

Genové manipulace a klasická genetika

Genové manipulace

RNDr. PhDr. ZDENĚK HOSTOMSKÝ, Ústav molekulární genetiky ČSAV, Praha

Klíčová slova: nové biotechnologie, restrikční endonukleázy, genové manipulace, rekombinace DNA in vitro, molekulární klonování, plazmidové vektory, reverzní transkripce, sekvenování DNA, proteinové inženýrství, cílená mutagenese, chemická syntéza DNA, hybridní bílkoviny

Slovo biotechnologie se dnes velmi často používá, stalo se téměř módní, a mohl by vzniknout dojem, že biotechnologie je tedy nějaký velký objev z poslední doby. Na druhé straně je známo, že mnohé významné biotechnologické postupy, jako jsou výroba piva, vína, sýru atd., lidstvo využívá už několik tisíciletí. Jedním z rozhodujících činitelů, jenž posunul biotechnologickou oblast do popředí současného zájmu, jsou však hlavně nové možnosti genových manipulací, které vzbuzují oprávněnou naději, že tyto účinné způsoby zásahů do živých systémů najdou uplatnění i v průmyslových biotechnologických procesech. **Nové biotechnologie** tak budou přímým pokračováním převratného vývoje molekulární genetiky v posledním desetiletí.

Zvrat ve studiu genetické informace uložené v molekulách DNA byl způsoben začátkem sedmdesátých let hlavně objemem **restrikčních endonukleáz**, enzymů, které mohou štěpit molekuly DNA jen v místech specifických sekvencí 4–8 párů bází. Hakovým štěpením se dají

reprodukovatelně získat fragmenty DNA o velikosti několika tisíc až jen několika jednotek párů bází. Použití restrikčních endonukleáz spolu s dalšími enzymy metabolismu nukleových kyselin (DNA-ligáza, DNA-polymeráza, polynukleotidkináza, terminální transferáza, reverzní transkriptáza, RNA-ligáza, různé exonukleázy atd.) je základem technik a postupů označovaných dnes souborně jako **genové manipulace** (někdy se též používají termíny genové inženýrství, in vitro rekombinace DNA apod.).

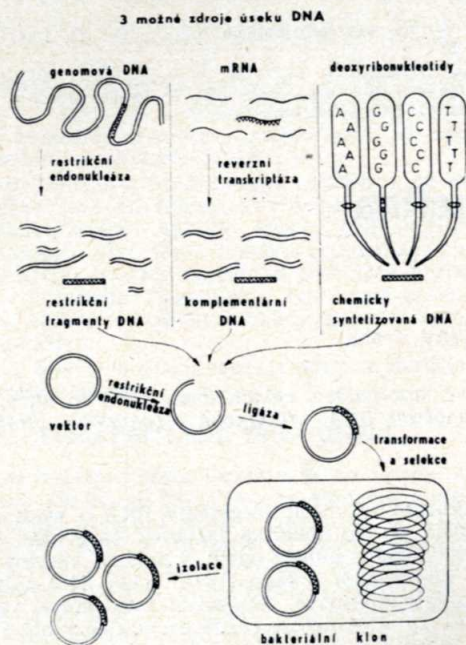
Před obdobím genového inženýrství získávala genetika většinu svých poznatků o struktuře genů nepřímo — z pozorování důsledků takových biologických procesů, jako jsou mutace a rekombinace. Jen výjimečně, po vzdálené hybridizaci, bylo možné sledovat projevy genů v nepřibuzném hostiteli. Studium genomu bylo komplikováno tím, že molekuly DNA většiny organismů jsou příliš komplexní a to znemožňovalo získat homogenní výchozí materiál pro podrobnější analýzu. Snažší to bylo pouze u některých bakteriofágů a virů, jejichž genom je

poměrně malý. Běžný preparát DNA z bakterií (asi 3 milióny párů bází) je již směsí nahodilých fragmentů. Studium genomů vyšších organismů, které jsou ještě asi tisíckrát obsáhlejší než bakteriální, se zdálo proto nemožné.

Dnešní techniky genových manipulací umožňují vyjmout specifického úseku DNA z různých komplexních směsí připojením k vektorové molekule a přenos takto vzniklé **rekombinované molekuly** do hostitelské buňky. Pak se může rekombinovaná molekula DNA pomnožit za vzniku v podstatě libovolného množství identických kopií — což se označuje termínem **molekulární klonování**. Po izolaci lze z této DNA zpětně vyštepit specifický úsek naklonované DNA v množství dostatečném pro chemickou analýzu.

Jako **vektorové molekuly**, které umožní udržení cizorodého úseku DNA v bakteriálních buňkách, se většinou používá geneticky upravených plazmidů nebo bakteriofágů, jež jsou schopny se v buňce samostatně pomnožovat (jde o tzv. autonomní replikony). Je výhodné, když vektor nese genetické znaky, které usnadňují selekci rekombinovaných molekul. Nejčastěji jde o geny, které přenášejí rezistenci vůči různým antibiotikům, popř. způsobí odlišné zbarvení těch bakteriálních kolonií, jež obsahují rekombinované molekuly.

Dnes se ukazuje, že i v přírodě může někdy docházet k výměně genetické informace, a to dokonce i mezi různými druhy organismů. Molekulární klonování má však v porovnání s těmito procesy daleko obecnější použití, neboť **rekombinace in vitro** umožňuje téměř neomezené množství kombinací, přičemž v podstatě vůbec nezáleží na tom, odkud pochází úsek DNA včleněný do vektorové molekuly — zda z viru, bakterie, vyššího organismu nebo zda byl syntézován chemicky v laboratoři (obr. 1). Molekulární klonování se tak stává důmyslným nástrojem pro analýzu genomů nejrůznějších organismů.



Obr. 1. Obecné schéma molekulárního klonování

Chemická analýza struktury genů je založena na poznatku, že genetická informace je v DNA zakódována sledem čtyř typů dusíkatých bází: adeninu, guaninu, cytosinu a thyminu. V současné době jsou vypracovány metody **sekvenování DNA**, které umožňují zjistit poměrně rychle přesné pořadí bází v celé klonované molekule DNA. Ve špičkových laboratořích se získává sekvence

rychlostí přibližně 1000 párů bází na jednoho pracovníka za den. V současné době je osekvenováno už celkově několik miliónů párů bází a tato informace je uložena ve velkých databázích.

Důležitou předností postupu molekulárního klonování je nejen umožnění izolace a strukturální analýzy genu, ale i jeho znovuzavedení do buněk buď stejného, nebo i odlišného druhu. Po takovém překonání mezidruhových bariér lze sledovat projevy genů v různých hostitelích. Možnost vyhledat a přenášet izolovaný gen má přímé použití v konstrukci vysoce produkčních kmenů průmyslových mikroorganismů. Už sama skutečnost, že gen, který kóduje žádaný produkt, je přenesen na plazmidový vektor a tím je přítomen v původním hostiteli v několika kopiích, se většinou projeví ve zvýšené produkci.

Složitější je situace při přenášení živočišných genů do mikrobiálních hostitelů. Souvisí to s tím, že genom vyšších, eukaryotických organismů je organizován odlišně než u nižších, prokaryotických organismů. V eukaryotických chromozómech je zápis genetické informace pro bílkovinné produkty přetržitý, kódující oblasti jsou přerušovány sekvencemi se zatím neznámou funkcí (tzv. introny) a části genu se k sobě poskládají až na úrovni přepisu RNA. K převodu informace z RNA zpět do DNA, do podoby, která je už přijatelná pro bakteriální hostitele, lze využít enzymu **reverzní transkriptázy**. Tímto způsobem byly izolovány např. i lidské geny pro interferon, inzulin, růstový hormon a jiné fyziologicky důležité bílkoviny a v současné době jsou už jejich farmaceutické preparáty průmyslově produkovány.

Techniky genových manipulací však umožňují nejen přípravu kdysi vzácných přírodních bílkovin ve větším množství, ale dnes otevírají i úplně nové pole zatím neuštěpených perspektiv. Možnost izolovat gen, zjistit jeho primární strukturu, v sobě zároveň skrývá možnost do zjištěné genetické informace zasáhnout, cíleně změnit pořadí bází v DNA a tím definovaně změnit i příslušné aminokyseliny v bílkovinném produktu. Vytváření a zkoumání několika variant původní bílkoviny, tzv. **proteinové inženýrství**, je nejen fascinující z hlediska základního poznání, ale v budoucnu může vést k přípravě úplně nových bílkovin — např. enzymů s požadovanou předem určenou specifitou.

Pomocí **cílené mutagenese** je možno změnit jen určitou malou část přírodního genu, např. kodon pro jednu aminokyselinu. Současné metody **chemické syntézy DNA** však umožňují složit z krátkých syntézovaných sekvencí celé umělé geny, jejichž sekvenci si můžeme libovolně určovat. Existují též možnosti jak spojovat úseky genů pocházející z různých organismů, popř. je kombinovat se syntetickými úseky a tyto fúzané geny pak kódují tzv. **hybridní bílkoviny**.

Zatím se nedá vždy předpovědět, jak budou hybridní geny organismem přijaty a jak bude živá buňka zacházet s bílkovinnými produkty těchto genů. Pokrok v této oblasti vyžaduje ještě mnoho dalšího poznání, a to zejména na úrovni regulace projevu genů. Řešení praktických otázek při aplikaci genových manipulací v nových biotechnologických přímo souvisí s pokroky základního výzkumu a nedá se od něj oddělit.

Hostomský, Z.: **Genové manipulace**. Kvas. prům. 31, 1985, č. 7—8, s. 147—149.

Přehledný příspěvek sleduje vývoj metod genových manipulací a jejich vliv na vznik nových biotechnologií. V této souvislosti jsou diskutovány techniky molekulárního klonování, sekvenování DNA, chemické syntézy DNA, cílené mutagenese a konstrukce hybridních genů, které mohou být po přenesení do vhodných hostitelských organismů využity v biotechnologické praxi.

Гостомски, З.: **Генные манипуляции**. Квас. прум. 31, 1985, № 7—8, стр. 147—149.

Предлагаемая статья рассматривает развитие методов генных манипуляций и их влияние на возникновение новых биотехнологий. В связи с этим обсуждаются методы молекулярного клонирования, секвенирования ДНК, химического синтеза ДНК, сайт-дайректед мутагенеза и конструкции гибридных генов, которые могут быть перенесены в подходящие хозяйственные организмы и использованы в биотехнологической практике.

Hostomský, Z.: Gene manipulations and classical genetics. Kvas. prům. **31**, 1985, No. 7—8, pp. 147—149.

The review article follows the development of methods of gene manipulations and their impact on the rise of new biotechnologies. In this connection the techniques are discussed, including molecular cloning, DNA sequencing, chemical synthesis of DNA, site-directed mutagenesis and construction of hybrid genes which could, after transfer into convenient host organisms, be used in biotechnology.

Hostomský, Z.: Genmanipulationen und die klassische Genetik. Kvas. prům. **31**, 1985, Nr. 7—8, S. 147—149.

Dieser Reviewaufsatz folgt die Entwicklung von Methoden der Genmanipulationen und ihren Einfluß auf die Entstehung der neuen Biotechnologien. In diesem Zusammenhang sind diskutiert die Techniken von Molekulärklonierung, DNS-sequenzierung, chemischer DNS-synthesis, site directed Mutagenese und Konstruktion von Hybridgenen, die nach der Uebertragung in die geeigneten Wirtsorganismen in der biotechnologischen Praxis benutzt werden können.