Definice genového inženýrství

Genové inženýrství se zabývá vytvářením pozměněných či nových genů nebo přípravou nových (nepřirozených) kombinací genů a jejich zaváděním do genomu organizmů 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).

Pozn.: cílené změny genetické informace lze provádět také *in vivo*

Genové manipulace, moderní (molekulární) biotechnologie

Genové inženýrství (sylabus přednášky 2011)

1. **Osnova přednášky, definice genového inženýrství a jeho stručná historie, studijní literatura.Mutageneze *in vitro* (metody založené na restrikčních místech, metody založené na mutagenních oligonukleotidech, kazetová mutageneze, využití modifikovaných tRNA)**
2. **Optimalizace exprese klonovaných genů (faktory ovlivňující expresi genů v cizích hostitelích; úroveň transkripce, translace, export proteinů)**
3. **Klonování genů v grampozitivních bakteriích**
4. **Klonování genů v kvasinkách**
5. **Klonování genů v rostlinách**
6. **Klonování genů v živočišných buňkách, vektory pro přenos genů do savčích buněk, selekční markery pro vyhledání klonů obsahujících cizorodou DNA**
7. **Vnášení genů do zárodečných buněk myší, příprava transgenních savců**
8. **Cílená exprese cizorodých genů v buňkách a tkáních vyšších organismů**
9. **Opravy dědičných defektů u zvířat metodami genového inženýrství**
10. **Genová terapie u člověka – základní principy**
11. **Příprava farmakologicky významných látek v prokaryotických a eukaryotických organismech. Využití metod rekombinantní DNA k přípravě vakcín a protilátek. Identifikace produktů rekombinatních genů.**
12. **Pravidla pro práci s geneticky modifikovanými organismy, zákon 78/2004 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.**
- **Reece R. Analysis of Genes and Genomes. Wiley 2004**
- **Primrose S.B.,Twyman R.M. Principles of gene manipulation and genomics. Blackwell Publ., 2006, 7. vydání.**
- **Internetové zdroje, IS muni.cz**

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 organizmů a získávání produktů ve velkém množství – *překonání reprodukčních barier*
2. Příprava látek s novými vlastnostmi pozměňováním stávajících genů nebo vytvářením nových genů – *enzymy, protilátky, vakcíny aj.*
3. Pozměňování a zlepšování vlastností organizmů - vytváření geneticky modifikovaných n. transgenních organismů (GMO)
   - *příprava mikroorganizmů 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 (in vivo)* pozměňovat**
- **Přenést vhodným způsobem upravené geny do původních nebo nepříbuzných organismů a zajistit jejich expresi (heterologní expresní systémy)**

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, moratorium NIH (1976)

1976 – první pravidla práce s rekombinantní DNA

1977 – první rekombinované molekuly DNA nesoucí savčí geny

1977 – sekvenování DNA

1978 – příprava lidského inzulinu v bakteriích
(od r. 1982 vyráběn komerčně), založení Genentech

zavedení technik mutageneze in vitro – proteinové inženýrství

příprava transgenních organismů (bakterie, kvasinky,rostliny, živočichové)

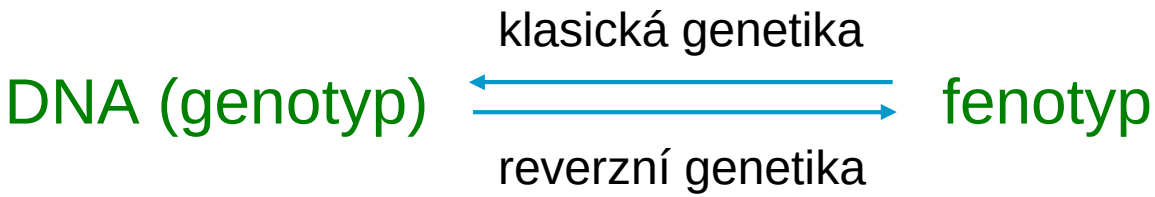
1980 – genové terapie

1997 – klonování živočichů

Mutageneze *in vitro*

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

reverzní genetika*, genetika „naruby“



* ***Reverzní genetika – „vypínání genů“ navozování nulových mutací genů nebo potlačování jejich exprese (knokauty genů, transpozonová inzerční mutageneze, anti-sense RNA, RNAi)***

Mutageneze *in vitro*

Mutace se vnášejí do vyizolované DNA (= *in vitro*)

Typy mutací: substituce, delece, inzerce

Cíle:

Výzkum:

- Analýza vztahu mezi strukturou a funkcí NK
- Objasnění funkce genů a regulačních oblastí

Praxe:

- Cílené změny aminokyselin v proteinech - příprava proteinů s novými vlastnostmi (proteinové inženýrství)
- Příprava geneticky modifikovaných a transgenních organismů

Nevýhody klasické mutageneze

(chemické, fyzikální, biologické mutageneze)

1. V organizmu 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

Mutageneze *in vitro*

Mutageneze *in vitro*

náhodná

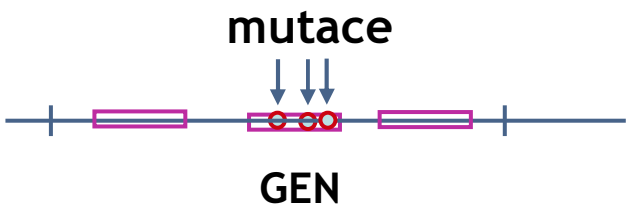
manipulace s restrikčními místy
inzerce linkerů
chemická mutageneza
inkorporace chybných bazí

vyhledání genu nebo
funkčních oblastí na DNA

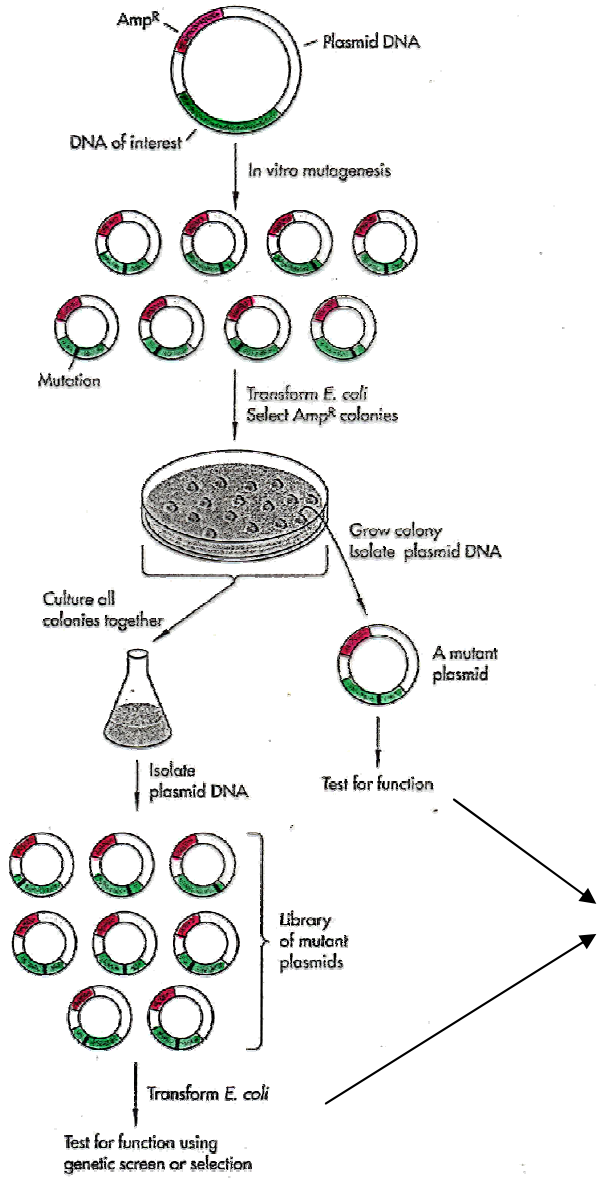
cílená

oligonukleotidová mutageneza
(umístění do konkrétního místa)
syntéza genů
(kazetová mutageneza)

záměny bazí nebo kodonů
cílené změny struktury
proteinů



Obecná strategie při mutagenezi *in vitro*



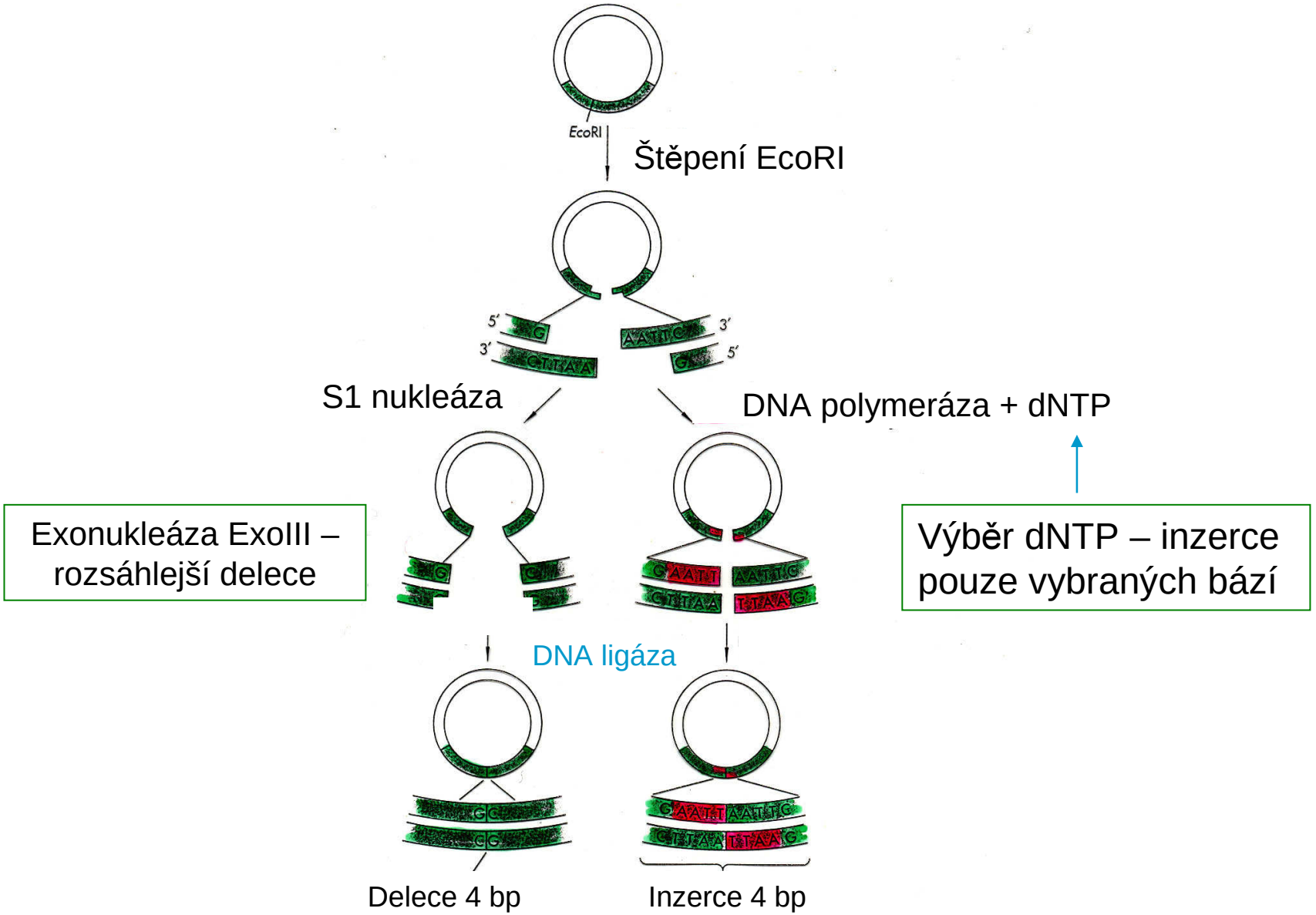
1. Klonování genu (sekvence DNA) určené k mutagenezi
2. Vlastní proces mutageneze *in vitro*
3. Selekce klonů obsahujících mutované geny (sekvence)
4. Stanovení funkce mutovaných genů
5. Ověření charakteru vnesené mutace (stanovení sekvence)

Stanovení sekvence pozměněného genu

Způsoby používané při mutagenezi *in vitro*

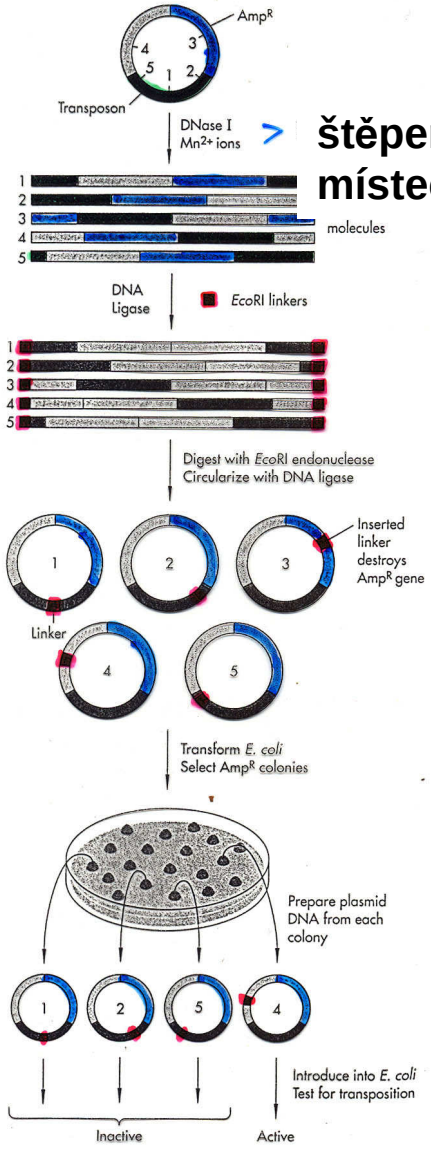
1. Manipulace s restrikčními místy a enzymatické úpravy DNA
2. Oligonukleotidová mutageneze (extenze primeru)
3. Chemická mutageneze
4. Kazetová mutageneze
5. Metody založené na PCR
6. Mutageneze pomocí supresorových tRNA

Vytváření mutací v restrikčním místě



Inzerční mutageneze pomocí linkerů k vyhledání funkčních oblastí transpozonu

Soubor náhodně linearizovaných molekul



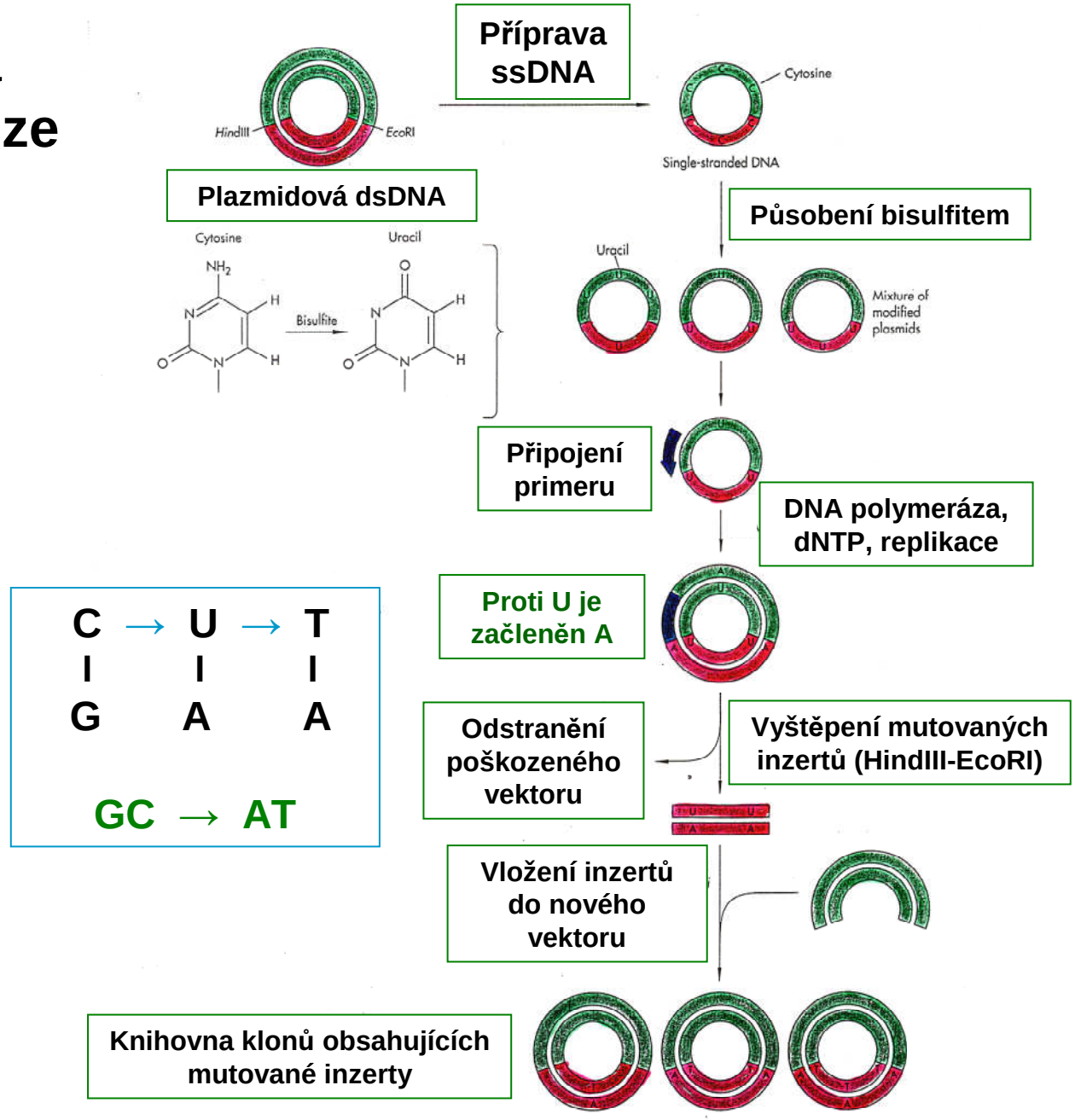
Štěpení rekombinantní DNA na různých místech

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

Vložený linker inaktivuje různé geny

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

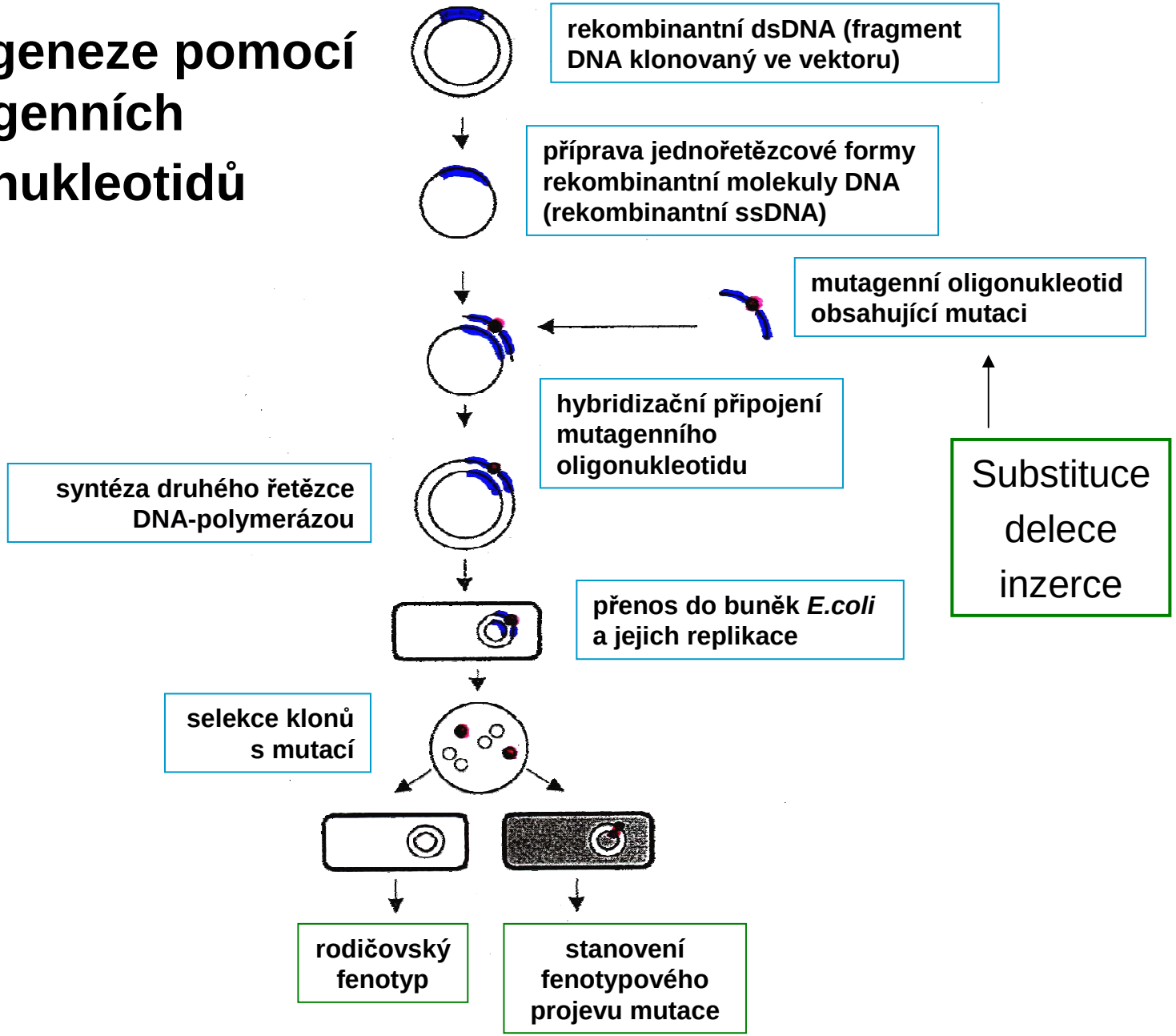
Chemická mutageneze bisulfitem

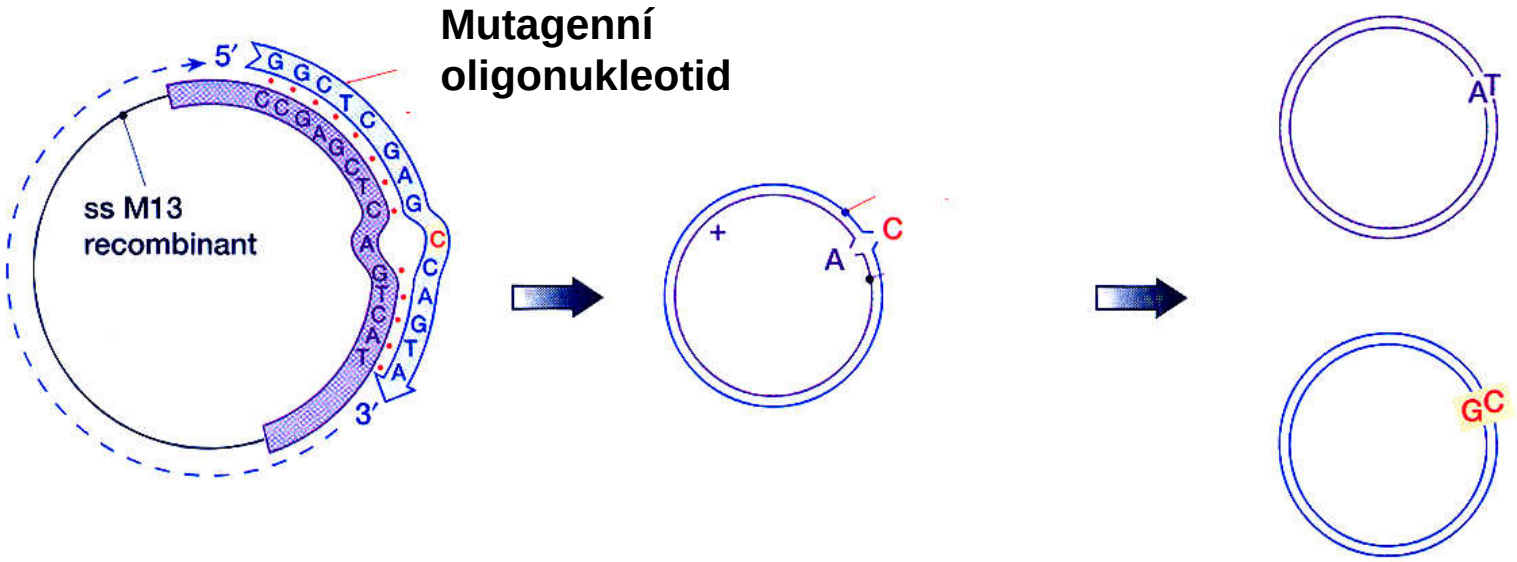


Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů

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 (přihybridizování) 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

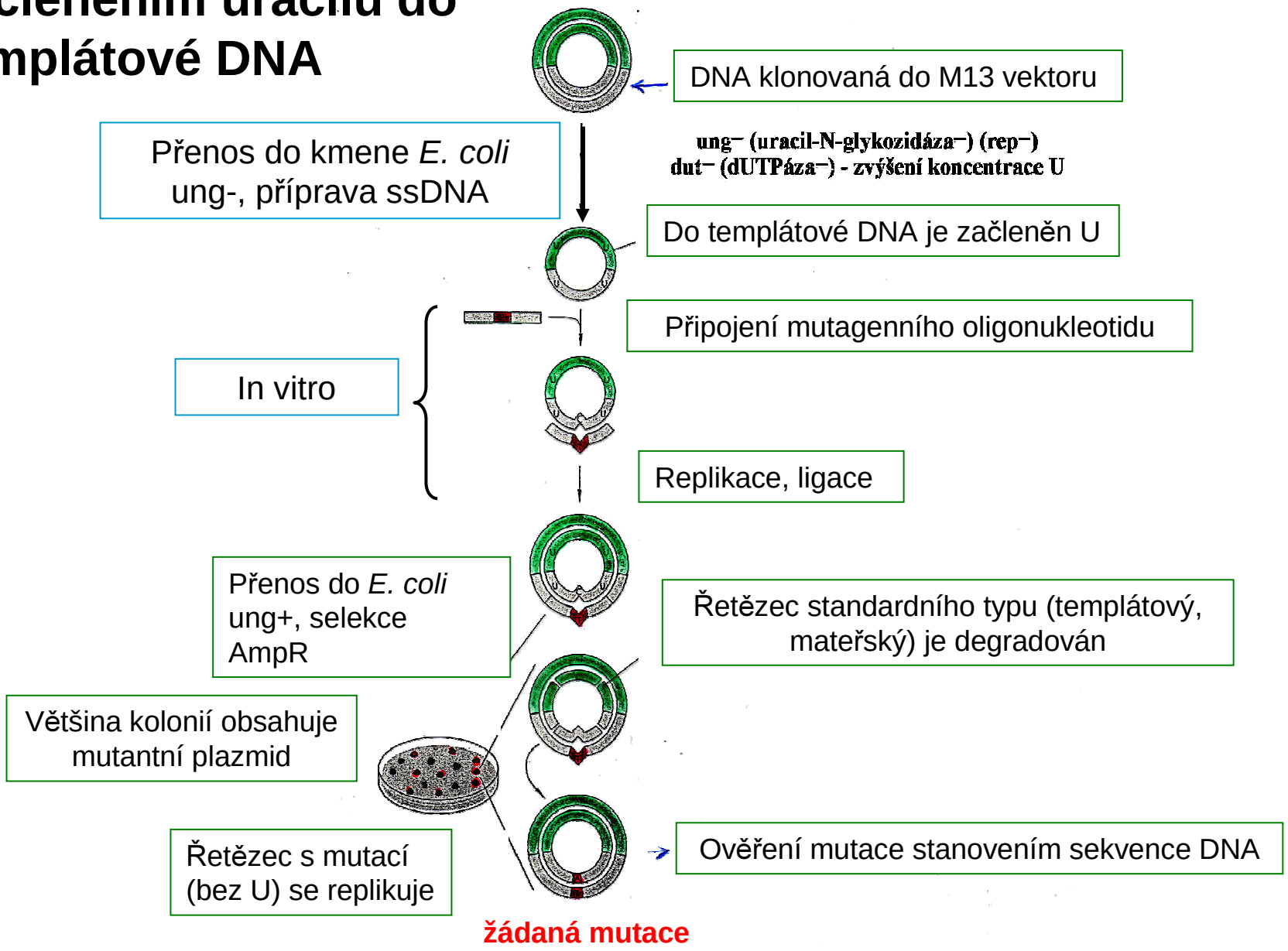
Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů



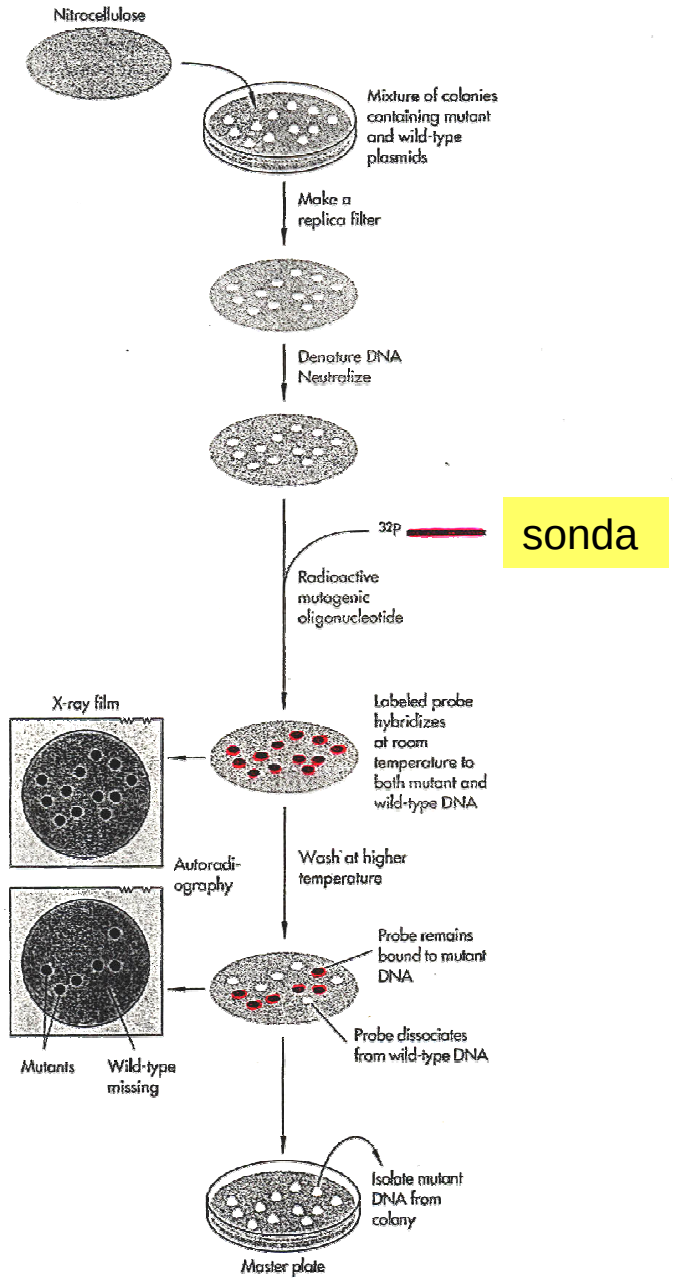


A - T → A - C → G - C

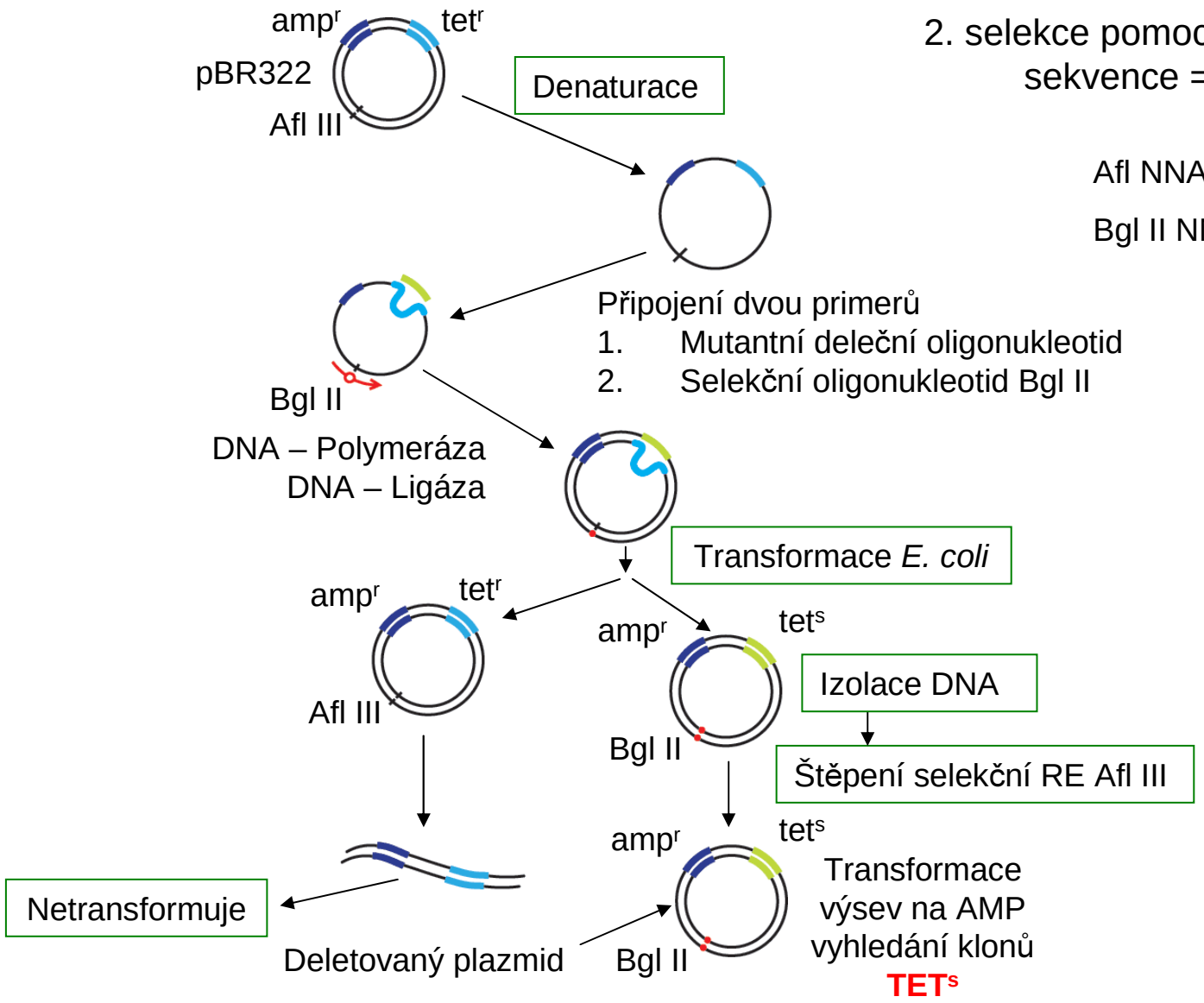
Zvýšení výnosu mutant začlenením uracilu do templátové DNA



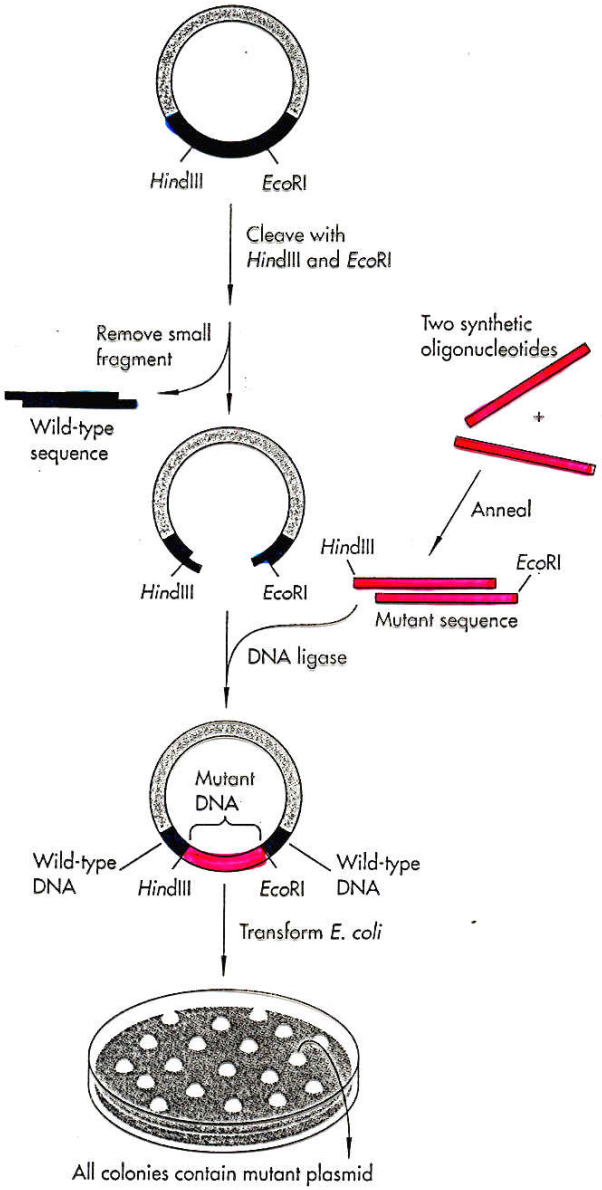
Vyhledání mutantních klonů pomocí sondy – tou je značený mutagenní oligonukleotid



Mutageneze pomocí mutantních oligonukleotidů

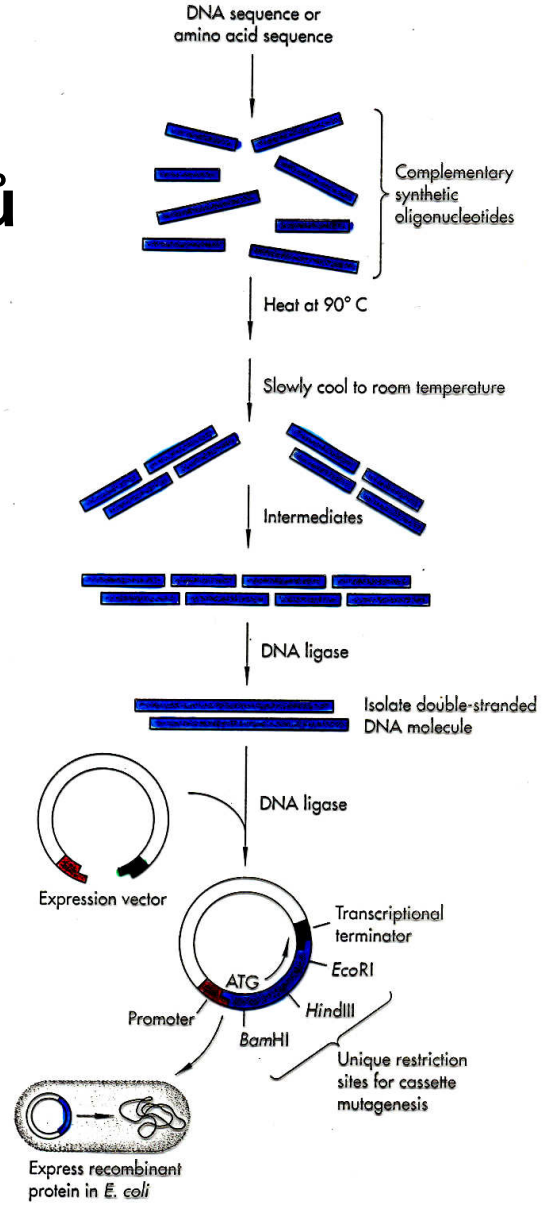


Kazetová mutageneze



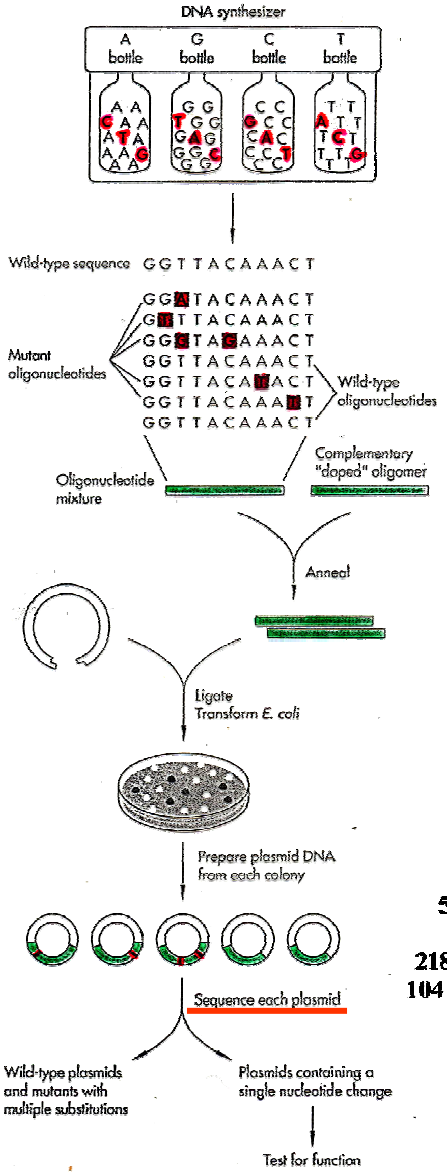
Syntéza genů

postupným spojováním kratších oligonukleotidů



Mutageneze pomocí kazet tvořených mutantními „doped“ oligonukleotidy

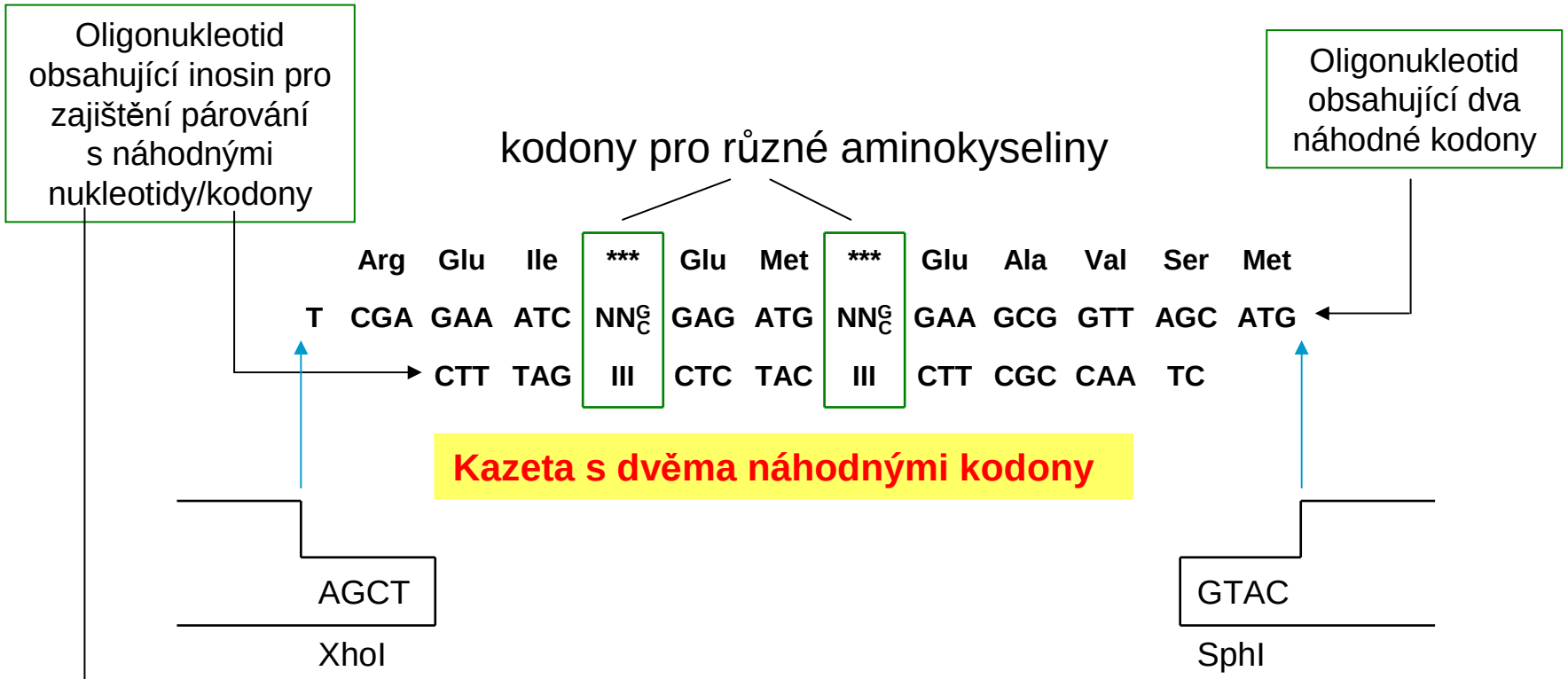
„kontaminované“ zásobní roztoky nukleotidů



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

Skríning např. fágovým displayem

Mutageneze pomocí „doped“ oligonukleotidů

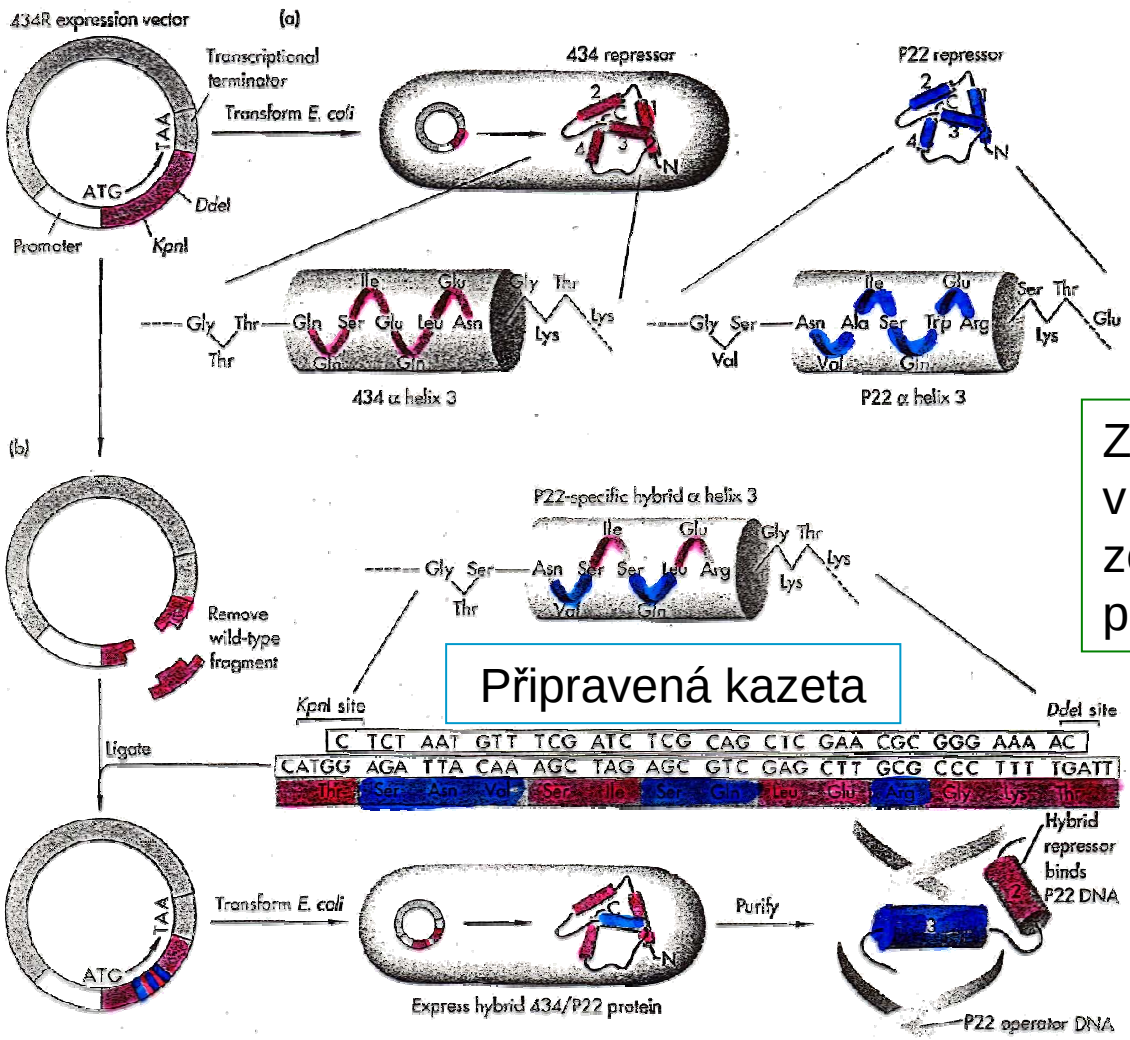


N = kterýkoliv ze 4 nukleotidů

NTG/C = hydrofóbní aminokyseliny
(fenylalanin, izoleucin, leucin, methionin a valin)

Alternativní způsob nasyntetizování druhého nukleotidu PCR

Záměna helixu v represorovém proteinu mutagenezou *in vitro* (příklad kazetové mutageneze)

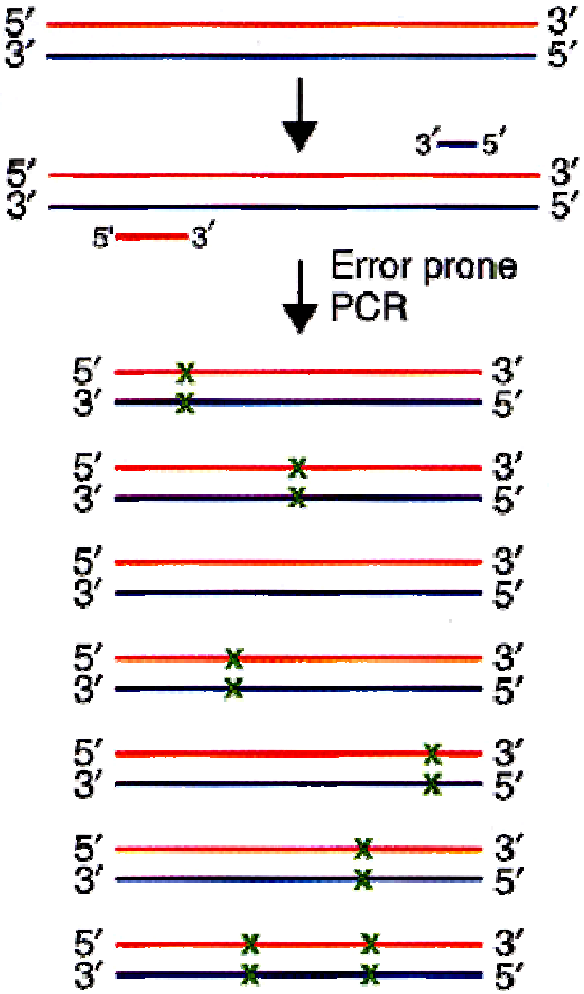


Záměna aminokyselin v doméně represoru zodpovědné za roz-poznání operátoru P22

Výhody PCR

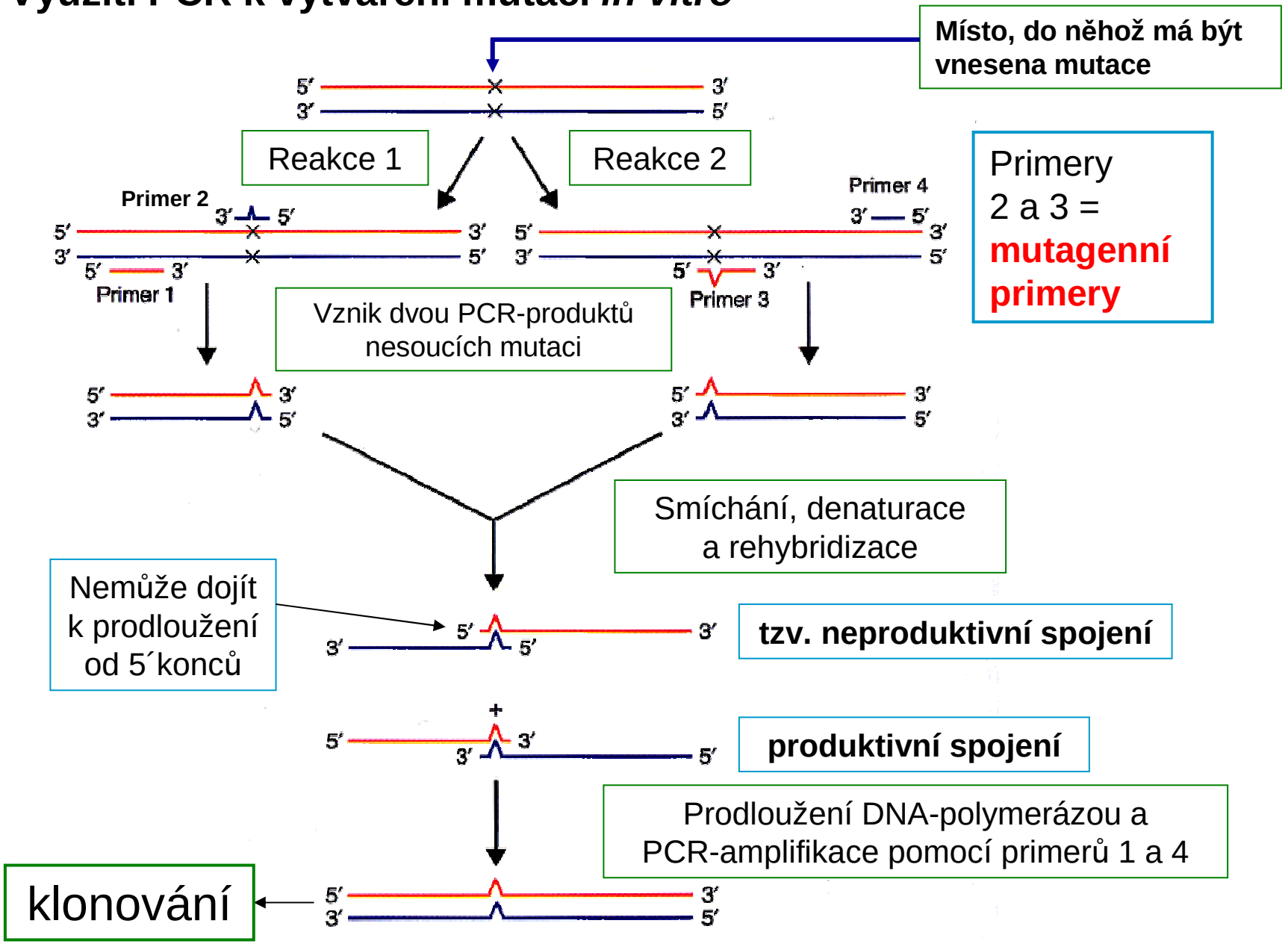
- jednoduché provedení
- možnost vytváření různého typu mutací
- není nutná následná selekce pro zvýšení proporce mutant
- nezávislost na RE místech
- není vždy nutné následné klonování mutovaného genu do vektoru (po PCR je možný přenos amplikonu do buněk transformací)

Vytváření náhodných mutací
= „error-prone“ PCR

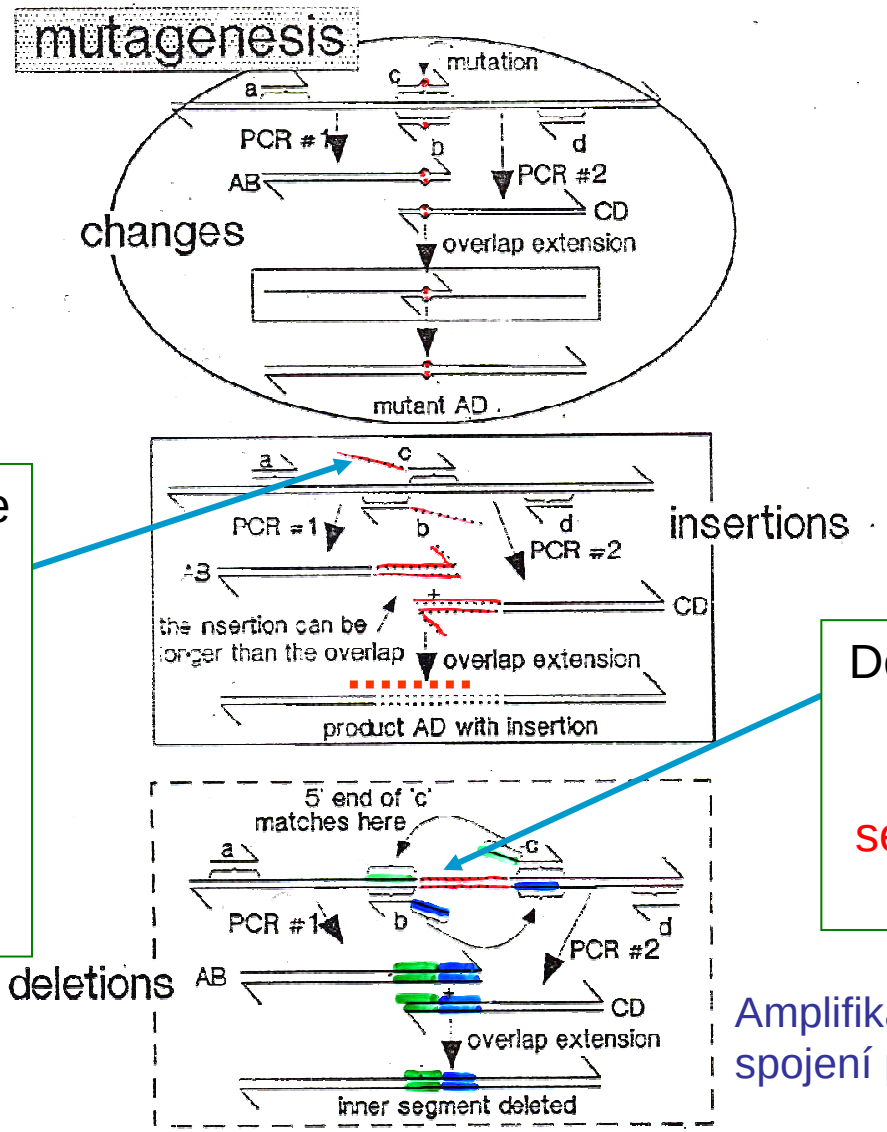


- využívají se DNA-polymerázy bez korektorské funkce (např. Taq-polymeráza)
- reakční podmínky PCR lze změnit tak, aby se počet chyb zvýšil a aby každý amplifikační produkt obsahoval jednu mutaci (např. zvýšení Mg++ nebo přidání Mn++, koncentrace reakčních složek atp)
- nevýhoda: převaha určitého typu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

Využití PCR k vytváření mutací *in vitro*



Vnášení mutací pomocí PCR



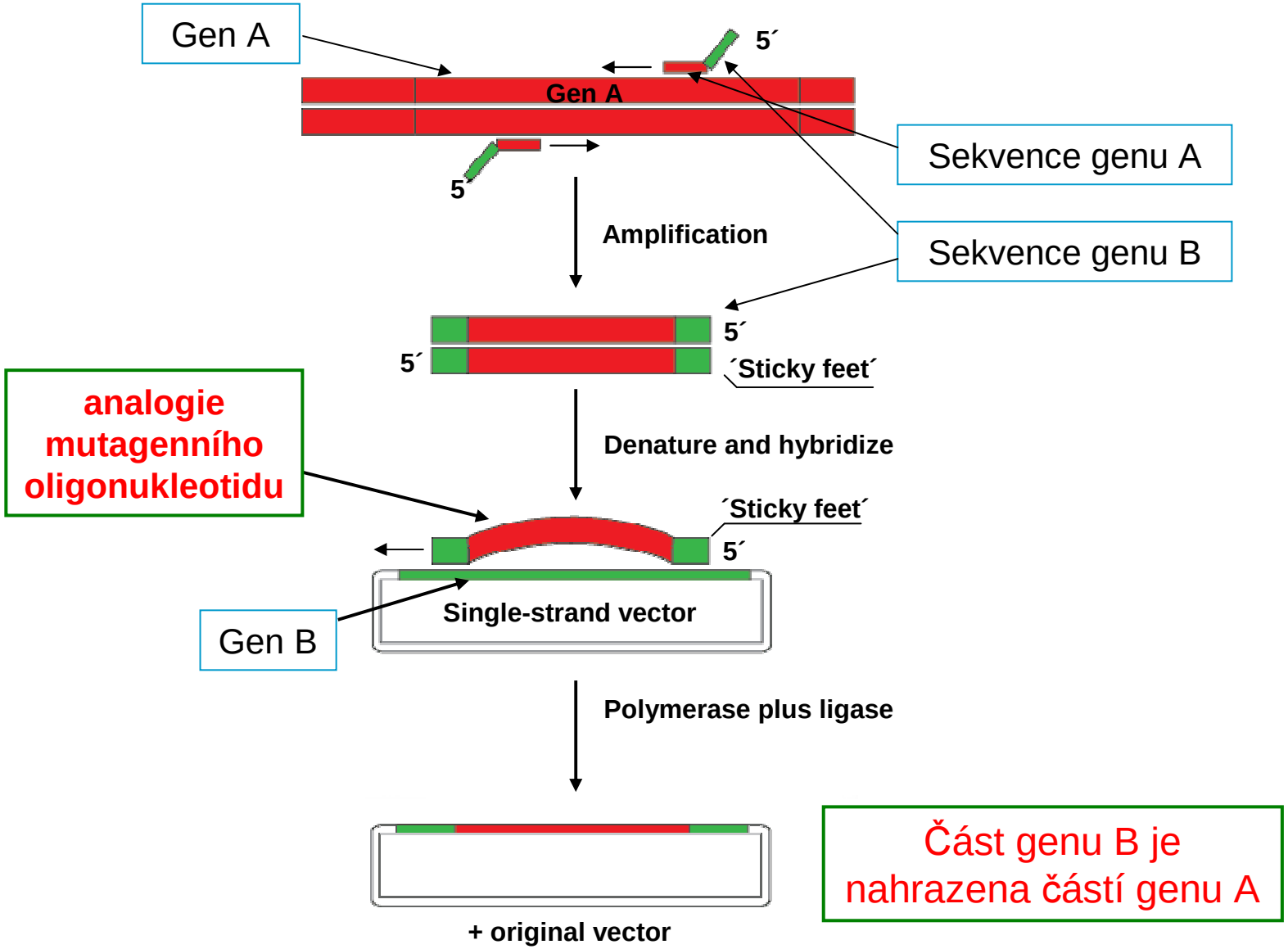
Vložená sekvence

(extenze primeru na jeho 5´konci) (extenze jsou vzájemně komplementární)

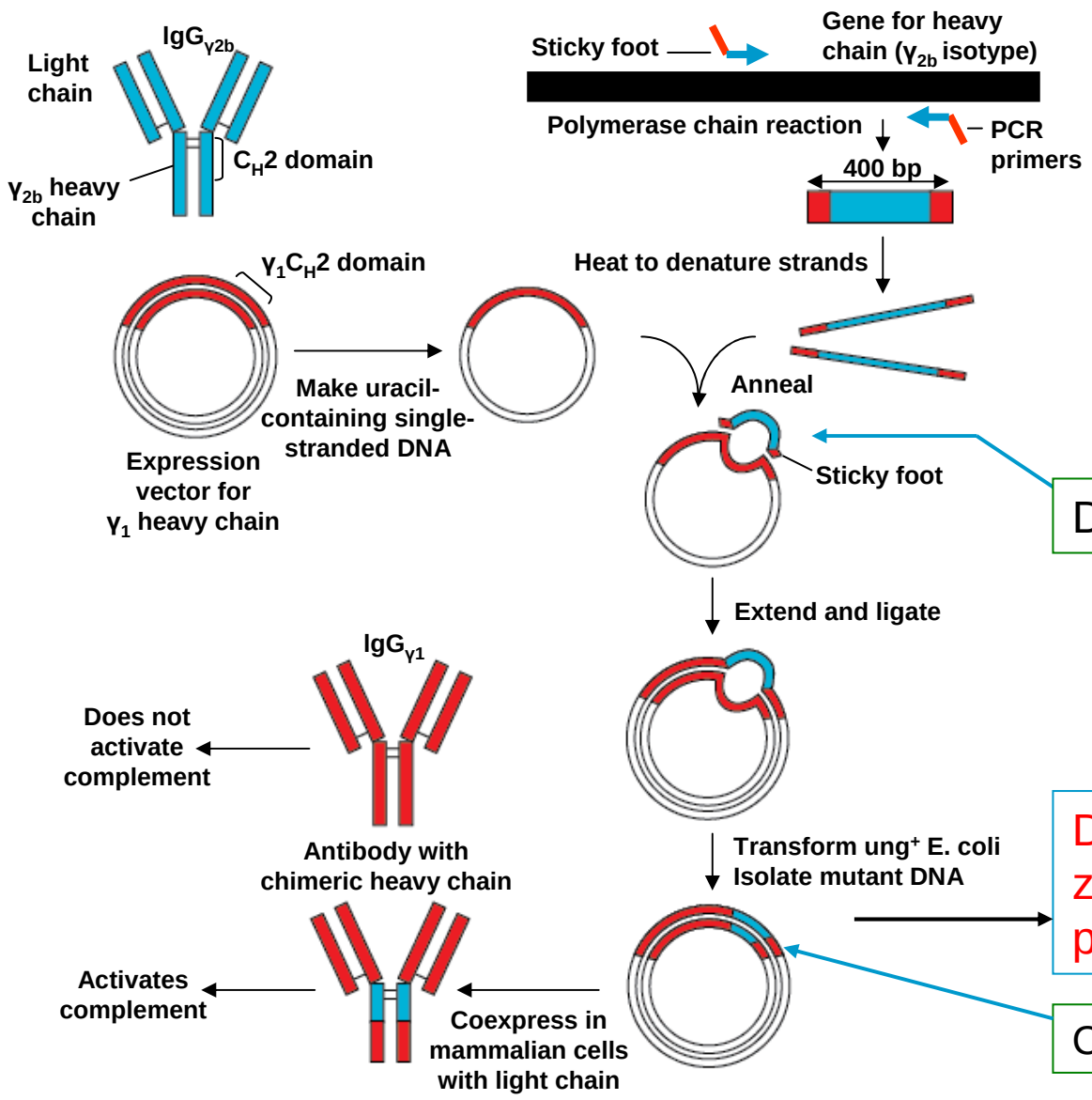
Deletovaná sekvence (extenze jsou komplementární k sekvenci vedle místa delece)

Amplifikace „produktivních“ spojení pomocí primerů **a** a **d**

Náhrada části genu sekvencí z příbuzného genu



Konstrukce genu pro chimerickou protilátku



Těžký řetězec typu γ2b zodpovídá za lyzu buněk závislou na komplementu
Protilátka s těžkým řetězcem γ1 tuto lyzu nenavozuje.
Která oblast γ2b za tuto vlastnost zodpovídá?

Doména C_H2 γ2b

Doména C_H2 odpovídá za aktivaci komplementu pro lyzu buněk

Chimerický těžký řetězec

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

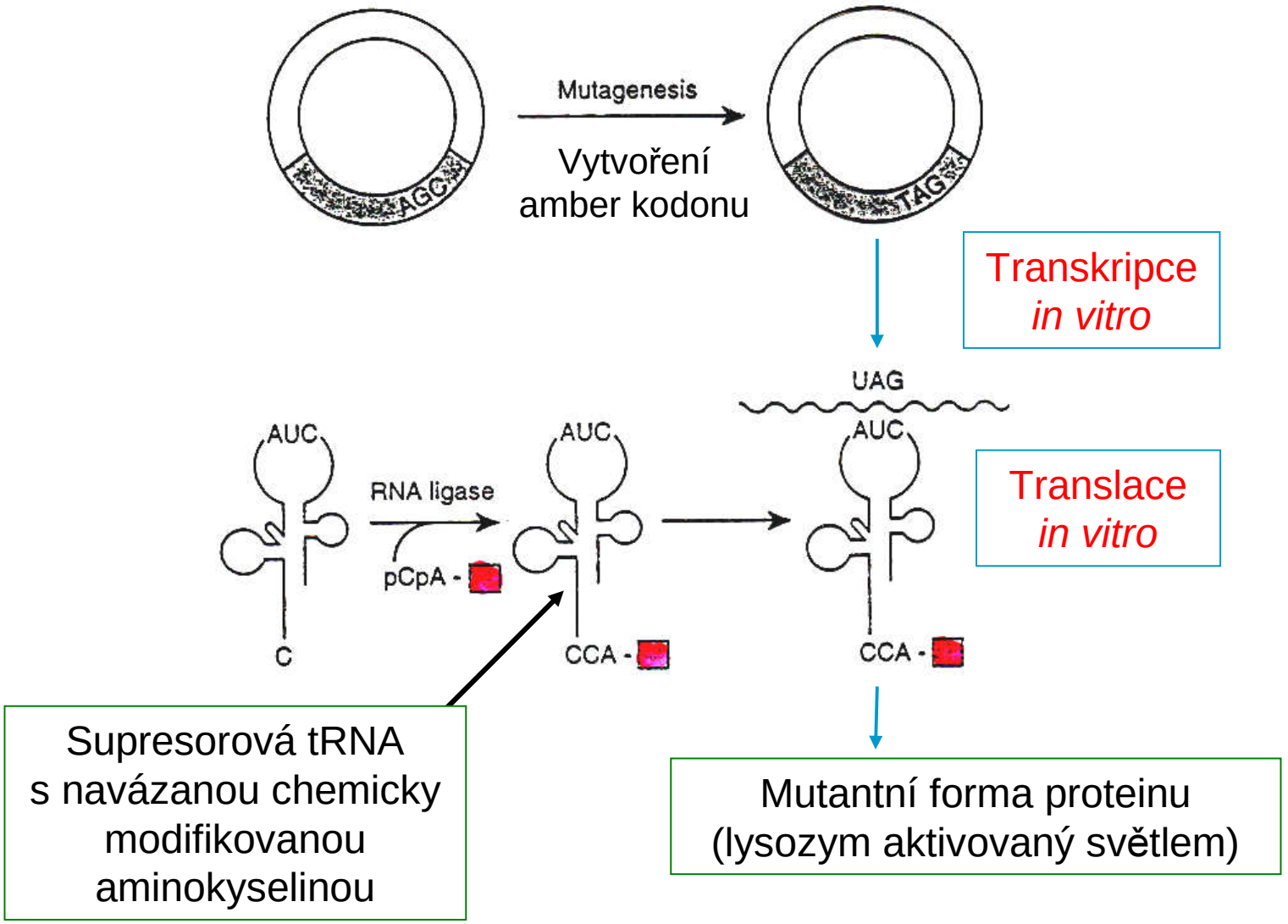
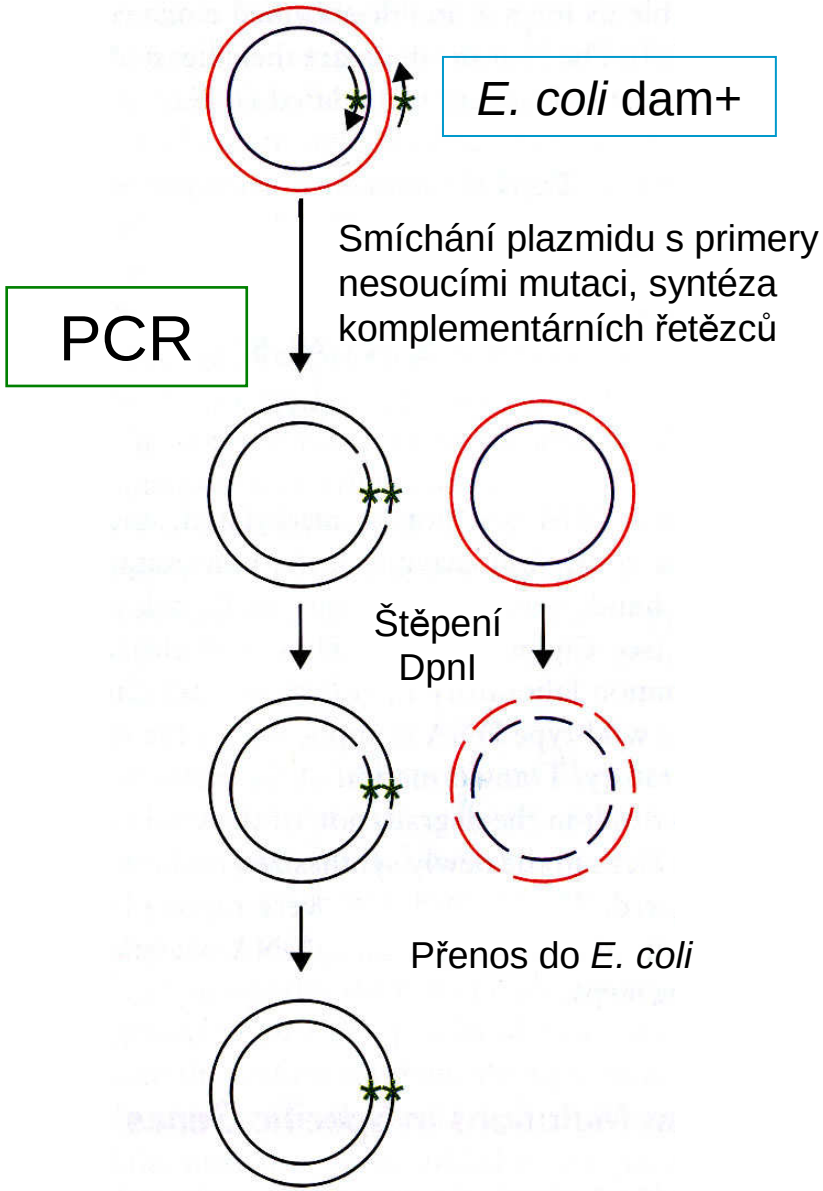


Table 4.4 Nonsense Suppressors Employed to Generate Altered Proteins

Suppressor	Codons recognized	Amino acid inserted	Efficiency (%)	References
A. přirozené				
Su1 (*supD*)	UAG	Serine	6–54	a, b
Su2 (*supE*)	UAG	Glutamine	0.8–20	a, b
Su2-89 (*supE*)	UAG	Glutamine	32–60	c, h
Su3 (*supF*)	UAG	Tyrosine	11–100	a, b
Su5 (*supG*)	UAA, UAG	Lysine	0.2–2 6–30*	a, b, h h
Su6 (*supP*)	UAG	Leucine	30–100	a, e
Su9	UGA	Tryptophan	0.1–30	a, f
B. Uměle připravené				
$tRNA^{Phe}_{CUA}$	UAG	Phenylalanine	48–100	g
$tRNA^{GluA}_{CUA}$	UAG	85% Glutamic acid 15% Glutamine	8–100	h, i
$tRNA^{Cys}_{CUA}$	UAG	Cysteine	17–51	g
$tRNA^{HisA}_{CUA}$	UAG	Histidine	16–100	h, i
$tRNA^{ProH}_{CUA}$	UAG	Proline	9–60	h, i
$tRNA^{Lys}_{CUA}$	UAG	Lysine	9–29	h, i
$tRNA^{Ala}_{CUA}$	UAG	Alanine	8–83	h, i
$tRNA^{Gly1}_{CUA}$	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

Vytváření mutací *in vitro* přímo na plazmidech (QuickChange)



- jako templát je využita dsDNA plazmidu
- 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 plazmidy 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 plazmidy obsahující mutaci se replikují