

Inzulin a historie vědy

Jaroslav Drobník

Z příspěvku Vladimíra Pliška (Vesmír 88, Listopad 2009, str. 700) se dovíme, jak inzulin provázely mnohé peripetie vědy a vědců. Ty však nekončí v polovině 20. století. Tento slavný peptid stojí i u vzniku moderní biotechnologie – techniky rekombinantní DNA nazývané transgenose.

Druhé jednání jeho dramatu začíná 24. května 1976 v Indianopolis. Firma Eli Lilly & Co – o které jsme se dověděli v uvedeném článku, že od roku 192 inzulin vyráběla - svolala několik molekulárních biologů a předložila projekt připravit metodou genového inženýrství lidský inzulin. Ten se totiž liší od prasečího běžně používaného v jedné z jednapadesáti aminokyselin a citliví pacienti na to reagují – viz článek Oldřicha Kapříka v témže Vesmíru.. Výzvu přijaly tři skupiny: z Harvardovy university tým Waltera Gilberta, z Kalifornské univerzity v San Francisku (UCSF) skupina Herberta Boyera, se kterou spolupracoval Arthur Riggs z City of Hope (později firma Genentech) a tým Williama Ruttera a Howarda Goodmana.

Klasický postup předepisuje izolovat z lidských β -buněk Langerhansových ostrůvků mRNA, která nese kód pro peptidy inzulínu, a podle ní pak reversní transkriptázou připravit kopii DNA odpovídající lidskému genu pro inzulín. Pomocí Boyerových restriktáz vložit do Cohena bakteriálního plazmidu a vpravit ho do bakterie. Ta bude při troše štěstí syntetizovat lidský inzulín. To byl postup, který zvolil Walter Gilbert a vydala se tímto směrem i Boyerova skupina na UCSF. Dva mladí „posdoci“ Boyerovy laboratoře - Bolivar a Rodriguez - nad pivem v místní hospodě vymysleli a pak v laboratoři zkonstruovali velmi rafinovaný plazmid podle nich označovaný jako pBR322 a Axel Ullrich ze skupiny Ruttera a Goodmana do něj vložili potkaní gen pro inzulín připravený výše popsáním postupem. Vnesli ho v únoru 1977 úspěšně do geonomu *Escherichia coli*. To byl významný mezník biotechnologie - bylo to první vnesení savčího genu do bakterie.

Jenže pak nastoupili úředníci. V USA tehdy musely být vektory schváleny Poradním výborem pro rekombinantní DNA - Recombinant DNA Advisory Committee (RAC). Prvého března však William Gartland - ředitel RAC na zasedání Poradního výboru zdůraznil, že plazmid pBR322 je sice schválen, ale ne certifikován ředitelem NIH (Národního zdravotního ústavu) a klonování savčích genů pomocí tohoto vektoru je tudíž ilegální. Milník biotechnologie tedy disciplinovaně skončil 19. března 1977 v nádobě s ředěnou HCl.

Politici nezůstali pozadu. Senátor Adlai Stevenson III z Illinois chtěl na této kauze demonstrovat svou péči o bezpečnost voličů. Povolal Williama Ruttera a Herb Boyera před kongresový výbor pro vědu, technologie a vesmír. Celá současná biologie se octla na lavici obžalovaných 8. listopadu 1977. Předcházela ponižující kontrola laboratoře P3 (speciálně zabezpečená laboratoř, kde se smí přenášet geny) včetně zpětné revize protokolů. (*Nepřipomíná to něco z EU po 30 letech?*)

Z této historie se poučil tým Harvardské university. Lidia Villa-Komaroff využila již povolený plazmid pBR322 a na prvního máje 1978 získala z *E. coli* fúzní protein, ve kterém byla spojena penicilináza (produkt selekčního genu) a potkaní inzulín. To byl další milník historie – exprese vloženého savčího genu v bakterii. Zbývalo jen potkana nahradit člověkem. Jenže podle předpisu se s lidským genem smělo pracovat jen v laboratoři P4 – nejvyšší

bezpečnostní třídy – a tu v USA měla jen armáda ve Fort Detricku k výzkumu biologických zbraní. Pustit tam civil bylo nepředstavitelné. Angličané byli vstřícnější: ředitel Vojenského výzkumného mikrobiologického zařízení Robert Harris souhlasil, že po dobu čtyř týdnů smí skupina Gilberta využít vojenskou laboratoř v Portonu. 1. září 1978 nastalo velké stěhování harvardských vědců do Staré dobré Anglie.

Krušně se přizpůsobivše vojenským předpisům prováděli hosté totéž co Lidia Villa-Komaroff ale s lidskou mRNA. Získanou bakteriální DNA sekvenoval Argiris Efstratiadis - a oznámil katastrofu: gen odpovídal molekule inzulínu - ale potkaního! Zřejmě z posledního pokusu prováděného na Harvardu zůstaly některé pomůcky kontaminované potkaní nukleovou kyselinou. Povolený pobyt končil a veškerá námaha byla marná.

Osud rozdává náhody takové i makové. Gilbert dostal tu červenou. Kalifornská skupina, která mezitím založila firmu Genentech, dostala zelenou. V roce 1974 Art Riggs v City of Hope dostal dopis od sebevědomého mladíka. Dvaatřicetiletý Japonec Keiichi Itakura; prohlašoval, že je v chemické syntéze polynukleotidů, tj. řetězců nukleových kyselin desetkrát rychlejší nežli nositel Nobelovy ceny Har Gobind Khorana. Historické rozhodnutí Riggsse hnulo dějinami biotechnologie: „Bereme ho!“

Itakura se planě nevychloubal: na třetí pokus připravil perfektní řetězce DNA. To byl v té době výkon. Inzulin se skládá ze dvou řetězců o třiceti a jednadvaceti aminokyselinách, což při tripletovém kódu znamená 90 a 63 nukleotidů v řetězci (kromě zaváděcích úseků). Tento produkt měl kromě toho obrovské kouzlo: ačkoli byl identický s lidským genem pro inzulin, pro byrokraty to byla chemikálie a žádné restriktce – laboratoř P4 a podobně - se na něj nevztahovaly. Takže Dennis Kleid a David Goeddel ve starém skladišti zakrytém střechem z plastové folie v noci z 23. na 24. srpna 1978 - tedy v době, kdy Gilbertův tým balil do Portonu – z bakteriální kultury získali asi 20 ng lidského inzulínu vyrobeného genovým inženýrstvím. Moderní průmyslová biotechnologie byla na světě.

Drama inzulínu má kromě vědy i ekonomickou paralelu. Techniku vkládání genů pomocí restriktáz nabízel Herbert Boyer už v roce 1975 různým firmám, ale bez úspěchu. V té době Robert Swanson, který získal bakalářskou hodnost v biochemii na MIT a pracoval ve firmě poskytující rizikový kapitál, považoval technologii rekombinantní DNA za perspektivní a nabízel k jejímu využití finance různým společnostem i vědcům – včetně Paul Berga, ale také nepochodil. Až v lednu 1976 zavolal Boyerovi, navštívil ho v laboratoři a následně v nedalekém baru oba zjistili, že mají stejný názor: měla by se založit firma, která by komerčně využívala rekombinantní DNA technologii. Učinili tak každým vložením \$ 500 (Boyer si je prý musel půjčit) a firmu nazvali Genentech.

Dne 14. října 1980 burza na Wall Street dala po otevření do prodeje 1,1 milionu akcií Genentech po 35 USD. Za 20 minut jejich cena byla 89 a večer uzavírala na 71^{1/4}. Boyer a Swanson, nyní získali po 66 milionech USD. To byl start boomu biotechnologického průmyslu. Biotechnologické firmy vyrůstaly jak houby po dešti, některé sice žily krátce, ale mnohým se dařilo. Jednou z nich byla firma Biogen, kterou založila skupina investorů a Walter Gilbert 6. května 1978 jako konkurenci ke Genentech. Biogen se později zapsal do historie přípravou lidského růstového hormonu.

Tak sice Boyer nedostal Nobelovu cenu jako Walter Gilbert (1980 spolu s Paul Bergem a Frederick Sangerem za sekvenování; také autor intronů a exonů), ale stal se nejbohatším molekulárním biologem.

Literatura:

Hall S.S.: Invisible Frontiers. The Race to Synthesize a Human Gene. The Atlantic Monthly Press, New York, 1987.

Drobník J.: Biotechnologie a polečnost. Skripta UK, Karolinum, 2008. Též www.biotrin.cz .