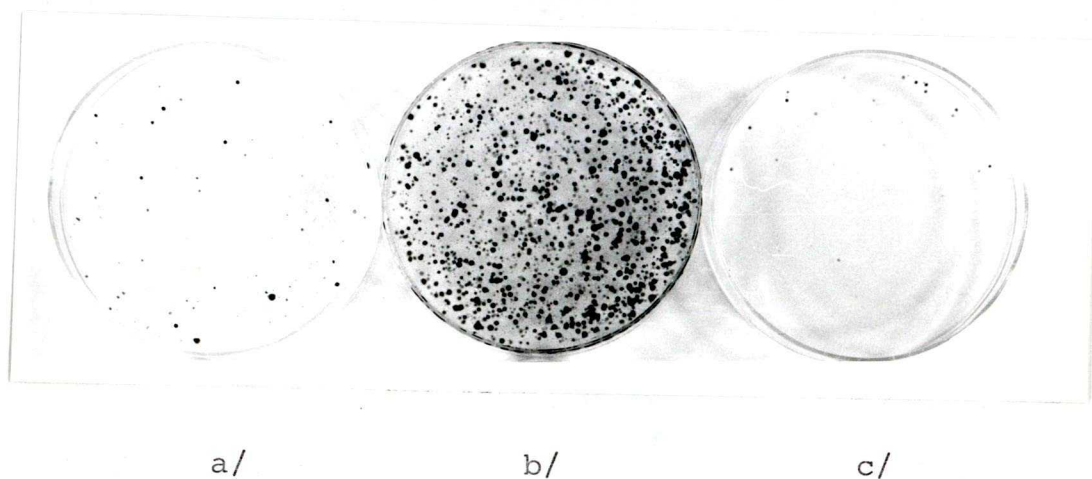
14. táblázat: HeLa sejtek transzformációja LUV-hoz asszociált λ gtWESneo fággal. Az optimálisnak talált liposzóma mennyiségeket hasonlítottuk össze.

A HeLa sejtek kalcium-foszfáttal, REV-vel és LUV-val való transzformációjának tipikus képét mutatja a G418-szelekció és a kristályibolyával való megfestés után a 9. és 10. ábra.



9. ábra: HeLa sejtek transzformációja a/ CP-vel ($5,6 \mu\text{g}$ pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt), b/ LUV-ba zárt λ gtWESneo fággal (200 nmol fl., azaz $1,65 \mu\text{g}$ pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt), c/ REV-be zárt pAG60-nal (400 nmol fl., azaz $0,74 \mu\text{g}$ pAG60 DNS/ 5×10^5 DNS). 3,5 órával a transzformáció után 25%-os glicerinnel sokkoltuk a sejteket. 48 órával a transzformáció után a sejteket 10 cm-es Petri-csészére tripszinez-tük át és $400 \mu\text{g/ml}$ G418-tartalmú tápoldatot adtunk. A túlélő, transzformáns kolóniákat 18 nap múlva festettük meg kristályibolyá-val.





10. ábra: HeLa sejtek transzformációja a/ CP-vel ($5,6 \mu\text{g}$ pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt), b/ LUV-ba zárt λ gtWESneo fággal (20 nmol fl., azaz $0,17 \mu\text{g}$ pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt), c/ REV-be zárt pAG60-nal (50 nmol fl., azaz $0,09 \mu\text{g}$ pAG60 DNS/ 5×10^5 DNS). 48 órával a transzformáció után a sejteket 10 cm-es Petri-csészére tripszineztek át és $400 \mu\text{g/ml}$ G418-tartalmú tápoldatot adtunk. A túlélő, transzformáns kolóniákat 18 nap múlva festettük meg kristályibolyával.

V. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

V. 1. Nagy molekulatömegű DNS liposzómába zárása

A különböző molekulatömegű DNS-ekkel elvégzett bezárási kísérleteink igazolták azt /az irodalmilag is megfigyelt, de összefüggéseiben nem vizsgált/ tényt, hogy a Ca^{2+} -EDTA kelációs módszer a nagy molekulatömegű DNS-t csak kis hatékonysággal zárja be (34, 40, 41). Adataink /4. ábra/ azt mutatják, hogy ennek oka a DNS kiterjedésében kereshető: a vizsgált /0,5-32 kb-os/ tartományban a lineáris DNS nagyságának /hosszának/ logaritmusával egyenes arányban csökken a bezárási hatékonyság logaritmusa. A negatív töltésű DNS, a negatív töltésű PS-liposzómákhoz csak úgy tud asszociálni, ha azok belsejében helyezkedik el, ehhez pedig a vezikulumok mérete túl kicsi egy bizonyos DNS nagyság után: a LUV liposzómák mérete a 200-1000 nm-es tartományba esik /úgy hogy a kisebb átmérőjű populáció dominál (30)/, míg egy 1 kb-os DNS 340 nm hosszú és 2 nm átmérőjű (55). Így érthető, hogy a több mint 50 % szuperhelikális szerkezetű plazmidot tartalmazó pAG60 /6306 bp/ preparátumra háromszor akkora bezárást kaptunk /7. táblázat/, mint ami a lineáris méretéből következett volna /4. ábra/.

Az irodalom szerint legáltalánosabban használt módszer, az un. REV nagy DNS molekulákat is jó hatékonysággal zár be (40, 41), viszont így a molekulák nickelődnek és törhetnek (35). Mi ezt a következőképpen magyarázzuk: a REV preparálása során a vizes ol-

datot /amely tartalmazza a DNS molekulákat/ apró, szubmikroszkópos cseppekre diszpergáljuk /2. ábra/, amelyeket szerves fázis vesz közre, így a DNS molekulák összetekeredés, csavarodás és hajlás révén kompaktabb szerkezetet vesznek fel, ami nagy bezárási hatékonysághoz vezet /hiszen a szerves oldószer eltávolítása után a liposzómák belsejében "találják magukat"/. Azonban az ilyen állapot kialakítása /ultrahangozással/ a DNS egyik vagy mindkét szálának töréséhez vezet /különösen a nagy molekulatömegű DNS viszkózus oldatának esetén/. Így a radioaktívan jelölt DNS-sel kapott REV-bezárási értékek /ez a módszer terjedt el az irodalomban a bezárás mérésére/ nem adják meg az intakt nagyságú DNS valódi bezárási adatait. Ha a REV-bezárási végtermékeit vizsgáljuk, akkor szükséges a DNS koncentrálása, hogy a nagy mennyiségű, de heterogén degradálódási termékeket vizsgálhassuk /6. és 7. ábra/: a szuperhelikális plazidszerkezet /természetesen a plazmid nagyságtól függően/ jobban ellenáll a REV képzés során történő degradációnak, mint a lineáris fág DNS. Az intakt állapotú termék aránya a plazmid molekulatömegének növekedésével szintén lecsökken.

Mindezek alapján véltük úgy, hogy a fágfejbe zárt DNS /természetes kompakt szerkezete révén/ nagyobb hatásfokkal lesz csomagolható LUV-ba, mint a csupasz DNS és ezen művelet enyhe módja biztosítani fogja, hogy ne történjen DNS degradáció. Az ily módon képezett liposzómákhoz a DNS olyan nagy mértékben asszociált, hogy ez több nagyságrenddel meghaladta a csupasz DNS-sel elért bezárásokat /5. ábra ill. 1. táblázat és 4. ábra/ és egy nagyságrenddel a kis molekulatömegű DNS-sel elért eredményt /4., 5. ábra

és 7. táblázat/. A liposzómához asszociált DNS mennyisége jelentősen függött a fág stabilitásától /EDTA hatását a rövidebb DNS-t tartalmazó fágfejek viszonylag jól tolerálják, míg a vad lambdával megegyező, vagy annál nagyobb DNS-t tartalmazó fágok EDTA hatására hamar szétesnek Mg^{2+} -ion elvonás miatt (57)/. Ezért a vad lambdánál rövidebb rekombináns fágokkal tovább növelhető a liposzómába beépített DNS aránya /2. táblázat/. Arra, hogy a liposzómához asszociált fágból mennyi volt a liposzómába zárva és mennyi helyezkedett el a liposzómák felületén, közelítőleges becslést adott a liposzóma képzés utáni proteínáz-K kezelés, ez ugyanis képes az EDTA-val fellazított fágfej degradációjára. Így a fág DNS-e kiszabadul és a differenciál centrifugálás nem ülepíti ki csak liposzómába zárt DNS-t /s az épen maradt fágok kis hányadát/. Ennek alapján adataink /2., 3., 4. táblázat, 8. ábra/ azt mutatták, hogy a fág DNS-eknek legalább a fele stabil asszociációba került /azaz beépült/ a liposzómával. Mindezen adatok azt is mutatják, hogy a fág vagy inkább a fágfehérjék egy része rendelkezik egy bizonyos kötődési képességgel a negatív töltésű foszfatidil-szerin liposzómákhoz /az elkészített LUV-hoz adott fág DNS ill. fágfehérje egy része is stabil asszociációba került a liposzómákkal/. Megnéztük, hogy a fágok milyen mértékben maradtak meg eredeti szerkezetükben a liposzóma képzés után /a preparátumokat néhány csepp kloroformmal kezeltük, majd megtitráltuk őket NM259 baktériumon/. Az 5. és 6. táblázat alapján azt mondhatjuk, hogy a fágok függetlenül attól, hogy LUV-ba zártuk vagy LUV-hoz adtuk őket, túlnyomórészt elvesztették eredeti, aktív /baktérium fertő-

zõ/ képességüket. Ezen EDTA-függő folyamat /a proteináz-K és a centrifugálás-felszuszpendálás mindezt természetesen fokozza/ azonban időben jóval lassúbb lefutású mint a liposzóma /LUV/ képződése ill. a fágok LUV-hoz asszociálódása, mert /és ez az instabilabb λ CI857Sam7 esetében jobban látható/: a kiülepíthetőség nagyobb a liposzómák jelenléte esetén, mint nélkülük.

A fágok REV-be zárása megerősíti a csupasz DNS-nél tapasztaltakat: adataink azt mutatják, hogy a stabilabb fág / λ gtWESneo/ jobban védi a degradálódástól a fág DNS-t, mint az instabilabb λ CI857Sam7 /közel kétszeresen: 3. és 4. táblázat/. Továbbá a fágba zárt DNS intaktabb maradt a REV preparálás után mint a csupasz /7. ábra/. A fág-titer meghatározások /5. és 6. táblázat/ pedig azt mutatják, hogy közel két nagyságrenddel kevesebb ép fág marad meg a REV-képzés után, mint a LUV-nál, de ennek túlnyomó része asszociált a REV-hez.

A DNS liposzóma általi védettségét mind a LUV, mind a REV esetében igazolja az a tény, hogy SDS és hőkezelés szükséges /7. ábra/ a mintáknak az agaróz gélen való futtatásához: csak így kapunk a csupasz DNS-re jellemző futási képet, egyébként a liposzóma /mint a fágfej/ akadályozza a szabályos elektroforézist.

V. 2. Szövettenyésztett sejtek transzformálása.

Liposzómáink transzformáló képességét először egy kalcium-foszfát módszerrel jól transzformálható /és ilyen célra gyakran

használt/ sejtvonallal, az LMTK⁻-val vizsgáltuk meg. Az irodalomban leírt (54) 10^{-3} -os nagyságrendet kaptunk, ha a kísérleteket CsCl-on tisztított pAG60 plazmid DNS-sel végeztük el, kalcium-foszfát-DNS koprecipitációt használva. Azonban ez a módszer jóval kisebb eredményt adott a λ gtWESneo fág DNS-ére. Mivel úgy találtuk, hogy a 10^{-4} -es /maximális/ transzformációs frekvencia a fág DNS 10-20 μ g-jával volt elérhető, valószínűnek tűnt, hogy a DNS nagyság az oka a pAG60-nál alacsonyabb transzformációs képességnek, nem pedig a preparátumok esetleges szennyezettsége /fág DNS-t a CsCl-on tisztított fágból proteináz-K kezelés után fenolozással és alkoholos kicsapásokkal állítottuk elő/. A LUV-ba zárt fággal történő transzformáció, amelyet 200 nmol foszfolipiddel /lemezenként 5×10^5 sejttel/ végeztünk el, akkor a fág DNS kalcium-foszfátos transzformációját többszörösen meghaladó értékeket kaptunk, de alatta maradtunk a pAG60 plazmidos kalcium-foszfátos értékeknek. Ha a transzformációk során nem alkalmaztunk glicerint sokkot, akkor a pAG60 CP-tal és a fág LUV-val történő transzformációja közel azonos értékeket adott. Ha a sokkolást /2'; 25 % glicerint/ a transzformáló anyag hozzáadása után 30'-cel végeztük el, akkor a CP esetén gyakorlatilag nem történt változás a nem sokkolthoz képest, míg a LUV esetében az eredmények meghaladták a 10^{-3} -os nagyságrendet. Mindezen jelenségek magyarázatára a HeLa sejtekenél visszatérünk.

Megállapítva azt, hogy a liposzómáink képesek a CP-vel jól transzformálható LMTK⁻ sejtvonalt transzformációjára, részletesebb vizsgálatokat végeztünk el HeLa sejteken, mert kíváncsiak vol-

tunk, hogy a mi megközelítésünk milyen eredményre vezet a nem elég jól működő CP-hez képest. Különböző koncentrációjú DNS-sel azt kaptuk /az LMTK⁻-hoz hasonlóan/, hogy a 10-20 µg-os tartományban van a transzformáció optimuma /9. táblázat/, s a tisztított λgtWESneo DNS-sel jelentősen kisebb eredmény volt elérhető mint a pAG60 DNS-sel /11. táblázat/. A hagyományos REV módszer mindezeknél csekélyebb hatásfokkal működött, s a fág DNS /ill. fág/ és a plazmid DNS között nem volt jelentős eltérés /10. és 11. táblázat/. Talán a fágfej védőhatását mutatja az, hogy a REV-be zárt fág valamivel jobban transzformált mint a REV-ben lévő csupasz DNS.

Ehhez képest igazi meglepetést hozott a LUV-ba zárt fággal történő transzformáció /12. táblázat/, ugyanis ennek frekvenciája egy nagyságrenddel meghaladta a REV módszert és optimális feltételeket biztosítva /mindkettőnek a maximumánál mért értékek/ a CP módszernél is hatásosabbnak bizonyult. Ennek feltétele azonban az volt, hogy kellő töménységű fágból induljunk ki a LUV preparálása során. A kiindulási fág koncentráció csökkentése ugyanis egyúttal jár a beépült fág DNS lipidhez viszonyított mennyiségének a csökkenésével, s ez kisebb transzformációs frekvenciához vezet /13. táblázat/. A fág és a liposzóma együttes jelenléte nem elégséges feltétele a transzformációnak, mert a LUV-hoz adott fág legalább két nagyságrenddel alacsonyabb értékeket adott /14. táblázat/, pedig a fág mellett lévő Mg²⁺-ionok liposzóma romboló hatásának elkerülésére megfelelő mennyiségű EDTA-t használtunk. Azonban paradox módon, ha a fágot differenciál centrifugálással eltávolított-

tuk /a LUV-hoz adás után 6 órával/, akkor a transzformációs érték számottevően nőtt. Mindez valószínűleg azért következett be, mert a LUV-hoz asszociált fágok egy része bejuttatta valamilyen módon a DNS-ét a liposzómába.

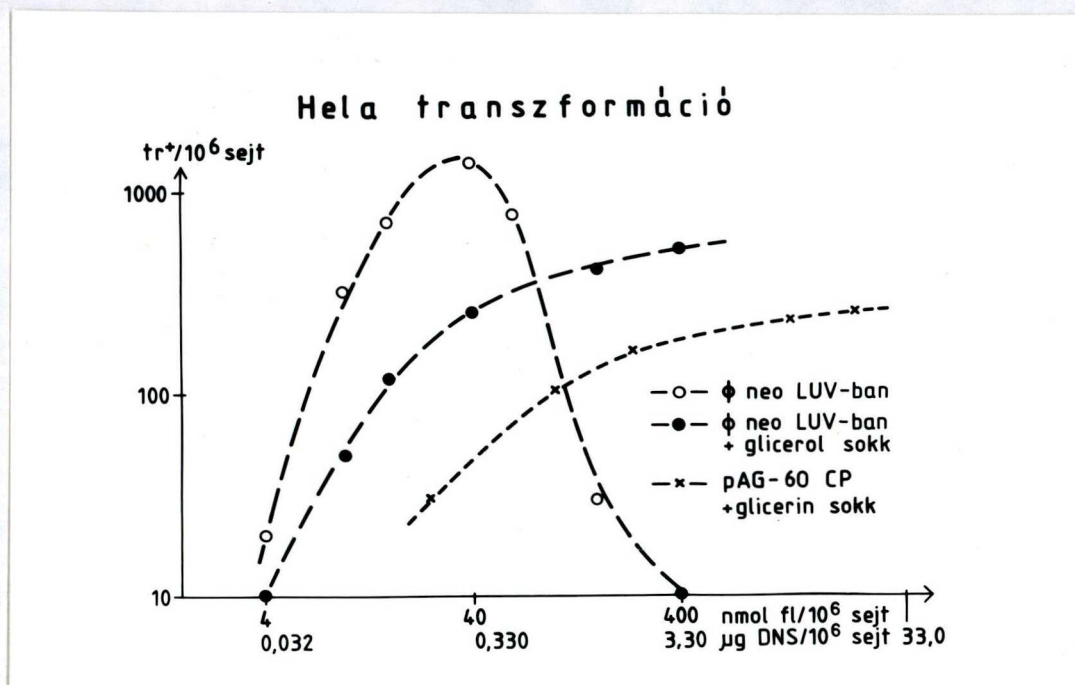
A LUV-ba zárt fág REV-hez képest nagyságrenddel nagyobb transzformációs frekvenciáját több tényező magyarázhatja, amelyek közül a legfontosabbnak az tűnik, hogy megnövekedett a liposzómába zárt /intakt állapotban maradt/ DNS mennyisége. Ennek elérése valószínűleg azért sikerült, hogy megnövekedett a DNS-sel töltött liposzómák aránya az üres LUV-okhoz képest. Mivel a liposzóma képződésekor a fágok szerkezete felbomlik, a fágburok védőhatása a liposzómákkal szemben csak kis mértékben és közvetett módon /pl. ahogy az RN-ázzal megfigyelték (23): RN-áz kezelés érdekes módon megnövelte néhányezerosára a LUV-ba zárt poliovírus titerét/ érvényesült. Mindezt alátámasztja, hogy a LUV-ba zárt fágok PK kezelése csak kis mértékben csökkentette a transzformációs hatásfokot.

A LUV koncentráció változtatása, a glicerín sokk alkalmazása vagy nem alkalmazása jelentős különbségeket okozott /az LM⁺ sejtekhez hasonlóan/ a transzformációs frekvenciában. /A 30'-es glicerín sokk a HeLa sejtek esetében változó sikerrel volt alkalmazható. A kísérletek több mint a felében a sokk során lejött a sejtek nagy része, azonban az olyan kísérletben ahol a sejtek rögzülve maradtak a lemezen az eredmény valamelyest meghaladta a glicerín sokk nélküliekét/. A CP-os, a glicerín sokkos és sokk nélküli eredmények ábrázolása /11. ábra/ jelentős különbségeket mutat. Mind a kalcium-foszfátos, mind a LUV-os transzformáció /glicerín

sokkal/ a megfelelően magas DNS /liposzóma/ koncentrációs tartományban telítést ér el /természetesen ennél jóval nagyobb mennyiségek a transzformáció csökkenéséhez vezetnek/. A kalcium-foszfátos, nem glicerinnal sós eredmények /nem árázva/ hasonlóak a glicerinnal sós megfelelőjükhöz, úgy hogy az abszolút értékek legalább 3-4-szer kisebbek voltak. A glicerinnal sós nélküli LUV transzformáció egy optimumgörbét adott 20-100 nmol foszfolipid/ 10^6 sejt tartományban. A glicerinnal sós hatásmechanizmusa /az irodalom szerint/ egyrészt az, hogy egy makropinocitózisra emlékeztető folyamat szerint /érzékeny a sejtlégzésgátlókra és a klorokvin, az ammonium-klorid és egyéb lizoszómagátlók növelik a glicerinnal sós hatását/, másrészt más ozmotikus sokkhoz /pl. DMSO (59)/ hasonló hatása miatt elősegíti a DNS sejtmagba jutását a lizoszómális rendszerből. Ezek alapján valószínű, hogy a DNS felvétel és a sejtmagba jutás mechanizmusa más: míg a kalcium-foszfát-DNS koprecipitátum a sejtekhez adás utáni második órától jelenik meg a sejtekben és 8-10 óra múlva éri el a csúcspontot (59), addig a liposzómák tartalmukat már 30' múlva bejuttatják (42) a sejtekbe. Így érthető, hogy a CP módszer esetében 4 óra után, a liposzómás géntranszfer esetében 30' után /olyan sejteknél amelyek ezt kibírják/ hatásos a glicerinnal sós. Véleményünk szerint a mi liposzómáinknál a glicerinnal sokkra kapott eltérő viselkedés oka az lehet, hogy a LUV-hoz kötődő fagfóhájék a liposzómák olyan komplexét alakítják ki, amely nagy liposzóma koncentrációban a kalcium-foszfát csapadékhoz hasonló módon kerül a sejtbe /ill. sejtmagba/. Míg alacsonyabb liposzóma koncentrációnál /a sejt liposzóma kötő-

helyeinek telítésénél: kb. 10^4 /sejt, azaz kb. 100 nmol PS/ 10^6 sejt (37, 40, 41, 43)/, ill. az alatt a "hagyományos" liposzóma bejutási mód jut érvényre.

A transzformáció hatékonyságát kifejezhetjük az egységnyi DNS /1 μ g/ által, adott számú sejten / 10^6 / elérhető transzformánsok számával. Ha a különböző módszereket összehasonlítjuk, akkor az általunk képzett liposzómák hatékonysága szembetűnően magas /természetesen, ha a fág DNS-be épített pAG60 méretét vesszük számításainkhoz alapul/. Ez azt mutatja /15. táblázat/, hogy adott számú DNS molekulából módszerünk képes a legtöbbet hatékonyan /transzformációt okozva/ bevinni a sejtekbe, pontosabban több sejtet transzformálni.



11. ábra: a Ca-foszfát /glicerol sokkal/ és a LUV módszer /glicerol sokkal és anélkül/ transzformációs frekvenciájának DNS /és lipid/ koncentrációfüggése, HeLa sejtekkel vizsgálva.

Módszer	pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt	Transzformáció	
		frekvencia $\text{tr}^+ / 10^6 \text{ sejt}$	hatékonyság $\text{tr}^+ / 10^6 \text{ sejt} / \mu\text{gDNS}$
CP	pAG60 DNS (11,2 μg)	250	22
	$\lambda\text{gtWESneoDNS}$ (1,5 μg)	110	73
REV	pAG60 DNS (0,5 μg)	30	60
	$\lambda\text{gtWESneo DNS}$ (0,1 μg)	14	140
	$\lambda\text{gtWESneo fág}$ (0,3 μg)	31	103

15. táblázat: Különböző módszerek hatékonysága /a legnagyobb transzformációs frekvenciát mutató körülmények között/, HeLa sejtekkel; /gl.s. +/-: glicerinnal sokkolt/nem sokkolt/.

A 15. táblázat folytatása.

Módszer	pAG60 DNS/ 5×10^5 sejt	Transzformáció	
		frekvencia $\text{tr}^+ / 10^6 \text{sejt}$	hatékonyság $\text{tr}^+ / 10^6 \text{sejt} / \mu\text{gDNS}$
LUV	$\lambda_{\text{gtWESneo}}$ fág (1,65 μg , gl.s.+)	510	309
	$\lambda_{\text{gtWESneo}}$ fág (0,17 μg , gl.s.-)	1380	8117

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Megvizsgáltuk a különböző molekulatömegű, csupasz DNS LUV-ba és REV-be való bezárhatóságát. REV esetén a DNS molekulatömege nem befolyásolja a bezárhatóságot, viszont a DNS méretének növekedésével csökken az intakt állapotban maradt DNS mennyisége /a REV-képzés során alkalmazott ultrahangozás miatt törik a DNS egy vagy mindkét szála/. LUV esetében a DNS méretének növekedése a bezárás erőteljes csökkenéséhez vezet /kettős logaritmikus összefüggés/, de a DNS intakt állapotban marad a bezárás után. Megállapítottuk, hogy ezen jelenség oka a DNS térbeli kiterjedésében van: a 200 - 1000 nm-es kiterjedésű negatív töltésű LUV-ok csökkent statisztikai valószínűséggel zárják be a nagyobb molekulatömegű, negatív töltésű DNS molekulákat /lineáris DNS esetén ez az összefüggés kifejezettebb/.

Ennek alapján úgy véltük, hogy a kompaktabb szerkezetű /töltés leárnyékoló/ DNS LUV-ba nagyobb hatásokkal lesz bezárható még a nagyobb DNS méretnél is. Mivel a természetben előforduló DNS egyik legtömörebb szerkezetű és /fehérjébe becsomagolt/ formája a fágfejekben van, s a fágok olyan rendszerek, amelyekben a nagy molekulatömegű DNS könnyen kezelhető állapotban van, a további kísérleteink céljára a vad és rekombináns lambda fágokat választottuk. Megállapítottuk, hogy a DNS nagy /a csupasz DNS-nél két nagyságrenddel jobb, a REV-vel hasonló/ hatásokkal zárható fágok formájában LUV-ba, ha az eljárás során az EDTA adagolás fokozatosan és kis

mennyiségekben történik. A vad lambdánál kisebb DNS molekulatömegű rekombináns fágok esetében a liposzómához való asszociáció tovább növelhető az EDTA-val szemben megnövekedett ellenállóképesség miatt. Mivel ugyanakkor a fág DNS elveszti /a liposzómán belül is/ a baktérium fertőző képességét, azaz a fágburok szerkezete felbomlik, valószínűleg nincs akadálya annak, hogy a fág DNS-e az eukarióta sejten belül könnyen szubsztrátja tudjon lenni a transzformációban fontos szerepet játszó enzimeknek.

Megvizsgáltuk, hogy a módszerünkkel képezett liposzóma mennyire alkalmazható szövettenyésztett sejtek transzformálására. Azt kaptuk, hogy a kalcium-foszfát módszerrel jól transzformálható LMTK⁻ sejteket a kalcium-foszfát DNS koprecipitátumhoz hasonló mértékben transzformálhatjuk az általunk készített liposzómákkal. A kalcium-foszfátra kevésbé recipiens sejteket megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy módszerünk több mint egy nagyságrenddel jobban működik a hagyományos REV módszerhez képest és meghaladja a kalcium-foszfát DNS koprecipitációt is. Mindennek oka elsősorban az, hogy megnövekedett a DNS-t tartalmazó liposzómák aránya az üres LUV-okhoz képest. A fág fehérjeburok az EDTA hatására történő fellazulása miatt csak kevésbé képes a liposzómális degradáció csökkentésére. A DNS sejtmagba jutásának növelését a továbbiakban olyan fuzogén fehérjéknek a liposzómába való beépítésével képzeljük el, amelyek /pl. a Sindbis vírus peplonja/ a liposzómába való bekerülés után, a savas pH hatására, fuzionálnak a liposzóma membránnal. Ily módon a liposzómába került anyag /pl. vírus DNS/ kikerül a sejtmag közelébe vándorolt liposzómából, s így elkerüli a degradációt.

Az a tény, hogy létezik egy olyan liposzóma koncentráció tartomány, ahol glicerín sokk nélkül is nagy hatásfokú transzformáció érthető el, annak a lehetőségét adja, hogy egyrészt a rendkívül érzékeny, másrészt a sejtszuszenzióban növekvő /más módszerekkel nagyon alacsony hatásfokkal transzformálható/ sejtvonalak is jól transzformálhatók lesznek módszerünkkel. A továbbiakban ennek a vizsgálatát fogjuk elvégezni.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy módszerünk képes a nagy molekulatömegű DNS-t intakt állapotban, nagy hatásfokkal a liposzómába csomagolni. Ily módon jó hatékonyságú rendszer alakítható ki az eukarióta sejtek nagy molekulatömegű DNS-sel való transzformációjára.

VII. IRODALOM

- 1/ Avery, O. T., C. M. Macleod, M. McCarty /1944/. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J. Exp. Med. 79: 137-158.
- 2/ Murray, N.E. and K. Murray /1974/. Manipulation of restriction targets in phage lambda to form receptor chromosomes for DNA fragments. Nature 251: 476-481.
- 3/ Mandel, M. and A. Higa /1970/. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53: 159-162.
- 4/ Bolivar, F. and K. Backman /1979/. Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. Methods Enzymol. 68: 245-267.
- 5/ Hanahan, D. /1983/. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- 6/ Collins, J. and B. Hohn (1978). Cosmids: A type of plasmid -gene cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. PNAS 75: 4242-4246.
- 7/ Szybalska, E.H. and W. Szybalski (1962). Genetics of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable transformation of biochemical trait. PNAS 48: 2026-2034.
- 8/ Szybalski, W.: DNA-mediated genetic transformation of human cell lines. Proc. 12th Ann. Session of the Natl. Poultry Breeders Roundtable, Kansas City, MO, /1963/ pp. 90-109
- 9/ McBride, O. W. and H. L. Ozer (1973). Transfer of genetic information by purified metaphase chromosomes. PNAS 70:1258-

-1262.

- 10/ McCutchan, J. H. and J. S. Pagano (1968). Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. J. Nat. Cancer Inst. 41: 351-357.
- 11/ Warden, D. and H. V. Thorne (1968). The infectivity of polyoma virus DNA for mouse embryo cells in the presence of diethylamino-ethyl-dextran. J. Gen. Virol. 3: 371-377.
- 12/ Burnett, J. P. and J. A. Harrington (1968). Infectivity associated with simian adenovirus type SA 7 DNA. Nature 220: 1245.
- 13/ Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52: 456-467.
- 14/ Wigler, M., S. Silverstein, L.-S. Lee, A. Pellicer, T. Cheng, R. Axel /1977/. Transfer of purified Herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell 11: 223-232.
- 15/ Scangos, G. and Ruddle F. H. /1981/. Mechanism and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. Gene 14: 1-10.
- 16/ Ishiura, M., S. Hirose, T. Uchida, Y. Hamada, Y. Suzuki, Y. Okada /1982/. Phage particle mediated gene transfer to cultured mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 2:607-616.
- 17/ Okayama, H. and P. Berg /1985/. Bacteriophage lambda vector for transducing a cDNA clone library into mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 5:1136-1142.

- 18/ Bangham, A. D., M. M. Standish and J. C. Watkins /1965/. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13: 238-252.
- 19/ Ostro M. J. /1987/. Liposomes. *Scientific American* 256:90-99.
- 20/ Fraley, R. and D. Papahadjopoulos /1981/. New generation liposomes: the engineering of an efficient vehicle for intracellular delivery of nucleic acids. *TIBS* 6: 77-80.
- 21/ Wilson, T., D. Papahadjopoulos, R. Taber /1977/. Biological properties of poliovirus encapsulated in lipid vesicles: Antibody resistance and infectivity in virus-resistant cells. *PNAS* 74: 3471-3475.
- 22/ Dimitriadis, G. J. /1978/. Translation of rabbit globin mRNA introduced into mouse lymphocytes. *Nature* 274: 923-924.
- 23/ Wilson, T., D. Papahadjopoulos, R. Taber /1979/. The introduction of poliovirus RNA into cells via lipid vesicles (liposomes). *Cell* 17: 77-84.
- 24/ Fraley, R. T., C. S. Fornari, S. Kaplan /1979/. Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer. *PNAS* 76: 3348-3352.
- 25/ Wong, T-K., C. Nicolau, P. H. Hofschneider /1980/. Appearance of beta-lactamase activity in animal cells upon liposome-mediated gene transfer. *Gene* 10: 87-94.
- 26/ Mukherjee, A. B., S. Orloff, J. D. Butler, T. Triche, P. Lally, J. D. Schulman /1978/. Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid vesicles (lipochromosomes): Carrier potential in gene transfer *PNAS* 75: 1361-1365.

- 27/ Kondorosi, E, and E. Duda /1980/. Introduction of foreign genetic material into cultured mammalian cells by liposomes loaded with isolated nuclei. FEBS Lett. 120: 37-40.
- 28/ Papahadjopoulos, D., and N. Miller /1967/. Phospholipid model membranes: I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals. BBA 135: 624-638.
- 29/ Papahadjopoulos, D., W. J. Vail, K. Jacobson and G. Poste /1975/. Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. BBA 394: 483-491.
- 30/ Szoka, F., and D. Papahadjopoulos /1980/. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467-508.
- 31/ Deamer, D., and A. Bangham /1976/. Large volume liposomes by an ether vaporisation method. BBA 443: 629-634.
- 32/ Szoka, F., and D. Papahadjopoulos /1978/. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. PNAS 75: 4194-4198.
- 33/ Enoch, H. G., and P. Strittmatter /1979/. Formation and properties of 1000-A-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles. PNAS 76: 145-149.
- 34/ Mannino, R. J., E. S. Allebach, W. A. Strohl /1979/. Encapsulation of high molecular weight DNA in large unilamellar phospholipid vesicles. Dependence on the size of the DNA. FEBS Lett. 101: 229-232.

- 35/ Deshayes, A., L. Herrera, and M. Caboche /1985/. Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. EMBO J. 4: 2731-2737.
- 36/ Fraley, R., S. Subramani, P. Berg, and D. Papahadjopoulos /1980/. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. J. Biol. Chem. 255: 10431-10435.
- 37/ Fraley, R., R. M. Straubinger, G. Rule, E. L. Springer, and D. Papahadjopoulos /1981/. Liposome-mediated delivery of deoxyribonucleic acid to cells: Enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions. Biochemistry 20: 6978-6987.
- 38/ Fraley, R. T., S. L. Dellaporta, and D. Papahadjopoulos /1982/. Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into tobacco protoplasts: A sensitive assay for monitoring liposome-protoplast interactions. PNAS 79: 1859-1863.
- 39/ Rouse, P., A. Deshayes, and M. Caboche /1983/. Use of liposomes for the transfer of nucleic acids: Optimization of the method for tobacco mesophyll protoplasts with tobacco mosaic virus RNA. Plant Science Lett. 31: 55-64.
- 40/ Fraley, R., and D. Papahadjopoulos /1982/. Liposomes: The development of a new carrier system for introducing nucleic acids into plant and animal cells. Curr. Top. Micr. Imm. 96: 171-191.
- 41/ Straubinger, R. M. and D. Papahadjopoulos /1983/. Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids. Meth. Enzymol. 101: 512-527.

- 42/ Straubinger, R. M., K. Hong, D. S. Friend, and D. Papahadjopoulos /1983/. Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: Encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell* 32: 1069-1079.
- 43/ Schaefer-Ridder, M., Y. Wang, P. H. Hofschneider /1982/. Liposomes as gene carriers: Efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene. *Science* 215. 166-168.
- 44/ Folch, J. /1942/. Brain cephalin, a mixture of phosphatides. Separation from it of phosphatidyl serine, phosphatidol ethanol-amine and a fraction containing an inositol phosphatide. *J. Biol. Chem.* 146: 35-44.
- 45/ Charles, J., M. Stewart /1980/. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* 104: 10-14.
- 46/ Leder, P., D. Tiemeier, L. Enquist /1977/. EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organism: the lambda. gtWES system. *Science* 196: 175-177.
- 47/ Frischauf, A-M., H. Lehrach, A. Poutska and N. Murray /1983/. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170: 327-342.
- 48/ Colbere-Garapin, F., F. Horodniceanu, P. Kousilski, A-C. Garapin /1981/. A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* 150: 1-14.
- 49/ Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook /1982/. *Molecular*

- cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 50/ Commerford, S. L. /1971/. Iodination of nucleic acids in vitro Biochemistry 10: 1993-2000.
- 51/ Hunter, W. and F. Greenwood /1964/. A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. Biochem. J. 91: 43-51.
- 52/ Peterson, G. L. /1977/. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83: 346-356.
- 53/ Davies, J. and D. I. Smith /1978/. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. Ann. Rev. Microbiol. 32: 469-518.
- 54/ Southern, P. J. and P. Berg /1982/. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341.
- 55/ De Jonge, A. J. R. and D. Bootsma /1984/. Chromosome and DNA mediated gene transfer in cultured mammalian cells. Int. Rev. Cytol. 92: 133-158.
- 56/ Stryer, L. /1981/. Biochemistry: 572. (W. H. Freeman and Company. San Francisco).
- 57/ Harrison, D. P., D. T. Brown and V. C. Bode /1973/. The lambda head-tail joining reaction: Purification, properties and structure of biologically active heads and tails. J. Mol. Biol. 79: 437-449.
- 58/ Loyter, A., G. Scangos, D. Juricek, D. Keene and F. H. Ruddle

- /1982/. Mechanism of DNA entry into mammalian cells: II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. Exp. Cell Res. 139: 223-234.
- 59/ Stow, N. D., N. M. Wilkie /1976/. An improved technique for obtaining enhanced infectivity with Herpes Simplex Virus type 1 DNA. J. Gen. Virol. 33: 447-458.