

# Genové inženýrství (syllabus přednášky 2007)

1. Osnova přednášky, definice genového inženýrství a jeho stručná historie, studijní literatura
2. Mutageneze *in vitro* (metody založené na restrikčních místech, metody založené na mutagenních oligonukleotidech, kazetová mutageneze, využití modifikovaných tRNA)
3. Optimalizace exprese klonovaných genů (faktory ovlivňující expresi genů v cizích hostitelích; úroveň transkripce, translace, export proteinů)
4. Klonování genů v grampozitivních bakteriích
5. Klonování genů v kvasinkách
6. Klonování genů v rostlinách
7. Klonování genů v živočišných buňkách, vektory pro přenos genů do savčích buněk, selekční markery pro vyhledání klonů obsahujících cizorodou DNA
8. Vnášení genů do zárodečných buněk myší, příprava transgenních savců
9. Cílená exprese cizorodých genů v buňkách a tkáních vyšších organismů
10. Opravy dědičných defektů u zvířat metodami genového inženýrství
11. Genová terapie u člověka – základní principy
12. Příprava farmakologicky významných látek v prokaryotických organismech. Využití metod rekombinantní DNA k přípravě vakcín a protilátek. Identifikace produktů rekombinantních genů.
13. Transgenní rostliny a živočichové – využití v praxi
14. Pravidla pro práci s transgenními organismy, zákon 153/2000 a 28/2004 Sb., rizika GI

# Doporučená literatura

- Old R.W., Primrose S.B., Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. Blackwell Science, 1995. 5. vydání.
- Watson J.D. et al., Recombinant DNA, 2nd ed., W.H.Freeman, New York 1992.
- Watson J.D. a kol. Rekombinantní DNA, krátký kurz. Academia Praha 1988.
- Strachan T., Read A.P. Human Molecular Genetics, 3. Vydání. Garland Science, London 2004.
- Glick B.R., Pasternak J.J. Molecular Biotechnology, 3. vydání, ASM Press, Washington 2003.
- Primrose S.B., Twyman R.M. Principles of gene manipulation and genomics. Blackwell Publ., 2006, 7. vydání.

# Definice genového inženýrství

Genové inženýrství se zabývá vytvářením pozměněných či nových genů nebo přípravou nových (nepřirozených) kombinací genů a jejich zaváděním do genomu organismů s cílem rekonstruovat jejich genetickou výbavu a vytvářet tak geneticky modifikované (transgenní) organismy.

Metodickým základem genového inženýrství jsou manipulace s DNA *in vitro* (klonování genů a jejich úpravy).

**Genové manipulace, moderní (molekulární) biotechnologie**

# Využití genového inženýrství

**Ve výzkumu:** studium struktury, funkce a exprese genů (genomů)

**Praktické (Moderní biotechnologie):**

1. Příprava látek významných v lékařství, zemědělství a průmyslu
  - vnášení cizorodých genů do nepříbuzných organismů a získávání produktů ve velkém množství – *překonání reprodukčních bariér*
2. Příprava látek s novými vlastnostmi pozměňováním stávajících genů nebo vytvářením nových genů – *enzymy, protilátky, vakcíny aj.*
3. Pozměňování a zlepšování vlastností organismů - vytváření geneticky modifikovaných n. transgenních organismů (GMO)
  - *příprava mikroorganismů pro biotechnologie,*
  - *zvyšování výnosů kulturních rostlin a užitkovosti hosp. zvířat (odolnost vůči chorobám, škůdcům nebo zevním vlivům, produkce cizích látek v tělech rostlin a zvířat)*
  - genové terapie

# Předpoklady pro cílené genetické manipulace

- Identifikovat geny a stanovit jejich funkce
- Izolovat geny a cíleně je *in vitro* pozměňovat
- Přenést vhodným způsobem upravené geny do původních nebo nepříbuzných organismů a zajistit jejich expresi

# Etapy vzniku a vývoje genového inženýrství

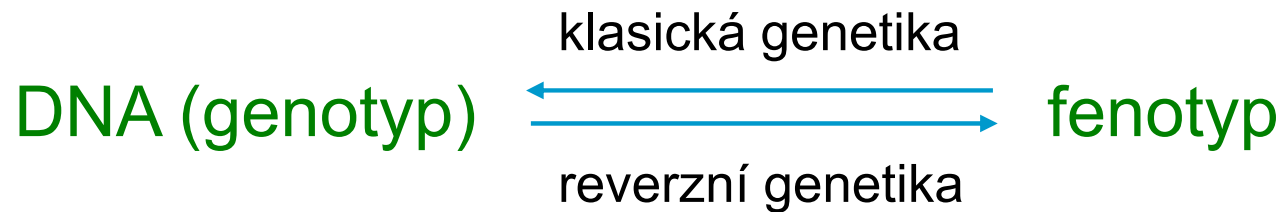
## Poznání základních procesů přenosu genetické informace

- 1970 – izolace prvního restrikčního enzymu
- 1972 – příprava prvních rekombinantních molekul DNA in vitro
- 1973 – začátek klonování genů
- 1975 – Asilomarská konference
- 1977 – první rekombinované molekuly DNA nesoucí savčí geny
- 1977 – sekvencování DNA
- 1978 – příprava lidského inzulinu v bakteriích  
(od r. 1982 vyráběn komerčně) **Genentech**
- \* mutageneze in vitro – proteinové inženýrství
- \* příprava transgenních organismů (rostliny, živočichové)
- 1980 – genová terapie
- 1977 – klonování živočichů

# Mutageneze in vitro

site-directed mutagenesis  
místně cílená (řízená) mutageneze  
lokalizovaná mutageneza

reverzní genetika, genetika „naruby“



# Mutageneze in vitro

Mutace se vnášejí do vyizolované DNA (= in vitro)

Typy mutací: substituce, delece, inserce

Cíle:

- Analýza vztahu mezi strukturou a funkcí NK
- Objasnění funkce genů a regulačních oblastí
- Cílené změny aminokyselin v proteinech
- Příprava proteinů s novými vlastnostmi (proteinové inženýrství)
- Příprava transgenních organismů



# Nevýhody klasické mutagenese

(chemické, fyzikální, biologické mutagenese)

1. V organismu může být zmutován kterýkoliv gen
2. Frekvence mutací v žádaném genu může být nízká
3. Žádaný fenotyp může být výsledkem mutací v různých genech
4. Rekombinační analýzou nelze zjistit, zda mutace v genu vznikla substitucí jedné báze, nebo delecí či inzercí DNA

# Mutagenеза in vitro

náhodná

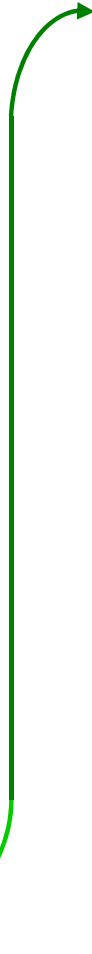
manipulace s restričními místy  
inzerce linkerů  
chemická mutagenеза  
inkorporace chybných bází

vyhledávání genu nebo  
funkčních oblastí na DNA

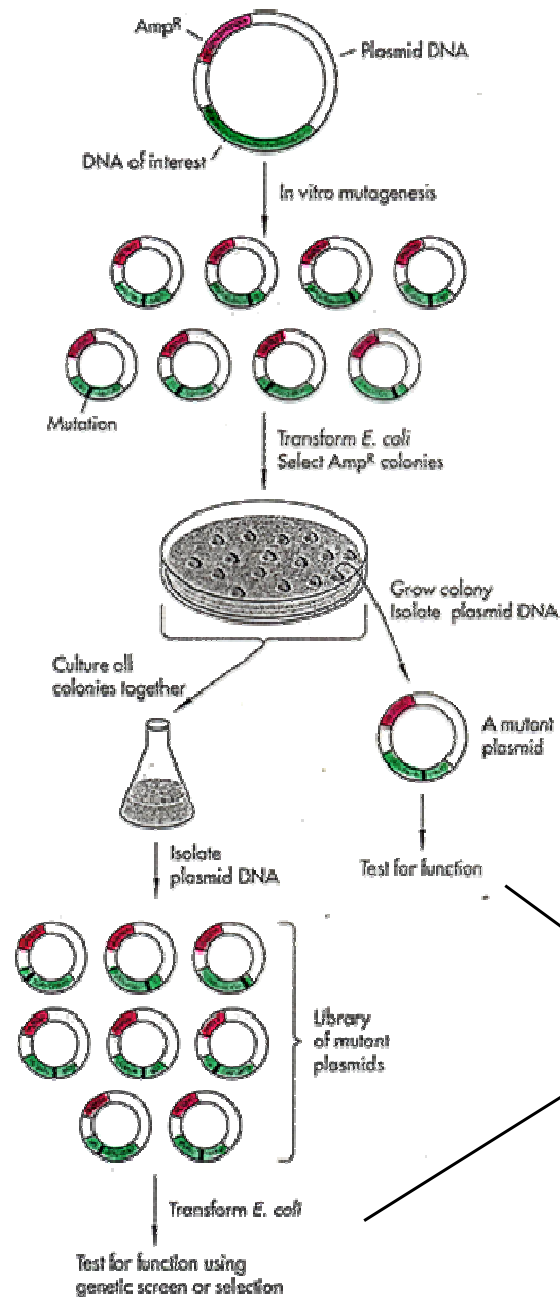
cílená

oligonukleotidová mutagenеза  
(umístění mutace  
do konkrétního místa)  
syntéza genů  
(kasetová mutagenеза)

záměny bází nebo kodonů  
cílené změny struktury proteinů



# Obecná strategie při mutagenезi in vitro



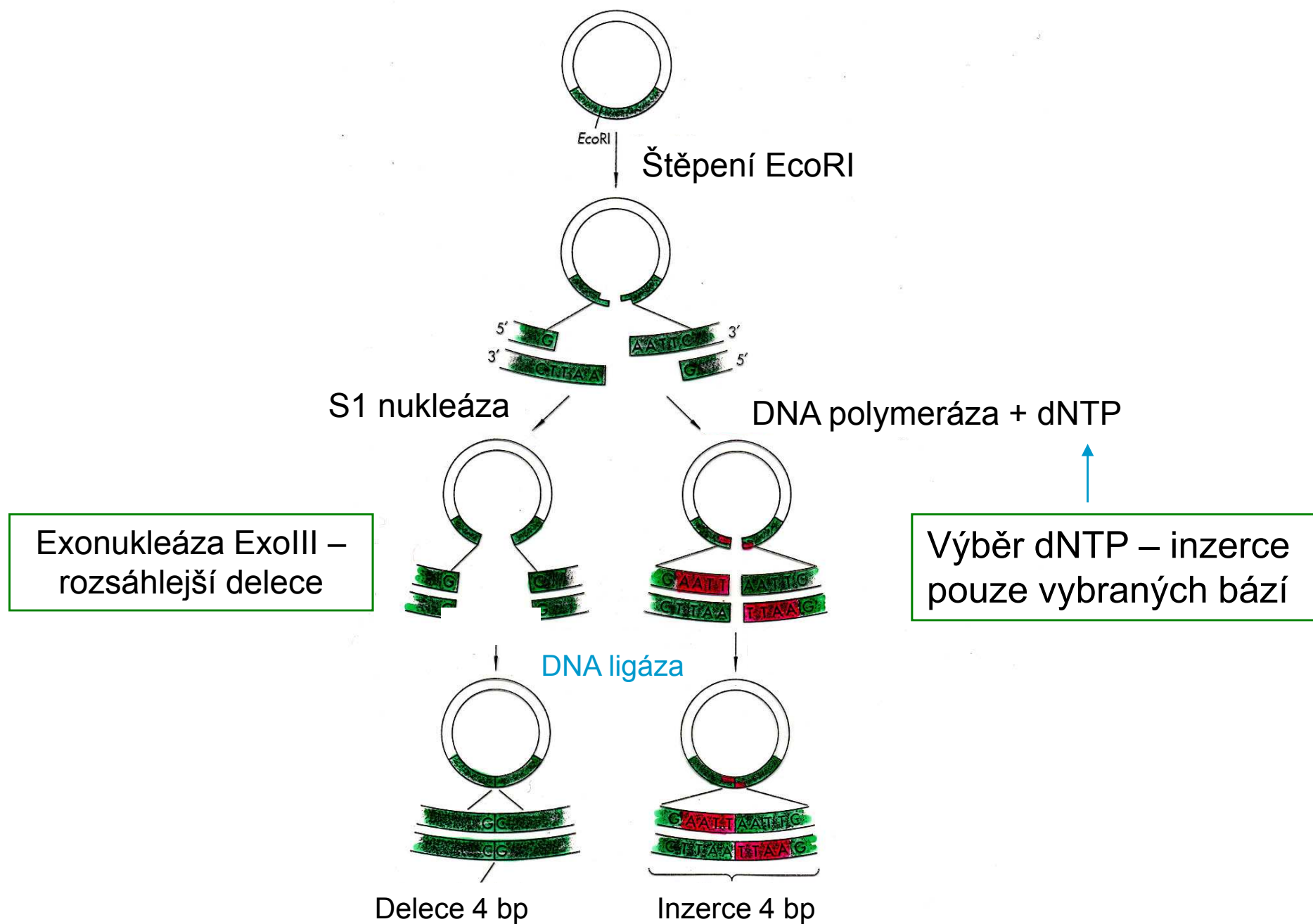
1. Klonování genu (sekvence DNA) určené k mutagenезi
2. Vlastní proces mutagenезe *in vitro*
3. Selekcce klonů obsahujících mutované geny (sekvence)
4. Stanovení funkce mutovaných genů
5. Ověření charakteru vnesené mutace (stanovení sekvence)

Stanovení sekvence  
pozměněného genu

# Způsoby používané při mutagenezi in vitro

1. Manipulace s restrikčními místy a enzymatické úpravy DNA
2. Oligonukleotidová mutageneze (extenze primeru)
3. Chemická mutageneze
4. Kazetová mutageneze
5. Metody založené na PCR
6. Mutageneze pomocí supresorových tRNA

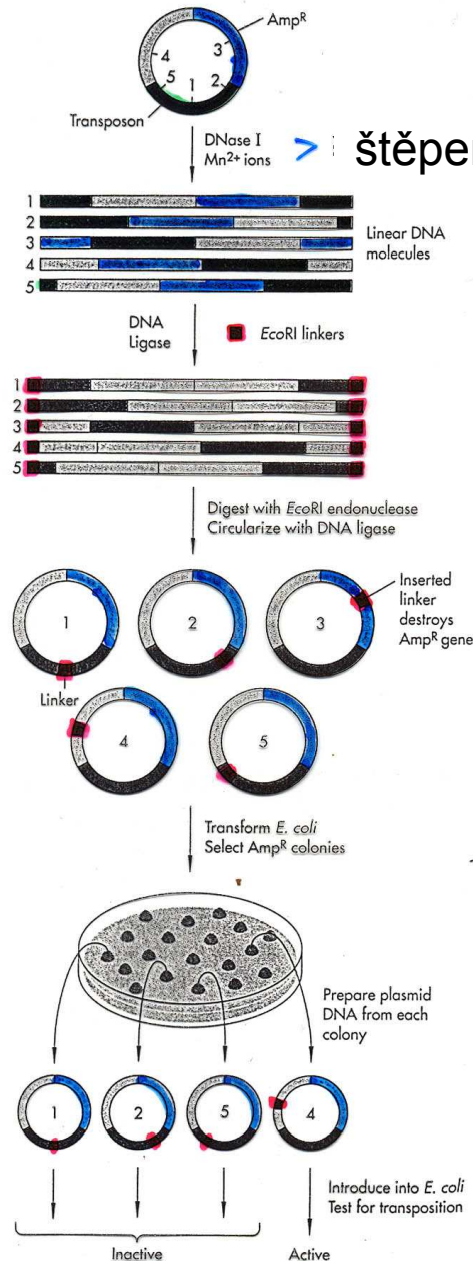
# Vytváření mutací v restričním místě



# Inzerční mutagenese pomocí linkerů k vyhledání funkčních oblastí transpononu

Soubor náhodně linearizovaných molekul

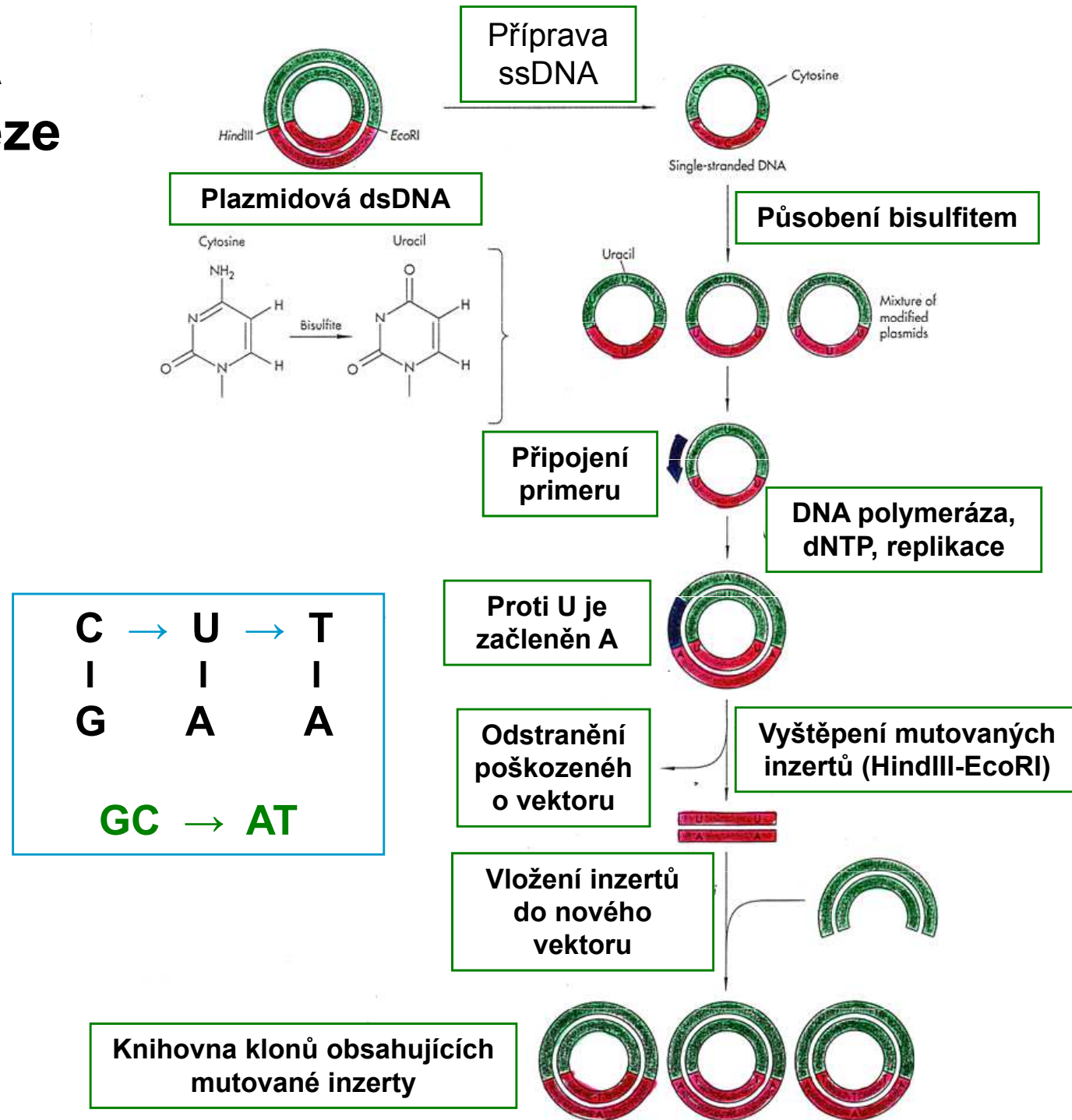
Vložený linker inaktivuje různé geny



Připojení EcoRI-linkerů (= vložení inzerce inaktivující zasažený gen)

Selekce klonů se ztrátou transpoziční aktivity, např. vyhledání genu pro transponázu (oblasti, která je pro její funkci nezbytná)

# Chemická mutagenese bisulfitem

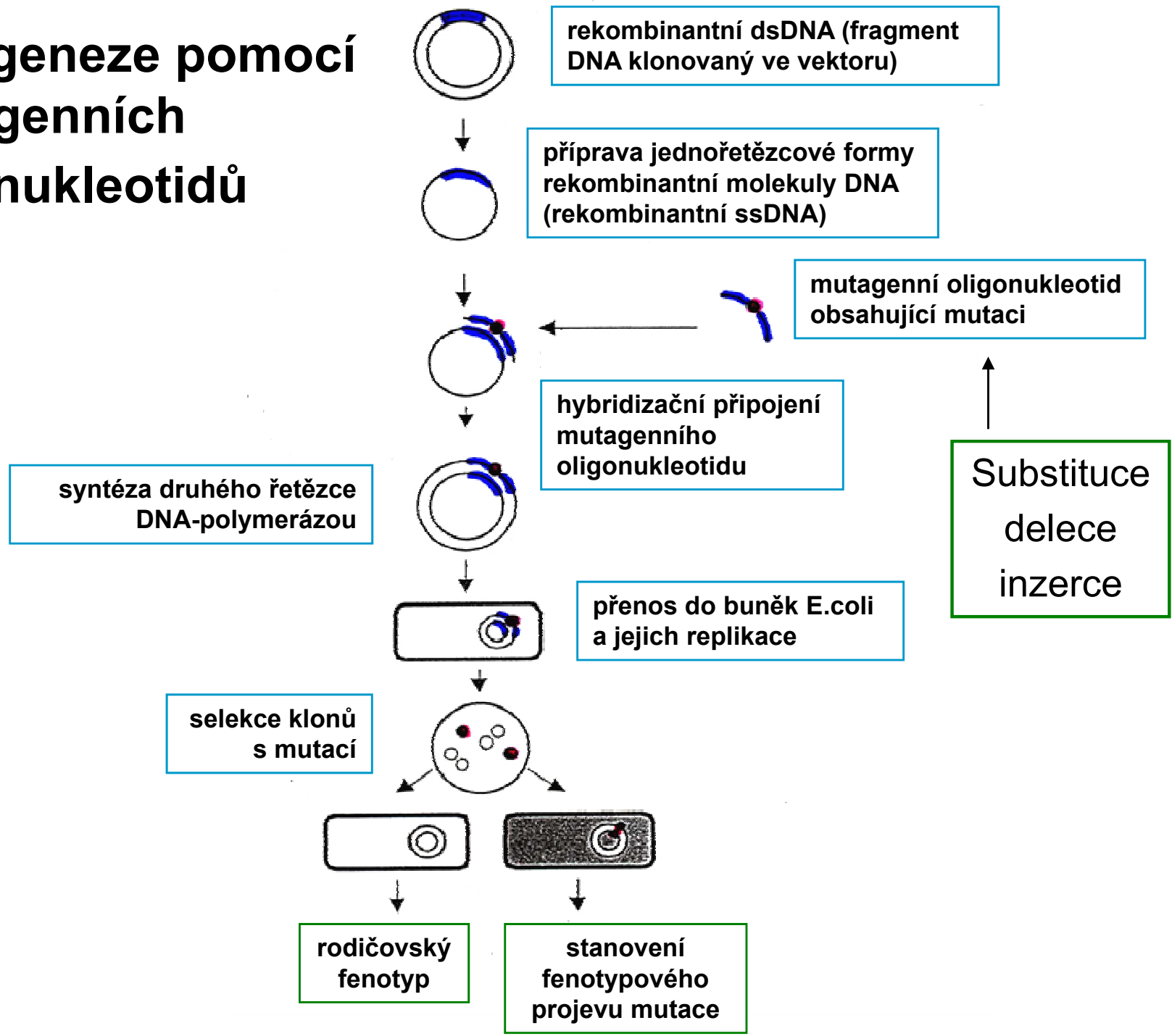


# Mutagenese pomocí mutagenních oligonukleotidů

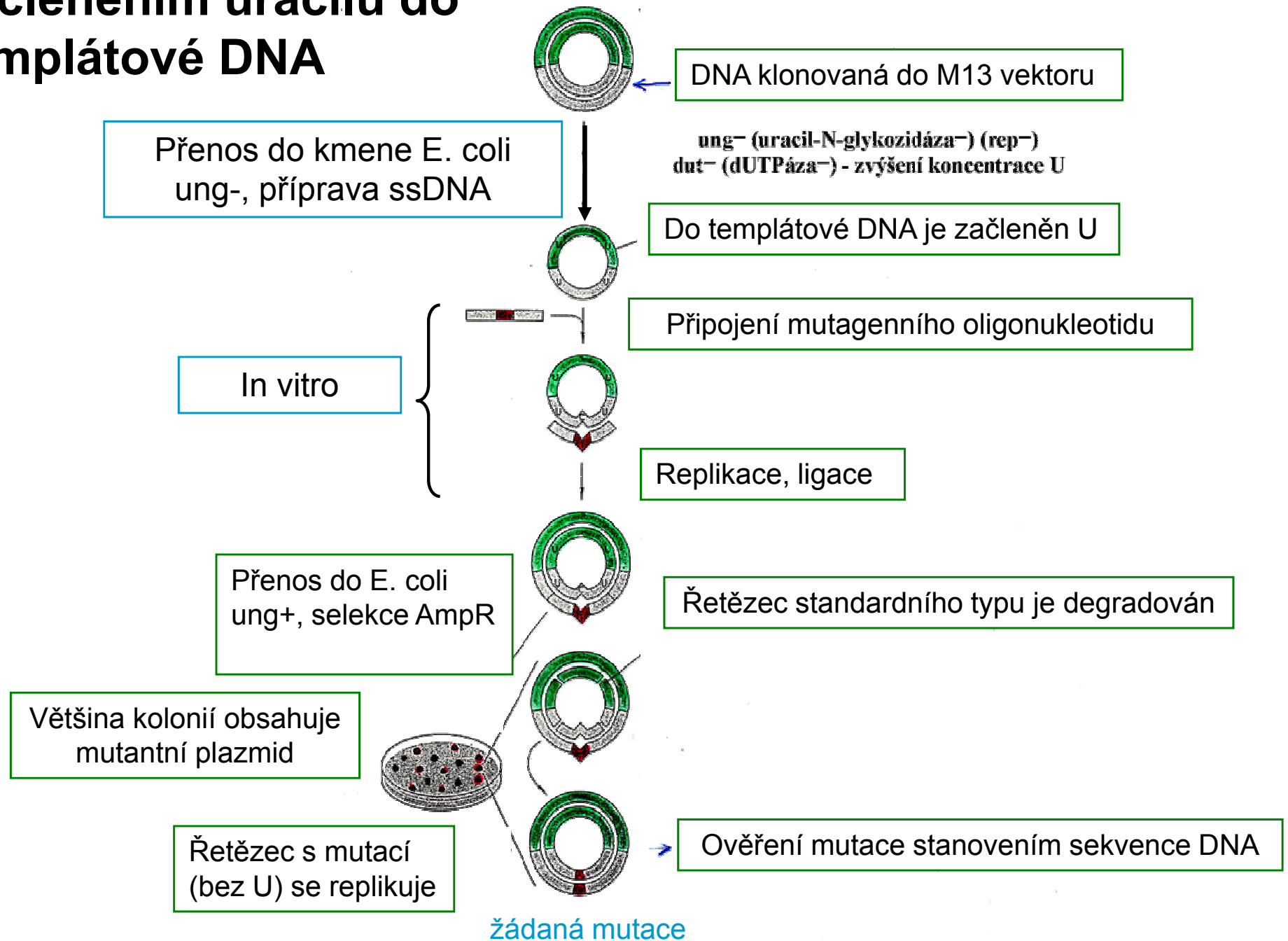
1. Klonování sekvence (genu) do vhodného vektoru (M13, fágemid, fasmid), izolace jednořetězcové formy rekombinantní DNA
2. Příprava syntetického oligonukleotidu (mutagenního oligonukleotidu) nesoucího žádanou mutaci (jeho sekvence je komplementární ke klonované sekvenci vyjma místa, do něhož má být mutace vnesena)
3. Připojení (při hybridizování) mutagenního oligonukleotidu in vitro
4. Dosyntetizování druhého (komplementárního) řetězce DNA-polymerázou, spojení DNA-ligázou
5. Transformace buněk *E. coli* heteroduplexní molekulou DNA, selekce mutantních molekul (příp. selekce in vitro a transformace mutantními molekulami DNA)
6. Pomnožení mutantní molekuly DNA v *E. coli*, ověření mutace stanovením sekvence DNA



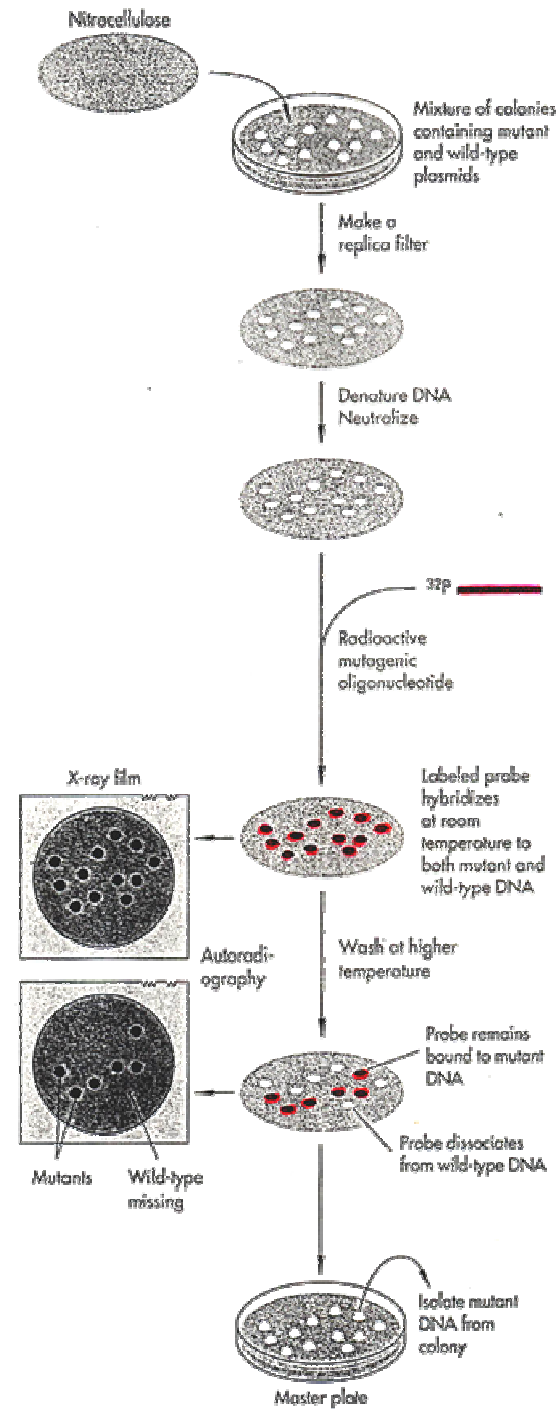
# Mutagenese pomocí mutagenních oligonukleotidů



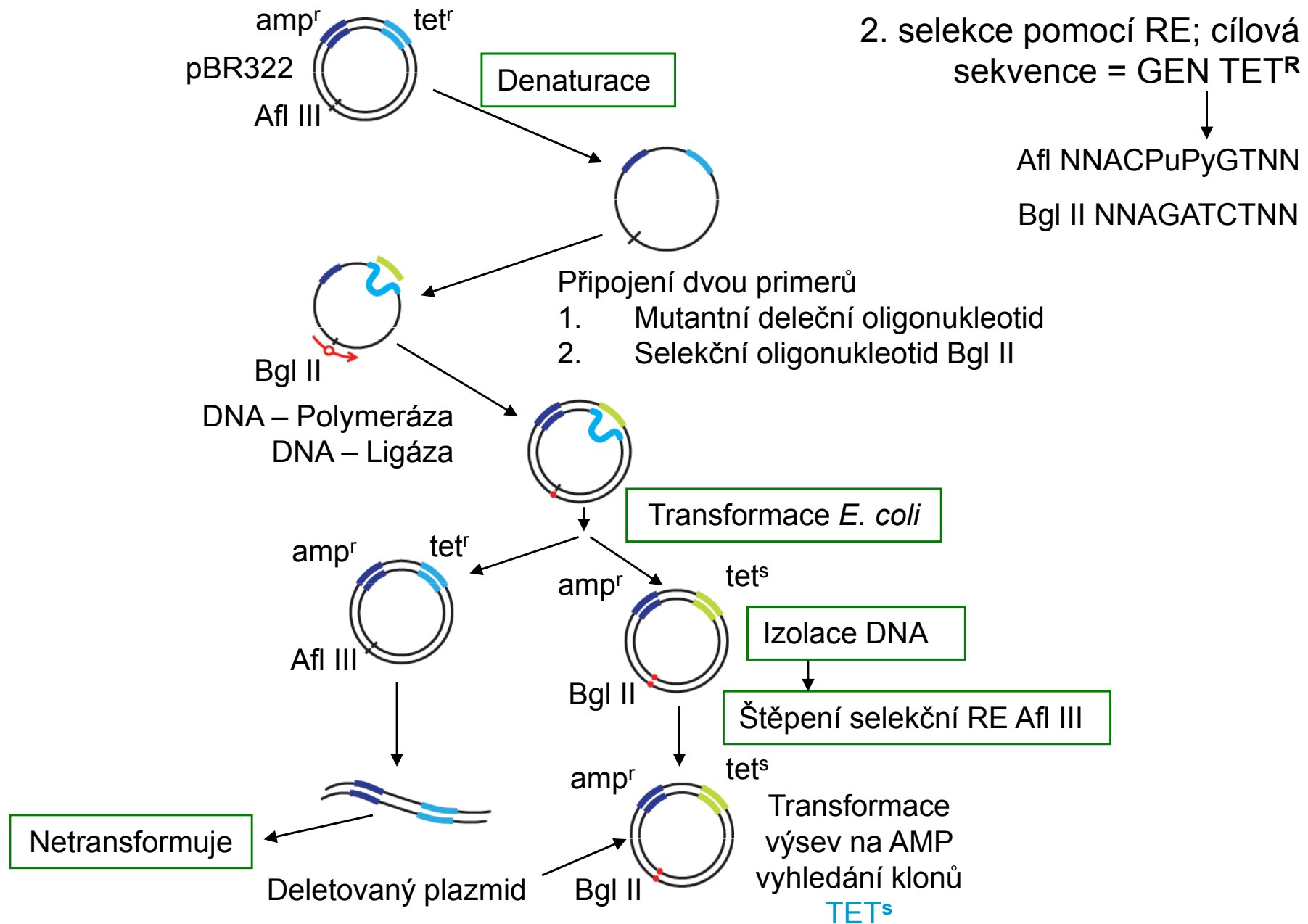
# Zvýšení výnosu mutant začleněním uracilu do templátové DNA



# Vyhledání mutančních klonů pomocí sondy

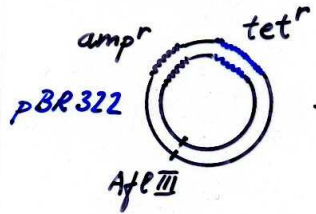


# Mutageneze pomocí mutančních oligonukleotidů



# MUTAGENEZE POMOCÍ MUTANTNÍCH OLIGONUKLEOTIDŮ

2. SELEKCE POMOCÍ RE; CÍLOVÁ SEKVENCE = GEN TET<sup>R</sup>



DENATURACE

Afe NNACPuPyGTNN  
BglII NNAGATCTNN

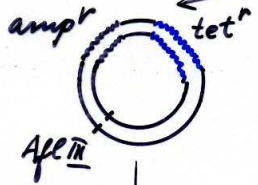
PŘIPOJENÍ DVOU PRIMERŮ

1. MUTANTNÍ DELEČNÍ OLIGONUKLEOTID
2. SELEKČNÍ OLIGONUKLEOTID BglII

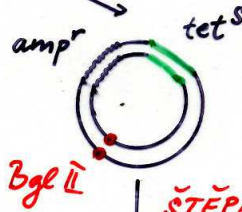
BglII

DNA-POLYMERÁZA  
DNA-LIGÁZA

TRANSFORMACE E. coli



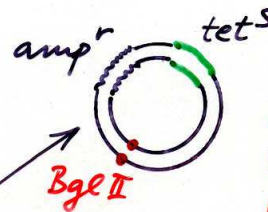
netransformuje



Deletovaný plazmid

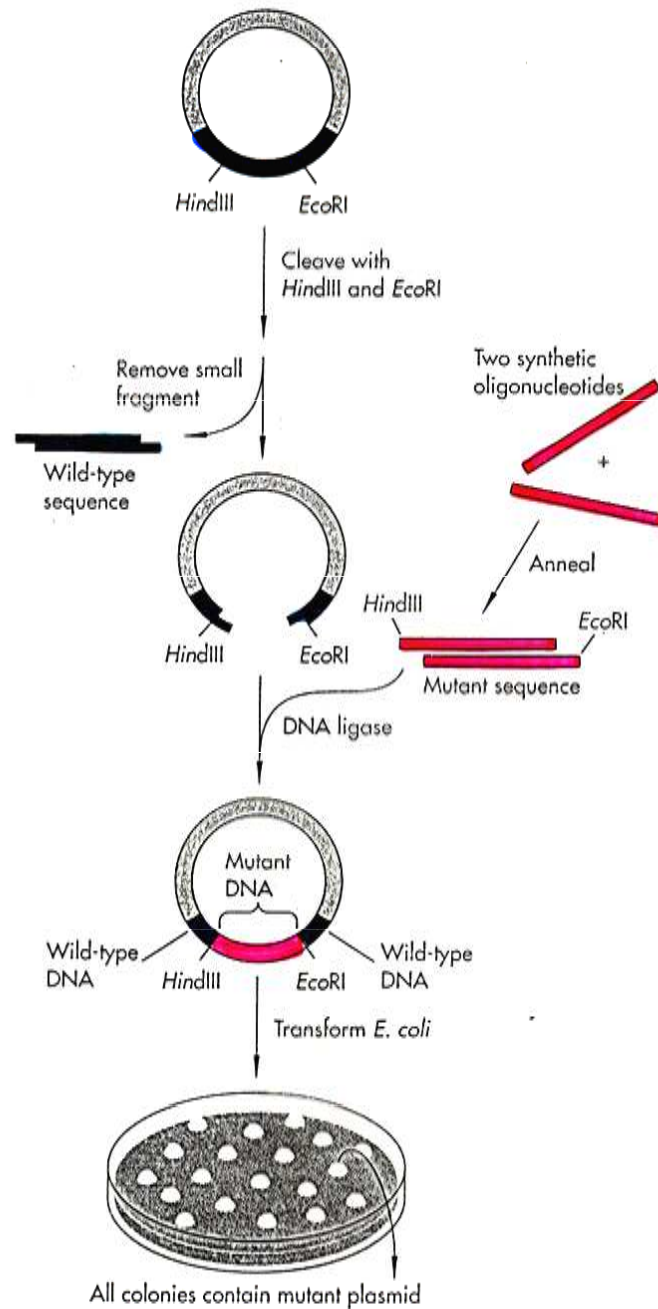
IZOLACE DNA

ŠTĚPENÍ SELEKČNÍ RE AfeIII

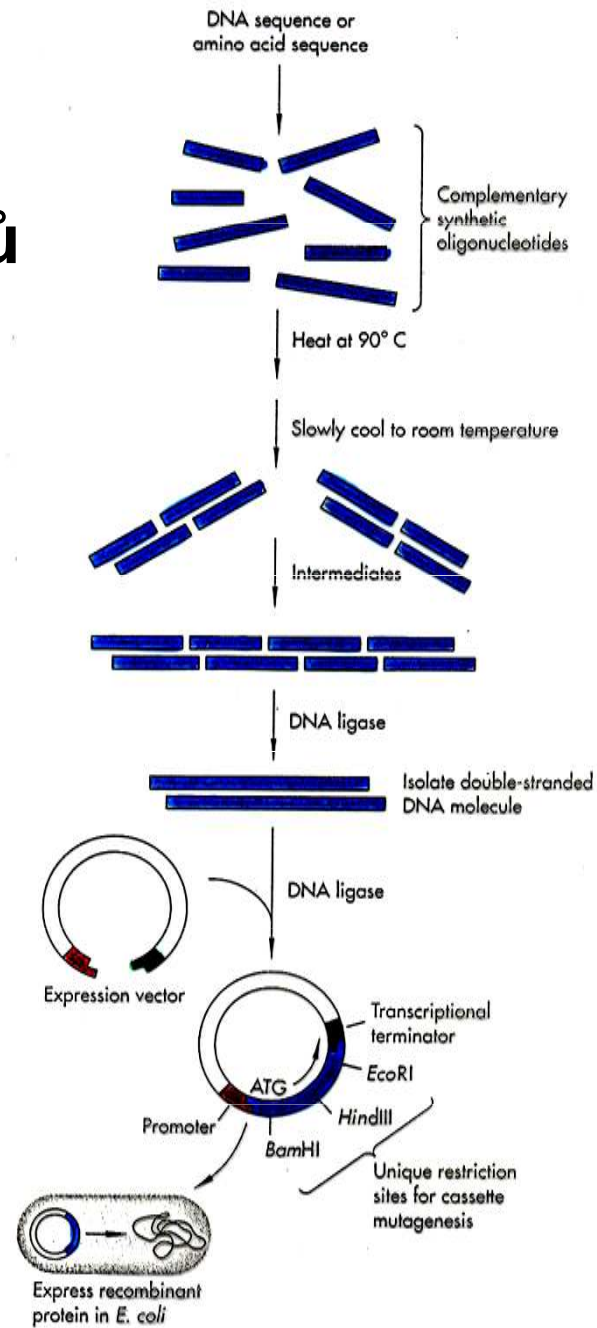


TRANSFORMACE  
VÝSEV NA AMP  
VYHLEDÁNÍ KLONŮ  
TET<sup>S</sup>

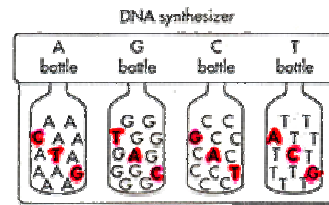
# Kazetová mutageneze



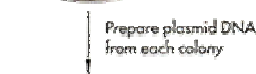
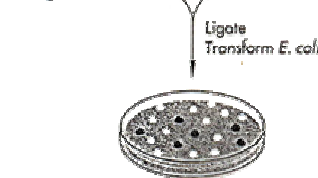
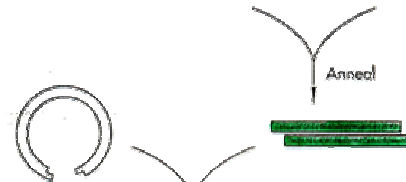
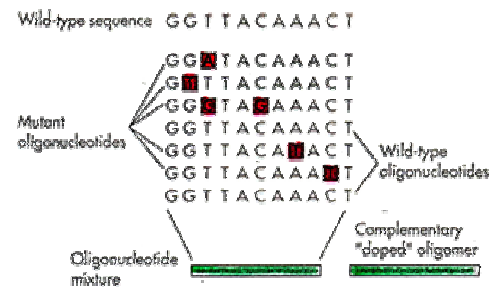
# Syntéza genů postupným spojováním kratších oligonukleotidů



# Mutagenese pomocí kazet tvořených mutantními „doped“ oligonukleotidy



„kontaminované“  
zásobní roztoky  
nukleotidů



546 klonů  
224 wt  
218 - 1x subst.  
104 - více subst.

Skríning např.  
fágovým displayem

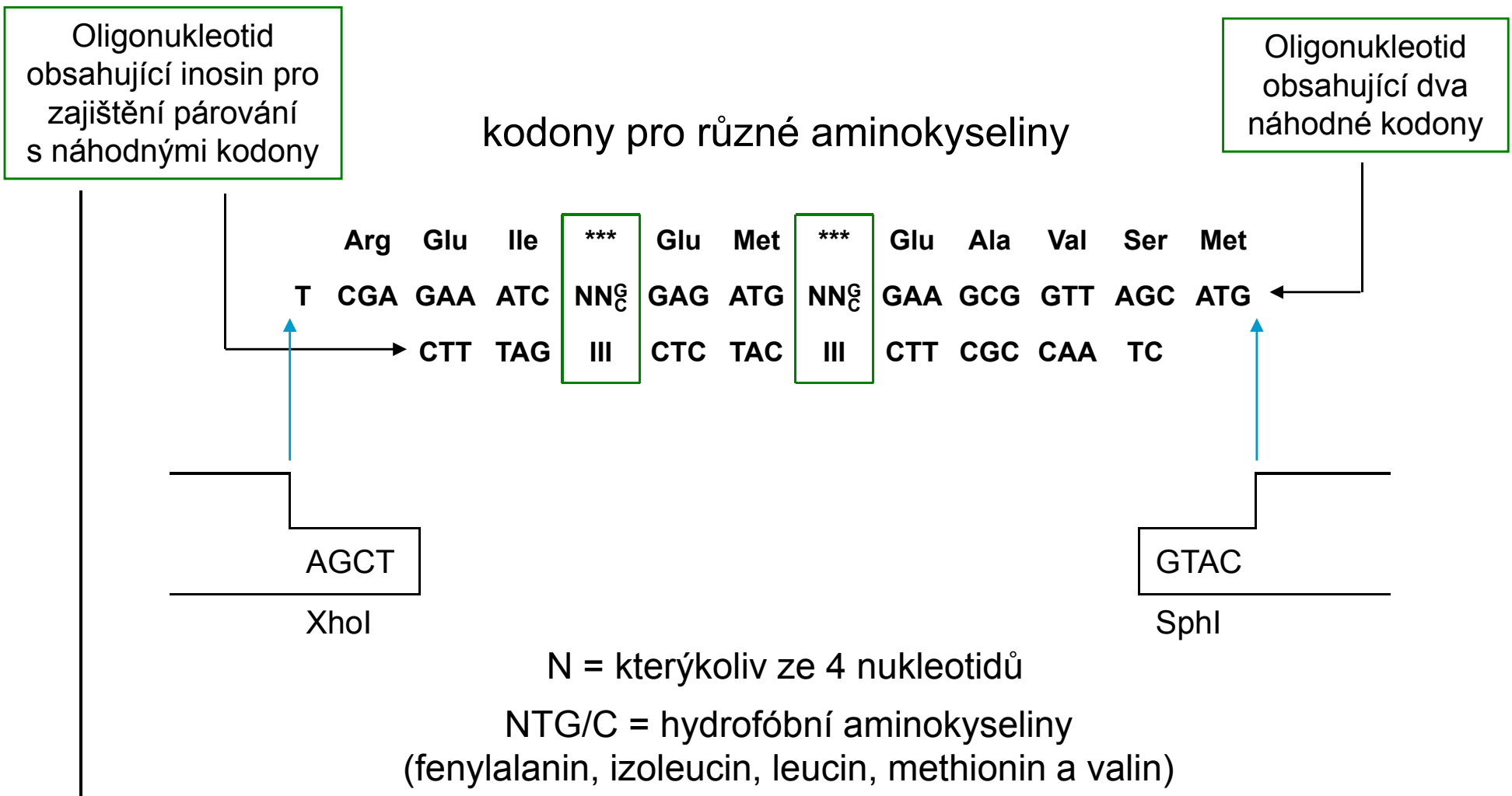
Wild-type plasmids  
and mutants with  
multiple substitutions

Plasmids containing a  
single nucleotide change

Test for function

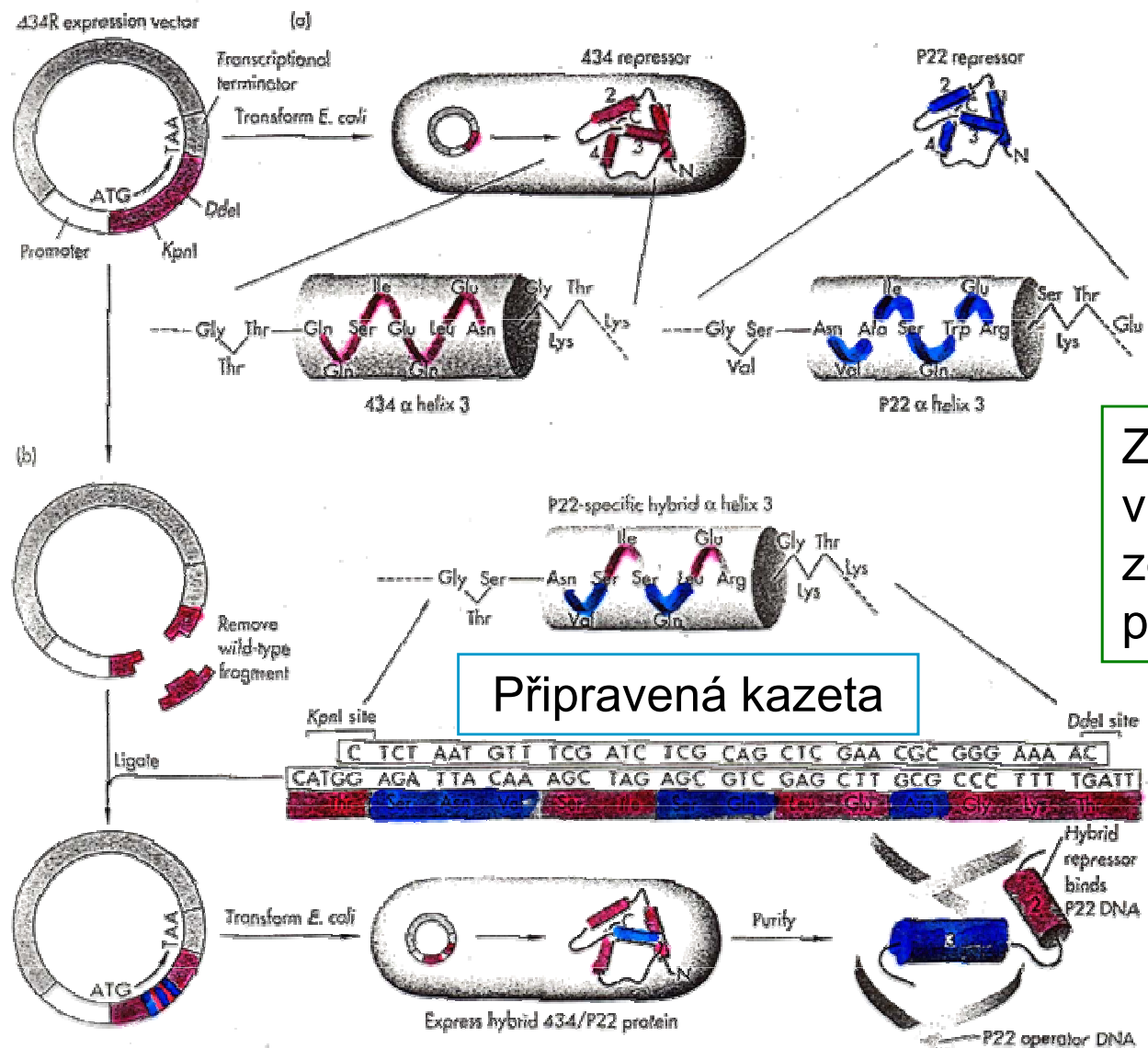


# Mutageneze pomocí „doped“ oligonukleotidů



Alternativní způsob nasyntetizování druhého nukleotidu = PCR

# Záměna helixu v represorovém proteinu mutagenezou in vitro (kasetová mutageneze)



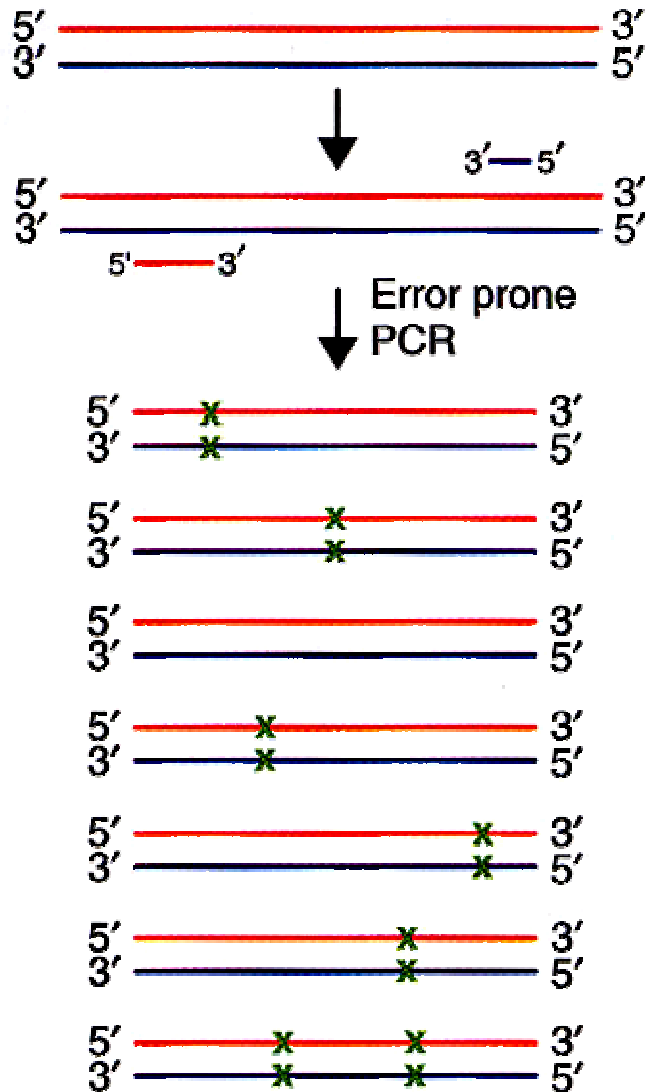
Záměna aminokyselin v doméně represoru zodpovědné za rozpoznání operátoru P22

Připravená kazeta

# Výhody PCR

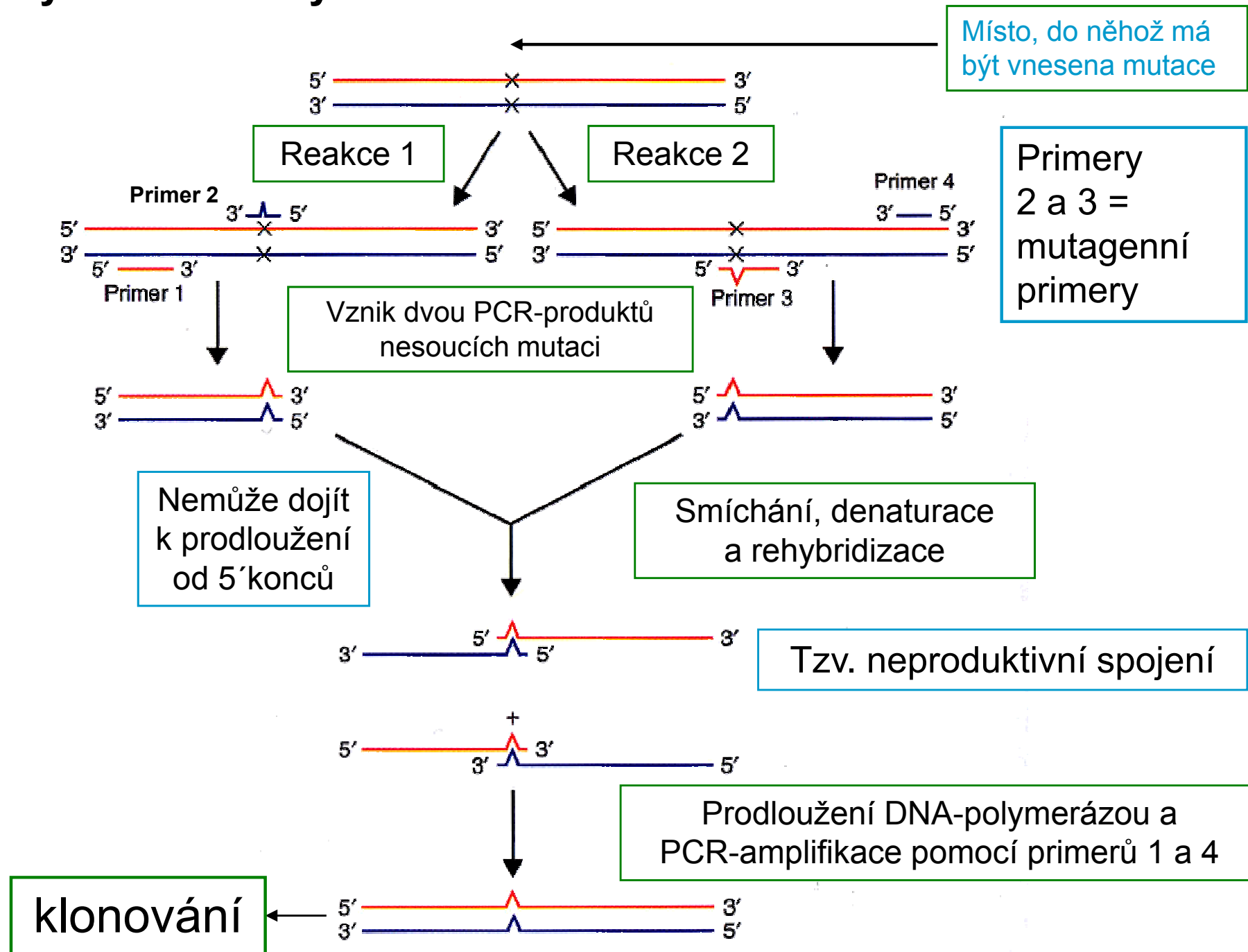
- jednoduché provedení
- možnost vytváření různého typu mutací
- není nutná následná selekce pro zvýšení proporce mutant
- nezávislost na RE místech
- není vždy nutné následné klonování mutovaného genu do vektoru (po PCR je možný přenos amplikonu do buněk transformací)

# Vytváření náhodných mutací = „error-prone“ PCR

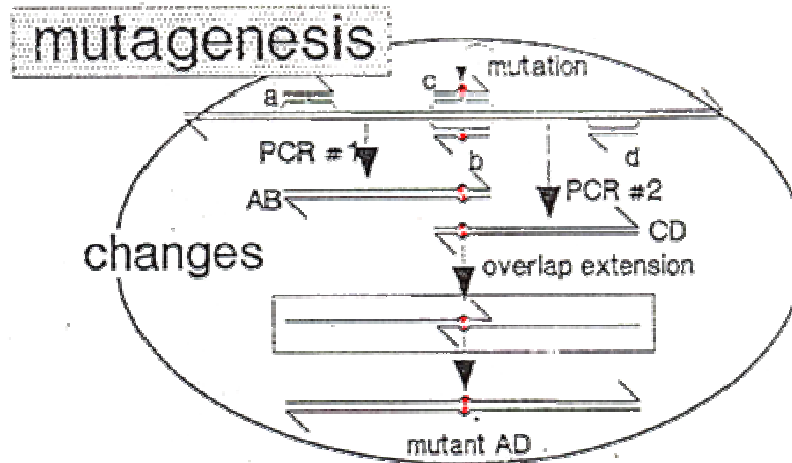


- využívají se DNA-polymerázy bez korektorské funkce (např. Taq-polymeráza)
- reakční podmínky PCR lze změnit tak, aby se počet chyb zvýšil a aby každý amplifikační produkt obsahoval jednu mutaci (např. zvýšení  $Mg^{++}$  nebo přidání  $Mn^{++}$ , koncentrace reakčních složek atp)
- nevýhoda: převaha určitého typu mutace (např. transice, zatímco transverze nevznikají)

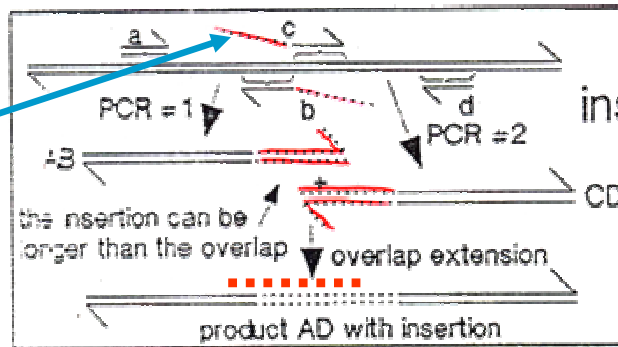
# Využití PCR k vytváření mutací in vitro



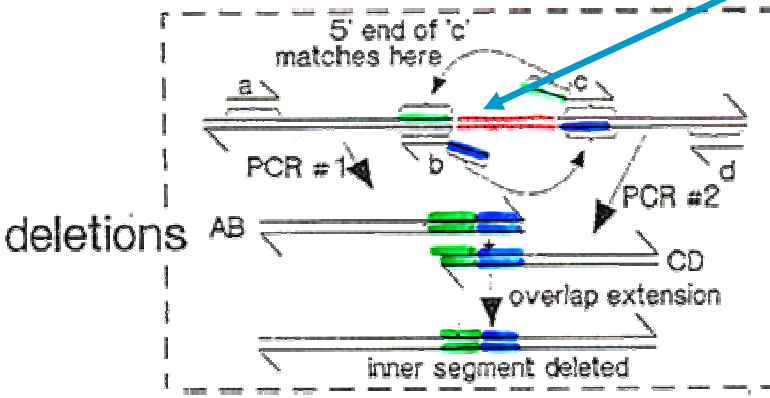
# Vnášení mutací pomocí PCR



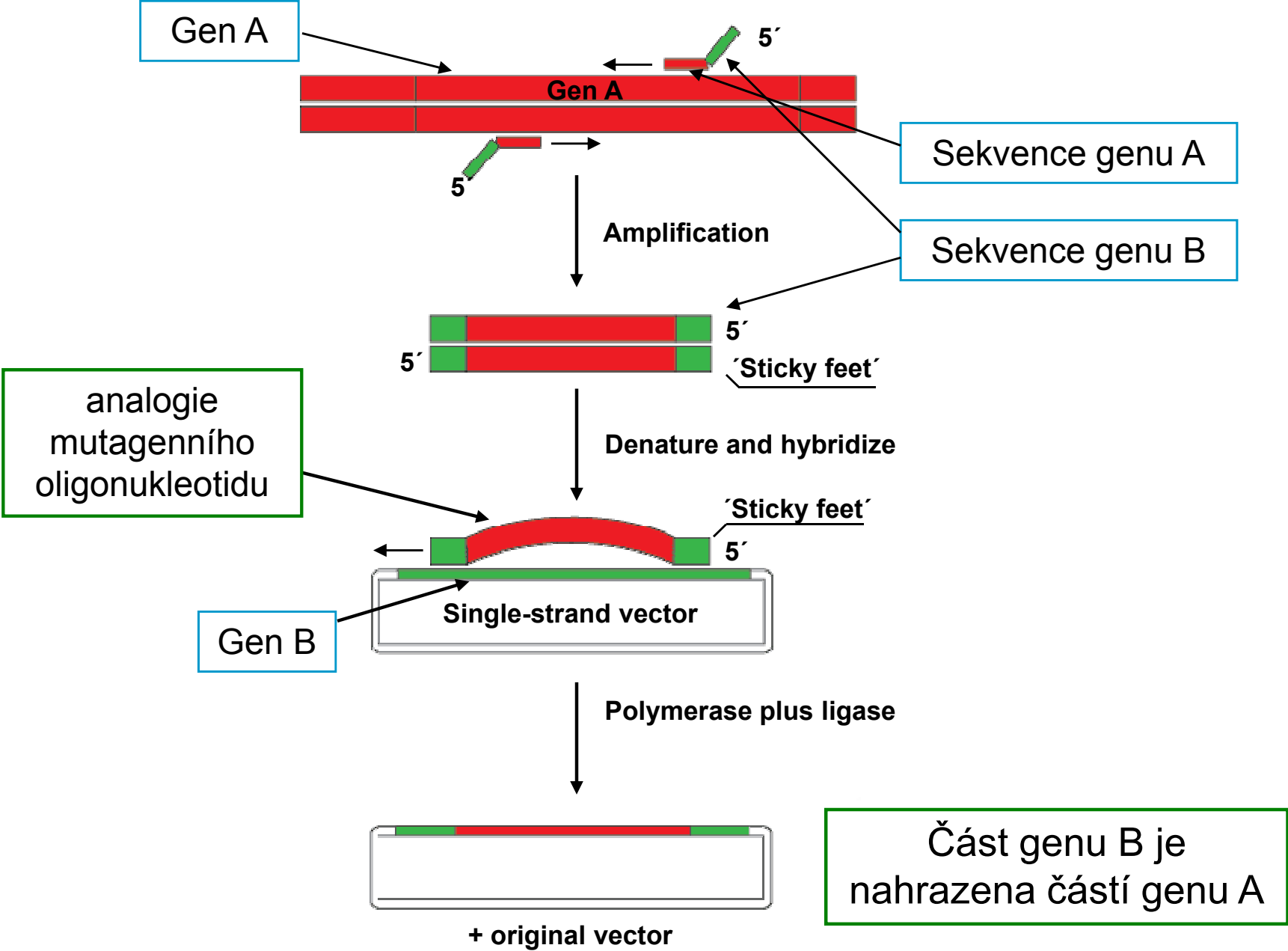
Vložená sekvence  
(extenze primeru  
na jeho 5'konci)



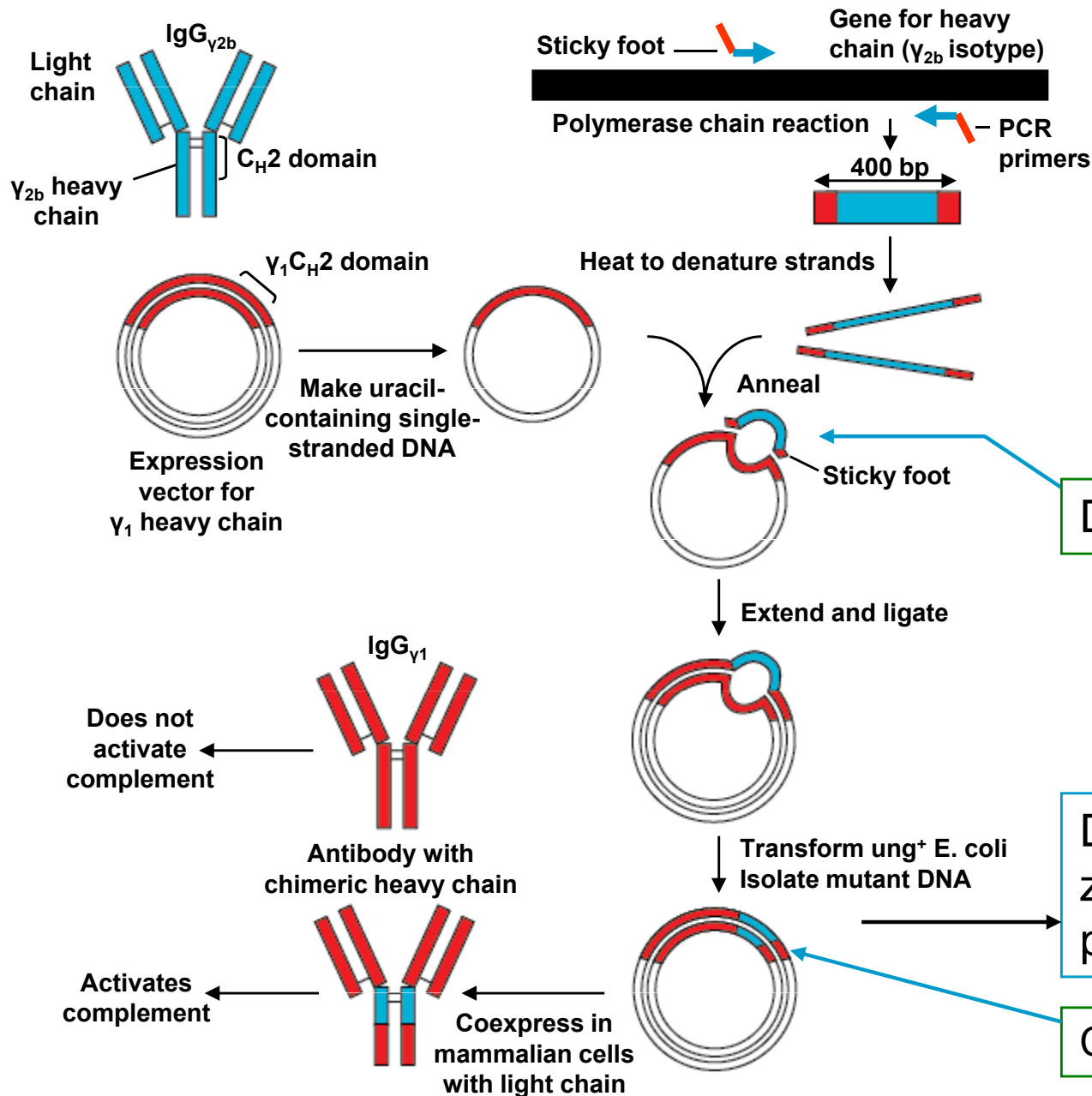
Deletovaná  
sekvence



# Náhrada části genu sekvencí z příbuzného genu



# Konstrukce genu pro chimerickou protilátku



Těžký řetězec typu g 2b zodpovídá za lyzu buněk závislou na komplementu  
 Protilátka s těžkým řetězcem g 1 tuto lyzu nenavozuje.  
 Která oblast g 2b za tuto vlastnost zodpovídá?

Doména CH2 g 2b

Doména CH2 odpovídá za aktivaci komplementu pro lyzu buněk

Chimerický těžký řetězec

Does not activate complement

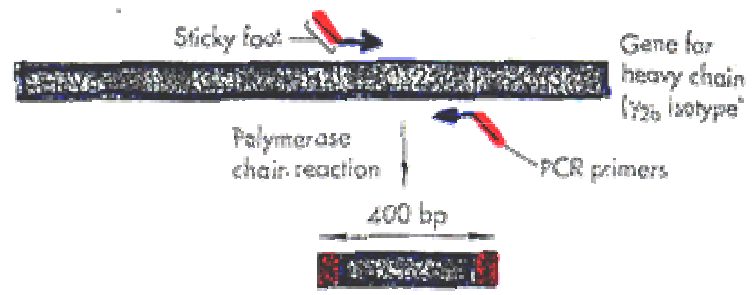
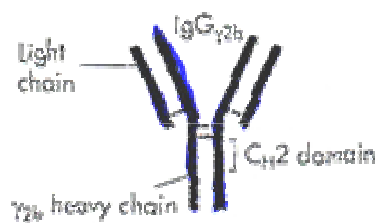
Antibody with chimeric heavy chain

Activates complement

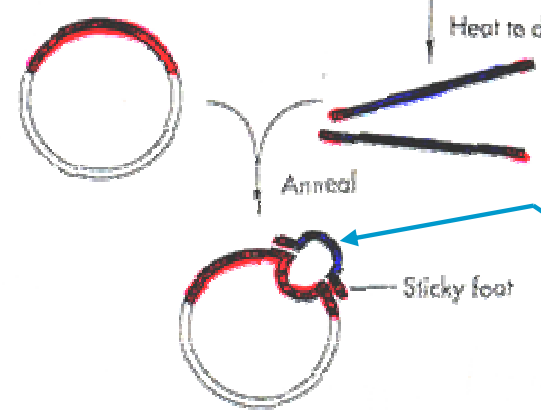
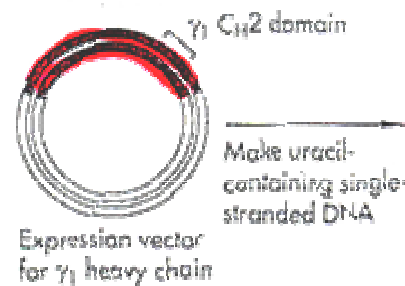
Coexpress in mammalian cells with light chain



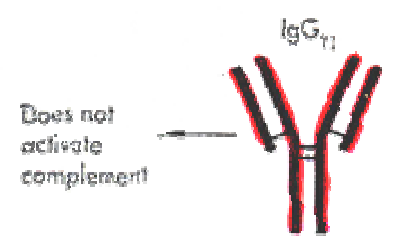
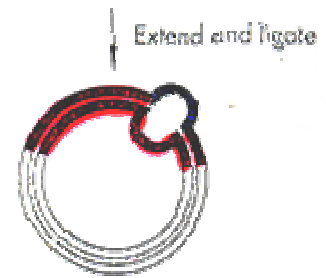
# Konstrukce genu pro chimerickou protilátku



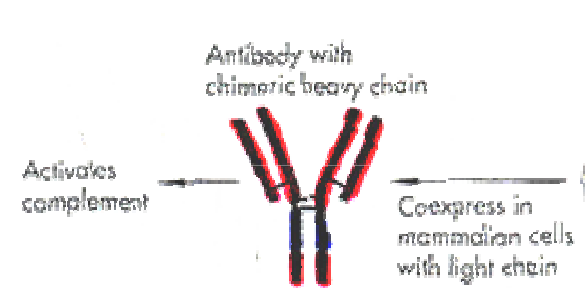
Těžký řetězec typu g 2b zodpovídá za lyzu buněk závislou na komplementu  
Protilátka s těžkým řetězcem g 1 tuto lyzu nenavozuje.  
Která oblast g 2b za tuto vlastnost zodpovídá?



Doména CH2 g 2b

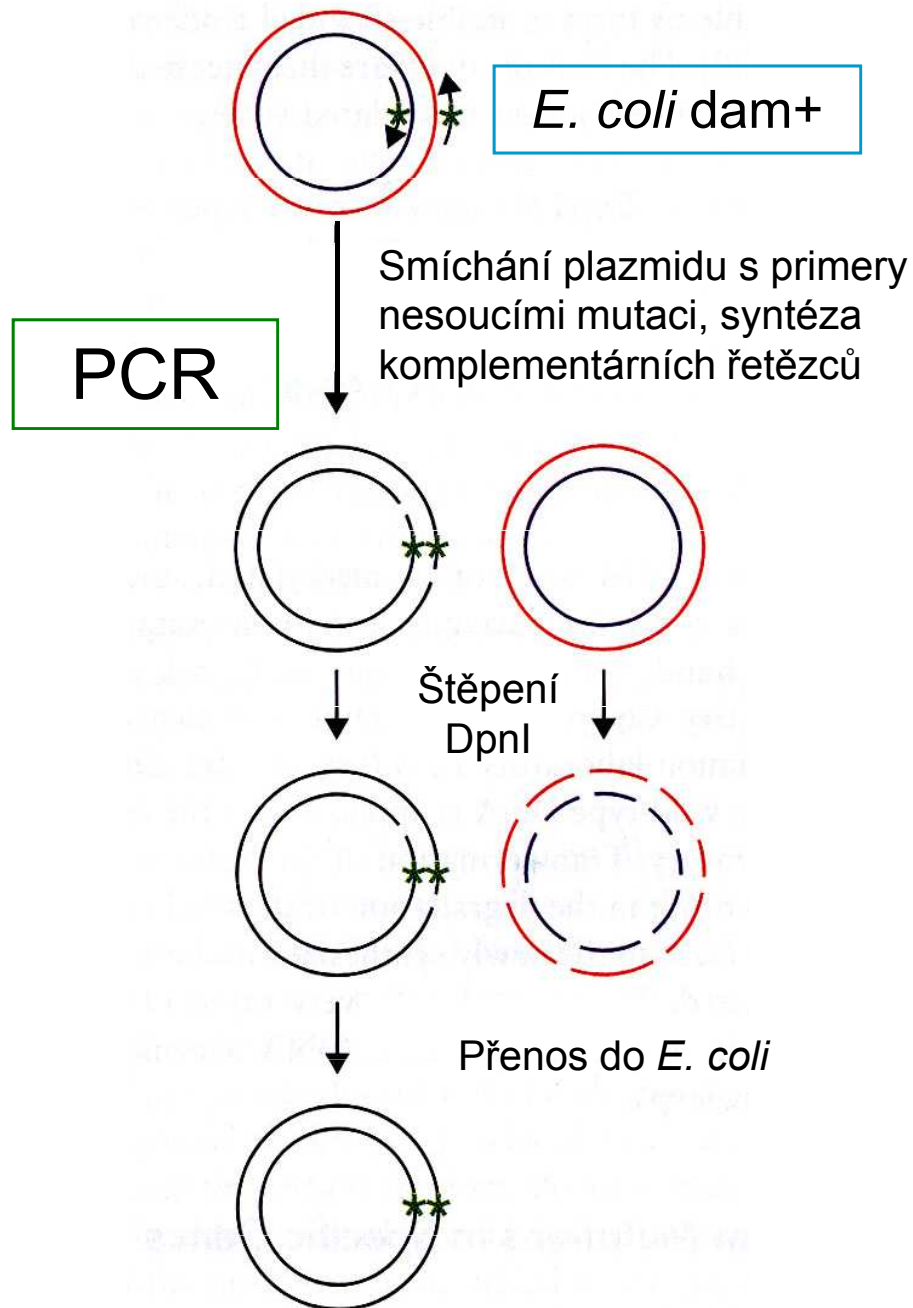


Doména CH2 odpovídá za aktivaci komplementu pro lyzu buněk



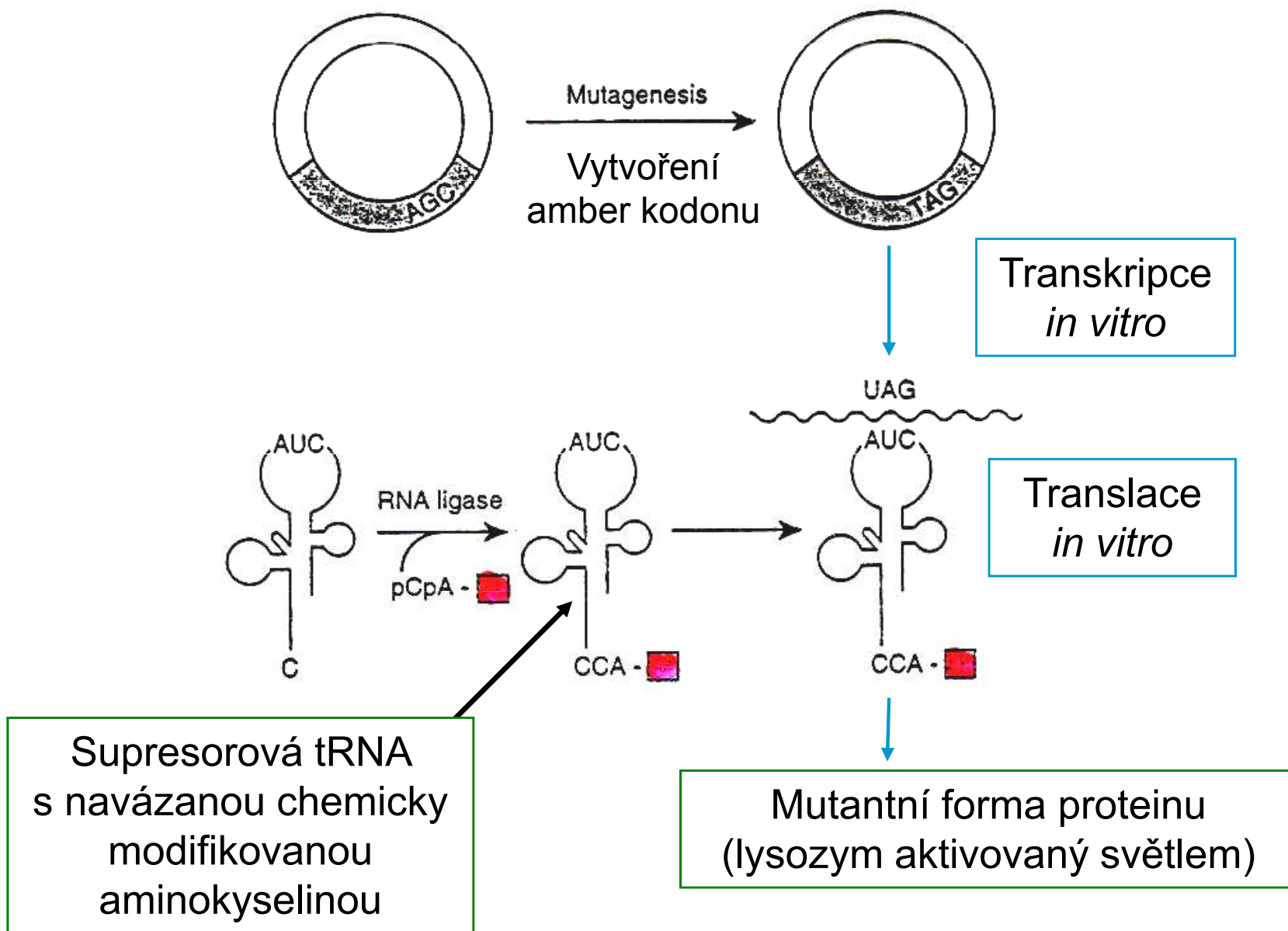
Chimerický těžký řetězec

# Vytváření mutací *in vitro* přímo na plasmidech (QuickChange)



- jako templát je využita dsDNA plasmidu
- po proběhnutí PCR se vytvoří dva komplementární řetězce nesoucí mutaci ve stejném místě, které jsou schopny se párovat za vzniku kružnice s posunutými zlomy
- po proběhnutí PCR jsou produkty štěpeny DpnI, která je schopná štěpit jen metylovanou DNA
- rodičovské molekuly DNA jsou metylovány, neboť plasmidy byly izolovány z dam+ kmenů *E. coli* - proto jsou DpnI rozštěpeny (odstranění rodičovského templátu bez mutace).
- nově syntetizované molekuly nejsou metylovány a tudíž nejsou štěpeny
- po transformaci do *E. coli* dojde k reparaci zlomů a nově nasyntetizované plasmidy obsahující mutaci se replikují

# Inzerce abnormálních aminokyselin do proteinu supresí amber mutace *in vitro* s využitím chemicky modifikovaných tRNA



**Table 4.4 Nonsense Suppressors Employed to Generate Altered Proteins**

Suppressor	Codons recognized	Amino acid inserted	Efficiency (%)	References
<b>A. Natural</b>				
Su1 ( <i>supD</i> )	UAG	Serine	6–54	a, b
Su2 ( <i>supE</i> )	UAG	Glutamine	0.8–20	a, b
Su2-89 ( <i>supE</i> )	UAG	Glutamine	32–60	c, h
Su3 ( <i>supF</i> )	UAG	Tyrosine	11–100	a, b
Su5 ( <i>supG</i> )	UAA, UAG	Lysine	0.2–2 6–30*	a, b, h h
Su6 ( <i>supP</i> )	UAG	Leucine	30–100	a, e
Su9	UGA	Tryptophan	0.1–30	a, f
<b>B. Synthetic</b>				
tRNA <sup>Phe</sup> <sub>CUA</sub>	UAG	Phenylalanine	48–100	g
tRNA <sup>GluA</sup> <sub>CUA</sub>	UAG	85% Glutamic acid 15% Glutamine	8–100	h, i
tRNA <sup>Cys</sup> <sub>CUA</sub>	UAG	Cysteine	17–51	g
tRNA <sup>HisA</sup> <sub>CUA</sub>	UAG	Histidine	16–100	h, i
tRNA <sup>ProH</sup> <sub>CUA</sub>	UAG	Proline	9–60	h, i
tRNA <sup>Lys</sup> <sub>CUA</sub>	UAG	Lysine	9–29	h, i
tRNA <sup>Ala</sup> <sub>CUA</sub>	UAG	Alanine	8–83	h, i
tRNA <sup>Gly1</sup> <sub>CUA</sub>	UAG	Glycine	39–67	h, i
FTORI 26	UAG	Arginine	4–28 4–47*	j h

Příklad: 160 variant genu pro lysozym s amber mutacemi na různých místech poskytlo v supresorových kmenech 2 000 variant lysozymu