

Genetické manipulace: nová éra výzkumu hmyzu

Marek Jindra

Genetika je jedním z účinných nástrojů k odhalování principů vývoje a fungování živých organismů, protože přináší důkazy o funkci jednotlivých genů. V klasické genetice odvozujeme tyto funkce od defektů způsobených mutacemi. Reverzní genetika je postupem, kdy biologickou funkci nějakého genu hledáme tak, že gen vyřadíme z funkce nebo do organismu přidáme a podle potřeby aktivujeme. Takový výzkum umožňuje modelové organismy, v nichž lze s geny experimentálně manipulovat.

Výhody octomilky

Mezi nejdůležitější modely patří muška octomilka (*Drosophila melanogaster*). Možnosti genetických manipulací, dostupnost materiálu a informací u tohoto druhu nebyly překonány u žádného jiného organismu. Mutantní a geneticky modifikované octomilky obdržíme z veřejných genetických bank. Úplná genetická informace zapsaná v DNA octomilky byla přečtena a je všem přístupná na internetu, stejně

jako údaje o dosud známých funkcích asi poloviny z jejich 14 tisíc genů.

Jelikož většinu z těchto genů nacházíme také u vyšších živočichů včetně člověka, mohou mít výsledky získané použitím *D. melanogaster* obecnou platnost. Pohled do

Gen pro zelený světélkující protein GFP z medúzy Aequorea victoria byl do tkání bource morušového (Bombyx mori) vnesen pomocí rekombinantního viru Sindbis. Foto M. Uhlířová

učebnic a do nejlepších vědeckých časopisů ukazuje, že práce na octomilce významně přispěla k rozvoji moderní biologie a že dodnes intenzivně pokračuje ve stovkách světových laboratoří. Naše země, která kdysi dala prostřednictvím Gregora Mendela světu zákony dědičnosti, je však v tomto směru pozadu. Laboratoře, které umějí potenciál octomilky využít, totiž u nás teprve vznikají, např. v Entomologickém ústavu AV ČR. Podívejme se na několik triků, které nám na modelu jménem *Drosophila* pomáhají zjistit, k čemu který gen vlastně je.

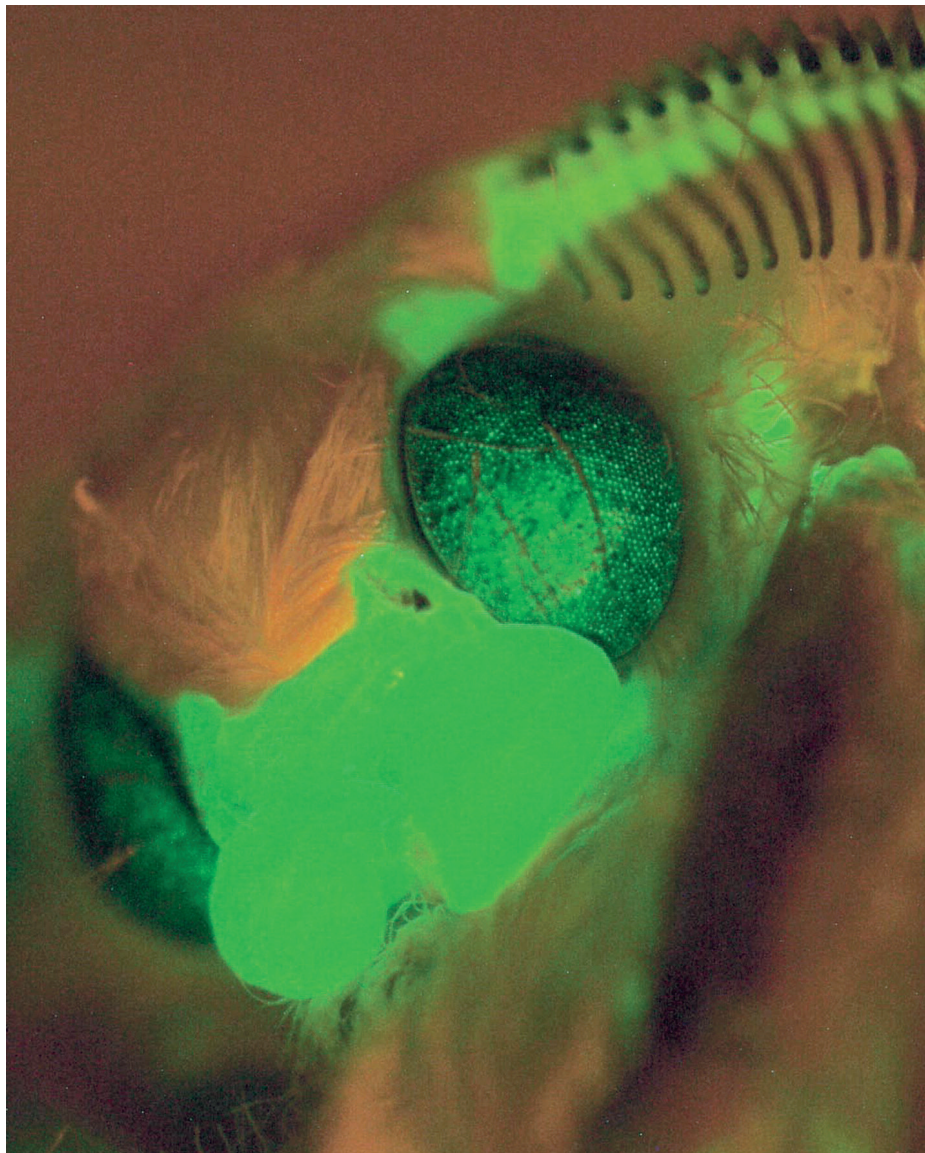
Nástroje pro reverzní genetiku: Jak přidáme octomilkám nový gen

Octomilka by se byla nestala tak důležitým modelem, kdyby ji nebylo možno geneticky transformovat, tj. vnášet do jejího genomu úseky DNA (geny). Mohou to být buď její vlastní geny, nebo geny jiných druhů, třeba i lidské, jejichž univerzální funkci lze v těle mouchy ověřit. Přenos genů umožňují mimo jiné tzv. transpozabilní elementy (transpozony), které se začleňují do chromozomů hostitele i s přidanou DNA. Zmíníme dva takové vektory: element *P* specifický pro octomilku a *piggyBac*, který lze použít u širokého spektra druhů.

Transformaci octomilky elementem *P* poprvé provedli Spradling a Rubin v r. 1982. Z elementu *P* odstranili gen pro enzym transponázu a tím i jeho autonomní schopnost začlenit se do DNA a přemístit (transponovat) v genomu z místa na místo. Takto upravený element *P* lze do DNA mušky vložit, když aktivitu transponázy dodáme pomocí jiné DNA, tzv. helperu. Transformaci provádíme tak, že do embrya octomilky injikujeme skleněnou jehličkou směs dvou kruhových DNA: helper kódující transponázu a náš vektor *P*, který kromě markeru (genu-značky) nese také gen, který chceme studovat (obr. 1). Markerem je zpravidla gen pro barvu oka nebo jiný viditelný znak, kterým přítomnost cizí DNA v octomilce monitorujeme. Při troše štěstí se element *P* v jádrech embrya dostane do kontaktu s DNA, působením transponázy se svými speciálními konci zabuduje do některého z chromozomů a stane se tak jeho součástí. Aby měl vektor k DNA přístup, je nutno injikovat embrya dříve, než se kolem jejich jader vytvoří buněčné membrány, tj. asi do 1 hodiny po naklazení vajíčka. Zpravidla injikujeme stovky embryí.

Podstatné je, aby se transgen stal dědičnou součástí organismu, tj. součástí jeho zárodečné linie, budoucích vajíček nebo spermií. Na octomilce vychované z injikovaného embrya ještě žádné známky transformace nevidíme, jelikož integrace vektoru *P* proběhla jen v některých jejích buňkách. Pokud se však vektor začlenil také do zárodečné linie, nalezneme v potomstvu mušek transformované jedince nesoucí transgen DNA ve všech buňkách. Tyto transformanty poznáme podle markeru, jakým může být např. gen kódující protein GFP (Green Fluorescent Protein) vypůjčený ze zeleně světélkující medúzy *Aequorea victoria*. Gen pro GFP bylo napřed nutno přenést z genomu medúzy do elementu *P* a zajistit jeho rozpoznání ve tkáních octomilky vhodnou regulační sekvencí DNA: díky tomu pak transformované mušce mohou zeleně fluoreskovat oči (obr. 1).

Proč právě oči? Je to díky regulační sekvenci DNA, kterou v r. 1999 Ernst Wim-



Obr. 1 Schéma transformace octomilky *Drosophila melanogaster* transpozonovým vektorem *P*. Gen pro zeleně fluoreskující protein (GFP) vypůjčený z medúzy způsobuje světélkování očí octomilky poté, co byl pomocí elementu *P* zabudován do její DNA. Snímky M. Jindry

mer před gen GFP umístil. Na tuto sekven-
ci se váže a gen GFP tak aktivuje protein
Pax6 přítomný v oku, jehož vývoj řídí.
Tento marker je univerzální, protože jak
uvidíme dále, Pax6 aktivuje zelenou fluo-
rescenci také v oku bource morušového —
Bombyx mori (obr. 4).

Jak řídíme aktivitu uměle vložených genů

Trik se světélkujícíma očima ilustruje
jedno z použití elementu *P*, a to k cílené
aktivaci (expresi) genů ve zvolených buň-
kách a tkáních. Tato metoda nám obecně
umožňuje zjistit orgánově specifickou
expresi genů v průběhu embryonálního
vývoje. Do mutantů, jejichž vývoj je naru-
šen ztrátou nějakého genu (*X*), vneseme
tento gen umístěný za vhodnou, tkáňově
specifickou regulační sekvencí, tzv. spouš-
těčem — enhancerem. Tak spustíme expre-
si genu *X* pouze v těch buňkách, v nichž je
enhancer aktivován, podobně jako tomu
bylo v případě Pax6. Pokud umožní aktivita
genu *X* omezená např. jen na nervovou sou-
stavu mutantní mušce normální vývoj,
víme, že je funkce genu *X* např. ve střevě
postradatelná, zatímco v nervové soustavě
je nezbytná.

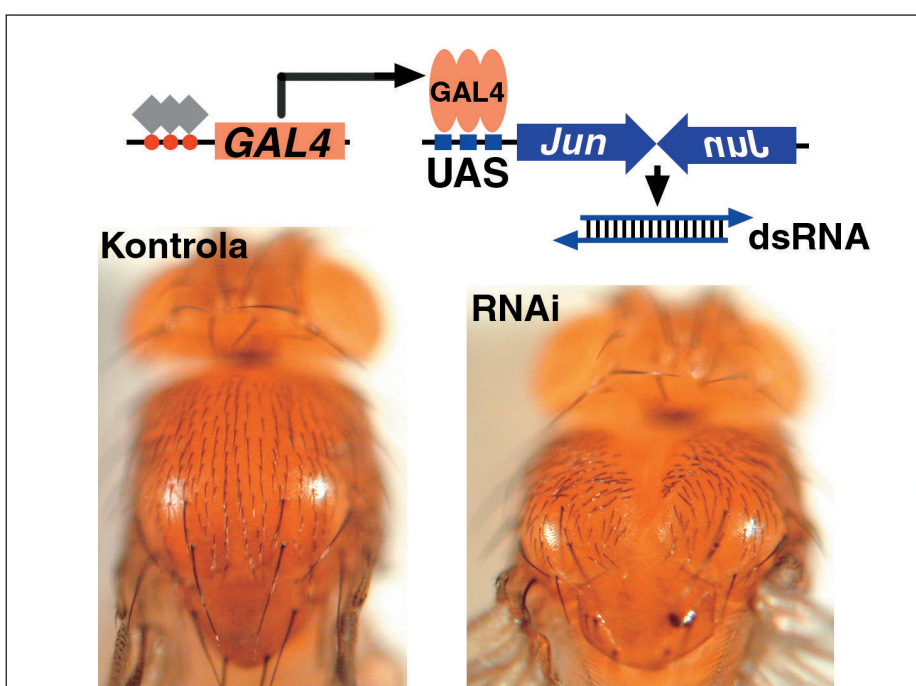
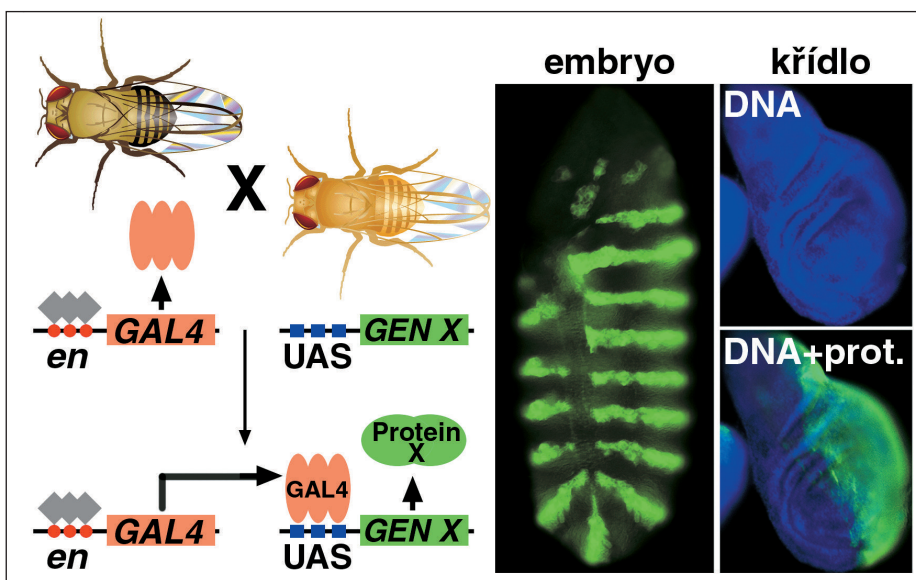
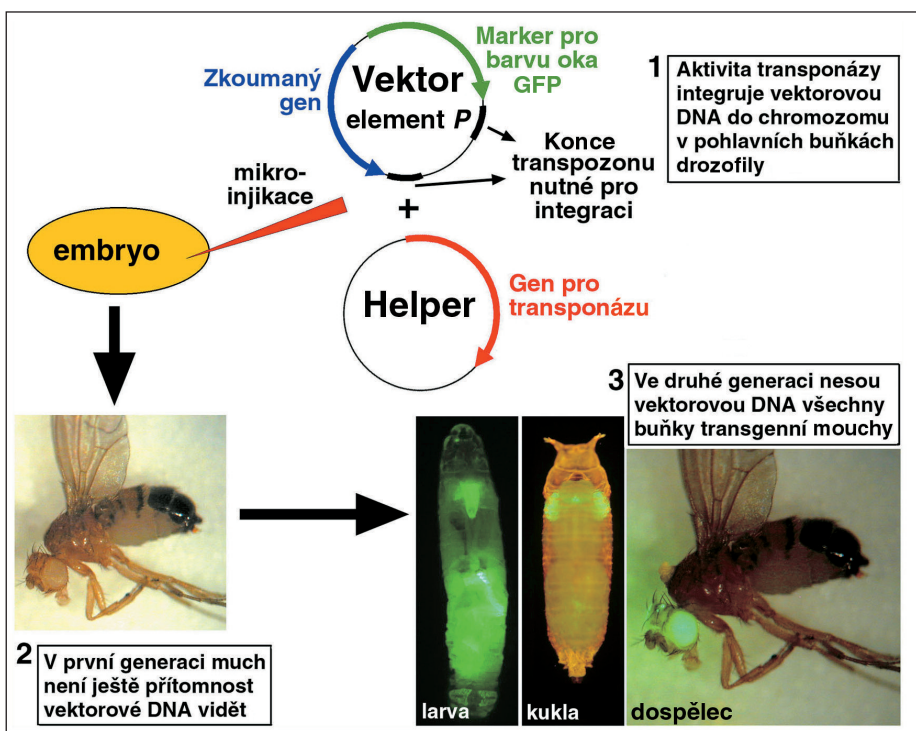
Elegantní způsob, jak zařídit cílenou
expresi genu, je založen na aktivačním pro-
teínu GAL4, vypůjčeném pro změnu z kva-
sinek. Tato metoda vyžaduje přípravu dvou
linií transgenních octomilek (obr. 2). Do

Obr. 2 Princip cílené genové exprese. Tran-
skripční faktor GAL4 z kvasinek se v potomstvu
transgenních octomilek váže na regulační
sekvenci UAS a spouští gen *X* (blíže viz text),
jehož produkt — protein *X* — zjišťujeme proti-
látkou (zeleně). Protein *X* se pak nachází pouze
tam, kde je GAL4 aktivován enhancerem z genu
engrailed (*en*). DNA budoucího křídla je zbar-
vena modře. Snímky I. Gažiové

jedné vneseme pomocí vektoru *P* gen pro
GAL4, jehož expresi řídí tkáňově specifický
enhancer. Druhá linie ponese gen *X* za
motivem DNA zvaným UAS (Upstream Acti-
vation Sequence), na který se GAL4 váže.
Dokud mušky těchto dvou linií nezkřížíme,
gen *X* „mlčí“. V potomstvu vzniklém zkří-
žením obou linií však GAL4 zapne expresi
genu *X*, a to pouze tam, kde je enhancer
pro GAL4 aktivní. Obr. 2 ukazuje expresi
transgenního proteinu, cílenou pomocí
enhanceru *engrailed* (*en*) do 14 článků
embrya a do zadní poloviny budoucího
křídla octomilky.

Ve vývojové biologii nás kromě „kde“
také často zajímá, „kdy“ je funkce genu pro
organismus potřebná. Jelikož mnohé regu-
lační geny mají životně důležité funkce již

Obr. 3 Umlčení genu *jun* metodou transgenní
interference RNA (RNAi) odbaluje funkci tohoto
genu ve vývoji octomilky. GAL4 aktivuje ve
specifické tkáni produkci symetrické RNA genu
jun, která se díky párování bází složí do dvouvlákná
(dsRNA); dsRNA pak spouští enzymatickou de-
gradaci messengerové RNA (mRNA) genu *jun*,
protein *Jun* tedy nevznikne. Snímky M. Jindry



během embryogeneze, mutanti, kterým tyto funkce chybějí, hynou před vylíhnutím, aniž bychom mohli sledovat úlohu genu v pozdějším vývoji. Proto je třeba expresi genu, nebo naopak umlčení genu aktivovat ve vhodném okamžiku podle potřeby. K tomu účelu poslouží regulační sekvence, jejichž aktivitu lze stimulovat vnějšími vlivy. Příkladem je enhancer genu pro protein Hsp70 (Heat shock protein). Pokud je tento enhancer ve vektoru *P* před zkoumaným genem, pak v buňkách *D. melanogaster* nesoucích tyto sekvence DNA tepelný šok indukuje expresi transgenu. Tímto způsobem lze nahradit (komplementovat) chybějící aktivitu vlastního mutantního genu a určit, která fáze vývoje tento gen vyžaduje.

Jak geny umlčíme

Abychom zjistili úlohu genu v živém organismu, musíme gen nějak vyřadit z činnosti a pak zkoumat následky. Klasická mutagenese je však pomalá a nespecifická. Jak jsme již zmínili, mutace v důležitých genech navíc často vedou ke smrti v raných stádiích, takže nám pozdější a třeba zajímavější úloha genu unikne. Dnes však můžeme geny nejen vyřadit z činnosti bez pracné izolace mutant, ale dokonce je inaktivovat podle potřeby v jednotlivých orgánech octomilky a v různých vývojových stádiích.

Princípem takového umlčování genů je proces zvaný RNA interference (RNAi), který kdysi dávno organismy vyvinuly jako obranu proti virům. Byl objeven koncem 90. let 20. stol. RNAi v buňce degraduje mRNA, nezbytný mezičlánek přenosu informace mezi genem (DNA) a jeho funkčním produktem (proteinem), pro nějž je mRNA předlohou. Způsobit to může dvouvláknová RNA (přirozená RNA je jednovláknová) shodná s některým z genů aktivních v buňkách organismu. Dvouvláknová

RNA je rozpoznána systémem RNAi, který ji nejprve rozdělí na malé úseky a ty pak použije jako vzor pro rozložení homologní přirozené mRNA na stejné části. Tím je znemožněn překlad mRNA do proteinového produktu a gen je umlčen.

Jak ale dvouvláknovou RNA do buněk dostat? Pomůže nám opět element *P*, který umožňuje vyrábět takovou RNA přímo v buňkách živé octomilky. Do vektoru *P* vložíme sekvenci genu, který chceme umlčet, a to dvakrát za sebou v opačné orientaci (obr. 3). Přepisem této sekvence vznikne molekula RNA, která se díky své vnitřní symetrii sama složí do dvouvláknka. Tato RNA je jedem, který si na sebe octomilka sama tvoří.

Vzpomeneme-li si nyní na systém GAL4-UAS pro cílenou expresi, snadno pochopíme, jak lze zbraň RNAi zamířit pouze na vybrané orgány octomilky. Opačně orientované úseky našeho genu stačí umístit za sekvenci UAS a mouchu nesoucí tento konstrukt zkřížit s příslušnou linií GAL4. Obr. 3 ukazuje příklad umlčení genu *jun* pomocí aktivity GAL4 v hrbitní části hrudi. Zatímco ztráta genu *jun* by octomilku zabila ve stadiu embrya, prostorově omezená RNAi způsobuje rozštěp hrudi, a tudíž odhaluje funkci *jun* při morfogenezi dospělce.

Má ale pro nás takový poznatek význam? Jistěže má, neboť stejný protein Jun zprostředkovává naši imunitní odpověď nebo programovanou smrt našich buněk; některé mutace v genu *jun* způsobují rakovinu. Na rozdíl od octomilky má člověk ne jeden, ale hned tři geny kódující podobné proteiny Jun. Následky jejich experimentálního umlčení však u živých lidí studovat nemůžeme.

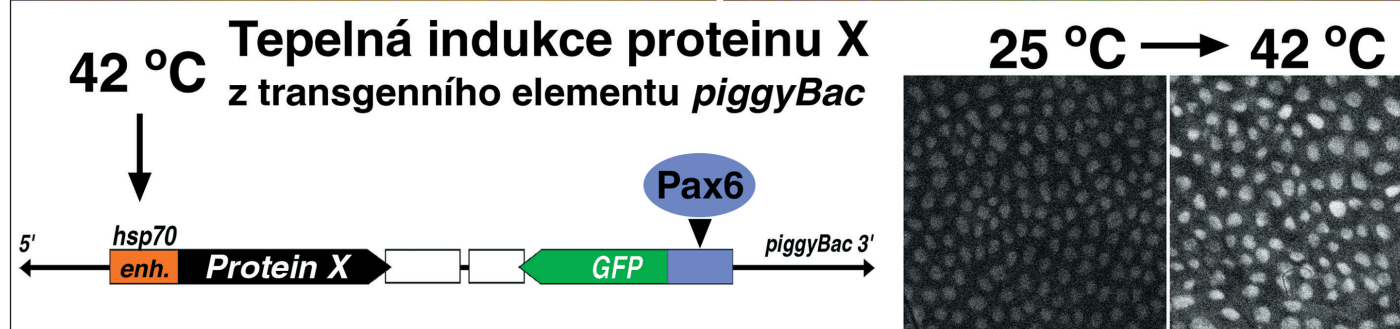
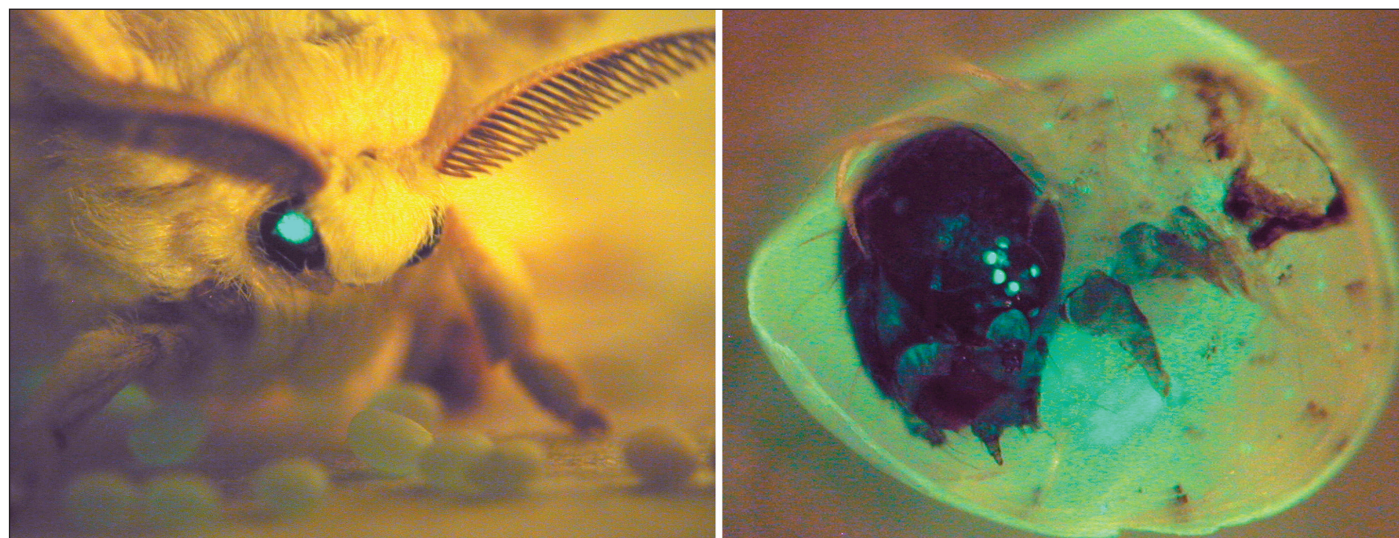
Bourci morušovi a milion dalších

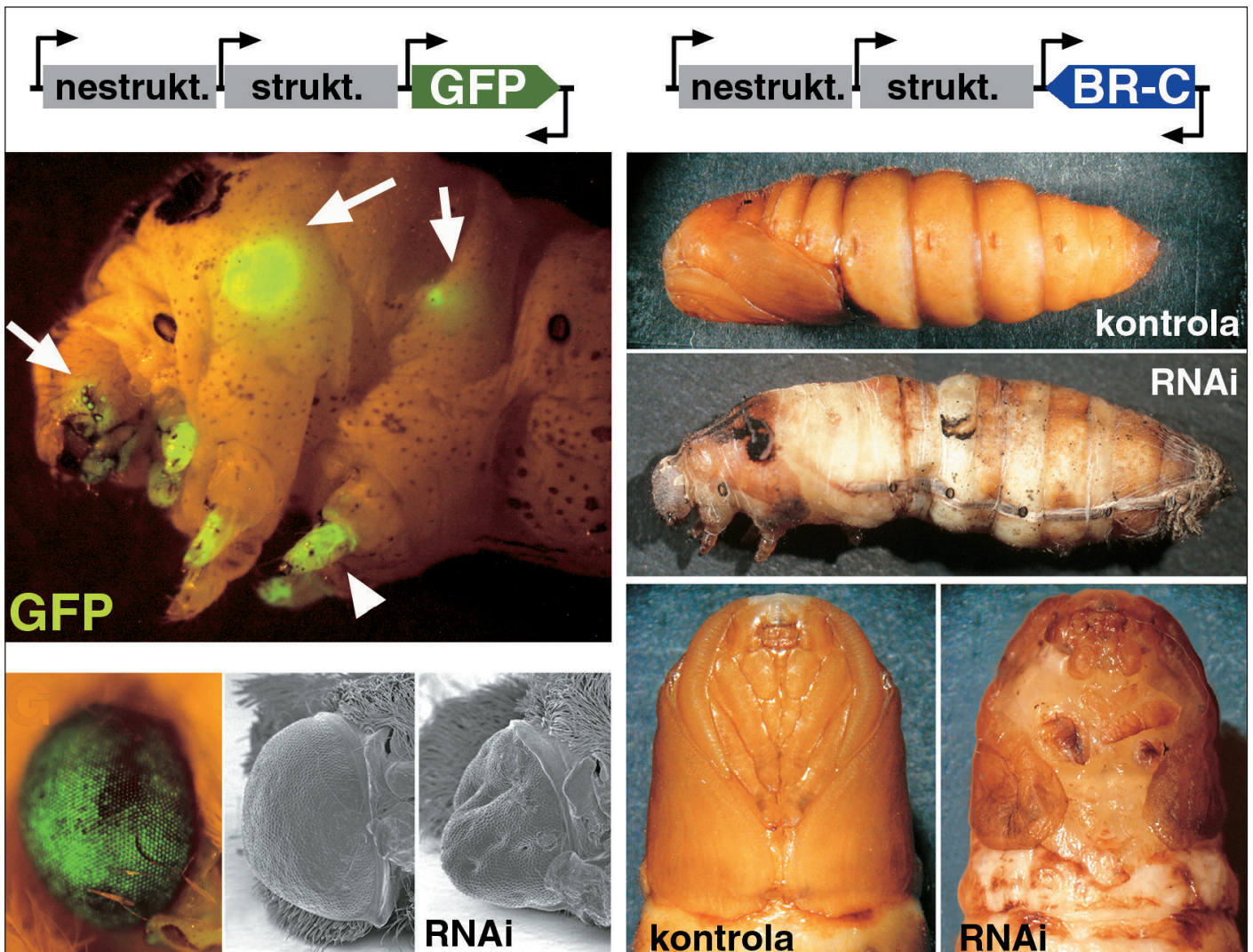
Bylo by skvělé, kdybychom mohli alespoň některé z metod běžných u octomilky

aplikovat na ostatní druhy hmyzu. Nejprve si ale řekněme, k čemu by takový výzkum vůbec byl. Jeden význam je obecně biologický. Vedle *D. melanogaster* známe více než milion druhů hmyzu, jejichž variabilita je nezměrná. Mají nejrůznější tvary, uplatňují odlišné vývojové a životní strategie, přezimují nebo migrují, adaptují se na různé podmínky. V této pestré společnosti má octomilka výjimečné postavení, neboť postrádá některé typické rysy (např. téměř celé tělo mušky je během metamorfózy tvořeno z primordiálních buněk, zatímco u většiny hmyzu z existujících buněk larvy). Abychom pochopili obecné principy hmyzí biologie, musíme proto funkce alespoň některých genů ověřit u jiných druhů.

Druhý aspekt je praktický. Četné druhy hmyzu škodí na kulturních plodinách, jiné (např. komáři) zase přenášejí lidské nemoci. Chceme-li v budoucnu inteligentním způsobem zasáhnout proti škůdcům nebo zastavit přenos např. malárie, neobejde se to bez genetických manipulací příslušných

Obr. 4 Tepelná indukce transgenního proteinu u bource morušového (Bombyx mori). Transformace bource transpozonovým vektorem piggyBac (vlevo dole) byla provedena podobně jako u octomilky (D. melanogaster, obr. 1). Transgenní marker GFP z medúzy, řízený vazebnou DNA pro protein Pax6 způsobuje zelené světlování očí samičky, která právě klade vajíčka (nahore vlevo). Přítomnost proteinu GFP je vidět již 6–7 dní po naklazení vajíček v jednoduchých očích ještě nevytříblé larvy bource (vpravo nahore). Kromě genu GFP obsahuje vektor piggyBac ještě gen pro určitý protein (X), jehož exprese lze indukovat zahřátím larev na 42 °C. Teplo působí na enhancer (enh.) hsp70 (blíže viz text) a protein X se hromadí v jádrech pokožky bource (vpravo dole). Enhancer hsp70 pochází z octomilky, kde stejný systém funguje při 37 °C. Snímky M. Uhlířové a M. Jindry





druhů hmyzu. To byl ještě donedávna sen, který se však pomalu naplňuje. Poslední vývoj technik přenosu genů pomocí nových transpozonů a virových vektorů otevírá možnosti genové manipulace u motýlů, komárů, much, brouků. Některé možnosti si ukážeme na bourci morušovém, s kterým naše laboratoř také pracuje.

Místo *P* elementu *piggyBac*

Získat zelenooké bource (obr. 4) na způsob octomilek nebyl problém po tom, co japonští a francouzští badatelé ukázali, že transpozon *piggyBac* může u bource nahradit element *P*. To bylo v r. 2000, 18 let po úspěšné transformaci *D. melanogaster*. Jak jsme již viděli, vnesením DNA do organismu však problém nekončí; aktivitu nového genu je také nutno určitým způsobem řídit. Proto jsme kromě GFP vložili do chromozomu bource ještě další gen, zařazený za již zmíněný enhancer Hsp70 (Heat shock protein) z drozofily. Tím jsme získali možnost aktivovat vložený gen v živých bourcích zvýšením teploty. Kromě systému tepelné indukce funguje u bource i systém cílené exprese GAL4-UAS, znázorněný na obr. 2. I když *Drosophila* zůstane nedostupným modelem, nic nám už nebrání provádět reverzní genetiku u bourců. *PiggyBac* navíc umožňuje využít bource jako bioreaktor pro výrobu žádaných proteinů. V Japonsku např. do genomu bource vložili gen pro lidský kolagen, který ve vysoké kvalitě vypřádá zároveň se svým hedvábím.

Co dokáže virus *Sindbis*

Přes počáteční optimismus se *piggyBac* zatím neosvědčil při funkční analýze genů. Expresí transgenických proteinů ani dvouvláknové RNA se totiž ještě nepodařilo vyvolat u bourců vývojové defekty, díky nimž bychom mohli sledovat funkce genů. Kromě toho zůstává dědičná transformace bource časově náročná, neboť jeho generační doba 45 dní je pětkrát delší než u drozofily.

Vhodnou alternativou může být *Sindbis*, alfavirus z čel. *Togaviridae*, který infikuje hmyz, ale nezabíjí ho. Genom viru *Sindbis* tvoří jednovláknová RNA kódující proteiny nutné pro propagaci viru. Do virového genomu lze přidat cizí gen, který se pak v buňce hostitele ve vysoké míře exprimuje spolu s virovými geny. Výhodou je, že náš gen zaneseme snadno a rychle injekcí viru do těla bource; nevýhoda spočívá v tom, že se *Sindbis* nepřenáší na další generace a neproniká do všech buněk.

Abychom viděli, jak se virová infekce v těle šíří, znovu použijeme gen pro zelené fluoreskující protein (GFP) z medúzy. Už tři dny po aplikaci viru se v larvě bource projevuje přítomnost GFP, nejsilněji v zárodcích budoucích křídel, nohou a očí dospělé (obr. 5). Infekce přetrvává během přeměny larvy v kuklu a kukly v dospělého bource, aniž by tuto metamorfózu narušila. To nám umožňuje využít *Sindbis* pro genetické studium vývoje.

Jednou z možností je inaktivace vybraných genů cestou RNA interference (RNAi). RNA viru *Sindbis* se v buňkách hostitele

Obr. 5 Využití viru *Sindbis* u bource morušového k expresi cizího proteinu (GFP) a umlčení genu bource *BR-C*. Gen *BR-C*, s nímž chceme manipulovat, byl umístěn za nestrukturní a strukturní geny viru. GFP signalizuje přítomnost viru v zárodcích budoucích křídel, nohou a očí (šipky). Infekce přetrvává do dospělosti, např. v oku (vlevo dole). Vývoj oka, stejně jako kuklení a vývoj nohou či křídel je narušen umlčením genu *BR-C* (RNAi). Snímky M. Uhlířové

přepisuje v obou směrech včetně vloženého genu, takže vznikající komplementární kopie mohou tvořit dvouvláknovou RNA a proces RNAi spustit. Že k tomu skutečně dochází, jsme u bource ověřili umlčením genu *BR-C*. Dvouvláknová RNA z viru způsobila v tkáních larev degradaci přirozené mRNA pro *BR-C*, což buď zabránilo kuklení nebo narušilo následný vývoj očí a nohou dospělé (obr. 5). Zároveň nedošlo k degeneraci již nepotřebných snovacích žláz larvy. To znamená, že ztráta funkce genu *BR-C* ovlivnila u bource oba aspekty metamorfózy, ve kterých hraje *BR-C* klíčovou roli i u octomilky, jak bylo již mnoho let známo ze studia jejích mutantů. Náš výsledek je prvním skutečným důkazem, že gen *BR-C* hraje podobnou roli ve vývoji alespoň dvou hmyzích řádů, tedy dvoukřídlých a motýlů.

Uvedené příklady využití viru *Sindbis* a transpozonu *piggyBac* ukazují, že se genetické manipulace hmyzu stávají realitou. Cílem není samozřejmě skládat z bourců a medúz zelenooké chiméry jako dr. Frankenstein, ale dozvědět se více o hmyzu — nejpočetnější skupině živočichů na Zemi.