

Génové inžinierstvo a životné prostredie

Génové inžinierstvo je skutočne revolúciou vo vede i v technológii. Na molekulárnej úrovni, na báze DNA umožňuje štúdium príčin a riešenie viacerých problémov v medicíne - v oblasti zatiaľ neliečiteľných chorôb a vo farmakológii napr. produkciu nových druhov účinných liečiv pripravovaných pomocou rDNA (rekombinantnej DNA) alebo syntetických génov. Široké možnosti prináša génové inžinierstvo v rastlinnej a živočíšnej výrobe, biotechnológiách i v oblasti životného prostredia pri biodegradácii toxických látok v prírode.

Podstatou génového inžinierstva je cielavedomý zásah do DNA a príprava rekombinantnej DNA.

DNA sa dá preniesť pomocou vhodného vektora, napr. plazmidu alebo vírusu do cudzej bunky. Geneticky najviac prebádané boli r. 1950 baktérie *Escherichia coli*. Okrem chromozómovej DNA majú i malé kruhové DNA - plazmidy, ktoré sa v bunke autonómne rozmnožujú (obr. 1). Po opakovanom a dlhodobom styku buniek s antibiotikami sú plazmidy voči nim rezistentné. *E. coli* sú veľmi vhodným bunkovým modelom, pretože majú krátku generačnú dobu - 20 minút, bez nárokov na aeráciu.

Objavením restričných enzýmov štiepiacich na špecifických miestach DNA podarilo sa po r. 1960 otvoriť plazmovú DNA (napr. pBR 322) a po vhodnej úprave koncov do nej vsunúť cudziu DNA. Takto pripravená rDNA sa môže v prostredí CaCl_2 vpraviť do buniek *E. coli* a klonovať. Tzv. kozmidové klonovanie umožňuje pomocou bakteriofágu λ klonovať väčšie fragmenty (35-40 kb eukaryotických fragmentov).

Uplatnenie génového inžinierstva v medicíne a vo farmakológii

Prípravou rDNA sa podarilo dosiahnuť, že prokaryotické bunky *E. coli* produkovali vzácne a ťažko dostupné peptidy a proteíny eukaryotického pôvodu, čo sa už využilo vo farmaceutickej výrobe. Ide o ľudské hormóny, inzulín a imunomodulátory, ako napr. interferón. Humánny rastový hormón (HGH) je polypeptid s dĺžkou 191 aminokyselín, ktorých sekvencia je známa. V niektorých prípadoch, kde sú známe sekvencie, pripravili sa i syntetické gény.

Protivírusové, protibakteriálne a protiparazitické vakcíny, pripravené klasickými postupmi, nie sú ideálnymi preparátmi. V súčasnosti sa už zavádza príprava vakcín génovou biotechnológiou. Vhodné je takto pripraviť subjednotkové vakcíny, ktoré neobsahujú celý materiál patogénu, ale špecificky sa viažu

na jeden determinant. Ide o replikáciu rekombinantných plazmidov, obsahujúcich sekvenciu DNA kódujúcu určitý imunogénny polypeptid, alebo aj o úplnú chemickú syntézu polypeptidov, zložiek najmä povrchových proteínov.

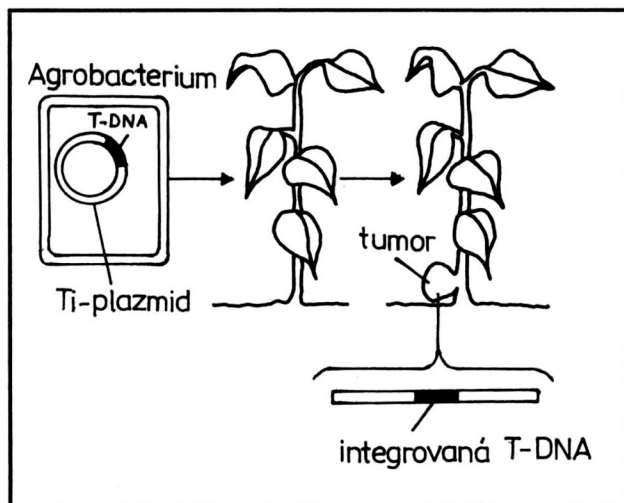
Monoklonálne protilátky sa pripravujú na antigénny determinant pomocou hybridómov, t.j. buniek vzniknutých fúziou lymfocytov a myelómových buniek. Lymfocyty sú imunizované proti určitému antigénu a majú krátku životnosť. Myelómové bunky sú nádorové bunky. Fúziou myelómových buniek s lymfocytmi sa lymfocyty stávajú nesmrteľné. Monoklonálne protilátky pochádzajú z jediného klonu a sú úzko špecifické. Menej špecifické sú polyklonálne protilátky. Rozdiel medzi monoklonálnymi a subjednotkovými vakcínami je ten, že vakcíny môžu obsahovať i antigény.

Niektoré firmy už takýmito postupmi vyrábajú vakcíny proti hepatitíde, slintavke a krívačke (vírusové ochorenia, ktoré postihujú divoké i domáce kopytníky). Pripravujú sa i subjednotkové vakcíny proti malárii. Treba tu počítať s viacerými determinantmi, keďže parazit môže špecifikovať niekoľko stoviek rôznych povrchových antigénov.

Pre zaujímavosť, napr. cirkumsporozoitný obalový proteín (CSP) *Plasmodium falciparum* obsahuje 37 tandemovo zaradených jednotiek kódujúcich peptid so 4 opakujúcimi sa aminokyselinami (Asn-Ala-Asn-Pro). Ďalšie vývojové štádium (merozoitné) po opustení lýzovaných erytrocytov vytvorí povrchový S-antigén, ktorý má opakujúce sa sekvencie o dĺžke 33 bp pre 11 aminokyselín, opakujúce sa aj 100-krát. Imunitný systém naráža na viacpočetné terče. Postihnutý sa nestačí brániť a podľahne ochoreniu. Výskumníci pripravili syntetické peptidy i gény pre CSP a S-antigén, na ktoré sa môžu imunizáciu pripraviť protilátky.

Pracovníci firmy Gementech v Bostone vyvinuli syntetické peptidy, ktoré majú štruktúru niektorých úsekov trans-membránového proteínu HIV (human immunodeficiency virus). Nie sú to iba diagnostické agensy, ale i potenciálne vakcíny proti AIDS. Vírus pôsobením mutácií veľmi výrazne mení povrchový proteín, preto je treba zamerať sa na prípravu polyvalentnej vakcíny z peptidov, ktoré majú štruktúru viacerých povrchových proteínov vírusu HIV.

Zistilo sa, že asi 30% kvasinkových génov je funkčných v *E. coli*. DNA kvasiniek môže byť klonovaná v plazmidoch, ktoré sa používajú na transformáciu buniek *E. coli*. Klonovalo sa niekoľko kvasinkovitých génov kódujúcich biosyntetické enzýmy. Kvasinky sú zaujímavé z hľadiska produkcie aminokyselín. Pomocou restričných enzýmov môžeme vpraviť do



- 1.
- 2.

1. Niektoré agrobaktérie infikujú rastliny a spôsobujú tvorbu rastlinných tumorov. Činiteľom tvorby tumorov je Ti-plazmid, ktorý integruje časť svojej T-DNA do chromozómu hostiteľskej bunky
2. Využitie Ti-plazmidu ako vektora

viacfunkčných vektorov DNA kvasiniek a pomnožiť ich v baktériách *E. coli*. Opačne, populácia plazmidov z *E. coli* je prenosná do kvasinkovitých sféroplastov (obr. 2).

Aplikácia rDNA v rastlinnej výrobe

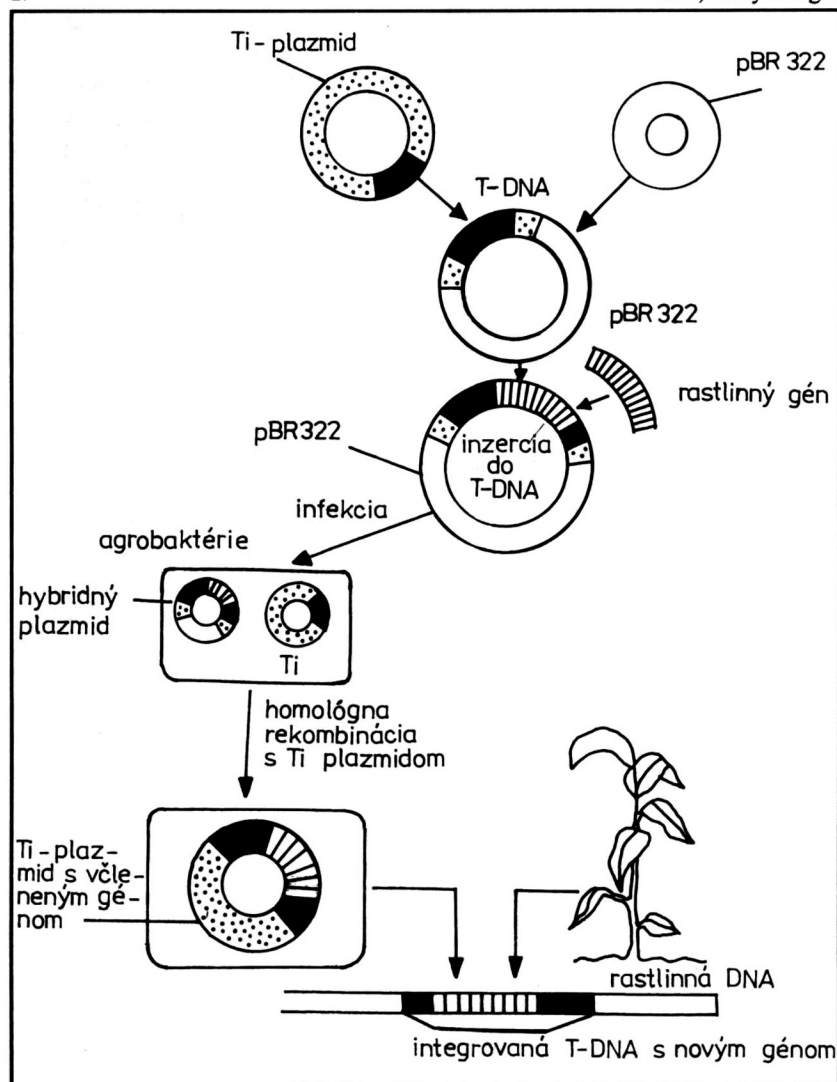
O možnostiach zlepšiť vlastnosti rastlín so zameraním na zvýšenie úrody sa diskutuje i z hľadiska génových manipulácií.

Niektoré agrobaktérie z pôdy infikujú rastliny a vyvolávajú tvorbu rastlinných tumorov. Pri tomto procese je činný Ti-plazmid, ktorý integruje časť svojej T-DNA do chromozómu hostiteľskej bunky.

Ti-plazmid možno použiť ako vektor na prenos cudzej DNA, ktorú vpravíme do plazmidu *E. coli* pBR 322. Hybridný plazmid sa zmieša s kolóniami agrobaktérií. Agrobaktérie nesúce cudzí gén sa použijú na infekciu rastlín, ktoré inkorporujú modifikovanú T-DNA do svojich chromozómov. Počas transformácie sa T-DNA včleňuje na veľmi rozdielne miesta rastlinného genómu. Ak sa včlení napr. do štruktúrneho génu pre rastlinný enzým, je tento gén inaktívovaný. Pomocou restriktčných endonukleáz sa môže vyčistiť z rastlinnej DNA i s okrajovými sekvenciami. T-DNA sa týmito hraničnými sekvenciami môže použiť ako sonda na testovanie knižnice celkovej rastlinnej DNA.

Zatiaľ sa pomocou Ti-plazmidu nepodarilo indukovať transformáciu buniek jednoklíčných rastlín (kukurice, pšenice a pod.). Pri kukurici bude snáď úspešná cesta pohyblivých elementov Ds. Ds je nehybný vo svojom mieste na chromozóme, pokiaľ nie je prítomný druhý element Ac. Počas pohybu môže vyvolať element Ds široké spektrum chromozómových abnormalít.

Génové inžinierstvo umožní vypestovať rastliny rezistentné voči stresom prostredia: fyzikálnym, chemickým a biologickým (sucho, extrémne teploty, znečistenie ovzdušia, vody a pôdy, baktérie, vírusy, plesne, hmyz a iní škodcovia). Napr. *Pseudomonas aeruginosa* svojimi metabolitmi chráni koreňový systém rastlín a semena





pred škodcami v pôde. Ráta sa s izoláciou génov zodpovedných za produkciu biologicky účinných látok a s ich aplikáciou do genómu rastlín. Tak isto možno ovplyvniť ďalšie vlastnosti, napr. odolnosť voči mrazu, či génu pre fixáciu vzdušného dusíka.

Ludia a zvieratá nedokážu syntetizovať osem esenciálnych aminokyselín, preto je zloženie aminokyselín v potrave veľmi dôležité. Pripravili sa klony DNA zásobných proteínov zo sóje, fazule, kukurice, pšenice a pod. V týchto génoch možno urobiť zmeny a zlepšiť tak rovnováhu aminokyselín v proteínoch.

Iná možnosť je zaviesť nové gény z iných druhov rastlín, napr. gén, ktorého produkty - proteíny sú mimoriadne bohaté na určité aminokyseliny, napr. proteíny brazílskych orieškov majú 25% aminokyselín obsahujúcich síru (metionín a cysteín). Prítom napr. proteíny sóje a iných rastlín sú na tieto aminokyseliny chudobné. Ďalej sú to gény ovplyvňujúce rast rastlín, stromov, ich kvitnutie a zrenie a zrenie plodov. Robia sa napr. pokusy vnieť gény na produkciu určitého insekticídu do rastlín cestou Ti-plazmidu.

Niektoré aplikácie génového inžinierstva sa skúšajú i v živočíšnej výrobe. Ide predovšetkým o prípravu vakcín proti vírusom, bakteriálnym, protozoálnym a parazitickým chorobám zvierat, ako aj o prípravu rastových hormónov.

V budúcnosti môže byť transfer génov jediným prostriedkom na prekonanie niektorých chorôb. Bude možné chovať zvieratá s génmi T-tolerancie voči určitým ochoreniam.

Predpokladá sa, že iba cestou génového inžinierstva sa vyrieši problém niektorých dedičných chorôb, rakoviny a starnutia.

Z hľadiska životného prostredia je dôležitá najmä príprava mikroorganizmov pomocou rDNA, schopných efektívne odbúravať ťažko rozložiteľné a toxické substráty, napr. PCB, 2, 3, 7, 8 - tetrachlór-p-dioxín, benzo/a/pyrén, pentachlór-fenol, pesticídy. Ich použitie je aktuálne i pri odsiňovaní hnedého uhlia a pri znižovaní obsahu SO₂ v ovzduší a pod.

To však nie je iba záležitosť biotechnológie, je to zásah do nukleových kyselín - zásah do dedičnosti, do genofondu. Ide o veľkú vedeckú revolúciu, jej výsledky sú však užitočné a nevyhnutné pre ďalší život na Zemi.

Literatúra

- Asada, J., Kimura, J., Kuwahar, M., Tsukamoto, A., Koide, K., Oka, A., Takamami, M., 1988: Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, p. 469-473.
 Maniatis, T.S.G. et al., 1982: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, 520 pp.
 Trotter, P. C., 1986: Tappi Journal, July, p. 22-28.
 Turňa, J., Krčméry, V., Kettner, M., Antal, M., Augustin, J., 1990: Rekombinantné DNA a biotechnológia. Alfa, Bratislava, 689 pp.
 Watson, J. D., Tooze, J., Kurtz, D. T., 1988: Rekombinantní DNA. Academia, Praha, 293 pp.