



## Princip mutageneze *in vitro*

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

**Typy mutací:** substituce, delece, inserce

### Cíle:

Výzkum:

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

Praxe:

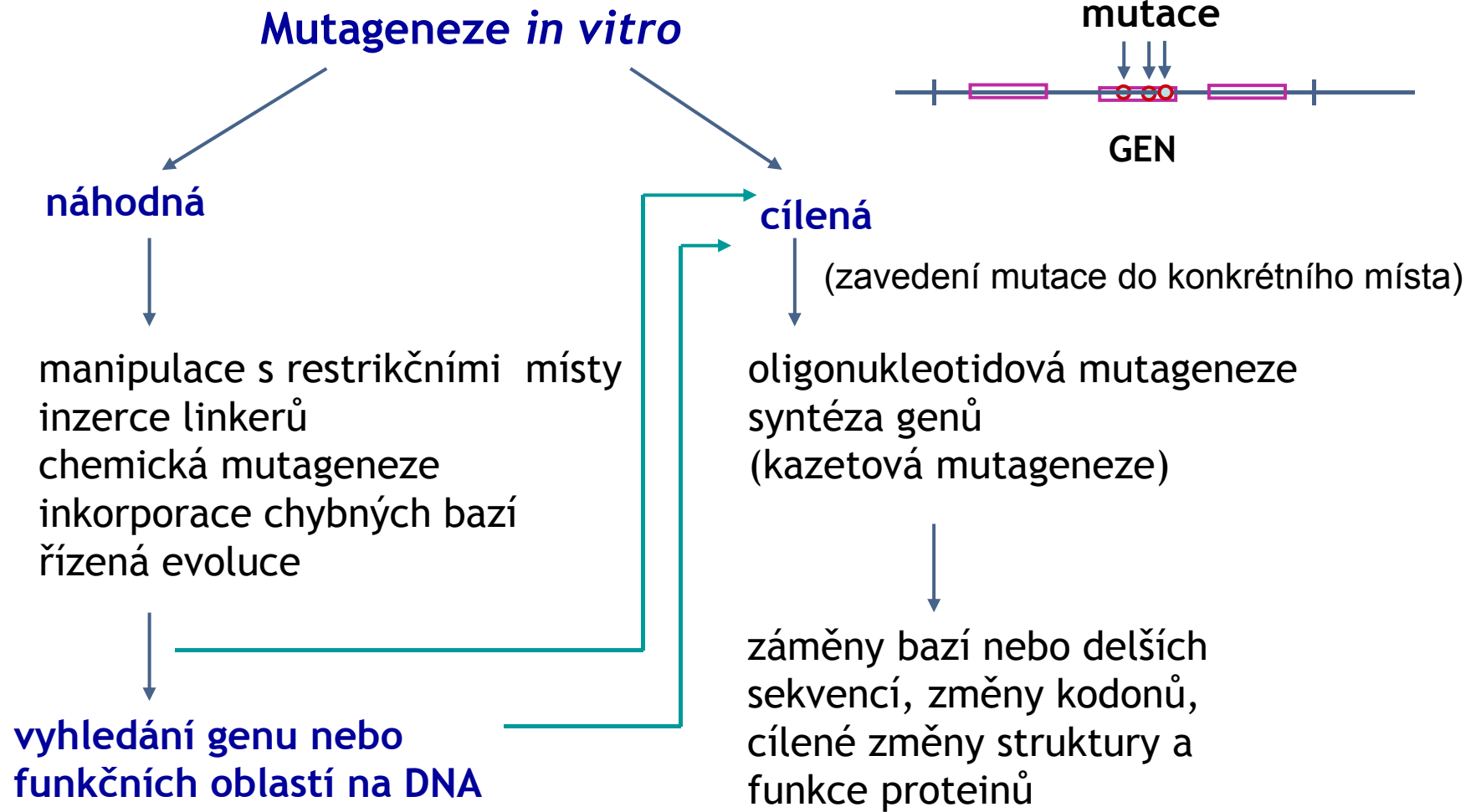
- Cílené změny aminokyselin v proteinech - příprava proteinů s novými (lepšími) vlastnostmi (**proteinové inženýrství**)
- Příprava geneticky modifikovaných a transgenních organismů

# **Nevýhody klasické mutagenese**

(chemické, fyzikální, biologické mutagenese)

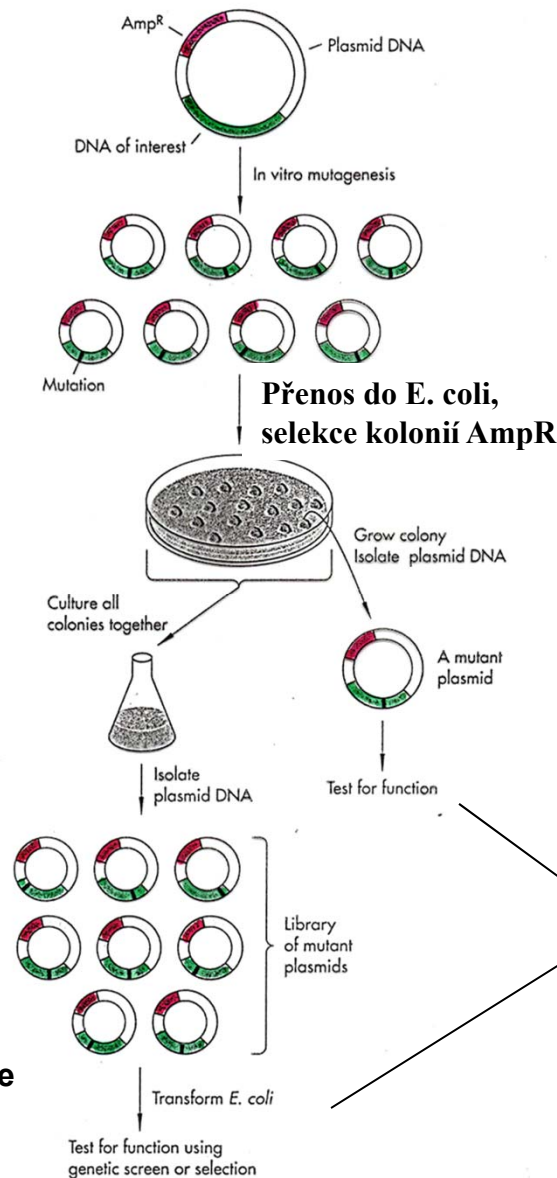
1. V organizmu může být zmutován kterýkoliv gen
  - **necílené působení mutagenu; mutaci nelze cílit na konkrétní sekvenci**
2. Frekvence mutací v žádaném genu může být nízká
  - **závislost na charakteru působení mutagenu a konkrétní sekvenci**
3. Žádaný fenotyp může být výsledkem mutací v různých genech
  - **řada znaků je výsledkem působení více genů**

# Mutagenese *in vitro* - přístupy



# Obecná strategie při mutagenезi *in vitro*

Alternativa ke klonování genů ve vektorech = PCR



Skríning nebo selekce a testování funkce

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

Stanovení sekvence pozměněného genu

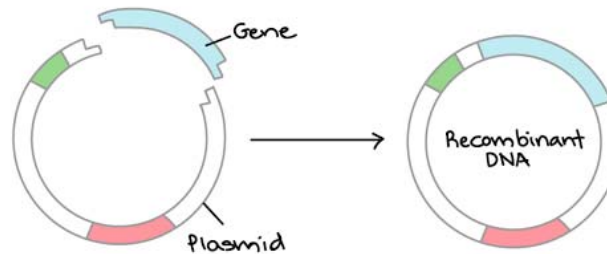
# Klonování genu

Neznám sekvenci genu - 3 základní přístupy

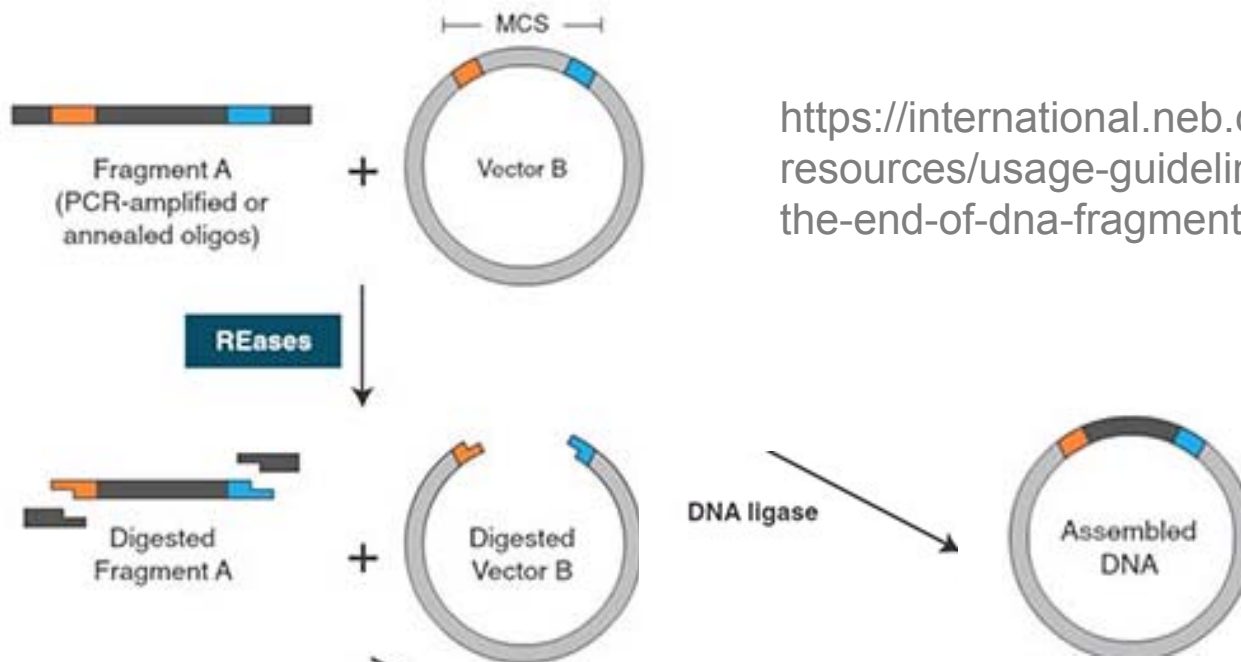
- **funkční klonování** - testuji funkci genu (př. prohledávání genové knihovny)
- **poziční klonování** - identifikace genu na základě znalosti jeho lokalizace  
(vazebné mapování, hybridizace se sondou - chromozom)  
-genová knihovna
- využití bioinformatiky pro **hledání homologií**

# Klonování genu

Znalost genomu - bioinformatika, PCR, DNA klonování



Restrikční endonukleázy - POZOR - většina vyžaduje přesah pro účinné štěpení

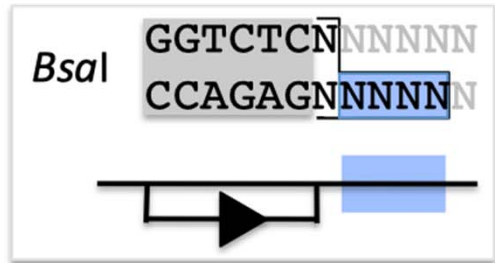


<https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments>

Enzyme <a href="#">Back to top</a>	Base Pairs from end			
	1 bp	2 bp	3 bp	4 bp
BamHI	+	++	+++	+++
BamHI-HF <sup>®</sup>	+	+	+++	+++
BbsI-HF <sup>®</sup>	+++	+++	+++	+++
BclI-HF	-	-	+++	+++
BglII	++	+++	+++	+++
BmtI	+++	+++	+++	+++
BmtI-HF <sup>®</sup>	+++	+++	+++	+++
BsaI	+++	+++	+++	+++
BsaI-HF <sup>®</sup> v2	+++	+++	+++	+++
BsiWI	++	+++	+++	+++
BsiWI-HF <sup>®</sup>	+++	+++	+++	+++
BsmBI	+++	+++	+++	+++
BsrGI	+++	+++	+++	+++
BssHII	+	+++	+++	+++
BsZ17I-HF <sup>®</sup>	+	+++	+++	+++



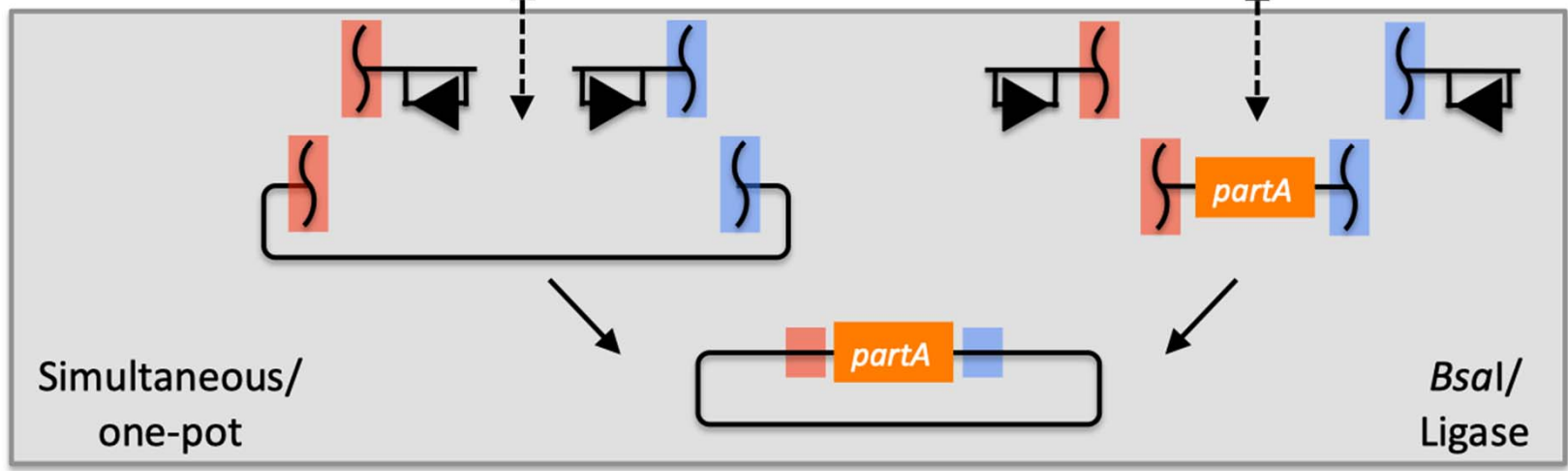




PCR-linearized destination vector

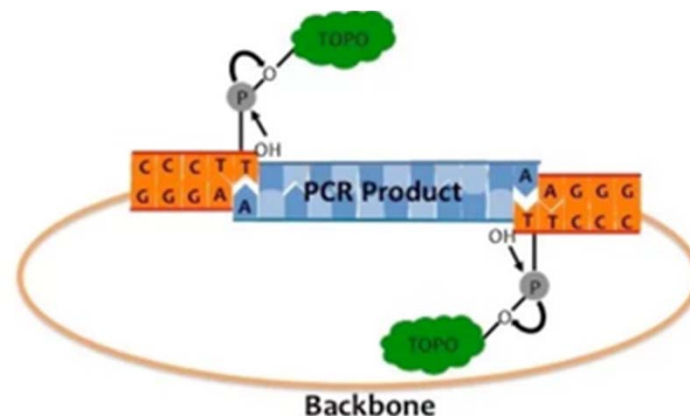


PCR product

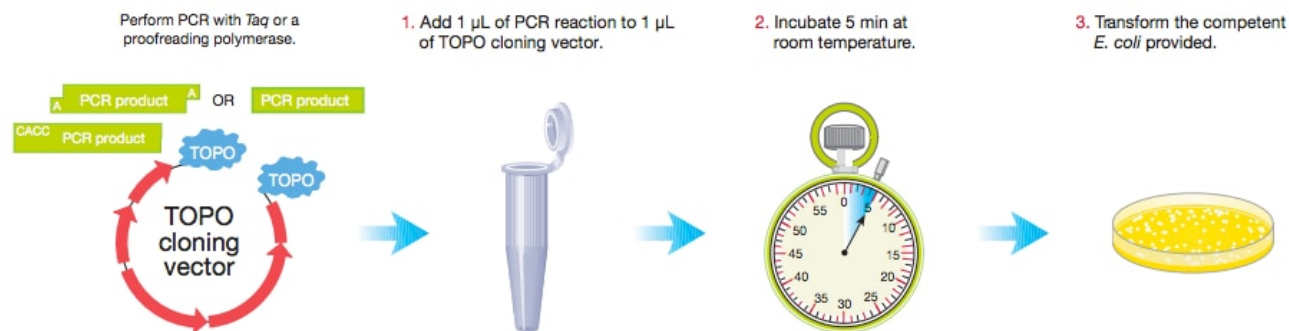


# TOPO klonování

- Topoizomeráza I izolovaná z *Vaccinia* viru
- Štěpí dsDNA v sekvenci 5' - (C/T)CCTT-3'
- Kovalentní vazba na 3' konec
- Spojení s komplementárním 5' koncem
- Nevyžaduje žádné úpravy PCR produktu (*Taq* polymeráza zanechává na 3' konci jeden A)
- Vektory s kovalentně navázanou Topo I lze zakoupit
- Stačí přidat PCR produkt
- „ligace“ 5 minut

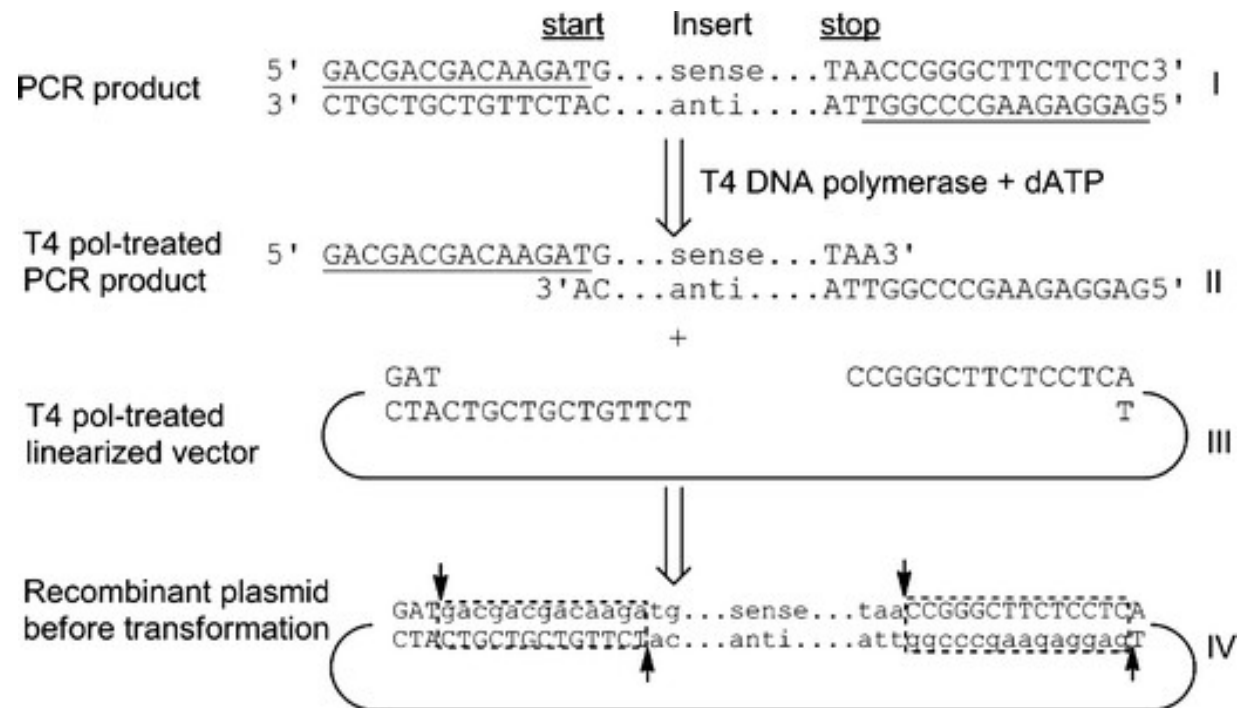


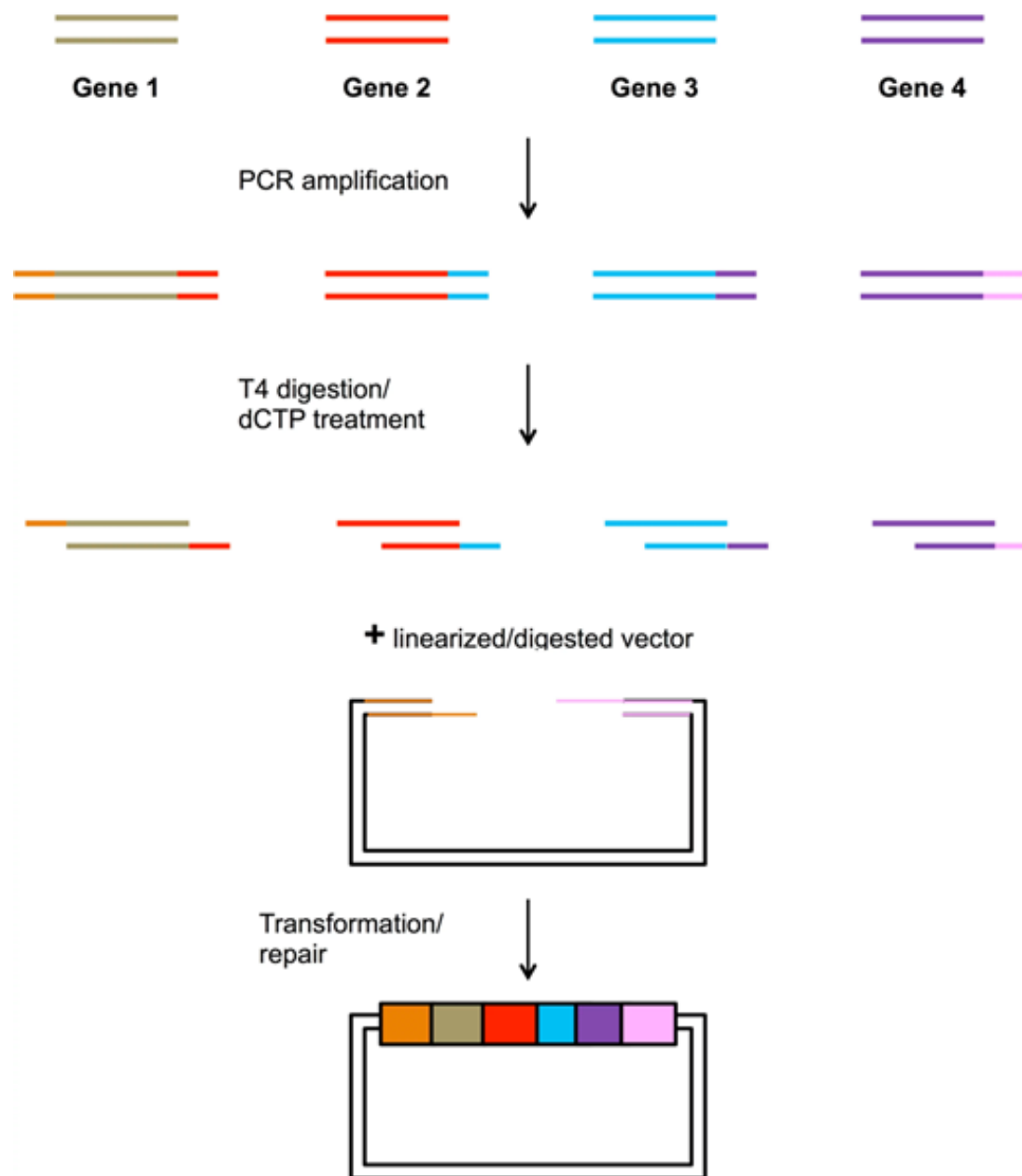
- Různé modifikace systému (i tupé konce)



# Sequence and ligation independent cloning (SLIC)

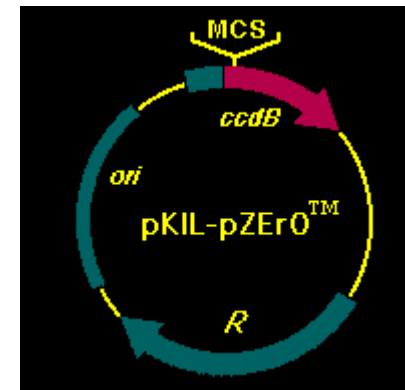
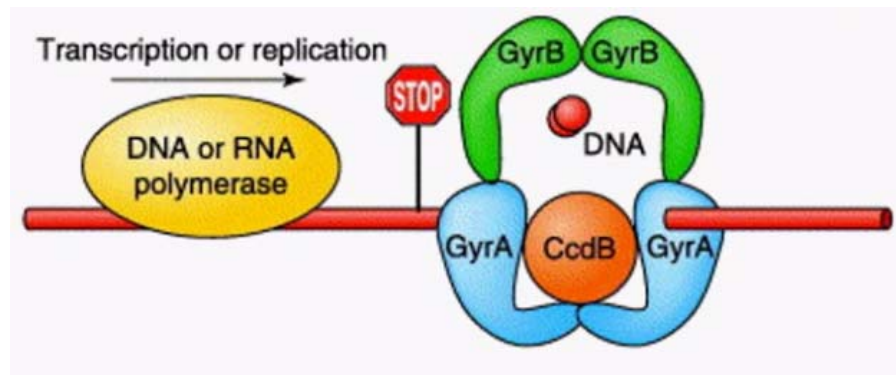
- Využívá exonukleázovou aktivitu T4 DNA polymerázy k tvorbě 10-12 bp přesahujících konců
- V reakci pouze jeden typ dNTP - na něm se exonukleázová/polymerázová funkce T4 DNA polymerázy zastaví
- Speciální vektory
- Po transformaci v baktériích se tyto jednořetězcové zlomy spojí
- i spojení více inzertů
- E.coli schopná opravit i nedokonalé spojení je-li překryv dostatečně dlouhý (20-60 bp)





# Gen *ccdB*

- Kóduje inhibitor DNA gyrázy - její inhibice vede ke smrti bakterií *E. coli*

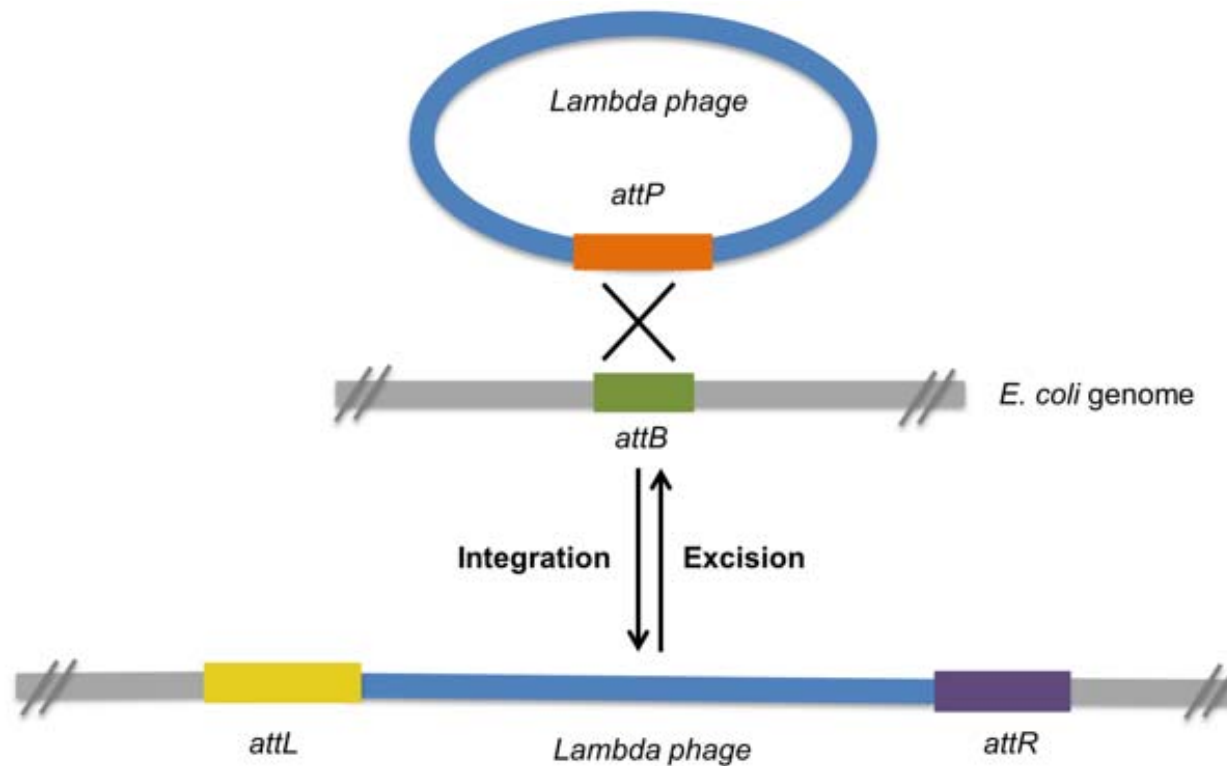


- využití pro selekci pozitivních klonů

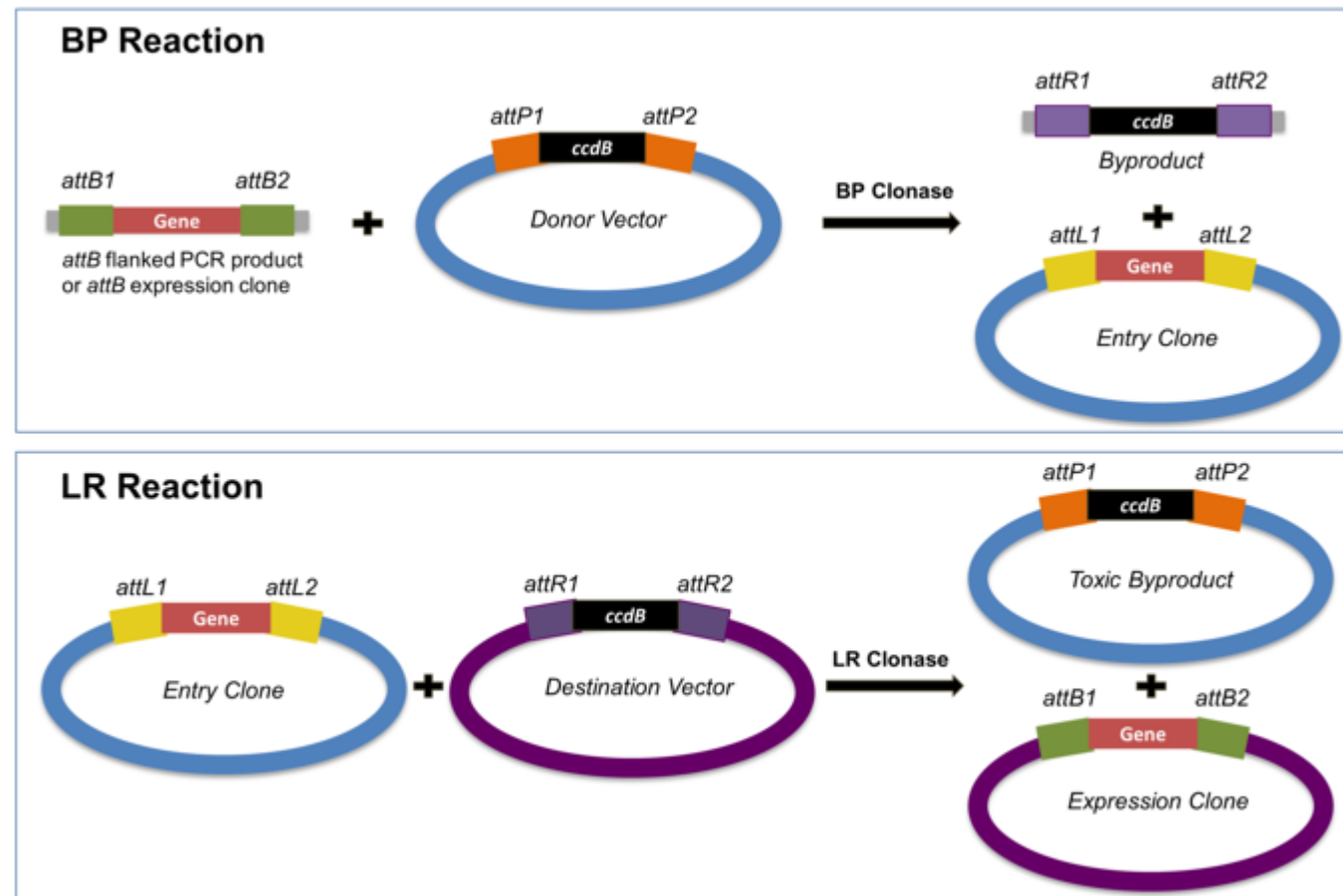
- *ccdA* - antitoxin *ccdB* - transkripční represor *ccdB*  
- vazba na CCDB protein - inhibice funkce CCDB
- CCDB - rezistentní kmeny *E. coli* (mutace v DNA gyráze)

# Gateway klonování

- Integrace/excize DNA fága lambda do/z bakteriálního genomu
- Rekombinace



- 2 reakce
- 2 rekombinázy



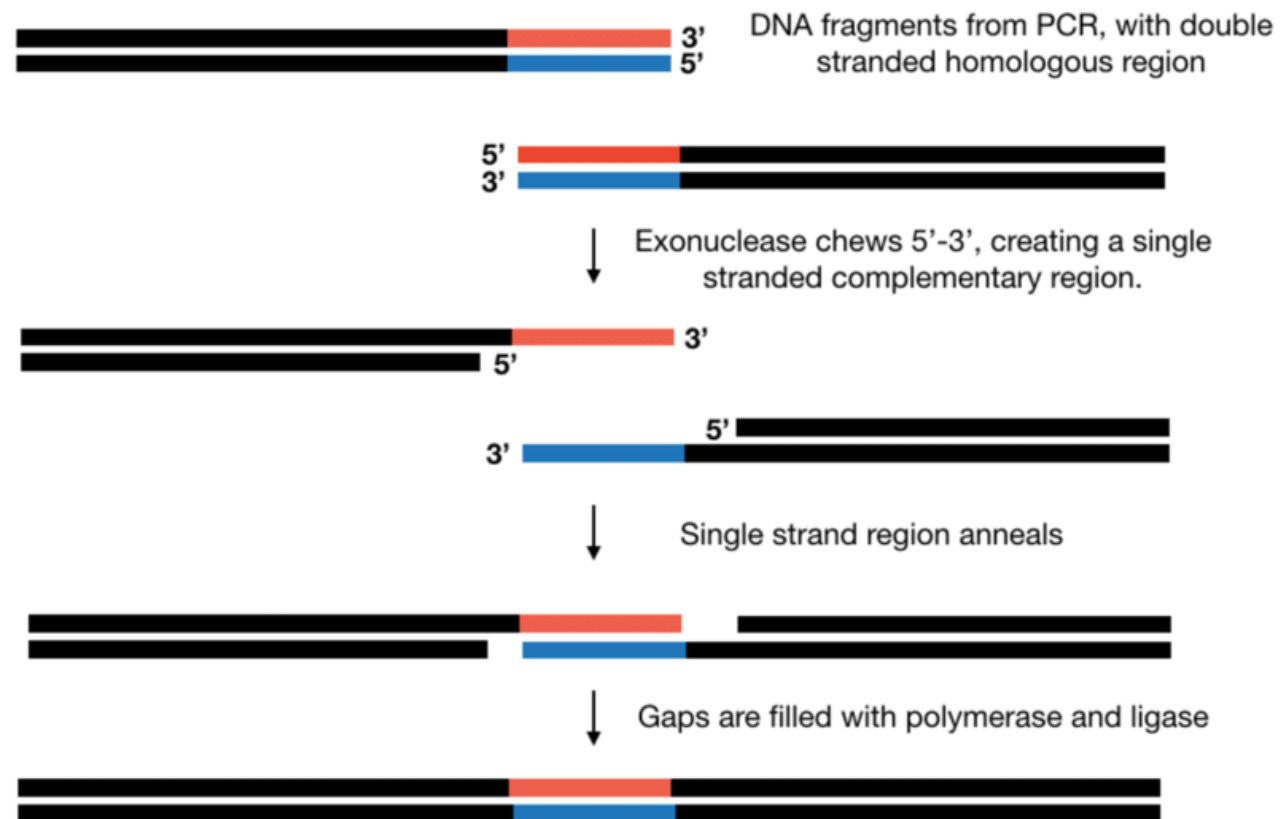
- Různé antibiotické rezistence na Entry a Destination vektorech
- Transformace do CCDB-senzitivních kmenů
- Výhoda - rychlost, variabilita vektorů, vysoká účinnost klonování



# Gibson assembly

- Exonukleáza 5' - 3' (neinhibuje činnost polymerázy)
- Polymeráza
- DNA ligáza

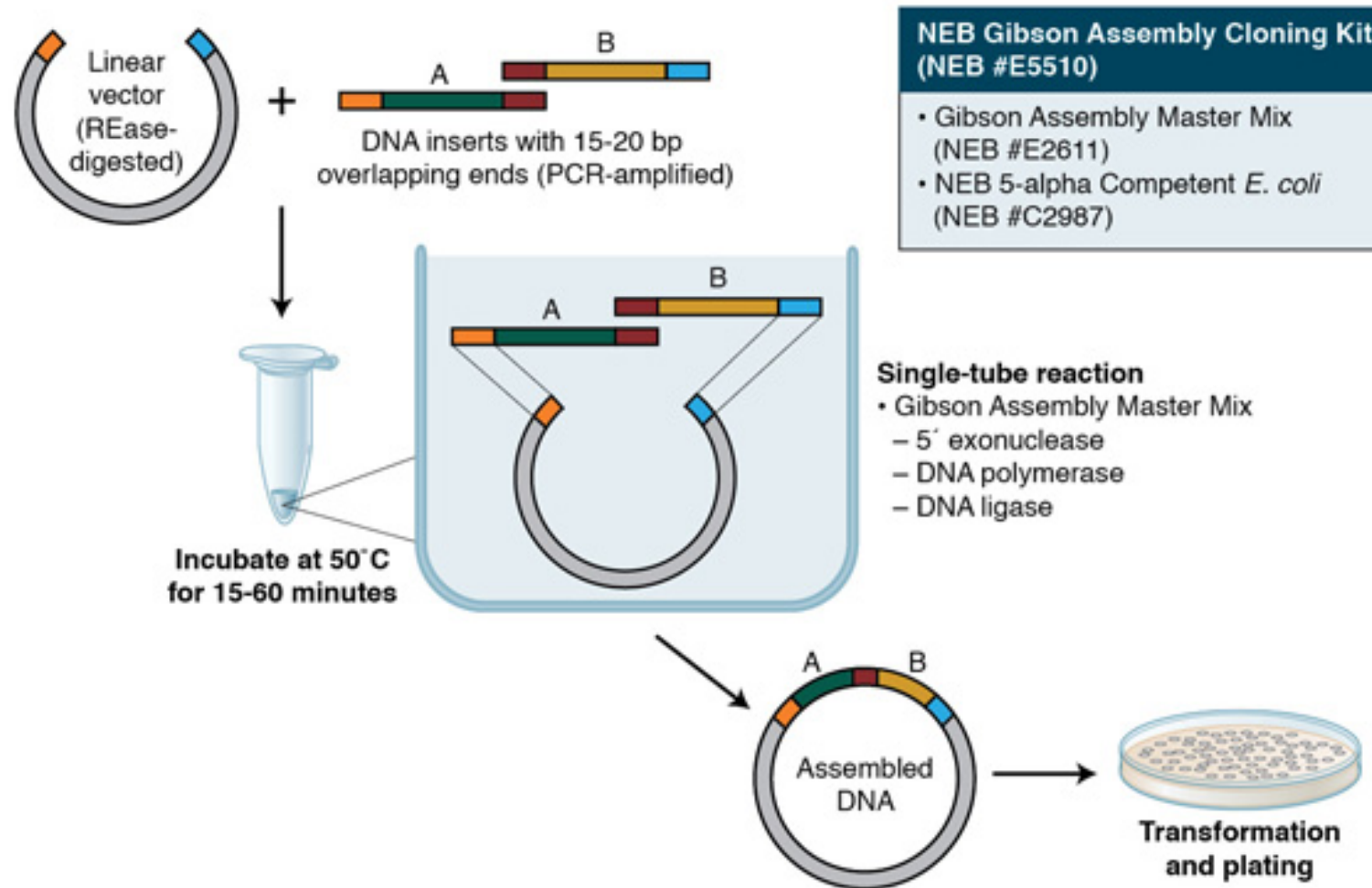
v jedné reakci při jedné teplotě, scarless



Přesahy 15-40 bp

i více fragmentů  
dohromady

- např. přiklonování dlouhého tagu, fúzní geny ...



# Gibson assembly

- Obdobné způsoby klonování

In fusion cloning (TaKaRa)

Cold Fusion Cloning (System Biosciences)

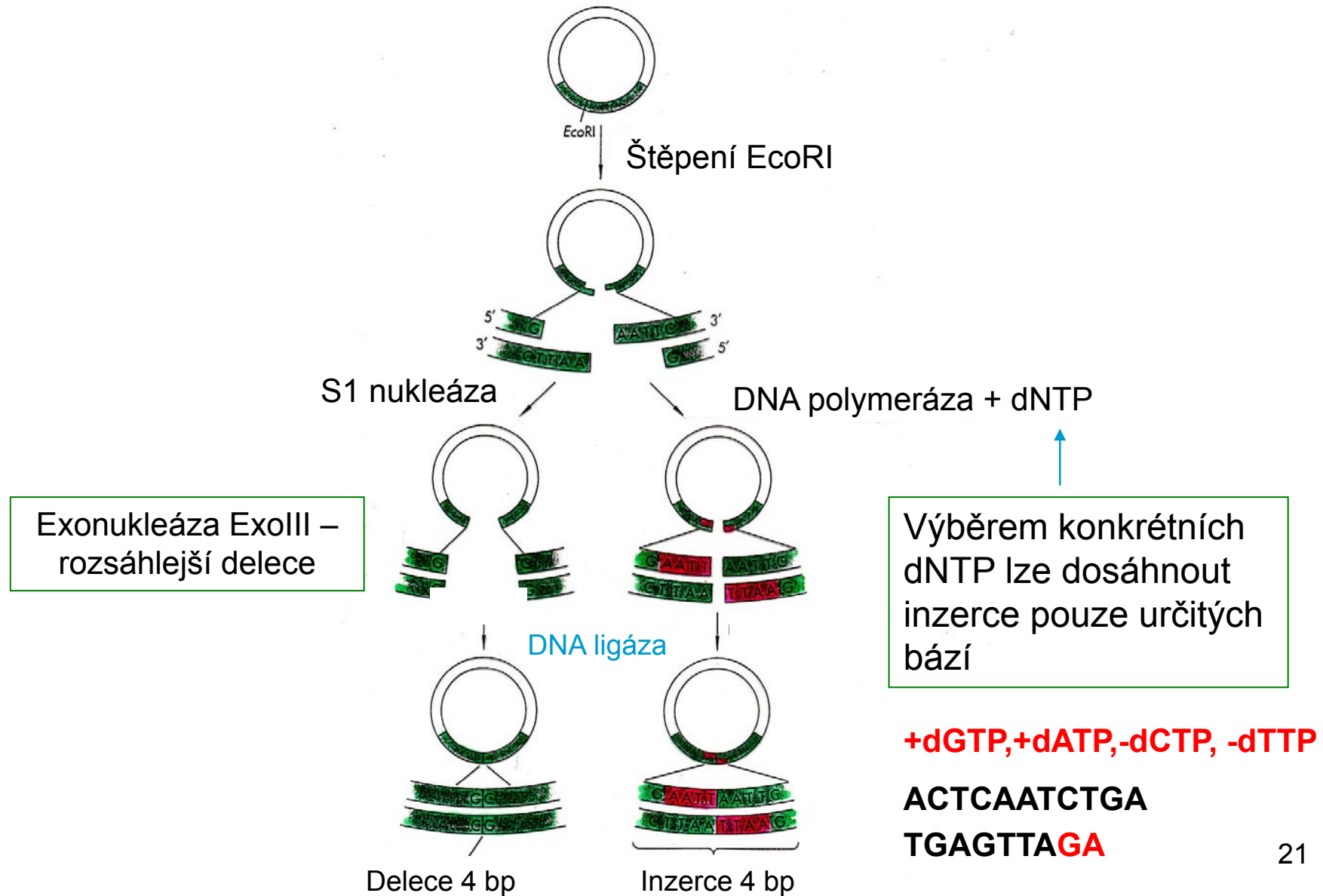
NEB HIFI DNA Assembly (NEB)

...

# 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**

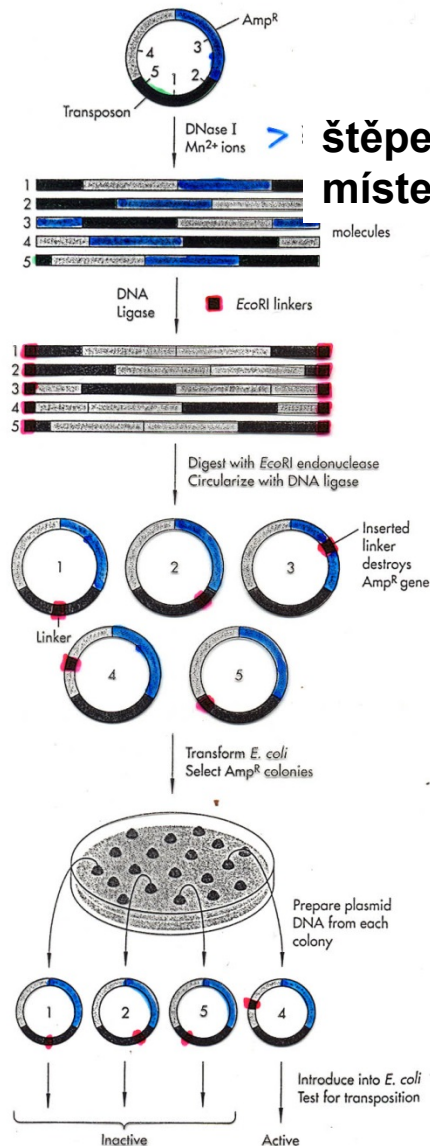
# Vytváření mutací v restričním místě



# Inzerční mutagenese pomocí linkerů k vyhledání funkčních oblastí transpozonu

Soubor náhodně linearizovaných molekul

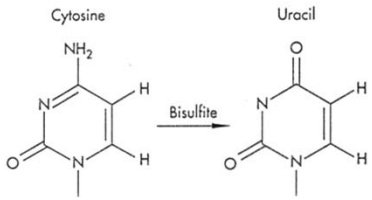
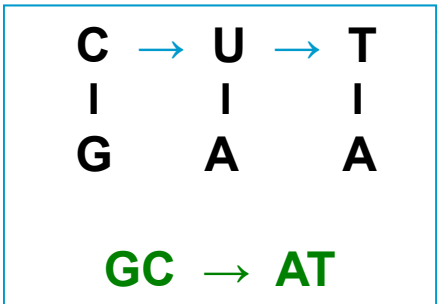
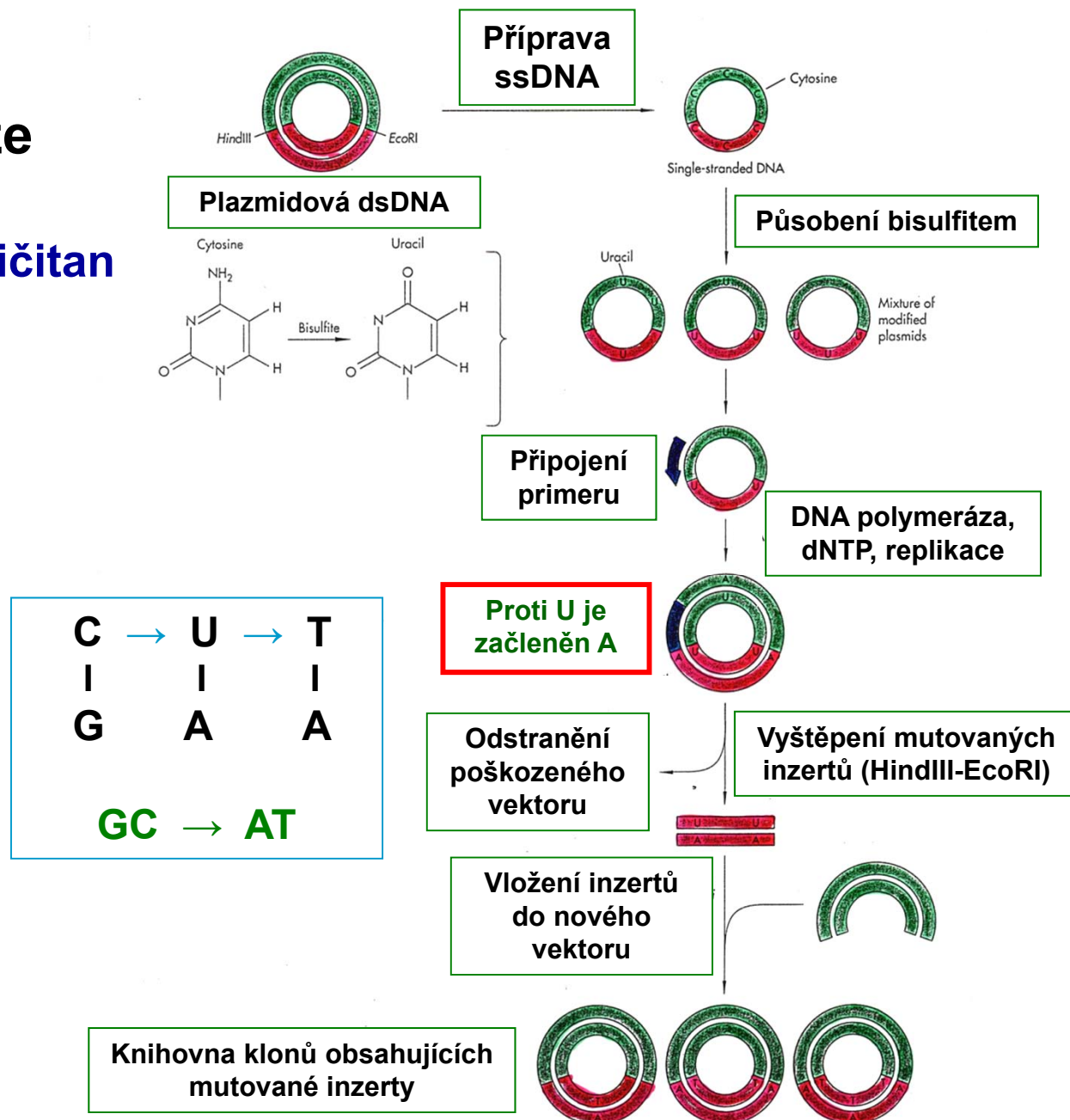
Vložený linker inaktivuje různé geny



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

Selekce klonů se ztrátou transpoziční aktivity, např. vyhledání genu pro transponázu (nebo oblasti transpozonu, která je pro transpozici nezbytná)

# Chemická mutagenese bisulfitem (hydrogensířičitan sodný)



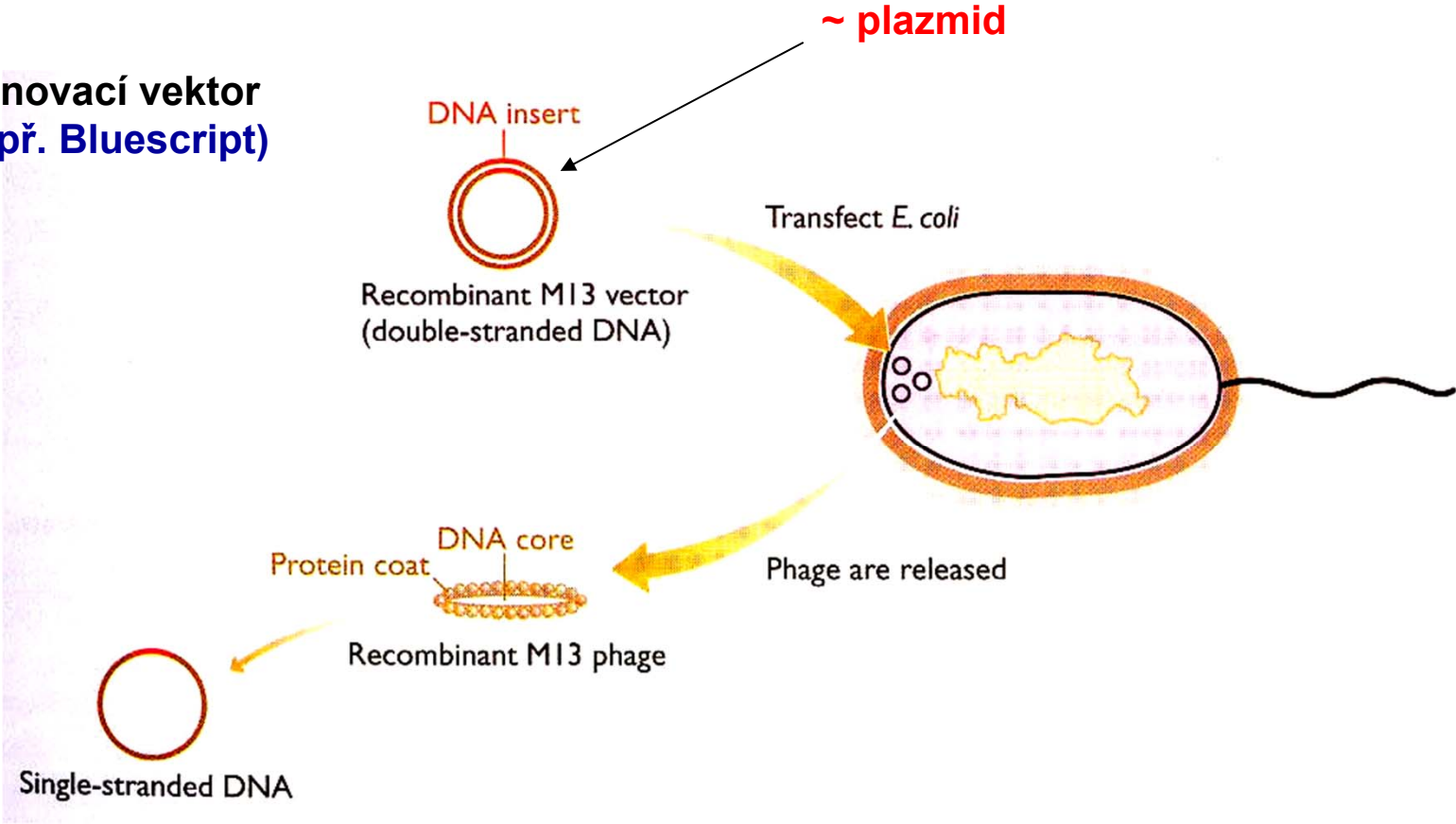
# Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů

1. Klonování sekvence (genu) do vhodného vektoru (M13, fágemid, fasmid), izolace jednořetězcové formy rekombinantní DNA
2. Příprava syntetického (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 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

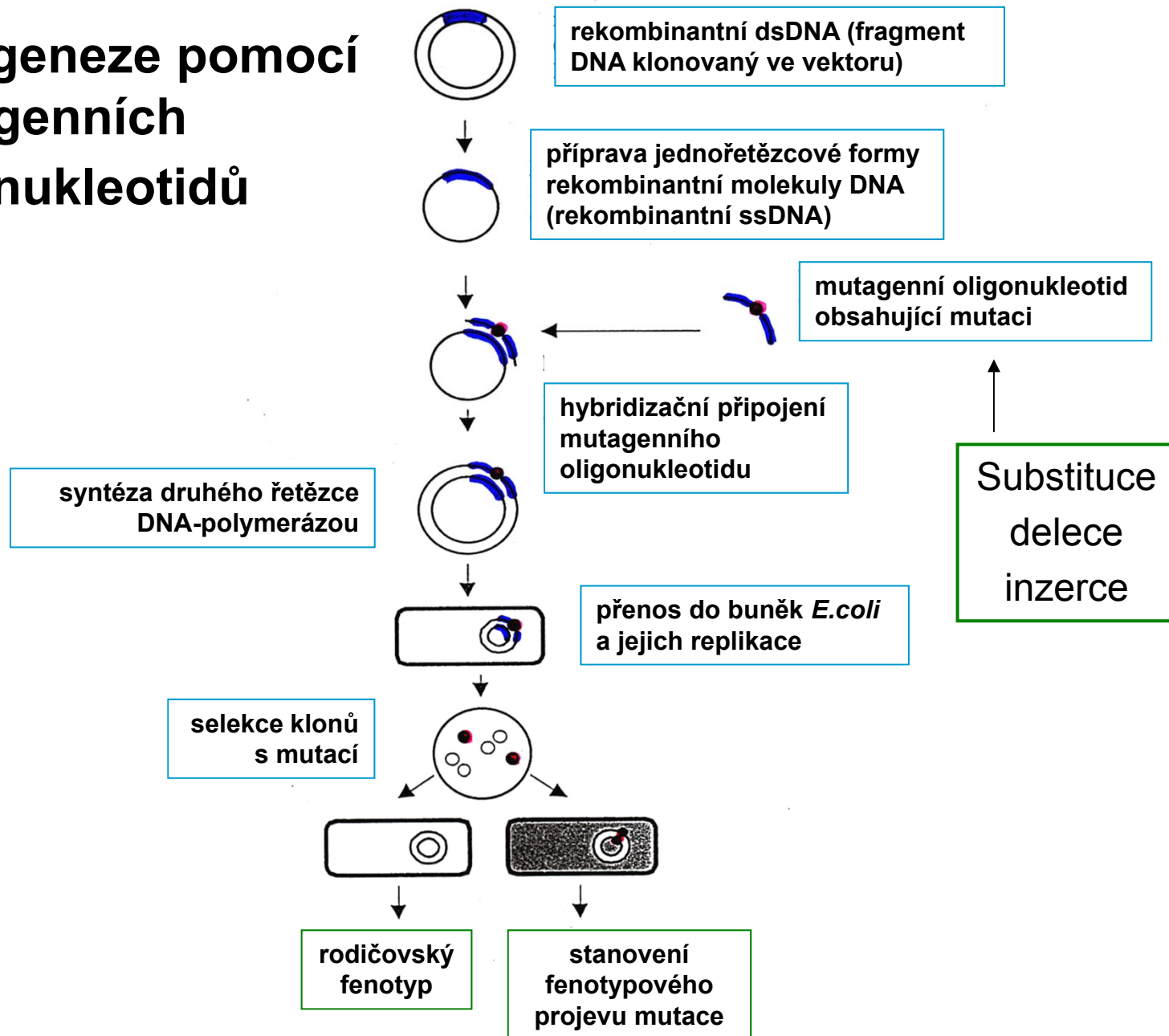


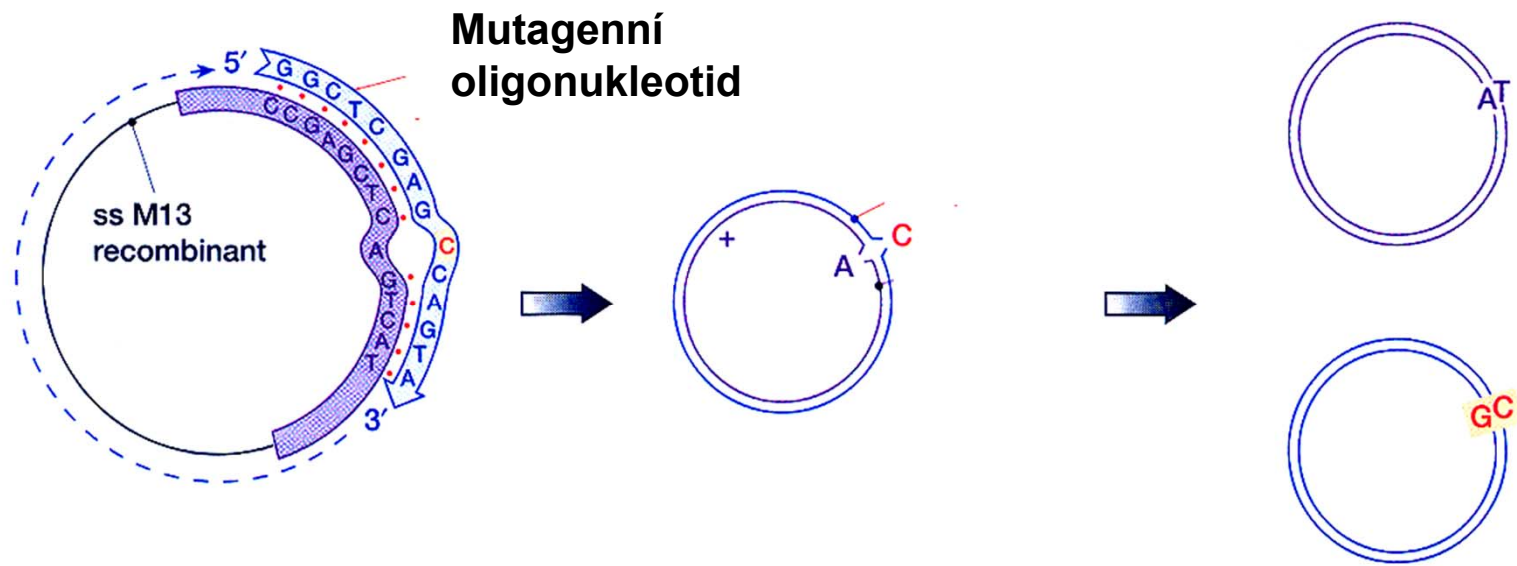
# Klonování genů ve fágemidech

Klonovací vektor  
(např. Bluescript)



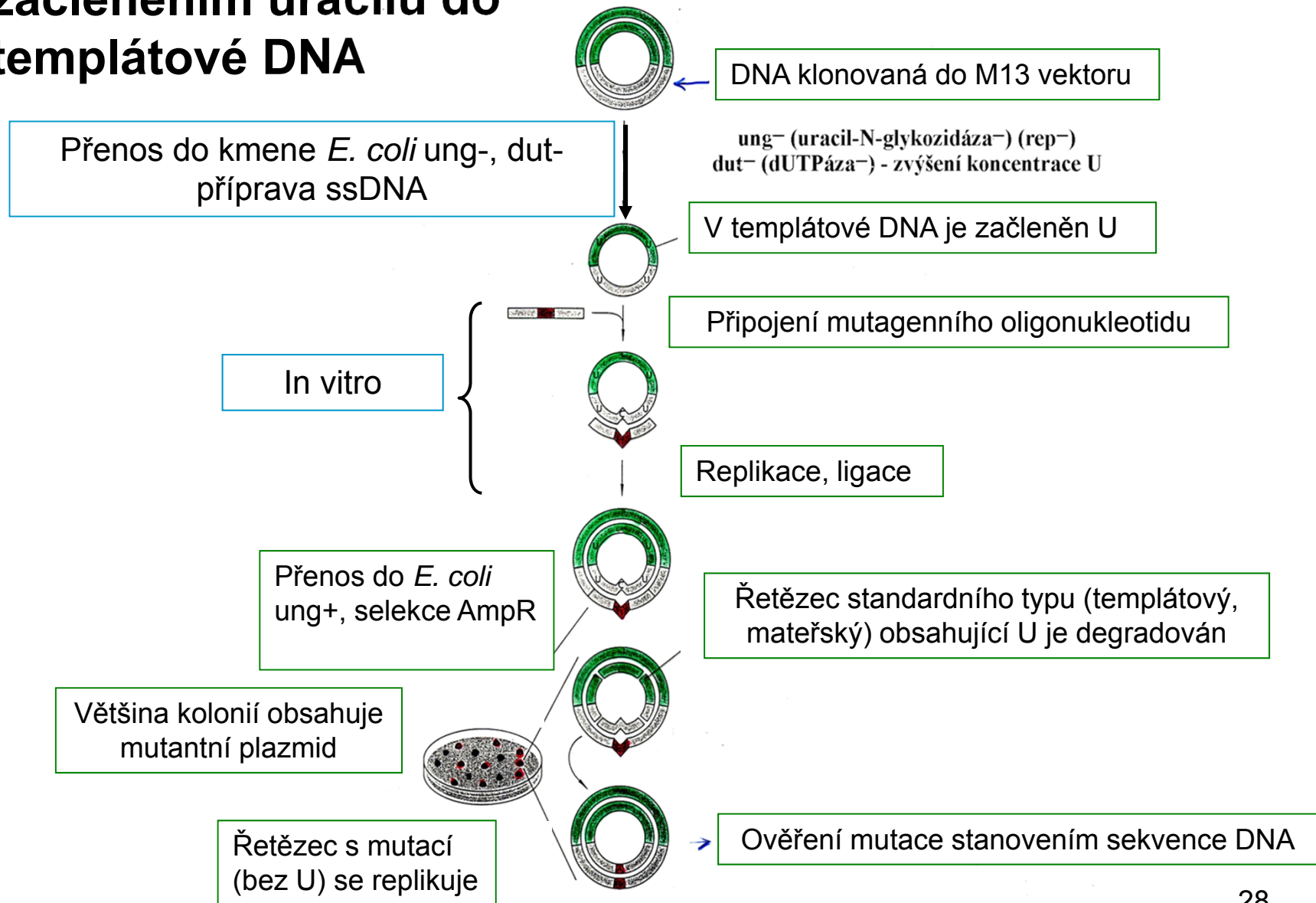
# Mutagenese pomocí mutagenních oligonukleotidů





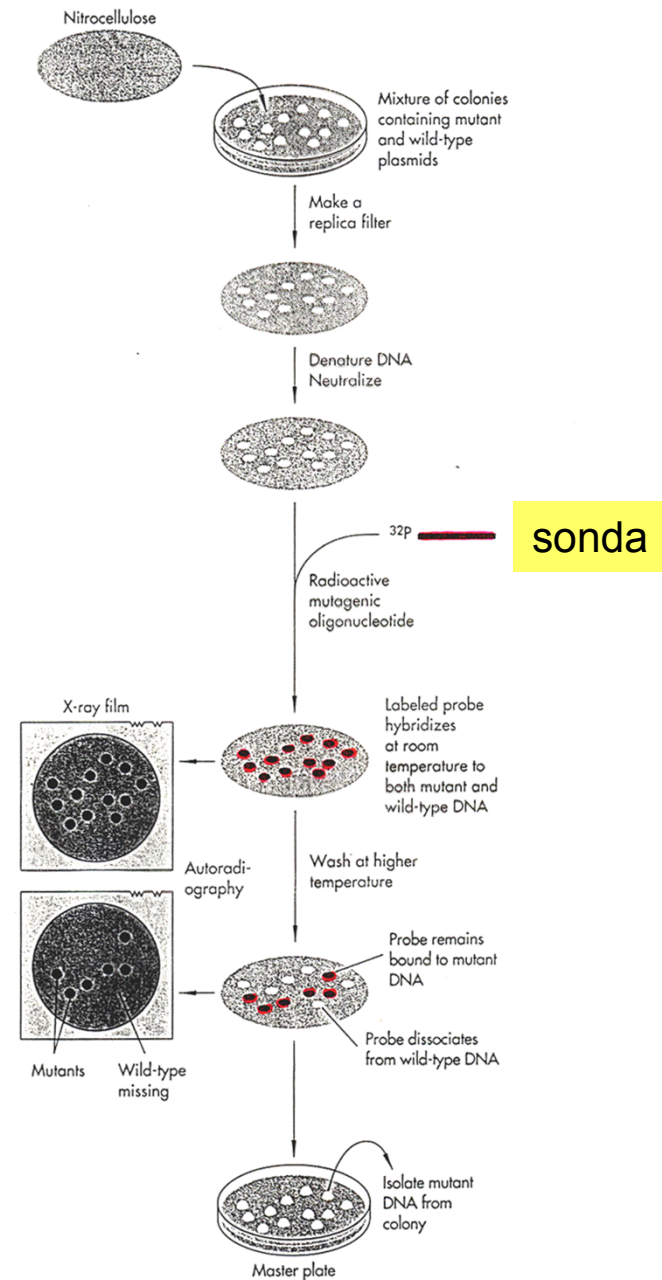
A - T → A - C → G - C

# Zvýšení výnosu mutant začlenením uracilu do templátové DNA

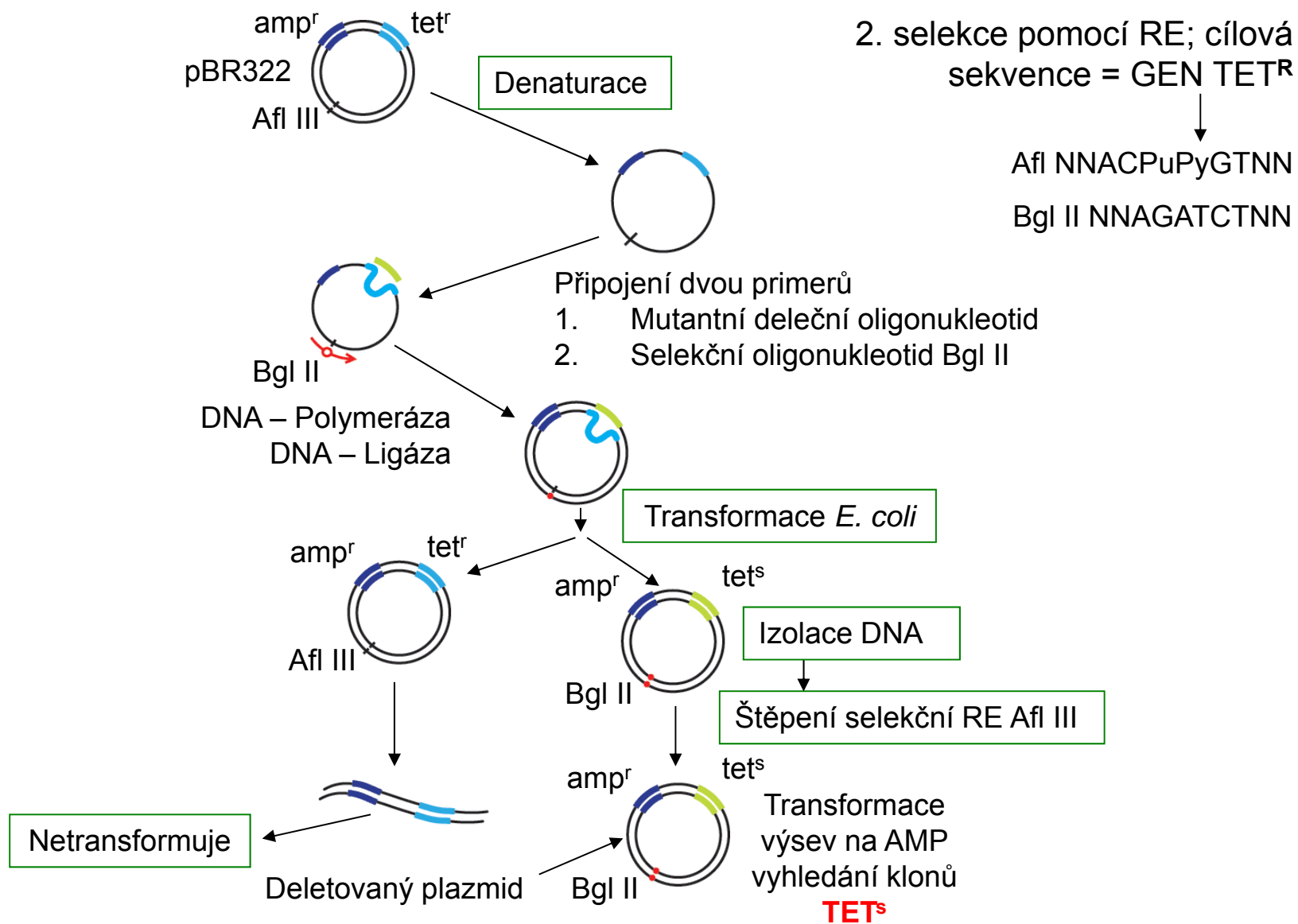


**žádaná mutace**

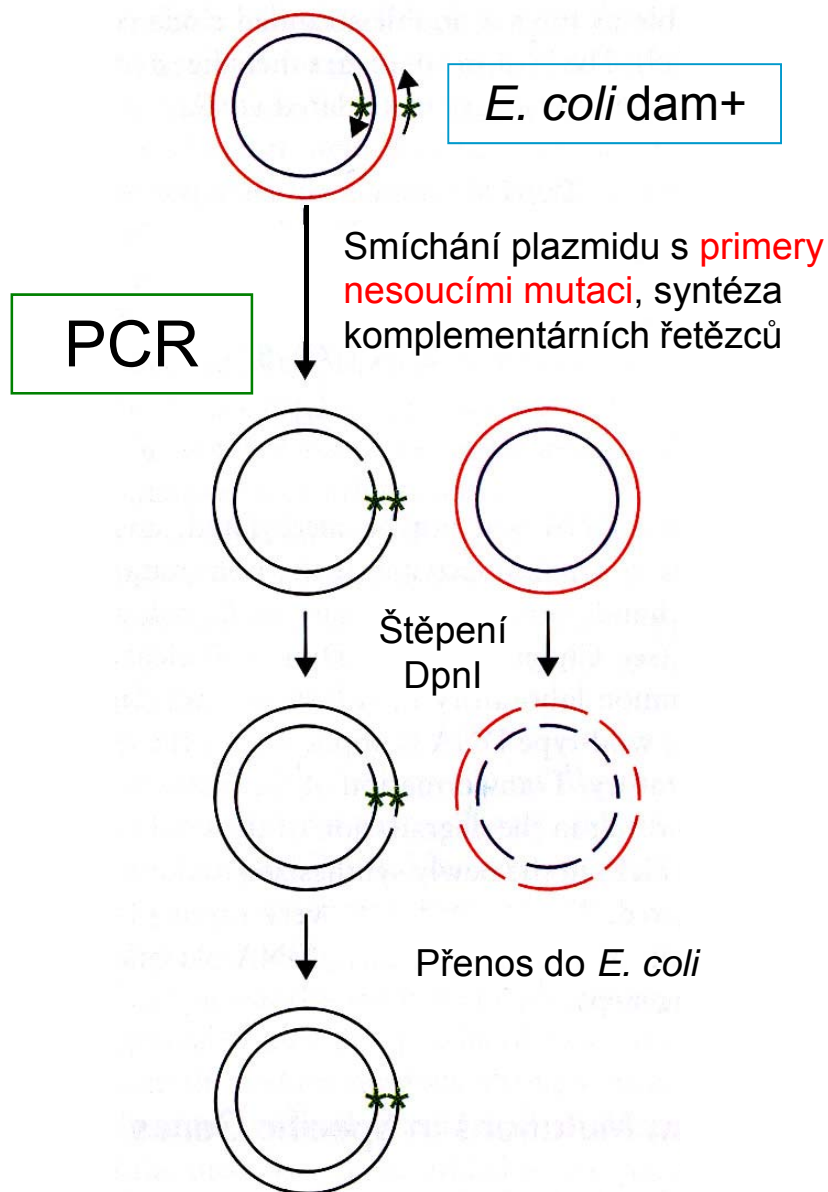
# Vyhledání mutantních klonů pomocí sondy – tou je značený mutagenní oligonukleotid



# Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů



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



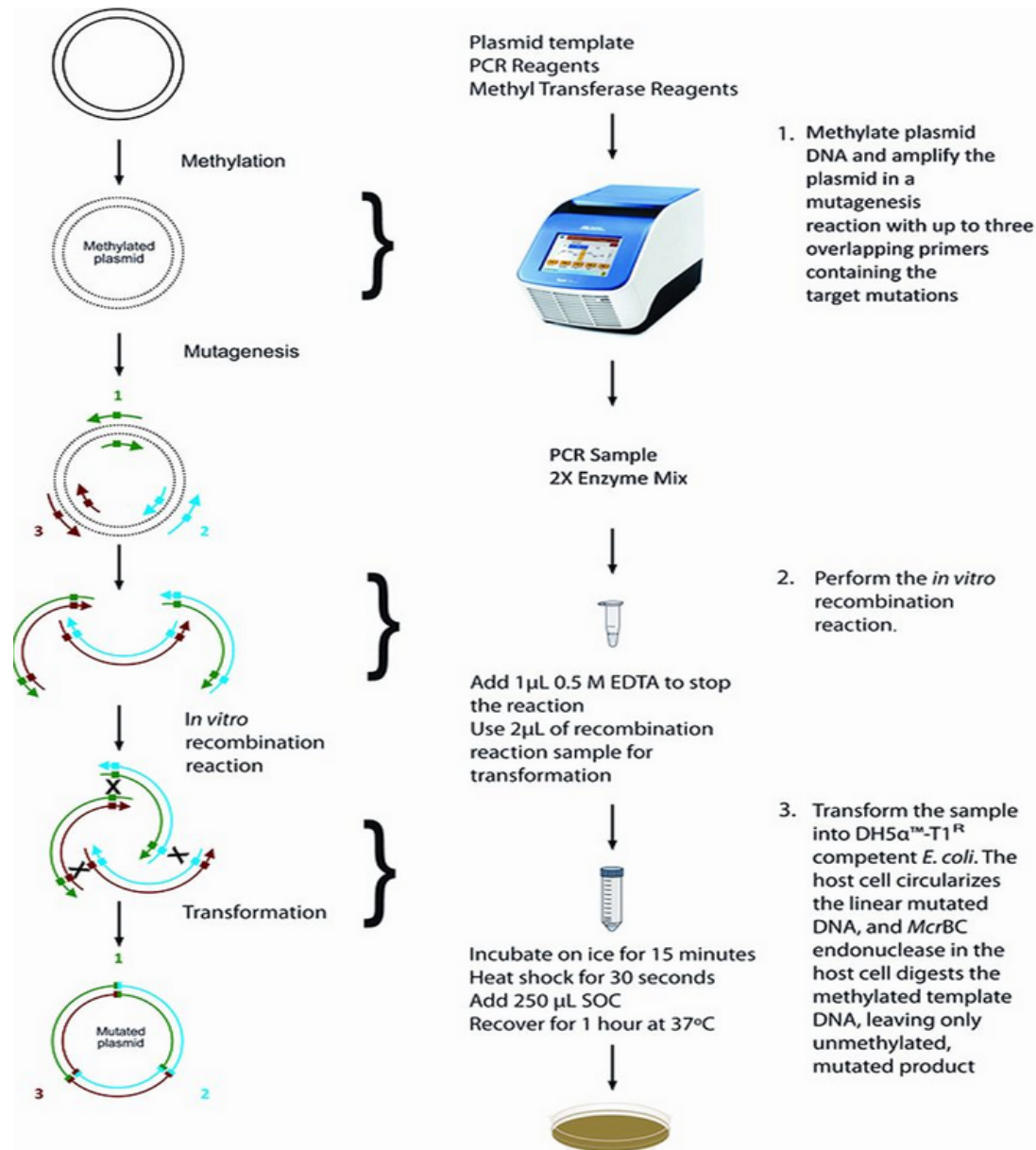
- jako templát je využita dsDNA plasmidu
- po proběhnutí PCR se vytvoří dva komplementární řetězce nesoucí mutaci ve stejném místě, které jsou schopny se párovat za vzniku kružnice s posunutými zlomy
- po proběhnutí PCR jsou produkty štěpeny DpnI, která je schopná štěpit jen metylovanou DNA
- rodičovské 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 ss DNA zlomů a nově nasyntetizované plasmidy obsahující mutaci se replikují

# Komerční soupravy pro snadné vytváření mutací a selekci

Metylovaná  
rodičovská DNA  
– DNA metyláza

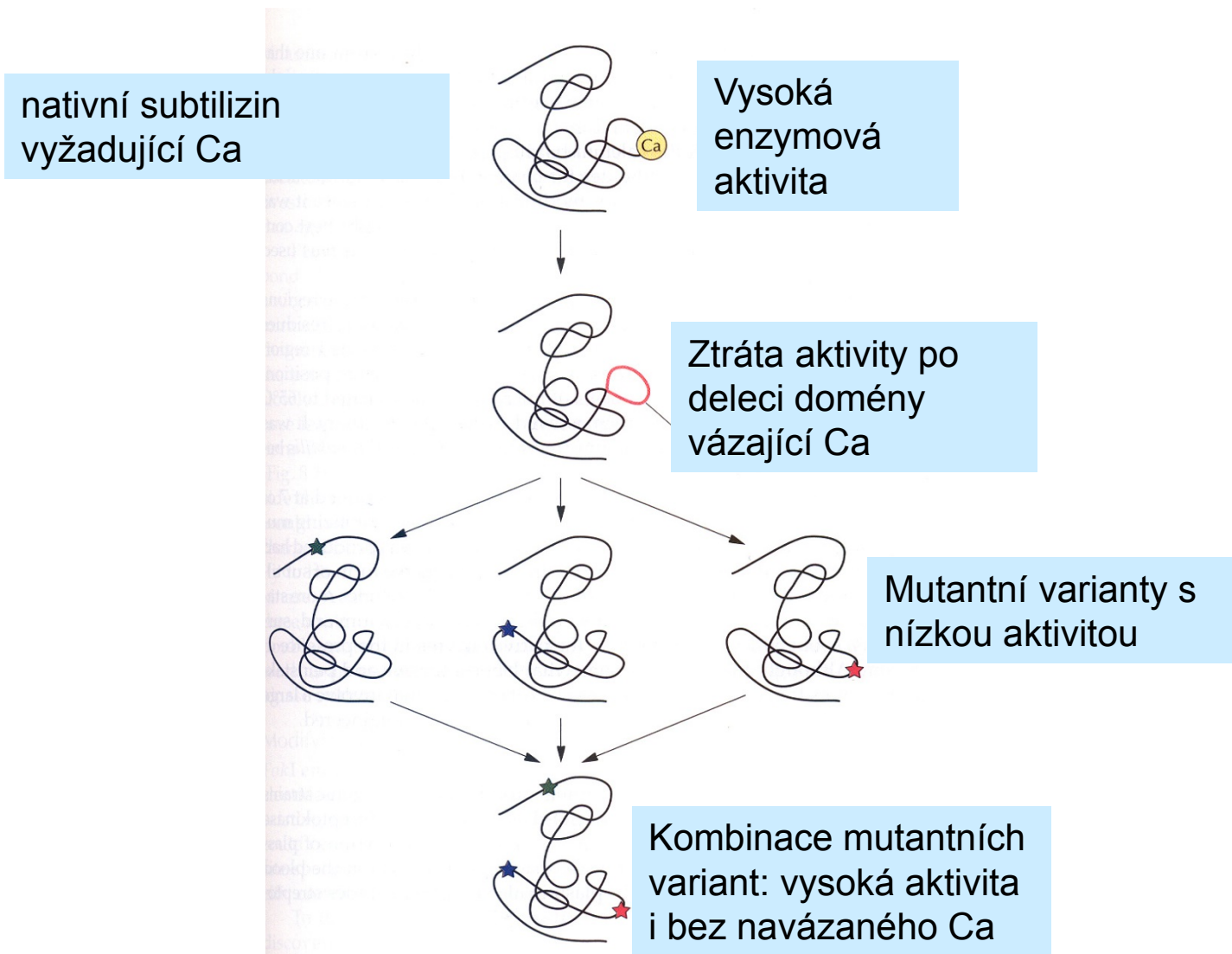
Mutagenní  
oligonukleotidy

Princip:  
rodičovská DNA  
standardního typu  
je metylována a je  
štěpena McrBC  
RE v *E. coli*,  
zachován je jen  
mutantní  
nemetylovaný  
produkt





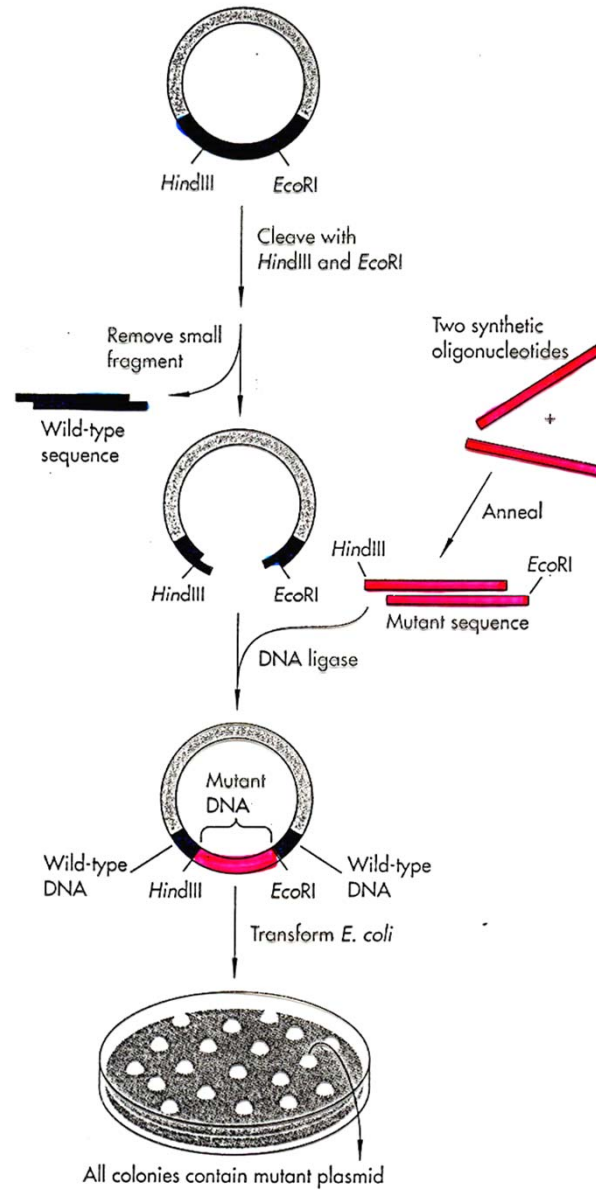
# Modifikace subtilizinu se změněným požadavkem na kofaktory (postupná mutagenze pomocí mutagenních oligonukleotidů)



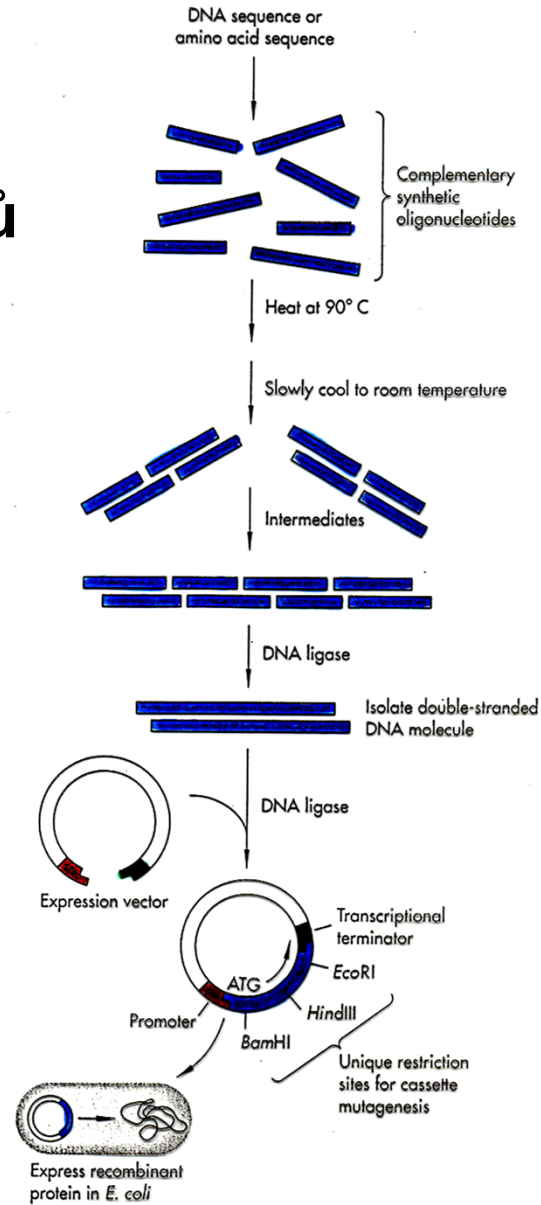
**Vlastnosti přirozeného lysozymu (wt) a šesti jeho modifikovaných variant připravených oligonukleotidovou mutagezí**

Enzyme	Amino acid at position:							No. of -S-S-	% Activity	$T_m$ (°C)
	3	9	21	54	97	142	164			
wt	Ile	Ile	Thr	Cys	Cys	Thr	Leu	0	100	41.9
pwt	Ile	Ile	Thr	Thr	Ala	Thr	Leu	0	100	41.9
A	Cys	Ile	Thr	Thr	Cys	Thr	Leu	1	96	46.7
B	Ile	Cys	Thr	Thr	Ala	Thr	Cys	1	106	48.3
C	Ile	Ile	Cys	Thr	Ala	Cys	Leu	1	0	52.9
D	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	2	95	57.6
E	Ile	Cys	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	2	0	58.9
F	Cys	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Cys	3	0	65.5

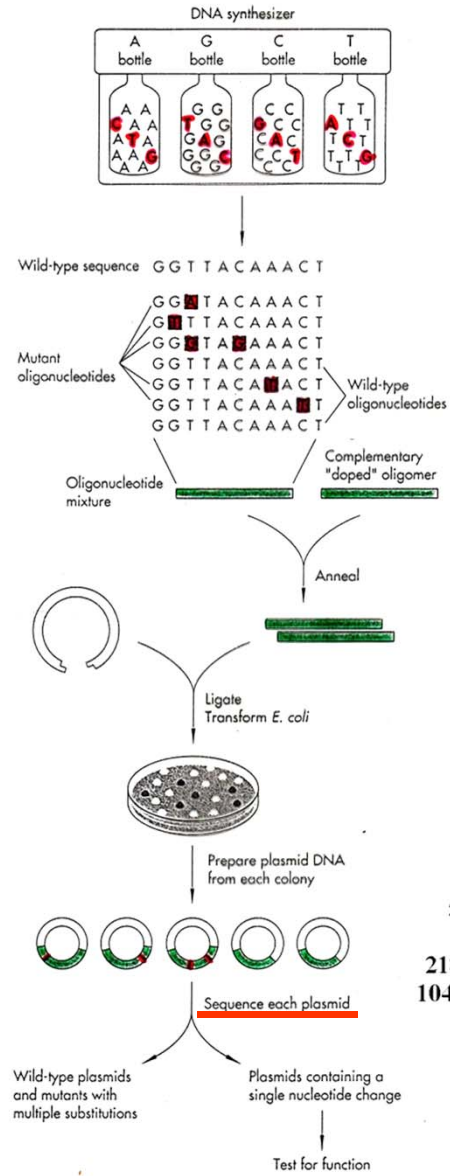
# Kazetová mutageneze



# Syntéza genů postupným spojováním kratších oligonukleotidů



# Mutageneze pomocí kazet tvořených mutantními „doped“ oligonukleotidy – vytváření náhodných sekvencí

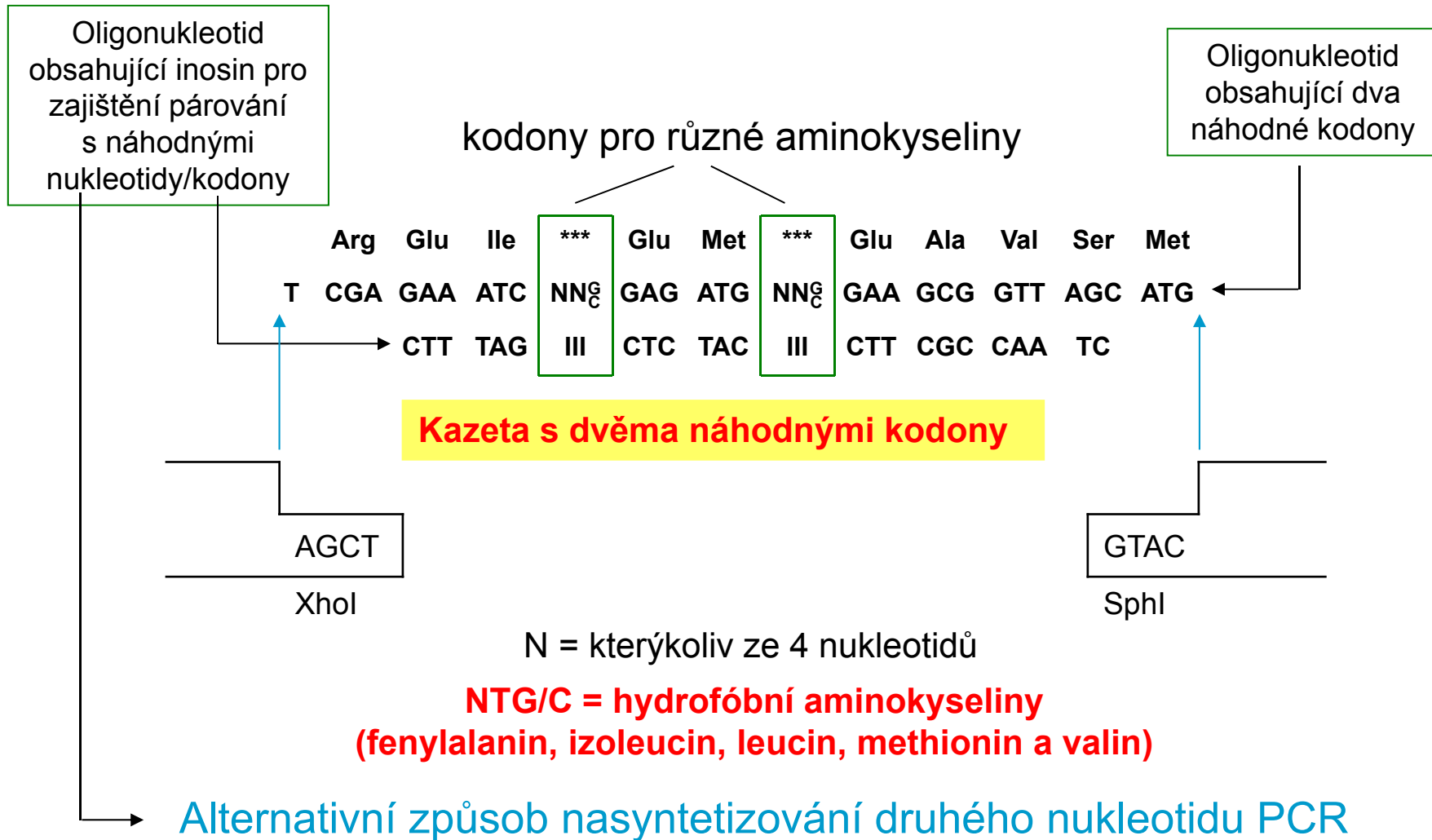


„kontaminované“ zásobní roztoky nukleotidů

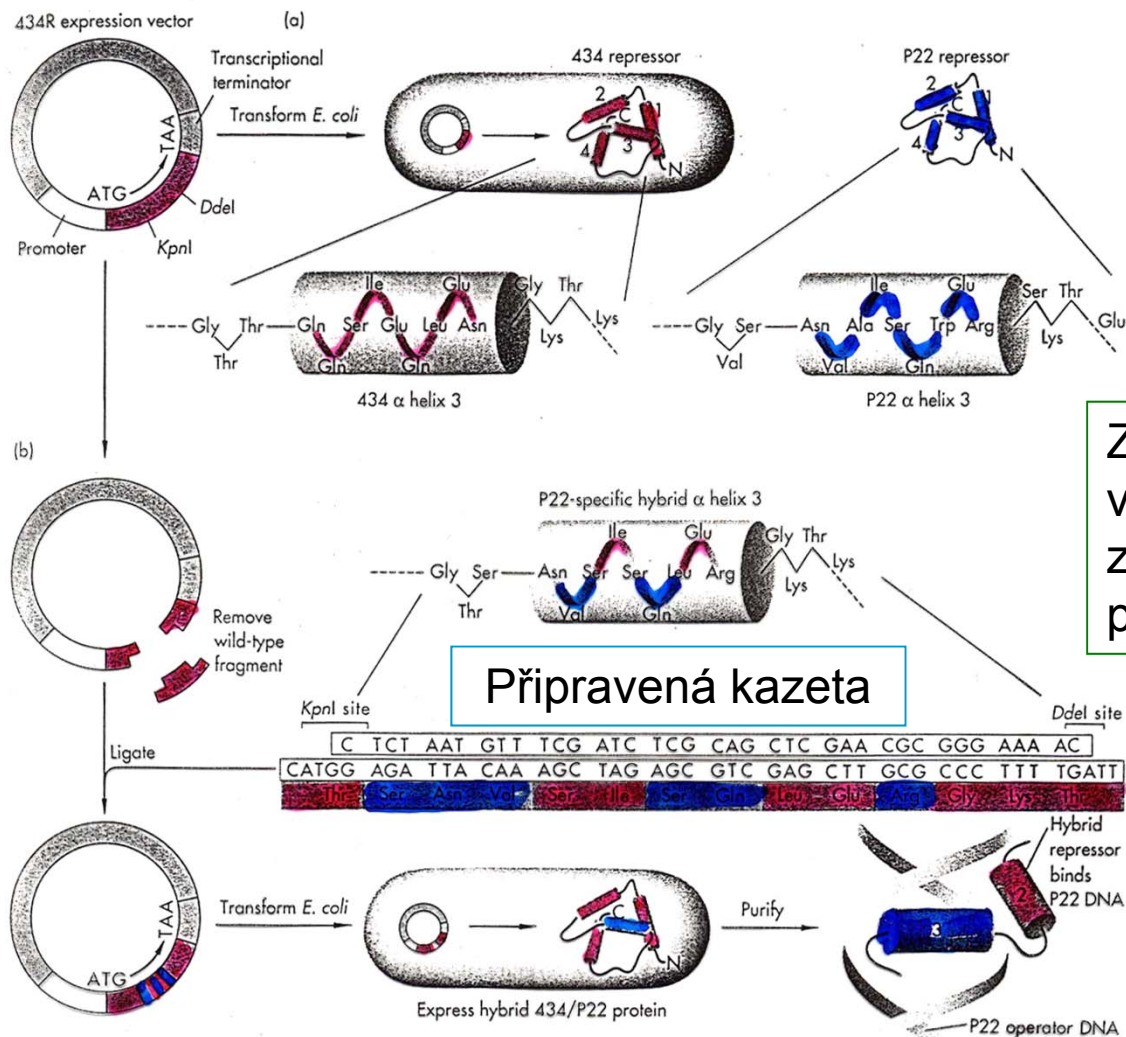
Skríning např. fágovým displayem

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

# Mutageneze pomocí „doped“ oligonukleotidů



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



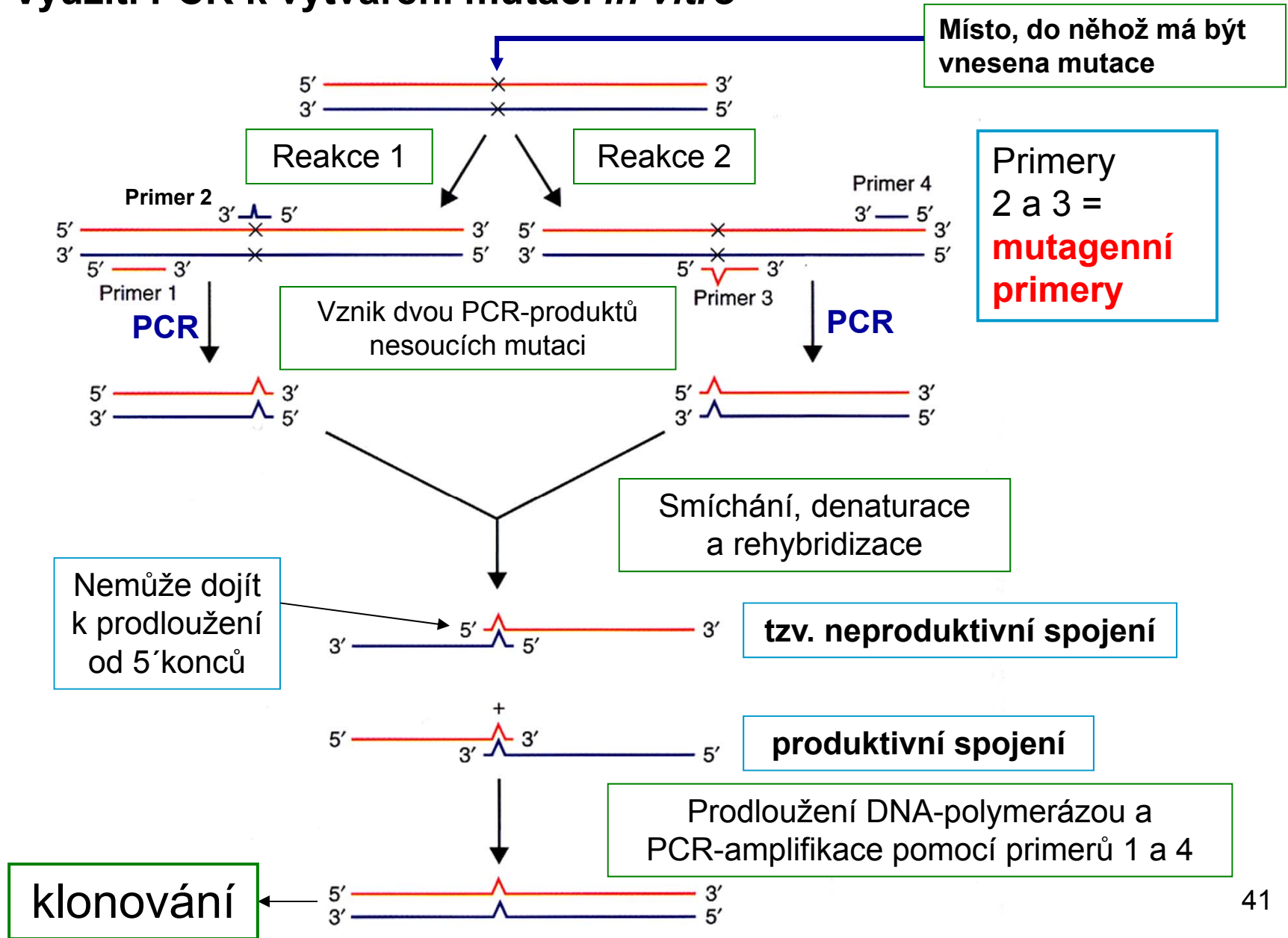
Záměna aminokyselin  
v doméně represoru  
zodpovědné za roz-  
poznání operátoru P22

# Výhody PCR

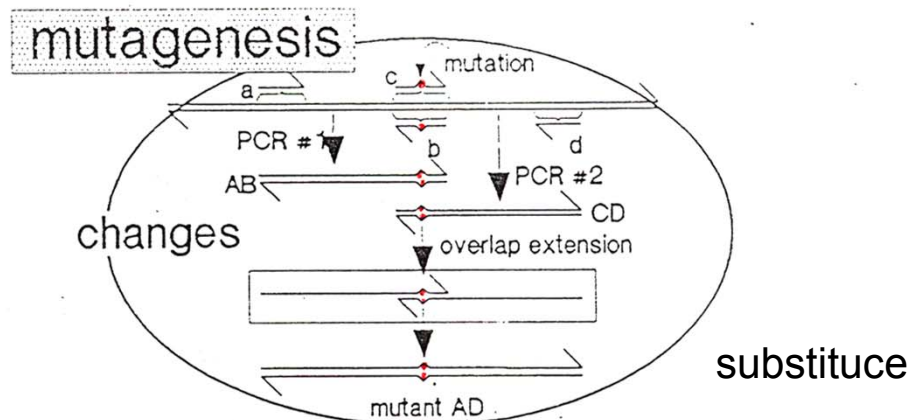
- jednoduché provedení
- možnost vytváření různého typu mutací
- není nutná následná selekce pro zvýšení proporce mutant (při cílené mutagenezi)
- nezávislost na RE místech
- není vždy nutné následné klonování mutovaného genu do vektoru (po PCR je možný přenos lineárního amplikonu do buněk transformací, možnost rekombinace s genomovou DNA – ale nízká účinnost)



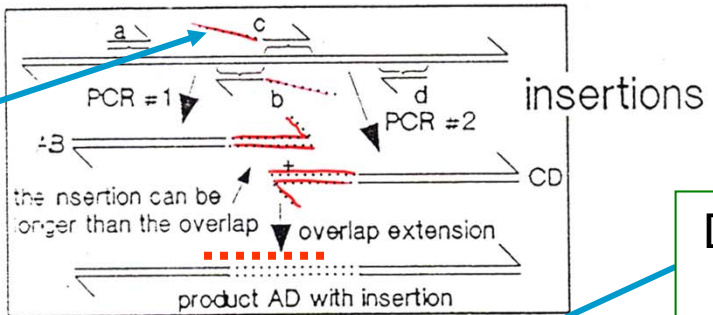
# Využití PCR k vytváření mutací *in vitro*



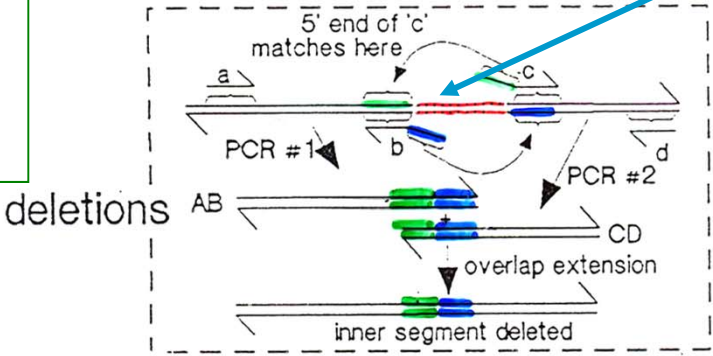
# Vnášení mutací pomocí PCR



Vložená sekvence  
(extenze primeru  
na jeho 5'konci)  
(extenze jsou  
vzájemně  
komplementární)

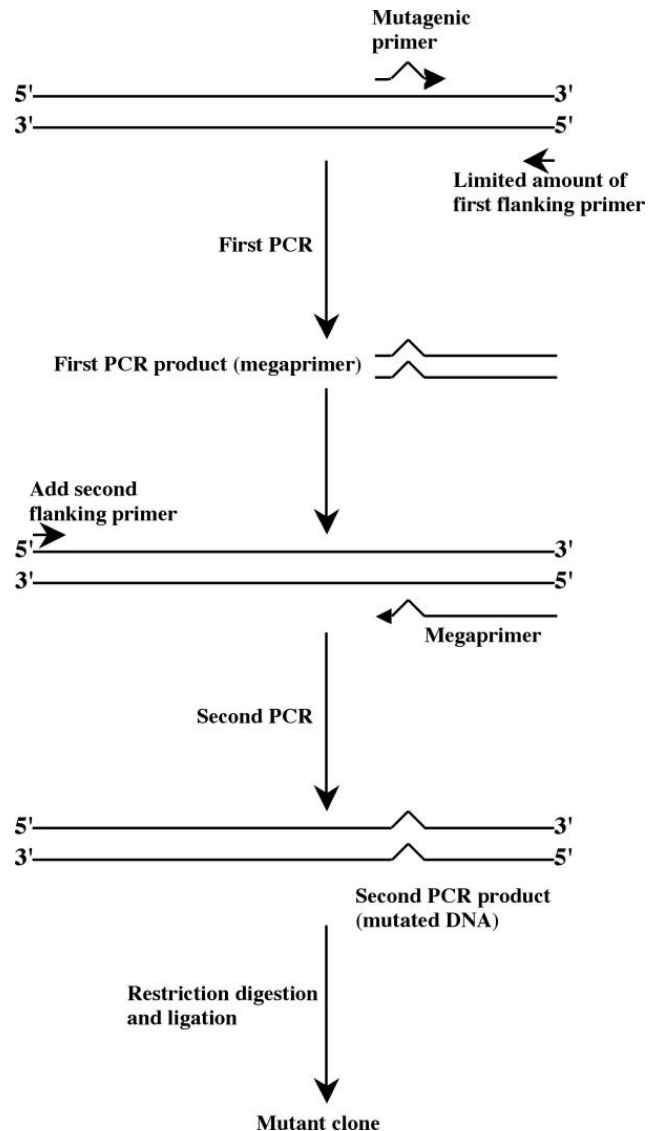


Deletovaná sekvence  
(extenze jsou  
komplementární k  
sekvenci vedle místa  
delece)



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

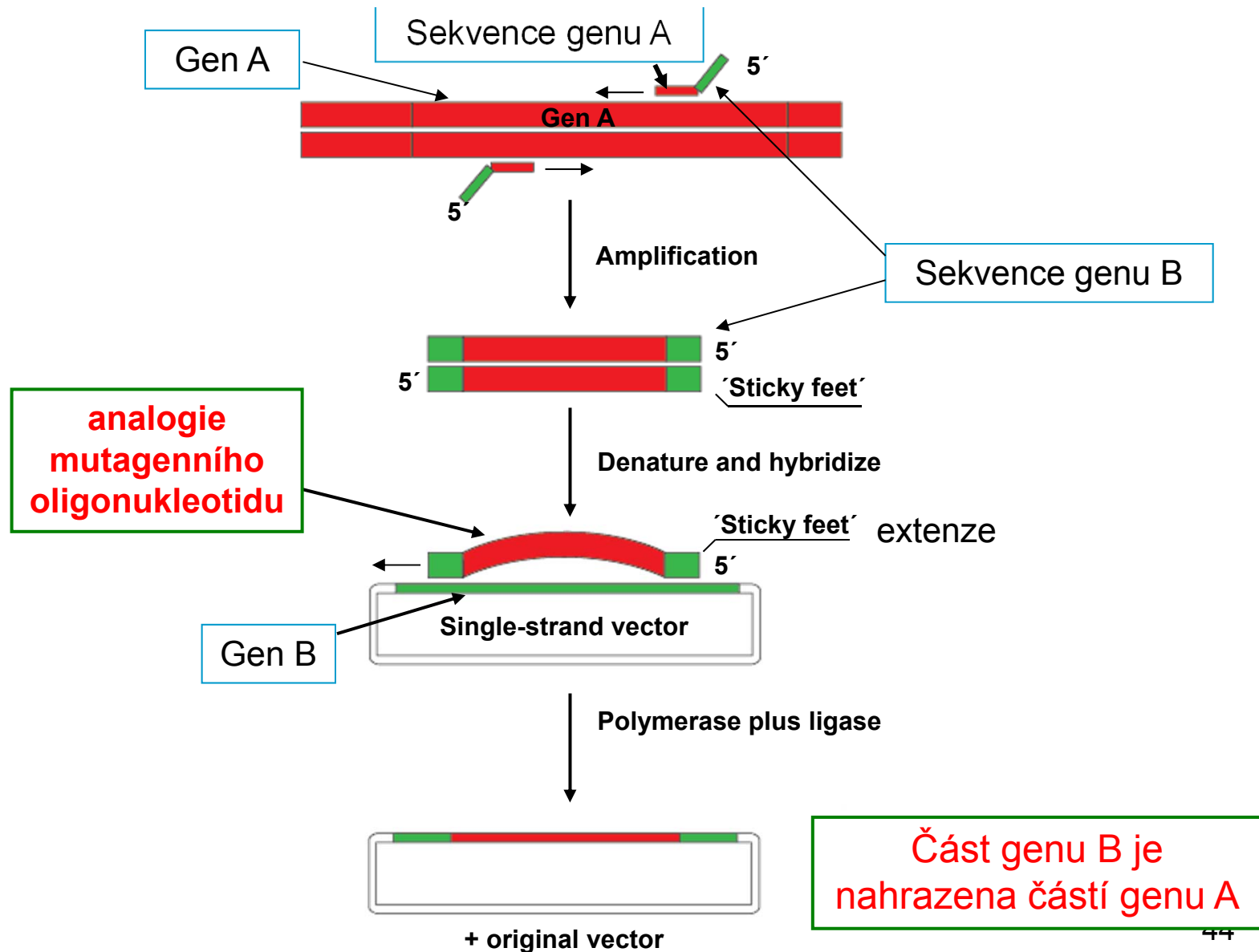
# PCR-mutageneze pomocí megaprimeru



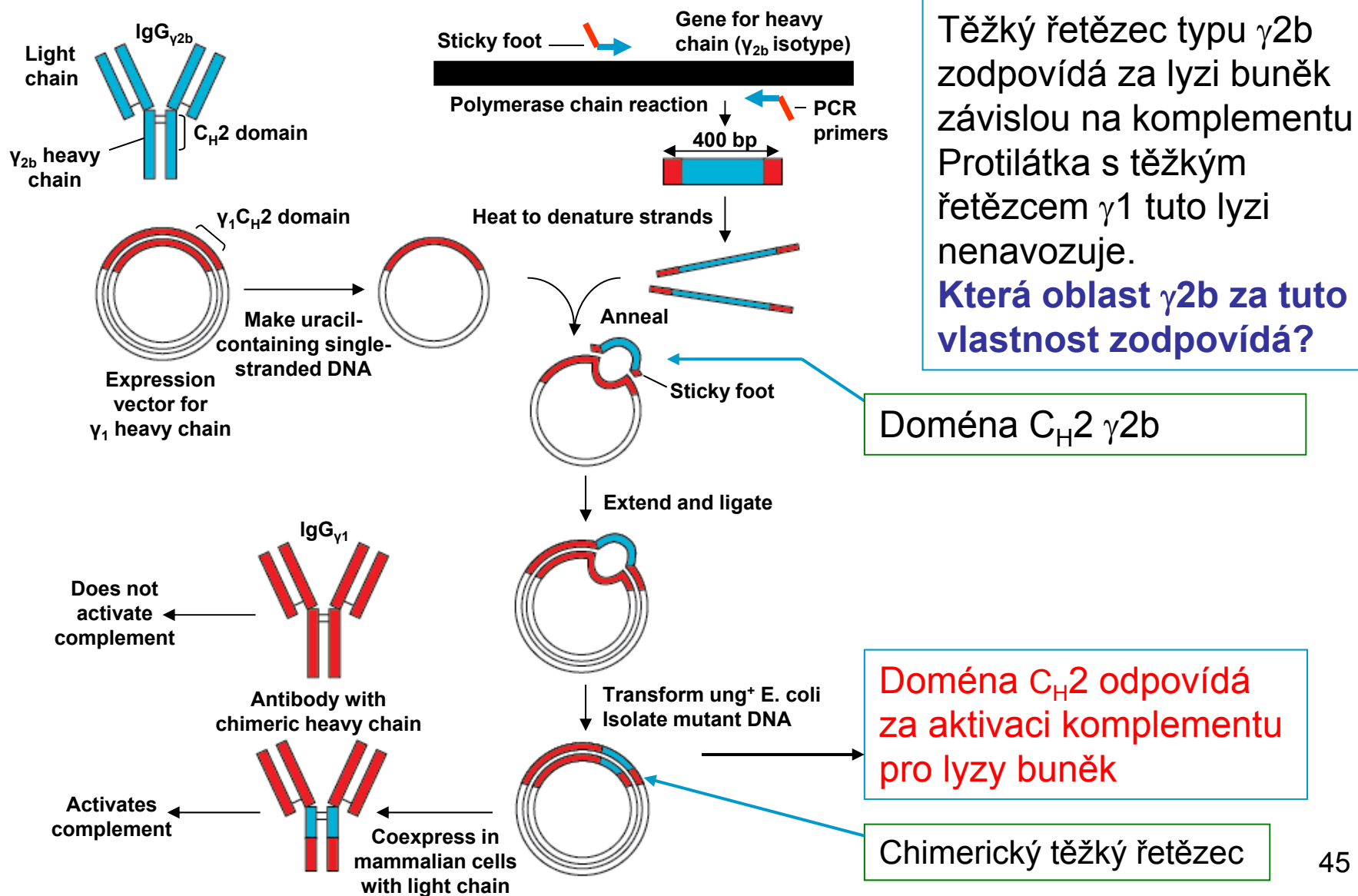
**Obecně:** The strategies require two rounds of PCR amplification using two flanking primers and one internal mutagenic primer. In the first round of PCR, one of the flanking primers and the internal mutagenic primer (having desired base substitutions) are used to generate a megaprimer. The megaprimer is purified by gel electrophoresis and extraction before being used along with the other flanking primer in the second round of PCR to generate the complete DNA sequence with the desired mutation.

**Nová modifikace:** The first PCR (5 cycles) contains a limiting concentration of the first flanking primer and is followed by a prolonged extension step. The second flanking primer is then added and the entire mutated template is amplified by PCR (25 cycles). The second PCR product is digested with appropriate restriction endonucleases to give desired mutated fragment, which then can be ligated to the expression vector.

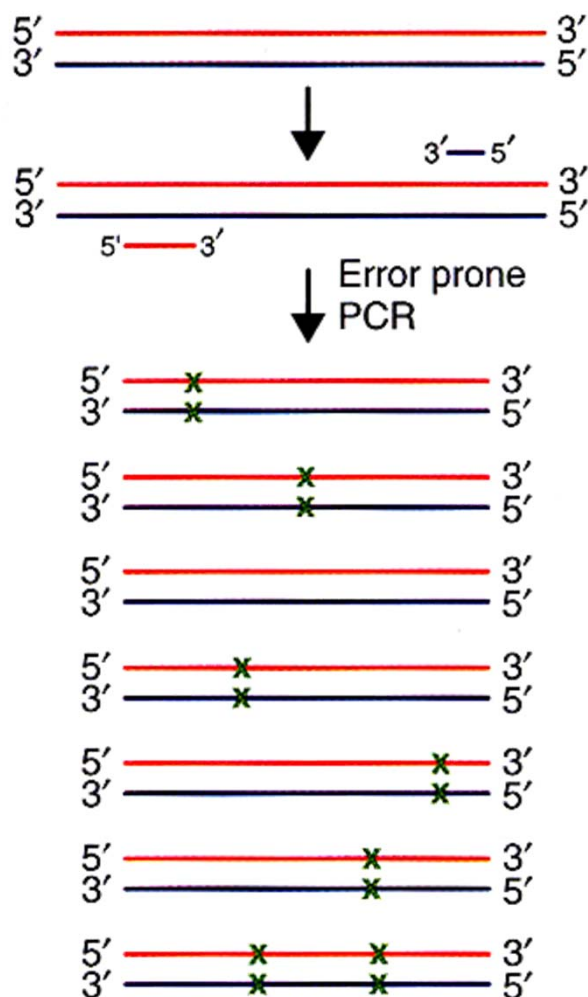
# Náhrada části genu sekvencí z příbuzného genu



# Konstrukce genu pro chimerickou protilátku

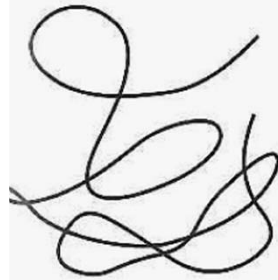


## Vytváření náhodných mutací - „error-prone“ PCR



- využívají se DNA-polymerázy bez korektorské funkce (např. Taq-polymeráza) – ne High Fidelity PCR Enzymes
- 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. transzice, zatímco transverze nevznikají)

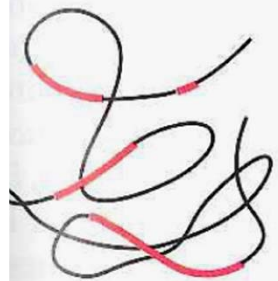
## Způsoby zavádění změn do proteinů



Standardní typ  
proteinu



Náhodná mutageneze  
nebo error-prone PCR

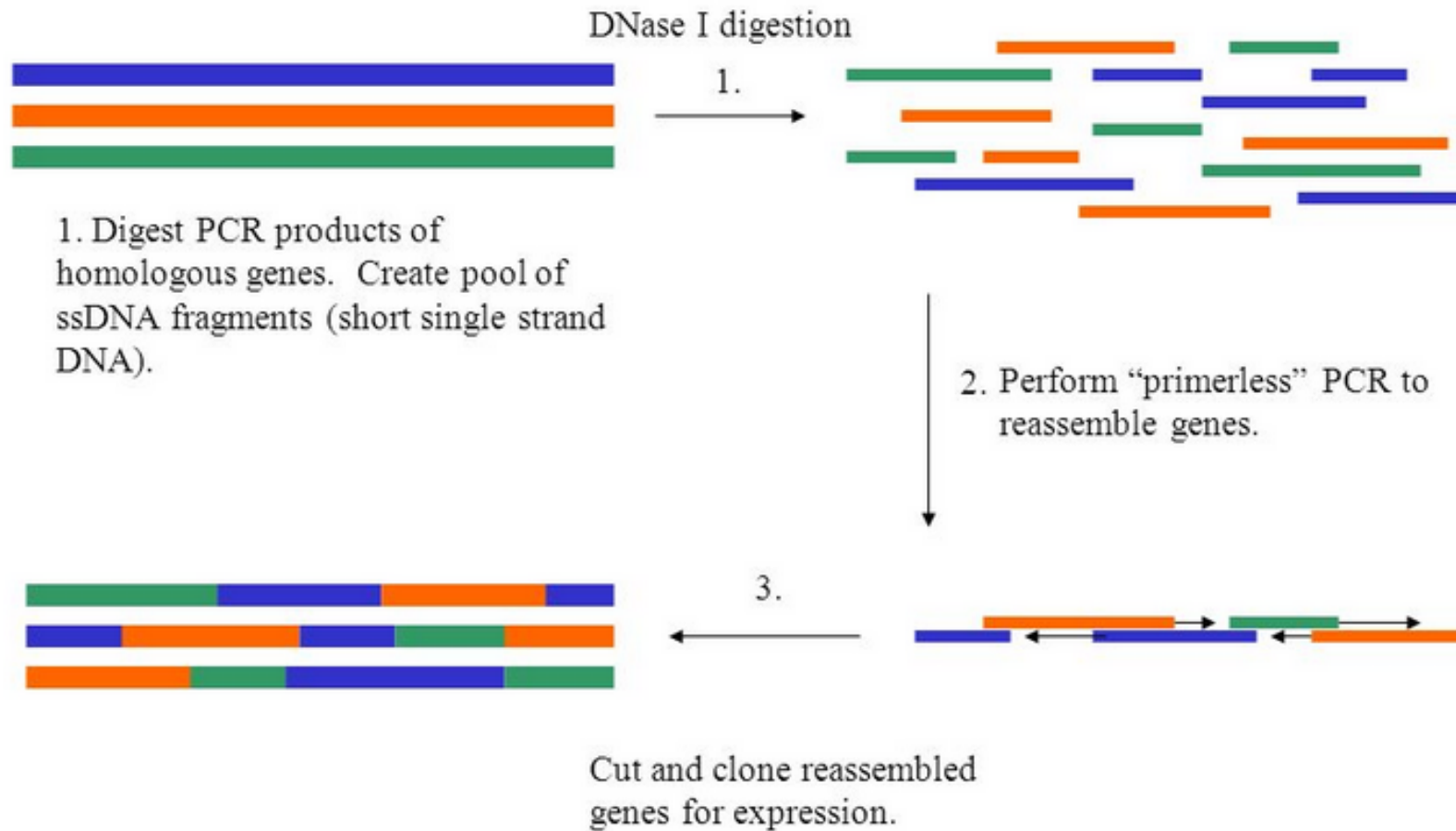


Kombinace oblastí/úseků (tzv. DNA-  
shuffling) pocházejících z genů  
genových rodin (interferon)

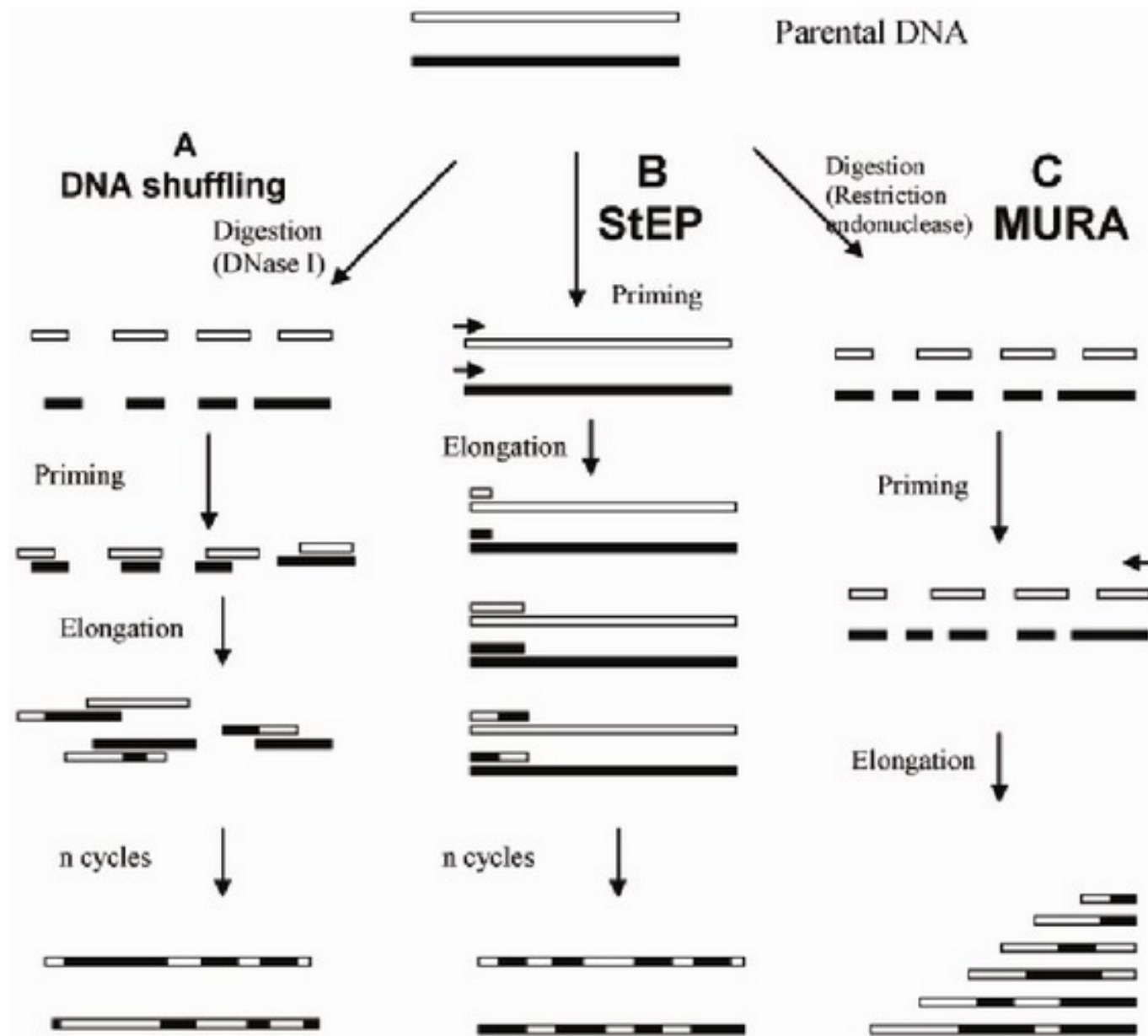
**Výsledek (např):**

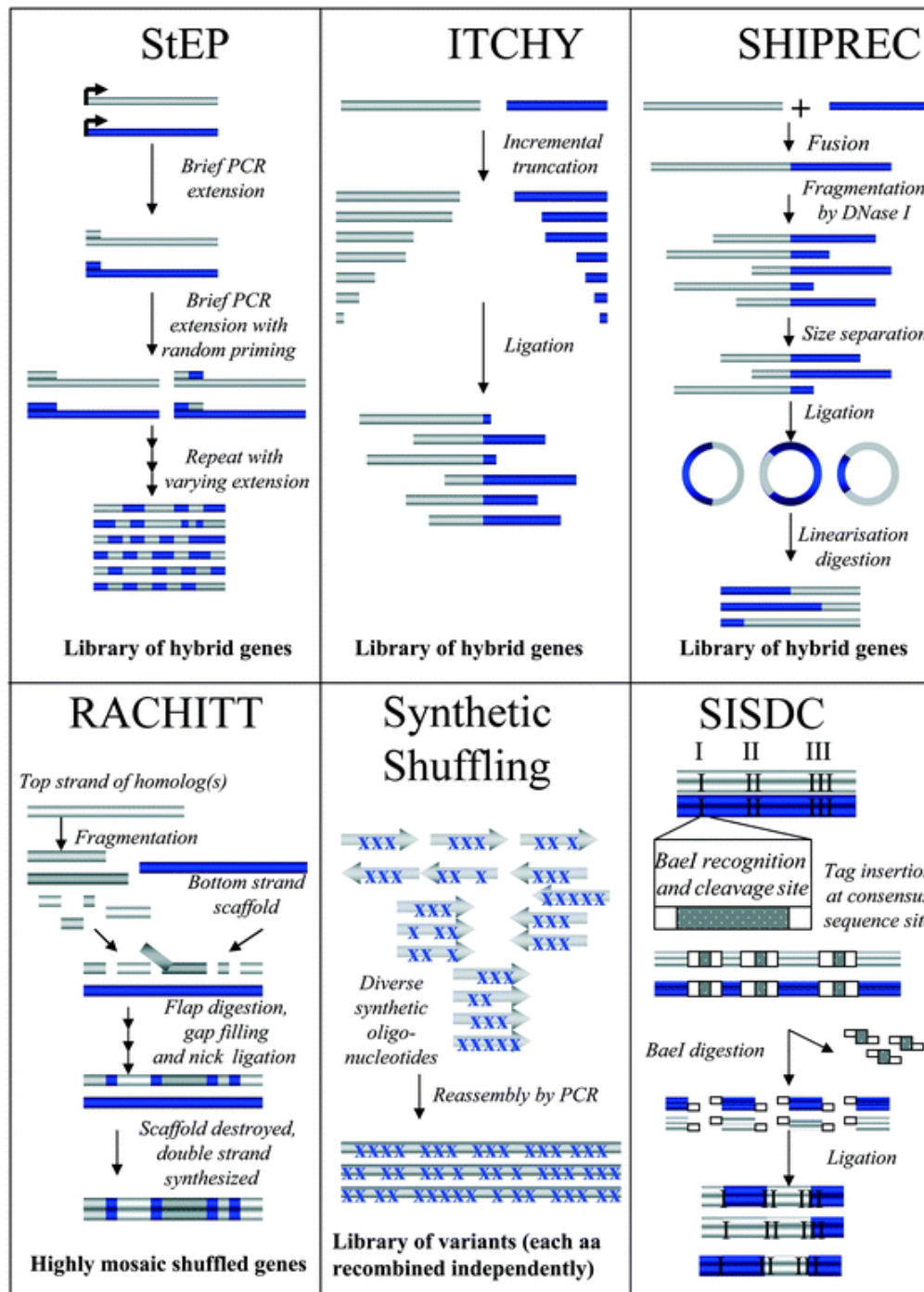
- **vyšší aktivita**
- **termostabilita**

# DNA shuffling

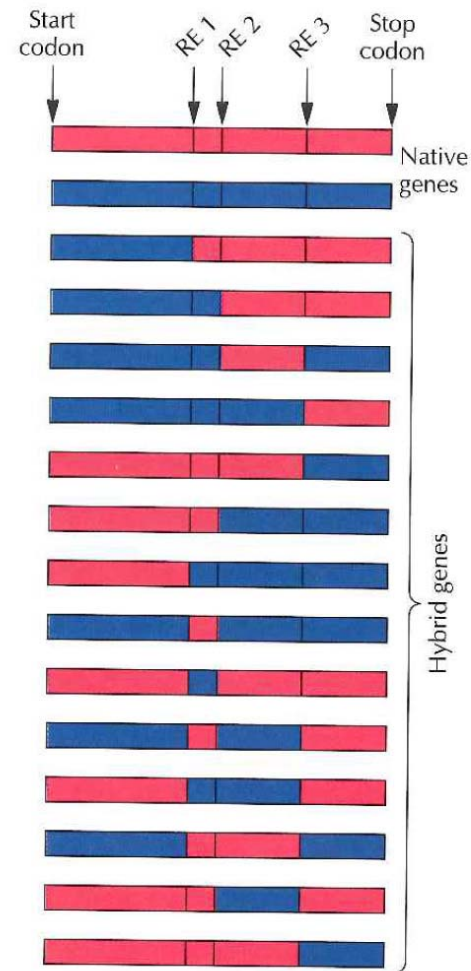






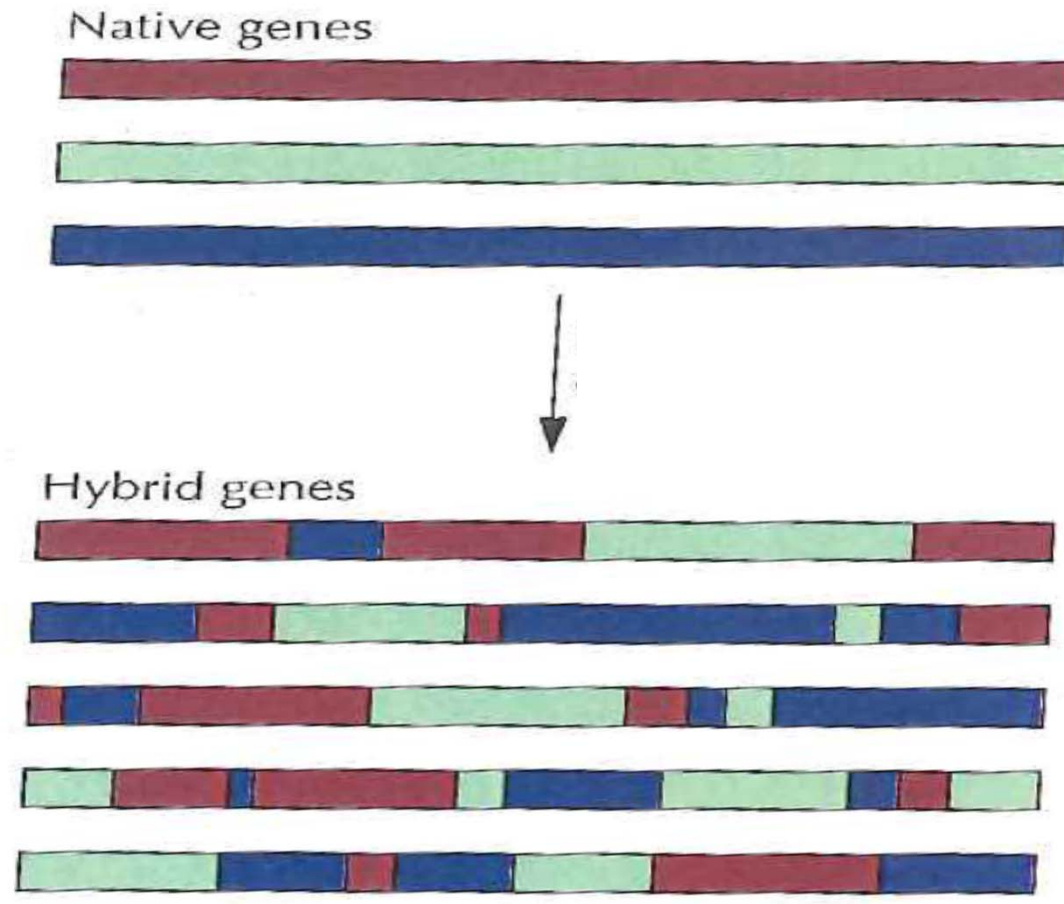


## Vytváření hybridních genů kombinací restričních fragmentů

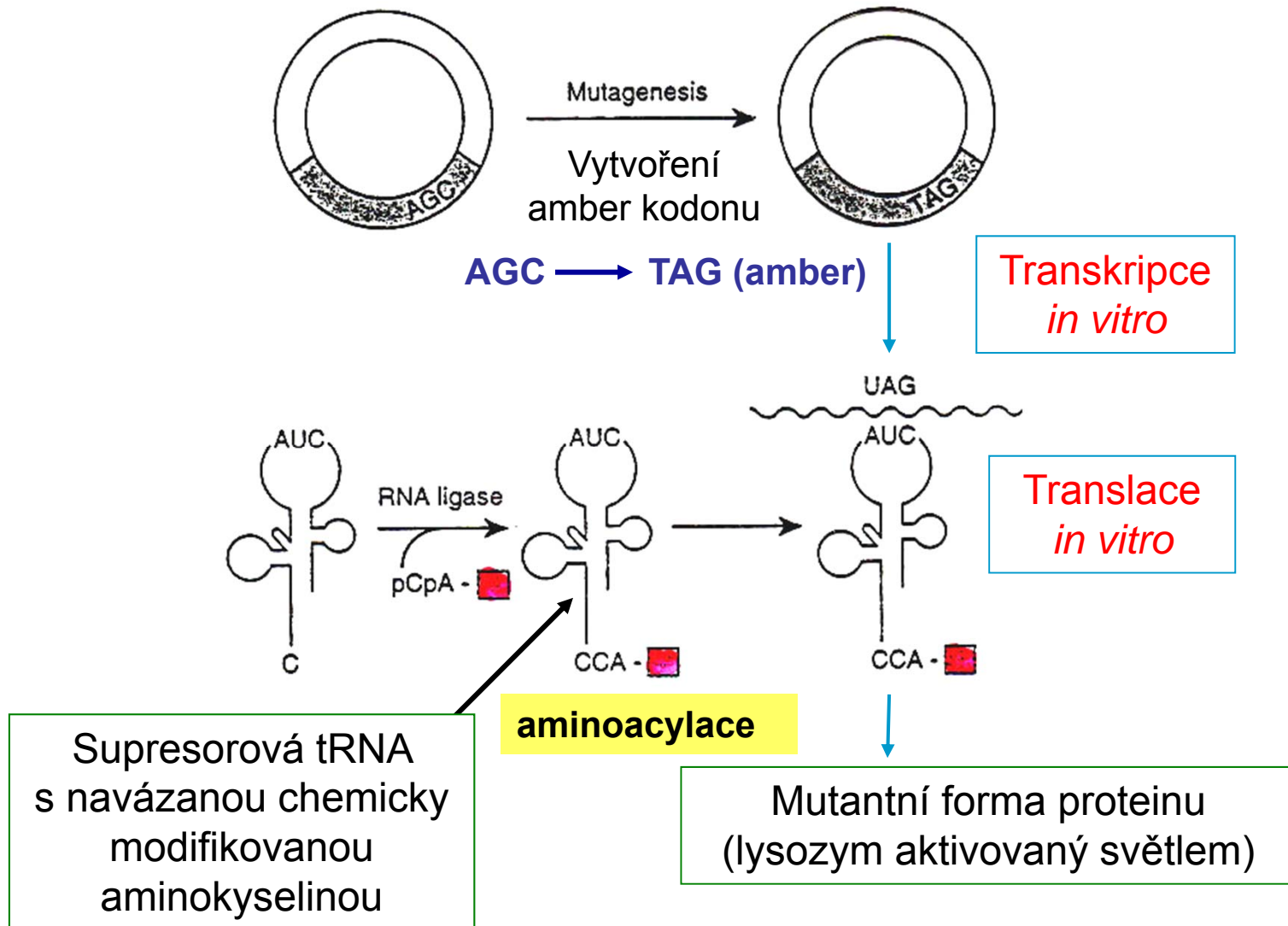


14 odlišných hybridních genů  
vytvořených kombinací  
restričních fragmentů  
pocházejících ze dvou genů  
téže genové rodiny

# Vytváření hybridních DNA kombinací úseků tří genů z jedné genové rodiny – tzv. „molecular breeding“



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

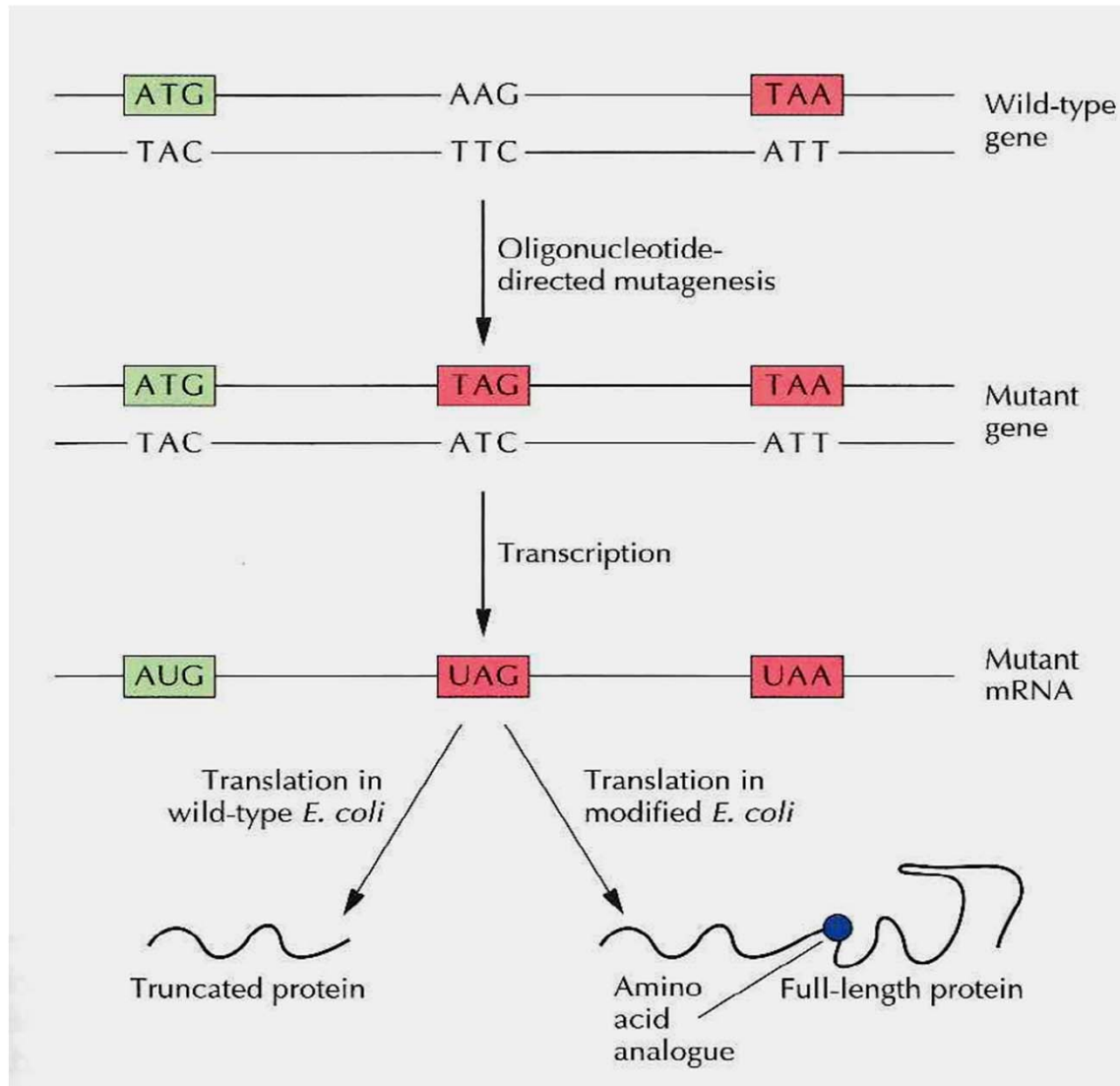


**Table 4.4 Nonsense Suppressors Employed to Generate Altered Proteins**

Suppressor	Codons recognized	Amino acid inserted	Efficiency (%)	References
<b>A. přirozené</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. Uměle připravené</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 lysozemu**

## Vytváření proteinů obsahujících nestandardní aminokyselinu O-metyl-L-tyrozin v geneticky upravených kmenech *E. coli*



Kmen *E. coli* obsahuje 2 geny z *Methanococcus jannaschii*:

1. Supresorovou tRNA, která se váže na amber kodon
2. Mutantní tyrozin-tRNA-syntetázu, která na tRNA váže místo tyrozinu O-metyl-L-tyrozin

Analogicky lze připravit kmeny, u kterých bude docházet k začleňování jinak modifikovaných aminokyselin

## RACIONÁLNÍ DESIGN

### 1. Počítačové modelování



### 2. Místně cílená mutageneze



Samostatný mutovaný gen

### 3. Transformace

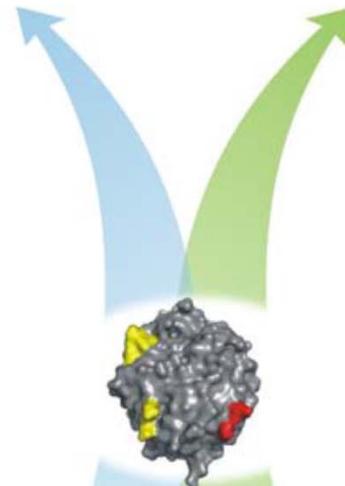
### 4. Exprese proteinu

### 5. Purifikace proteinu

6. *není aplikován*



Zkonstruovaný mutantní enzym



**VYLEPŠENÝ  
ENZYM**

### 7. Biochemické testování

## ŘÍZENÁ EVOLUCE

### 1. *není aplikováno*

### 2. Náhodná mutageneze



Knihovna mutovaných genů  
( >10,000 klonů )

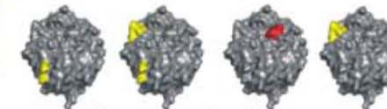
### 3. Transformace

### 4. Exprese proteinu

5. *není aplikována*

### 6. Screening a výběr

- stabilita
- selektivita
- afinita
- aktivita



Vybrané mutantní enzymy

Převzato: J. Damborský: Racionální design a řízená evoluce představují dva koncepčně rozdílné přístupy používané při konstrukci vylepšených enzymů metodami proteinového inženýrství.



## Dosažení náhodné záměny nukleotidů:

- Použití neoptimálních podmínek pro syntézu DNA *in vitro* (např. změny koncentrace iontů, odlišné koncentrace prekurzorů nukleotidů mají za následek chyby v jejich zařazování do DNA)
- Použití DNA-polymerázy bez korektorské funkce

**Základní problém: dochází ke vzniku většího počtu substitucí a je obtížné určit, která záměna (mutace) zodpovídá za změnu vlastností genu**