

MODERN NUKLEINSAVKUTATÁSI MÓDSZEREK FELHASZNÁLÁSA AZ ALAPKUTATÁSBAN ÉS GYAKORLATBAN

VENETIANER PÁL

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézete

Mivel a mai ülés az SZBK fennállásának tízéves évfordulóját ünnepli, talán nem indokolatlan, ha előadásomat visszatekintéssel kezdem. Mikor a mai nukleinsavcsoport őse megkezdte a munkát Szegeden, azt a célt tűztük magunk elé, hogy egy bakteriális gént tisztán előállítsunk. Sem a választott baktérium — az *Escherichia coli* —, sem a választott gén(ek) — a riboszomális RNS-t kódoló gének — semmiféle gyakorlati haszonnal nem kecsegtetett. Munkánkat kizárólag az motiválta, hogy úgy gondoltuk: a génműködés szabályozásának mélyebb megértéséhez tiszta, izolált, in vitro rendszerekre van szükség; a választott objektum technikailag hozzáférhetőnek látszott és elméletileg érdekes problémákat vetett fel. Bár e kutatás potenciális gyakorlati jelentőségét nem sikerült ésszerűen megindokolnunk, az intézet és az akadémia megértő vezetése lehetővé tette e munka elindítását. Mai szemmel visszatekintve kezdeti próbálkozásainkra, azok legfőbb hiányossága, hogy nem tudtuk a DNS-t meghatározott pontokon, specifikusan hasítani. Ezt a feladatot a restrikciós endonukleáz enzimek képesek elvégezni. Ezeknek az enzimeknek — azóta Nobel-díjjal honorált — felfedezése óriási lökést adott munkánknak. A technika alkalmazását azonnal megkezdtük, mielőtt ezek az enzimek kereskedelmi forgalomba kerültek. Ennek a gyors reakciónak köszönhetően nem ért készületlenül a hamarosan bekövetkező két újabb — az elmúlt évben szintén Nobel-díjjal jutalmazott — technikai-módszertani forradalom sem: a DNS-klónozási (génebézési) technika megszületése és a gyors nukleinsavszekvenca meghatározási módszerek kidolgozása.

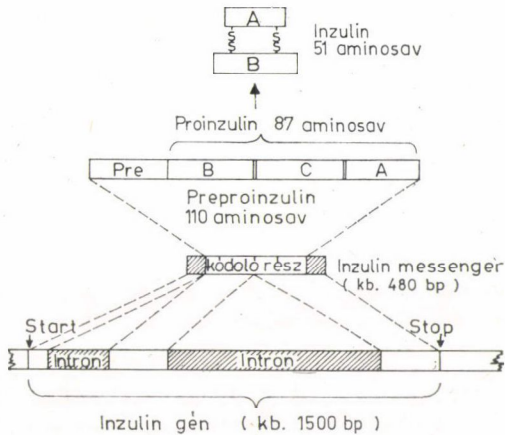
Mindezek a módszerek — hozzászámítva a korábban kidolgozott hibridizációs és elektronmikroszkópos technikákat — olyan eszköztárat adtak a kezünkbe, amelynek segítségével sikerült teljesen megoldani a felvetett problémát, elérni az eredetileg kitűzött célt. Meghatároztuk az *Escherichia coli* kromoszómáján az rRNS-t kódoló gének számát, pontosan feltérképeztük környezetüket. Klónoztuk és izoláltuk az egyik rRNS gént, meghatároztuk a szabályozó régió teljes nukleotidsorrendjét (1800 bázispárt) és az így meghatározott struktúrához elektronmikroszkópos és in vitro transzkripció vizsgálatokkal hozzárendeltük a funkciót, sikeresen magyarázva ezzel a gén működésének bizonyos sajátosságait. Mivel erről a munkáról az MTA tavalyi köz-

gyűlésén már beszámoltunk (9), a továbbiakban nem fogok erről beszélni. Ugyancsak nem fogok bővebben beszélni e technikák egyéb alapkutatási alkalmazásairól. Csak megemlítem, hogy klónoztunk egy modifikáció metiláz enzimet kódoló gént *Bacillus sphaericus*-ból (8), a gén szerkezetének felderítése folyamatban van. Részt vettünk a *Rhizobium meliloti nif* gének klónozásában — erről Kondorosi Ádám előadásában fognak hallani, és meghatároztuk egy mutáns *Drosophila* gén szerkezetét is — erről Gausz János előadásában lesz szó.

Az elmúlt években világszerte nyilvánvalóvá vált, hogy ezek a módszerek — amelyeket mindenütt alapkutatással foglalkozó laboratóriumok fejlesztettek ki — óriási potenciális gyakorlati jelentőséggel rendelkeznek. Ennek következtében mélyreható változás történt az ilyen típusú kutatások társadalmi és anyagi helyzetében. E változás jegyében a MTA főtitkárának és a Kőbányai Gyógyszergyárnak a megbízásából munkacsoportunk is vállalkozott egy közvetlen gyakorlati célt szolgáló feladat megoldására. E program célja egy olyan baktérium konstruálása, amely tartalmazza az emberi inzulin kódoló gént és azt ki is fejezi, így alkalmazható az emberi inzulin ipari fermentációval történő előállítására. A következőkben e munka állásáról fogok beszámolni, előrebocsátva, hogy a hároméves programnak még csak az első éve telt le, így csak részeredményekről beszélhetek.

A probléma gazdasági jelentősége az, hogy míg a cukorbetegek száma világszerte, így hazánkban is rohamosan emelkedik, az inzulin iránti kereslet növekedésével a hagyományos termelés (sertés pankreászból) nem tud lépést tartani. Ennek következtében az inzulin világpiaci ára az elmúlt két évtizedben megtízszereződött és hasonló ütemű áremelkedés várható a jövőben is. Magyarország jelenleg nem gyárt inzulint, a teljes szükséglet tőkés importból fedezzük. Meg kell jegyezni azt is, hogy a cukorbetegek mintegy 5%-a allergiás a sertésinzulinra és várható, hogy ezeken a betegeken az emberi inzulin segíthet. Ez az igény indokolta, hogy a génmanipuláció ilyen célú felhasználásával a vezető amerikai laboratóriumok már régen foglalkoznak és a Genentech cég kutatói már be is számoltak sikeres eredményekről (3). Az ő általuk konstruált baktériumklón felhasználására az inzulin-világpiac 80%-át kezében tartó Ely Lilly cég új gyárat létesített. Természetesen a baktériumtörzs elvben meg is vásárolható, sajnos, a cég tízmillió dollárt kér érte. Tekintve, hogy a mi munkánk ennél lényegesen olcsóbb, érdemesnek látszik foglalkozni a konstrukcióval — természetesen egészen más úton, mint az amerikai kutatók.

Az emberi inzulin két polipeptidláncból, 51 aminosavból álló molekula, amely több feldolgozási lépésen át a 110 aminosavból álló preproinzulinból keletkezik. Ezt a fehérjét egyetlen gén kódolja. Mint az 1. ábrán látható, az eukaryota gének nagy részéhez hasonlóan az inzulingén is tartalmaz közbeiktatott szekvenciákat, úgynevezett intronokat (1). Ennek következtében az inzulingén közvetlen átültetése a baktériumba nem járható út, mert az



1. ábra. Az emberi inzulin génje és az inzulin bioszintézis vázlata

intronokban kódolt információt a baktérium nem tudja eltávolítani. Az átültetendő szekvencia a preproinzulin messengerben levő információ. Elvileg az volna a legegyszerűbb stratégia, hogy tiszta emberi inzulin-messengert állítunk elő, majd erről DNS másolatot készítünk és ezt visszük be a baktériumba. Sajnos, emberi pankreász-ból nem jöhet szóba a messenger tisztítása, mert a kiinduló anyag nem áll rendelkezésre elegendő mennyiségben. Ez a nehézség kikerülhető oly módon, hogy patkányból tisztítunk inzulin-messengert, ennek DNS másolatát klónozzuk és ezzel mint hibridizációs próbával azonosítjuk az emberi inzulint kódoló szekvenciákat egy tisztítatlan emberi pankreász-messengerből készített ún. klónbankban (2). Patkány inzulin-messenger tisztítható volna a Langerhans-szigetek kémiai indukálható tumorjából (5). Sajnos e tumorok kifejlődése 1–2 év, erre nem akartunk várni. Inkább egy olyan alternatív stratégiát választottunk, amely felhasználja már azt a szerkezeti információt, amely az elmúlt év során ismertté vált az emberi és patkány inzulingénről.

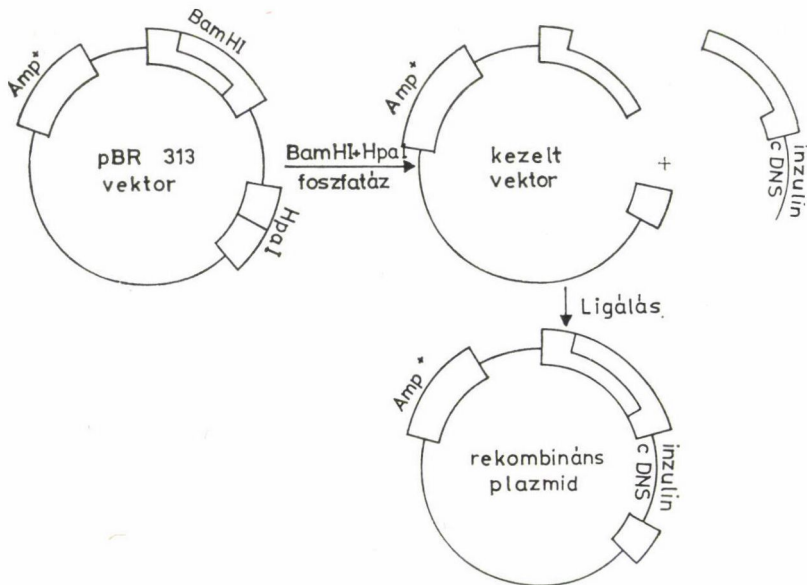
Bármely messenger-RNS-ről általában úgy készíthető DNS másolat, hogy a szintézist végző reverz transzkriptáz enzim a reakcióelegybe bevitt oligo-dT molekulához építi hozzá a DNS láncot és azért másol le minden messenger RNS-t, mert ezek 3'-végénél levő poly A szakasz megköti az oligo-dT-t. Mi abból indultunk ki, hogy ha oligo-dT helyett egy olyan kémiai szintetizált oligonukleotidot alkalmazunk „primer”-ként, amely az inzulin-messenger valamely részével komplementer, akkor még tisztítatlan messenger esetén is az inzulin-messenger fog preferenciálisan (vagy kizárólagosan) lemásolódni. Az inzulinmolekula utolsó három aminosavát kódoló három tripletet és a terminátor tripletet választottuk erre a célra (TACTGCAACTAG), illetve e szekvencia komplementerjét (CTAGTTGCAGTA). Ezzel egyrészt biztosítottuk, hogy a teljes kódoló szekvenciát lemásoljuk, másrészt ez a szekvencia

közös patkánynál és embernél (2, 6), tehát mindkét esetben alkalmazható. A kémiai szintézist Simoncsits András (SZBK Genetikai Intézet) végezte a módosított triészter módszerrel (7).

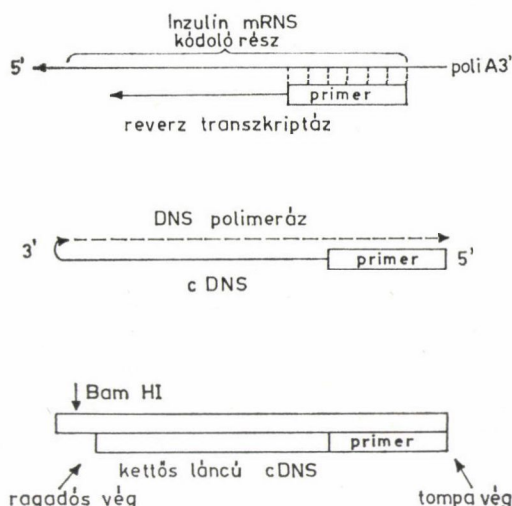
A részlegesen tisztított messenger-RNS preparálását Deák Ferenc végezte el. A módszer lényege: Langerhans-szigetek tisztítása patkány pankreászból, összes RNS izolálása a szigetektől denaturáló közegben, majd a polyA-végű messenger-RNS frakció elválasztása oligo-dT-cellulóz kromatográfiával (4).

A munka következő fázisait — ez Boros Imre nevéhez fűződik — a 2. és 3. ábra szemlélteti vázlatosan. Első lépésként a dodekanukleotid „primer” 5' végét radioaktívan jelöltük, hogy a reakciót könnyebben követhessük, majd reverz transzkriptázzal, a jelölt dodekanukleotid „primer” felhasználásával egyszálú DNS másolatot készítettünk a messengerről. Mint a negyedik ábra mutatja, a „primer” valóban specifikusan irányította a reakciót, a Langerhans-szigetből izolált messenger másolata egyetlen domináns csíkot adott pontosan az inzulin-messengertől várt 390 nukleotid hosszúságú lánchnak megfelelő helyen. Összes pankreász-messenger használata esetén is megtalálható ez a csík, de ilyenkor természetesen jóval komplexebb a termék.

A következő lépésben, az RNS eltávolítása után az egyszálú DNS-t DNS-polimeráz segítségével kettős szálúvá alakítottuk, majd a kétszálú DNS-t a 3. ábrán látható klónozási séma követelményeinek megfelelően „méretre vágtuk”. Ez annyit jelentett, hogy BamHI restrikciós endonukklázzal hasívcenciáját kell tartalmazniuk. E szekvencia eléggé hasonlít az emberi inzulingén



2. ábra. cDNS szintézise az inzulin-messengerről, specifikus „primer”-rel



3. ábra. Az inzulin cDNS klónozása

tottuk, amelyről tudtuk, hogy az inzulingén elején, a 3. aminosav után kell hogy hasítsa a DNS-t. A gén végét nem módosítottuk. Ily módon feltételezésünk szerint az inzulint kódoló szekvencia egyik vége ún. „ragadós” vég, amely könnyen kapcsolódhat más, szintén BamHI enzim által generált végekhez. A klónozásra kiválasztott plazmidvektort ugyancsak BamHI enzimmal, illetve a „tompá” végeket generáló HpaI enzimmal emésztettük, majd a két DNS-t ligázalással összekapcsoltuk. Ligálás után a plazmidot transzformáció útján vittük be az *Escherichia coli* sejtbe és a rekombinánsokat ampicillinrezisztenciájuk alapján szelektáltuk. A rekombinánsok további szűrésénél arra támaszkodtunk, hogy az ismert szekvencia alapján a patkány inzulingénben a 3' végtől 118 bázispárnnyira van egy SmaI restriktív endonukleáz hasítóhely. Ismeretes, hogy eukaryota DNS-ban igen ritkán hasít a SmaI, átlagosan 16 000 bázispárra esik egy hasítóhely. Mivel a használt vektorban a HpaI helytől 220 bázispárnnyira szintén van egy SmaI hely, a rekombináns plazmidokat egyenként emésztettük SmaI-lyel és azokat válogattuk ki, amelyekből az inzulin-szekvencia alapján várt 338 bázispár hosszúságú fragmentum hasadt ki SmaI emésztésre. Kb 300 klón átvizsgálása után 3 ilyen találtunk (5. ábra) és feltételezzük, hogy ezek tartalmazzák az inzulint kódoló szekvenciát. Ezt a feltételezést természetesen direkt DNS szekvenciameghatározásnak kell megerősítenie — ennek eredményéről sajnos még nem tudok beszámolni.*

Amennyiben feltételezésünk megerősítést nyer, akkor e klónoknak az első 11 nukleotid kivételével a patkány inzulin-messenger teljes kódoló szek-

* Ez a mondat így hangzott el az előadáson. Közben megtörtént a szekvenciavizsgálat és ez igazolta a feltételezést. E klónok valóban a patkány inzulint kódoló DNS-t tartalmazzák. MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete.

szekvenciájához, tehát mint hibridizációs próba, alkalmas annak „felismerésére”. A kis mennyiségben rendelkezésre álló emberi pankreászból tehát nem szükséges Langerhans-szigetet tisztítani. Ha az összes messengerből az előbbiekhöz hasonló módon DNS másolatot készítünk és klónozzuk, a rekombinánsok közül e próba segítségével választhatjuk ki a megfelelőt. Hála több szegedi és budapesti klinika segítségének, már sikerült is emberi pankreászból messenger RNS-t készíteni és, mint a 6. ábra mutatja, a specifikus „primer”-rel lemásolva ebben a preparátumban is felismerhető az inzulin DNS-nek megfelelő 390 nukleotid hosszúságú lánc. A klónozás tehát elvégezhető lesz, amint megerősítést nyer a patkányból származó „próba” szekvenciája.

Pillanatnyilag itt tartunk. Előadásom érdemi részének befejeztével, az elmondottak alapján három gondolatot szeretnék hangsúlyozni. Az első: az alkalmazott technikák hallatlan teljesítőképessége. Az emlős genom információtartalma körülbelül 3 milliárd bázispár, ebből az inzulint kódoló szekvencia kevesebb, mint 500. A klónozás nanogrammmnyi inzulin-messengerből indul ki és ebből nyerhető milligrammos mennyiségben a klónozott DNS. A másik dolog, amire fel szeretném hívni a figyelmet, hogy a „genetic engineering” kifejezés mennyivel jobb, mint a génebészet. Ezek a kísérletek ugyanis elvben valóban mérnöki pontossággal tervezhetők, sőt gondos munka és némi szerencse mellett még sikerülnek is. Végül a harmadik gondolat: már korábban hangsúlyoztam, hogy ezt a munkát az tette lehetővé, hogy a bakteriális rRNS génekkel dolgozva elsajátítottuk és helyenként továbbfejlesztettük a modern nukleinsav-kutatási módszereket. Mindezeket a módszereket alapkutatókkal foglalkozó laboratóriumokban dolgozták ki, olyan kísérleti rendszerekben, illetve olyan problémákat kutatva, amelyeknek semmi közük nem volt a gyakorlathoz és a jövő alkalmazáshoz. A tanulságot talán nem is szükséges megfogalmazni.

Befejezésül el szeretném mondani, hogy az inzulinprogram keretében számos alternatív stratégiát próbáltunk ki és fogunk alkalmazni a jövőben is. Ebben munkacsoportunk valamennyi tagja részt vesz és külső segítséget is igénybe veszünk. Az előbb elmondottak egyetlen utat ismertettek, azt, amelyben eddig legmesszebbre jutottunk. Ezért szeretném felsorolni mindazon kutatókat, akik — a korábban említettek mellett — ebben a munkában részt vettek: Aradi János (DOTE Biokémiai Intézet), Duda Ernő, Erdei Sára, Fehér Zsigmond (DOTE Biológiai Intézet), Fejes Erzsébet, Horváth Péter, Kiss Antal, Kiss Ibolya, Kondorosi Éva, Sain Béla, Török István, Udvardy Andor.

IRODALOM

1. BELL, G. I., PICTET, R. L., RUTTER, W. J., CORDELL, B., TISCHER, E. and GOODMAN, H. M.: Sequence of the human insulin gene. *Nature* **284**, 26—32 (1980).
2. BELL, G. I., SWAIN, W. F., PICTET, R., CORDELL, B., GOODMAN, H. M., RUTTER, W. J.: Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin. *Nature* **282**, 525—527 (1979).

3. GOEDDEL, D. V., KLEID, D. G., BOLIVAR, F., HEYNEKER, H. L., YANSURA, D. G., CREA, R., HIROSE, T., KRASZEWSKI, A., ITAKURA, K. and RIGGS, A. D.: Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesised genes for human insulin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**, 106—110 (1979).
4. GOODMAN, H. M. and MACDONALD, R. J.: Cloning of human genes from a mixture of cDNA molecules. in: *Methods in Enzymology*. Vol. 68. Eds: Grossmann, L. and Moldave, K. Academic Press. New York—London. (1980).
5. ITOH, N., NOSE, K. and OKAMOTO, H.: Purification and characterization of proinsulin mRNA from rat B-cell tumor. *Eur. J. Biochem.* **97**, 1—9 (1979).
6. LOMEDICO, P., ROSENTHAL, N., EFSTRATIADIS, A., GILBERT, W., KOLODNER, R. and TIZARD, R.: The structure and evolution of the two nonallelic rat preproinsulin genes. *Cell* **18**, 545—558 (1979).
7. SIMONCSITS, A.: Chemical synthesis of a dodecadeoxyribonucleotide complementary to the 3'-end of the coding region of human preproinsulin mRNA. *Acta Biologica ASH. Sajtó alatt*.
8. SZOMOLÁNYI, É., KISS, A. and VENETIANER, P.: Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *Escherichia coli*. *Gene* **10**, 219—225 (1980).
9. VENETIANER Pál: Génműködés és nukleinsav-szerkezet. *MTA. Biol. Tud. Oszt. Közl.* **23**, 327—335 (1980).