

Aplikace genového inženýrství – příprava farmakologicky nebo průmyslově významných látek

- Hormony,
- Růstové faktory
- Vakcíny,
- DNA-vakcíny
- Protilátky,
- Abzomy,
- Imunotoxiny
- Další biologicky aktivní látky (interferon, krevní srážecí faktory aj)

Gen pro inzulin

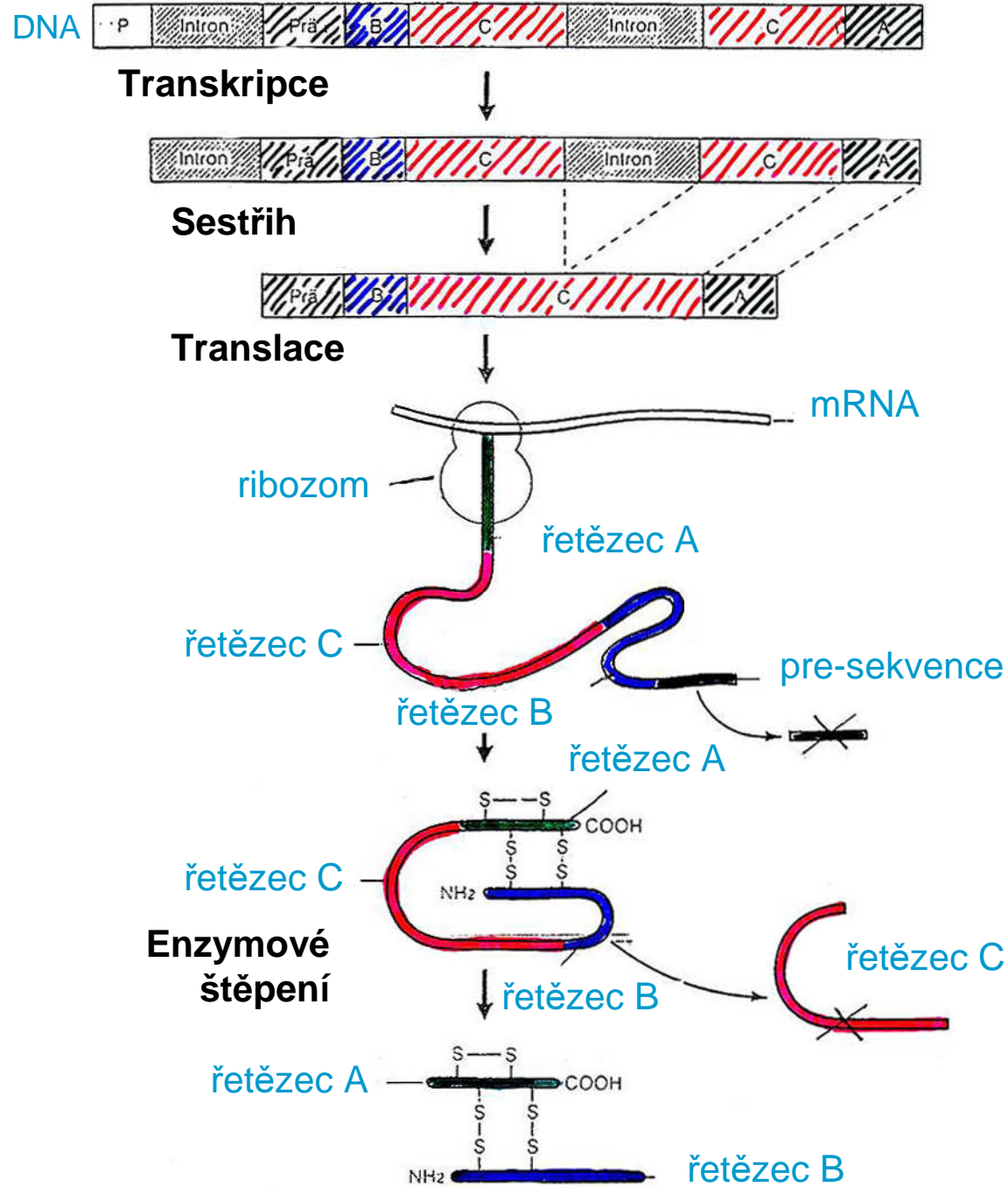
pre-mRNA

mRNA pro pre-proinzulin

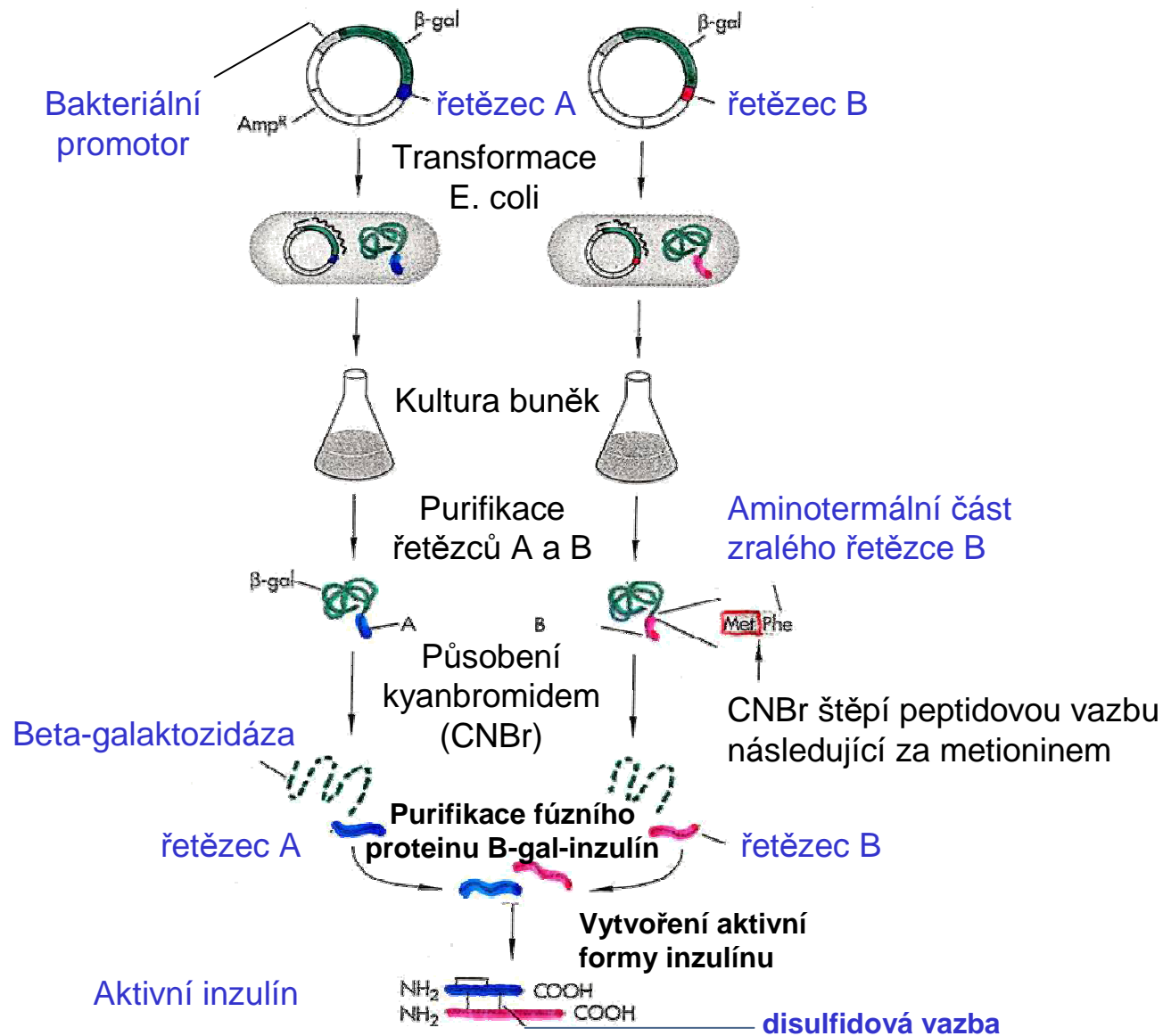
pre-proinzulin preprohormon

proinzulin prohormon

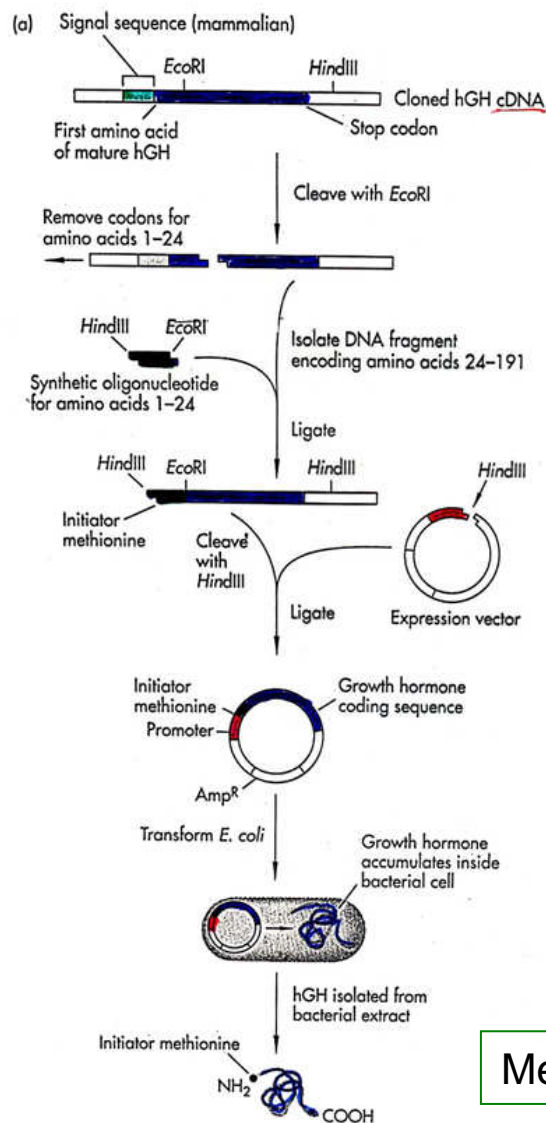
aktivní inzulin zralý hormon



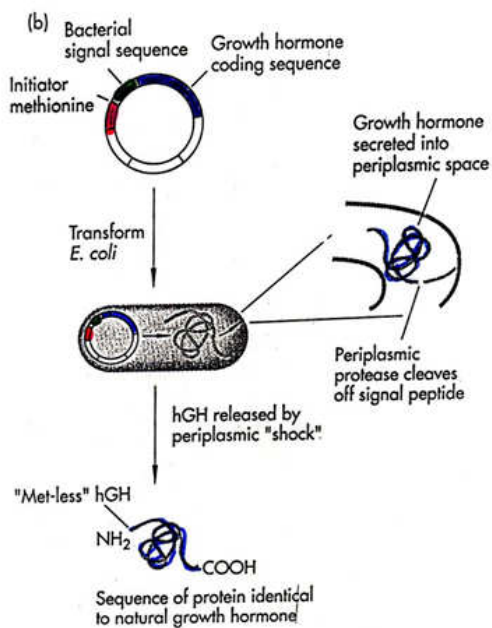
Příprava lidského inzulinu v bakteriálních buňkách



Příprava lidského růstového hormonu (hGH) v bakteriích

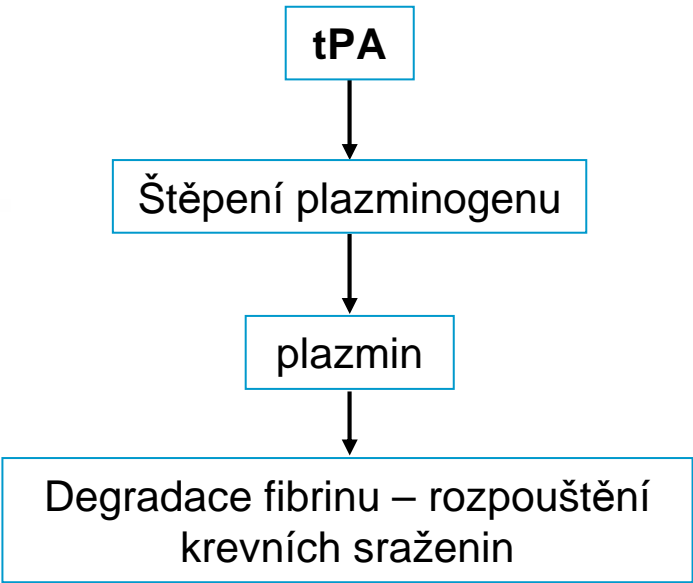
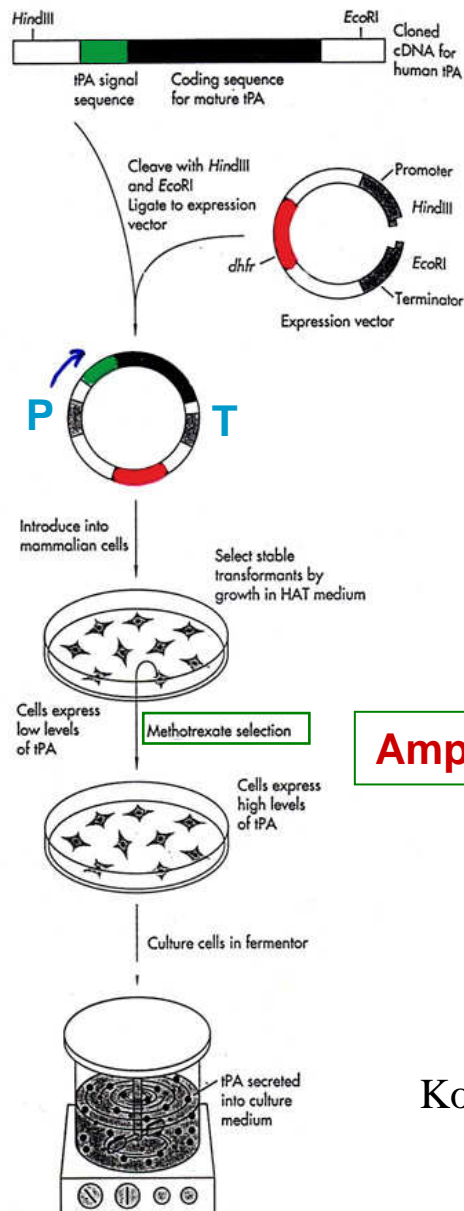


Příprava formy hGH sekretované v bakteriálních buňkách



Met není u přirozeného hGH

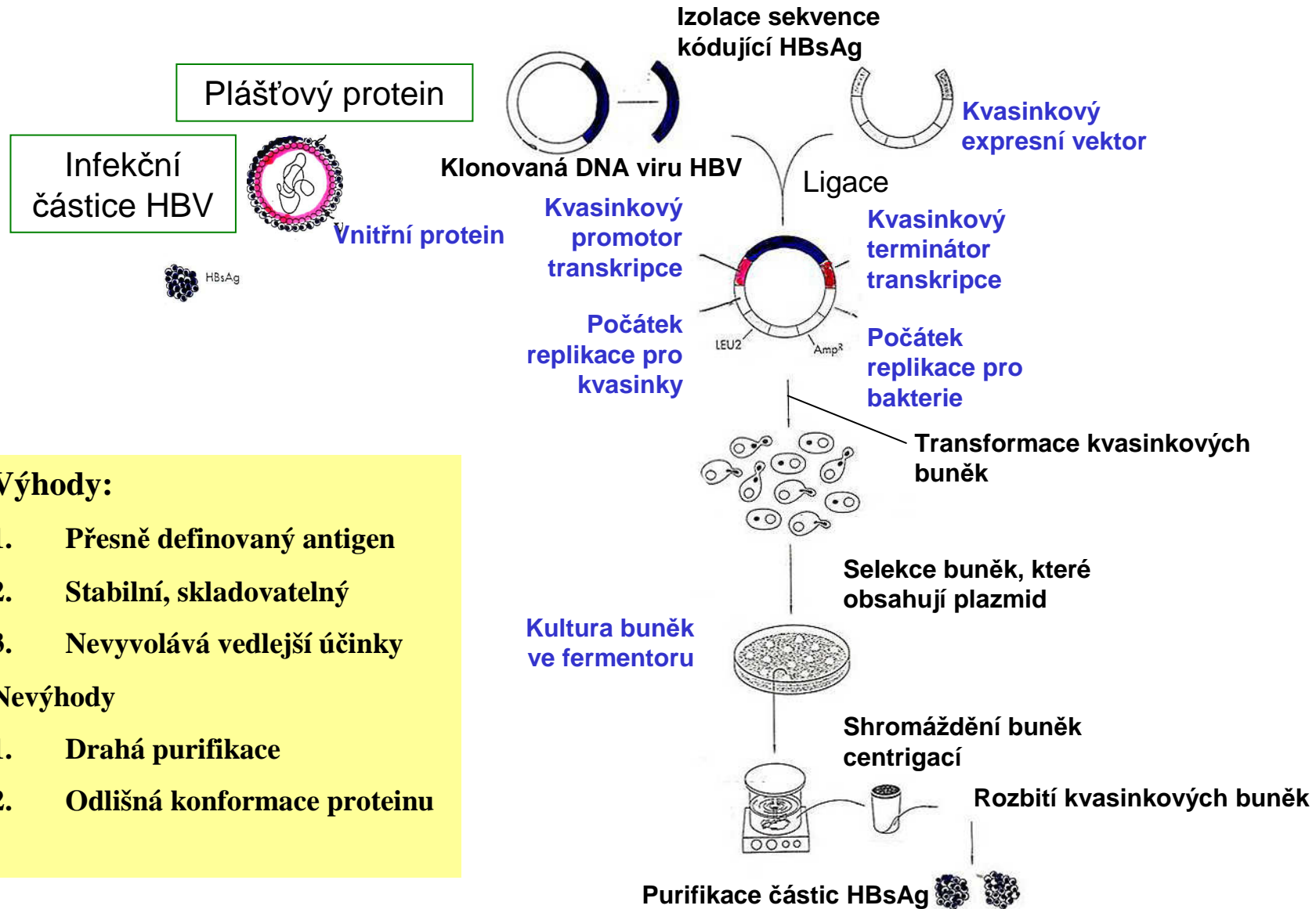
Příprava tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA)



Amplifikace genů tPA

Komerční výroba

Příprava podjednotkové vakcíny viru HBV v kvasinkách



Výhody:

1. Přesně definovaný antigen
2. Stabilní, skladovatelný
3. Nevylučuje vedlejší účinky

Nevýhody

1. Drahá purifikace
2. Odlišná konformace proteinu

Table 11.1 Human disease agents for which recombinant vaccines are currently being developed

Pathogenic agent	Disease(s)
Viruses	
Varicella-zoster virus	Chicken pox
Cytomegalovirus	Infection in infants and immunocompromised patients
Dengue virus	Hemorrhagic fever
Hepatitis A virus	High fever, liver damage
Hepatitis B virus	Long-term liver damage
Herpes simplex virus type 2	Genital ulcers
Influenza A and B viruses	Acute respiratory disease
Japanese encephalitis virus	Encephalitis
Parainfluenza virus	Inflammation of the upper respiratory tract
Rabies virus	Encephalitis
Respiratory syncytial virus	Upper and lower respiratory tract lesions
Rotavirus	Acute infantile gastroenteritis
Yellow fever virus	Lesions of heart, kidney, and liver
Human immunodeficiency virus	AIDS
Bacteria	
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera
<i>E. coli</i> enterotoxin strains	Diarrheal disease
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorrhea
<i>Haemophilus influenzae</i>	Meningitis, septicemic conditions
<i>Mycobacterium leprae</i>	Leprosy
<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningitis
<i>Bordetella pertussis</i>	Whooping cough
<i>Shigella</i> strains	Dysentery
<i>Streptococcus</i> group A	Scarlet fever, rheumatic fever, throat infection
<i>Streptococcus</i> group B	Sepsis, urogenital tract infection
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumonia, meningitis
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanus
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis
<i>Salmonella typhi</i>	Typhoid fever
Parasites	
<i>Onchocerca volvulus</i>	River blindness
<i>Leishmania</i> spp.	Internal and external lesions
<i>Plasmodium</i> spp.	Malaria
<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomiasis
<i>Trypanosoma</i> spp.	Sleeping sickness
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Filariasis

Příklady rekombinantních vakcín (vakcín obsahujících rekombinantní antigeny)

Product	Company	Therapeutic indication	Date approved
Recombinant vaccines			
<i>Hepatitis B</i>			
Ambirix (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	GlaxoSmithKline	Immunization against hepatitis A and B	2002 (EU)
Pediarix (combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization of children against various conditions inducing hepatitis B	2002 (US)
HBVAXPRO (r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i>)	Aventis Pharma	Immunization of children & adolescents against hepatitis B	2001 (EU)
Twinrix (adult & pediatric forms in EU. Combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham (EU); GlaxoSmithKline (US)	Immunization against hepatitis A and B	1996 (EU) (adult), 1997 (EU) (pediatric), 2001 (US)
Infanrix-Hexa (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, <i>Haemophilus influenzae</i> type b, hepatitis B and polio	2000 (EU)
Infanrix – Penta (combination vaccine, containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, polio and hepatitis B	2000 (EU)
Hepacare (r S, pre-S & pre-S2 HBsAg produced in a mammalian (murine) cell line)	Medeva Pharma	Immunization against hepatitis B	2000 (EU)
Hexavac (combination vaccine, containing rHBsAG produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B, polio and <i>H. influenzae</i> type B	2000 (EU)
Procomvax (combination vaccine, containing r HBsAg as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against <i>H. influenzae</i> type B and hepatitis B	1999 (EU)
Primavax (combination vaccine, containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	Aventis Pasteur	Immunization against diphtheria, tetanus, and hepatitis B	1998 (EU)
Infanrix Hep B (combination vaccine containing rHBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against diphtheria, tetanus, pertussis and hepatitis B	1997 (EU)
Twinrix (adult and pediatric forms; combination (pediatric) vaccine containing r HBsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> as one component)	SmithKline Beecham	Immunization against hepatitis A and B	1996 (EU) (adult), 1997 (EU)
Comvax (combination vaccine, containing HbsAg produced in <i>S. cerevisiae</i> , as one component)	Merck	Vaccination of infants against <i>H. influenzae</i> type B and hepatitis B	1996 (US)

Přehled hlavních typů vakcín

A. vakcíny vyrobené tradiční technologií:

- živá vakcína
 - virulentní (dnes se již nepoužívá)
 - heterologní
 - atenuovaná
- inaktivovaná vakcína
 - celobuněčná
 - toxoidová
- subjednotková
 - s purifikovaným antigenem
 - se syntetickým antigenem
 - ribozomální

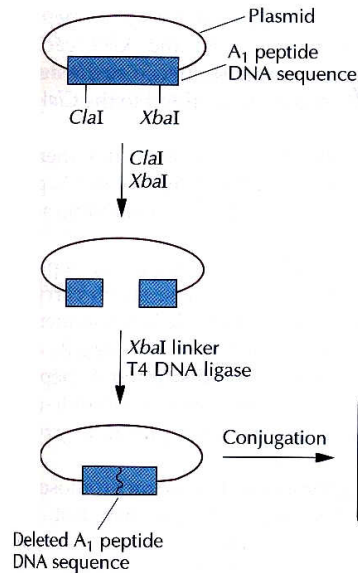
B. rekombinantní vakcíny:

- subjednotková
 - s deletovaným genem
 - vektorová

C. DNA vakcíny

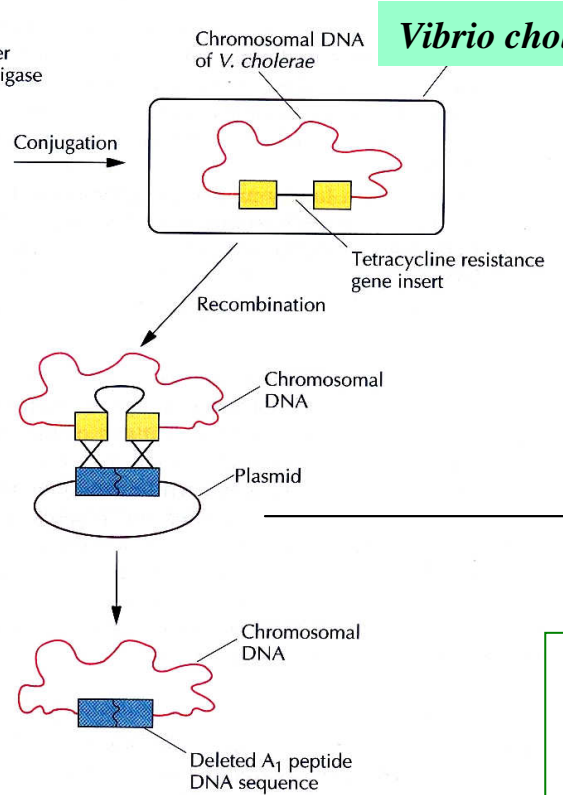
D. antiidiotypové vakcíny - Vakcína připravená z protilátek, které považují jiné protilátky za antigen a naváží se na ně. Antiidiotypové vakcíny mohou stimulovat organismus k vytváření protilátky proti nádorovým buňkám

Strategie pro vytvoření delece části peptidu A1 cholera toxinu – příprava kandidátního vakcinačního kmene



Vyštěpení části sekvence kódující peptid A1 (klonované v plasmidovém vektoru) – vyštěpí se ~ 90% aminokyselin

Cirkularizace vektoru (připojení XbaI-linkeru, štěpení XbaI, ligace)

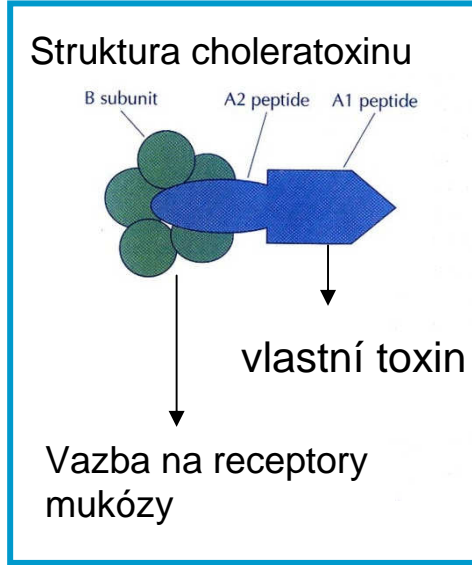


Vibrio cholerae

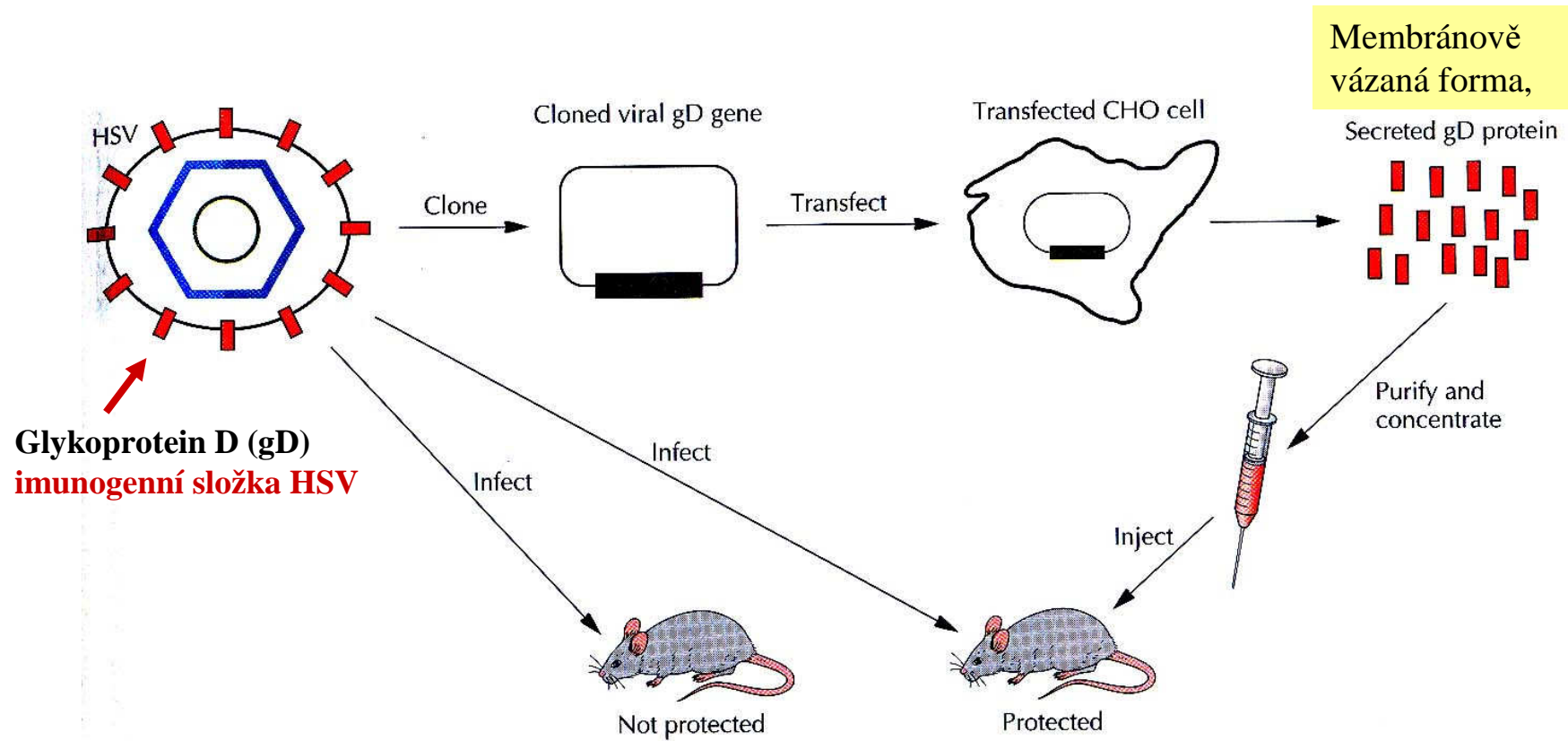
Přenos vektoru do kmene, v němž je uvnitř genu pro A1 začleněn gen pro rezistenci k tetracyklinu (A1 je inaktivován, buňky jsou TetR) – potenciální reverze A1 vyčleněním tetR – proto není vhodný jako vakcína

Vektor se po několika generacích spontánně vyřadí

Selekce buněk TetS, obsahujících deletovanou formu A1 – tyto buňky tvoří složku A2 a B, a jsou proto imunogenní – reverze není možná



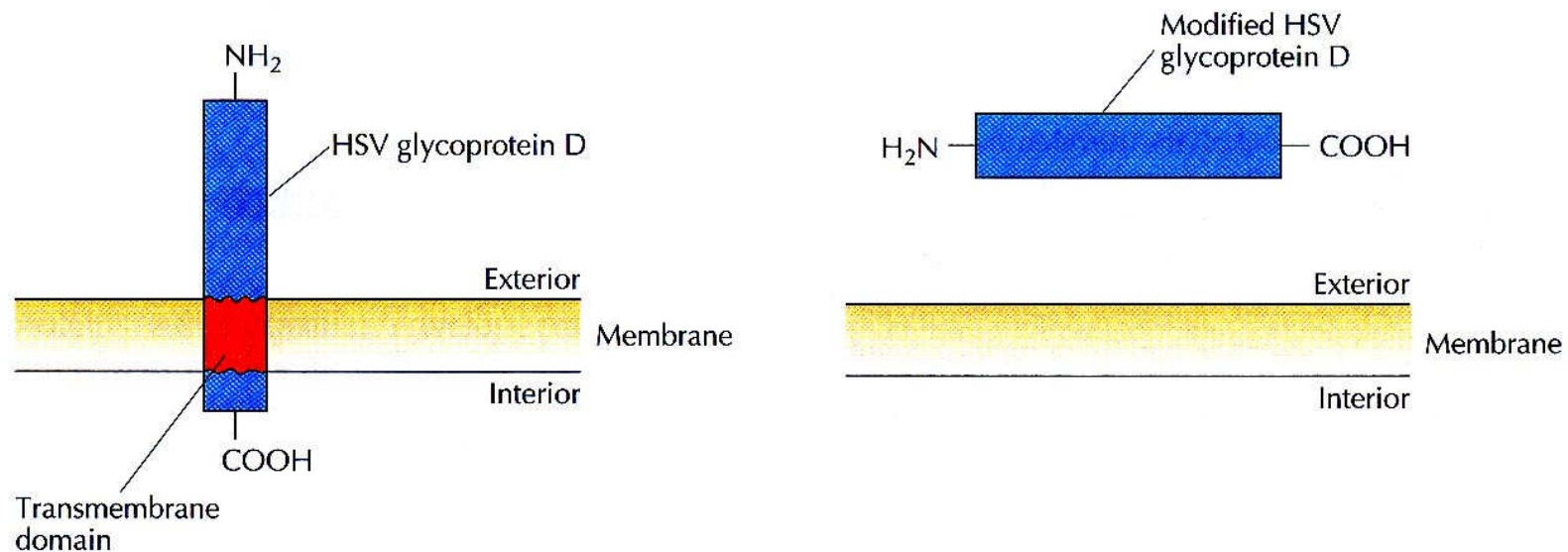
Příprava podjednotkové vakcíny proti HSV v buňkách CHO (chinese hamster ovary)



HSV – onkogenní virus, sexuálně přenosná onemocnění, encefalitida, infekce oka

Úprava genu pro plášťový glykoprotein (gD) HSV pro získání rozpustné formy gD

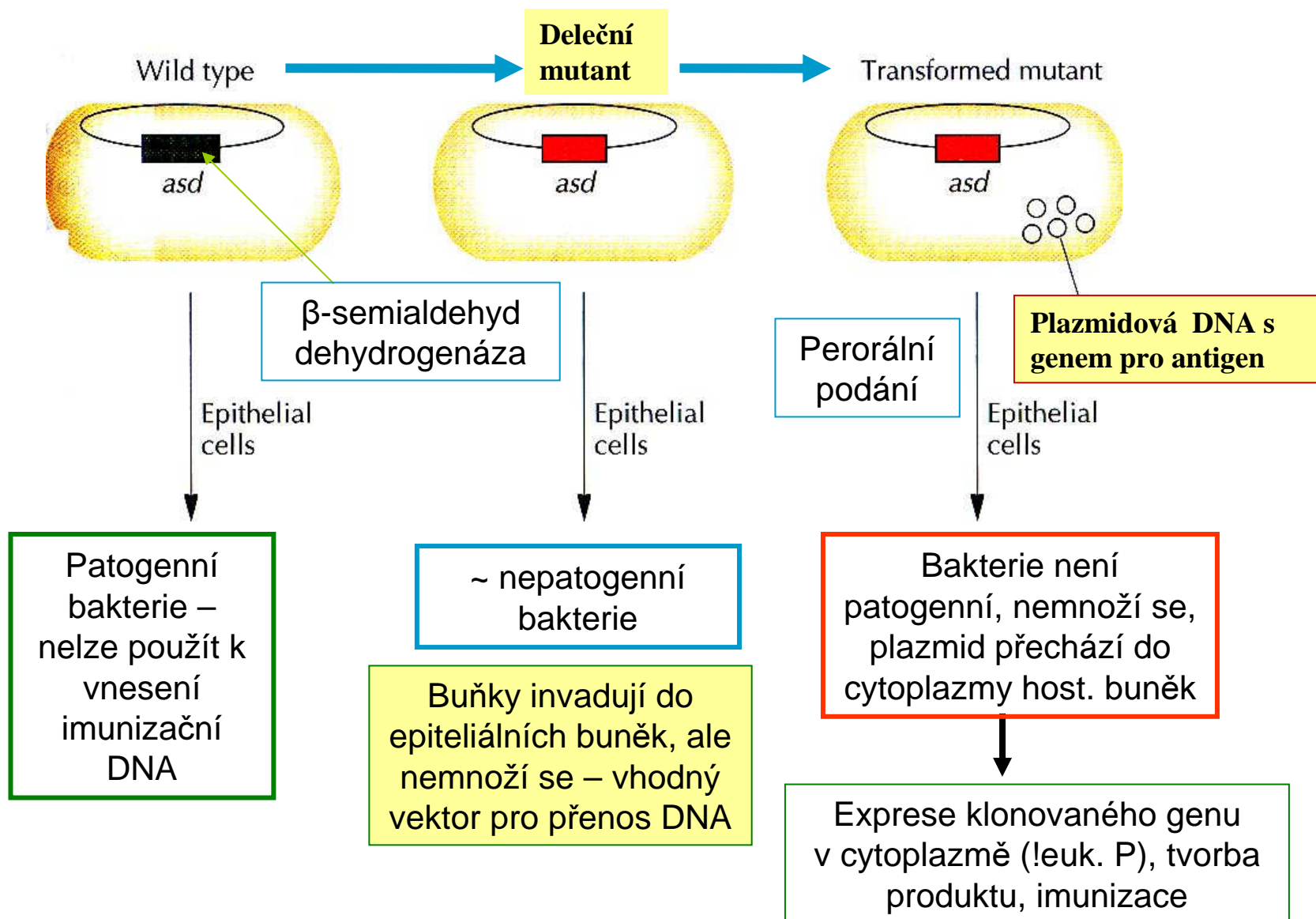
Klonování a exprese genu v savčích expresních systémech (CHO)



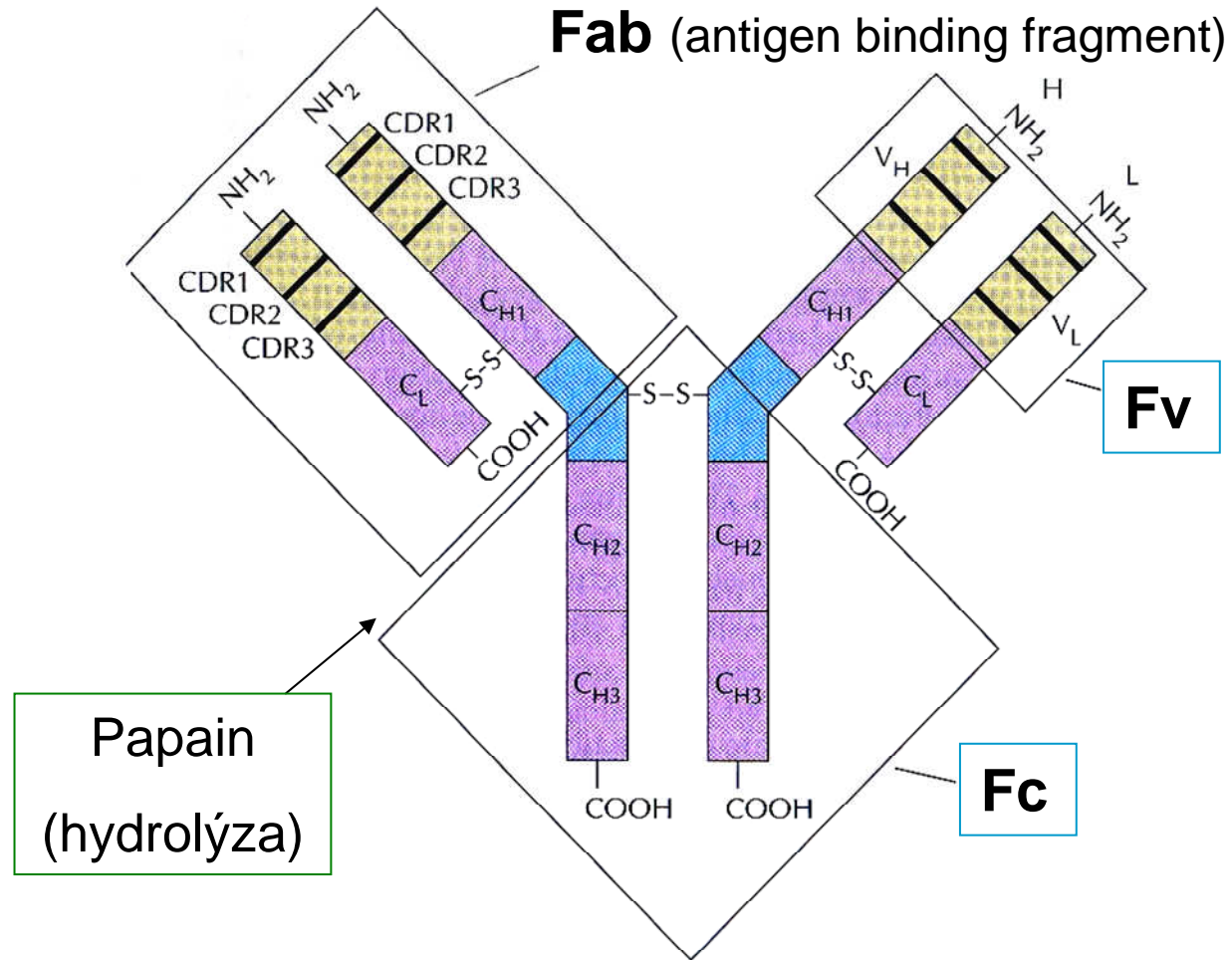
Kompletní gen pro gD obsahující C-terminální úsek kódující transmembránovou doménu – tato forma gD je obtížně purifikovatelná

V genu pro gD byla oblast kódující transmembránovou doménu deletována, výsledný produkt je rozpustný a lze jej snáze purifikovat

Využití patogenního druhu *Shigella flexneri* jako živého vektoru k přenosu DNA pro **genetickou imunizaci** do savčích epitelálních buněk



Struktura protilátky



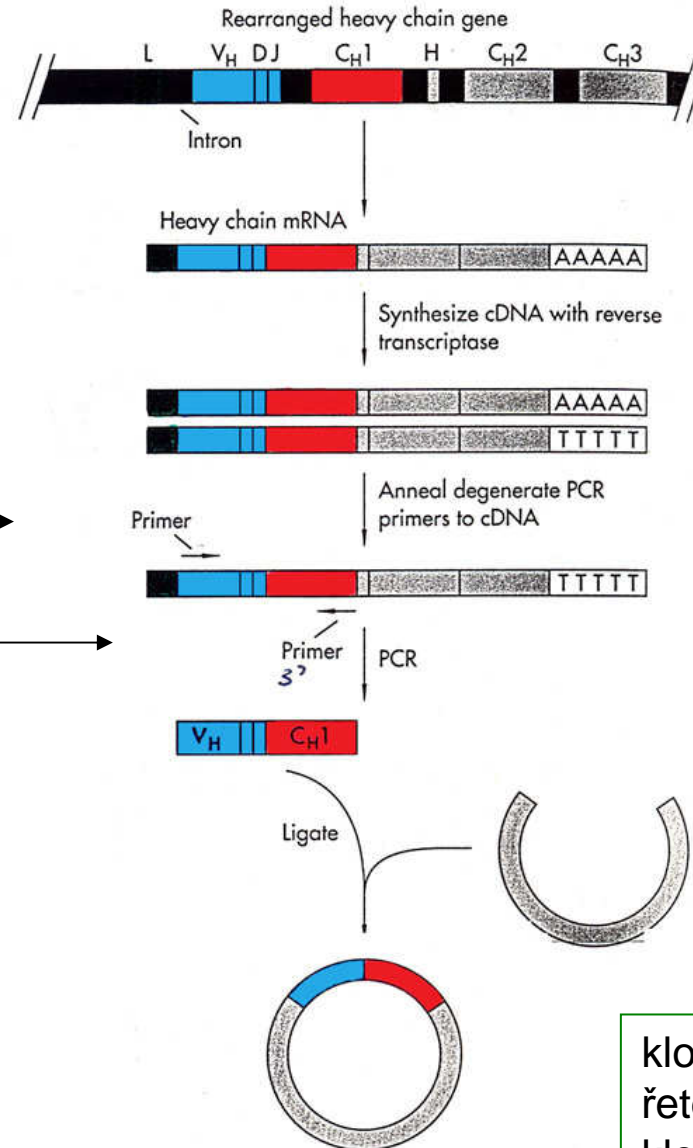
Klonování cDNA pro přípravu rekombinantních protilátek

Lymfocyty získané z imunizované myši (přeskupené geny)

Soubor degenerovaných 5'-primerů

Stejný primer pro všechny

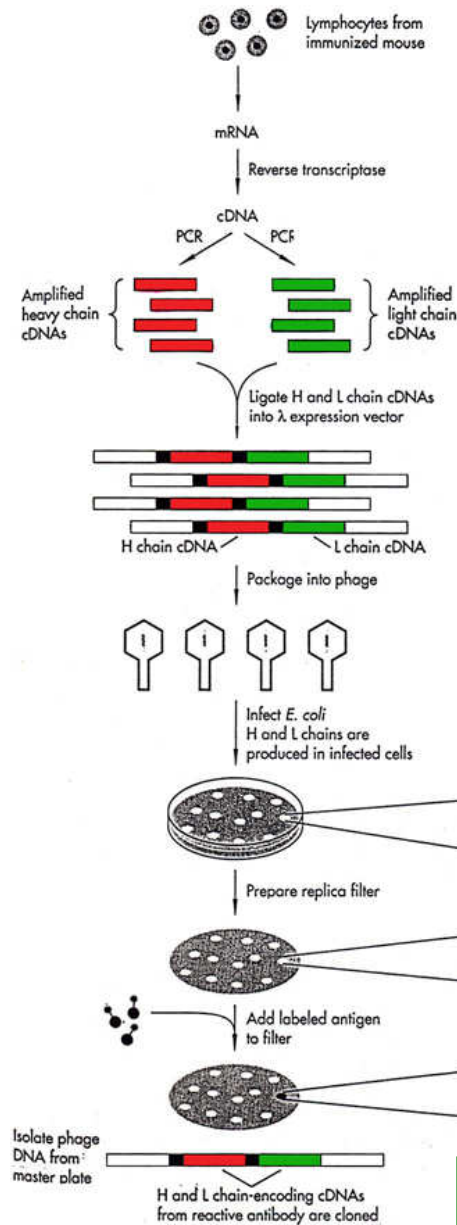
Soubor cDNA pro těžké řetězce



Kombinace milionů klonů pro těžké a pro lehké řetězce

klonovaná cDNA pro těžký řetězec, stejným způsobem se klonuje cDNA pro lehký řetězec

Příprava specifické protilátky



Příprava milionů cDNA nesoucích informaci pro L a H řetězce

Amplifikace genů pro L a H řetězce pomocí PCR, klonování do fágového vektoru

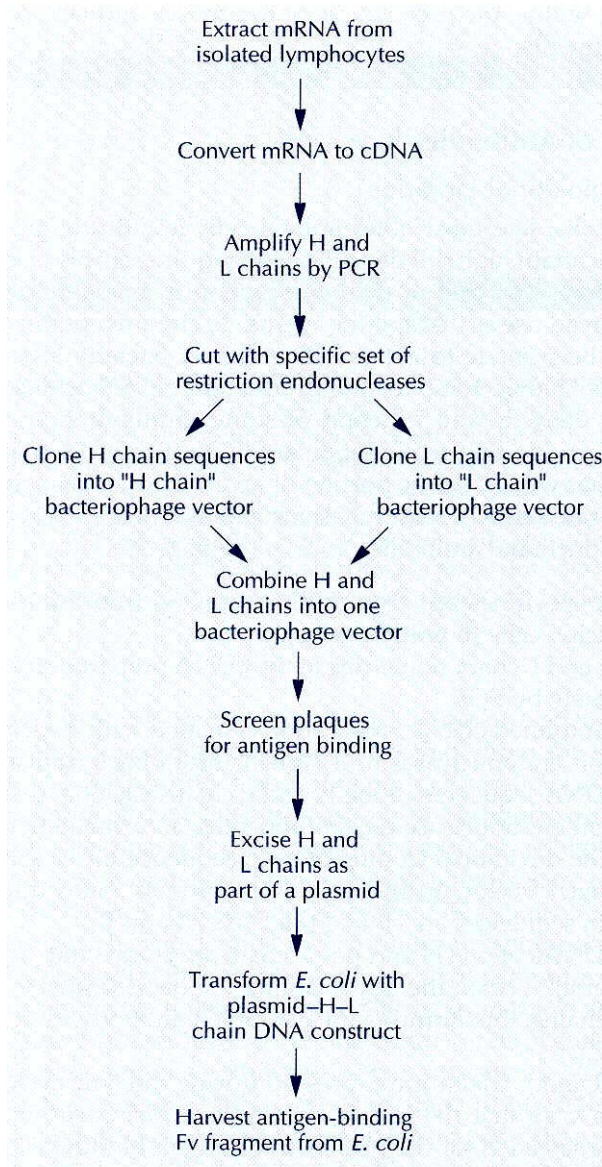
Každý fág obsahuje náhodnou kombinaci L a H

Soubor fágů představující kombinatorickou fágovou knihovnu

Miliony „monoklonálních“ protilátek

Překlonování do expresního savčího nebo bakteriálního vektoru

Příprava kombinatorické knihovny V_L - a V_H - oblastí protilátek v *E. coli* ve vektoru lambda



Lidské B-lymfocyty

PCR

cDNA H a L řetězců mají odlišná místa pro různé RE, což umožňuje jejich oddělené klonování

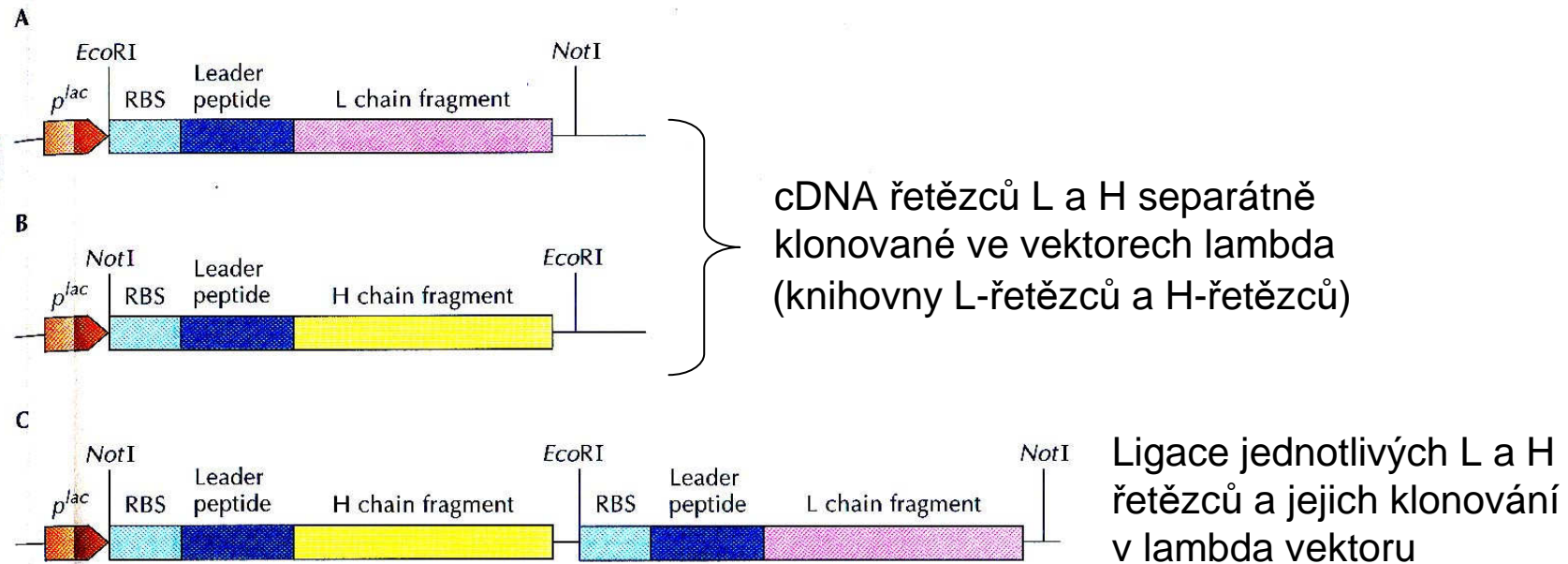
Mnoho různých kombinací – každý „kombinatorický vektor“ obsahuje jednu kombinaci.

selekce

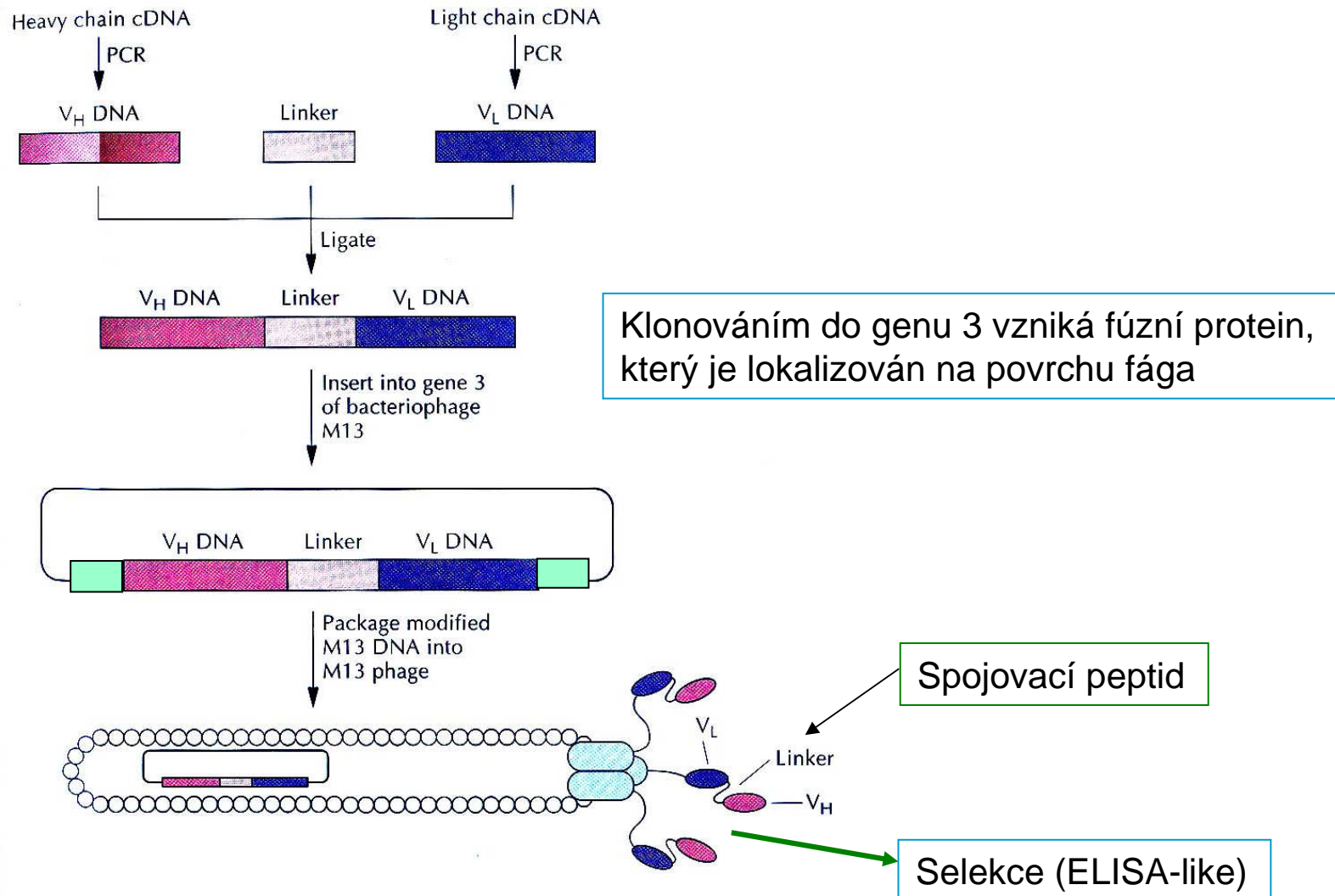
Překlonování vybraných kombinací do plasmidu (fág buňky lyzuje a není možné získat větší množství produktu)

Využití v diagnostice/terapii

Konstrukce kombinatorické knihovny Fv ve vektoru bakteriofága lambda



Vytvoření kombinatorické knihovny Fv protilátek ve vektoru fága M13 (fágemidech)



Důvod pro přípravu humanizovaných protilátek:

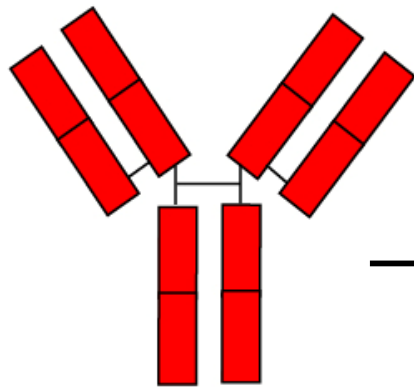
obtížná příprava lidských monoklonálních protilátek konvenční hybridomovou technologií

- Lidské chromozomy v hybridomech vytvořených po fúzi lidských lymfocytů s myšími myelomovými buňkami jsou nestabilní, takže se takové hybridomy produkující monoklonální protilátky vytvářejí jen vzácně
- Nejsou k dispozici linie lidských myelomových buněk, které by mohly nahradit myší myelomové buňky při tvorbě hybridomů
- I kdyby bylo možné vytvářet lidské hybridomové buněčné linie, bylo by to proti lékařským etickým zásadám (injikování specifických antigenů do člověka za účelem jiným než terapeutickým, a odběr části sleziny pro získání lymfocytů)

Transgenní myši s geny pro lidské imunoglobuliny v YAC (jejich vlastní geny pro Ig knokautovány, pak imunizace, např. tetanotoxinem – tvoří lidské protilátky)

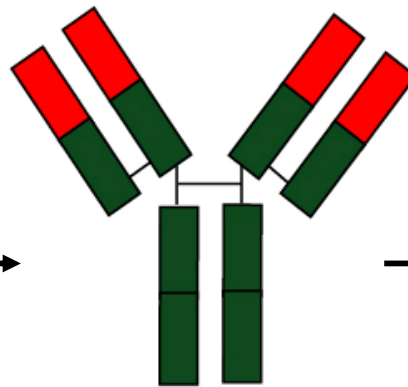
Příprava humanizovaných protilátek

Myší protilátka



Variabilní, konstantní a hypervariabilní oblasti jsou z protilátek myši

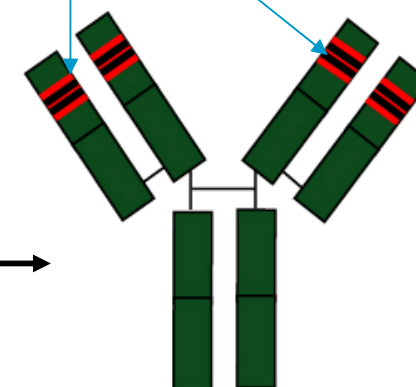
Chimerická protilátka



Konstantní oblast je z lidské protilátky, variabilní a hypervariabilní oblasti jsou z myši

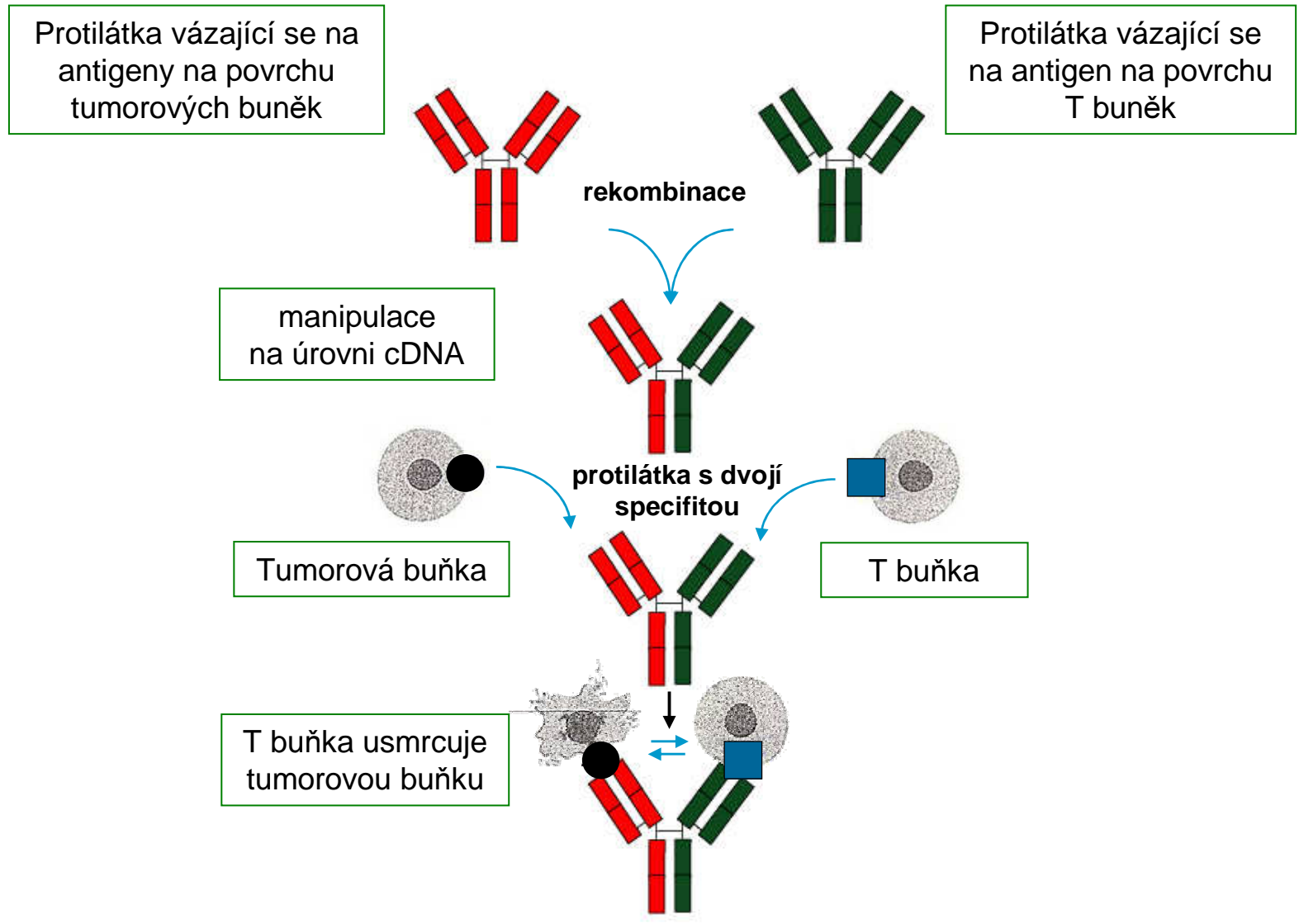
Humanizovaná protilátka

CDRs - complementarity determining regions

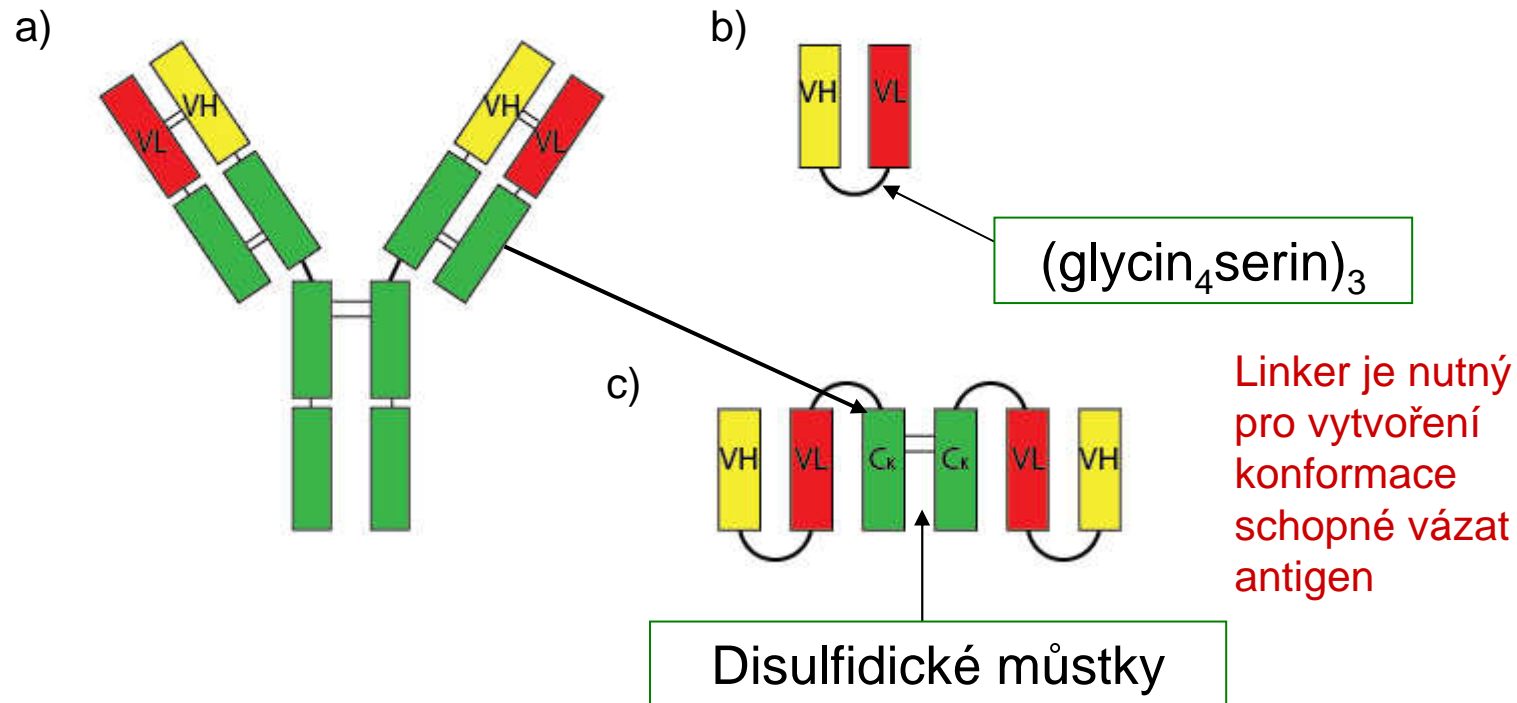


Hypervariabilní oblasti jsou z myších protilátek, ostatní jsou lidské

Protilátka s dvojí specifitou



scFv - single chain antibody variable region fragments (SCA)



scFv – terapeutické agents – nové vazebné schopnosti, nižší imunogenicita v důsledku chybění Fc domény, snadnější penetrace do cílového místa (pevné nádory atp).

Some therapeutic monoclonal antibodies that have been approved for human use in either the United States or European Union

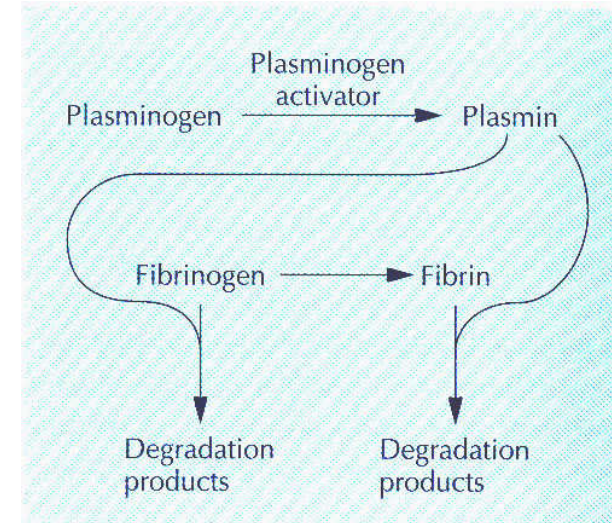
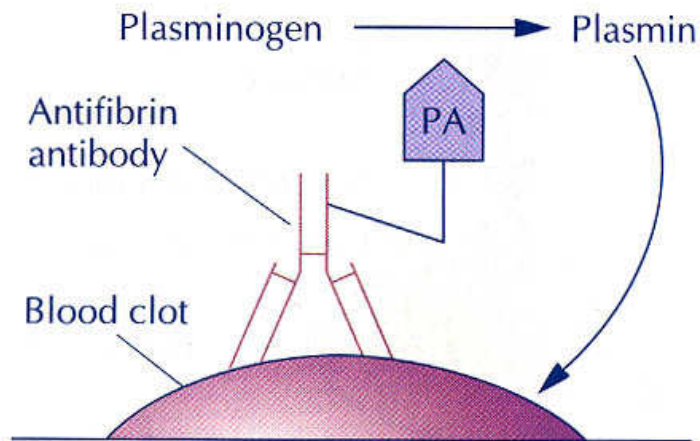
Date of approval	Type of antibody	Company	Therapeutic use
1986	Mouse	Ortho Biotech	Prevention of acute kidney transplant rejection
1994	Chimeric	Centocor	Prevention of blood clots
1997	Chimeric	Genentech, Idec Pharmaceuticals	Non-Hodgkin lymphoma
1997	Humanized	Protein Design Labs, Hoffmann-La Roche	Prevention of acute kidney transplant rejection
1998	Chimeric	Centocor, Schering-Plough	Crohn disease and rheumatoid arthritis
1998	Chimeric	Novartis	Prevention of acute kidney transplant rejection
1998	Humanized	Genentech	HER2-positive breast cancers
1998	Humanized	Medimmune	Respiratory syncytial virus infection in children
1998	Chimeric	Hoffmann-La Roche	Non-Hodgkin lymphoma
2000	Humanized	American Home Products, Celltech	Relapsed acute myeloid leukemia
2001	Humanized	Millennium Pharmaceuticals, Schering	Chronic lymphocytic leukemia
2001 pending	Humanized	Genentech, Novartis, Tanox	Asthma

In addition to the antibodies listed here, 11 have been approved for diagnostic purposes.

Imunotoxin = MAB s navázaným toxinem (ricin, difterický toxin aj)

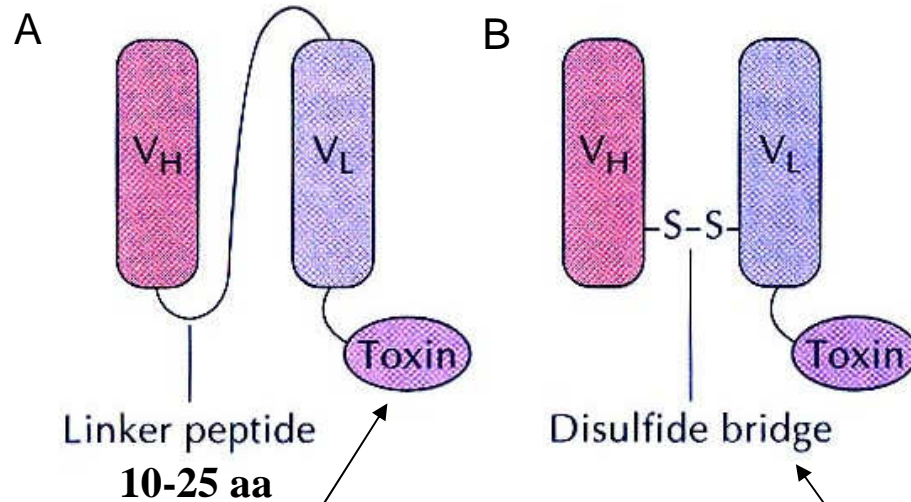
Terapeutické protilátky

Aktivace plazminogenu na plazmin, degradace fibrinu



Struktura imunoterapeutické trombolytické protilátky. Antifibrinová protilátka (monoklonální protilátka specifická pro fibrin, který se nachází v krevní sraženině) je vázána s aktivátorem plazminogenu (PA). Když se protilátka naváže na fibrin, PA vede k akumulaci plazminu v blízkosti sraženiny. Plazmin (proteáza fibrinolyzin) pak degraduje krevní sraženinu.

Schematické znázornění struktury „single-chain“ Fv imunotoxinů (scFv)



- exotoxin A *Pseudomonas*
- difterický toxin
- ricin

Protinádorové působení (vazba na receptory a povrchové proteiny nádorových buněk)

Záměna peptidového linkeru za disulfidický můstek několikanásobně zvyšuje stabilitu scFv a tím zlepšuje jeho terapeutické využití

Např. fúzní protein
HER2-Ig + exotoxin *Pseudomonas*

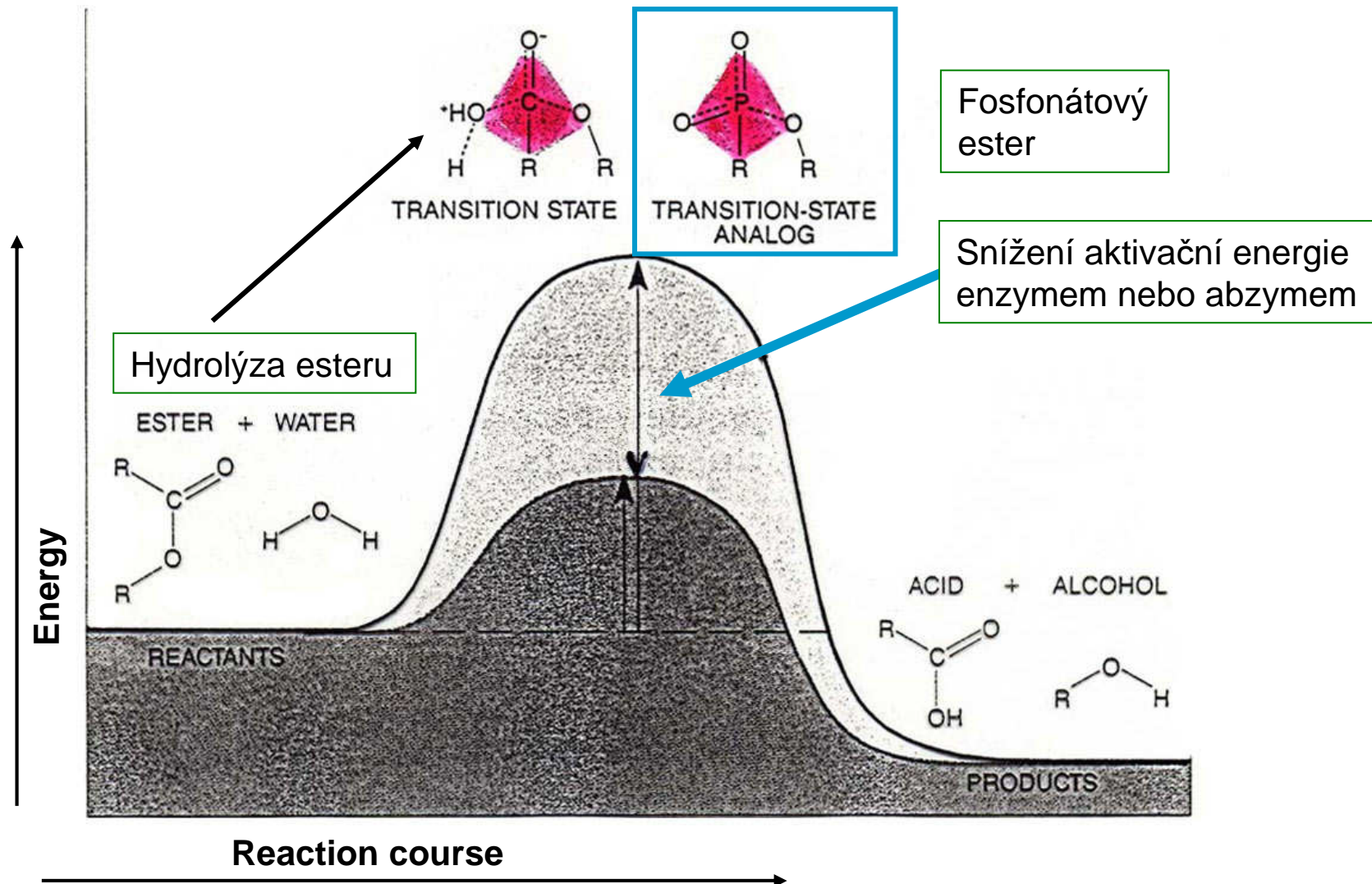
human epidermal growth factor receptor 2 -Approximately 30% of breast cancers have an amplification of the *HER2/neu* gene or overexpression of its protein product.

Pbs21 (plasmodium) + Shiva-1

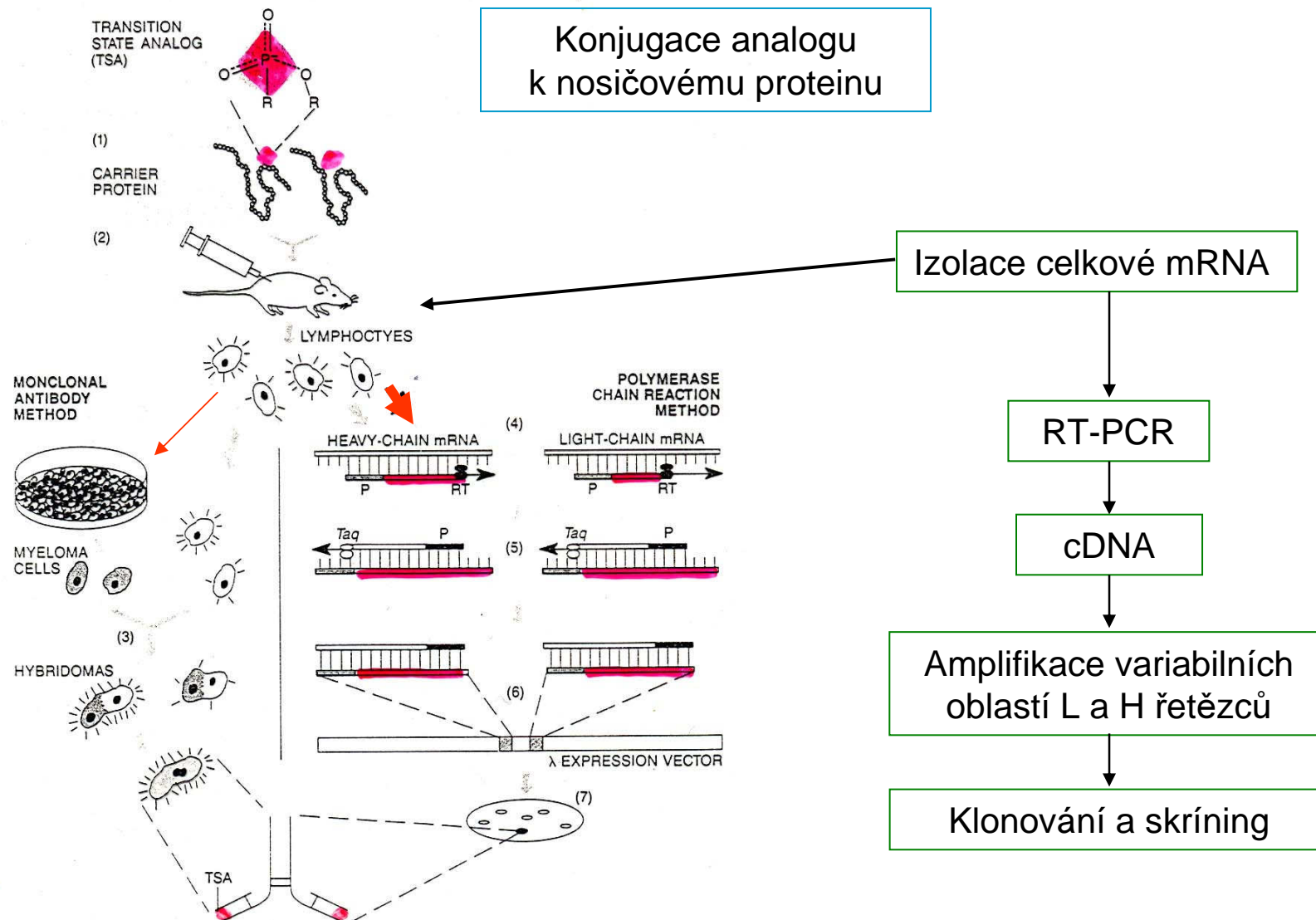
- An abzyme (from antibody and enzyme), also called catmab (from catalytic monoclonal antibody), is a monoclonal antibody with catalytic activity. Molecules which are modified to gain new catalytic activity are called synzymes. Abzymes are usually artificial constructs, but are also found in normal humans (anti-vasoactive intestinal peptide autoantibodies) and in patients with the autoimmune disease systemic lupus erythematosus, where they can bind and hydrolyze DNA. **Abzymes are potential tools in biotechnology, e.g., to perform specific actions on DNA.**
- Enzymes function by lowering the activation energy of the transition state, thereby catalyzing the formation of an otherwise-less-favorable molecular intermediate between reactants and products. **If an antibody is developed to a stable molecule that's similar to an unstable intermediate of another (potentially unrelated) reaction, the developed antibody will enzymatically bind to and stabilize the intermediate state, thus catalyzing the reaction.**

Abzym (Ab-enzym)

catmab (catalytic monoclonal antibody)



Příprava protilátky s enzymovou aktivitou (abzymu)



Genetická imunizace - DNA vakcíny

Gen kódující antigen je vnesen do buněk zvířete, v nichž je pak tento antigen produkován a zvíře vytváří protilátky.

Přenos DNA:

- biolistická metoda: rekombinantní plazmid (E. coli) nesoucí gen pro antigen pod kontrolou virového promotoru je vnesen např. do boltce myši
- injekce velkých množství DNA (100 mg rek. plazmidu) přímo do svalů zvířat – účinnost přenosu až 70%
- elektroporace

Výhody:

- antigen je správně posttranslačně upraven a není třeba jej purifikovat
- na jednom plazmidu mohou být v jednom kroku přeneseny geny pro více antigenů

Nevýhoda:

- neznalost osudu přenesené DNA v buňkách, začlenění do genomu hostitele a přerušení genů – proto je výhodnější transientní exprese (extrachromozomální stav)

Příklady virových antigenů: chřipka, HIV, bovinní HV, vzteklna, HBV, rotavirus, slintavka a kulhavka, aj.

Bakteriální antigeny: Clostridium tetani, Mycobacterium tuberculosis,

Proteinové inženýrství

Navrhování, vyvíjení a příprava proteinů s vylepšenými charakteristikami (pozměněné nebo zcela nové proteiny)

A. Využití mutagenese *in vitro* pro záměnu klíčových aminokyselin (bodové mutace)

- zvýšení termostability proteinů (lysozym aj)
- rezistence proteinů k oxidativnímu stresu
- zvýšení bioaktivity proteinů

druhá generace farmak s vylepšenou farmakokinetikou, strukturou, stabilitou a biologickou dostupností

(inzulin – zvýšení schopnosti absorpce, tkáňový plazminogenový aktivátoru – zvýšení poločasu oběhu)

Příklad: Subtilizin – hydrolýza proteinů, např. v detergentech

prakticky každá vlastnost této serinové proteázy byla pozměněna/optimalizována:

- rychlost katalýzy,
- substrátová specifita,
- tolerance k pH,
- tolerance k oxidačním látkám,
- termostabilita.
- zvýšená stabilita v org. rozpouštědlech (změna konformace proteinu)

B. Makromodifikace proteinů

Část genu se eliminuje vyštěpením restričního fragmentu nebo nahradí chemickou syntézou části genu.

- Klenowův fragment DNA polymerázy, který postrádá 3'-5' exonukleázovou aktivitu.
- Přidání aminokyselin = stabilizace cizích proteinů v *E. coli*.
- Zvýšení afinity proteinů k iontům kovů vložením sekvence His-X3-His do alfa-helixu – zvýšení rezistence k denaturaci.
- Jeden gen je fúzován s druhým za vzniku kompletně nového proteinu. Varianty protilátek – jednořetězcové protilátky (SCA – single chain antibodies) jsou umělé protilátky složené z vazebných oblastí těžkého a lehkého řetězce, které jsou spojeny chemicky a vytvářeny v mikroorganismech pomocí expresních vektorů.
- Příprava purifikovaných imunogenních složek v prokaryotických nebo eukaryotických systémech (vakcína proti hepatitidě B ve kvasinkách, vakcína proti *Salmonella typhimurium* – oslabení kmene vnesením mutace do genomu)
- Nepatogenní mikroorganismy použité jako vektory pro expresi cizích genů zodpovědných za imunogenicitu (rekombinantní vakcíny, které stabilně exprimují cizí geny: u *Vibrio cholerae* byl připraven kmen s delecí v genu pro cholerový toxin – mutace byla vnesena rekombinací do standardního kmene. Výsledný kmen produkoval imunogenní, avšak netoxický „toxin“ (netoxickou B podjednotku toxinu).
- viry jako vektory pro expresi imunologicky aktivních proteinů (virus vakcinie – rekombinantní vakcíny proti vzteklině)

- Genetickou úpravou lze připravit bakterii, která by produkovala modré barvivo používané na džínovinu. Výroba barviva by byla mnohem ekologičtější nežli současná chemická syntéza, která ročně produkuje asi 16 000 tun tohoto barviva.
- Podle evropské legislativy budou muset být takové džíny na viditelném místě označeny nápisem: "Vyrobeno z geneticky modifikovaných organismů".

Genové inženýrství



Genové inženýrství se zabývá vytvářením pozměněných či nových genů a jejich zaváděním do organismů s cílem rekonstruovat jejich genetickou výbavu.

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

Objevy, které umožnily cíleně manipulovat s DNA

- **restrikční endonukleázy a další enzymy**
 - rozštěpení DNA v přesně definovaném místě
 - spojení dvou cizorodých DNA (DNA z různých organismů)
 - syntéza DNA ve zkoumavce
- **sekvenování DNA**
 - stanovení molekulární struktury genu
- **klonování genů**
 - zavedení genu do nepříbuzných organismů
 - **(překonání mezidruhových barrier)**
 - pomnožení genu do neomezeného množství
 - cílené zavádění mutací do genu
 - studium projevu pozměněných genů (mutace → funkce)

Etapy vzniku a vývoje genového inženýrství

1965 - objev plazmidů

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 - sekvenování DNA

1978 - příprava lidského inzulinu v bakteriích
(od r. 1982 vyráběn komerčně)

**** mutageneze *in vitro* - proteinové inženýrství

**** příprava transgenních organismů (rostliny, živočichové)

1980 - genové terapie

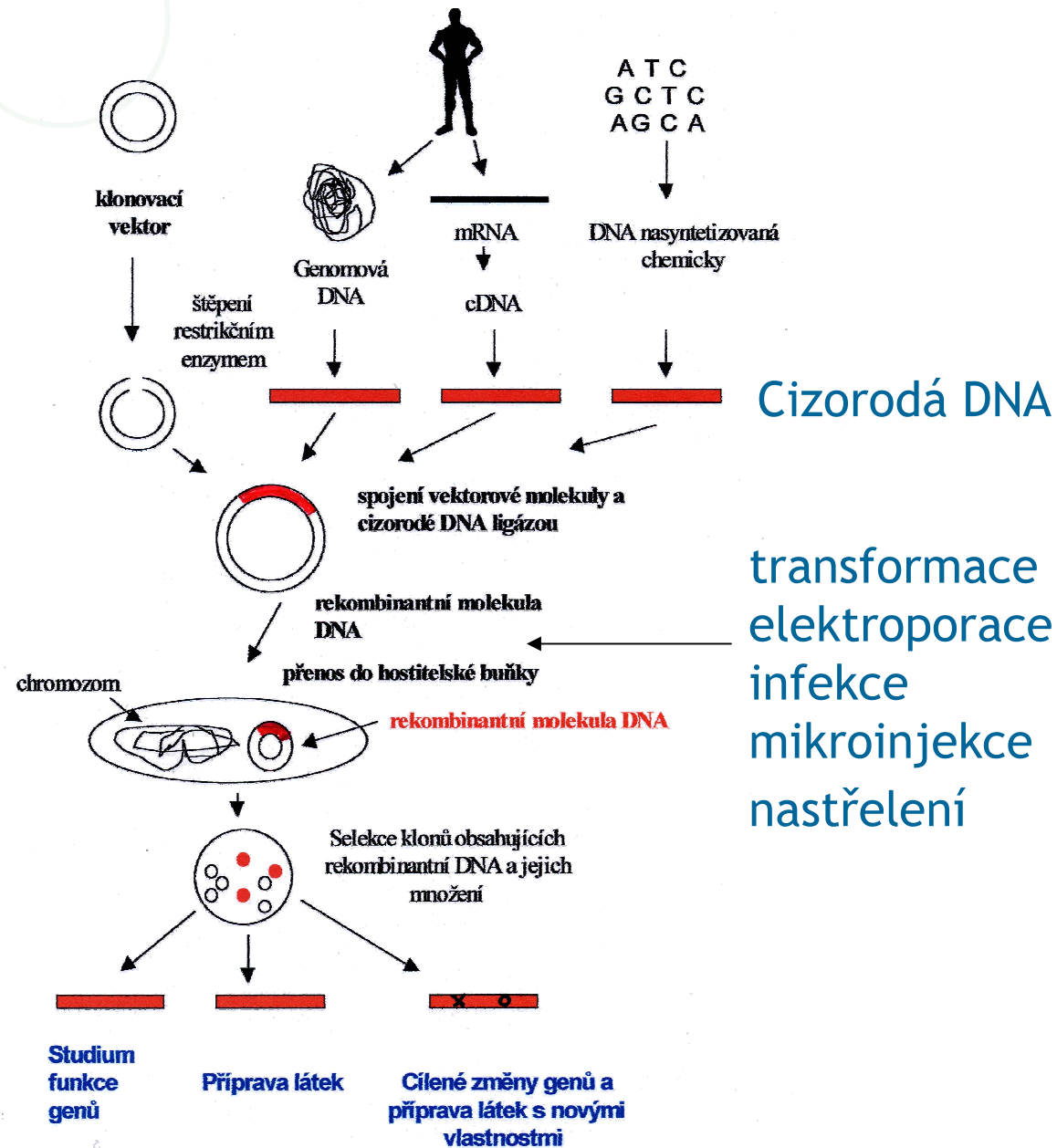
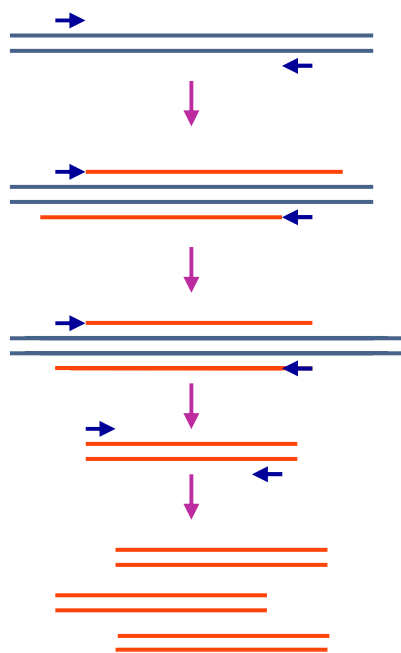
1997 - klonování živočichů

Využití genového inženýrství

- **Základní výzkum: studium struktury a funkce genů a genomů**
- **Praktické aplikace:**
 - **Příprava látek významných v lékařství, zemědělství a průmyslu**
 - vnášení cizorodých genů do nepříbuzných organismů a získávání produktů ve velkém množství - *překonání reprodukčních bariér*
 - **Příprava látek s novými vlastnostmi** pozměňováním stávajících nebo vytvářením nových genů - *enzymy, protilátky, vakcíny aj.*
 - **Pozměňování a zlepšování vlastností organismů**
 - 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)
 - **Genová terapie** - léčba genetických chorob

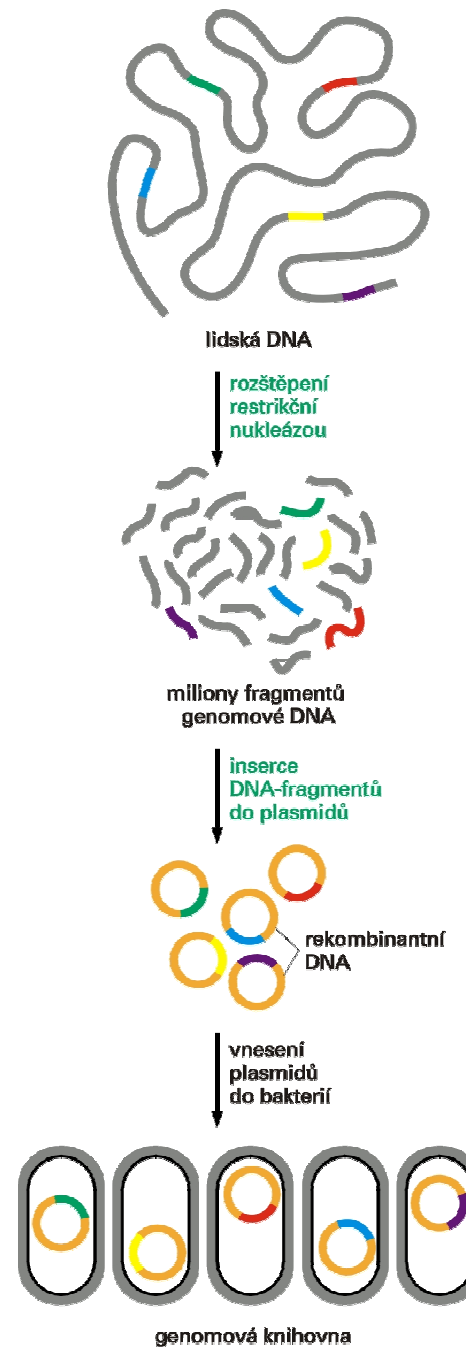
Klonování genů pomocí vektorů

Klonování genů pomocí PCR

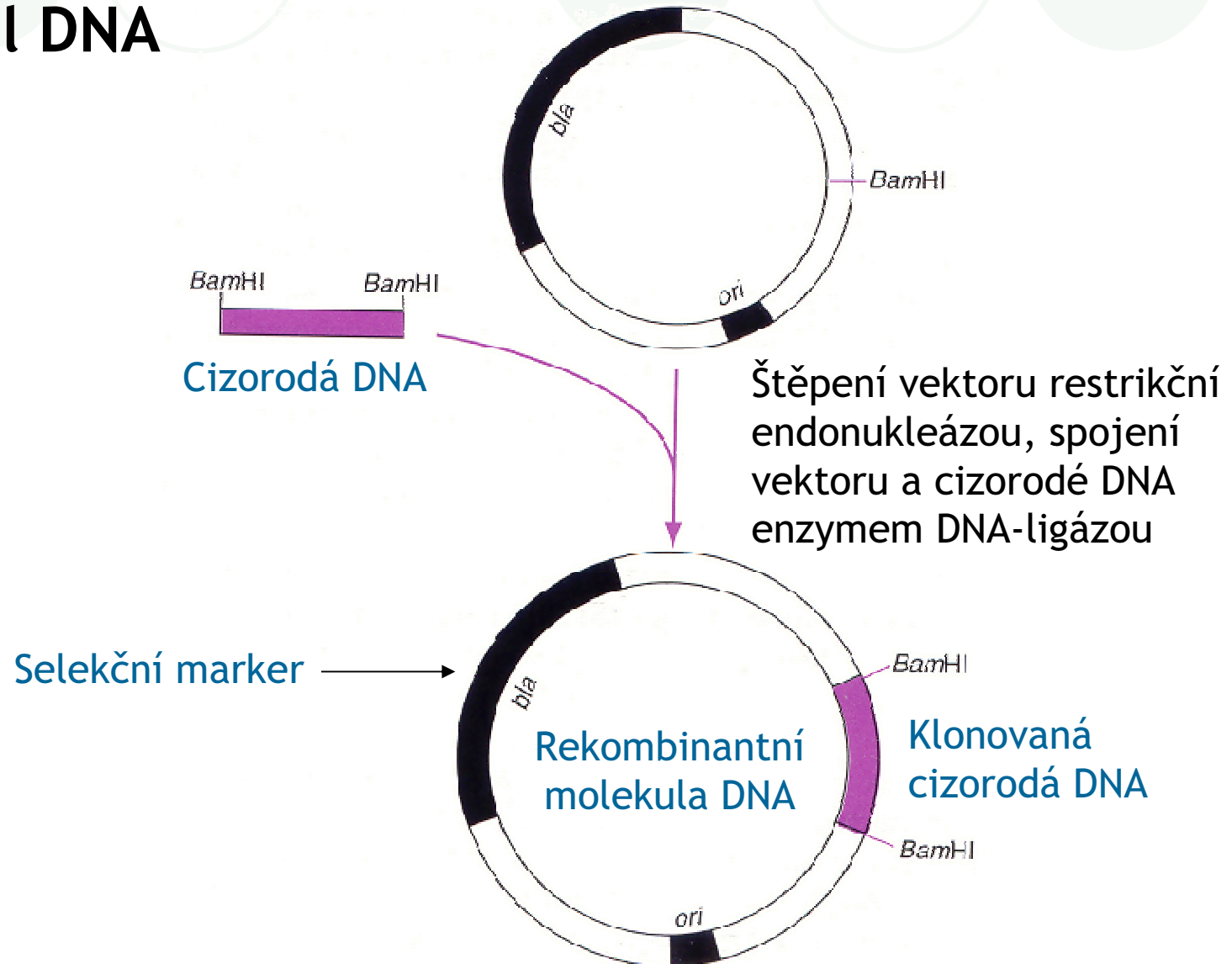


Konstrukce (lidské) genomové knihovny

Soubor klonovaných fragmentů genomové DNA, které dohromady reprezentují celý genom příslušného organismu.

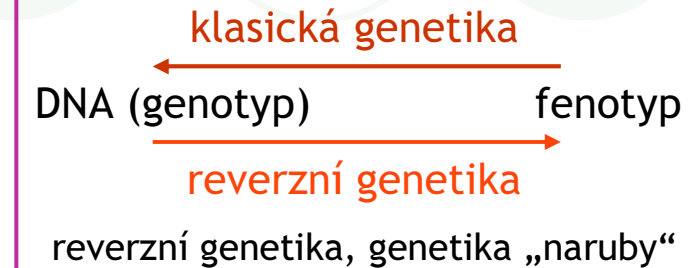


Příprava rekombinantních molekul DNA



Mutageneze *in vitro*

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



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

typy mutací: **substituce, delece, inserce**

Cíle: analýza vztahu mezi strukturou a funkcí NK

- Objasnění funkce genů a regulačních oblastí
- Cílení změny aminokyselin v proteinech
- Příprava proteinů s novými vlastnostmi (proteinové inženýrství)
- Příprava transgenních organismů

Mutagenese *in vitro*

Mutagenese *in vitro*

náhodná

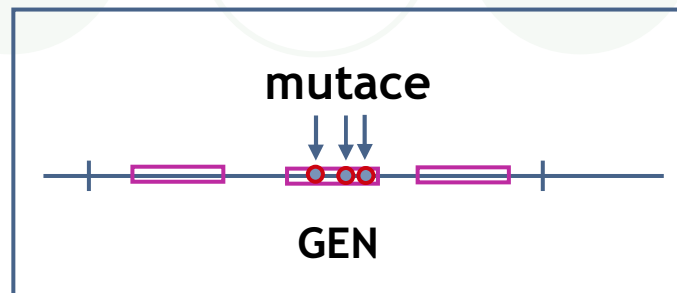
manipulace s restričními místy
inzerce linkerů
chemická mutagenese
inkorporace chybných bází

vyhledání genu nebo
funkčních oblastí na DNA

cílená

oligonukleotidová mutagenese
(umístění do konkrétního místa)
syntéza genů
(kasetová mutagenese)

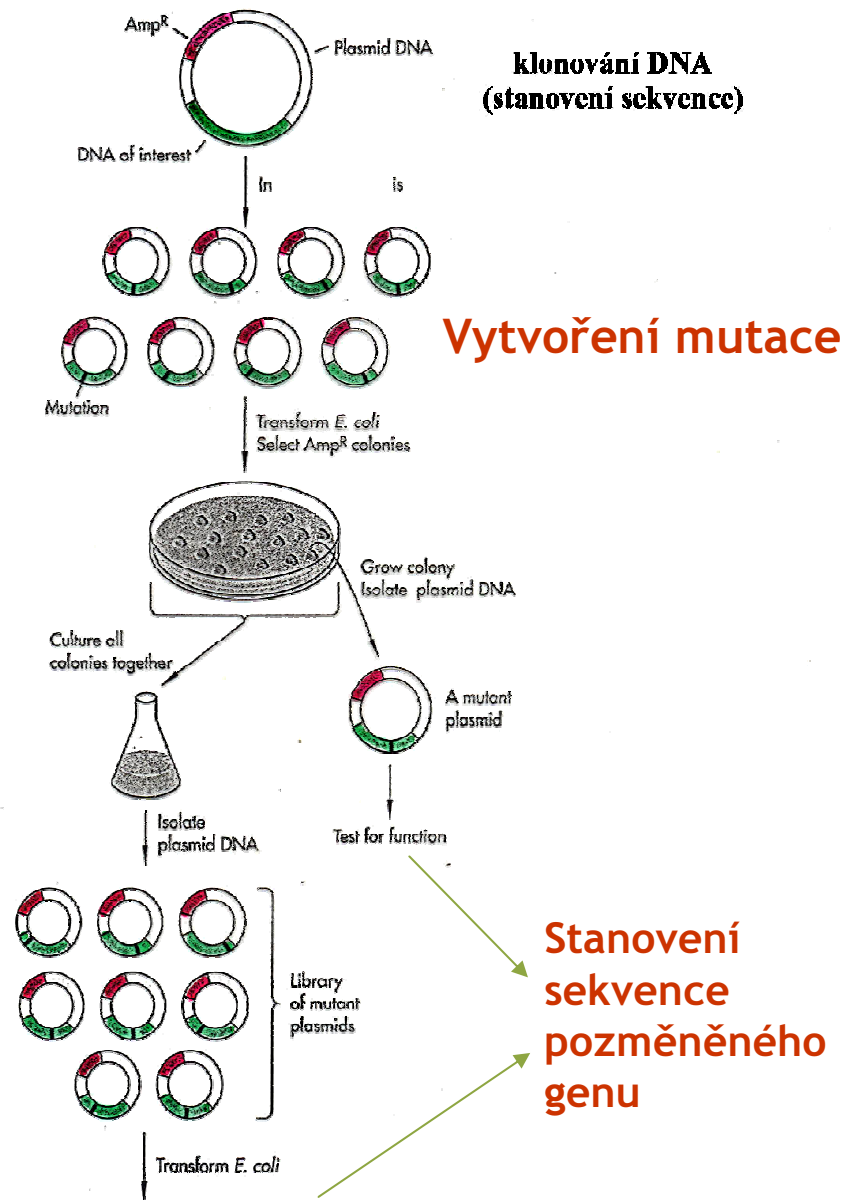
záměny bází nebo kodonů
cílené změny struktury
proteinů



Způsoby používané při mutagenезi in vitro

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

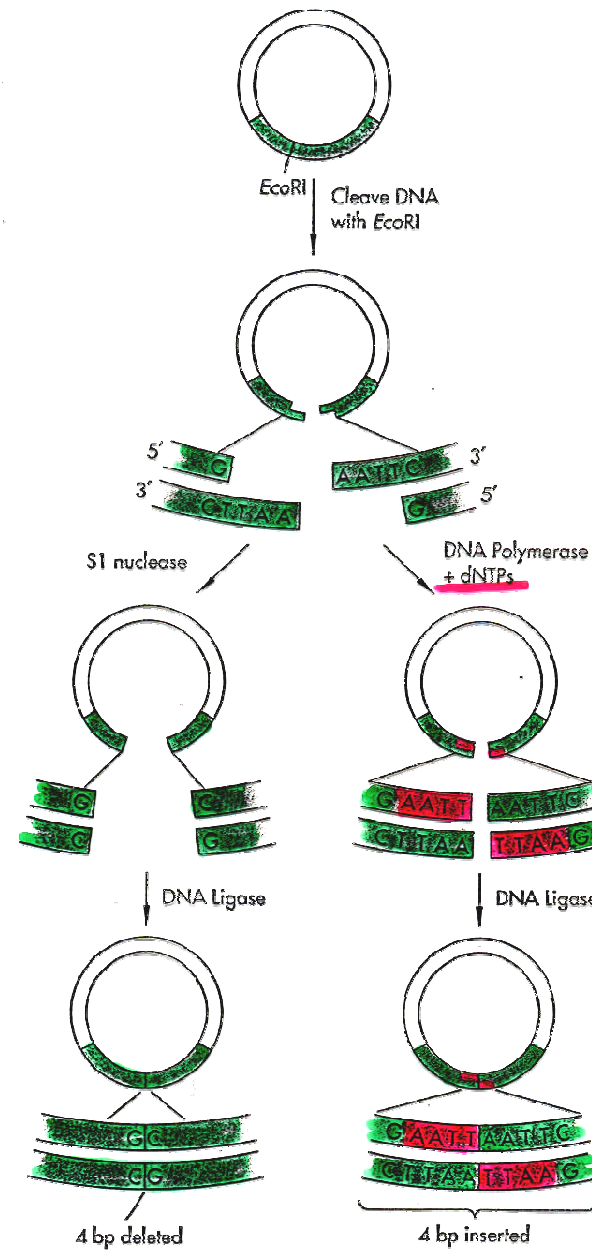
Obecná strategie při mutagenезi *in vitro*



Testování funkce pozměněného genu

Stanovení sekvence pozměněného genu

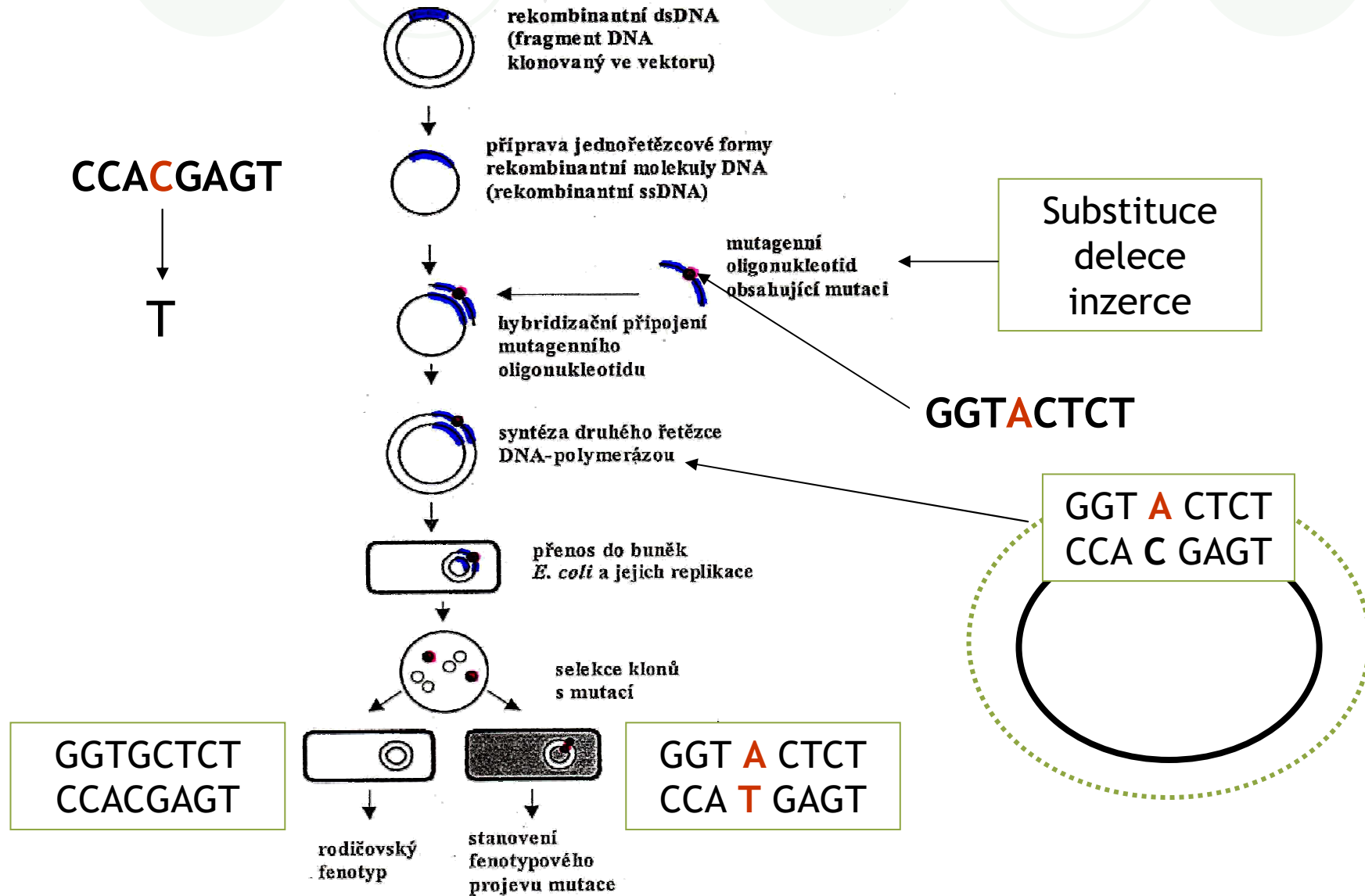
Vytváření mutací v restričním místě



- exonukleáza
- výběr dNTP

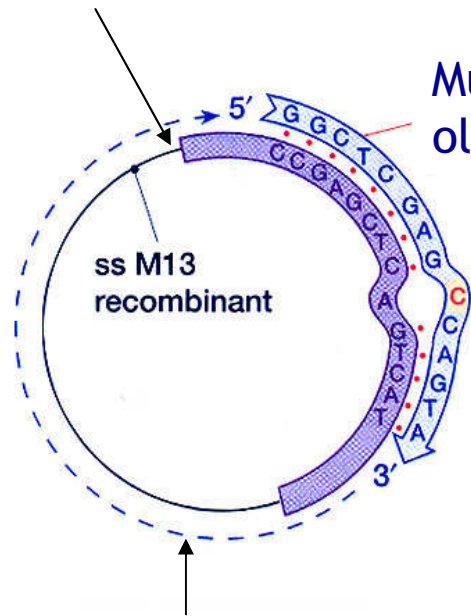
Vytváření inzercí nebo
delecí v sekvenci genu

Mutageneze pomocí mutantních oligonukleotidů



Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů

Rodičovská
(nemutantní) DNA



Nově syntetizovaná
(mutantní) DNA

Mutagenní
oligonukleotid

Nově syntetizovaná
mutantní DNA

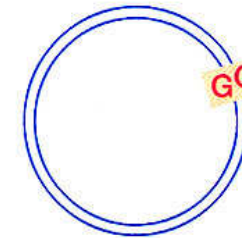
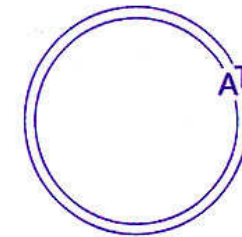


Dvojřetězcová
heteroduplexní DNA

Přenos do E.
coli

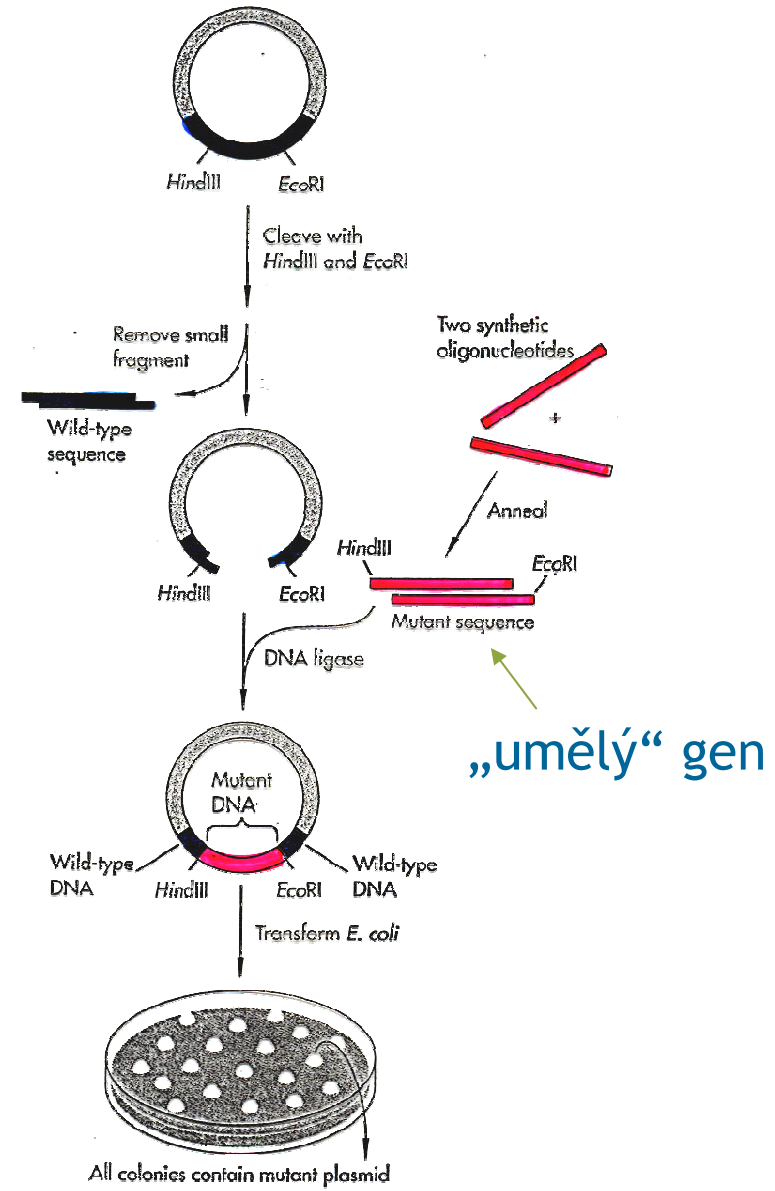


rodičovský homoduplex



mutantní homoduplex

Kazetová mutace



Proteinové inženýrství



Cíl: změna struktury a funkce proteinů prostřednictvím technologie rekombinantní DNA

- změny vazebných oblastí proteinů
- termostabilita
- rychlost a substrátová specifita reakcí
- citlivost k oxidaci a toxickým látkám

Předpoklady pro vytváření funkčních proteinů klonovaných genů

1. Transkripce genu

- přítomnost funkčních regulačních oblastí pro transkripci
- promotor, terminátor

2. Translace přepisu genu

- přítomnost signálů pro translaci
- SD, iniciační a terminační kodon
- výběr kodonů pro tRNA daného organismu

3. Posttranslační modifikace

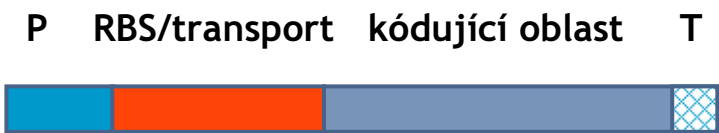
4. Transport proteinu

- signální sekvence funkční v daném hostiteli

Zajištění exprese cizorodých genů

bakteriální gen

eukaryotický gen



Hybridní (chimerický) gen



cDNA

Syntéza DNA *de novo*

Fúzní protein



štěpení, purifikace

zralý protein



Gen pro inzulin DNA



Transkripce



pre-mRNA



Sestřih



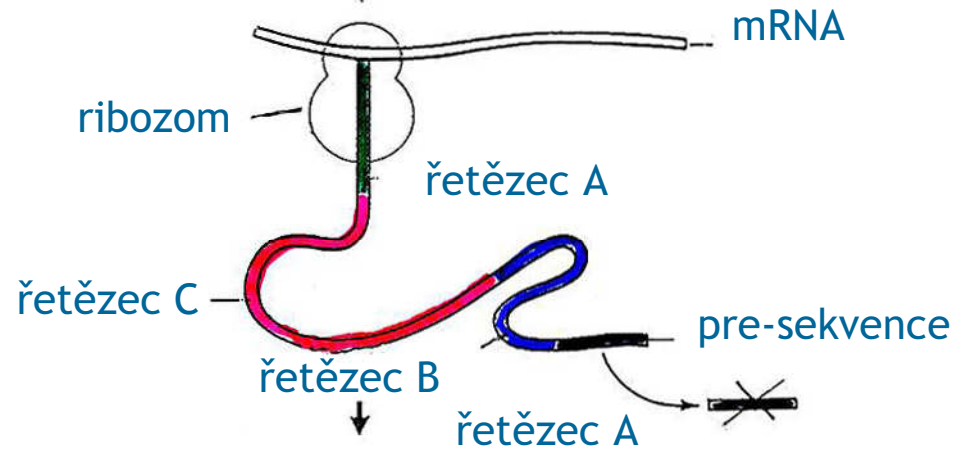
mRNA pro pre-proinzulin



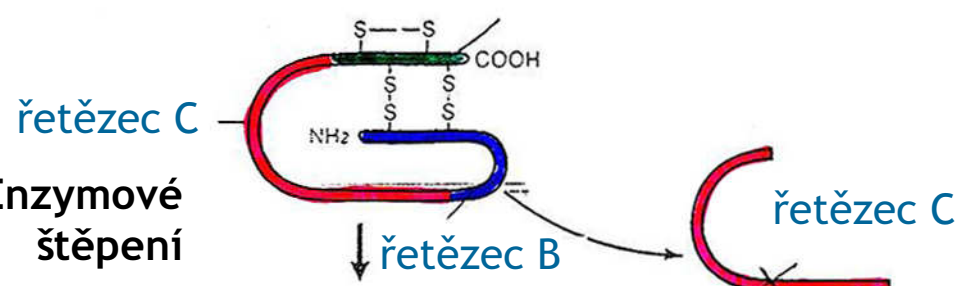
Translace



pre-proinzulin (preprohormon)

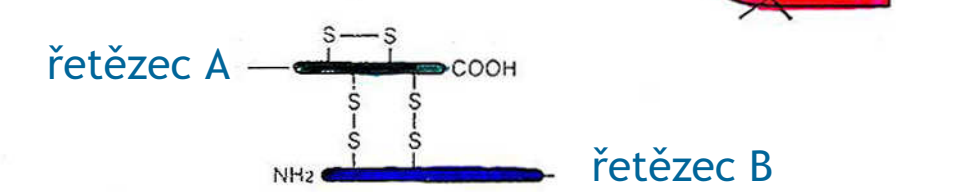


proinzulin (prohormon)

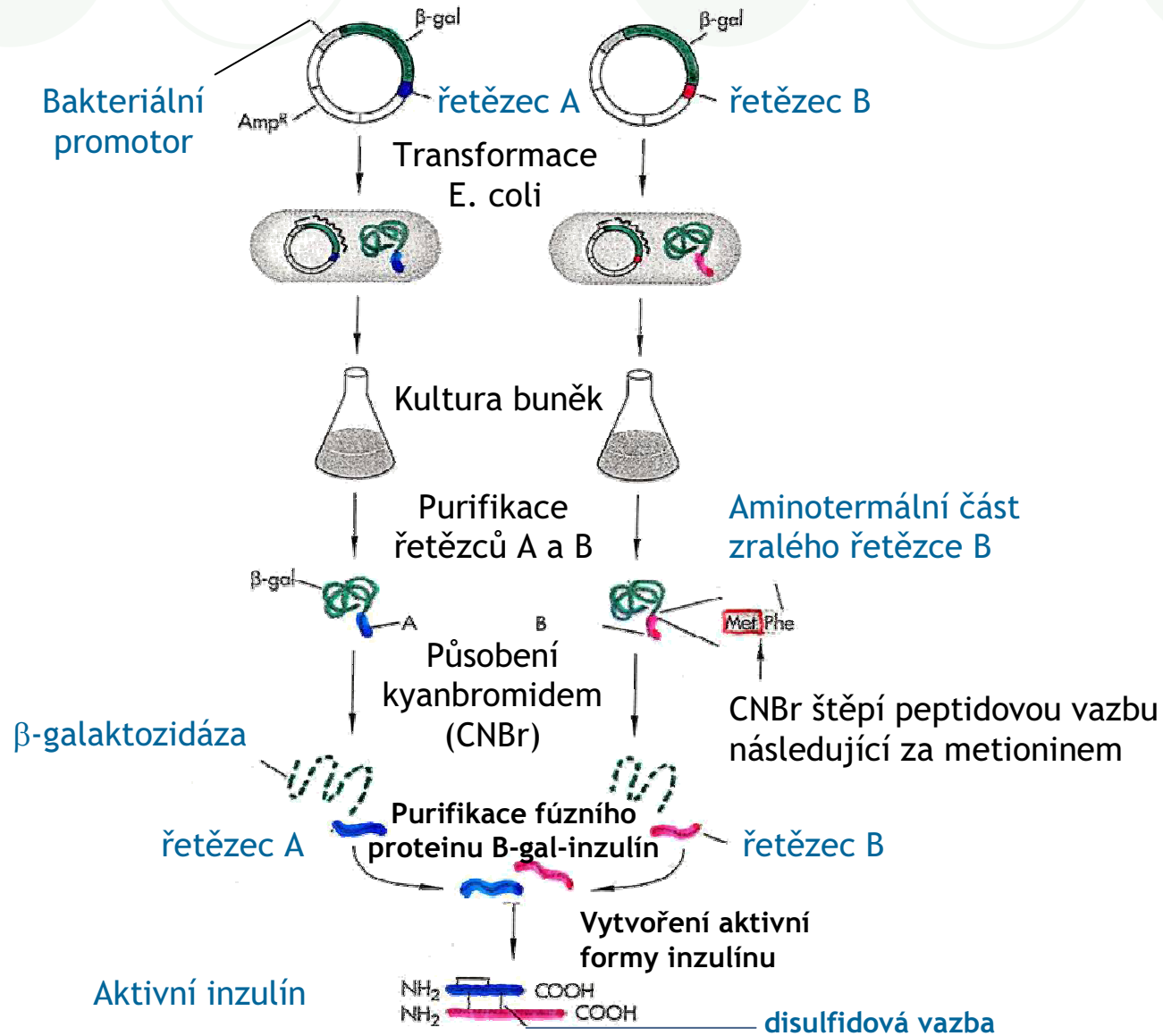


aktivní inzulin (zralý hormon)

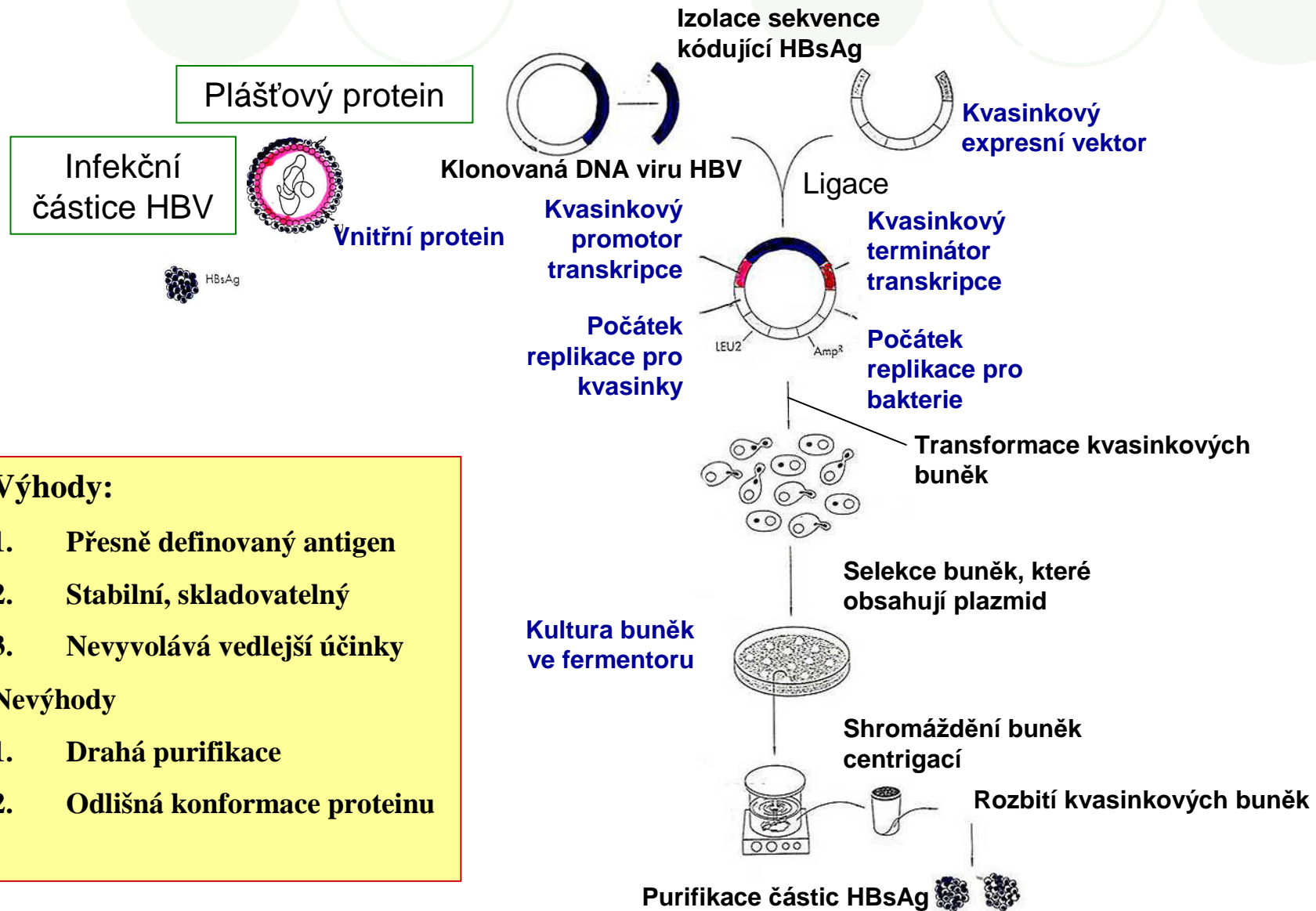
Enzymové štěpení



Příprava lidského inzulinu v bakteriálních buňkách



Příprava podjednotkové vakcíny viru hepatitidy B (HBV) ve kvasinkách



Výhody:

1. Přesně definovaný antigen
2. Stabilní, skladovatelný
3. Nevyvolává vedlejší účinky

Nevýhody

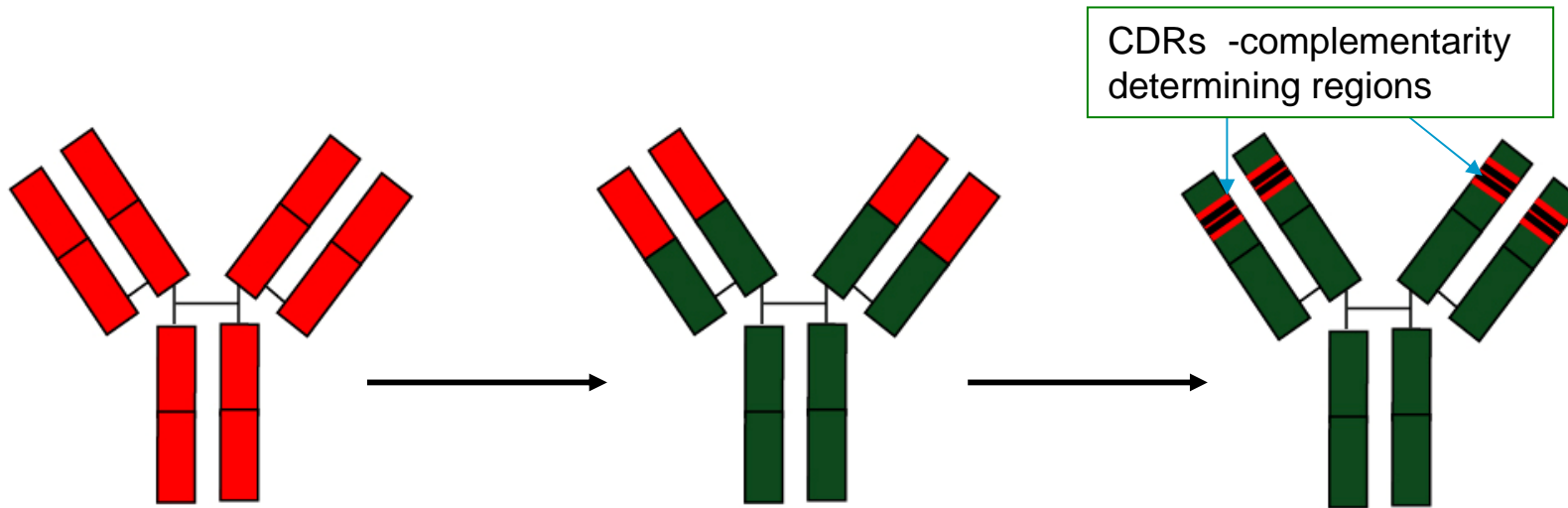
1. Drahá purifikace
2. Odlišná konformace proteinu

Příprava humanizovaných protilátek

Myší protilátka

Chimerická protilátka

Humanizovaná protilátka



Variabilní, konstantní a hypervariabilní oblasti jsou z protilátek myši

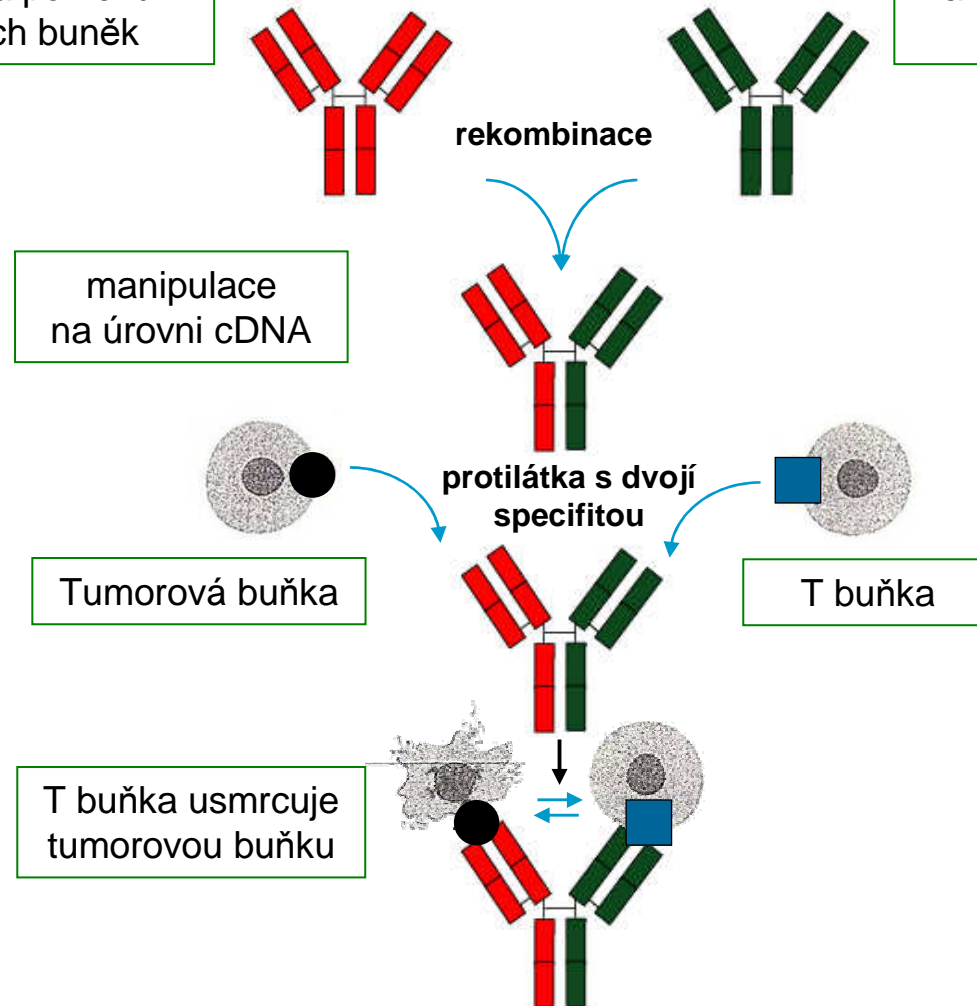
Konstantní oblast je z lidské protilátky, variabilní a hypervariabilní oblasti jsou z myši

Hypervariabilní oblasti jsou z myších protilátek, ostatní jsou lidské

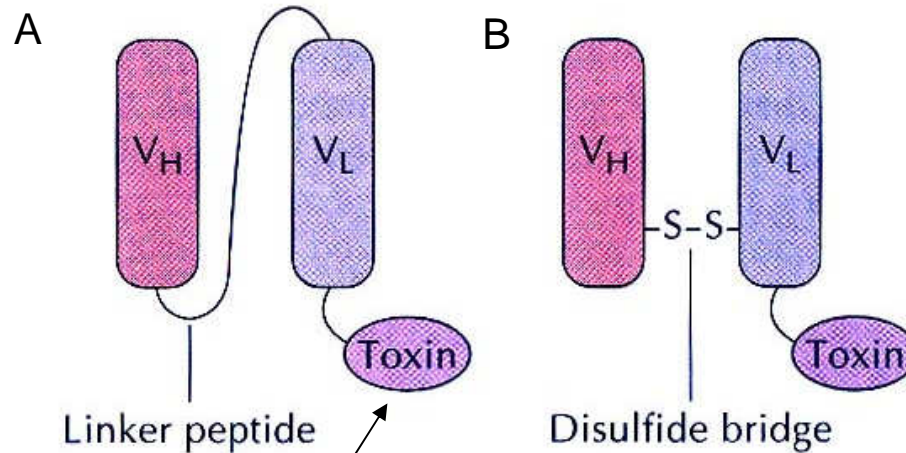
Protilátka s dvojí specifitou

Protilátka vázající se na antigeny na povrchu tumorových buněk

Protilátka vázající se na antigen na povrchu T buněk



Jednořetězcové protilátky a imunotoxiny



- exotoxin A *Pseudomonas*
- difterický toxin
- ricin

Protinádorové působení (vazba na receptory a povrchové proteiny nádorových buněk)

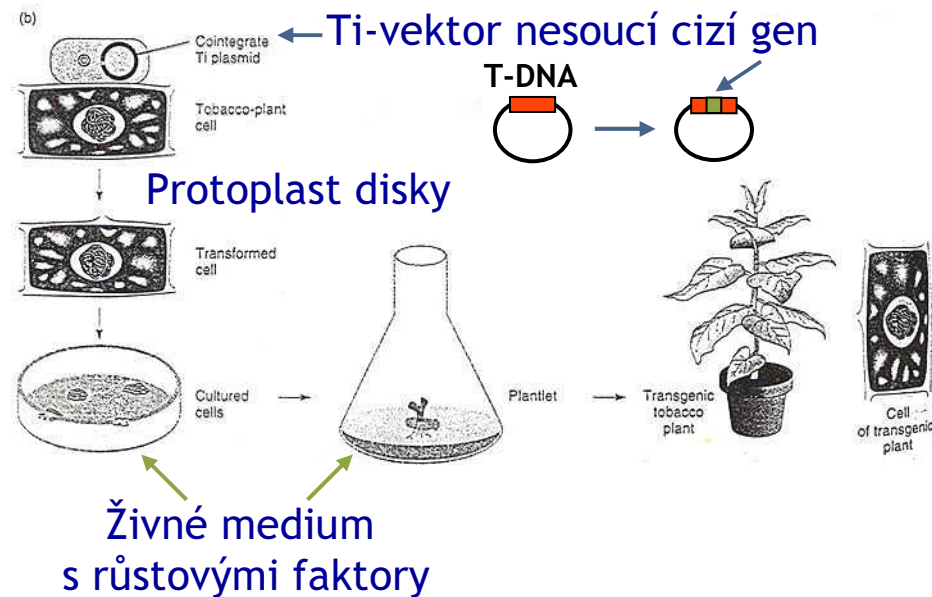
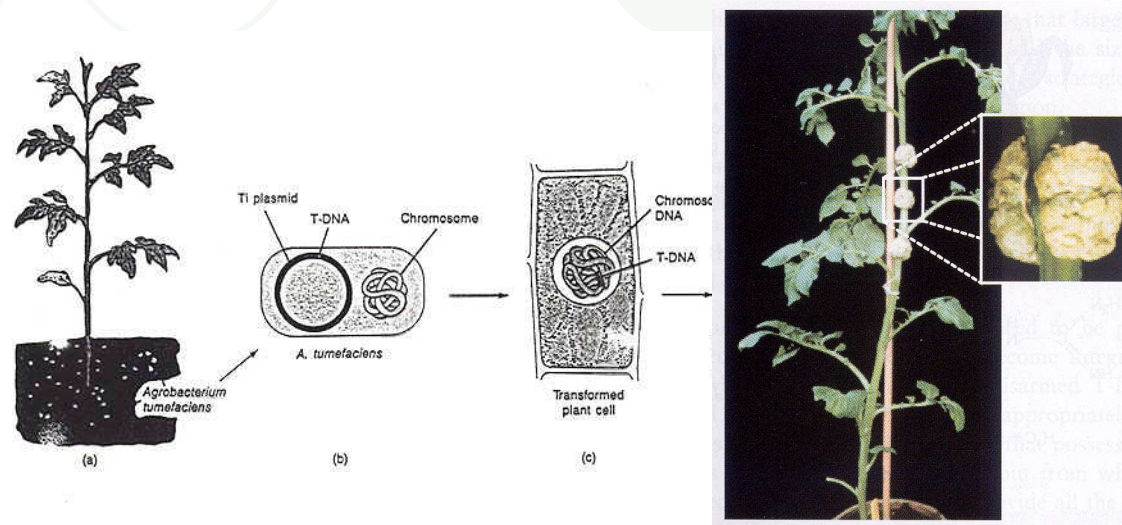
Záměna peptidového linkeru za disulfidický můstek několikanásobně zvyšuje stabilitu scFv a tím zlepšuje jeho terapeutické využití

Např. fúzní protein
HER2-Ig + exotoxin *Pseudomonas*

human epidermal growth factor receptor 2 - Approximately 30% of breast cancers have an amplification of the *HER2/neu* gene or overexpression of its protein product.

Pbs21 (plasmodium) + Shiva-1

Přenos cizích genů do rostlin pomocí Ti-plazmidu



Transgenní
rostlina
přenášející
geny do
potomstva

Využití genového inženýrství u rostlin

A. Potravinry a krmiva

- **Ovlivňování agronomických vlastností**
 - Rezistence k herbicidům
 - Rezistence k patogenům (hmyzu, virům, plísním apod.)
 - Tolerance ke stresům (vodní stres – sucho, mráz; osmotický stres – zasolení půd)
- **Modifikace posklizňových vlastností**
 - Prodloužení skladovatelnosti
 - Zpomalení zrání a navození rezistence k skládkovým chorobám
 - Vylepšování nutriční hodnoty a chuti

Využití genového inženýrství u rostlin

B. Produkce sekundárních metabolitů

- Studium a přenos genů pro klíčové enzymy biosyntetických drah
- Farmakologické přípravky

C. Technické plodiny

- Produkce škrobu a olejů pro průmyslové využití
- Biodegradovatelné plasty

D. Fytoremediace

Transgenní rostliny

A. Rezistence k virům

- Zavedení genu pro plášťový protein VTM do Ti-plazmidu, přenos do tabáku, rajčat
- Vakcína je multivalentní, působí na jiné virózy

B. Rezistence k hmyzím škůdcům

- Vnesení genu pro endotoxin z **Bacillus thuringiensis** působícího na hmyzí škůdce (BT-rostliny: kukuřice, tabák, brambor, aj.)
- Nepřímý způsob – naklonování genu pro tvorbu toxinu do bakterií kolonizujících rostliny (listy, kořeny) – např. *Pseudomonas fluorescens*

C. Rezistence k herbicidům

- Např. glyfozátu (nejpoužívanější neselektivní herbicid) inhibuje enzymy tvorby esenciálních aminokyselin
1. Vnesení genu pro tvorbu cílového enzymu (větší množství zajistí odolnost rostlin)
 2. Vnesení genu pro tvorbu pozměněného (méně citlivého) enzymu
 3. Vnesení genu pro tvorbu enzymu, který inaktivuje herbicid

Transgenní rostliny

D. Vylepšení nutričních hodnot plodů a semen nebo rostlinných produktů využívaných průmyslově

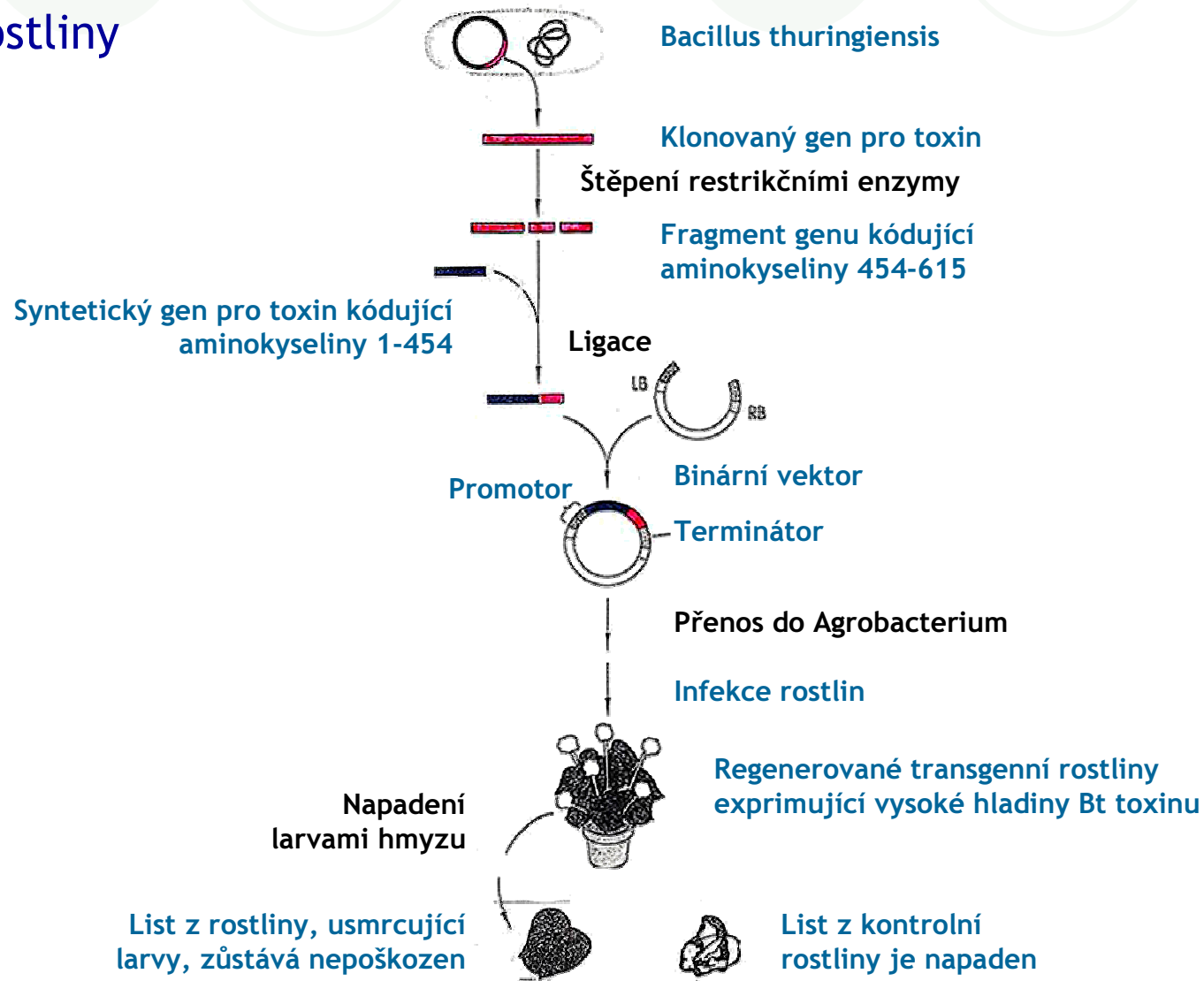
- Rajče FlavrSavr fy Calgene – transgen: antisense mRNA genu pro polygalakturonidasu – prodloužená konzumní zralost
- Rýže – vhodná pro alergiky
- Řepka – olej ze semen obsahující zvýšený podíl kys. Laurové (mýdla a detergenty)
- Řepka – olej ze semen bohatý na myristát (kosmetika) nebo kys. Eruková (mazadla a výroba nylonu)
- Arabidopsis a řepka – tvorba biodegradovatelných polymerů v chloroplastech využitelných jako plasty (polyhydroxybutyrát, polymery podobné polyesteru ve vláknech bavlníku)

E. Produkce vakcín rostlinami („jedlé vakcíny“)

- Syrová zelenina obsahující antigen (vakcínu), který indukuje tvorbu imunoglobulinů mukózního imunitního systému v zažívacím traktu
 - Povrchový antigen viru hepatitidy B
 - Podjednotka B toxinu cholery

Rostliny rezistentní k hmyzím škůdcům

Bt-rostliny



Transgenní BT-kukuřice

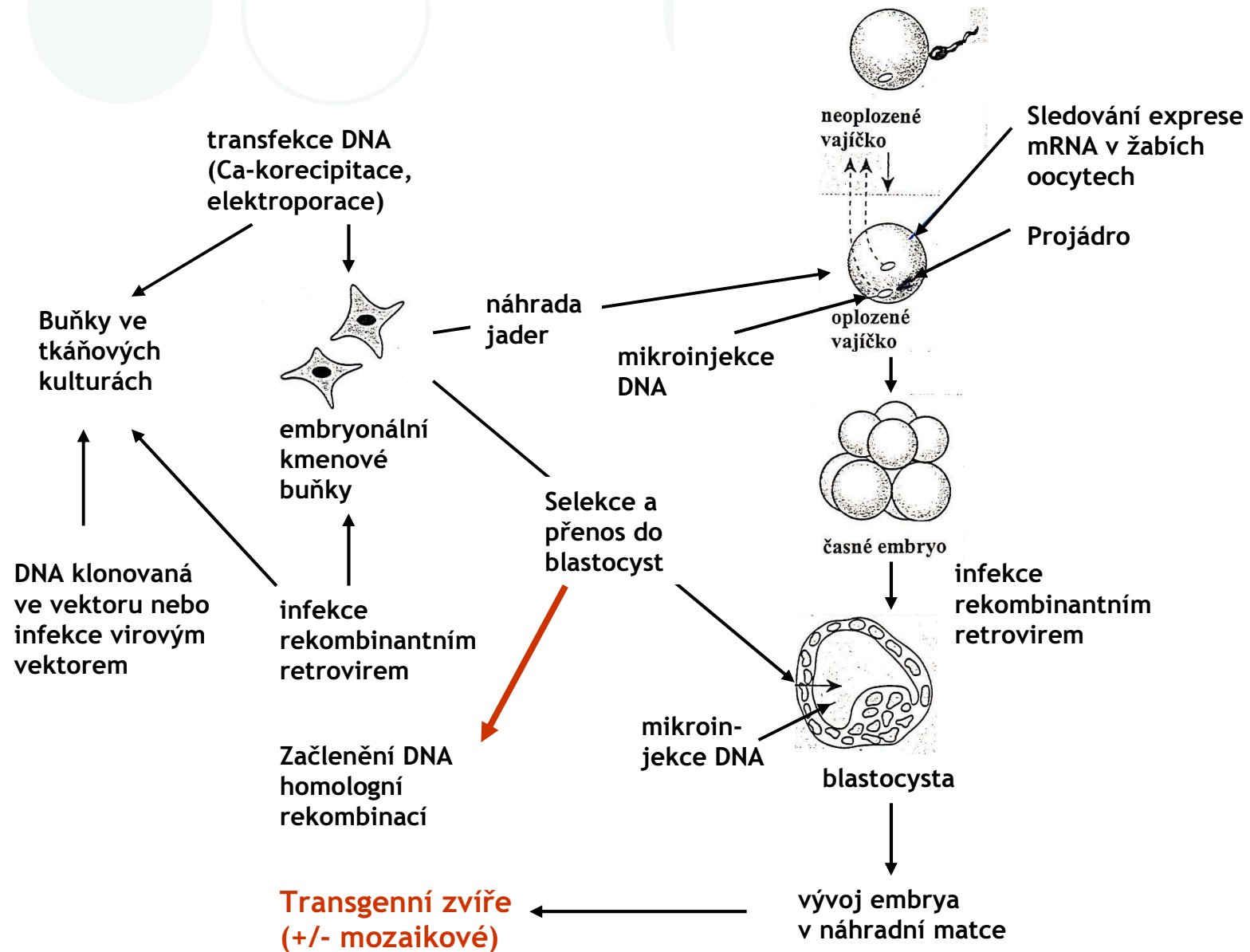
Obsahuje navíc dva až tři geny:

1. Gen(y) podmiňující **odolnost rostlin proti hmyzím škůdcům** (bakteriální gen z *Bacillus thuringiensis* zodpovědný za tvorbu deltatoxinu, který je jedovatý pro některé skupiny hmyzu, ale zcela neškodný pro savce a člověka)
2. Gen pro **odolnost vůči herbicidu Basta** (jeden z nových herbicidů, který má krátkou životnost a je šetrný k prostředí). Gen pochází z bakterie *Streptomyces*.
3. Gen pro **odolnost k antibiotiku ampicilinu** (selekční marker použitý pro selekci transgenních rostlin (buněk) při jejich přípravě). Gen pochází z bakterie.

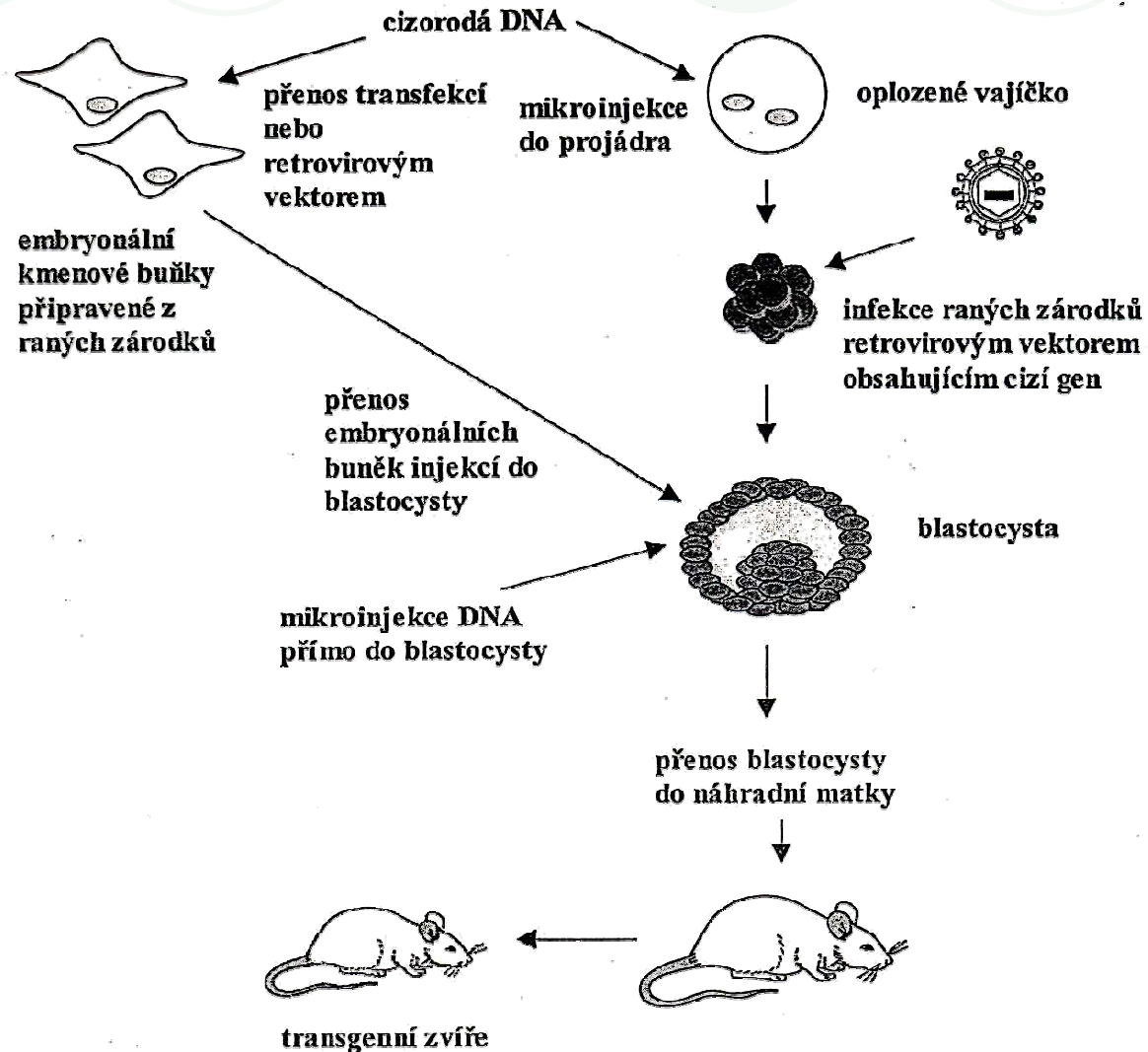
Cíle studia přenosu genů do živočišných buněk

- 1. Studium funkce genů a způsobu jejich regulace**
- 2. Příprava transgenních organismů**
 - studium fungování genů v rámci celého organismu
 - příprava živočichů s cíleně upravenými geny
 - modely pro studium genetických chorob
 - příprava zvířat s lepšími užitkovými vlastnostmi,
 - vytváření cizorodých proteinů
 - hledání možností pro genovou terapii

Způsoby přenosu cizích genů do savčích buněk

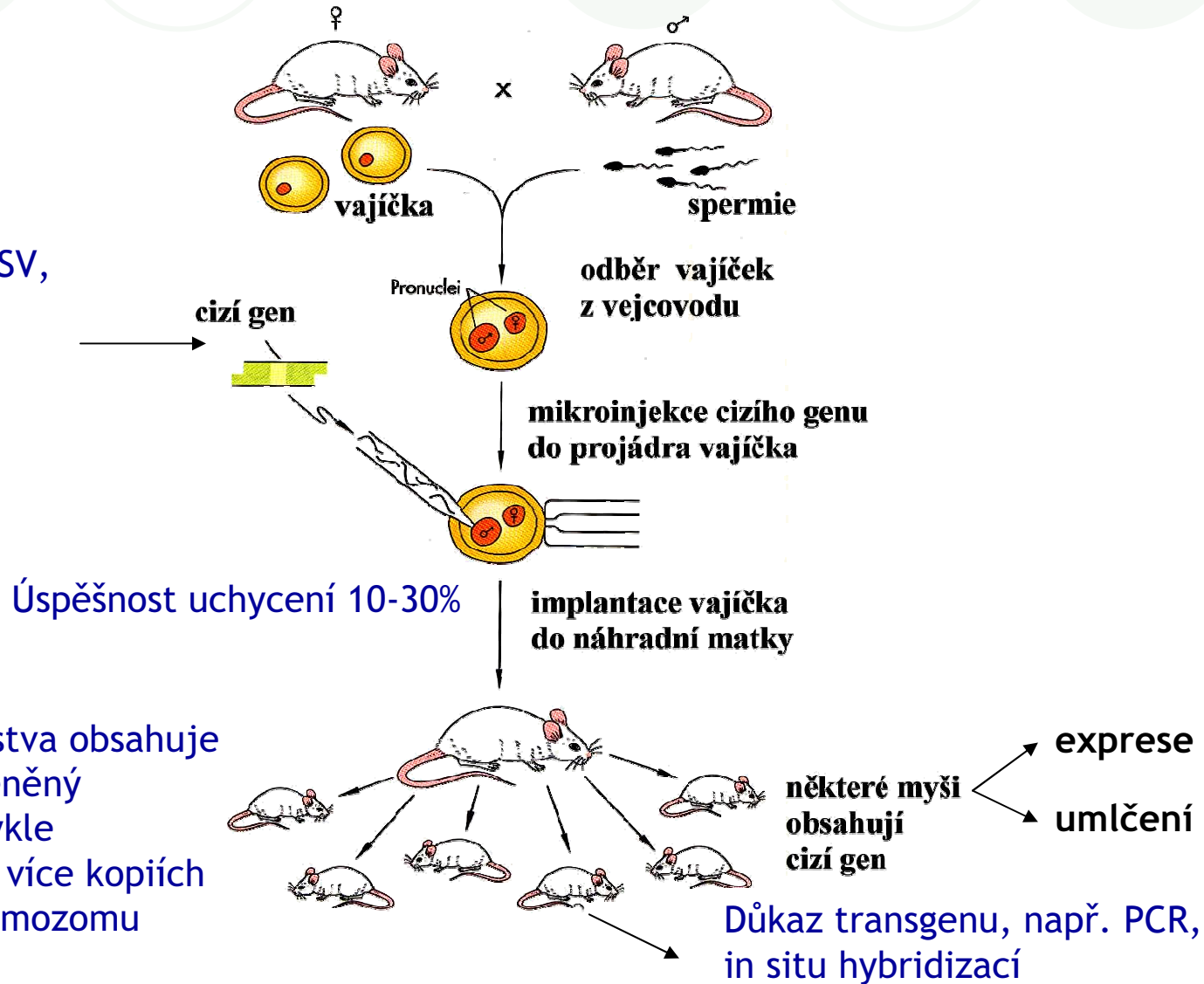


Příprava transgenních savců



Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka

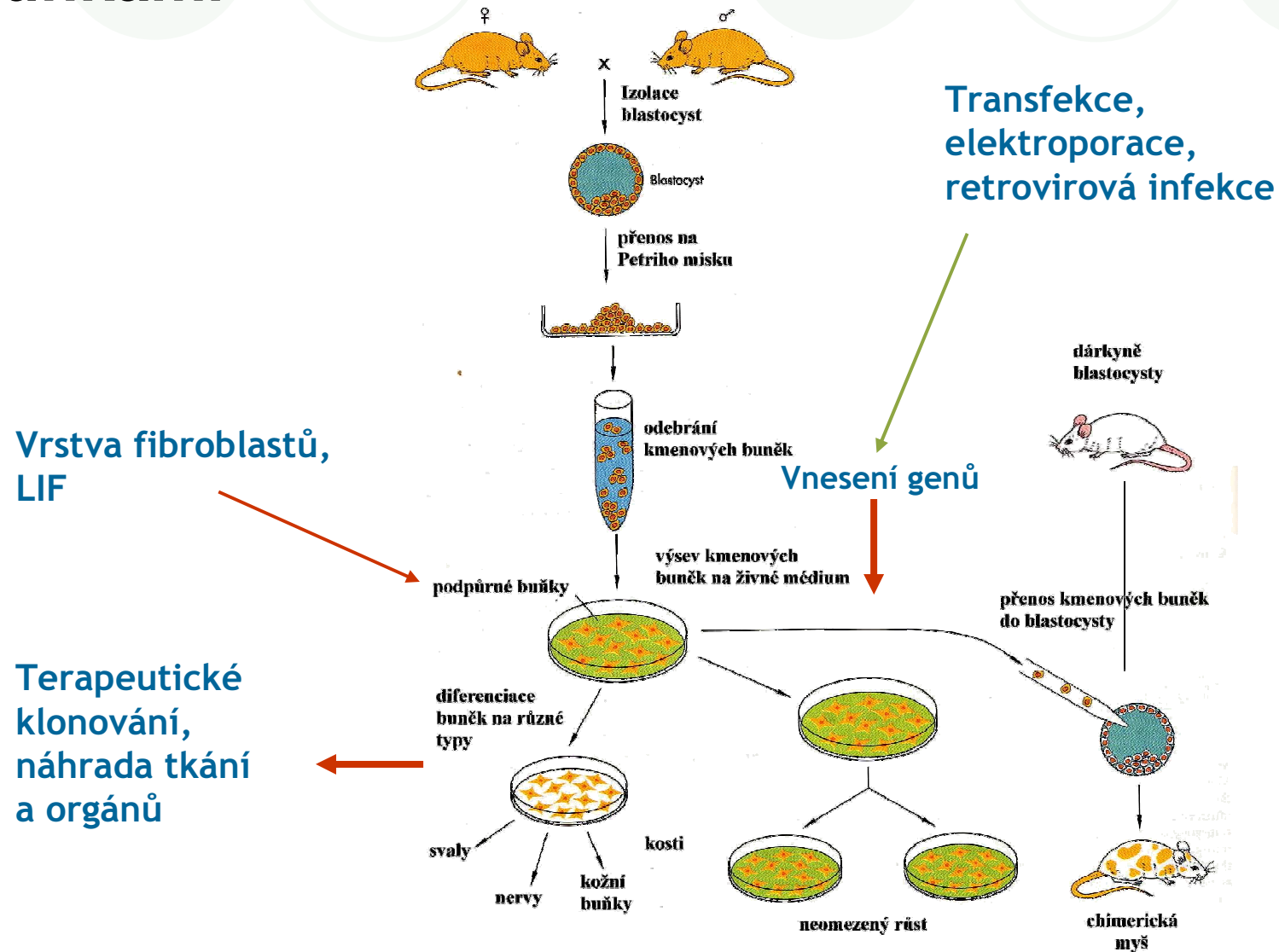
DNA SV40, tkHSV,
lidský inzulin,
B-globin,
interferon



Až 40% potomstva obsahuje transgen začleněný náhodně, obvykle tandemově ve více kopiích v jednom chromozomu

Důkaz transgenu, např. PCR, in situ hybridizací

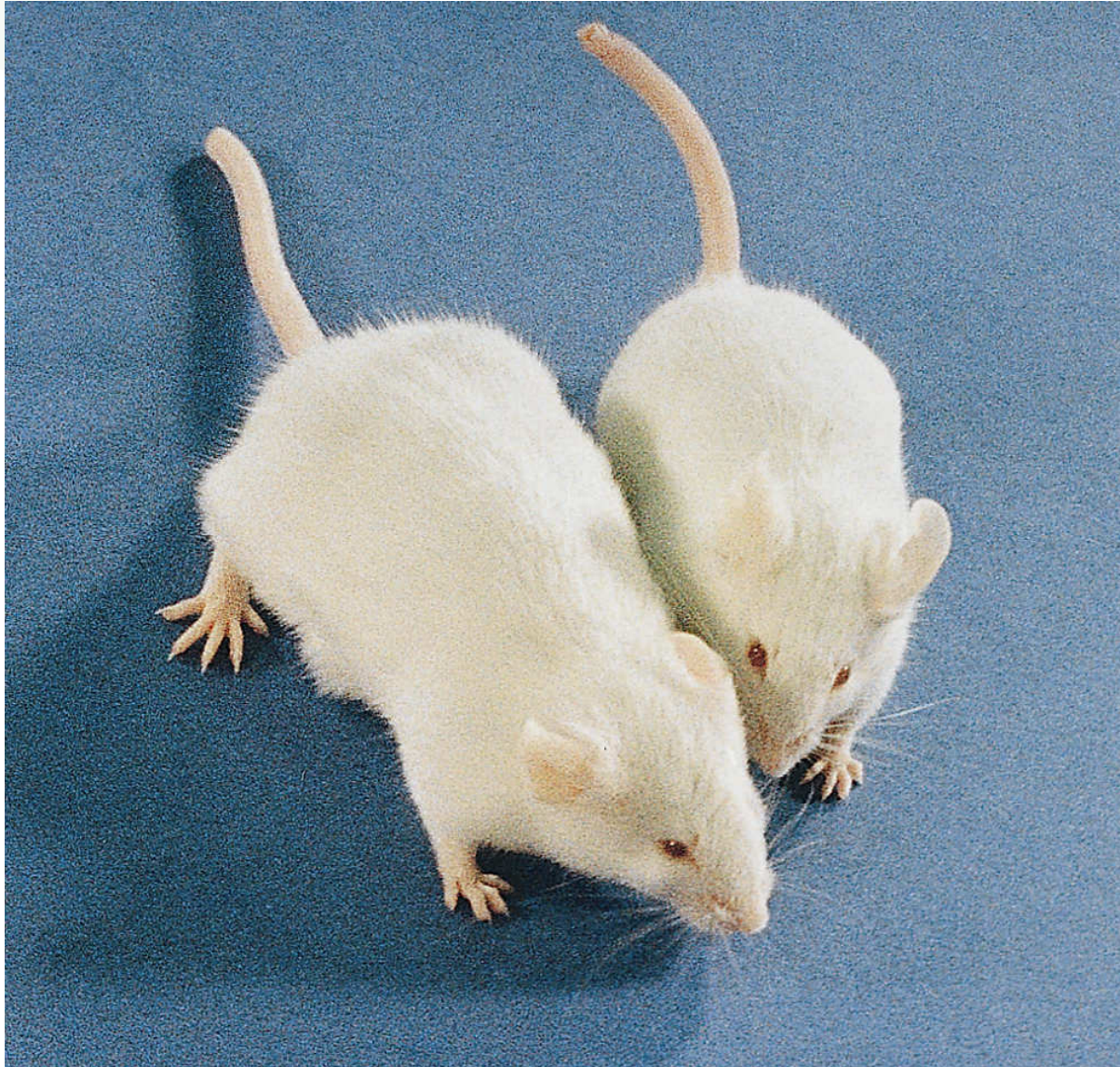
Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami



Příklady transgenních živočichů

- Zvířata (myši, drůbež, hospodářská zvířata, ryby) obsahující gen pro růstový hormon – rychlejší růst, změna vlastností produktů
- Přežvýkavci obsahující ve střevě GMO-mikroorganismy, které redukuje toxicitu některých rostlin (rozšíření potenciálu krmiv)
- Drůbež s pozmeněnými trávicími schopnostmi (celulóza, lignin, tuky)
- Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu ve vejcích (využití v průmyslu a farmakologii)
- Ovce s vylepšenou srstí
- **Myši s pozmeněnými nebo inaktivovanými geny**
 - studium lidských genetických poruch:
 - neurodegenerativní, imunitní, hormonální choroby,
 - vliv faktorů na organismus faktorů (např. léků, mutagenů)
 - studium poruch paměti
- Zvířata jako dárci orgánů pro transplantace (xenotransplantáty)
 - orgány s pozmeněnými antigeními vlastnostmi vhodné pro člověka
- **Zvířata produkující cizorodé látky v mléce, moči, krvi nebo tkáních (animal farming: zvířata jako bioreaktory)**

Myš nesoucí gen pro lidský růstový hormon



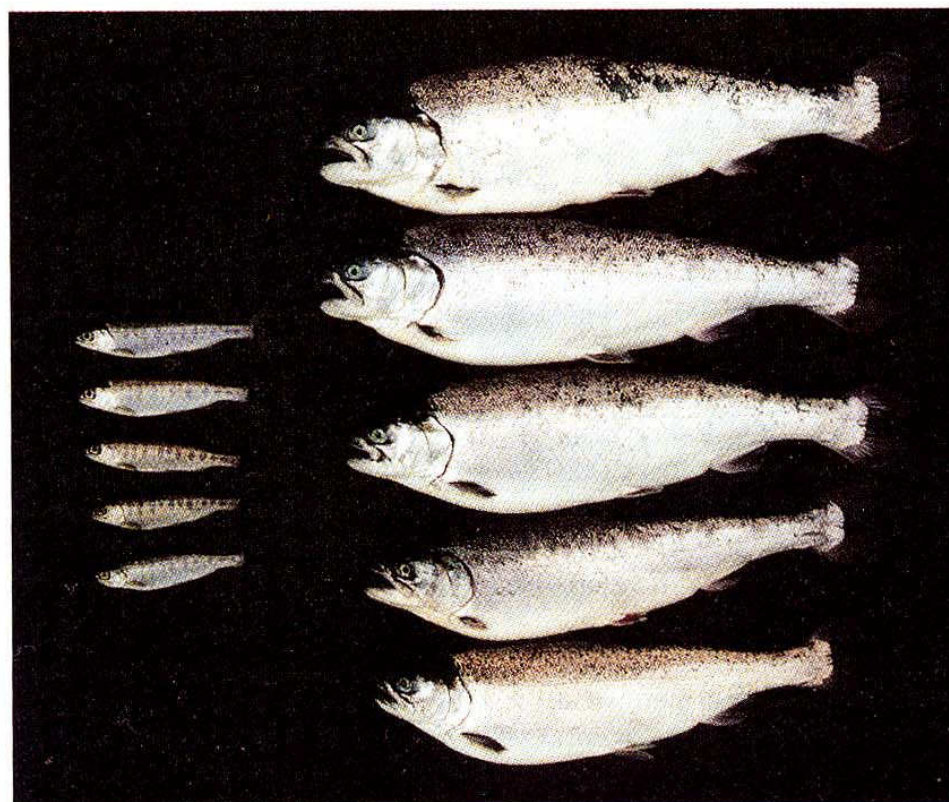


Figure 11.18 Normal coho salmon (left) and genetically engineered coho salmon (right) containing a sockeye salmon growth-hormone gene driven by the regulatory region from a metallothionein gene. The transgenic salmon average 11 times the weight of the nontransgenic fish. The smallest

fish on the left is about 4 inches long. [Courtesy of R. H. Devlin. Reprinted by permission from *Nature* 371: 209, R. H. Devlin, T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, E. M. Donaldson, P. Swanson, and W. K. Chan. Copyright 1994 Macmillan Magazines Ltd.]

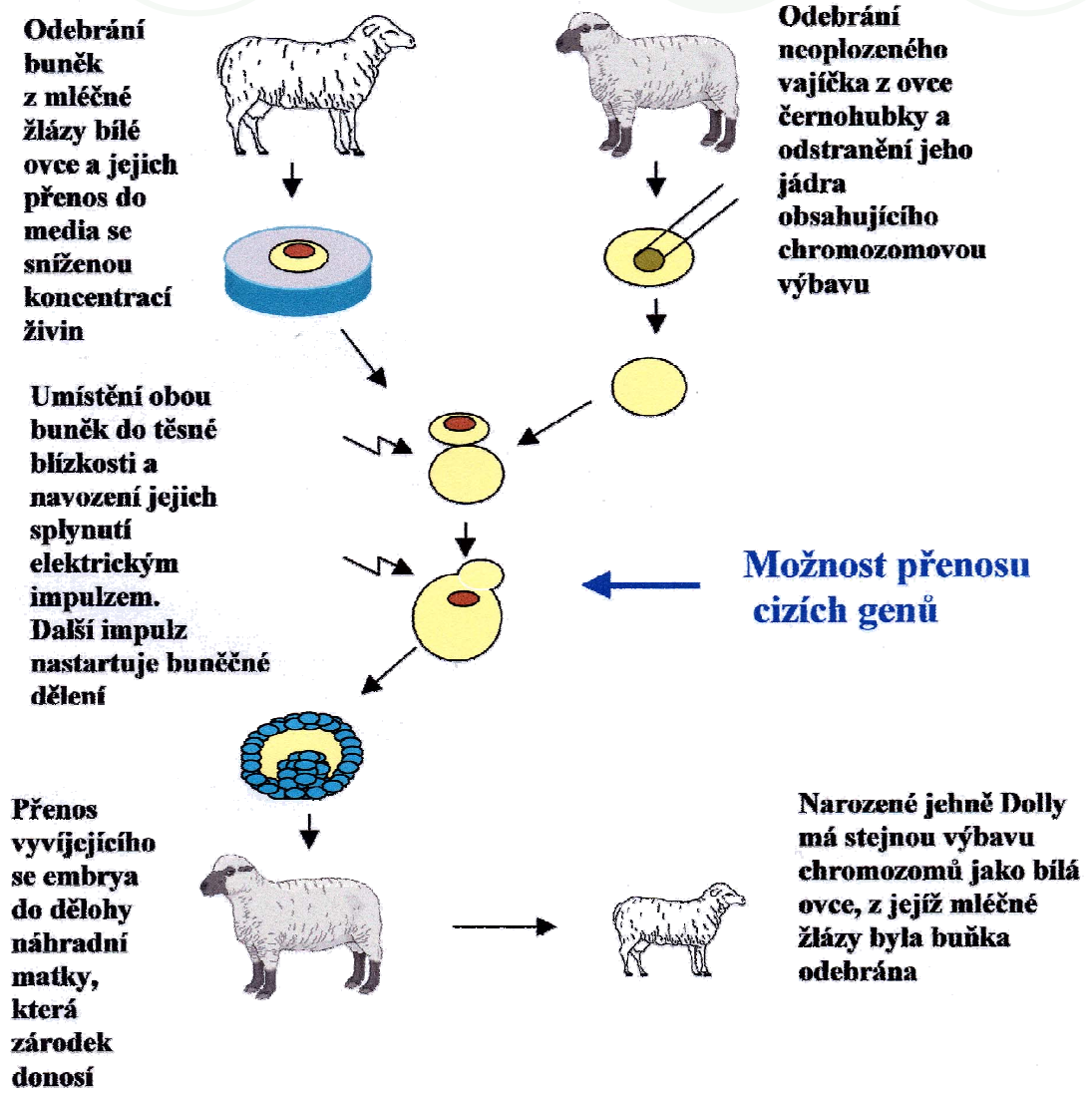
Zvířata jako bioreaktory: „animal farming“



Příklady látek vytvářených v transgenních zvířatech

Zvíře	Látka	Využití
ovce	Alfa-1-antitrypsin	Léčba rozedmy plic
koza	Tkáňový aktivátor plazminogenu	Rozpouštění krevních sraženin
ovce	Faktor pro srážení krve VIII, IX	Navození srážení krve
prase	hemoglobin	Náhražka krve při transfúzi
koza	Lidský růstový hormon	Léčba nanismu
ovce, myš	Regulátor CFTR	Léčba cystické fibrózy
prase	Lidský protein C	Antikoagulans krve

Klonování savců



Možné způsoby léčby genetických onemocnění

1. **Úprava diety - kareční terapie** (galaktosemie, fenylketonurie)
2. **Substituční terapie** (hemofilie, diabetes, nanismus)
3. **Genová terapie** (kauzální léčba)
 - vnesení funkčního genu (funkční alely) do genomu
 - cílená záměna poškozeného genu homologní rekombinací
 - cílené usmrcování geneticky pozměněných buněk
 - cílená inhibice exprese genů zodpovědných za genetickou poruchu

Genové terapie

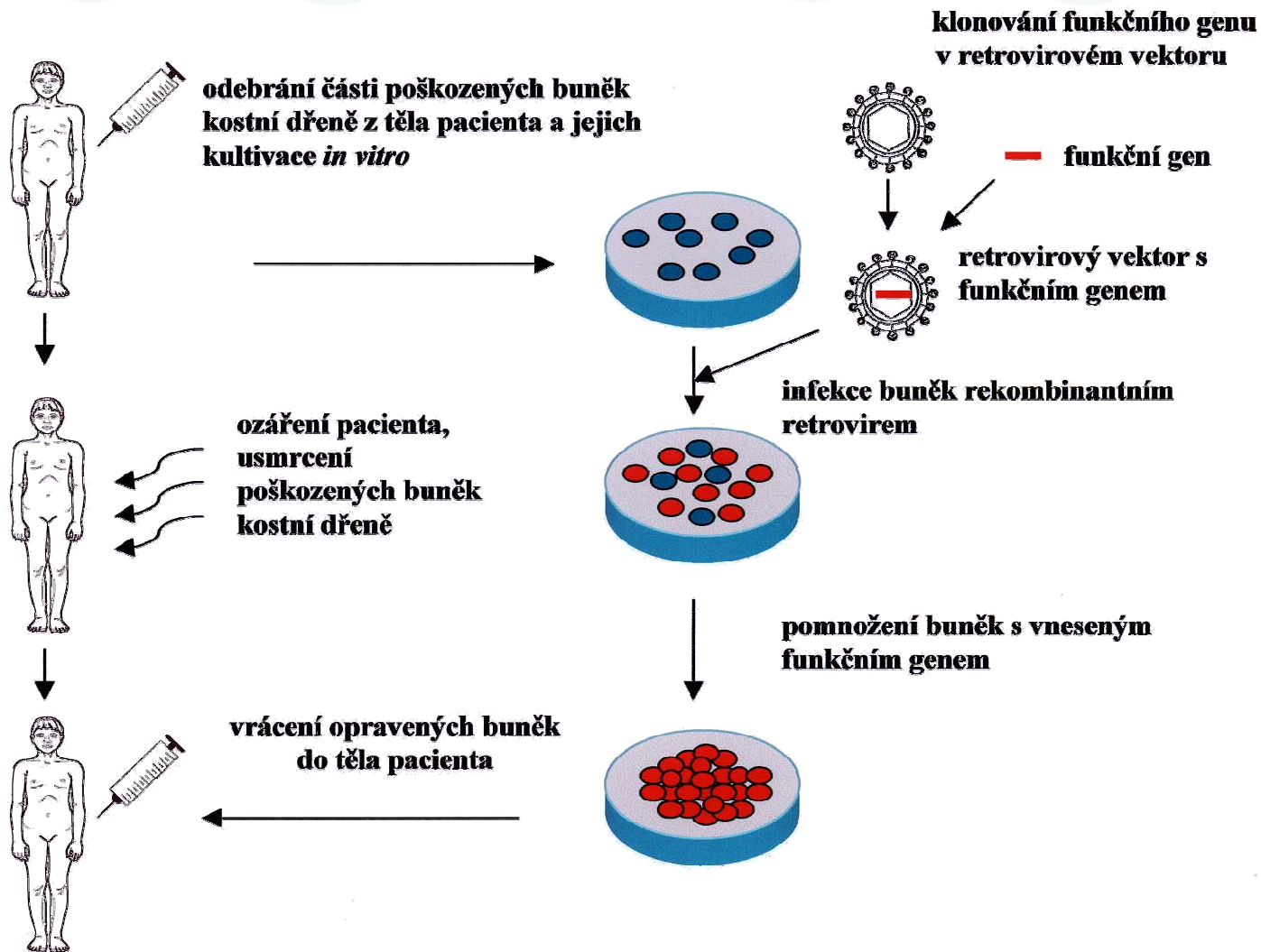


- Léčba genetických chorob
 - dědičných
 - nádorových
- **Podle typu buněk, do nichž jsou geny vneseny:**
 - A. genová terapie zárodečných buněk
 - B. genová terapie somatických buněk
- **Podle způsobu přenosu genů:**
 - A. genová terapie in vitro (ex vivo)
 - B. genová terapie in vivo

Příklady lidských chorob podmíněných monogenně a připadajících v úvahu pro genovou terapii v současnosti

Nemoc	Hlavní symptomy	Produkt defektního genu	Četnost
Deficience adenzin-deaminázy (ADA)	<i>Defektní T-lymfocyty, porucha v tvorbě protilátek, narušení imunitního systému.</i>	adenozindeamináza	1/10 ⁶
Fenylketonurie	<i>Fyzická a psychická retardace.</i>	fenylalaninhydroxyláza	1/12 000
Hemofilie A + B	<i>Porucha v srážlivosti krve, krvácivost.</i>	faktor VIII, faktor IX	1/10 ⁶ mužů
Familiární hypercholesterolemie	<i>Předčasné arteriosklerotické změny cév.</i>	LDL-receptor	1/500
Deficience na α_1 -antitrypsin	<i>Plicní emfyzém (rozedma plic).</i>	α_1 -antitrypsin	1/3 500
Cystická fibróza, CF	<i>Porucha v transportu Na⁺, zahlnění dýchacích cest, embolie.</i>	transmembránový regulátor CF	1/2 500
Gaucherova choroba	<i>Nádory sleziny, zvětšení jater, žluté zbarvení (pigmentace) kůže.</i>	glukocerebrozidáza	?
Duchennova svalová dystrofie	<i>Svalová ochablost.</i>	dystrofin	1/3 000 mužů
Leschův-Nyhanův syndrom	<i>Usazování kyseliny močové v kloubech a ledvinách, poruchy CNS.</i>	hypoxantinguaninofosforibozyltransferáza	1/10 ⁶

Genová terapie in vitro



Vlastnosti buněk vhodných jako vektory pro zavádění genů do organismu

1. Snadné získání buněk z těla
 2. Snadná kultivace v kulturách in vitro
 3. Odolnost k manipulacím spojeným se zaváděním genů
 4. Schopnost navrácení buněk do organismu, kde se musí pomnožovat přetrvávat po dostatečně dlouhou dobu
- Kmenové buňky kostní dřeně
 - Kožní fibroblasty
 - Hepatocyty
 - Myelocyty

Schéma postupu při genové terapii deficience na adenozeaminázu

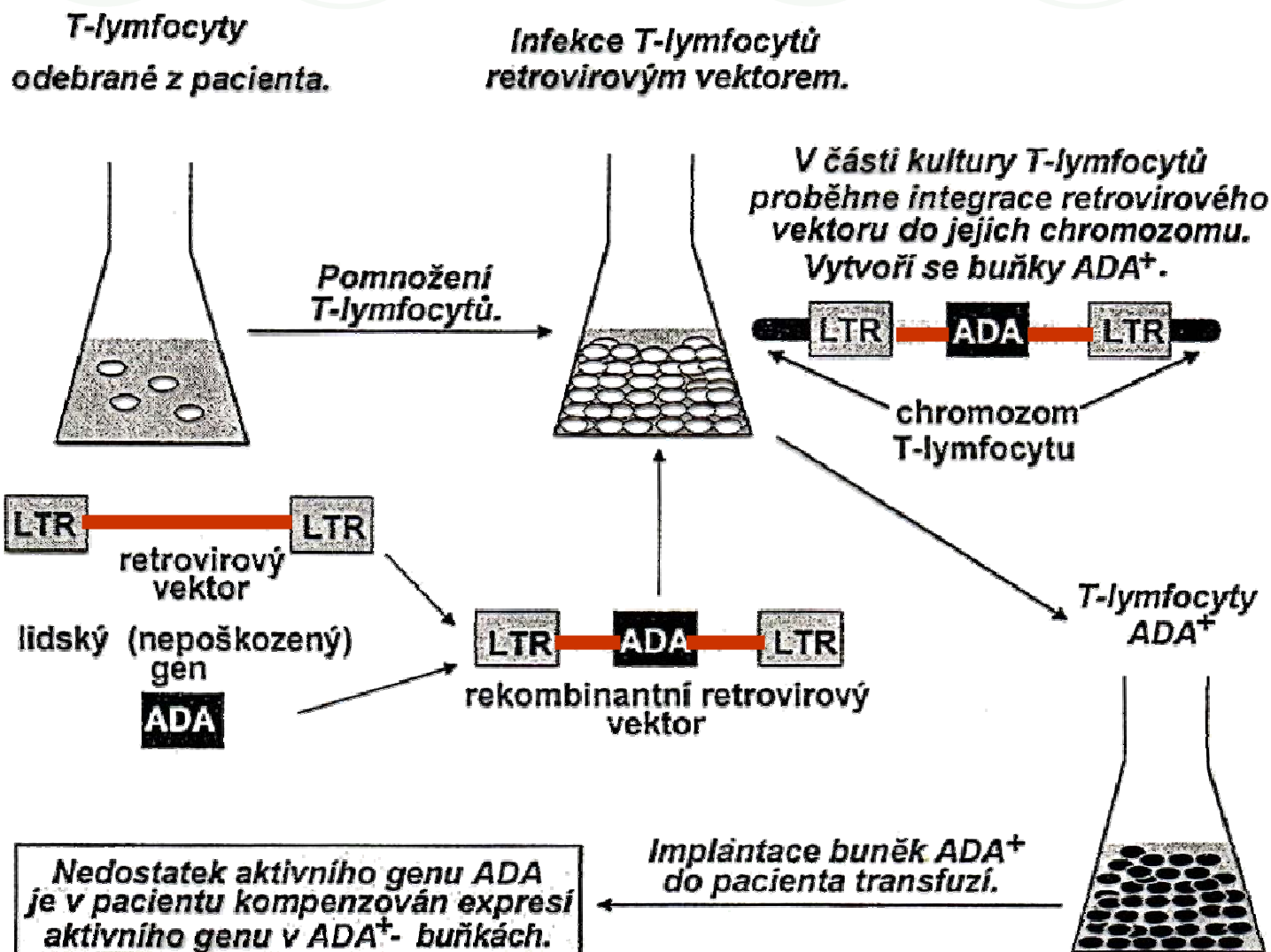
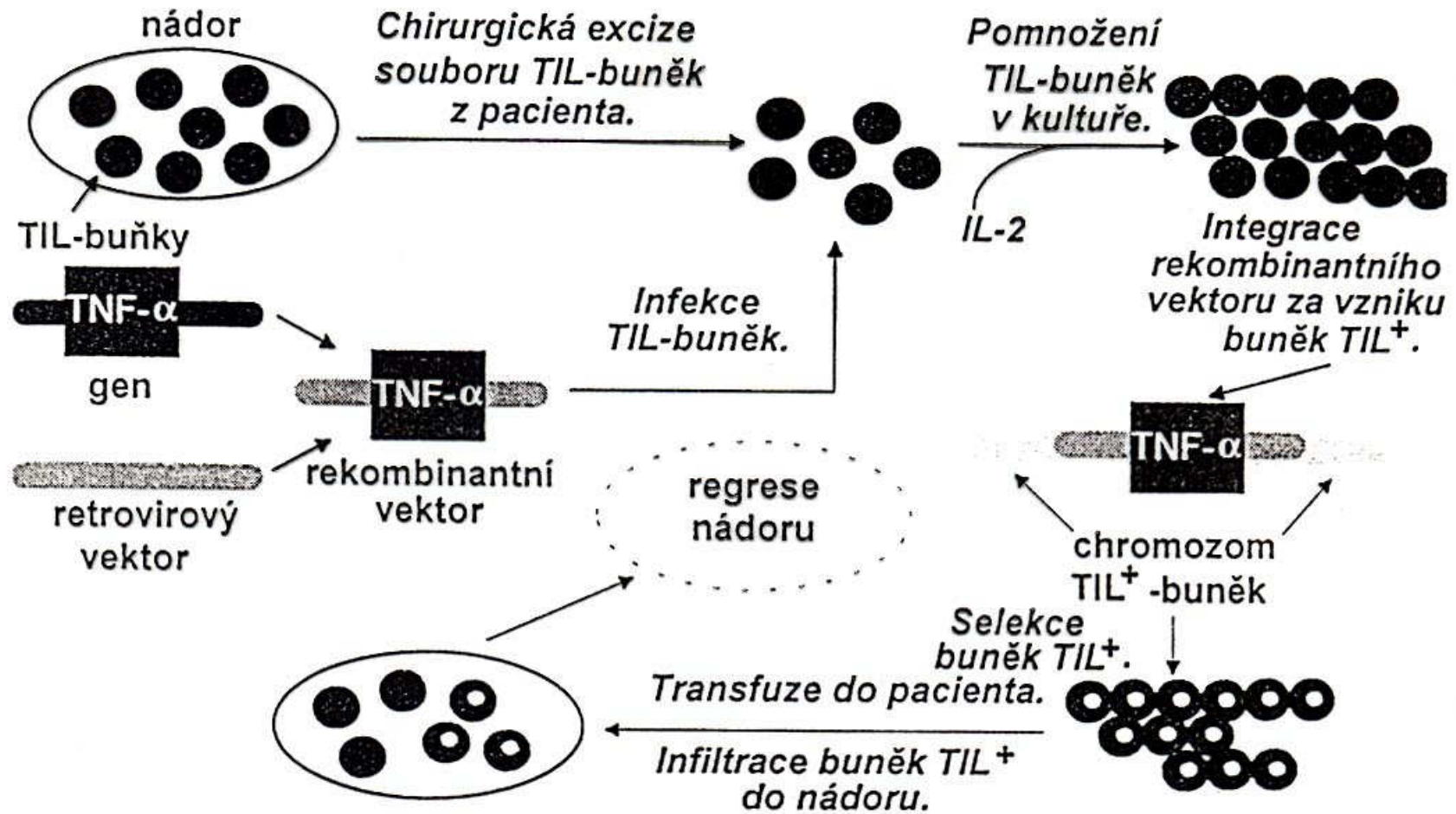


Schéma genové terapie melanomu



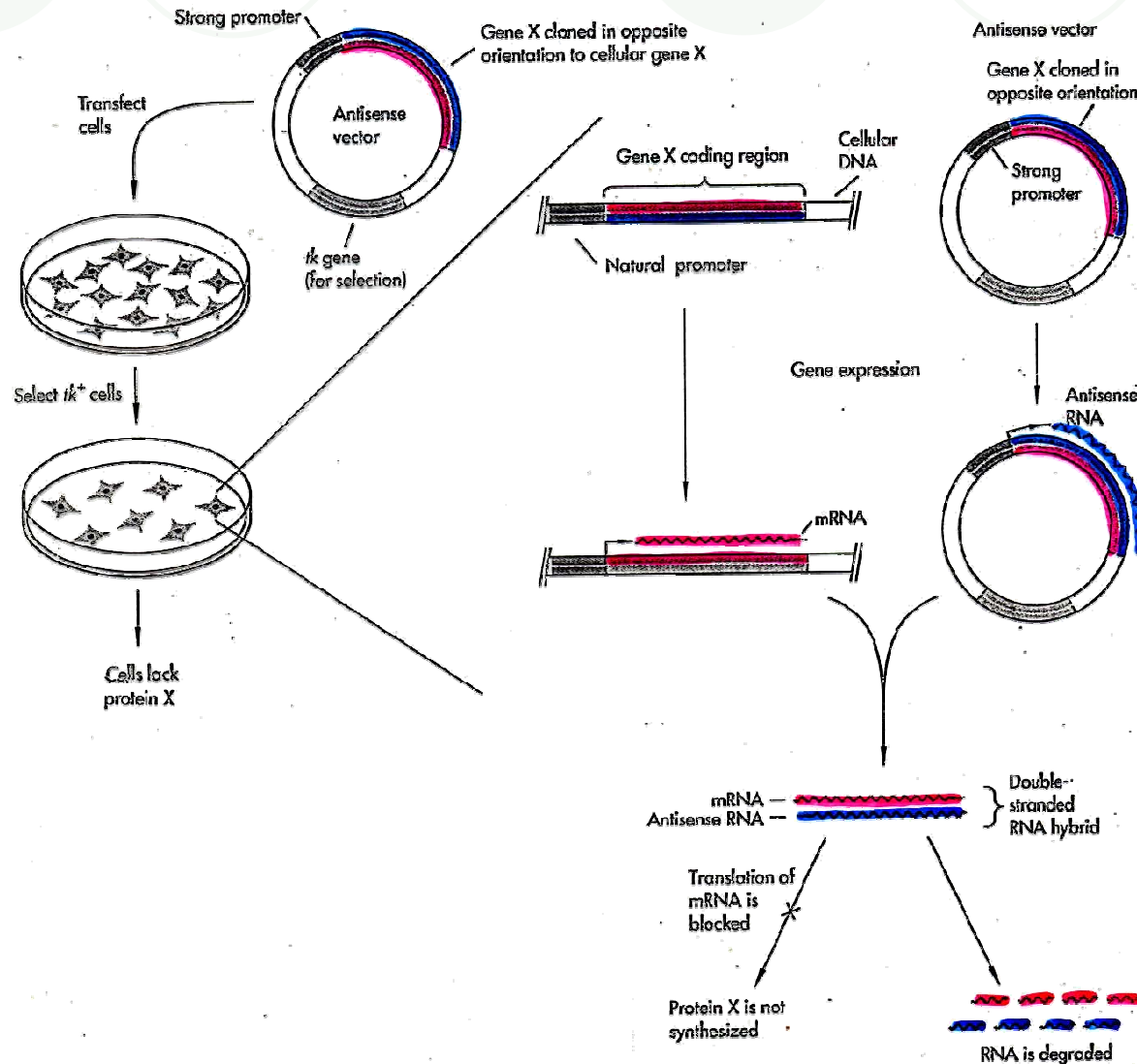
TIL = tumor infiltrující lymfocyty; TNF α = tumor nekrotizující faktor

Viry jako vektory

nejpoužívanější v GT, velmi dobře infikují lidské buňky. Asi 70% pokusů s GT

- **Onkoretroviry:** transgen začleňují do chromozomu do dělících se buněk - výhoda při léčbě nádorů (např. nádory mozku). Riziko inzerční inaktivace endogenů
- **Adenoviry:** infikují nedělící se buňky, DNA zůstává jako epizom v jádře. Jsou bezpečné, ale exprese je krátkodobá. Problém je imunogenicita. Uplatnění tam, kde je nutná vysoká exprese během krátké doby, např. při léčbě rakoviny pro zabití buněk.
- **Adenoasociované viry AAVs:** Nepatogenní, schopné infekce jen s využitím adenovirů jako pomocných virů k replikaci. Integrují DNA do chromozomu na specifické místo, umožňující dlouhodobou expresi bez rizika inzerční mutageneze.
- **Lentiviry:** HIV (retrovirus) – infikují nedělící se buňky. Do chromozomu se integrují náhodně - dlouhodobá exprese. Nutnost odstranění virových genů a zachování schopnosti infikovat nedělící se buňky.
- **Herpes simplex viry:** Mají tropii pro CNS, v latentní infekci jsou epizomální, tj. dlouhodobě exprimují transgen a šíří jej do okolní synaptické sítě. Hlavní úloha: přenos genů do neuronů pro léčbu nervových chorob (Parkinsonova ch.) a tumory CNS.

Zábrana exprese genů navozená protismyslovou RNA



Genová terapie nádorů

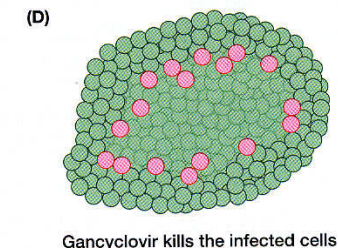
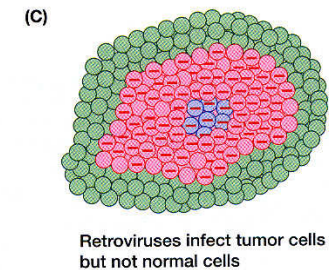
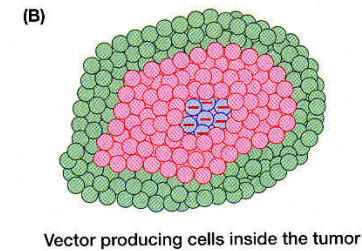
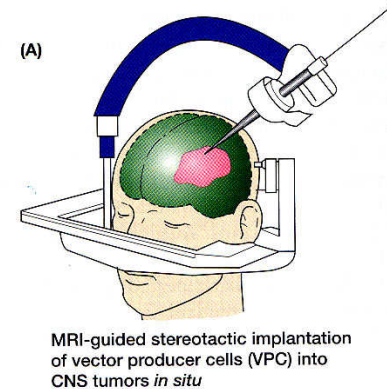
1. Dodání genu: obnova funkce nádorových supresorových genů
2. Inaktivace genu: zábrana exprese aktivovaného onkogenu
3. Genetická manipulace: vyvolání apoptózy nádorových buněk
4. Modifikace nádorové buňky tak, aby byla více antigenní a byla zničena imunitním systémem
5. Modifikace dendritických buněk ke zvýšení nádorově-specifické imunitní odpovědi
6. Použití geneticky upravených onkolytických virů selektivně usmrcujících nádorové buňky
7. **Genetická modifikace nádorových buněk zajišťující konverzi netoxického prekursoru na toxický produkt**

Příklady léčby nádorů pomocí genové terapie

Typ nádoru	Změněné buňky	Použitá strategie genové terapie
Vaječník	Nádorové buňky	Intraperitoneální injekce retrovirů nebo adenovirů s genem p53 nebo BRCA1 – obnova kontroly buněčného cyklu
Vaječník	Nádorové buňky	Injekce adenoviru s scFv protilátkou proti onkoproteinu ErbB2. Snaha o inaktivaci růstového signálu
Maligní melanom	Tumor-infiltrující lymfocyty (TILs)	Extrakce TILs z tumoru a jejich pomnožení. Infekce TILs retrovirem s genem pro nekrotický faktor, který pak působí na okolní buňky v nádoru
Různé nádory	Nádorové buňky	Transfekce nádorových buněk retrovirem exprimujícím povrchový antigen (HLA-B7) nebo cytokin (IL-12), což by mělo zvýšit imunogenicitu tumoru, takže jej imunitní systém snáze zničí
prostata	Dendritické buňky	Na autologní dendritické buňky se působí tumorovým antigenem nebo cDNA exprimující antigen aby zahájily imunitní odpověď vůči tumoru
Maligní gliom (mozek)	Nádorové buňky	Injekce retroviru s TK do tumoru. Jsou infikovány jen rostoucí buňky. Je přidán gancyklovir, který TK-pozitivní buňky (tj. tumorové) mění na toxin a jsou tak samy selektivně usmrcovány

Genová terapie in vivo

Do nádoru jsou injikovány buňky, do nichž byl *in vitro* vnesen retrovirový vektor, který obsahuje gen pro tymidinkinázu (TK). Vektor se uvolňuje a infikuje okolní nádorové buňky, v nichž se pak vytváří TK (retrovirus je schopen infikovat jen dělící se buňky!). Do těla pacienta je intravenózně podána netoxická látka gancyklovir (gcv), která je TK konvertována na toxický gancyklovir-trifosfát usmrcující nádorové buňky.



Transpozony - mobilní genetické elementy

- **Tvoří pravidelnou součást genomu prokaryot i eukaryot (až 50% genomu)**
- **Navozují mutace genů (inzerční inaktivace, polární mutace, změny exprese genů)**
- **Jsou zodpovědné za přestavby chromozomů nebo plazmidů (tvoří "přenosné" úseky homologie, podmiňující homologní rekombinace, interakce mezi složkami genomu)**
- **Přenášejí nové znaky (např. AntR, onkogeny) mezi organismy (horizontální přenos genů)**

Specifické rysy transpozice:

- **cílová místa nejsou homologická s místy donorovými**
- **obvykle dochází k duplikaci přenášené sekvence, tj. transpozon zůstává i v původním donorovém místě**
- **v místě inzerce se zdvojují ve stejném směru sekvence DNA - transpozon je na obou koncích ohraničen přímými repeticemi, což je důsledek mechanismu transpozice**
- **po inzerci transpozonu do cílového místa dochází k inaktivaci genů, po excizi transpozonu se funkce obnovuje.**

Základní typy transpozonů a jejich klasifikace

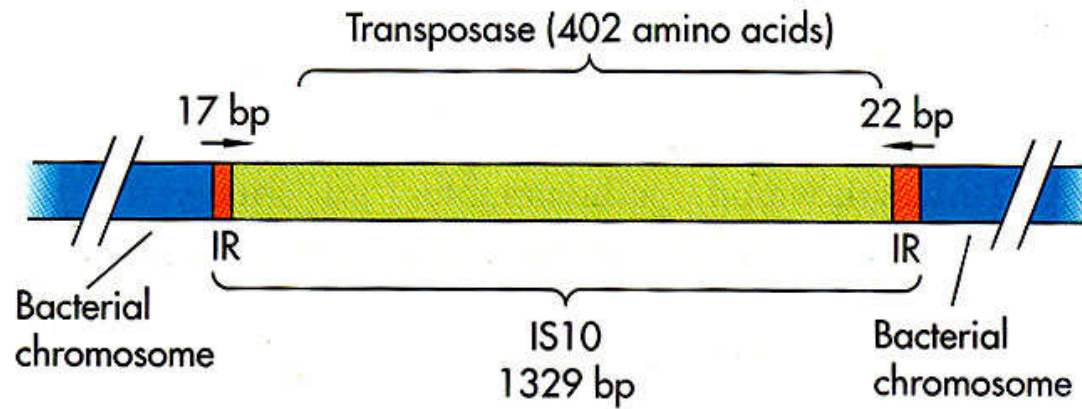
DNA-transpozony

- **Transpozony „cut and paste“** (prokaryota a eukaryota) – vyčlení se z původního místa a začleňují se do nového
- **Replikativní transpozony** (prokaryota) – během transpozice se replikují (jedna kopie zůstává v původním místě, druhá se objeví v novém místě)
 - **Konjugativní transpozony** (bakterie)
- 3. **Retrotranspozony** (eukaryota) – **během transpozice se transkripční sekvence transpozonu vytváří RNA**, která se převádí na DNA, která se pak začleňuje do nového místa
 - **retroviry**,
 - **retrovirům podobné elementy, retrotropozony**
 - **retrony** (bakterie)

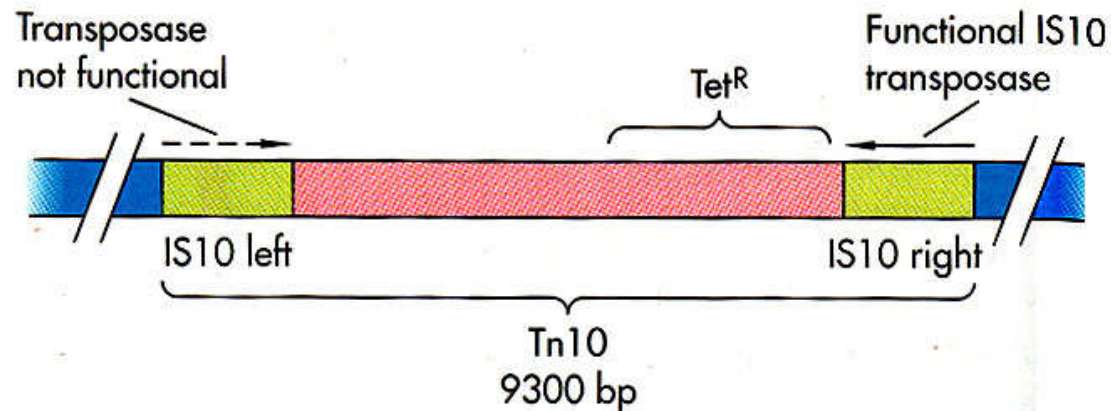
Struktura mobilních elementů bakterií

Inzerční sekvence (IS)

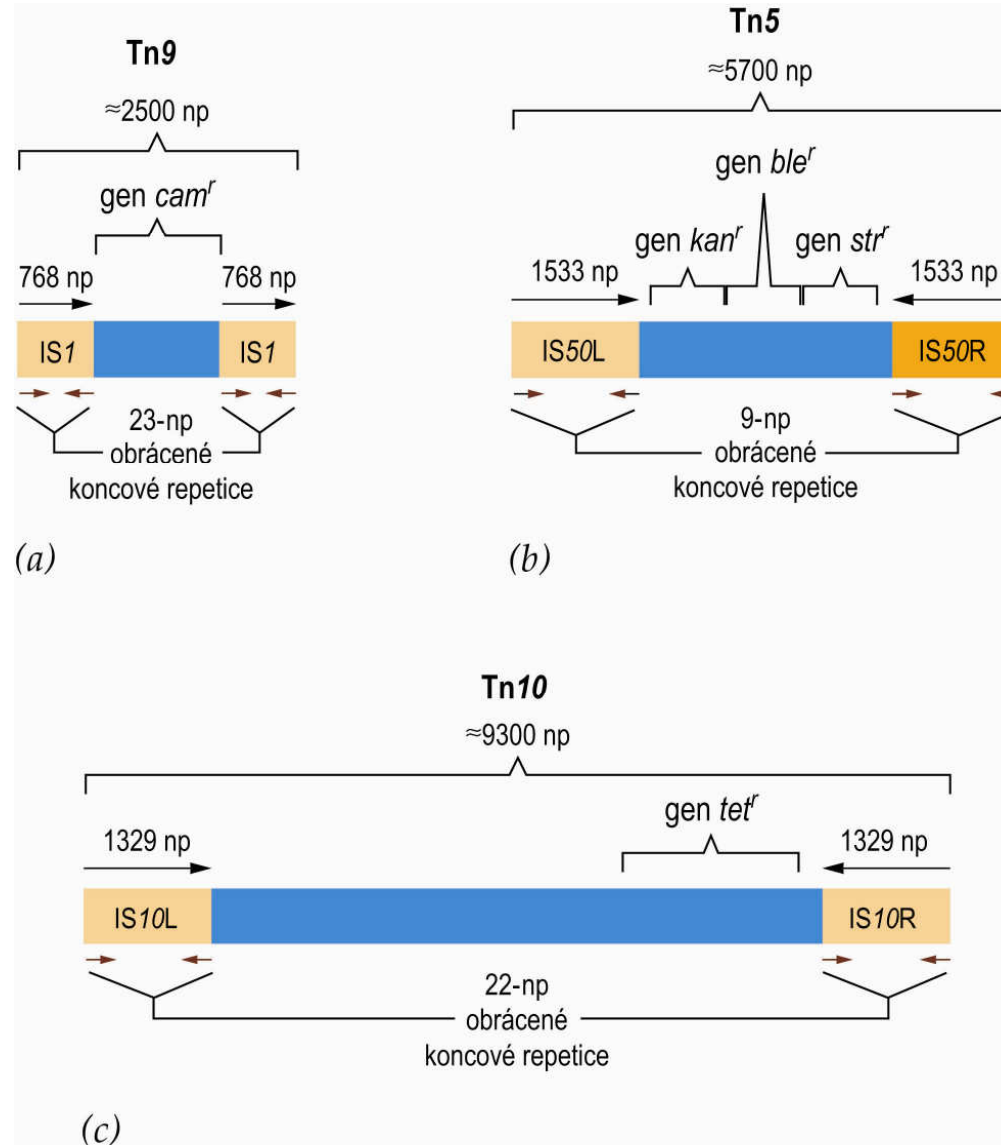
transponáza



Složené transpozony (Tn)

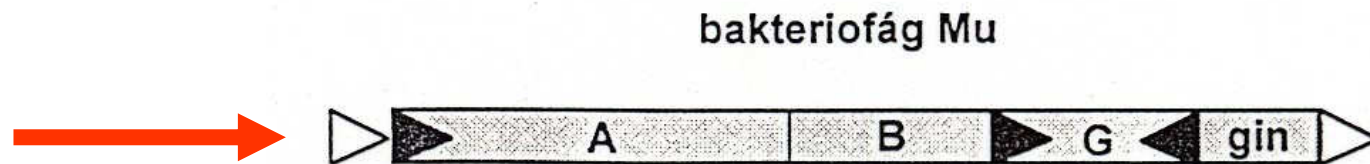
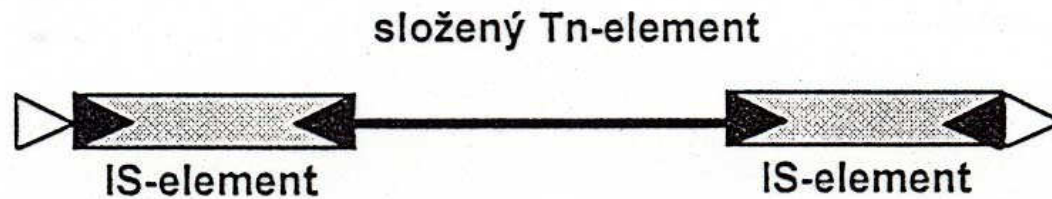
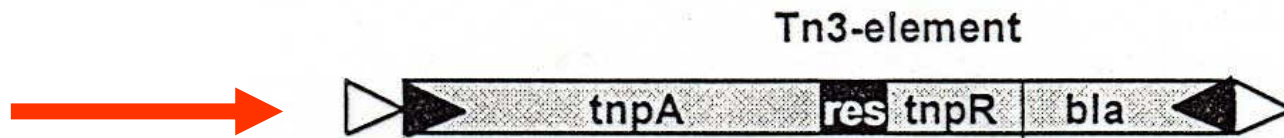
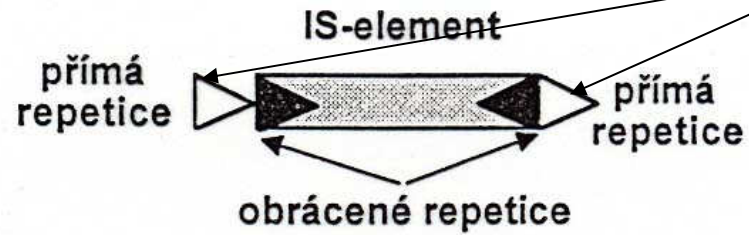


Příklady složených transpozonů bakterií



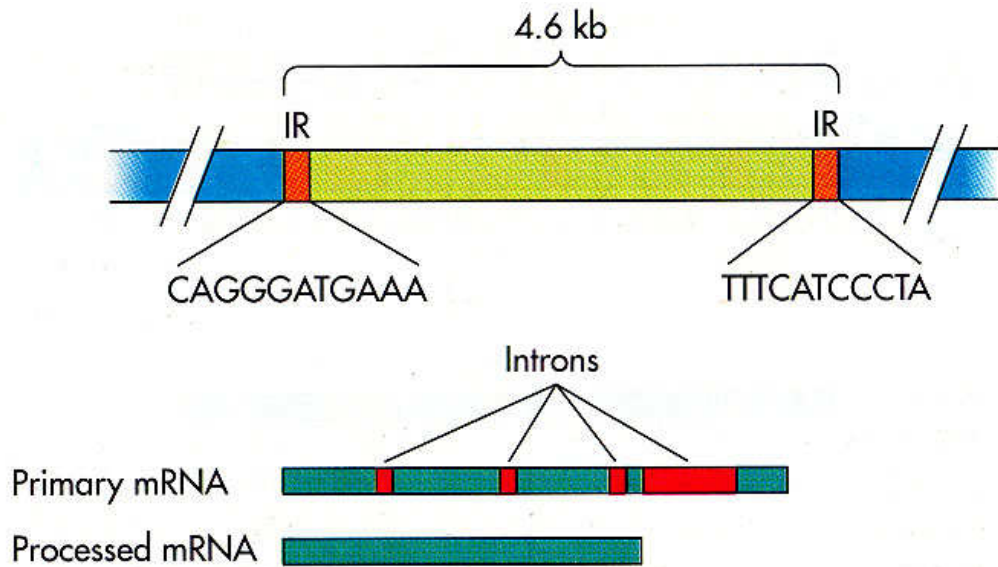
prokaryotické transpozony

Vedle místa začlenění



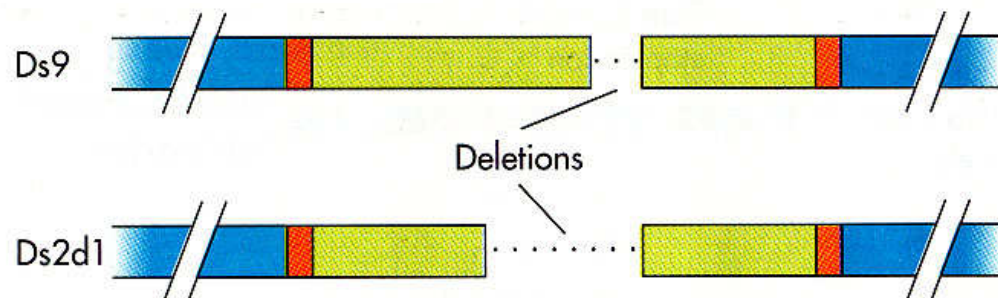
Mobilní elementy u kukuřice (Ac/Ds) (Elementy B. McClintockové)

Ac element



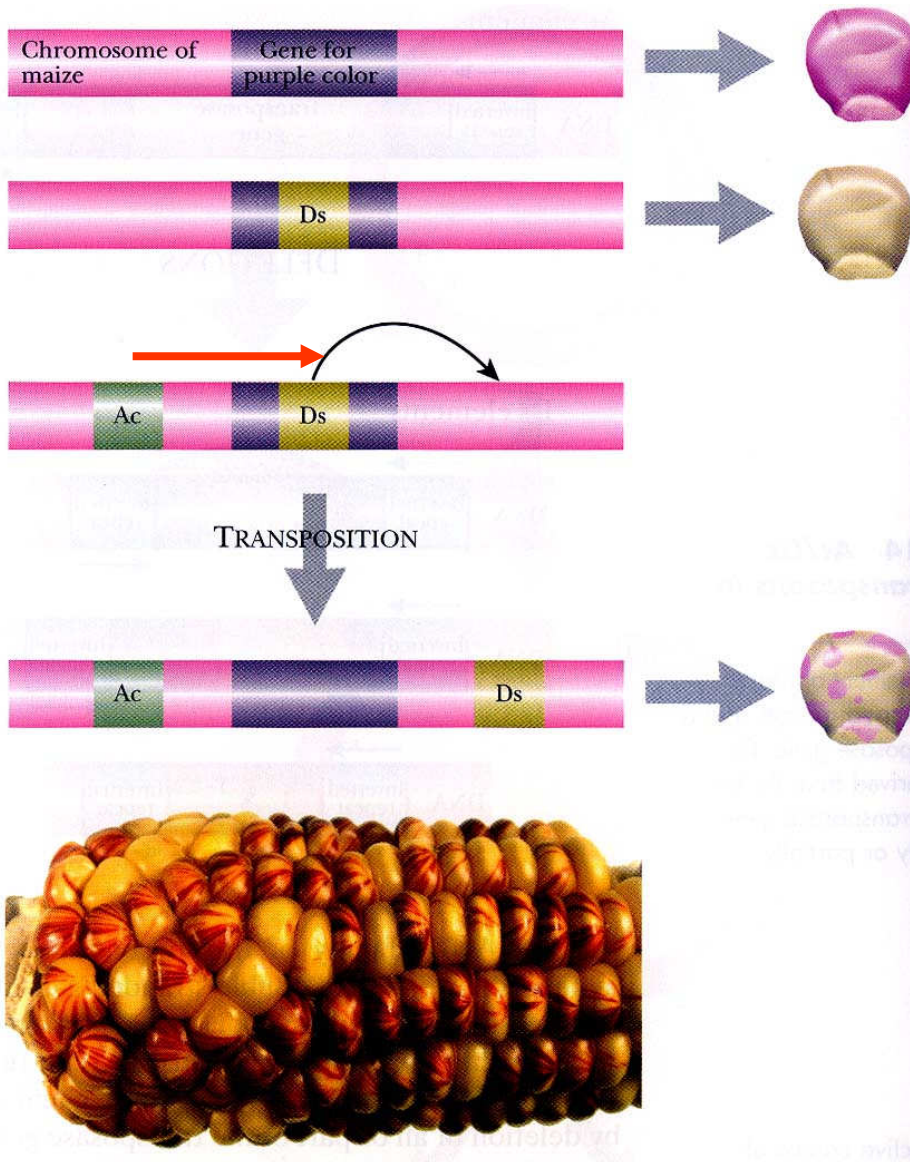
Autonomní elementy schopné zajistit vlastní transpozici

Ds elementy



Neautonomní elementy schopné transpozice za přítomnosti Ac elementů

Transpozice Ds elementu u kukuřice



Funkční gen pro purpurovou barvu obilek

Gen pro purpurovou barvu obilek přerušeny transpozonem

Vyčlenění Ds elementu z genu zprostředkované transponázou Ac elementu

Znovunabytí funkce genu pro purpurovou barvu obilek v buňkách, v nichž došlo k vyčlenění transpozonu.

Náhodnost procesu vyčlenění má za následek vznik skvrnitých obilek

Transpozony u kukuřice



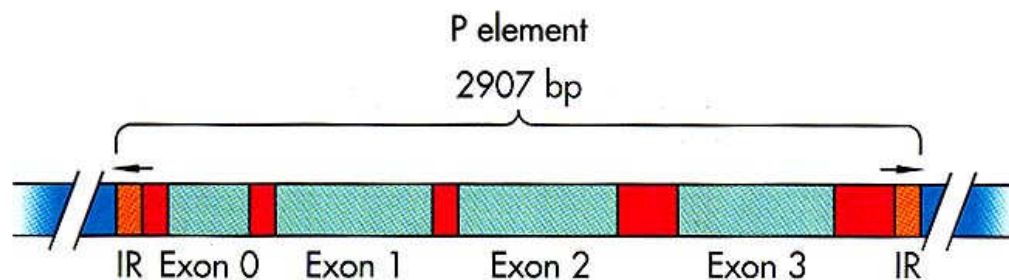
Figure 21-42 Mosaicism through transposon mutagenesis in corn. These seeds represent genotypes in which a transposon has inserted into a gene that produces anthocyanin. Therefore, the cells of these seeds are predominantly lacking anthocyanin and are yellow; let us call the genotype $A^T A^T$. However, during development, the transposon can occasionally exit from the gene, forming a revertant cell of genotype AA^T . Cell division will result in a clone of revertant cells and hence a patch of pigmented cells. The three different rows represent corn lines in which the transposon exits early (large spots), late (small spots), or in between (intermediate spots).

Transpozony u *Antirrhinum*

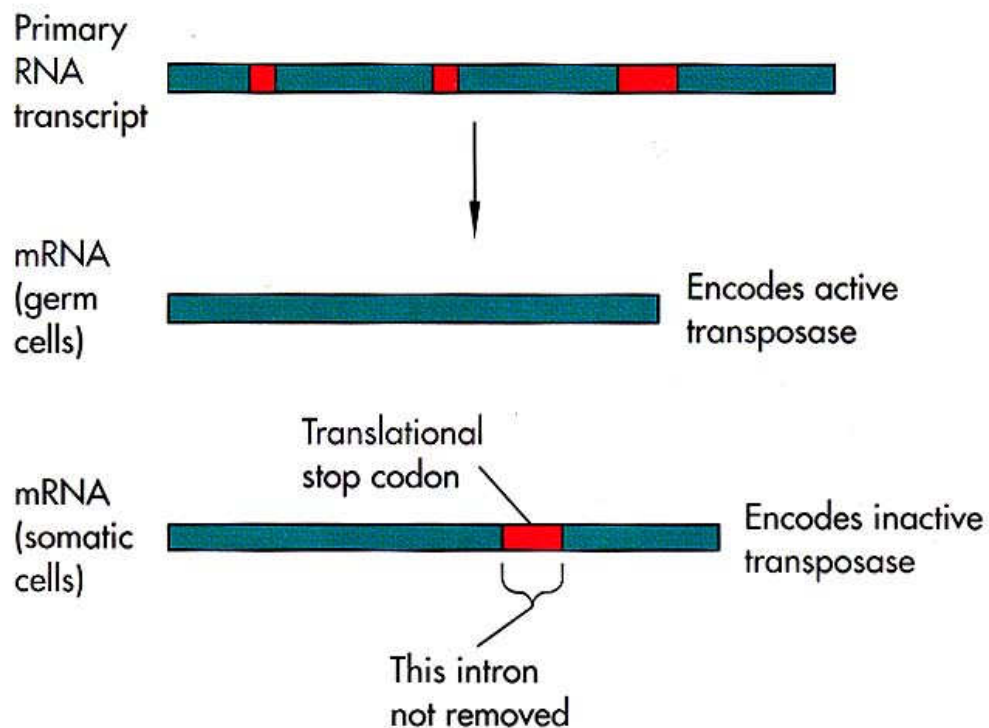


Mozaikovitost květu je způsobena pohyby transpozonů, které jsou začleněny do obou alel genu pro anthokyanin. Vyčlenění transpozonů vede k vytváření červených sektorů.

Mobilní elementy *Drosophila melanogaster* - P elementy



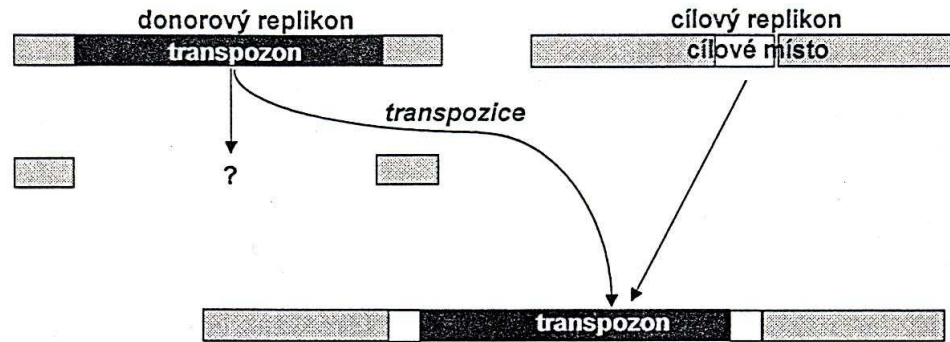
Transpozony navozující dysgenezi hybridů



K transpozici dochází jen v zárodečných buňkách, kde se tvoří aktivní transponáza

mariner – různé druhy drosofil, aj.

Mechanismy transpozice

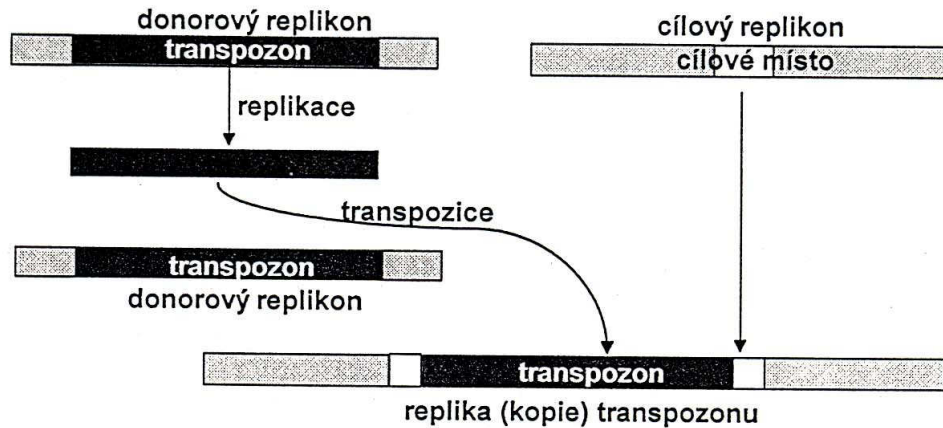


Obr. 403
Konzervativní transpozice

„cut and paste“

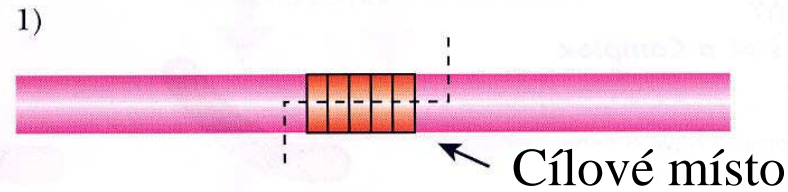
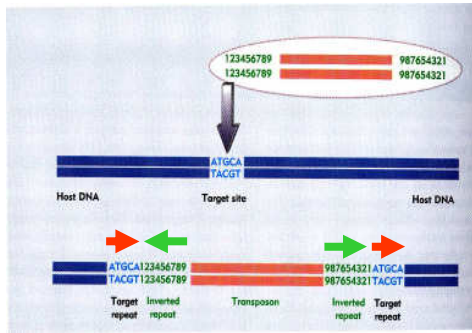
Typy transpozice

- intramolekulární
- intermolekulární



Obr. 404
Replikativní transpozice

Vznik přímých repeticí v cílovém místě po začlenění transpozonu



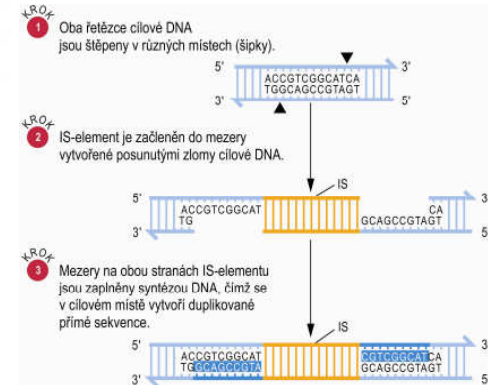
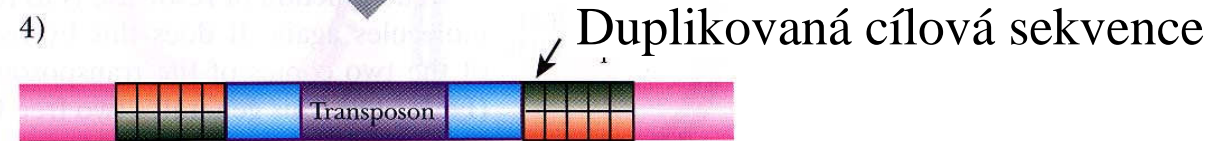
Vytvoření posunutých zlomů transponázou



Začlenění transpozonu do cílového místa

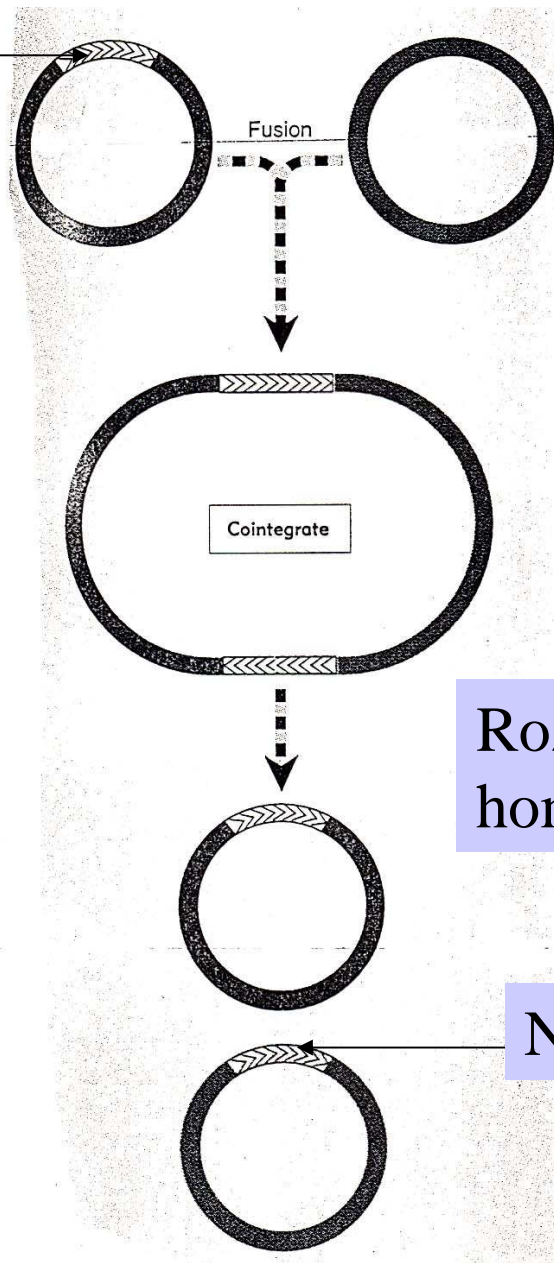


Doplnění komplementárních úseků



Replikativní transpozice

transpozon

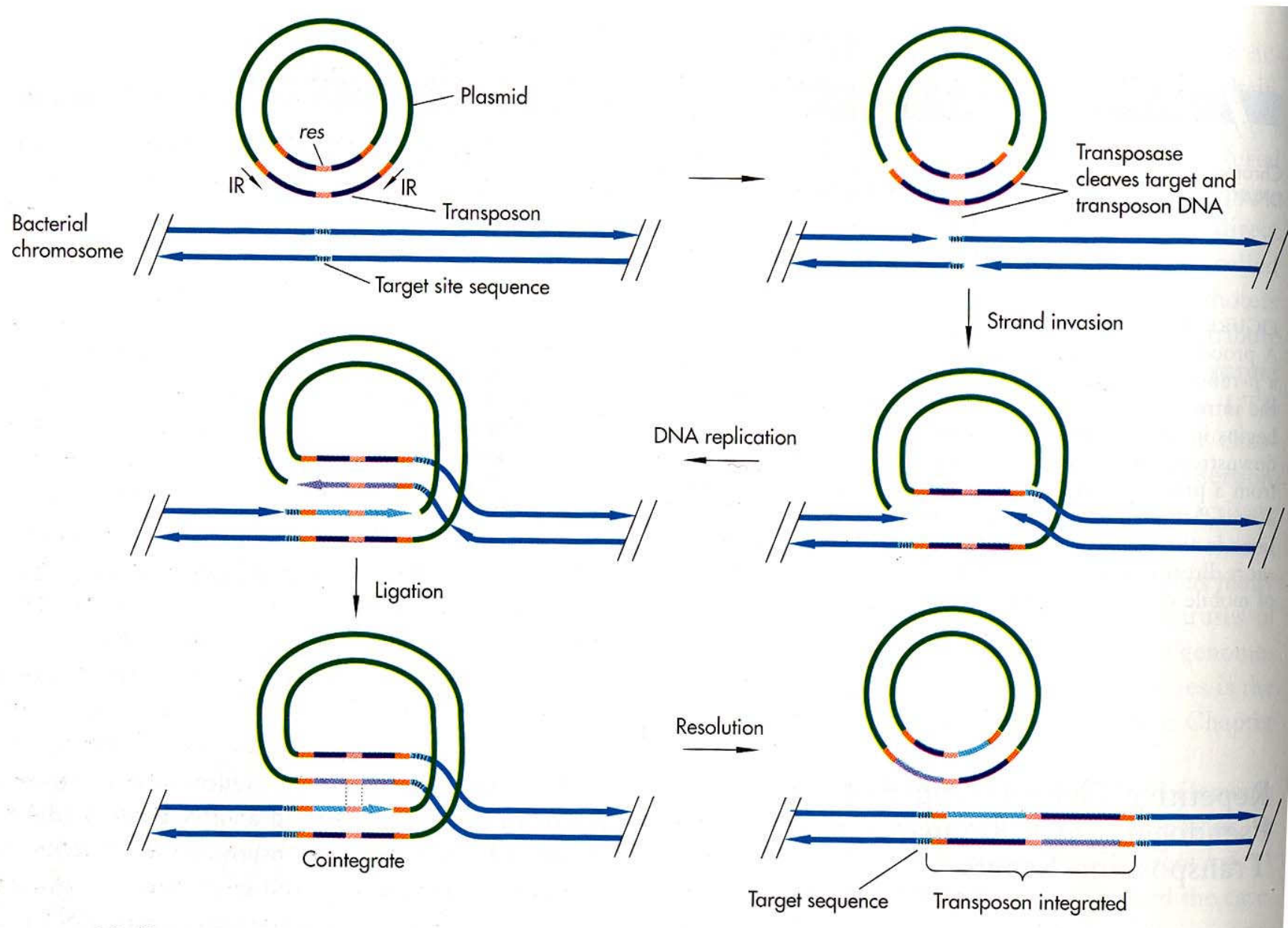


Vznik kointegrátu


Rozklad kointegrátu
homologní rekombinací

Nová kopie transpozonu

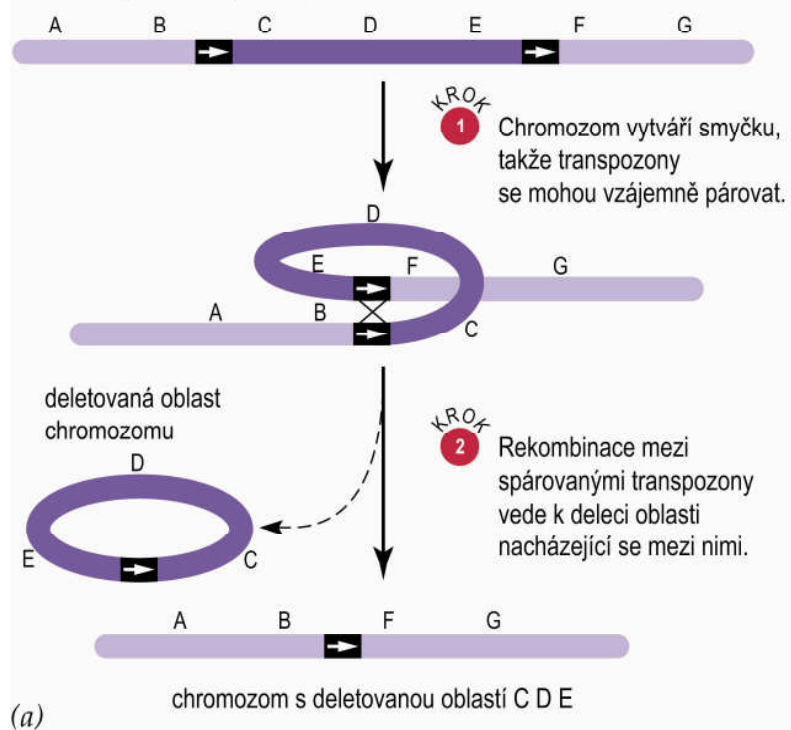
Mechanismus replikativní transpozice



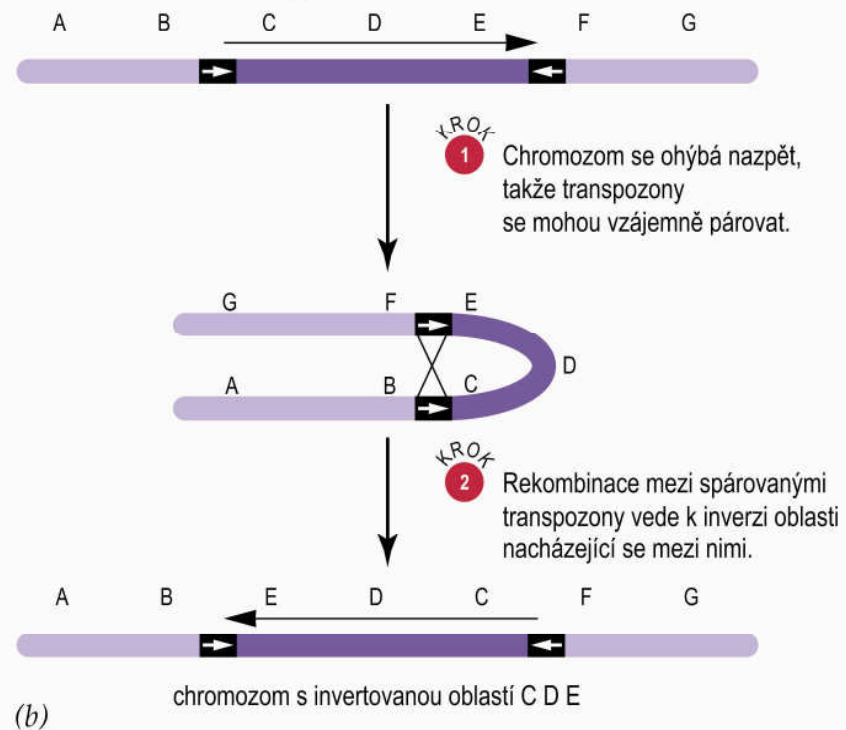
Chromozomová přeskupení navozená transpozony

 = transpozon

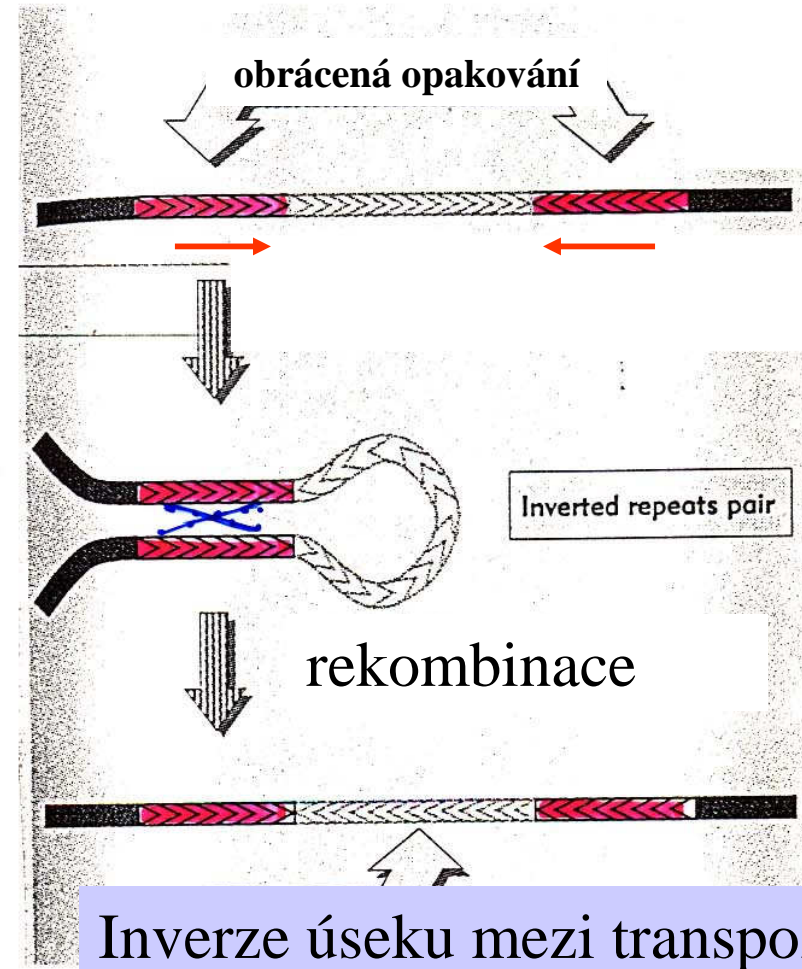
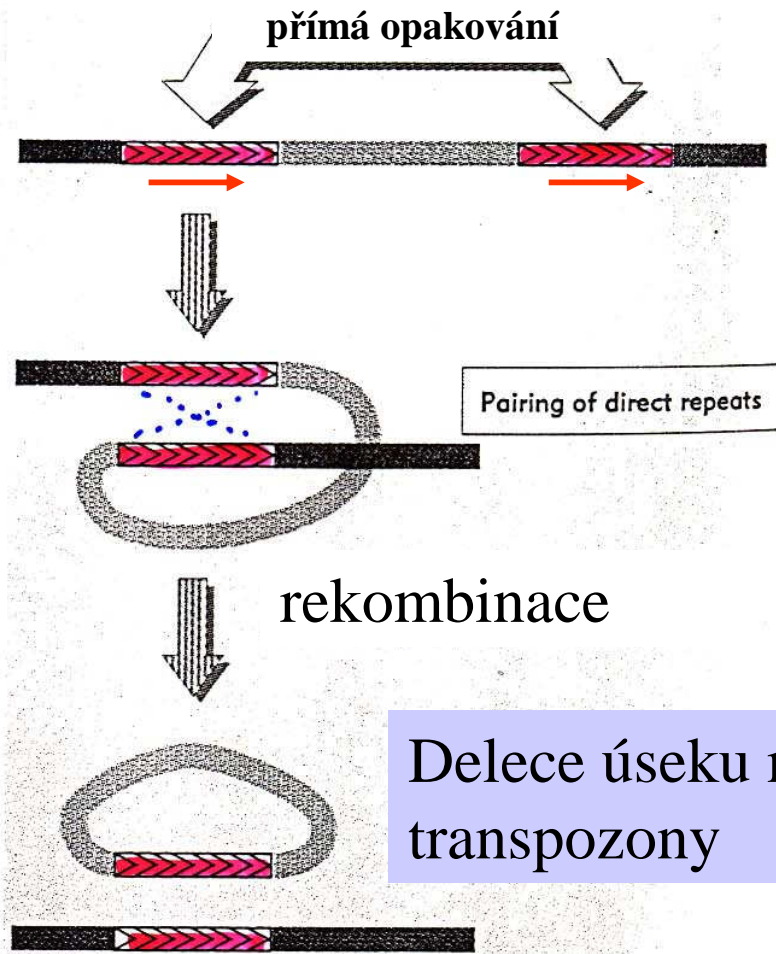
chromozom se dvěma stejně orientovanými transpozony



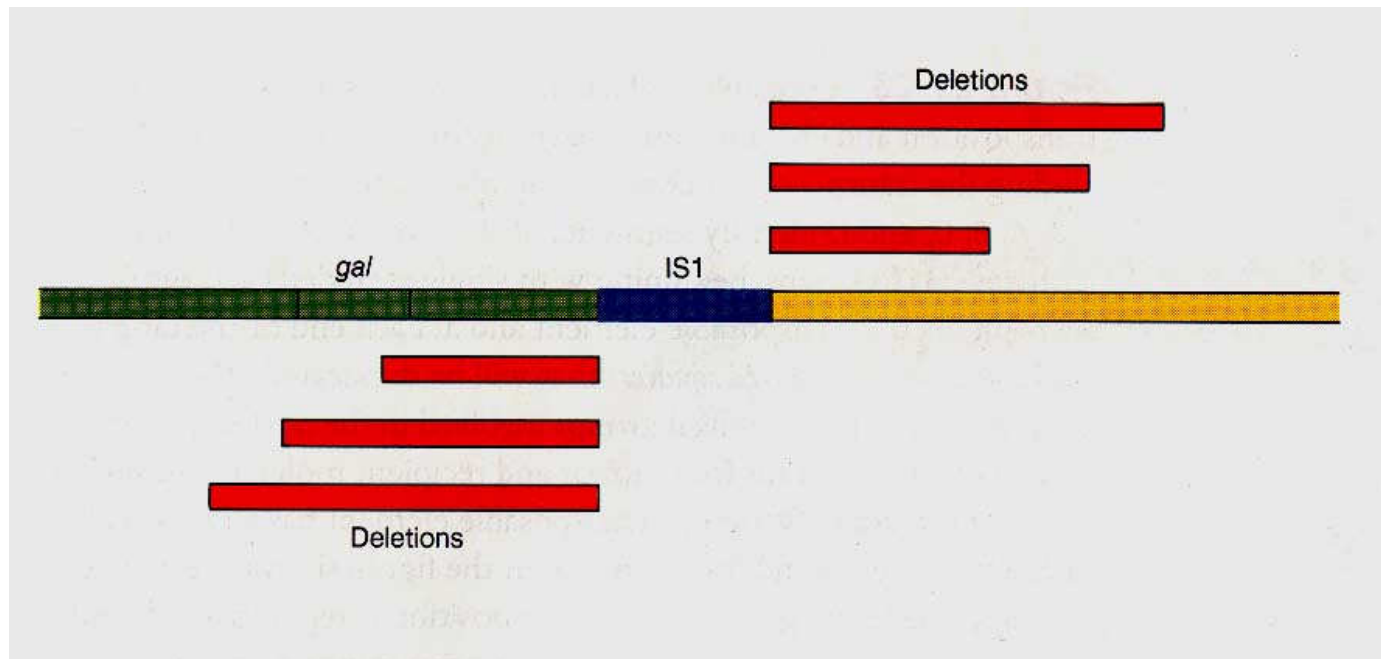
chromozom se dvěma opačně orientovanými transpozony



Vznik delecí a inverzí

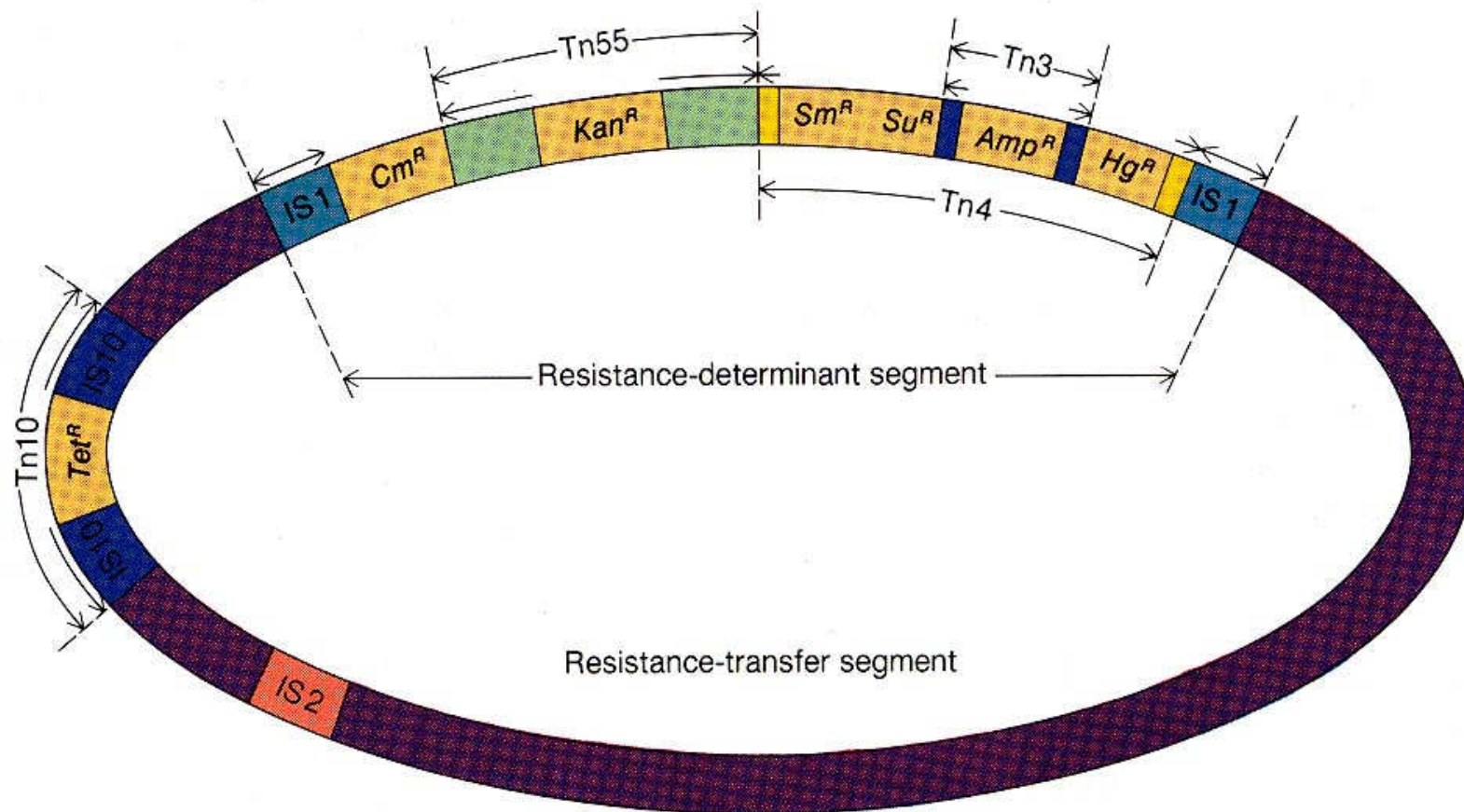


Delece pozorované v místě začlenění IS1 v lokusu gal *E. coli*

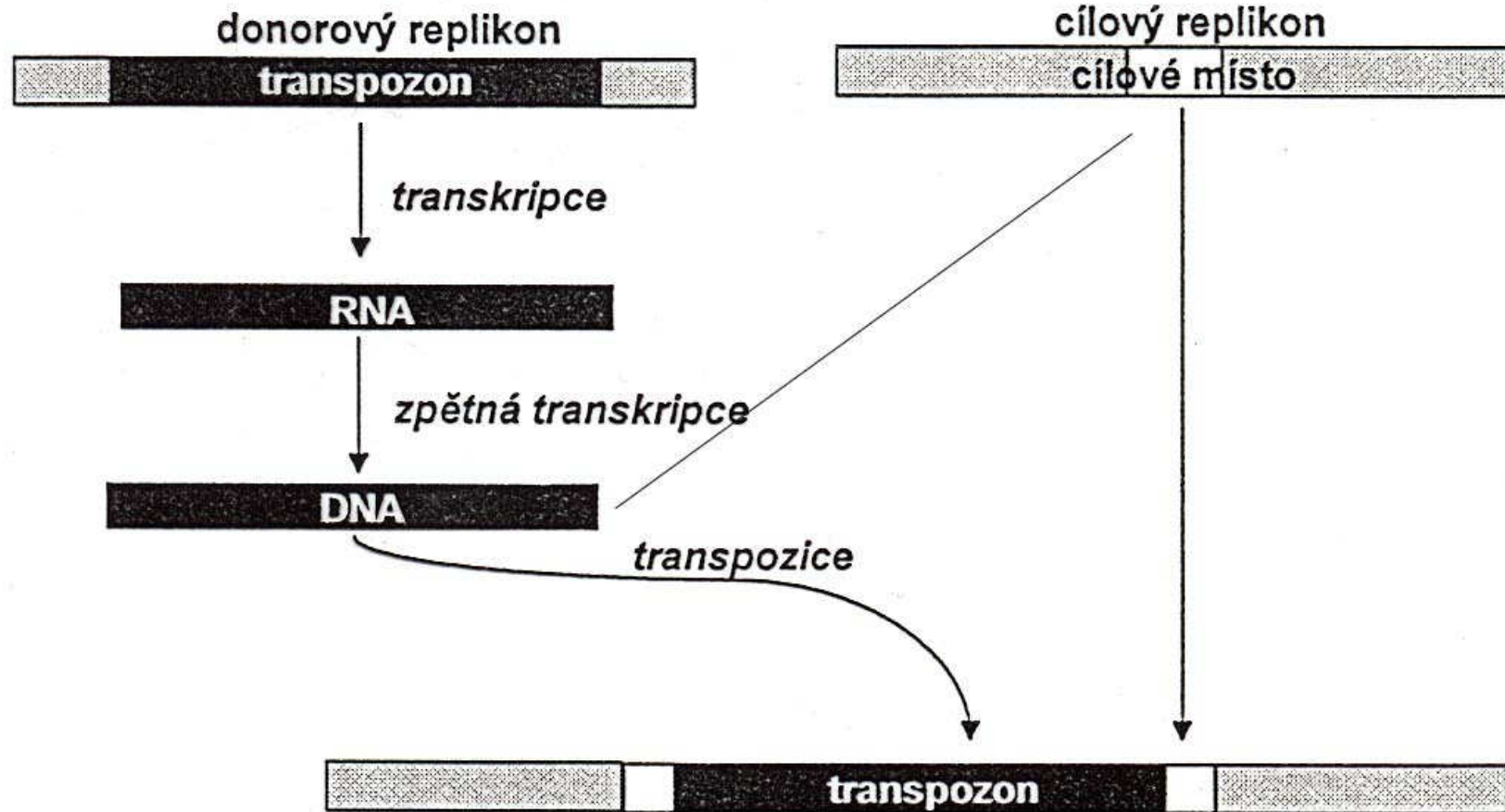


Úloha transpozonů při evoluci R-plazmidů

- každý transpozon může být přenášen nezávisle



Retropozice



RETROELEMENTY



1. NEVIROVÉ RETROELEMENTY (LTR, reverzní transkriptáza, integráza)

A. Retrotranspozony (obsahují LTR)

- * Ty-elementy u kvasinek (6,3 kb)
- * Copia-elementy u drozofily (5 kb)

B. Retropozony (bez LTR)

- * krátké sekvence SINE (short interspersed element) - <500 bp, 10^5 kopií - odvozeny z genů pro malé RNA, včetně tRNA (pseudogeny)
- * dlouhé sekvence LINE (long interspersed element)- 6,5 kb, 20 000 - 50 000 kopií u savců

C. Retrosekvence (cDNA geny) (bez LTR, reverzní transkriptázy a integrázy)

reverzní transkripty strukturních genů - upravené přepisy bez intronů, s poly(A)

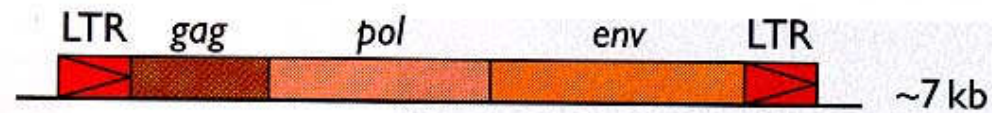
- * Retrogeny - funkční retrosekvence kódující identický protein jako původní gen
- * Retropseudogeny - nefunkční formy genů
 - Alu- sekvence (z 7SL RNA, 300 bp, u člověka 500 000 x)



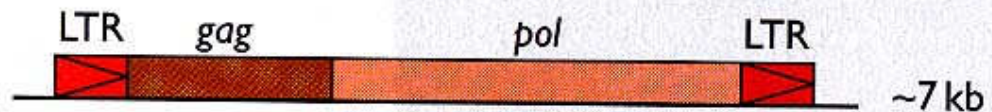
2. VIROVÉ RETROELEMENTY virus HIV

Srovnání struktury čtyř typů retroelementů

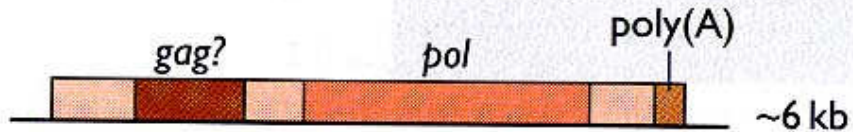
(A) Retrovirus



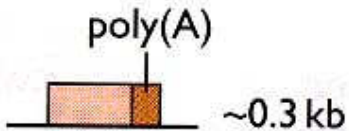
(B) Ty1/copia retrotransposon



(C) LINE **nemají LTR**



(D) SINE



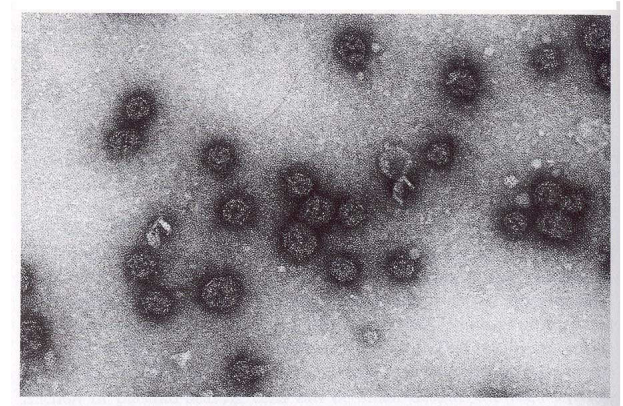
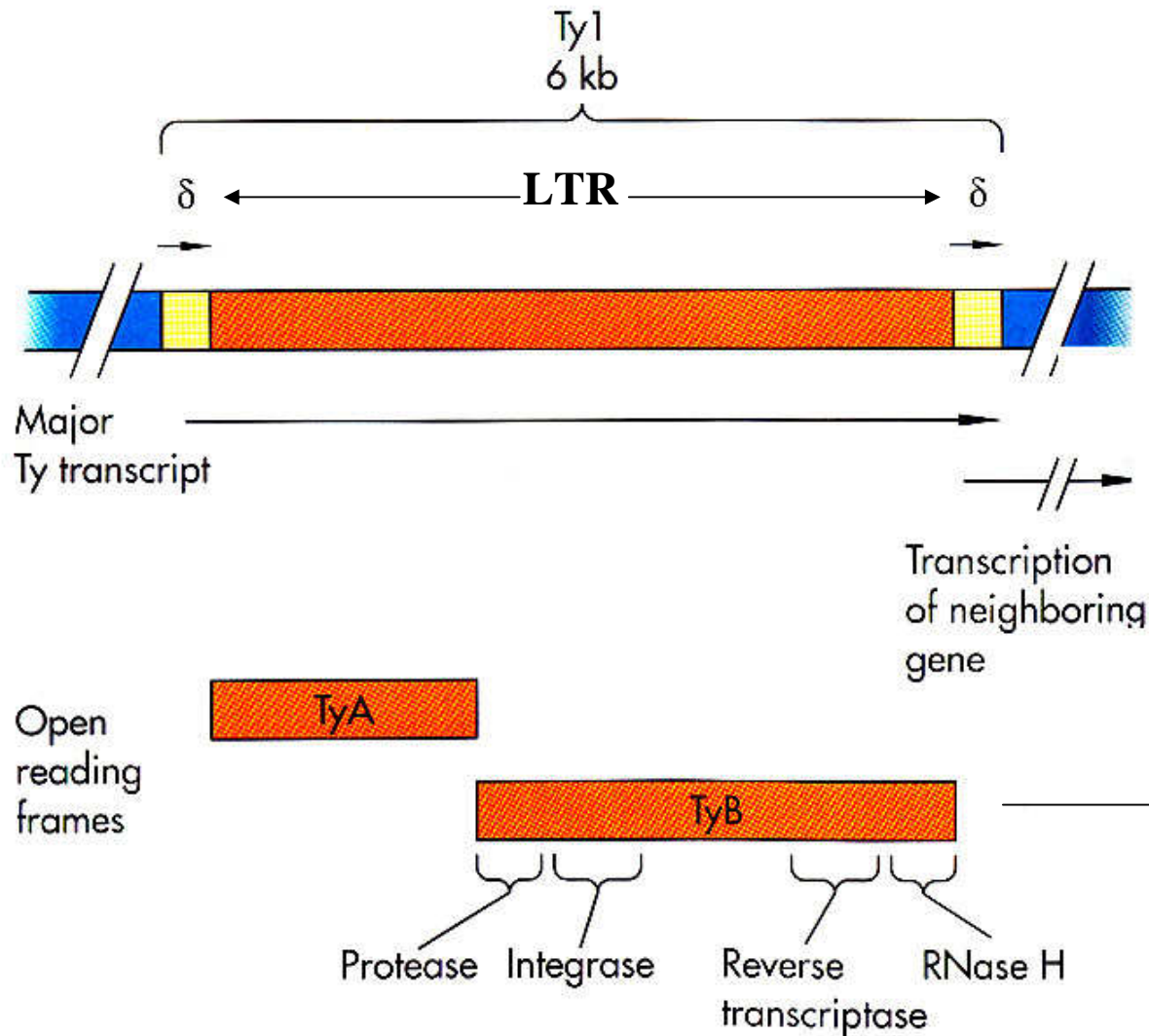
neautonomní

RT

Mobilní elementy kvasinek - Ty elementy

Retrovirům podobné elementy

Virům podobné částice odvozené z Ty elementů



Enzymy zajišťující zpětnou transkripci a integraci DNA do nových míst v genomu

Retroelementy u drozofily

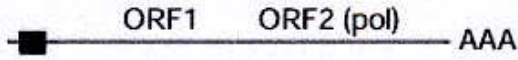
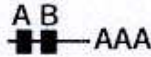
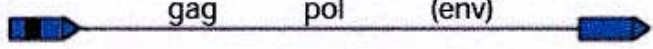
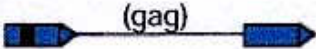
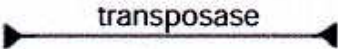

Copia elementy

Gypsy elementy

F, *G* a *I*-elementy

HeT-A, *TART* (telomere associated retrotransposons) – transpozice v telomerách, regenerace konců chromozomů ztracených při replikaci

4 třídy rozptýlených repeticí v genomu člověka

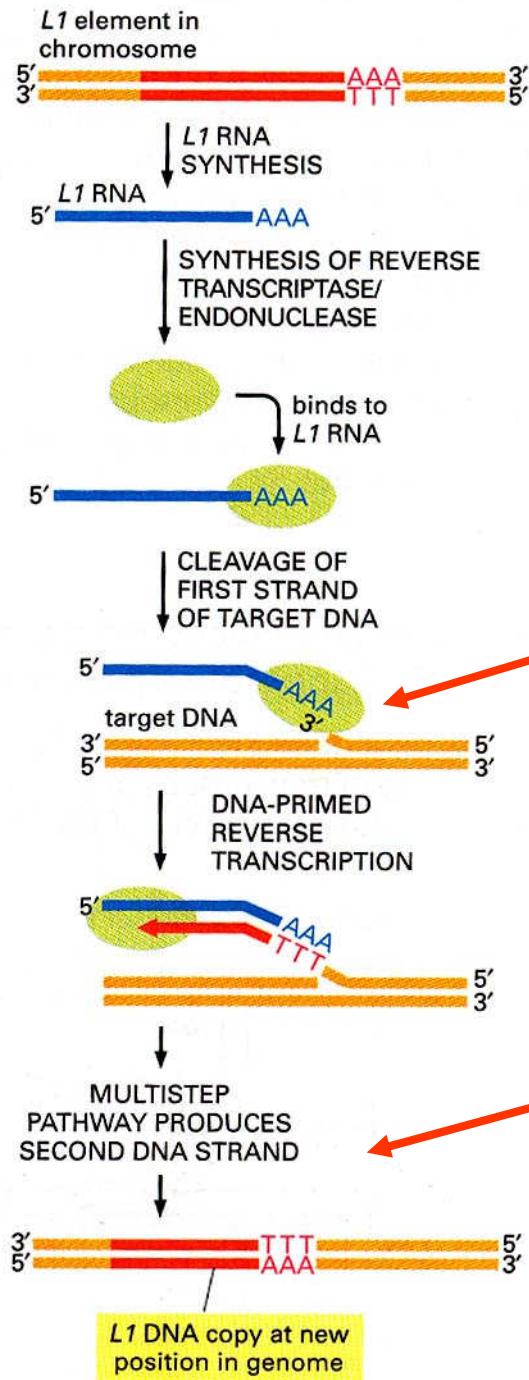
			Length	Copy number	Fraction of genome
LINES	Autonomous		6–8 kb	850,000	21%
SINEs	Non-autonomous		100–300 bp	1,500,000	13%
Retrovirus-like elements	Autonomous		6–11 kb	450,000	8%
	Non-autonomous		1.5–3 kb		
DNA transposon fossils	Autonomous		2–3 kb	300,000	3%
	Non-autonomous		80–3,000 bp		

Alu



Inaktivní nejméně 50 milionů let

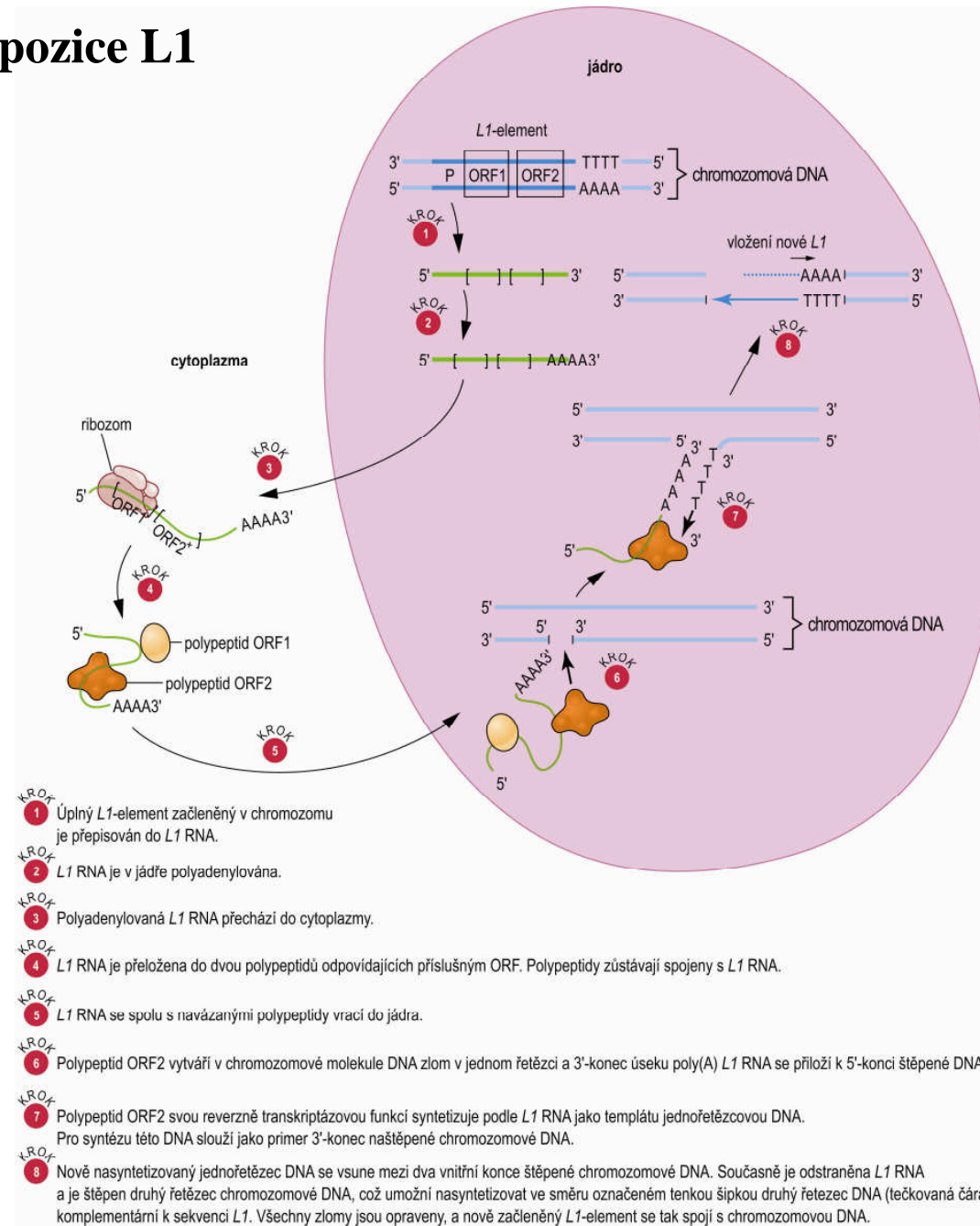
Transpozice neretrovirových retrotranspozonů (sekvence LINE 1) místně specifickou rekombinací



Iniciační fáze, při níž endonukleáza (součást RT) připojená na L1 RNA štěpí cílovou sekvenci - uvolněná 3'OH skupina funguje jako primer pro reverzní transkripci - vytváří se ssDNA napojená na cílovou DNA.

V dalším kroku se vytvoří dsDNA, která se začlení do cílového místa

Mechanismus transpozice L1 v lidském genomu



Vznik upravených pseudogenů



Původní funkční gen



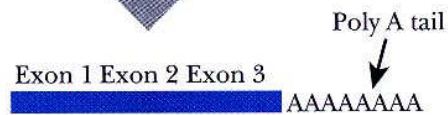
Primary transcript



PROCESSING



mRNA



Sestřih a připojení polyA

REVERSE TRANSCRIPTION



cDNA



Reverzní transkriptáza některé transkripty konvertuje na cDNA

RE-INSERTION

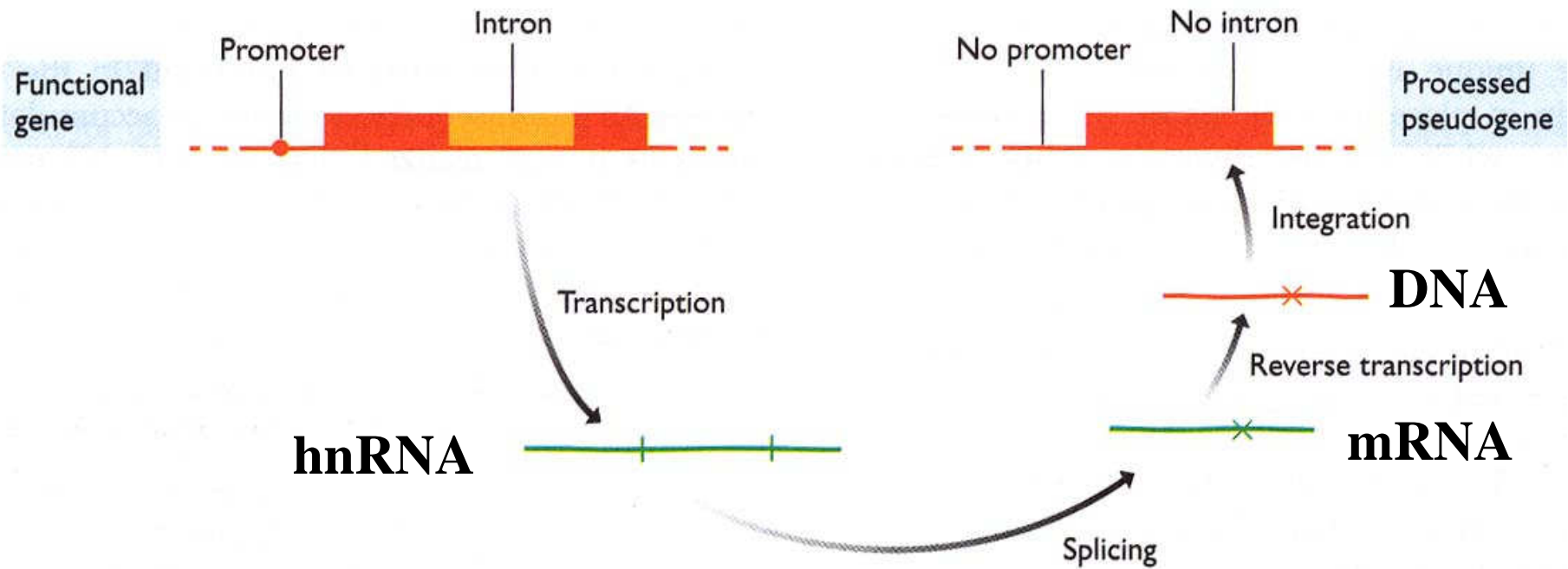


Another site in DNA



Vytvořená cDNA je začleněna do jiných míst genomu - vzniká pseudogen, který není funkční v důsledku chybění promotoru

Upravené pseudogeny vytvořené reverzní transkripcí



Retrotranspozice „homing retro-intronů“ skupiny II

Intron začleněný v jedné z kopií genu



kopie genu neobsahující intron



TRANSCRIPTION



TRANSLATION

Vytvoření enzymu s dvojí aktivitou



ENDONUCLEASE ACTIVITY

Štěpení genu v cílovém místě

REVERSE TRANSCRIPTASE ACTIVITY



dsDNA kopie intronu



dvouřetězcový zlom



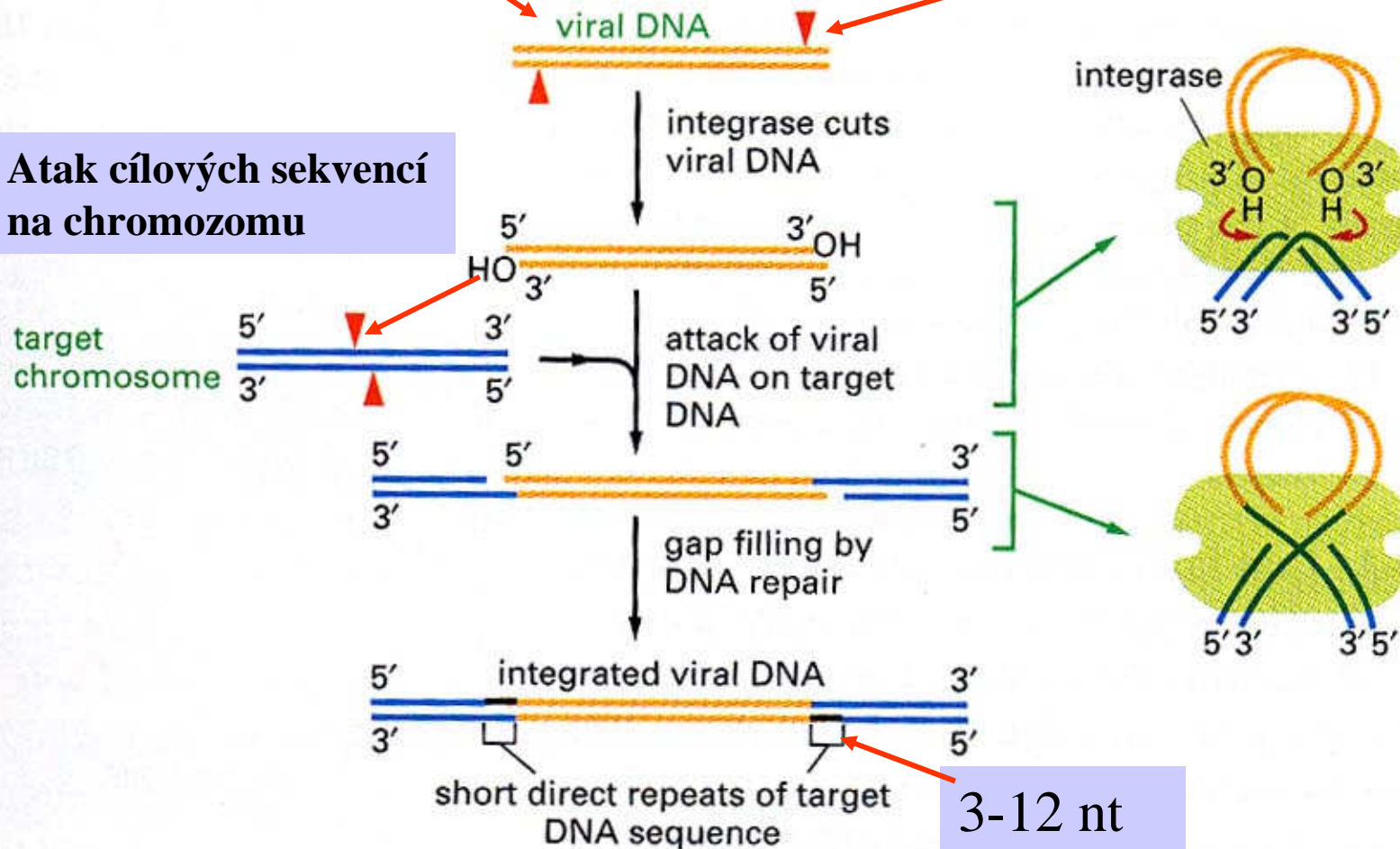
Transpozice retrovirů nebo retrotranspozonů místně-specifickou rekombinací

RNA

RT

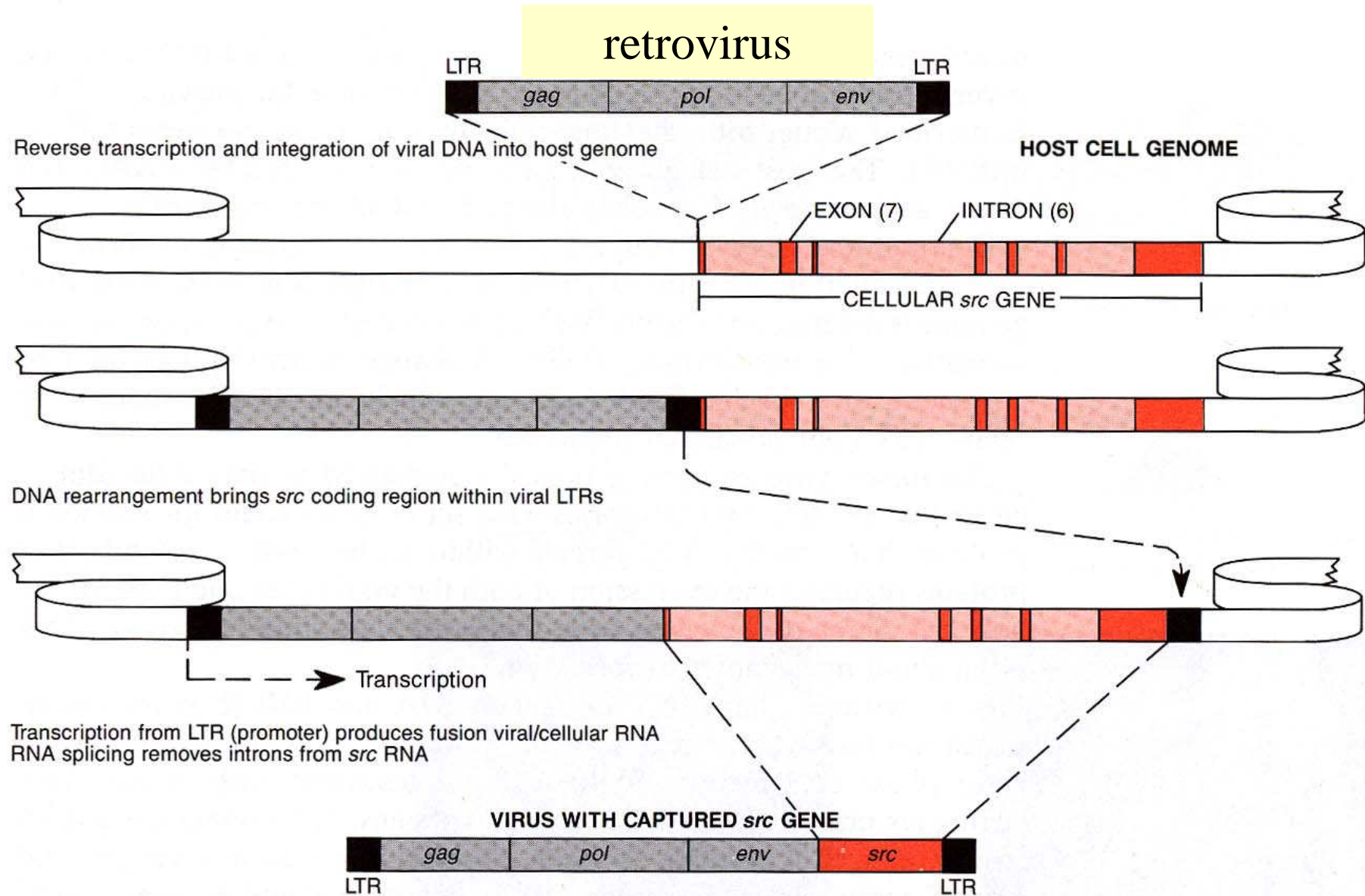
Štěpení konců
transpozonu integrázou

Atak cílových sekvencí
na chromozomu



3-12 nt

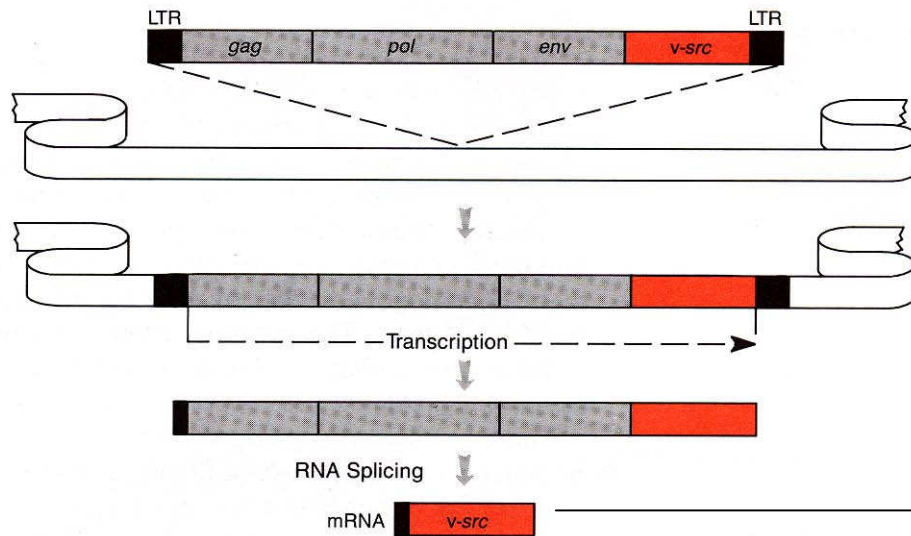
Vznik retrovirů přenášejících onkogeny



Capture of the Cellular *src* Oncogene by a Progenitor Rous Sarcoma Virus

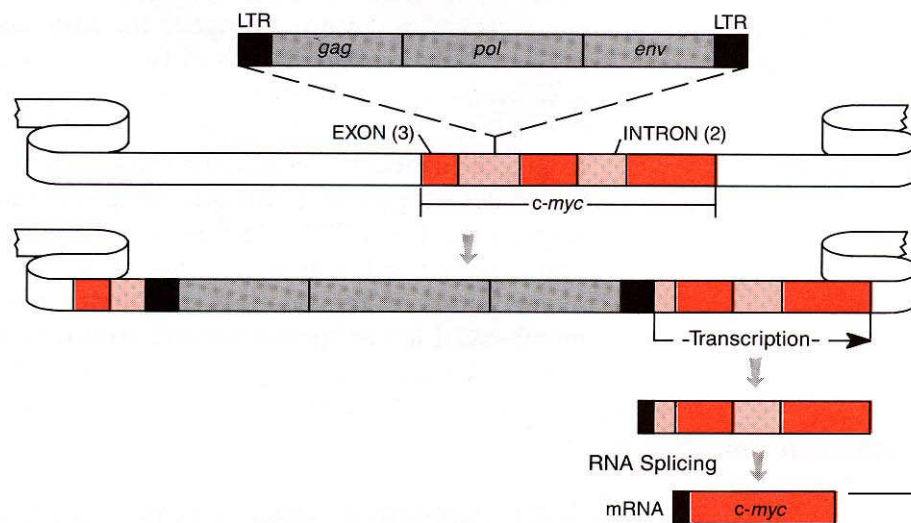
Akutně a pomalu transformující retroviry

ACUTE TRANSFORMATION: ROUS SARCOMA VIRUS (RSV)



Transdukce onkogenu akutně transformujícími retroviry

CHRONIC TRANSFORMATION: AVIAN LEUKOSIS VIRUS (ALV)



Inzerční aktivace protoonkogenu pomalu transformujícími retroviry

Acute vs. Chronic Transformation by Retroviruses

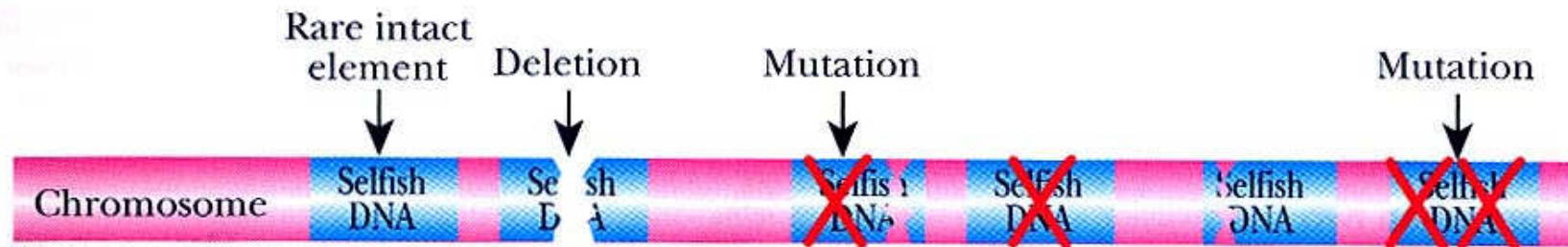
nádor

Vznik „odpadní“ DNA jako důsledek transpozice a následné inaktivace mobilních elementů

mobilní elementy



po mnoha generacích



Transpozony - mobilní genetické elementy

- **Tvoří pravidelnou součást genomu prokaryot i eukaryot (až 50% genomu)**
- **Navozují mutace genů (inzerční inaktivace, polární mutace, změny exprese genů)**
- **Jsou zodpovědné za přestavby chromozomů nebo plazmidů (tvoří "přenosné" úseky homologie, podmiňující homologní rekombinace, interakce mezi složkami genomu)**
- **Přenášejí nové znaky (např. AntR, onkogeny) mezi organismy (horizontální přenos genů)**

Specifické rysy transpozice:

- **cílová místa nejsou homologická s místy donorovými**
- **obvykle dochází k duplikaci přenášené sekvence, tj. transpozon zůstává i v původním donorovém místě**
- **v místě inzerce se zdvojují ve stejném směru sekvence DNA - transpozon je na obou koncích ohraničen přímými repeticemi, což je důsledek mechanismu transpozice**
- **po inzerci transpozonu do cílového místa dochází k inaktivaci genů, po excizi transpozonu se funkce obnovuje.**

Základní typy transpozonů a jejich klasifikace

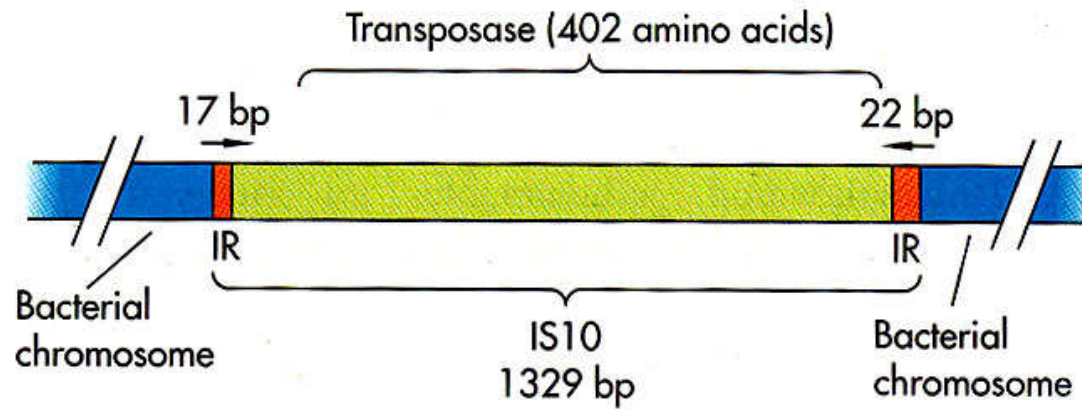
DNA-transpozony

- **Transpozony „cut and paste“** (prokaryota a eukaryota) – vyčlení se z původního místa a začleňují se do nového
- **Replikativní transpozony** (prokaryota) – během transpozice se replikují (jedna kopie zůstává v původním místě, druhá se objeví v novém místě)
 - **Konjugativní transpozony** (bakterie)
- 3. **Retrotranspozony** (eukaryota) – **během transpozice se transkripční sekvence transpozonu vytváří RNA**, která se převádí na DNA, která se pak začleňuje do nového místa
 - **retroviry**,
 - **retrovirům podobné elementy, retrotropozony**
 - **retrony** (bakterie)

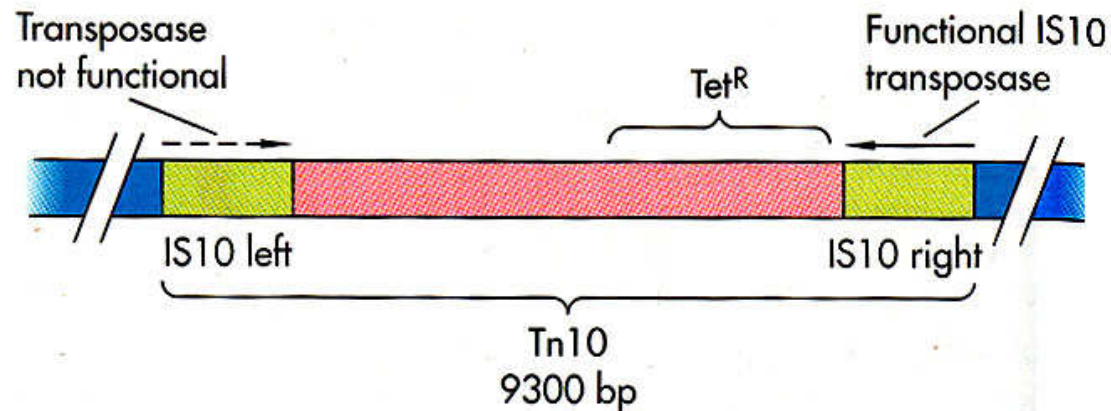
Struktura mobilních elementů bakterií

Inzerční sekvence (IS)

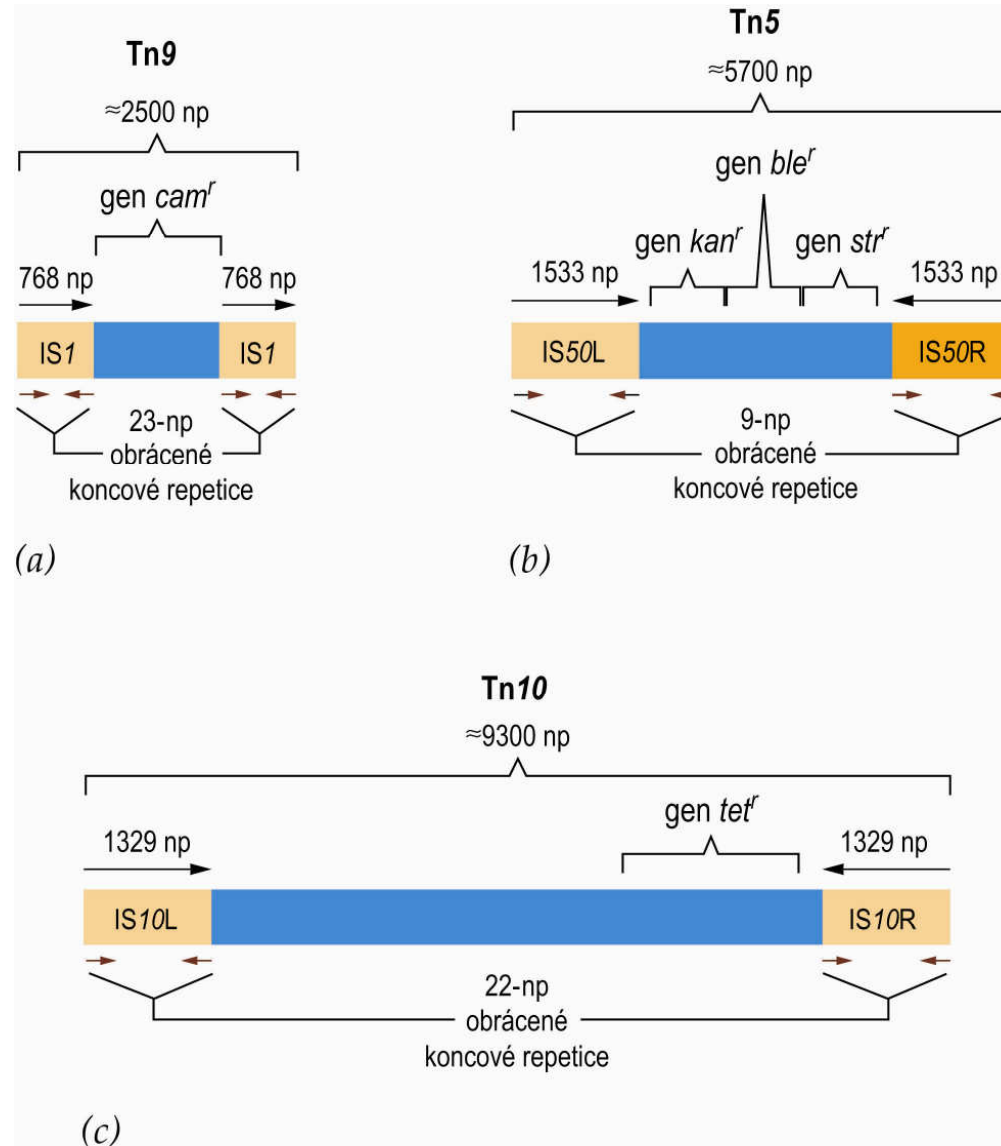
transponáza



Složené transpozony (Tn)

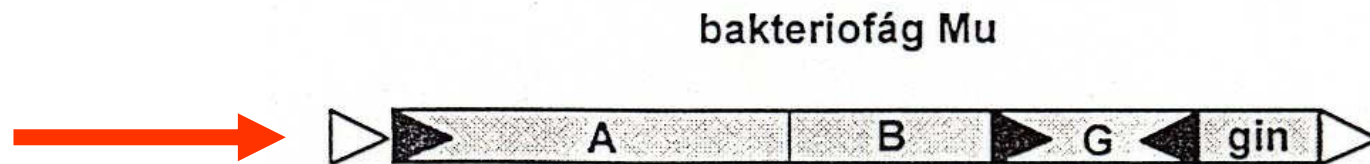
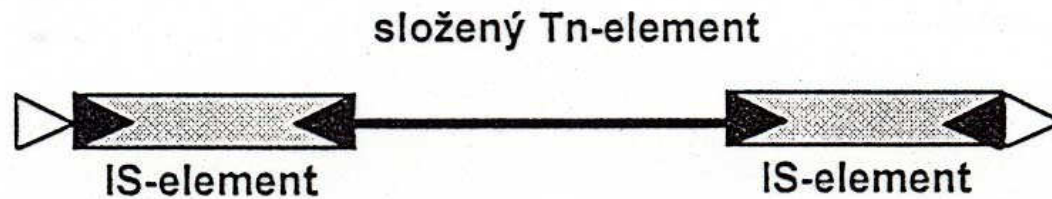
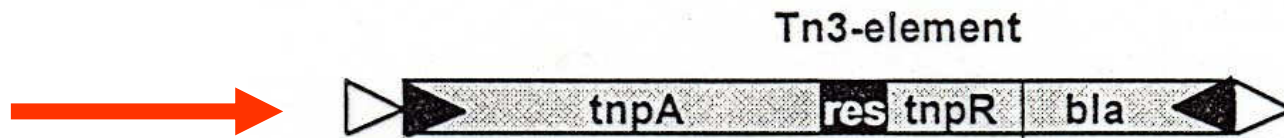
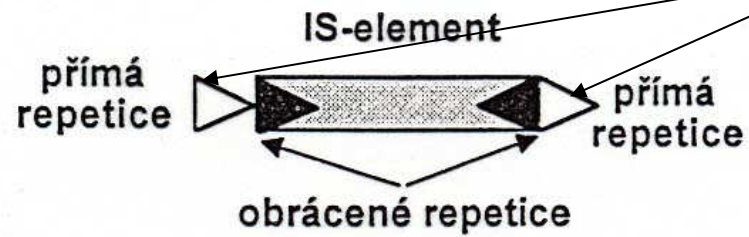


Příklady složených transpozonů bakterií



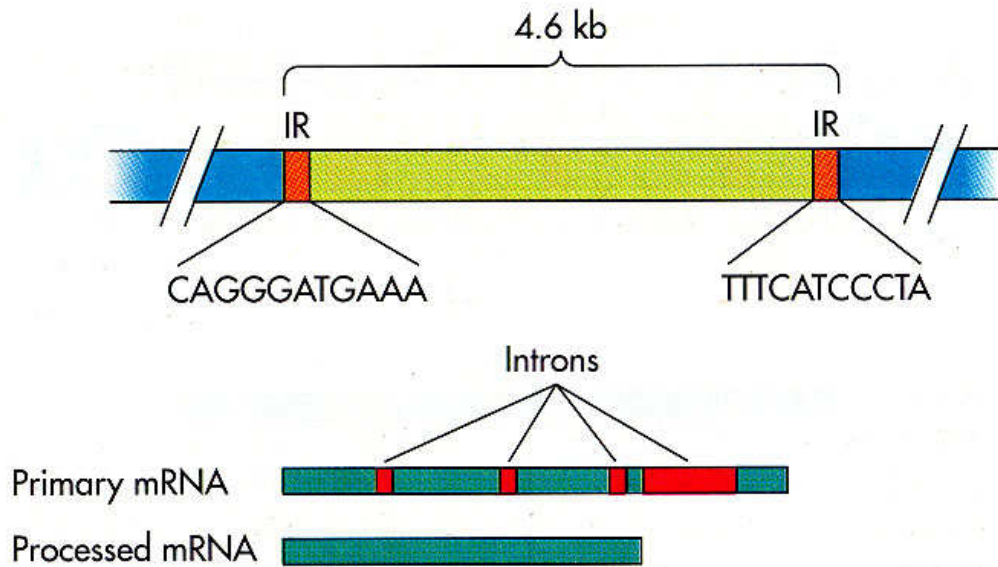
prokaryotické transpozony

Vedle místa začlenění



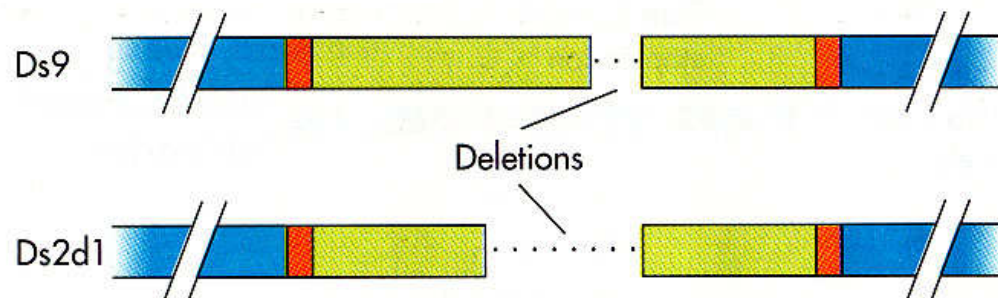
Mobilní elementy u kukuřice (Ac/Ds) (Elementy B. McClintockové)

Ac element



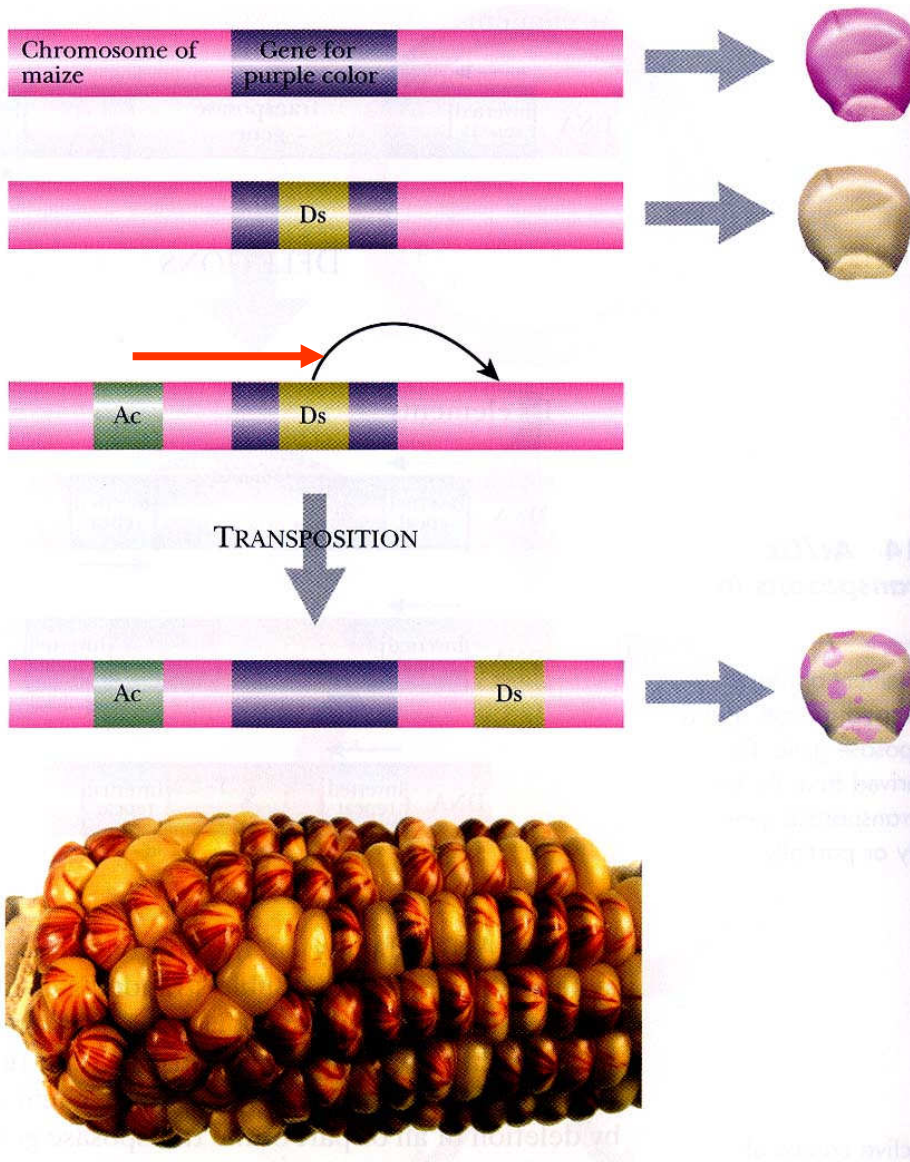
Autonomní elementy schopné zajistit vlastní transpozici

Ds elementy



Neautonomní elementy schopné transpozice za přítomnosti Ac elementů

Transpozice Ds elementu u kukuřice



Funkční gen pro purpurovou barvu obilek

Gen pro purpurovou barvu obilek přerušeny transpozonem

Vyčlenění Ds elementu z genu zprostředkované transponázou Ac elementu

Znovunabytí funkce genu pro purpurovou barvu obilek v buňkách, v nichž došlo k vyčlenění transpozonu.

Náhodnost procesu vyčlenění má za následek vznik skvrnitých obilek

Transpozony u kukuřice



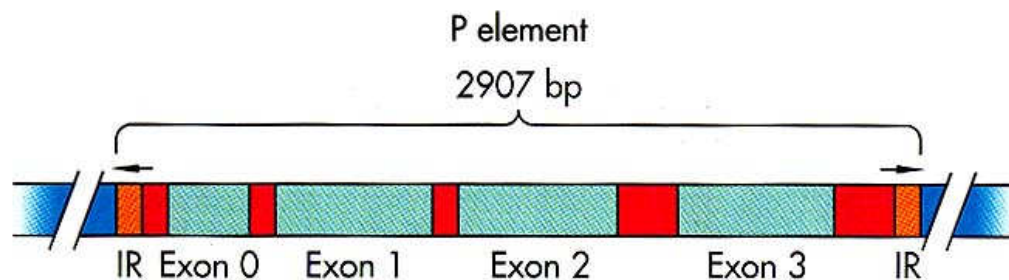
Figure 21-42 Mosaicism through transposon mutagenesis in corn. These seeds represent genotypes in which a transposon has inserted into a gene that produces anthocyanin. Therefore, the cells of these seeds are predominantly lacking anthocyanin and are yellow; let us call the genotype $A^T A^T$. However, during development, the transposon can occasionally exit from the gene, forming a revertant cell of genotype AA^T . Cell division will result in a clone of revertant cells and hence a patch of pigmented cells. The three different rows represent corn lines in which the transposon exits early (large spots), late (small spots), or in between (intermediate spots).

Transpozony u *Antirrhinum*

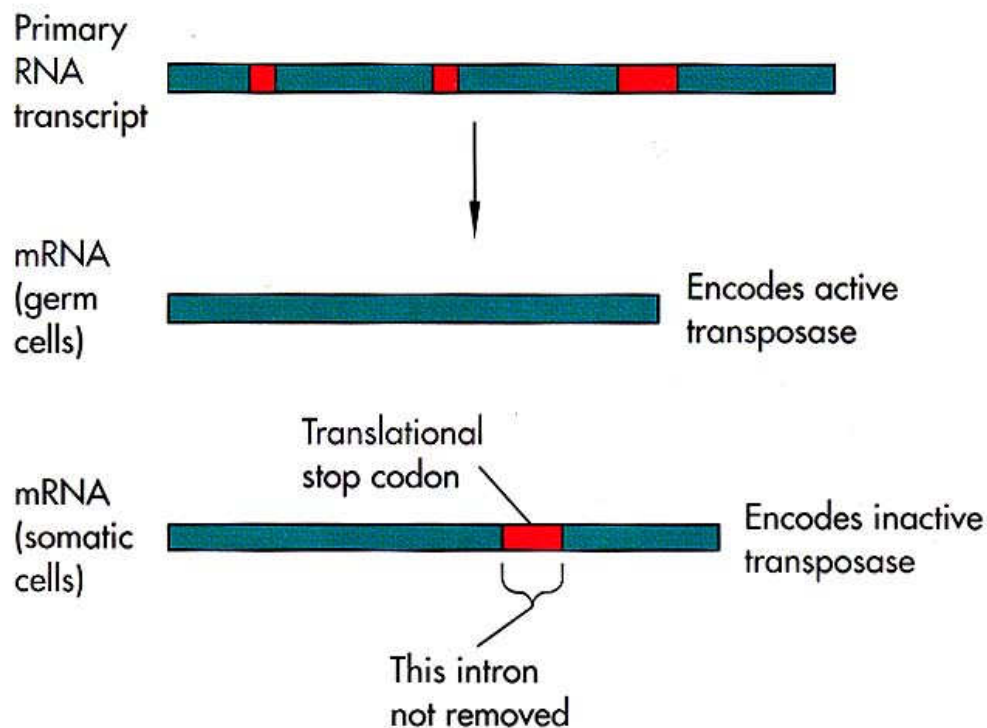


Mozaikovitost květu je způsobena pohyby transpozonů, které jsou začleněny do obou alel genu pro anthokyanin. Vyčlenění transpozonů vede k vytváření červených sektorů.

Mobilní elementy *Drosophila melanogaster* - P elementy



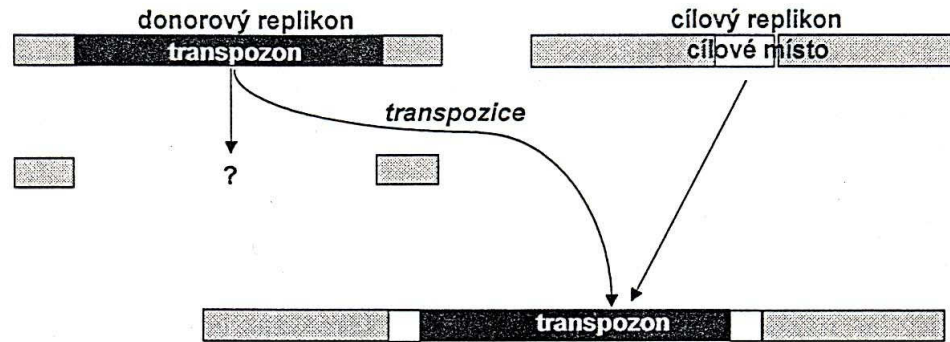
Transpozony navozující dysgenezi hybridů



K transpozici dochází jen v zárodečných buňkách, kde se tvoří aktivní transponáza

mariner – různé druhy drosofil, aj.

Mechanismy transpozice

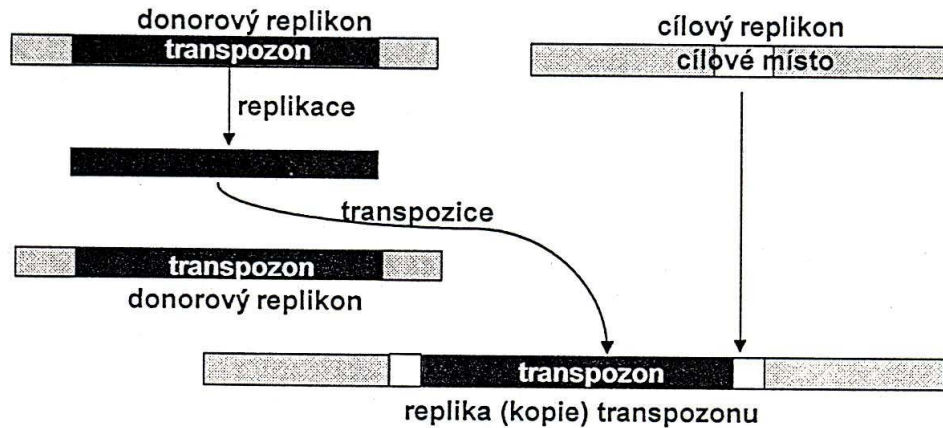


Obr. 403
Konzervativní transpozice

„cut and paste“

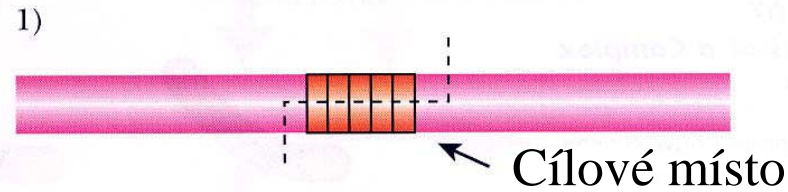
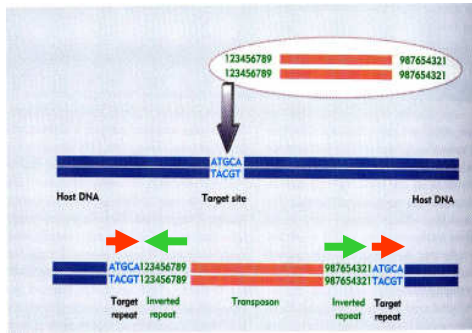
Typy transpozice

- intramolekulární
- intermolekulární



Obr. 404
Replikativní transpozice

Vznik přímých repeticí v cílovém místě po začlenění transpozonu



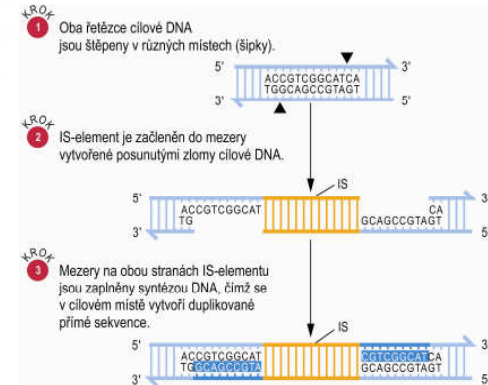
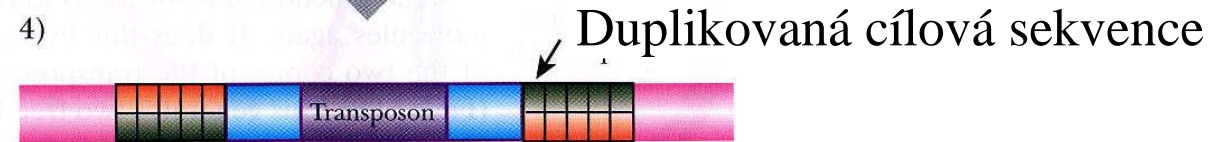
Vytvoření posunutých zlomů transponázou



Začlenění transpozonu do cílového místa

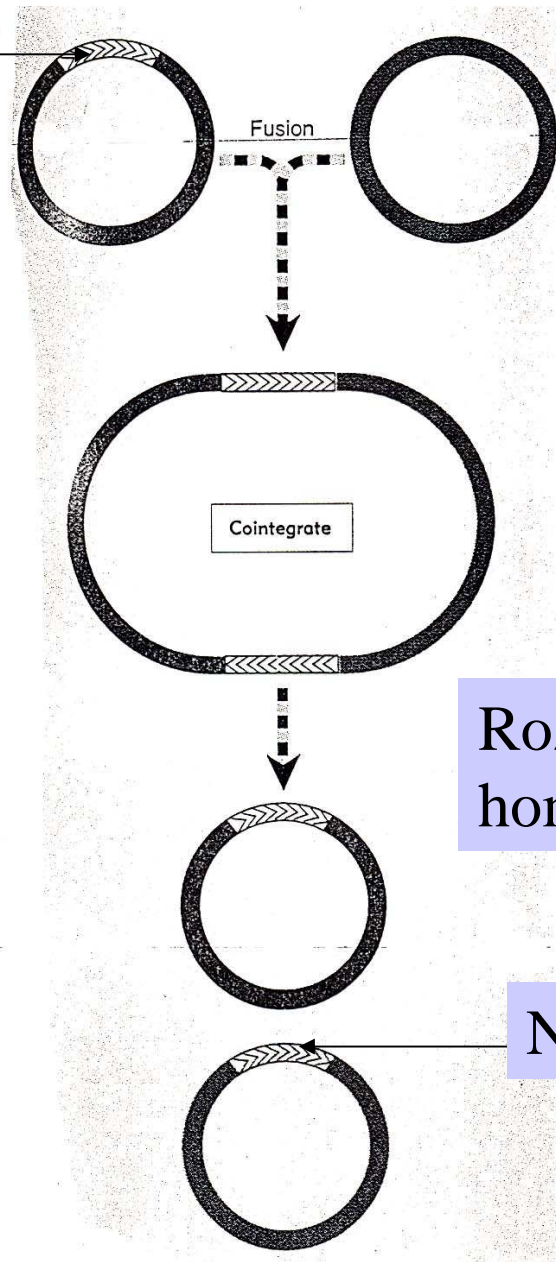


Doplnění komplementárních úseků



Replikativní transpozice

transpozon

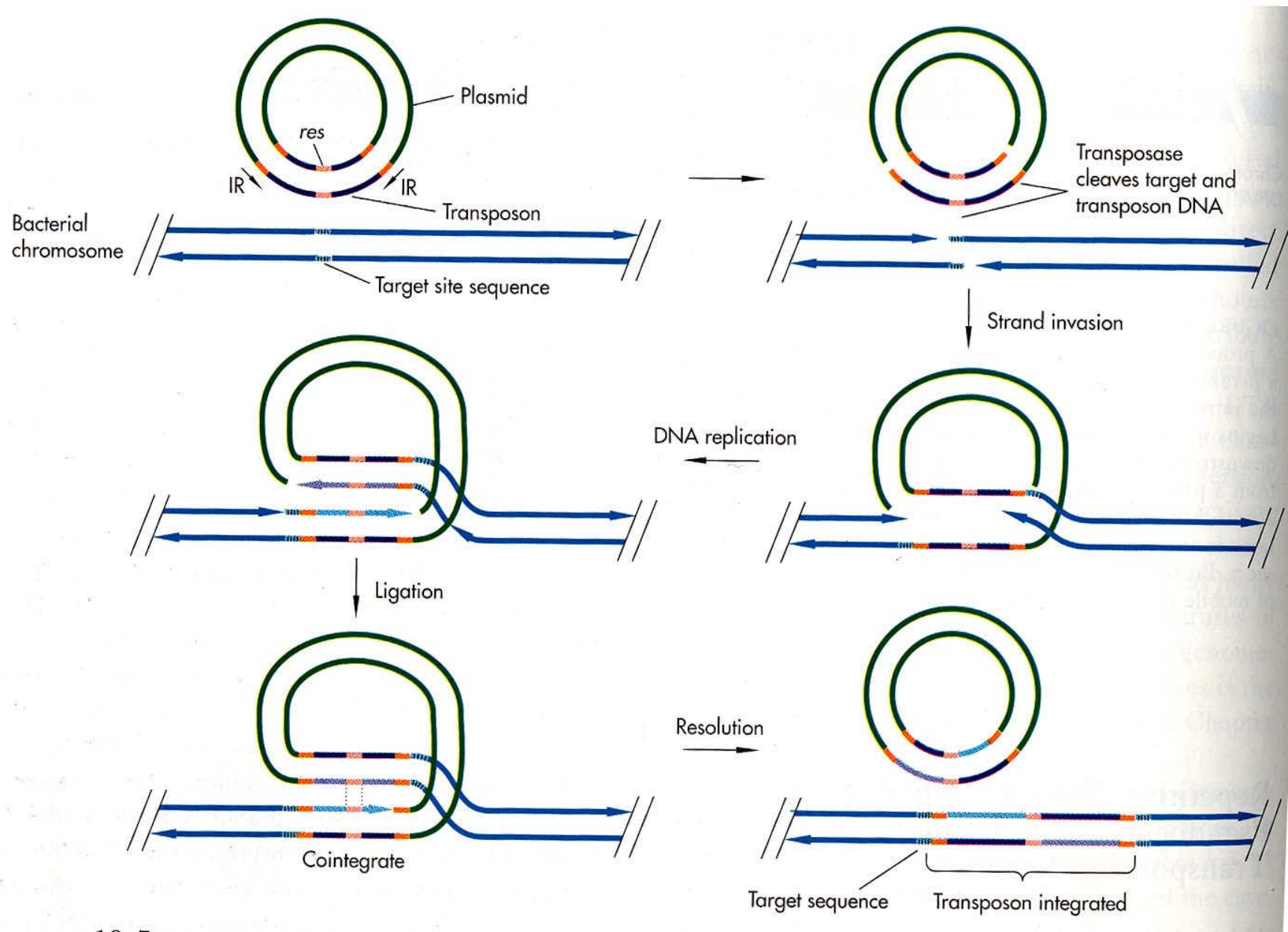


Vznik kointegrátu


Rozklad kointegrátu
homologní rekombinací

Nová kopie transpozonu

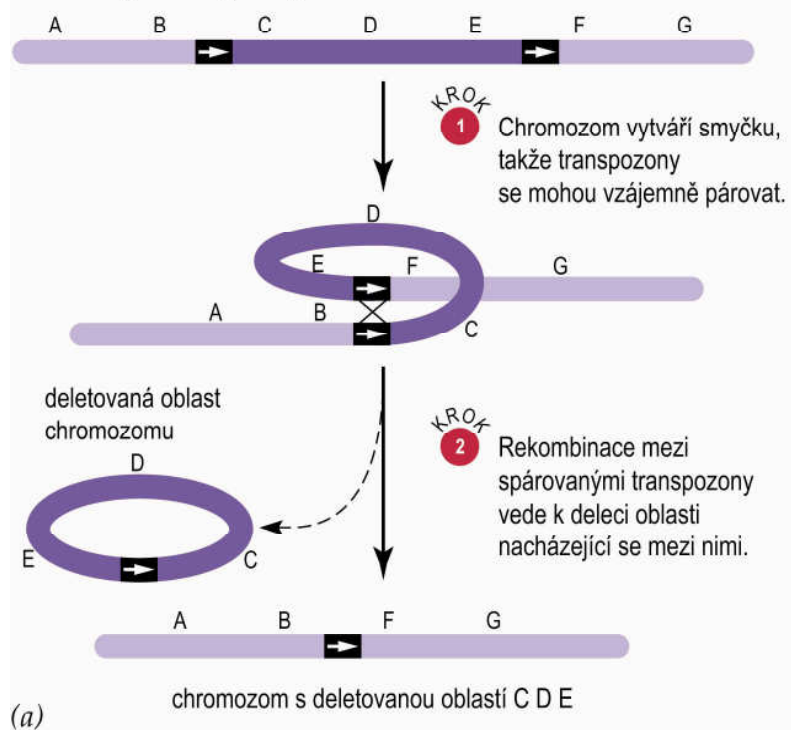
Mechanismus replikativní transpozice



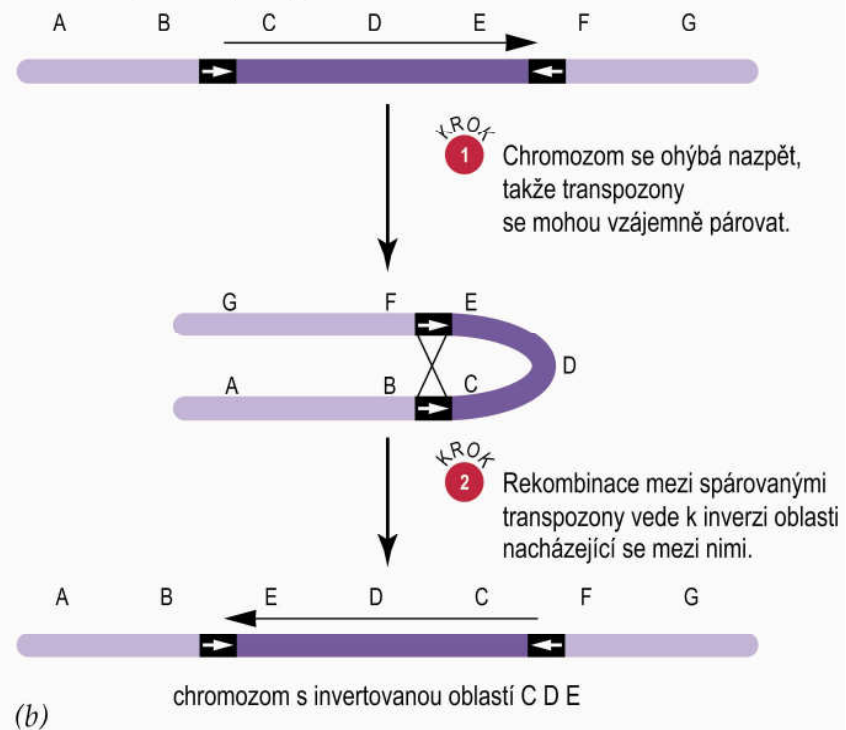
Chromozomová přeskupení navozená transpozony

 = transpozon

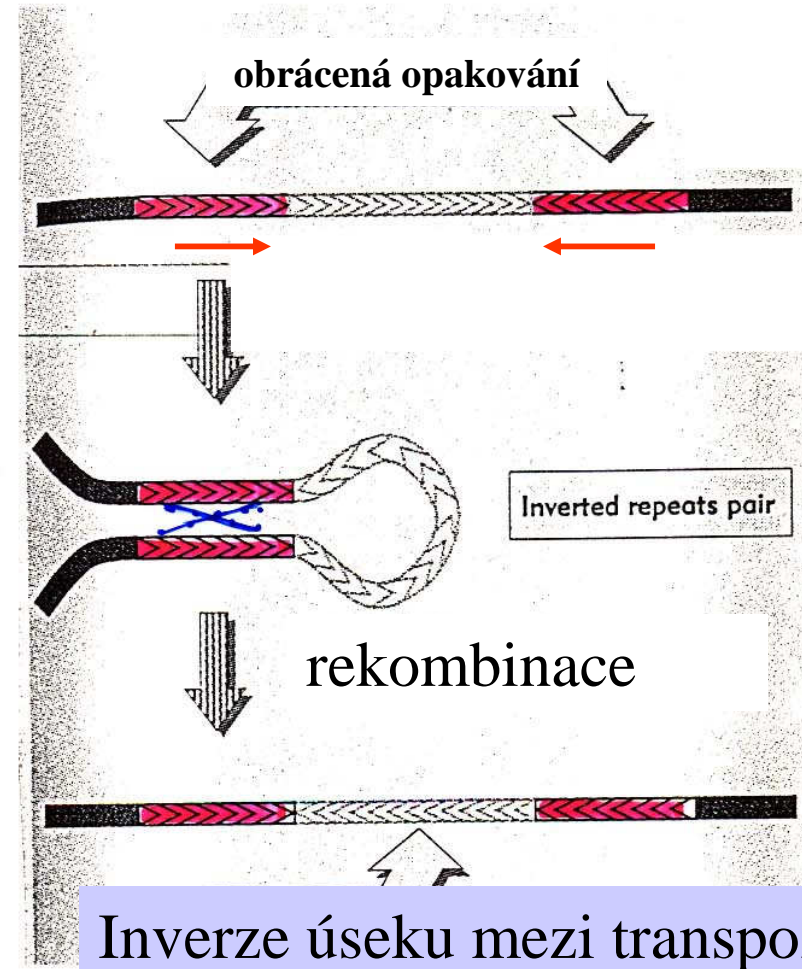
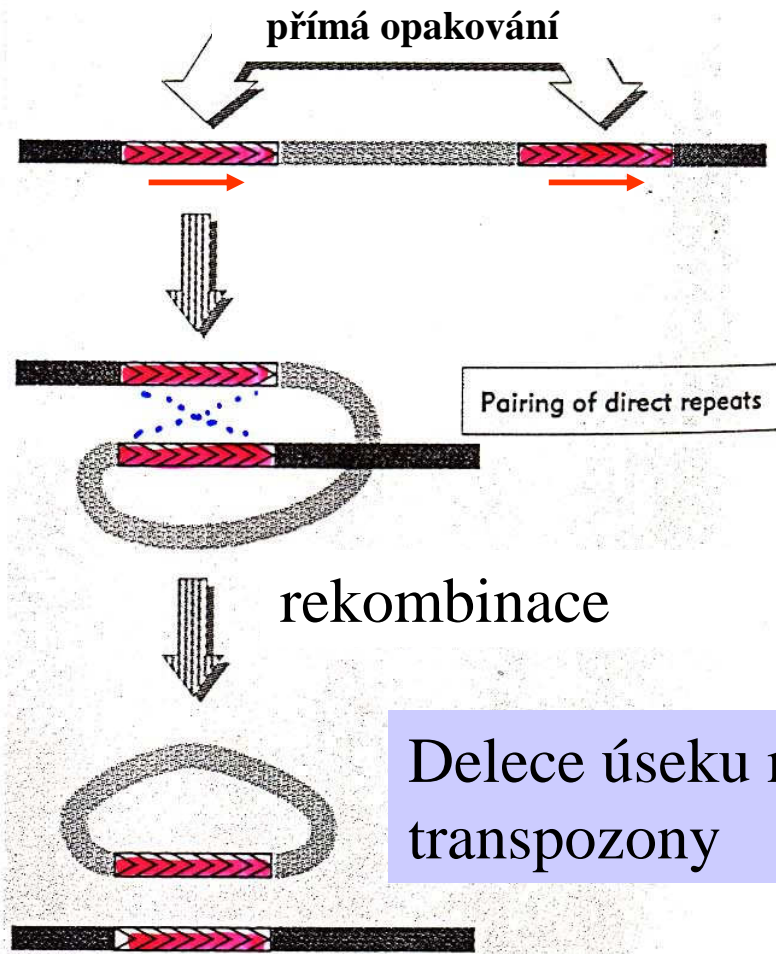
chromozom se dvěma stejně orientovanými transpozony



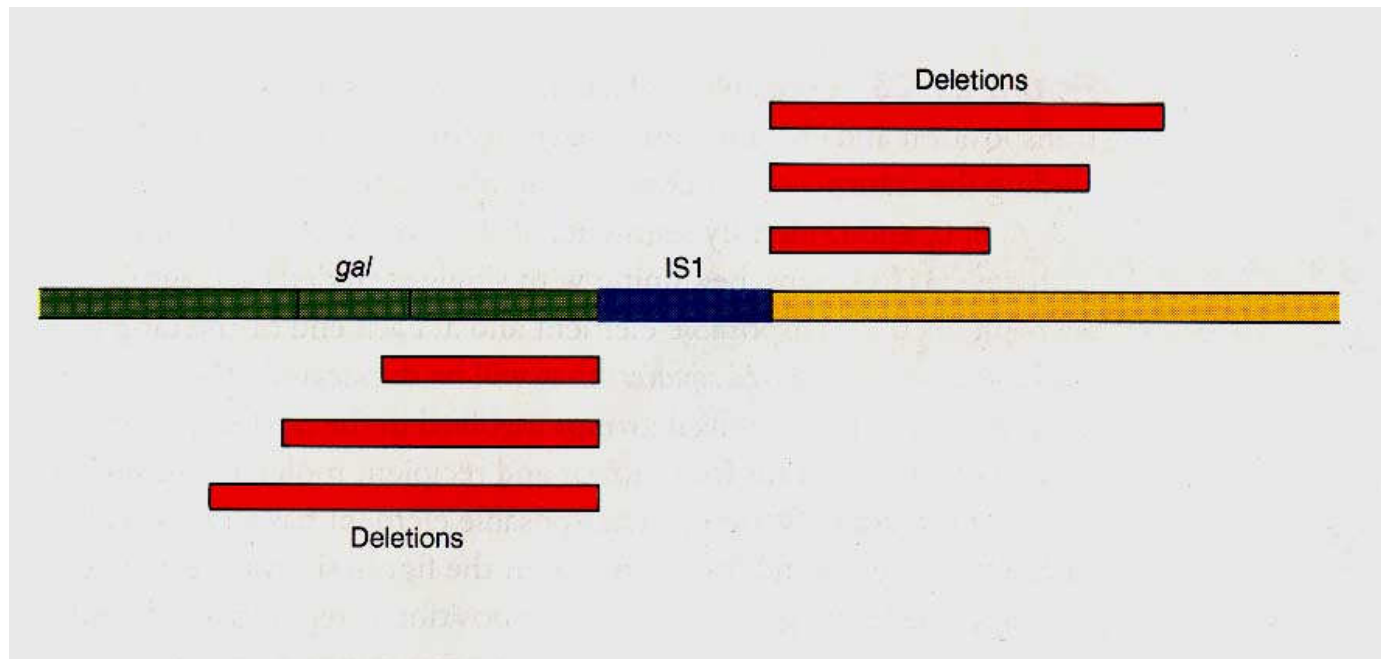
chromozom se dvěma opačně orientovanými transpozony



Vznik delecí a inverzí

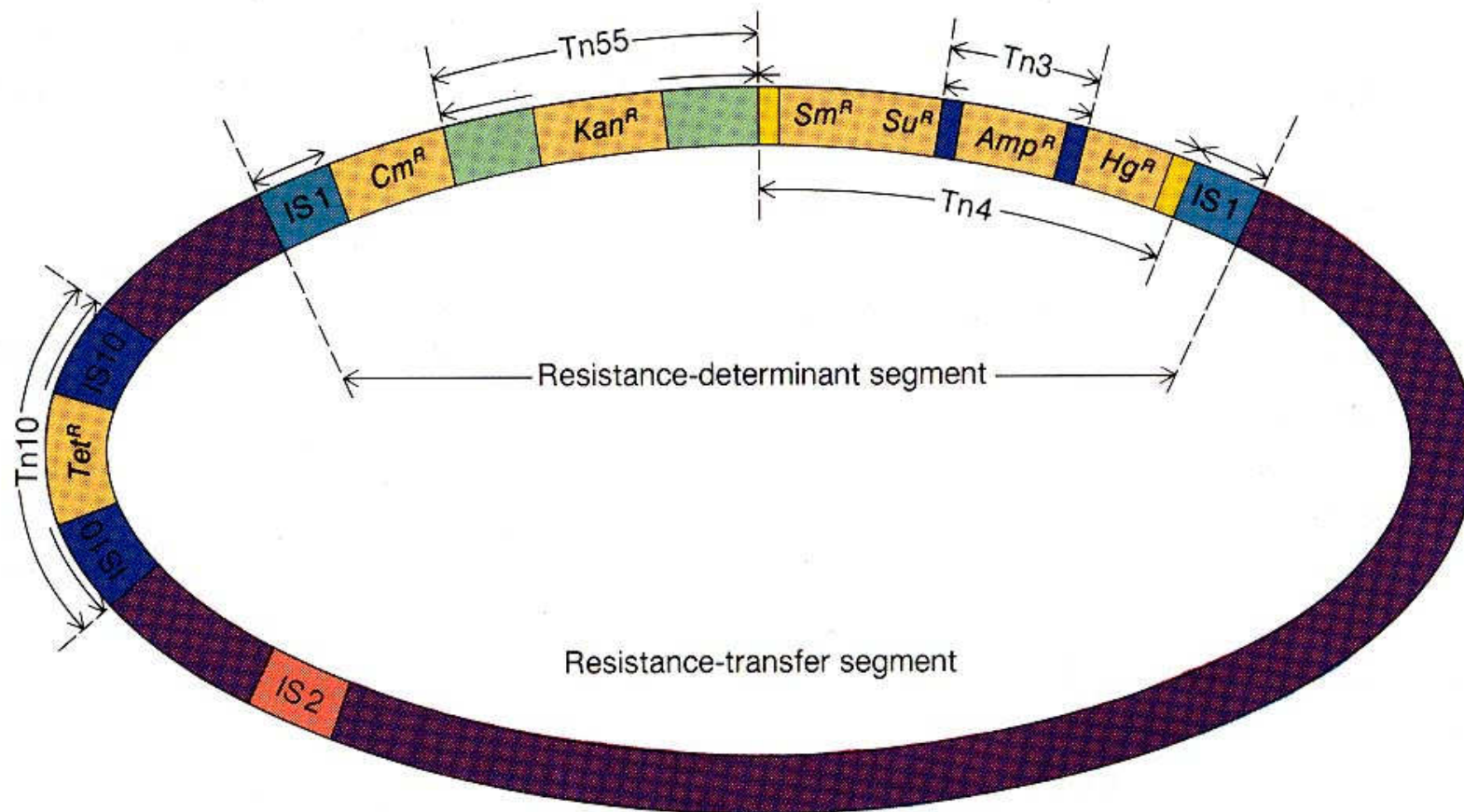


Delece pozorované v místě začlenění IS1 v lokusu gal *E. coli*

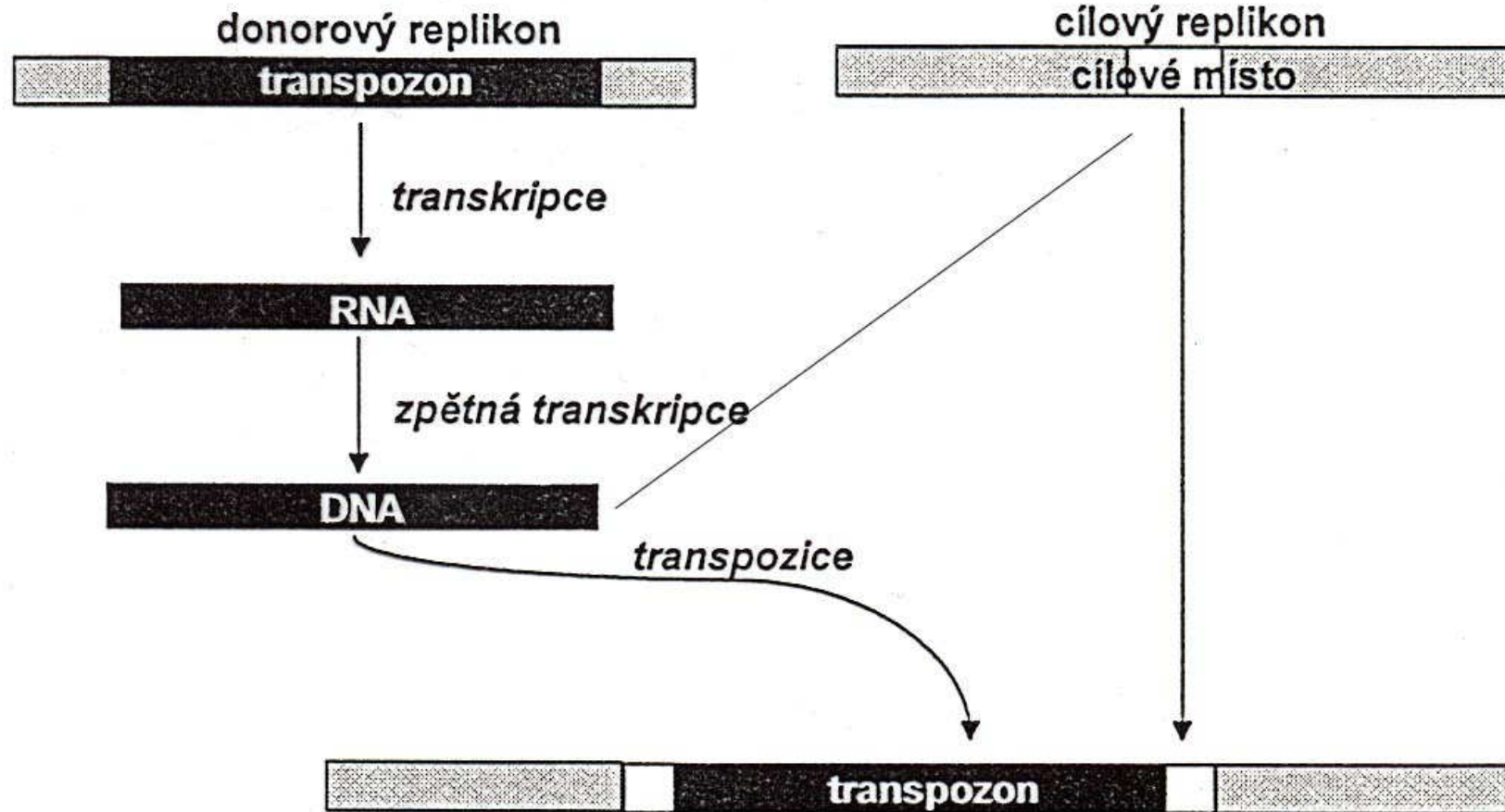


Úloha transpozonů při evoluci R-plazmidů

- každý transpozon může být přenášen nezávisle



Retropozice



RETROELEMENTY



1. NEVIROVÉ RETROELEMENTY (LTR, reverzní transkriptáza, integráza)

A. Retrotranspozony (obsahují LTR)

- * Ty-elementy u kvasinek (6,3 kb)
- * Copia-elementy u drozofily (5 kb)

B. Retropozony (bez LTR)

- * krátké sekvence SINE (short interspersed element) - <500 bp, 10^5 kopií - odvozeny z genů pro malé RNA, včetně tRNA (pseudogeny)
- * dlouhé sekvence LINE (long interspersed element)- 6,5 kb, 20 000 - 50 000 kopií u savců

C. Retrosekvence (cDNA geny) (bez LTR, reverzní transkriptázy a integrázy)

reverzní transkripty strukturních genů - upravené přepisy bez intronů, s poly(A)

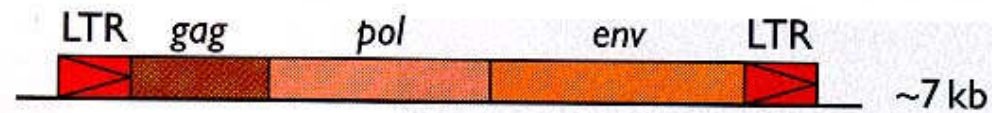
- * Retrogeny - funkční retrosekvence kódující identický protein jako původní gen
- * Retropseudogeny - nefunkční formy genů
 - Alu- sekvence (z 7SL RNA, 300 bp, u člověka 500 000 x)



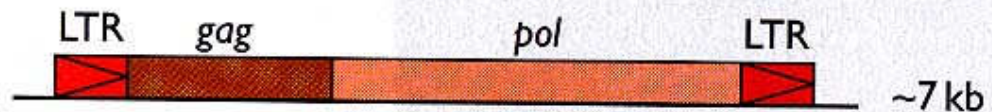
2. VIROVÉ RETROELEMENTY virus HIV

Srovnání struktury čtyř typů retroelementů

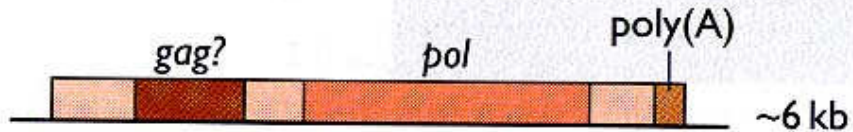
(A) Retrovirus



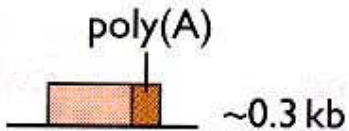
(B) Ty1/copia retrotransposon



(C) LINE **nemají LTR**



(D) SINE



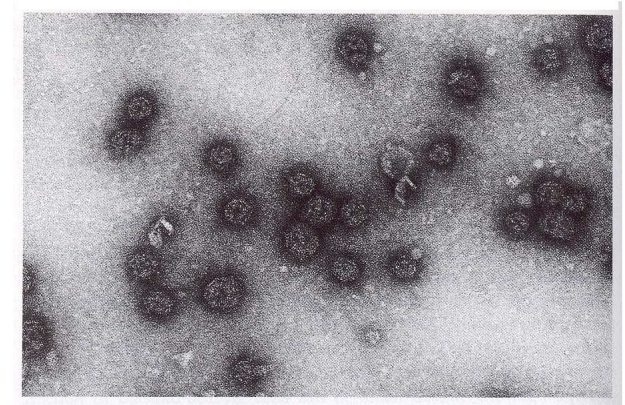
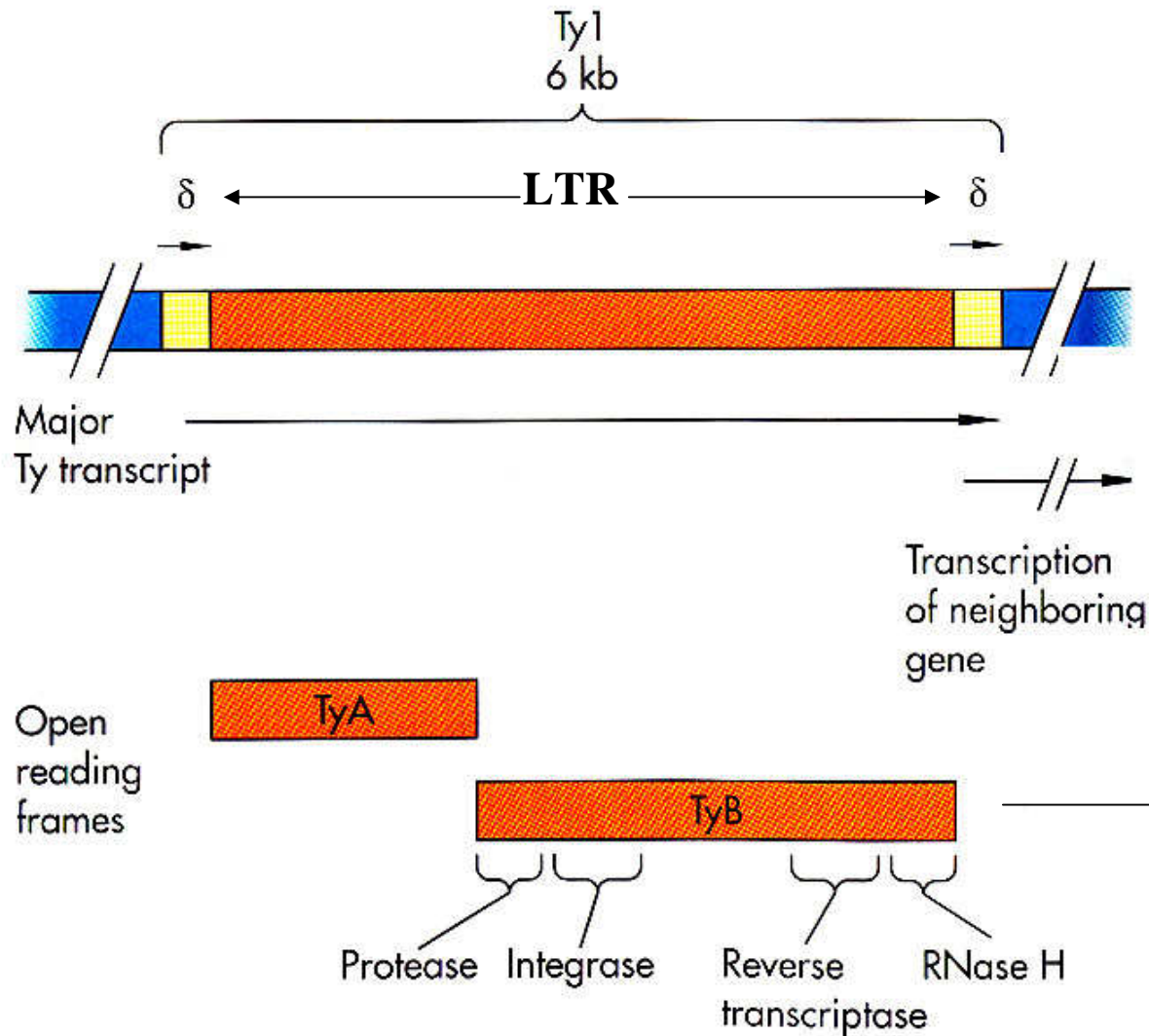
neautonomní

RT

Mobilní elementy kvasinek - Ty elementy

Retrovirům podobné elementy

Virům podobné částice odvozené z Ty elementů



Enzymy zajišťující zpětnou transkripci a integraci DNA do nových míst v genomu

Retroelementy u drozofily

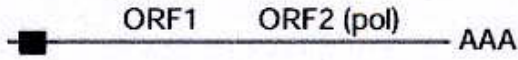
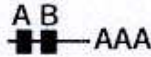
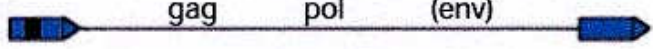
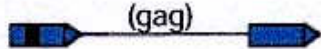
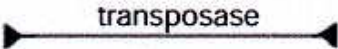

Copia elementy

Gypsy elementy

F, *G* a *I*-elementy

HeT-A, *TART* (telomere associated retrotransposons) – transpozice v telomerách, regenerace konců chromozomů ztracených při replikaci

4 třídy rozptýlených repeticí v genomu člověka

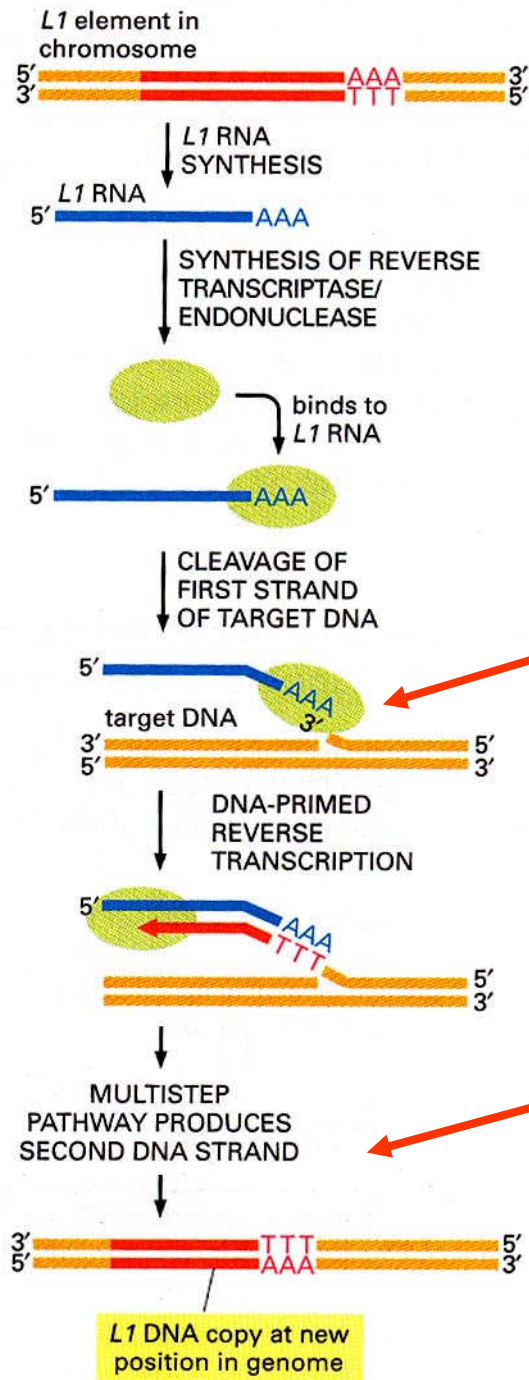
			Length	Copy number	Fraction of genome
LINES	Autonomous		6–8 kb	850,000	21%
SINEs	Non-autonomous		100–300 bp	1,500,000	13%
Retrovirus-like elements	Autonomous		6–11 kb	450,000	8%
	Non-autonomous		1.5–3 kb		
DNA transposon fossils	Autonomous		2–3 kb	300,000	3%
	Non-autonomous		80–3,000 bp		

Alu



Inaktivní nejméně 50 milionů let

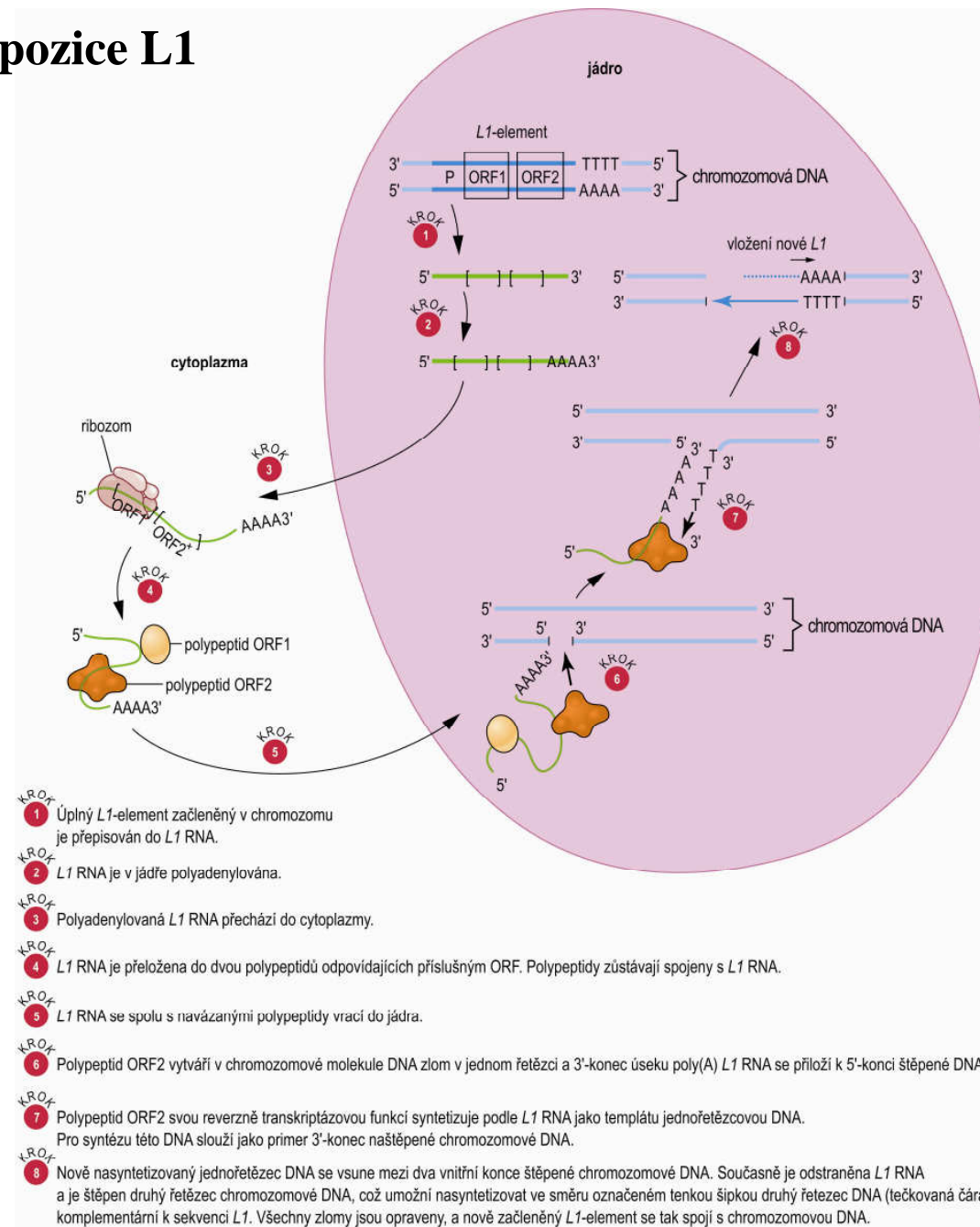
Transpozice neretrovirových retrotranspozonů (sekvence LINE 1) místně specifickou rekombinací



Iniciační fáze, při níž endonukleáza (součást RT) připojená na L1 RNA štěpí cílovou sekvenci - uvolněná 3'OH skupina funguje jako primer pro reverzní transkripci - vytváří se ssDNA napojená na cílovou DNA.

V dalším kroku se vytvoří dsDNA, která se začlení do cílového místa

Mechanismus transpozice L1 v lidském genomu



Vznik upravených pseudogenů



Původní funkční gen



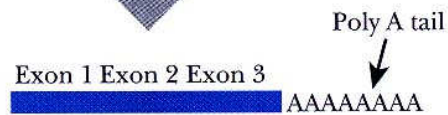
Primary transcript



PROCESSING



mRNA



Sestřih a připojení polyA

REVERSE TRANSCRIPTION



cDNA



Reverzní transkriptáza některé transkripty konvertuje na cDNA

RE-INSERTION

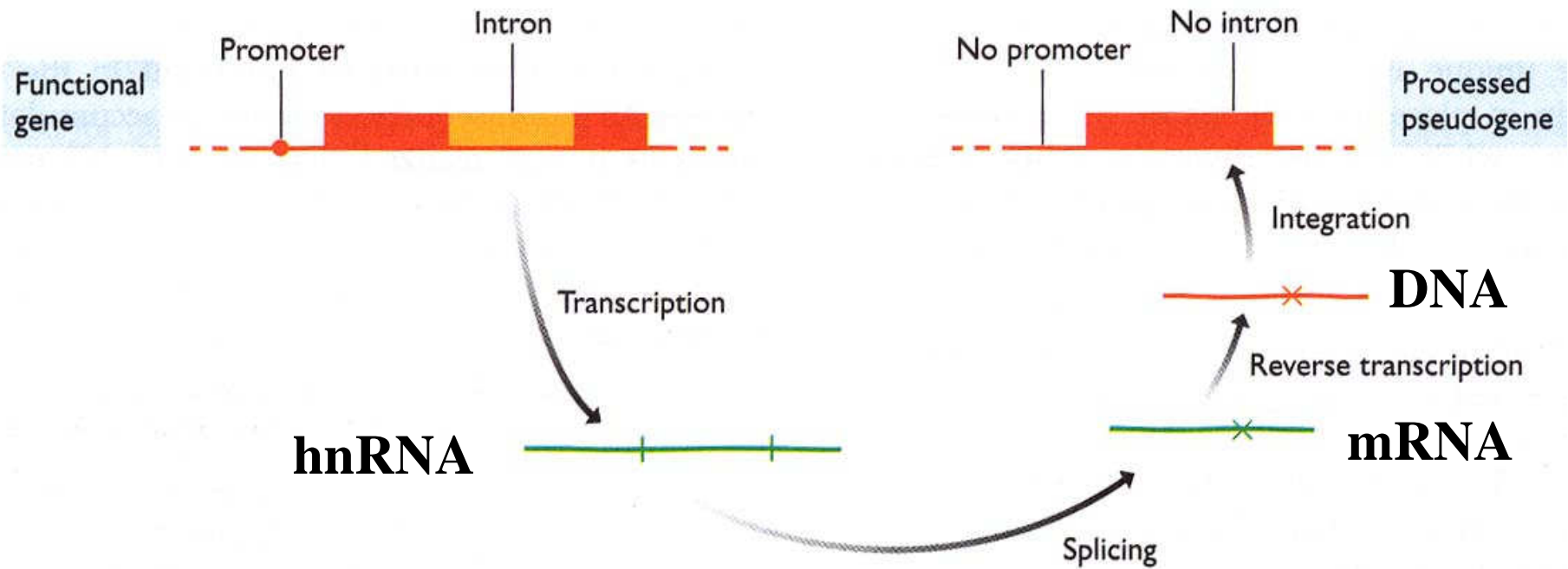


Another site in DNA



Vytvořená cDNA je začleněna do jiných míst genomu - vzniká pseudogen, který není funkční v důsledku chybění promotoru

Upravené pseudogeny vytvořené reverzní transkripcí



Retrotranspozice „homing retro-intronů“ skupiny II

Intron začleněný v jedné z kopií genu



kopie genu neobsahující intron



TRANSCRIPTION

mRNA

TRANSLATION

Vytvoření enzymu s dvojí aktivitou



ENDONUCLEASE ACTIVITY

Štěpení genu v cílovém místě

REVERSE TRANSCRIPTASE ACTIVITY



dsDNA kopie intronu

dvouřetězcový zlom



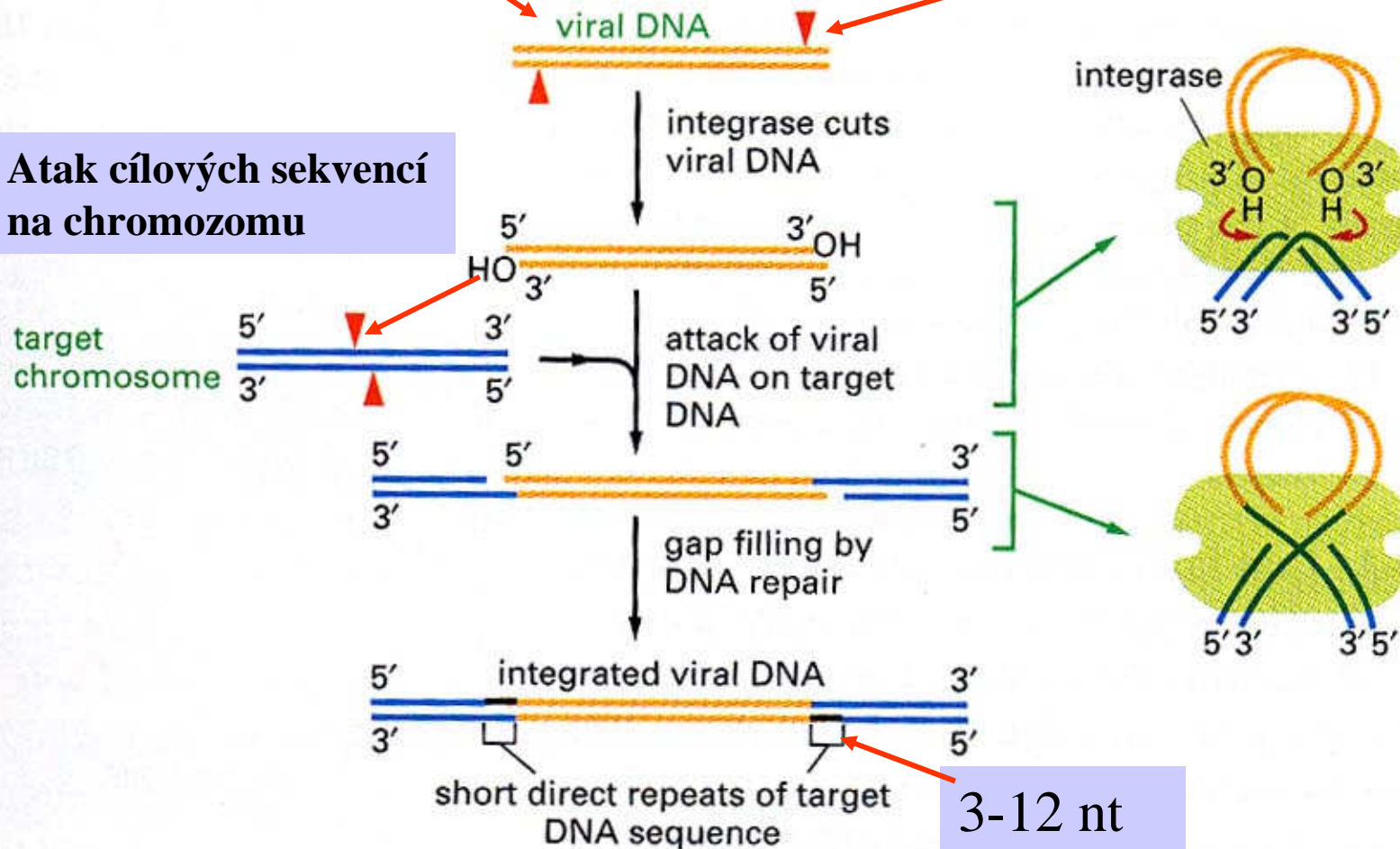
Transpozice retrovirů nebo retrotranspozonů místně-specifickou rekombinací

RNA

RT

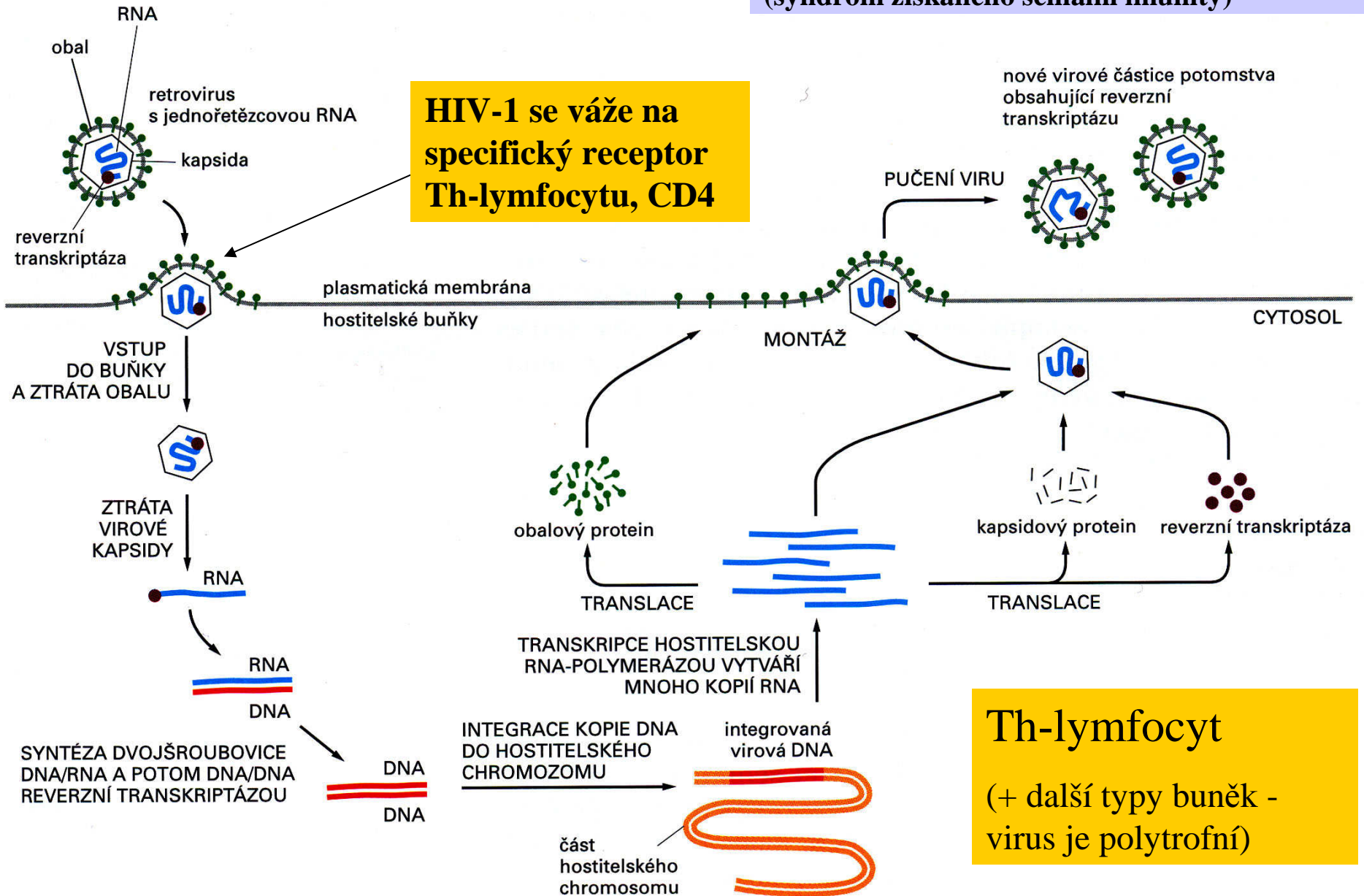
Štěpení konců
transpozonu integrázou

Atak cílových sekvencí
na chromozomu



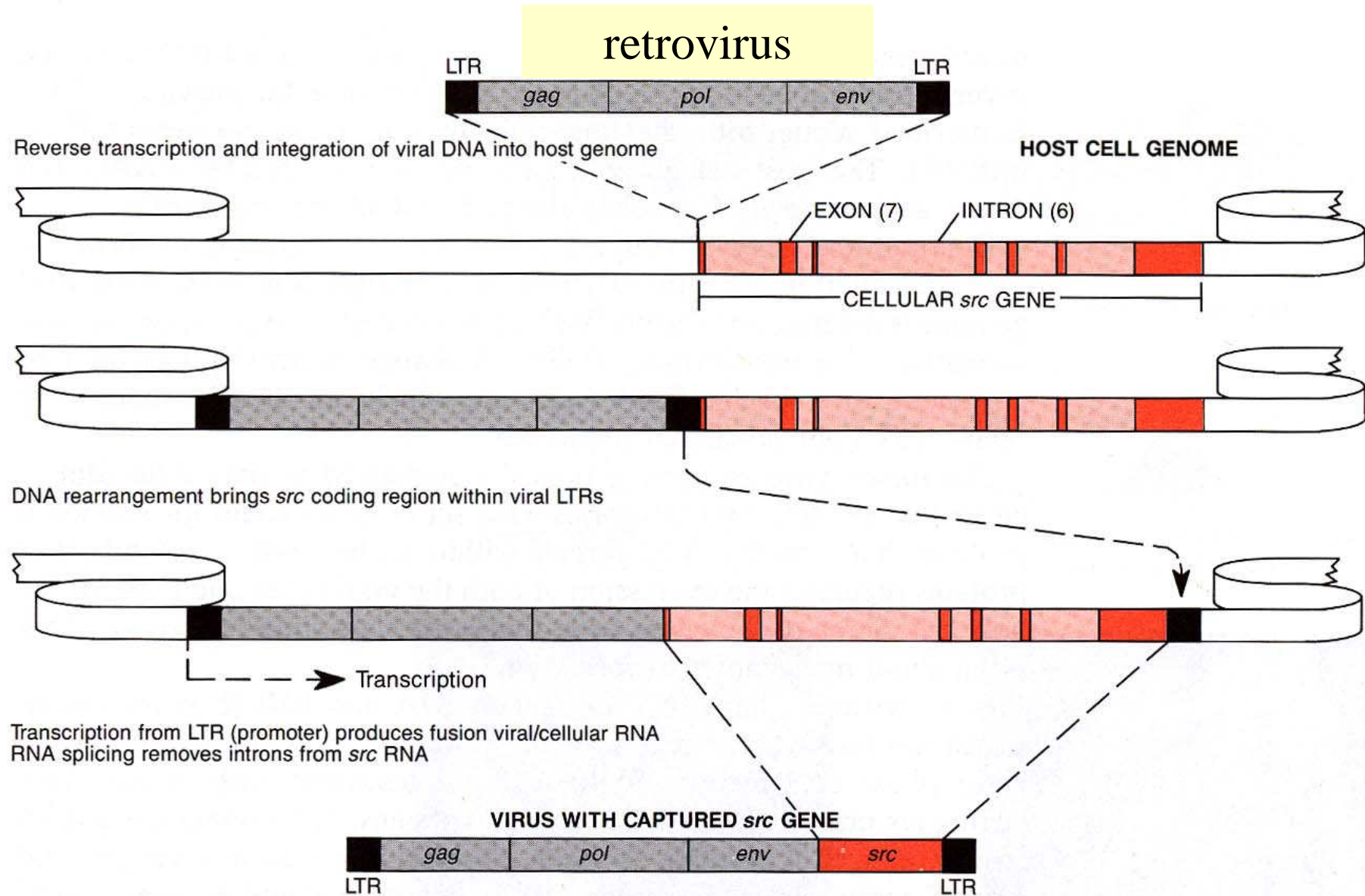
HIV - Human immunodeficiency virus
AIDS = acquired immune deficiency syndrom
(syndrom získaného selhání imunity)

Životní cyklus retroviru



Th-lymfocyt
 (+ další typy buněk - virus je polytrofní)

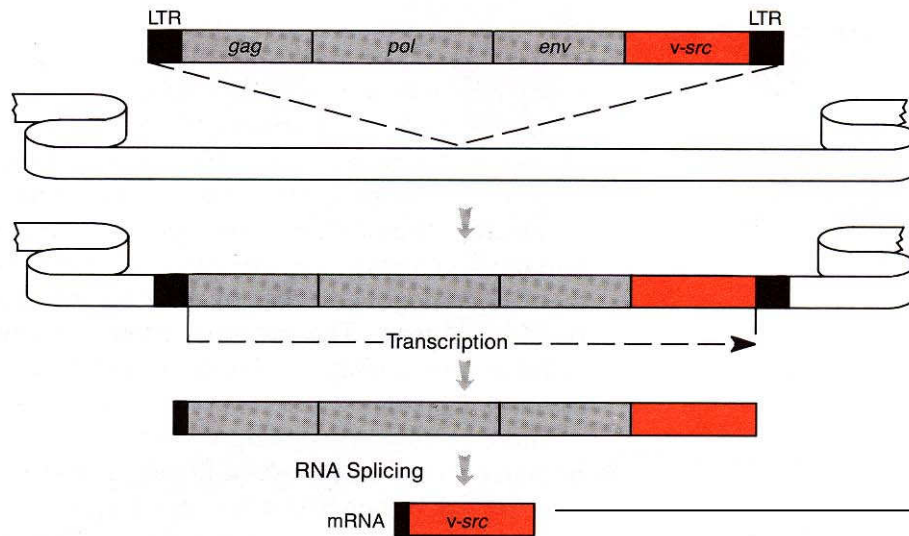
Vznik retrovirů přenášejících onkogeny



Capture of the Cellular *src* Oncogene by a Progenitor Rous Sarcoma Virus

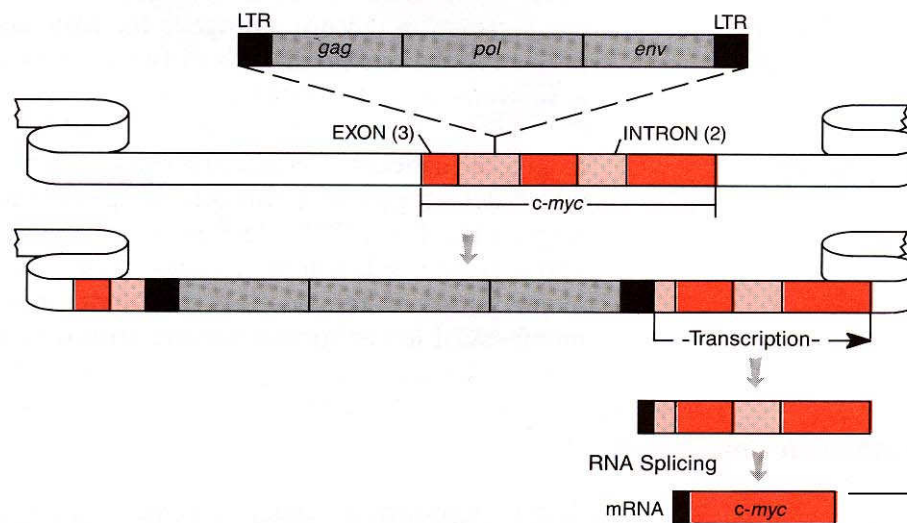
Akutně a pomalu transformující retroviry

ACUTE TRANSFORMATION: ROUS SARCOMA VIRUS (RSV)



Transdukce onkogenu akutně transformujícími retroviry

CHRONIC TRANSFORMATION: AVIAN LEUKOSIS VIRUS (ALV)



Inzerční aktivace protoonkogenu pomalu transformujícími retroviry

Acute vs. Chronic Transformation by Retroviruses

nádor

Vznik „odpadní“ DNA jako důsledek transpozice a následné inaktivace mobilních elementů

mobilní elementy



po mnoha generacích

