

Molekulární genetik

Text pro studenty septim a biologických seminářů.

Text vznikl v roce 2002 podle přednášek prof. Jaroslava Petra a článků v časopisu Vesmír, v průběhu dalších let byl mírně aktualizován.

Techniky molekulární genetiky

(příklady významných technik)

1. Štěpení molekul DNA

Pomocí enzymů **restrikčních endonukleáz** (pocházejí z bakterií, v nich slouží k likvidaci cizorodé DNA virového původu). Enzym štěpí molekulu na přesném místě – pro každou endonukleázu specifický sled bází (typ palindrom – čte se stejně zleva jako komplementární úsek zprava).

Např. sekvence ...XXGAATTCXX..., rozštěpení: ...XXG AATTCXX...
proti ní ...XXCTTAAGXX... ...XXCTTAA GXX...

Konce TTAA se označují jako “lepivé konce”, může se na ně připojit jakékoli vlákno DNA, které začíná AATT

2. Slepování molekul DNA

Pomocí enzymů **ligáz**, dvě části molekuly DNA se mohou připojit svými vzájemně komplementárními lepivými konci.

Štěpení a slepování molekul DNA lze mj. využít k vnesení nového genu do DNA bakterie či jiného organismu. Přenášený gen se oddělí od původní DNA pomocí restrikčních endonukleáz, pomocí stejných endonukleáz se rozštěpí DNA příjemce (tj. kraje štěpů jsou komplementární), pomocí ligáz se nový gen připojí k DNA příjemce.

3. Hybridizace DNA

Umožňuje testování, do jaké míry je nějaká neznámá molekula DNA shodná (resp. komplementární) se známou molekulou (základním principem je využití komplementarity bází DNA).

Hybridizaci můžeme např. využít ke zjišťování míry shodnosti genů u různých organismů (z toho lze usuzovat na jejich příbuznost) nebo na porovnání určitého genu u zdravého a nemocného jedince (tím je možné zamítnout či podpořit hypotézu, že zkoumaný gen je odpovědný za danou nemoc – pokud je gen zdravého a nemocného úplně shodný, je potvrzeno, že gen není zodpovědný za vznik sledované choroby).

4. Elektroforeze

Určování délky zkoumaného řetězce DNA.

Vychází z toho, že DNA je elektricky nabitá. DNA se umístí na gelovou destičku s mikropóry do silného stejnosměrného elektrického pole. Záporně nabitá molekula DNA se posunuje směrem ke kladnému pólu, čím menší molekula, tím se pohybuje rychleji. Určitý čas se nechají molekuly DNA pohybovat v elektrickém poli. Výsledek se (fotografickou cestou) zobrazí jako rovnoběžné proužky v různé vzdálenosti od kraje. Každý proužek odpovídá úseku DNA jisté délky. K zobrazení lze přidat měřítko a podle umístění proužku určit počet párů bází zkoumaného úseku DNA.

5. PCR – Polymerázová řetězcová reakce

Postup, který umožňuje získat velké množství shodným molekul DNA.

6. Sekvenování DNA

Kombinace předchozích metod, umožňuje přesné zjištění pořadí bází na zkoumaném úseku DNA. Náročné na čas a zručnost laboranta, v současné době se sekvenuje na automatech napojených na počítač (tzv. sekvenátorech), na počítači se rovnou zobrazuje pořadí bází na zkoumané DNA.

Čtení genomu

Zjišťování úplného pořadí bází na DNA různých organismů.

Příklady přečtených genomů:

Viry, řada bakterií (více než 20 kmenů, např. původci TBC, skvrnitého tyfu, syfilis, boreliózy, *Helicobacter pylori*, ...) Kvasinky

Prvoci (např. trypanozomy, plasmodium)

Hlístice (*Caenorhabditis elegans*)

Drosophila, komár Anopheles, včela

Huseniček (*Arabidopsis thaliana*) – relativně malý genom – $2n=10$, 120 miliónů bází

Trávy, obilniny, rýže.

Obratlovci (ryby čtverzubci, myš, potkan, šimpanz, makak, tur, pes, vačice, ptakopysk)

Člověk (26. 6. 2000 ohlášeno kompletní přečtení lidského genomu, ve skutečnosti chybělo několik %), postupně se dokončuje přečtení celého genomu.

Projekt HGP (Human Genom Project) – vyhlášen v 90. letech, podílí se řada laboratoří v několika státech – každá laboratoř osekvenuje úsek, postupně se skládá celý genom. Do projektu se zapojily i soukromé firmy (Celera Genomics).

Význam

- hledání vztahu gen – vlastnost. Známe-li přesné sekvence genů, můžeme zjišťovat, jak se projeví jejich odchylky na fenotypu
- porovnání genů zdravých a nemocných jedinců (lidí i zvířat)
- porovnání sekvencí u různých druhů – nové poznatky pro výzkum vývoje druhů, evoluční příbuznost. (Např. genom člověka a šimpanze se podle předběžných výsledků liší v 1,5 % sekvencí – zaměření výzkumu bude na to, co těchto 1,5% odlišné informace zapisuje). Jeden z předběžných výsledků je, že řada druhů se geneticky odlišuje méně než fenotypově.
- genetické “otisky prstů” – z drobného vzorku na místě činu (např. vlas, kapka krve, odloupený kus kůže, ...) lze izolovat DNA a porovnat s DNA podezřelých (stačí porovnat jen krátký úsek, který se liší u různých jedinců). Neexistuje geneticky identická dvojice lidí (s výjimkou jednovaječných dvojčat).
- přesnější diagnostika bakteriálních a virových chorob – z těla nemocného se izoluje vzorek patogenního organismu, jeho DNA se porovná s databází a tím se určí přesná diagnóza. (k porovnání stačí krátký specifický úsek DNA).
- genová diagnostika a poradenství (rozpoznání genetických poruch u vyvíjejícího se zárodku, zjištění přítomnosti recesivních alel u rodičů)
- genová terapie (viz dále)

Genové manipulace (genové inženýrství)

Používané termíny:

GMO – geneticky manipulované organismy – organismy, kterým byl upraven genom

Transgenní organismy – organismy, které mají do svého genomu zabudovaný nový gen

Knokautované organismy – organismy, kterým odebrán nebo vyřazen z činnosti nějaký gen

Bakterie

Od 70. let, v současnosti řada běžných biotechnologických postupů.

Využívá se schopnosti bakterií vyměňovat si genetickou informaci. Do plazmidu se vloží potřebný gen, některé bakterie jsou schopné tento plazmid včlenit do své buňky. za vhodných podmínek tím mohou získat schopnost syntézy potřebné látky (bílkoviny).

V současnosti se takto získává např. lidský inzulin, růstový hormon, apod. (je to levnější a méně rizikové, než získávání téhož produktu od zvířat – množství zvířat, imunitní odpověď, riziko BSE, ...)

Rostliny

Různé techniky, základní princip: izolace potřebného genu, jeho případná úprava (např. spojení dvou genů z různých rostlin), vpravení do genomu rostliny (pomocí mikroinjekce, virového nosiče apod.), namnožení rostlin, kde byla genová úprava úspěšná.

Některé manipulace ve stádiu výzkumu, jiné už v praxi (např. sója a kukuřice v USA)

Využití

- Získání odolnosti proti hmyzím škůdcům
Bt kukuřice – obsahuje gen z *Bacillus thuringiensis*, který zajišťuje odolnost proti hmyzím škůdcům (u kukuřice jde hlavně o motýla zavíječe kukuřičného), podobně např. Bt brambory odolné proti mandelince bramborové
- Odolnost proti herbicidům – umožňuje ošetřit kulturu herbicidem – plevele zničeny, rostlina vydrží
- Odolnost proti plísním, bakteriím, virům
- Zvýšení odolnosti proti mrazu, suchu, zasolení půdy
- Schopnost syntézy nových látek, např.
Zlatá rýže – vnesen gen pro zvýšení obsahu provitamínu A, podobně jiné transgenní odrůdy mají geny pro zvýšení množství železa a fosforu v obilkách (větší výživná hodnota rýže)

Řepka – chimérický gen (složený z genů dvou různých organismů) pro oleosin+hirudin – produkce hirudinu (protisrážlivý faktor – využití např. při operacích, levnější než získávat z pijavek)

Bavlna obsahující gen pro modré barvivo – na poli se sklízí rovnou modrá bavlna, nemusí se barvit

- Vnesení genu, který umlčí jiné geny – např. u rajčete je inhibován gen produkující enzym, který působí měknutí plodů.
- Čištění kontaminovaných půd – některé rostliny lze geneticky upravit tak, že do nadzemních částí akumulují např. těžké kovy v mnohonásobné koncentraci oproti koncentraci v půdě.

Rizika

- Přenos genu na jiné kulturní odrůdy nebo planě rostoucí rostliny – kříženec nesoucí modifikovaný gen může v populaci převážit a postupně vytlačit ostatní varianty – snížení genetické variability druhu
- Invazní rostliny – GM rostlina sama nebo její kříženci. Masově se šíří, protože je odolnější než konkurenti.
- Nepříznivé působení na živočichy, kteří požírají GM rostlinu (žádoucí – likvidace škůdců, nežádoucí – likvidace ostatních druhů, možné negativní účinky technických GM rostlin na živočichy). např. z Bt kukuřice se větrem přenesl pyl na další rostliny (jiné druhy), na nich motýl Monarcha stěhovavý, pro něj pyl toxický).
- Nepříznivé působení na predátory škůdců – snížení množství potravy, látky z GM rostlin v tělech škůdců
- Vznik rezistence škůdců (např. rezistence vůči Bt kukuřici je recesivní; opatření: kolem polí s Bt kukuřicí se vyseje ochranný pás normální kukuřice – většina pylu z GM rostliny se zachytí v ochranném pásu, v normální kukuřici se mohou vyvíjet a množit jedinci nesoucí dominantní alely, ti se kříží s recesivními, tj. v populaci nepřeváží recesivní homozygoti)
- Možnost vzniku nových virových chorob rostlin – jako přenašeče genů se používají viry, za určitých podmínek by se mohly rekombinovat virové geny a vytvořit se nový vir
- Dříve obsahovaly GM rostliny geny rezistence k antibiotikům (tyto geny byly ve vazbě s vnášeným genem a sloužily k selekci těch rostlin, kde se správně začlenil nový gen) – riziko přenosu na patogenní bakterie, dnes se ze všech GM rostlin tyto geny odstraňují.
- Působení na člověka – potenciální alergeny (člověk může mít alergii např. na ořechy – pokud se gen z ořechů přenesl na jinou plodinu, může tato GM plodina vyvolat alergickou reakci).
- Obecně:
 - 1) Polní pěstování GM rostlin je určitým zásahem do ekosystému a přináší jistá rizika
 - 2) GM rostliny mohou obsahovat nové alergeny nebo jejich kombinace (účinek původní rostliny se zkombinuje s účinkem vneseného genu), které mohou být rizikové pro některé lidi (případně zvířata)

Testy GM rostlin

- Test produktu genu – bílkoviny: obsah a distribuce v rostlině, vliv na rostlinu
- Bezpečnost bílkoviny: toxikologické zkoušky na myších a dalších pokusných zvířatech, izolace bílkoviny, zjišťování sekvence aminokyselin (skandál: Bt brambory, zkoušky na potkaních – potkani krmení výhradně Bt brambory, špatná kondice a hynutí potkanů – dvě interpretace: 1) důkaz toxicity Bt brambor pro potkany/ 2) špatně uspořádaný pokus bez srovnávacího vzorku (= potkani krmení normálními brambory), na potkany nepříznivě působily jiné látky, než produkt vneseného genu
- Srovnání s geneticky nemodifikovanou odrůdou (obsah látek, toxicita)

Přísné zákony – pokud nějaká ze zkoušek dopadne nepříznivě, není povolena distribuce GM rostliny. V řadě zemích Evropy většina genově manipulovaných rostlin zakázána (veřejné mínění, ekonomika), v USA podmínky liberálnější (např. velké plochy GM sóji a kukuřice). GM rostliny nadějně zejména pro třetí svět – zvýšení výnosu a nutriční hodnoty, odolnost vůči škůdcům (často až 90% úrody zničí škůdci, plísňe apod.)

Živočichové

Genové manipulace složitější a hůře proveditelné než u rostlin nebo bakterií (rozsáhlejší genom, složitější regulace, nemožnost vegetativního rozmnožování, ...)

Využití

- zvýšení růstu hospodářských zvířat
- odolnost vůči chorobám
- změna vlastností produktů (např. snížení množství laktózy v kravském mléce)
- produkce farmakologicky využitelných bílkovin, např. v mléce (vakcína proti viru hepatitidy B, faktor srážlivosti krve, ...)
- produkce nových materiálů (umělá pavučina, ...)

Techniky

- vpravení genu do zárodku či tkáně mikrokapilárou – málo účinné pomocí virových nosičů – přenést lze jen některé geny, u některých virů riziko (např. imunitní reakce)
- vpravení genu do kultury buněk in vitro, výběr vhodných jader, kde byl přenos genu úspěšný, klonování (vnesených takto upravených jader do oocytů – vývoj nového jedince)
Např.: Z embrya se odeberou fibroblasty (zárodečné pojivové buňky), do nich se přenesou vybrané geny. Jádra s novým genem se přenesou do oocytu zbaveného vlastního jádra, vajíčka jsou pak implantována do dělohy. Narodí se transgenní potomek, který produkuje potřebnou látku.
(Ovce Polly – v mléce produkuje faktor IX pro srážení krve – léčba hemofilie. Získávání faktoru IX touto cestou je mnohonásobně levnější, než jinými způsoby).

Klonování

Obecně jde o získání geneticky shodných jedinců.

Klon je každá skupina geneticky shodných buněk či organismů (např. vegetativně namnožené rostliny, prvoci vzniklí dělením jedné buňky apod.)

Klonování savců – tři důležité metody:

1) Dělení zárodků

Na úrovni moruly se zárodek rozdělí na několik částí, za příznivých okolností se z každé části vyvine samostatné embryo schopné dalšího vývoje. Např. opice Tetra – vyvinula se z embrya vzniklého rozdělením původního embrya na 4 části (tři ostatní zárodky zahynuly během vývoje).

Využití: Rozdělení embrya hodnotného hospodářského zvířete – získání většího počtu jedinců (např. při oplodnění in vitro – získá se větší množství embryí, ty se testují, nejlepší se vyberou a naklonují dělením).

(Přirozeně takto vznikají jednovaječná dvojčata)

2) Přenos jader

Do oocytu (samičí pohlavní buňka) zbaveného vlastního jádra se přenesou 2n jádro z vybrané buňky “genetického” rodiče. Pak se buňka stimuluje k dalšímu vývoji, vnesou se do dělohy “biologické” matky a nechá se vyvinout přirozenou cestou.

Př.: Ovce Dolly – jádro buňky mléčné žlázy dospělé ovce.

Úspěšné jen u některých druhů (zatím největší úspěchy u ovcí a skotu), zatím spíše ojedinělé úspěchy (Dolly – z 277 pokusů jeden úspěšný).

Základním problémem je interakce cytoplasmy vajíčka příjemce a jádra dárce. V první fázi je vývoj oplozeného vajíčka řízen enzymy a RNA, které jsou přítomny v cytoplasmě a pocházejí od biologické matky. Po určitém čase (např. myš 2 dny, prase a člověk 4 – 6 dní, ovce 8 dní, králík 16 dní) řízení vyvíjející se buňky převezme její jádro. Po implantaci nového jádra do oocytu nějaký čas trvá, než se nové jádro nastaví na situaci v nové buňce a převezme její řízení. Pokud je po tuto dobu buňka řízena RNA a enzymy v cytoplasmě (tj. pokud toto řízení trvá delší dobu – např. 8 dní u ovce), je vyšší pravděpodobnost úspěchu.

Při přenosu jader jsou v cytoplasmě buňky příjemce mitochondrie (které mají vlastní DNA), tj. geny nesené mitochondriemi pocházejí od “biologického” rodiče, ostatní od “genetického” rodiče.

U ovce Dolly se objevil další problém: na koncích chromozomů každé buňky jsou úseky – telomery, které se při každém dělení buňky zkracují. Pokud se telomery zkrátí na minimum, buněčný cyklus se zastaví a buňka se dále nedělí (délka telomer tedy odpovídá počtu dělení buňky – čím častější dělení buňky, tím kratší telomery). (U pohlavních buněk se telomery obnoví na původní délku.). Ovce Dolly má telomery odpovídající stáří své “genetické” matky, tj. mnohem kratší, než ovce stejného věku, a projevují se u ní choroby typické pro pokročilý věk (např. artróza).

3) Využití embryonálních kmenových buněk (ESC)

Za určitých podmínek se ESC množí bez diferenciaci, vznikne hodně buněk se stejnou genetickou informací. Existují postupy, jak z těchto buněk získat řadu životaschopných geneticky shodných zárodků (zatím úspěšné pokusy u myši, u dalších zvířat se nedaří). Z ESC lze ovlivněním diferenciaci získat (u myši) řadu různých tkání.

Genové manipulace a klonování člověka

Klonování člověka

- 1) **Reprodukční** – cílem klonování je vytvořit geneticky (téměř) shodného jedince s dárce jádra – ve většině zemí zakázáno, velké biologické riziko (vrozené vývojové vady), eticky nevyjasněno

2) **Terapeutické** – cílem klonování je získání buněk pro léčbu

Genové manipulace u člověka

Genové manipulace jsou omezeny (prozatím) na **tělní buňky** – tj. jde o změny v buňkách, ze kterých se nevyvíjejí potomci, změna se týká jen jednoho jedince

Genové manipulace se **zárodečnými buňkami** (tj. buňkami, ze kterých budou vznikat mj. pohlavní buňky) – změna se týká všech potomků – zatím složitě a riskantní, ve většině zemí zakázáno.

Ve stadiu experimentů je vytvoření umělého chromozomu, na který se přenesou potřebné nové geny. Takový chromozom bez problémů prochází mitózou i meiózou a může být možností, jak řešit obtíže a technická rizika manipulace se zárodečnými buňkami. Výsledek je riskantní z etického a sociálního hlediska.

Genové manipulace můžou např. prodloužit lidský věk (u zvířat úspěšné pokusy) tak, že jednotlivá stádia vývoje budou trvat déle. Pro reprodukci budou pak dlouhověcí lidé vyhledávat odpovídající partnery. Lidé geneticky manipulovaní (tj. ti, kteří investovali peníze do genetické výbavy svých potomků) budou přednostně vyhledávat geneticky manipulované partnery, přítomnost nového chromozomu může být překážkou plodnosti potomků geneticky pozměněných lidí s nepozměněnými.

Všechny tyto tři příklady mohou vést k rozdělení lidské populace na skupinu geneticky pozměněných a geneticky nepozměněných, mezi nimiž bude postupně vznikat reprodukční bariéra.

Genová terapie člověka

Převážně ve stadiu pokusů (zkoušky na zvířatech, klinické pokusy na dobrovolnících)

- Léčba některých chorob způsobených vadným genem
Do organismu se vpraví (různými technikami – např. mechanickým vnesením, pomocí viru, transplantací geneticky pozměněných buněk, ...) genový konstrukt, který nahradí nefunkční nebo vyřadí z provozu vadný gen.

Např.: - defekt enzymu adenosin deaminázy – léčba transfekcí kostní dřeně

(3 vyléčené případy)

- hemofilie – do buněk se vpraví gen pro produkci chybějícího faktoru srážlivosti

- Alzheimerova choroba – do mozku injikovány vlastní buňky se zvýšenou produkcí GNF (= nervový růstový faktor)

- srdce – buňky obsahující gen pro faktor růstu nových cév, gen pro zvýšení produkce NO

- Pokusy s lidskými ESC (embryonálními kmenovými buňkami) – cílem je navodit diferenciaci tak, aby vznikly konkrétní tkáňové buňky, které lze transplantovat do nemocného orgánu (např. buňky produkující inzulín, buňky srdečního svalu, buňky stěny srdečních cév, mozkové buňky – léčba Parkinsonovy choroby, ...)
Jedna z možných technik: Pacient dá své buňky, jejich jádra se přenesou do oocyty zbaveného jádra (před tím může dojít k jejich genetické modifikaci – např. se vnese gen pro schopnost produkovat inzulín), embryo se vyvine, vytvoří se ESC, z nich se diferencuje potřebná tkáň, ta se transplantuje na potřebné místo. Naznačený postup zaručuje, že transplantované buňky nebudou odmítnuty imunitním systémem.

Dva problémy: 1) etický – usmrcení embrya

2) technický – z ESC vzniknou jiné buňky než chceme

Snaha o řešení problému 1) – pokusy s využitím zvířecích buněk, do kterých bude přeneseno jádro lidské buňky (nepříliš úspěšné), druhou možností je použití vlastních buněk pacienta, které se určitými zásahy vrátí do nediferencovaného stavu a budou se chovat jako ESC (zatím ve stadiu prvních pokusů).

- DNA vakcíny
“DNA očkování” – místo oslabeného nebo mrtvého patogenu se do buněk vnáší jen část jeho DNA – produkce např. virové bílkoviny – vyvolání imunitní reakce (např. HIV, TBC, salmonella, malárie, ...)
- Léčba nádorů (asi 70% klinických zkoušek)
(Nádor – množící se tkáň, chová se jinak než normální tkáň v těle)
Základní princip:
 1. Do nádoru se vpraví gen.
 2. Podá se látka, která působí na geneticky pozměněné buňky.
Tím se např. rovnou usmrtí nádorové buňky, aktivizuje se imunitní systém, který nádor zničí, zastaví se růst cév, které nádor vyživují, obnoví se činnost genu, který spouští apoptózu (apoptóza = naprogramovaná “sebevražda” buňky, u nádorových buněk je gen pro spuštění apoptózy deaktivovaný).