

Nové možnosti genových modifikací se vyvíjejí paralelně s novými bezpečnostními opatřeními

Záhy poté, co se genové inženýrství oddělilo od molekulární biologie, bylo jasné, že vzniká nová technologie, která pomůže nejen základnímu biologickému výzkumu, ale také osvěží zcela originálním způsobem rozvoj biotechnologií. Později se ukázalo, že praktický význam je ještě mnohem širší, než se původně očekávalo. Podobně jako při práci s ohněm může však dojít i při využívání této technologie k případnému ohrožení a dokonce k zneužití. V tomto článku ukazují, že genové inženýři věnují bezpečnosti od samého počátku velkou pozornost, která je demonstrována na příkladech z historie vývoje stále důmyslnějších bezpečnostních opatření.

Nejdůležitější používané technologie

V první etapě rozvoje genových modifikací se většinou používala technologie rekombinantní DNA, zavedená zakladateli této nové vědecko-technické disciplíny (Cohen, Boyer a Berg 1971–73). Vhodně upravený modifikační gen byl vložen do vektoru (přenašeče) odvozeného od plasmidu nebo virové DNA (S. N. Cohen a kol. 1973; obr. 1). Vektor, pomocná molekula DNA, byl vybaven tak, aby zajistil udržení a případně i projev cizorodého genu v novém organismu, a dále tak, aby bylo možno snadno rozeznat, anebo dokonce selektovat modifikovaný organismus. Tento postup se používá dodnes.

Pokud bylo třeba modifikaci organismu založit na odstranění funkce nějakého genu, zvolený gen mohl být poškozen působením mutagenního faktoru, což je postup aplikovatelný relativně snadno pouze u haploidních buněk bakterií. Genové inženýrství nabídlo řadu nových postupů pro

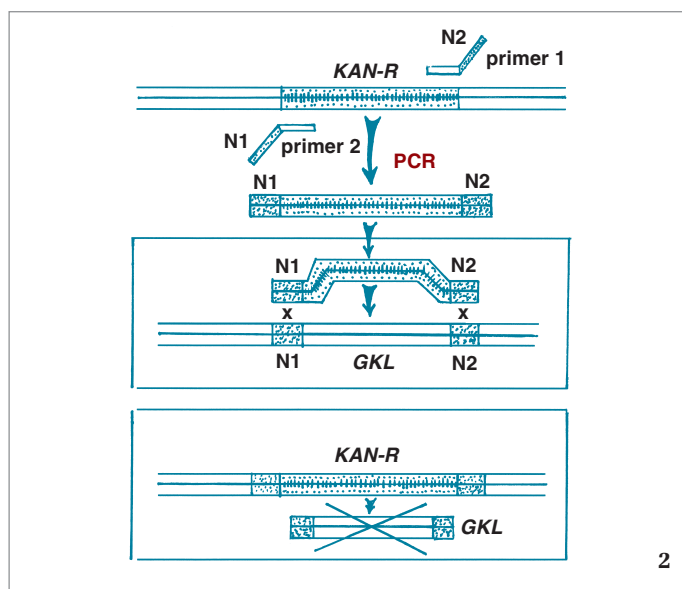
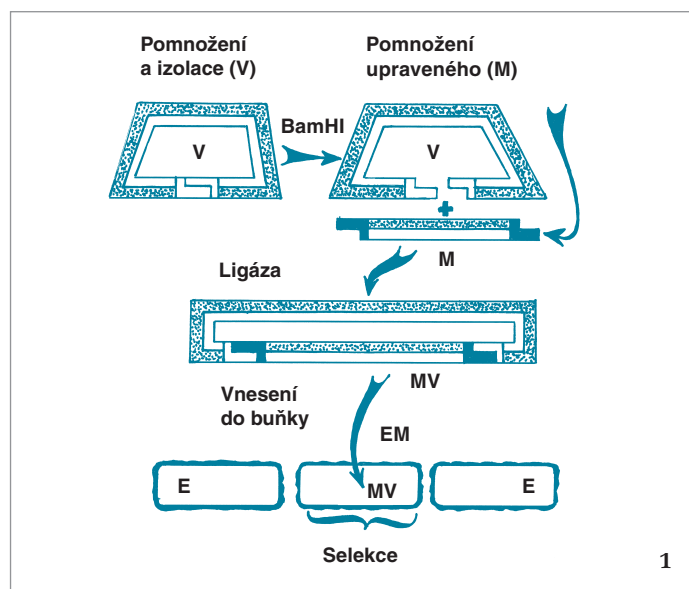
náhodné nebo cílené poškozování genů, např. velmi elegantní technologii „knock out“ (W. Kokotek, W. Lotz 1989; obr. 2), která je však snadno použitelná jen u některých druhů organismů (např. u kvasinek). Organismus musí vykazovat značnou schopnost rekombinovat DNA v úsecích vyznačujících se shodným pořadím bází (tzv. homologní rekombinace), jinak je aplikace této technologie velmi pracná a náročná na výběr správného zásahu na pozadí zásahů nesprávných. Rekombinace je pochod, který může vyvolat reorganizaci chromozomální DNA v buňkách. Nejběžnější je rekombinace homologní probíhající v oblastech dvouřetězcové DNA, které si sekvencí nukleotidů odpovídají. Podílí se na ní řada různých buněčných proteinů.

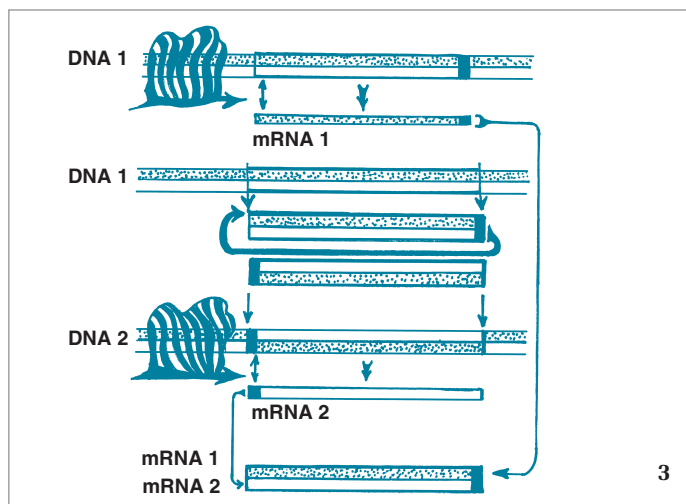
Velkého pokroku v této oblasti bylo dosaženo v druhé etapě rozvoje genového inženýrství za pomoci technologie využívající RNA, jejíž různé varianty dovolují

„umlčovat“ vybrané geny, aniž bychom je poškodili. Patří sem např. anti-sens technologie (J. Abelson a kol. 1999; obr. 3), která je použitelná jak u prokaryotických, tak u eukaryotických organismů. Je založena na zjištění, že pre-mRNA je obtížně modifikovatelná na mRNA a ta je nevhodná jako předloha pro syntézu proteinu, pokud vytváří s anti-sens RNA dvojitou šroubovici. Navíc se u eukaryotických buněk mohou objevit efekty odpovídající RNA-interferenci. Vnesení umělého genu pro vhodnou anti-sens RNA do buňky tedy může specificky zabránit projevu zvoleného genu. Další metoda pro cílené „umlčování“ genů („knock down“) je založena pouze na principu RNA interference. RNA interference je pochod, který reguluje na posttranskripční úrovni projev genů ve většině eukaryotických buněk. Regulačním agens je dvouřetězcová RNA, která je homologní s dostatečně dlouhou částí genu. Na regulaci se podílí dvě skupiny proteinů, jejichž seskupení se označují jako DICER, resp. RISC. V průběhu pocho-

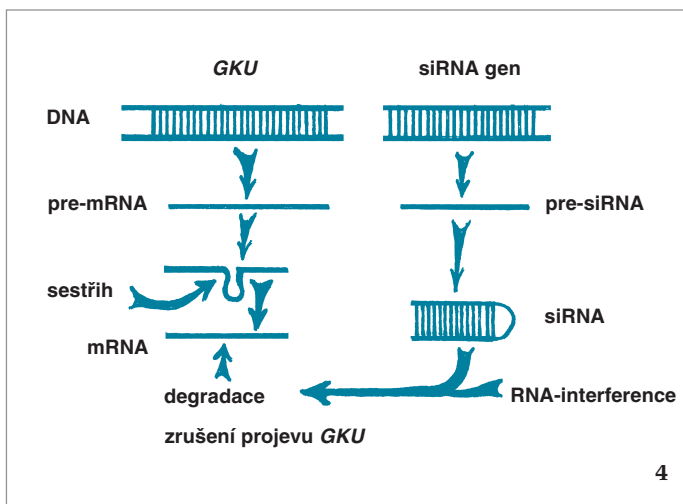
1 Zjednodušené schéma postupu s využitím technologie rekombinantní DNA (příklad). Vektor plazmidového typu (V), restriční endonukleáza (např. BamHI), upravený modifikační gen (M), ligáza, rekombinantní DNA (MV), buňky nového hostitele (např. bakterie *Escherichia coli* – E), genově modifikovaná buňka (EM) obsahující rekombinantní DNA.

2 Princip technologie „knock out“ (příklad). Delece genu („knock out“) výměnou za gen pro rezistenci k antibiotiku kanamycinu (*KAN-R*). Vektor s genem *KAN-R* poslouží pro namnožení *KAN-R* pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Použijeme-li primery s dostatečně dlouhými nástavci N1 a N2 homologními ke krajům genu k likvidaci (*GKL*), vzniknou nastavené kopie, které poslouží pro homologně rekombinační výměnu. Uvolněný *GKL* zanikne a buňka, v níž proběhla výměna, je rezistentní vůči kanamycinu a geneticínu, který má s kanamycinem sdruženou rezistenci. Např. u kvasinek geneticin slouží pro selekci „knock out“ buněk, které ztratily vybraný *GKL*, protože kanamycin do jejich buněk nevstupuje.





3



4

du se původní RNA nejprve štěpí na kratší úseky (siRNA), potom se jeden řetězec RNA degraduje a nakonec se indukuje obvykle přetržení uvnitř homologního transkriptu, po kterém následuje jeho postupná degradace. Tím je exprese genu „umlčena“. V některých případech dochází k „umlčení“ až na translační úrovni. Pro umlčení umělé se většinou používá jako siRNA vlásenková RNA – shRNA. Vnáší se např. umělý gen pro vhodnou siRNA vytvářející vlásenku, jejíž „stonek“ je homologní s vybranou částí genu, která v součinnosti s buněčným systémem pro realizaci RNA interference zabrání projevu vybraného genu na posttranskripční úrovni (A. Z. Fire a kol. 1998 – objev RNA interference, P. Padison a kol. 2002 – uplatnění malé vlásenkové RNA; obr. 4). Její nevýhodou však bývá někdy neúplnost potlačení projevu vybraného genu.

Během celého vývoje strategií modifikací se navíc využívá poznatků o promotorech a dalších přirozených regulátorech genové exprese. Na jejich základě lze zajistit projev genu ve všech či přednostně pouze v určitých orgánech modifikovaného mnohobuněčného organismu (např. pouze v orgánech pohlavních), anebo lze projev genu povzbudit či potlačit zvnějšku (např. přidáním nízkomolekulárního regulátoru, jenž specificky ovlivňuje frekvenci iniciace (zahájení) transkripce na genu pod kontrolou určitého promotoru). Zvláště významnou možnost představuje regulování iniciace transkripce např. pomocí různých nízkomolekulárních látek, která je využitelná u prokaryot i eukaryot.

Vývoj bezpečnostních opatření

Ta tam je doba, kdy veřejnost o možnostech genových modifikací nic nevěděla a kdy vědci-zakladatelé nového vědeckotechnického zaměření prožívali trauma z možných neblahých následků svého počínání pouze uvnitř vědecké komunity. Ta tam je i doba, kdy část veřejnosti, podporovaná některými odborníky a hlavně sdělovacími prostředky, kategoricky žádala úplný zákaz genových modifikací, i když byl genově modifikovaný organismus (GMO) používán třeba jen v uzavřených laboratořích. Již dlouho se také masově nedemonstrovalo proti průmyslovým aplikacím GMO v uzavřených prozorech. Ukázalo se totiž, že riziko úniku GMO z uzavřených prostorů je při volbě správných

postupů konstrukce GMO, při náležitém vybavení manipulačního prostoru a dostatečné zodpovědnosti obsluhy zanedbatelné. Zdá se, že většina lidí již dnes v tuto zkušenost věří. Kromě toho, tato část aktivit je přiměřeně ošetřena zákony, které prověřil čas. Lidé většinou také věří, že lze ohlídat produkci krmiv a potravin vyráběných z GMO prověřováním např. toxických nebo alergenních vlastností výrobků, které jsou navíc značeny, takže se každý zákazník může rozhodnout, zda si je koupí.

S přelomem tisíciletí se hlavním diskutovaným problémem stává uvolňování genově modifikovaných plodin (GMP) do veřejného prostoru. Sklizeň prvních GMP v USA (1996) proběhla bez vážných problémů, zato v Evropě byl vývoj dramatictější. Došlo i k plnění pokusných polí. Např. v r. 2003 byla narušena asi polovina započatých polních pokusů ve Francii. V současnosti se však zdá, že spory mezi příznivci a odpůrci pozvolna přecházejí do kultivovanější verbální podoby.

Nejzávažnější současné námitky proti uvolňování GMP jsou tyto:

- U pohlavně se rozmnožujících rostlin je nebezpečí kontaminace krajiny spojeno s přirozeným přenosem genů (např. pro odolnost vůči různým herbicidům nebo insekticidům na píry a jiné rostliny) pylem, přičemž možnost mezidruhového přenosu je sice relativně vzácná, ale poněkud běžnější než u jiných taxonů. Tyto přenosy by mohly vyvolat nežádoucí a nevratné změny v životním prostředí (např. zaplevelení vysoce odolnými píry).

- Vypadávání semen a částí rostlin při dopravě a jiných manipulacích s GMP může způsobit ztrátu kontroly nad jejich šířením po krajině.

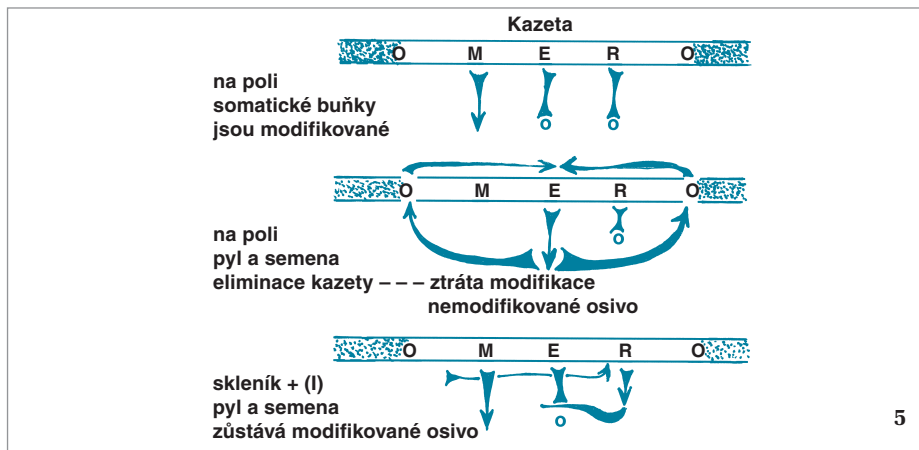
- Přenos genů na nemodifikované rostliny stejného druhu může ohrozit např. dotované tzv. organické („ekologické“) zemědělství a pochopitelně i svobodu těch, kteří pěstují geneticky nemodifikované plodiny pro svou potřebu, protože GMP např. z osobních důvodů odmítají.

Při modifikaci bakterií byla vyzkoušena a osvědčila se poměrně jednoduchá opatření, která zabraňují úniku rekombinantní DNA, resp. rekombinantního organismu. Pokud se zajistí, že použitý vektor bude mít poškozený gen nezbytný pro reprodukci rekombinantní DNA, a to např. pomocí mutace vedoucí k vzniku „před-

3 Princip „anti-sens“ technologie. Nasednutím RNA-polymerázy (velká šipka) na promotor je určen směr transkripce a výběr řetězce DNA pro kopírování podle zákona komplementarity (dvojitá šipka). Vzniklá mRNA 1 pořadím bází odpovídá tečkovanému řetězci DNA. Když na izolovaném genu vystřihneme kódující úsek, obrátíme jej a vložíme zpět za promotor, směr transkripce zůstane nezměněn, ale mRNA 2 bude odpovídat řetězci bez teček, který má obrácené pořadí bází vzhledem k původnímu stavu. Je-li mRNA 1 a mRNA 2 produkována ve stejné buňce, spojí se na základě komplementarity. Spojené řetězce se nehodí pro další kroky projevu genu a gen je tak „umlčen“.

4 Princip „umlčování“ projevu genu na základě RNA interference (zjednodušené schéma). Pro umlčení vybraného genu lze použít např. tzv. siRNA (vlásenková RNA, jejíž stonek je dvouřetězcový a homologní s úsekem genu k umlčení – GKU), která je kódována umělým genem vneseným do organismu na vhodném vektoru. K „umlčení“ dochází v tomto případě mechanismem obdobným jako u RNA interference, tj. na posttranskripční úrovni.

časného“ terminačního kodónu, potom se může vektor a rekombinantní DNA reprodukovat jen v organismu, který nese další mutaci, např. v nějakém genu pro tRNA, díky které vznikne mutantní tRNA schopná zařadit vhodnou aminokyselinu v místě terminačního kodónu. Pokud bude modifikovaný organismus mnohonásobným mutantem, jenž má poškozené geny pro růst nezávislý na dodávání několika hotových substrátů (např. polyauxotrofický mutant), nemá modifikovaný organismus naději přežít bez pomoci experimentátora a obstát v konkurenci s divokými organismy v případě úniku z laboratoře. Navíc, např. mutant citlivý na UV-záření může být snadněji než divoké kmeny odstraněn z vhodně upravených prostorů ozářením po ukončení experimentu. Mutant s poškozenými komponentami rekombinačního systému nebude obměňovat přenesenou rekombinantní DNA. Mutant poškozený v nejdůležitějších genech pro endonukleázy nebude ničit cizorodou DNA, která byla vnesena do buňky, což znamená, že bude vykazovat zvýšenou frekvenci



úspěšné transformace cizorodou DNA. Jinými slovy: pro bezpečnost je výhodné pracovat s kmeny, které jsou udržovány při životě jen s přispěním experimentátora, které se snadno usmrtí, je-li to zapotřebí, snadno se transformují (kmeny běžné v přírodě se transformují většinou velmi obtížně) a s vektory, které se reprodukuji pouze v upravených kmenech.

Bezpečnostní úpravy na této úrovni navíc podporuje předpisové chování lidské obsluhy v předpisově vybavené laboratoři při dodržování etických a zákonem předepsaných pravidel. U některých jednodušších eukaryotických organismů lze zajistit alespoň některé z výše uvedených opatření (kromě plnění všech nastavbových pravidel) pro nakládání s GMO v uzavřených prostorách, takže bezpečnostní opatření jsou několikastupňová, i když jediný stupeň stačí a ostatní představují pojistku.

U mnohobuněčných organismů a zejména u rostlin uvolňovaných do otevřeného prostoru však jsou molekulárně-biologická opatření většinou těžko realizovatelná. Přesto se v poslední době podařilo vyvinout několik metod zabraňujících nekontrolovanému šíření GMP. Na příkladu odrůdy modifikovaných brambor 'Amflora', která byla v letošním roce schválena Evropskou komisí pro pěstování a průmyslovou výrobu škrobu se sníženým obsahem amylozy (viz také článek na str. XLVII kuléru), lze ukázat, že u organismů, které se množí pouze vegetativně, je kon-

trola nad spontánním šířením GMP poměrně snadná. První opatření, které se tudíž u rostlin nabízí, je využití sterilních odrůd. Odpůrci však protestují proti závislosti uživatelů na komerčním dodávání osiva firmou. Proto se mi jako jeden z nejzajímavějších bezpečnostních zásahů jeví konstrukce odrůdy za použití speciálních kazet obsahujících mezi dvěma okrajovými sekvencemi kromě modifikačního genu a případně selekčního genu ještě gen eliminační. Ten se automaticky zapíná v buňkách pohlavních orgánů, ve kterých se pak vystřihne a zničí obsah celé vložené kazety. Eliminační gen totiž kóduje místně specifickou rekombinázu, jejímž substrátem jsou okrajové sekvence kazety. Tento gen může být v případě potřeby umlčen působením chemikálií přidaných zvnějšku. Chemikálie indukuje projev regulačního genu, syntézu siRNA, která „umlčí“ projev eliminačního genu (Kemin Luo a kol. 2007; obr. 5). V tomto případě je možno v uzavřeném skleníkovém prostředí získat modifikované osivo pro další sezonu. Z pole lze získat semena pro kultivaci nemodifikovaných rostlin, pokud zemědělec již nechce pokračovat s modifikovanou odrůdou. Atraktivnost tohoto postupu, který je ve stadiu prověřování, spočívá i v tom, že princip metody by mohl být dále rozvíjen pro tzv. „modifikace nanečisto“, a to nejen v souvislosti s uvolňováním GMP na pole, ale i při havarijních únicích GMO z uzavřených prostorů, při

5 Princip technologie eliminovatelné kazety. Mezi dvěma okrajovými sekvencemi (O) je kromě modifikačního genu (M) a případně selekčního genu ještě gen eliminační (E), který se automaticky zapíná v buňkách pohlavních orgánů, v nichž se pak vystřihne a zničí obsah celé vložené kazety. Eliminační gen kóduje místně specifickou rekombinázu, jejímž substrátem jsou okrajové sekvence kazety. V případě potřeby může být tento gen umlčen působením chemikálií (I) přidaných zvnějšku. Chemikálie indukuje projev regulačního genu (R), syntézu siRNA, která „umlčí“ projev E. Svislá šipka značí, že se gen projevuje, o značí neprojevující se gen, ostatní šipky vyznačují vzájemná ovlivnění (např. vyjmutí kazety rekombinázou, produktem E). Blíže v textu. Všechny orig. V. Vondřejse

genových terapiích a při modifikačních genů u živočichů. Možnost zásahů nanečisto (tzn. pokud se zamýšlená modifikace nepodaří, anebo se jedinec vymkne z kontroly, lze všechny vnesené geny snadno odstranit zásahem zvencí chemicky nebo fyzikálně) by mohla pomoci překonat i některé etické problémy. Např. novorozenec se nemůže právoplatně rozhodnout pro genovou terapii. Rozhodnutí leží na jeho rodičích. Při použití terapie nanečisto by mohl takový jedinec dodatečně v dospělosti potvrdit rozhodnutí rodičů, anebo požádat o zrušení modifikace. To je ale zatím spíše sci-fi než reálná možnost. Současná genová terapie se, bohužel, spíše potýká s dočasností dosažených zlepšení.

Podrobnější informace o tématu čtenář najde v knize Otazníky kolem genového inženýrství, která v blízké době vyjde v Nakladatelství Academia. Jsou v ní ve větší šíři diskutovány problémy, které kolem aplikací genového inženýrství vznikaly a stále vznikají. Byla napsána nejen pro odborníky, ale i pro širokou veřejnost se zájmem o tuto problematiku. Byl bych rád, kdyby tato pomůcka posloužila také těm odpůrcům genového inženýrství, kteří nejsou prozatím v této oblasti dostatečně vzděláni. Jejich argumentace by po přečtení knížky mohla být završenější a tím také účinnější. Pouze poučená a angažovaná diskuze tvůrců se zastánci a odpůrci může být zárukou dalšího zdárného a bezpečného rozvoje genových modifikací. Neurčitě strachy charakteristické pro angažovanou, ale nepoučenou část veřejnosti nejsou přínosné. Lze je pouze chápat, respektovat a vysvětlováním opřeným o praktické zkušenosti postupně překonávat. Nepoučená veřejnost také velmi snadno podléhá nepodloženým tlakům motivovaným skupinovými zájmy, které nemají s poctivou a věcnou argumentací nic společného.

