

Definice genového inženýrství

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

Metodickým základem genového inženýrství jsou manipulace s DNA *in vitro* (klonování genů a jejich úpravy) a cílené změny genetické informace prováděné *in vivo*

Aplikace GI: moderní (molekulární) biotechnologie

Genové inženýrství (syllabus přednášky 2018)

1. Osnova přednášky, definice genového inženýrství a jeho stručná historie, studijní literatura. Mutageneze *in vitro* (metody založené na restričních místech, metody založené na mutagenních oligonukleotidech, kazetová mutageneze, využití modifikovaných tRNA)
2. Optimalizace exprese klonovaných genů (faktory ovlivňující expresi genů v cizích hostitelích; úroveň transkripce, translace, export proteinů)
3. Klonování genů v grampozitivních bakteriích
4. Klonování genů v kvasinkách
5. Klonování genů v rostlinách, příprava transgenních rostlin
6. Klonování genů v živočišných buňkách, vektory pro přenos genů do savčích buněk, selekční markery pro vyhledání klonů obsahujících cizorodou DNA
7. Vnášení genů do zárodečných buněk myší, příprava transgenních savců
8. Cílená exprese cizorodých genů v buňkách a tkáních vyšších organismů
9. Opravy dědičných defektů u zvířat metodami genového inženýrství
10. Editace genomů *in vivo*, meganukleázy, systémy CRISPR/Cas
11. Příprava farmakologicky významných látek v prokaryotických a eukaryotických organismech. Využití metod rekombinantní DNA k přípravě vakcín a protilátek. Identifikace produktů rekombinantních genů.
12. Pravidla pro práci s geneticky modifikovanými organismy, novelizovaný zákon 78/2004 Sb., rizika přípravy GMO. Povinné školení pro studenty.

Doporučená literatura

- Watson J.D. et al., Recombinant DNA, 2nd ed., W.H.Freeman, New York 1992.
- Old R.W., Primrose S.B., Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. Blackwell Science, 1995. 5. vydání.
- Strachan T., Read A.P. Human Molecular Genetics, 3. Vydání. Garland Science, London 2004.
- Glick B.R., Pasternak J.J. Molecular Biotechnology, 3. vydání, ASM Press, Washington 2003.
- Reece R. Analysis of Genes and Genomes. Wiley 2004
- Primrose S.B., Twyman R.M. Principles of gene manipulation and genomics. Blackwell Publ., 2006, 7. vydání.
- Snustad D.P., Simmons M.J.: Genetika (překlad originálu Principles of Genetics), MU Brno, 2009, 2017
- Kun, L.Y.: Microbial biotechnology, principles and applications. 3rd Edition, World Scientific, Singapore, 2013.
- Základní metody: Šmarda J. a kol.: Metody molekulární biologie, Brno, 2005.
- Internetové zdroje, přehledové články
- IS muni.cz

Využití genového inženýrství

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

V praxi (Moderní biotechnologie):

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

Předpoklady pro cílené genetické manipulace

- Identifikovat geny a stanovit jejich funkce
- Izolovat geny a cíleně je *in vitro* (*in vivo*)
pozměňovat
- Přenést vhodným způsobem upravené geny do
původních nebo jiných (**nepříbuzných**) organismů
a zajistit jejich expresi (**heterologní** expresní
systémy)

Etapy vzniku a vývoje genového inženýrství

Poznání základních procesů přenosu genetické informace

1970 – izolace prvního restrikčního enzymu

1972 – příprava prvních rekombinantních molekul DNA *in vitro*

1973 – začátek klonování genů

1975 – Asilomarská konference, moratorium NIH (1976)

1976 – první pravidla práce s rekombinantní DNA

1977 – první rekombinované molekuly DNA nesoucí savčí geny

1977 – zavedení metod sekvenování DNA

1978 – příprava lidského inzulinu v bakteriích

(od r. 1982 vyráběn komerčně), založení fy Genentech

zavedení technik mutageneze *in vitro* – proteinové inženýrství

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

1980 – první pokusy o genovou terapii

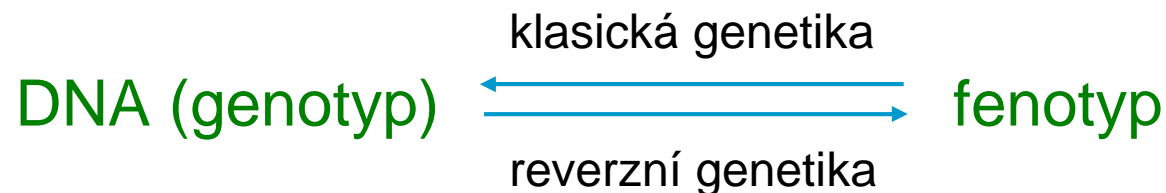
1997 – klonování živočichů

~2000: zavedení technik editace genomů

Mutagenese *in vitro*

site-directed mutagenesis
místně cílená (řízená) mutagenese
lokalizovaná mutagenese, řízená evoluce

reverzní genetika*, genetika „naruby“



* **Reverzní genetika** – „vypínání genů“ navozování nulových mutací genů nebo potlačování jejich exprese (knokauty genů, transpozonová inzerční mutagenese, knockdown – umlčování genů pomocí anti-sense RNA, RNAi, CRISPR/Cas aj).

Princip mutageneze *in vitro*

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

Typy mutací: substituce, delece, inserce

Cíle:

Výzkum:

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

Praxe:

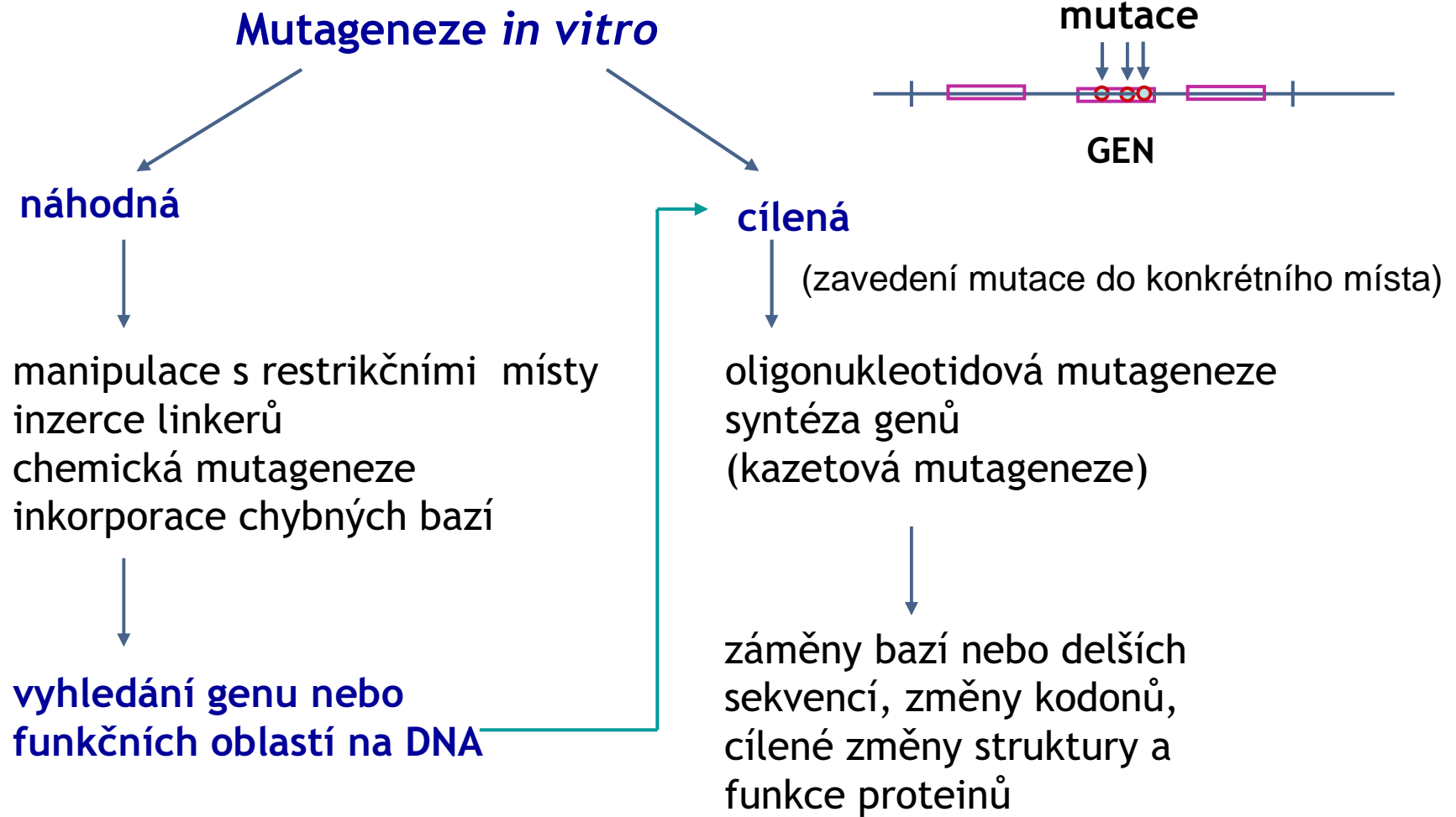
- Cílené změny aminokyselin v proteinech - příprava proteinů s novými (lepšími) vlastnostmi (**proteinové inženýrství**)
- Příprava geneticky modifikovaných a transgenních organismů

Nevýhody klasické mutageneze

(chemické, fyzikální, biologické mutageneze)

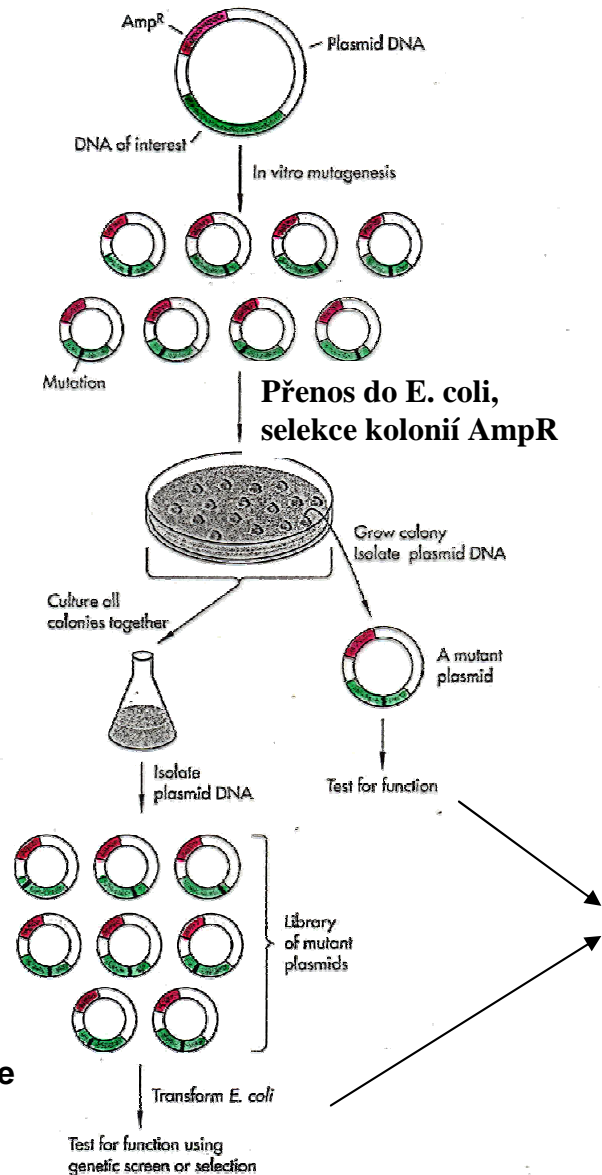
1. V organizmu může být zmutován kterýkoliv gen
 - **necílené působení mutagenu; mutaci nelze cílit na konkrétní sekvenci**
2. Frekvence mutací v žádaném genu může být nízká
 - **závislost na charakteru působení mutagenu a konkrétní sekvenci**
3. Žádaný fenotyp může být výsledkem mutací v různých genech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

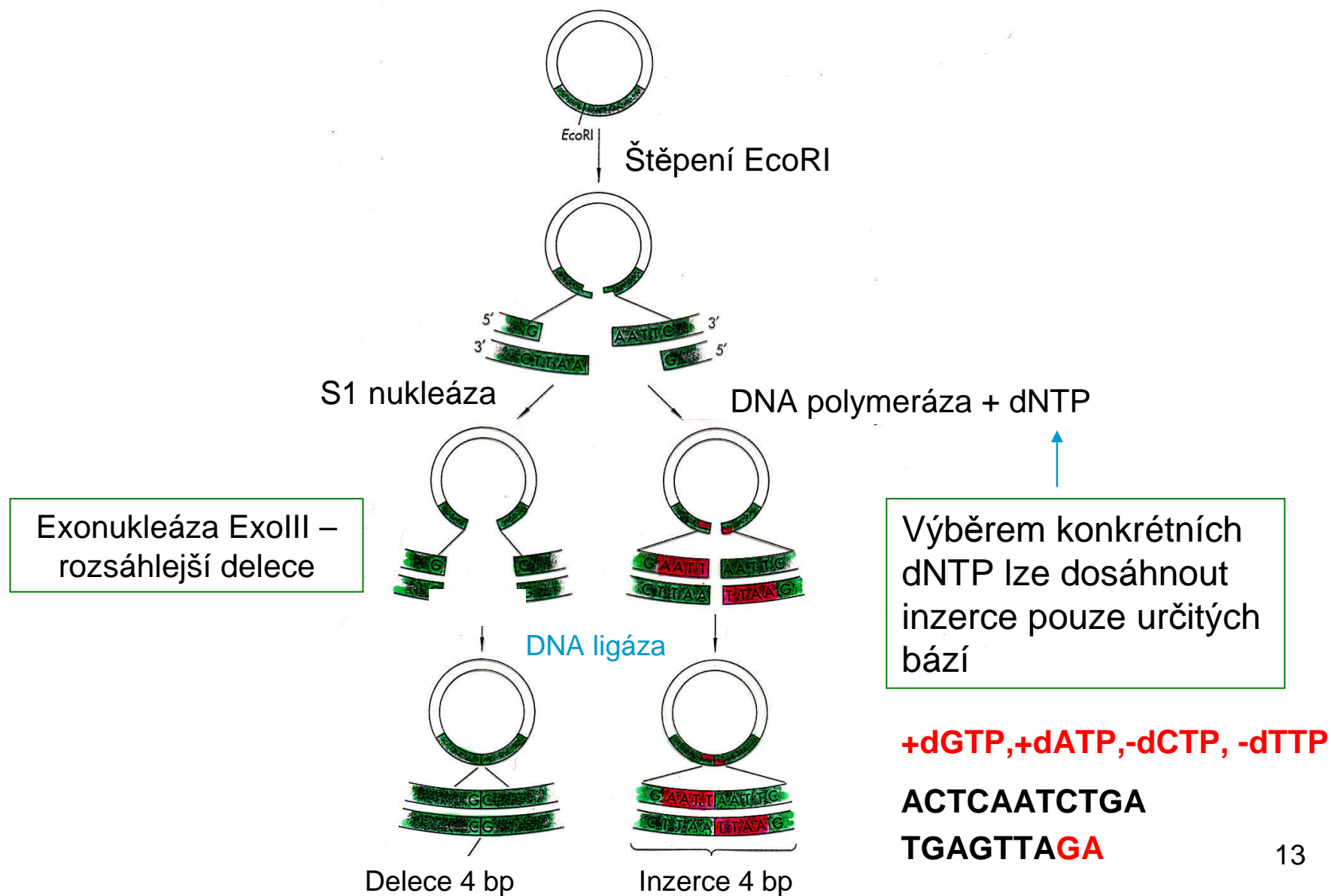
1. Klonování genu (sekvence DNA) určeného k mutagenезi
2. Vlastní proces mutagenезe *in vitro*
3. Selekcce klonů obsahujících mutované geny (sekvence)
4. Stanovení pozměněné funkce mutovaných genů
5. Ověření charakteru vnesené mutace (stanovení sekvence)

Stanovení sekvence pozměněného genu

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**

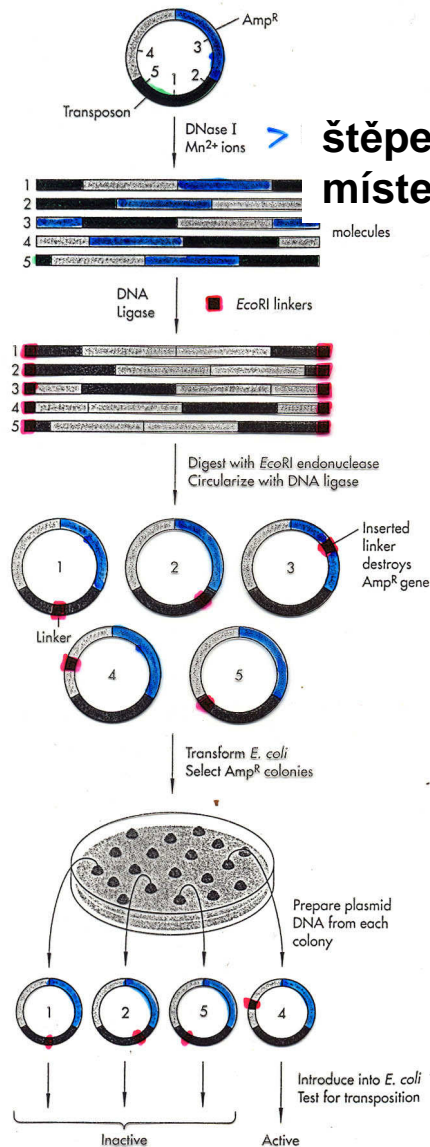
Vytváření mutací v restričním místě



Inzerční mutagenese pomocí linkerů k vyhledání funkčních oblastí transpozonu

Soubor náhodně linearizovaných molekul

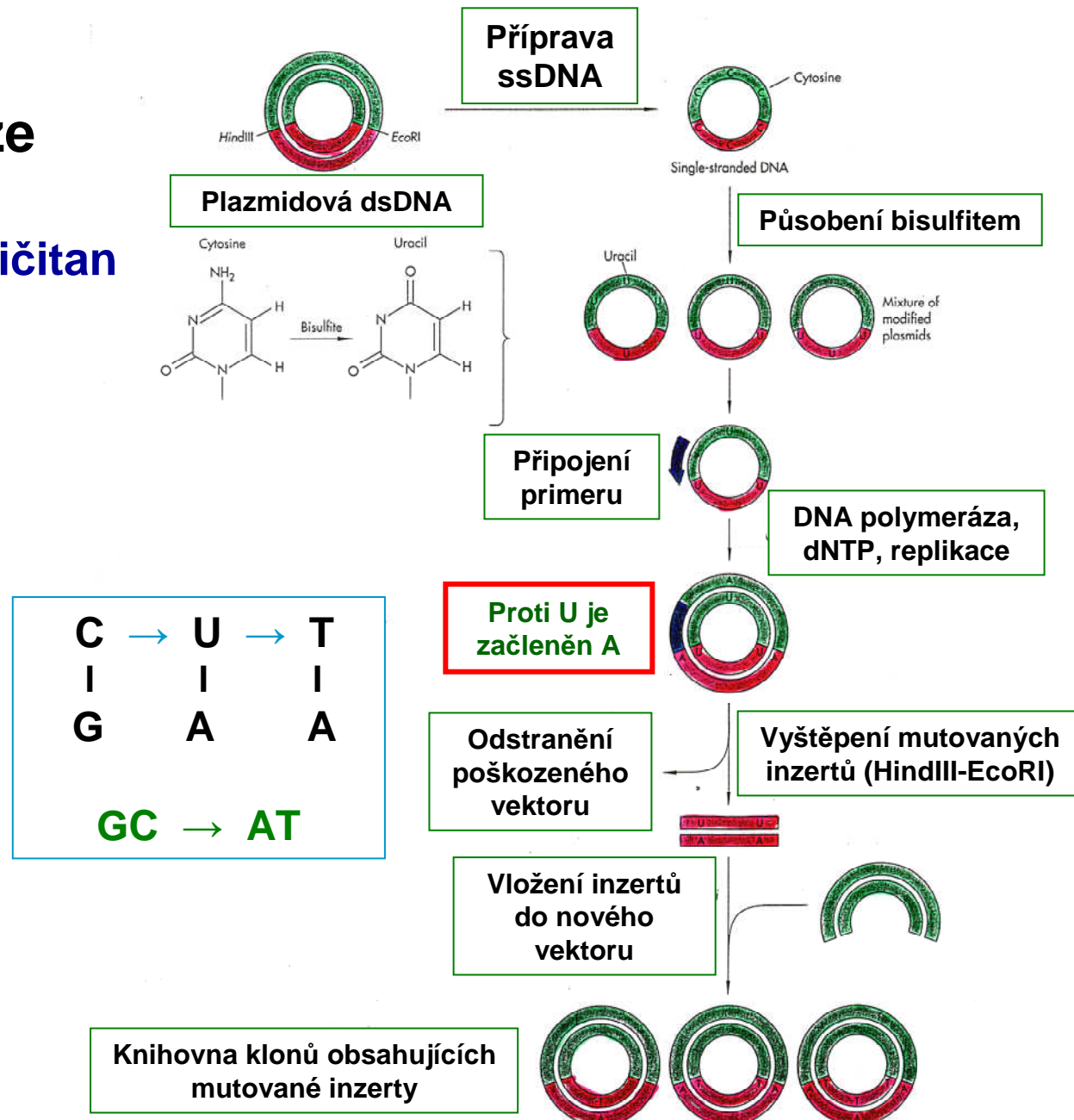
Vložený linker inaktivuje různé geny



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)

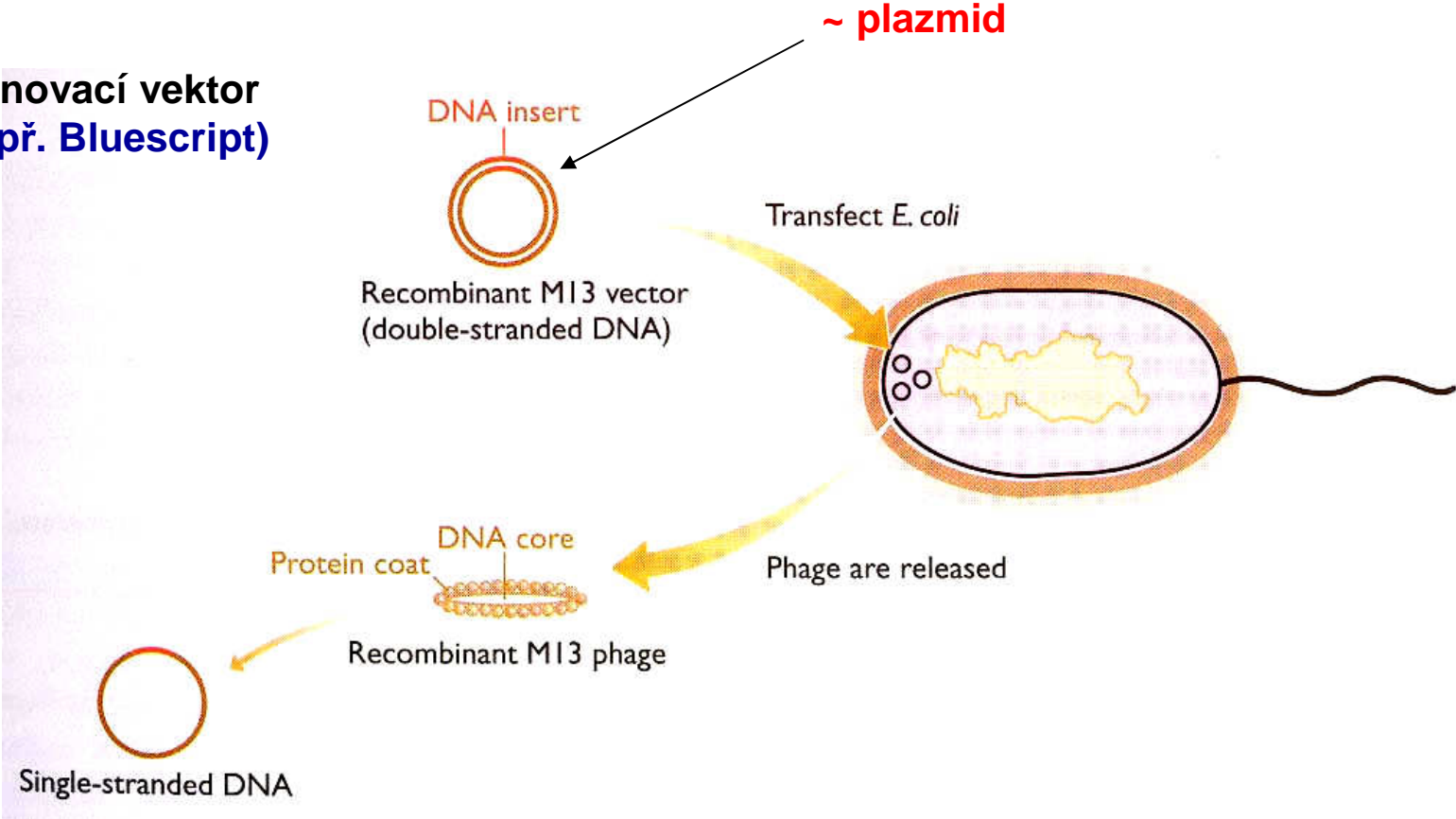


Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů

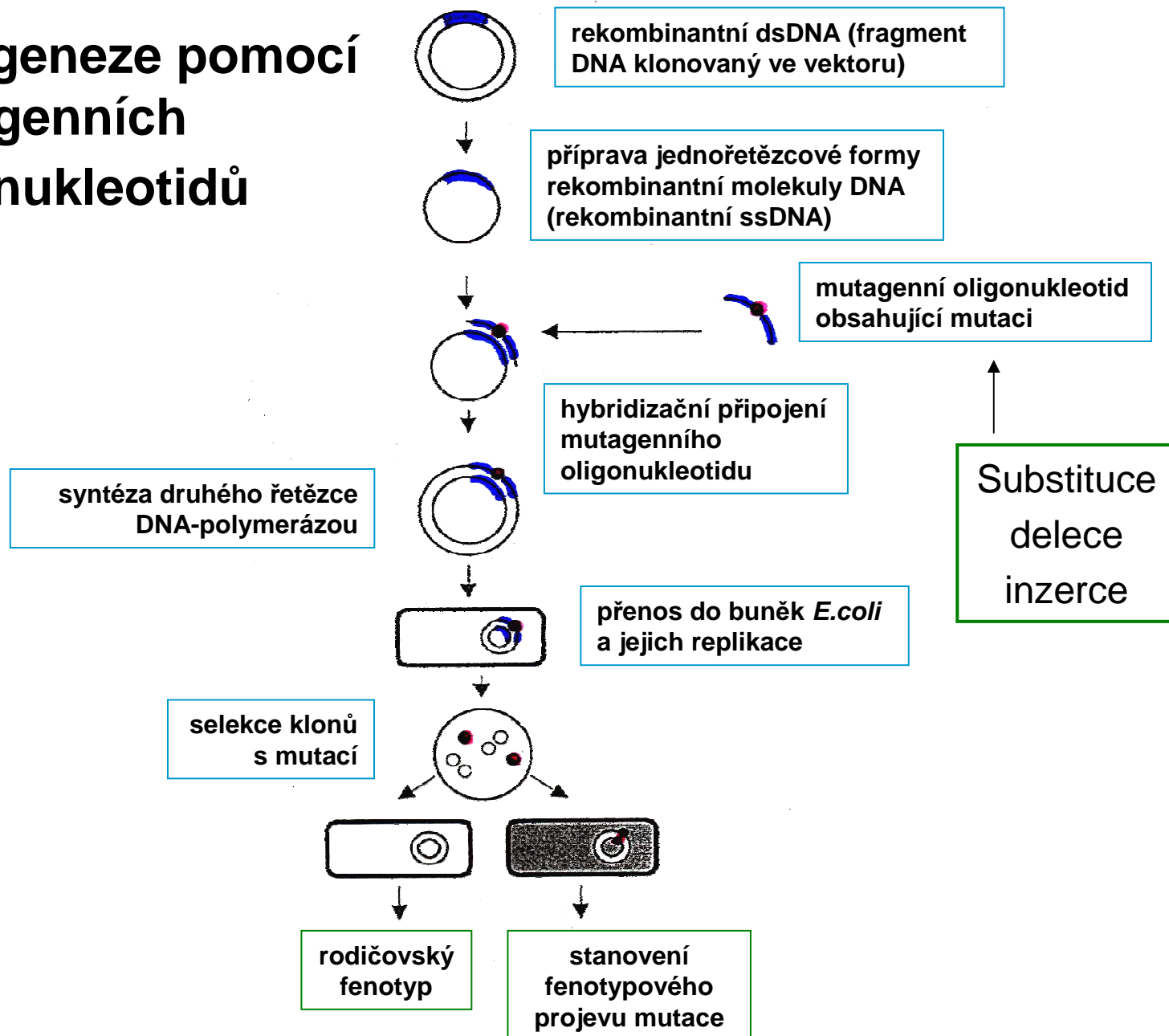
1. Klonování sekvence (genu) do vhodného vektoru (M13, fágemid, fasmid), izolace jednořetězcové formy rekombinantní DNA
2. Příprava syntetického (mutagenního) oligonukleotidu nesoucího žádanou mutaci (jeho sekvence je komplementární ke klonované sekvenci vyjma místa, do něhož má být mutace vnesena)
3. 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

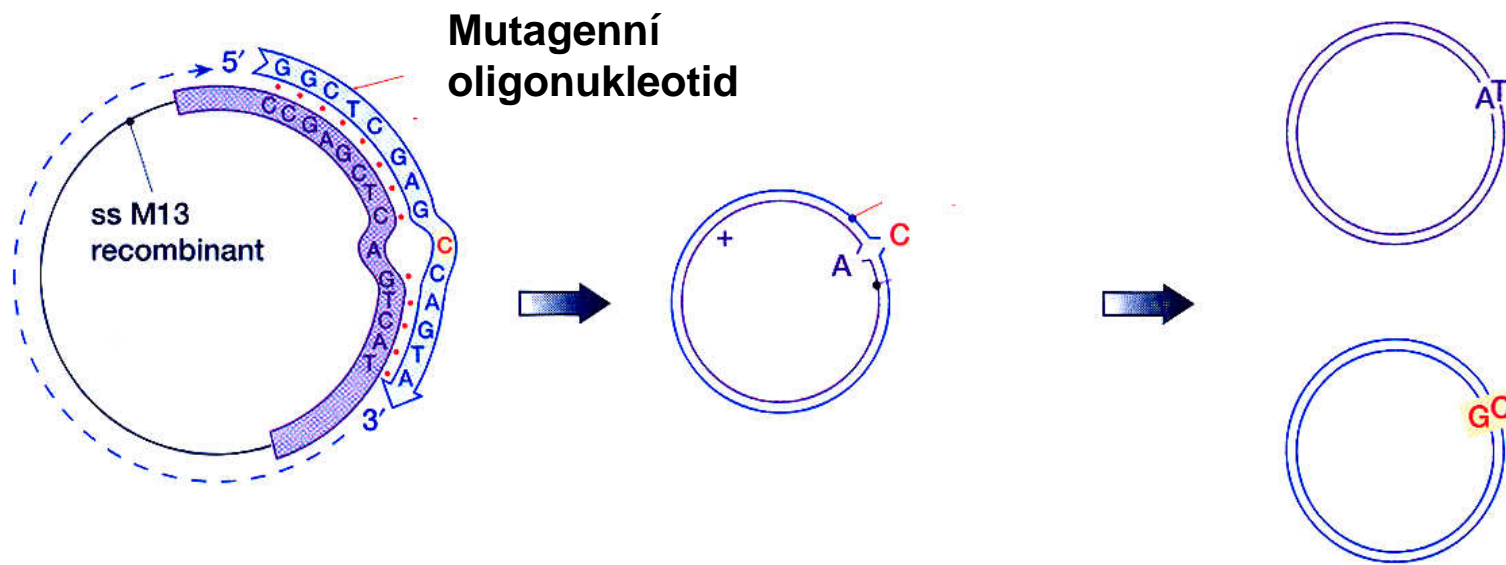
Klonování genů ve fágemidech

Klonovací vektor
(např. Bluescript)



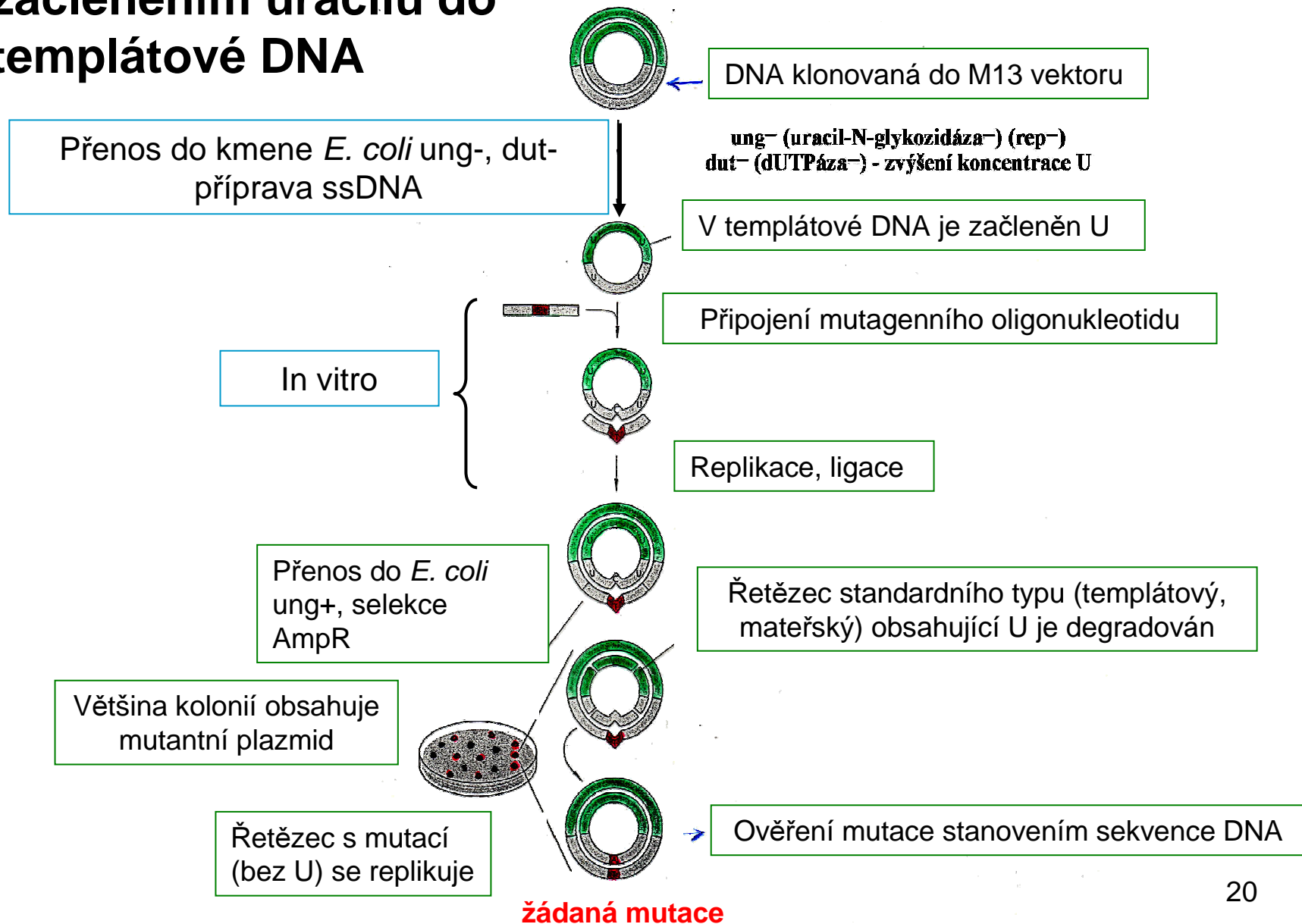
Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů



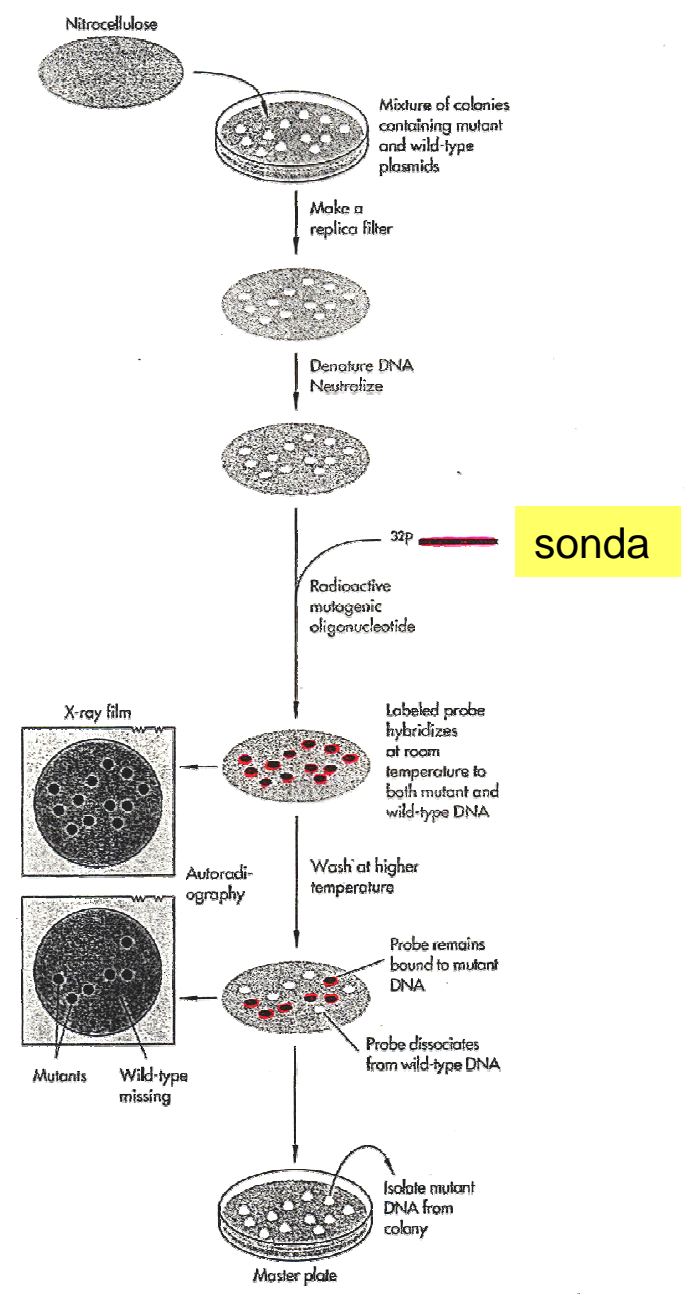


A - T → A - C → G - C

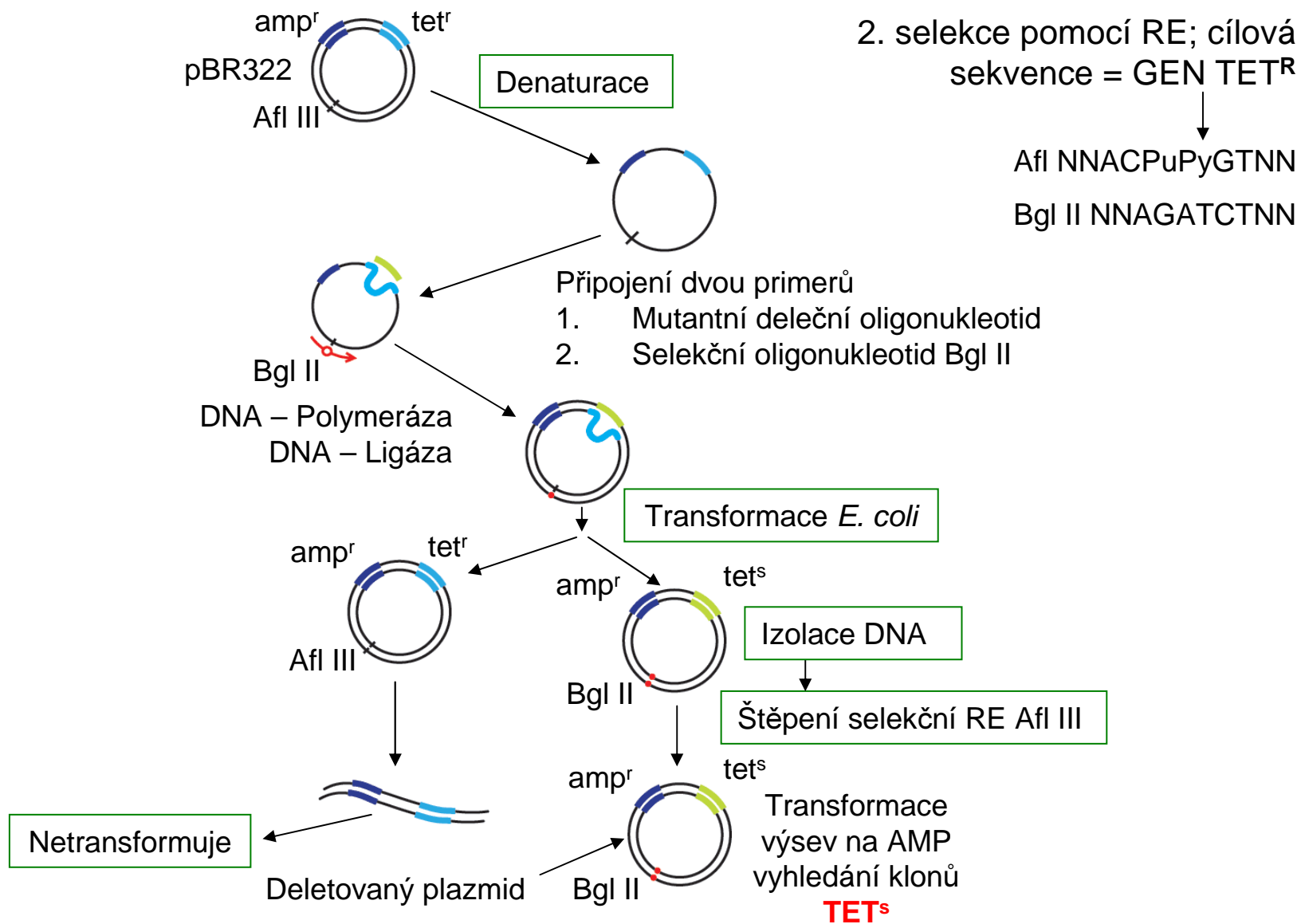
Zvýšení výnosu mutant začlenením uracilu do templátové DNA



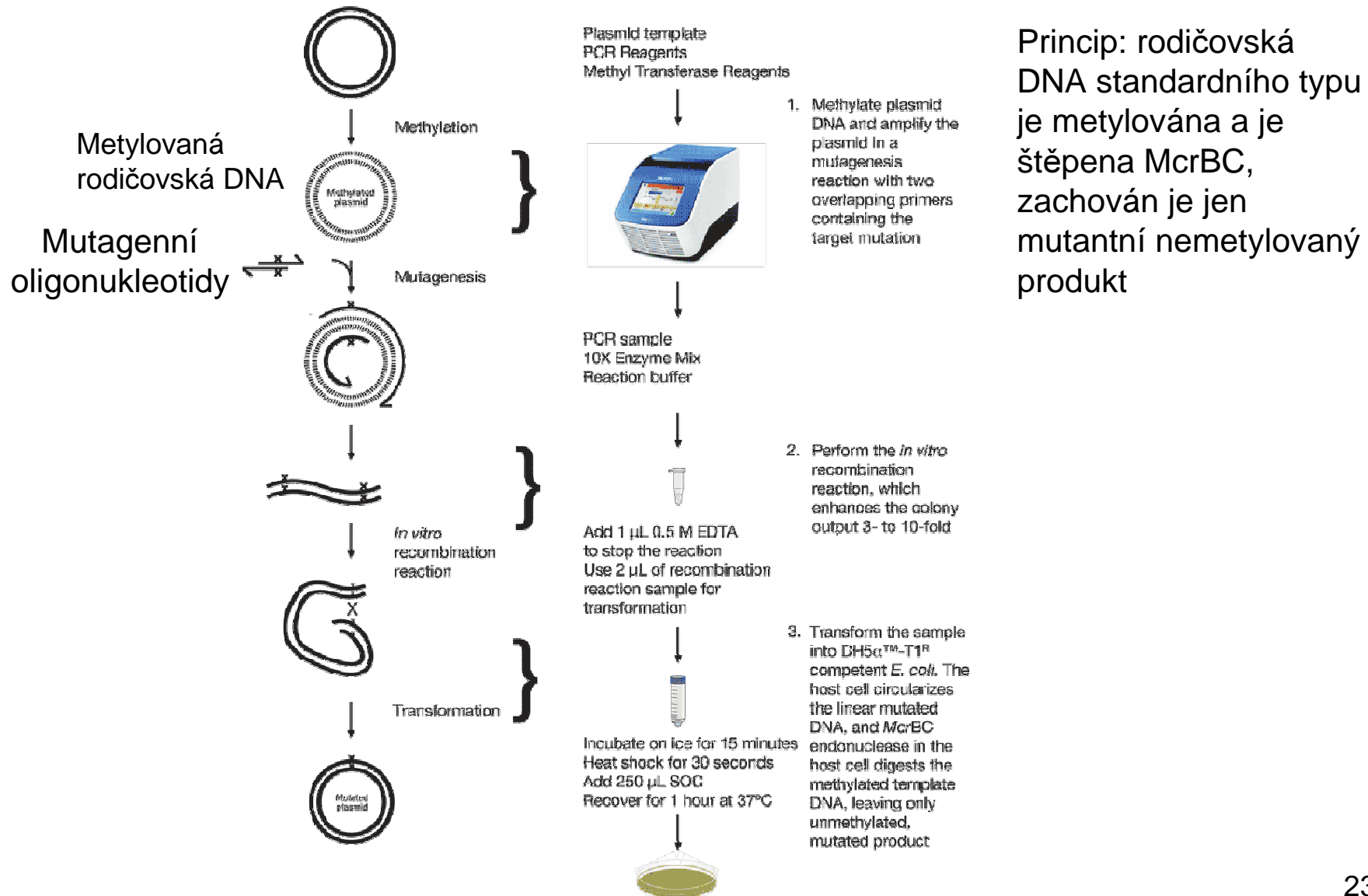
Vyhledání mutantních klonů pomocí sondy – tou je značený mutagenní oligonukleotid



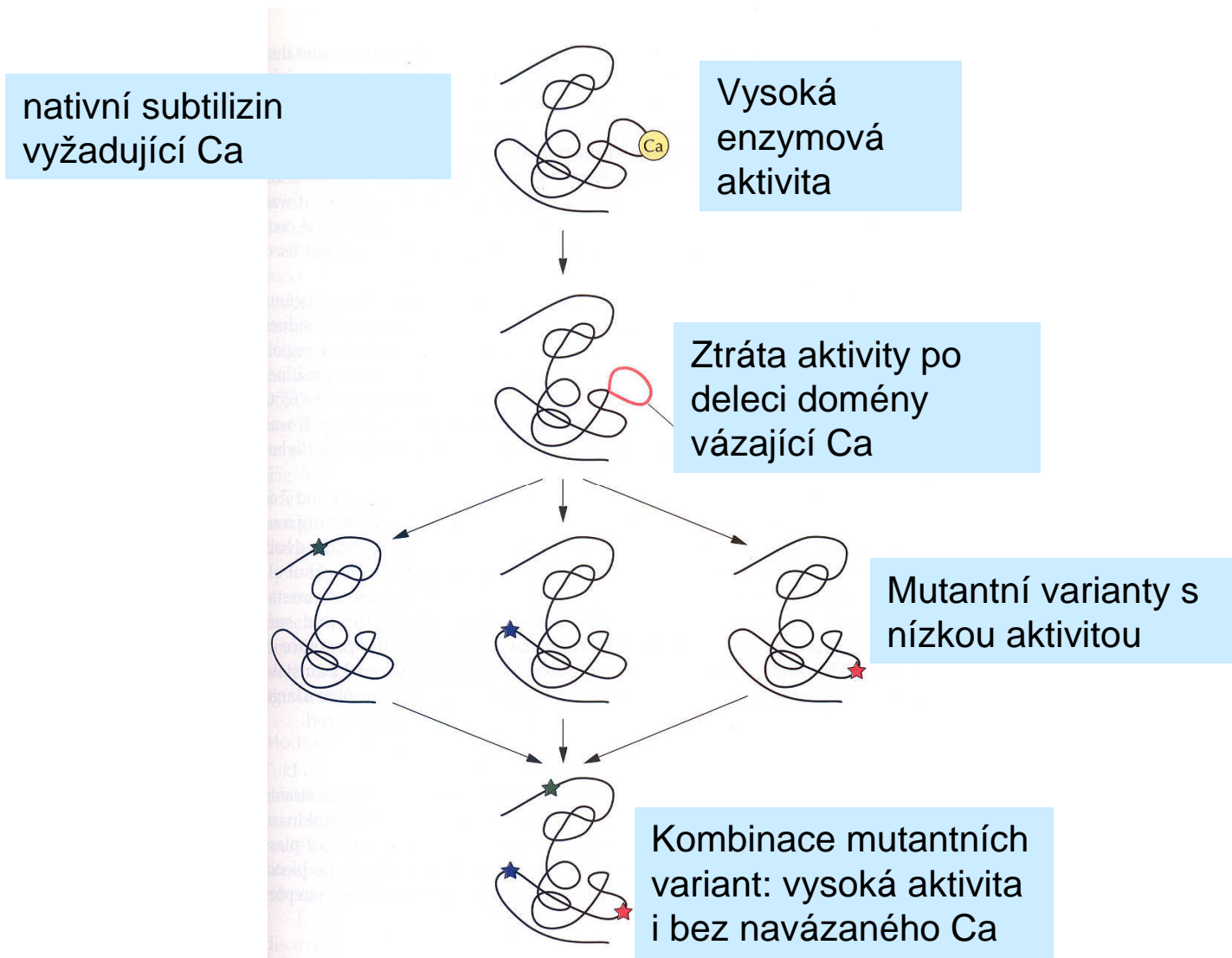
Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů



Komerční soupravy pro snadné vytváření mutací a selekci



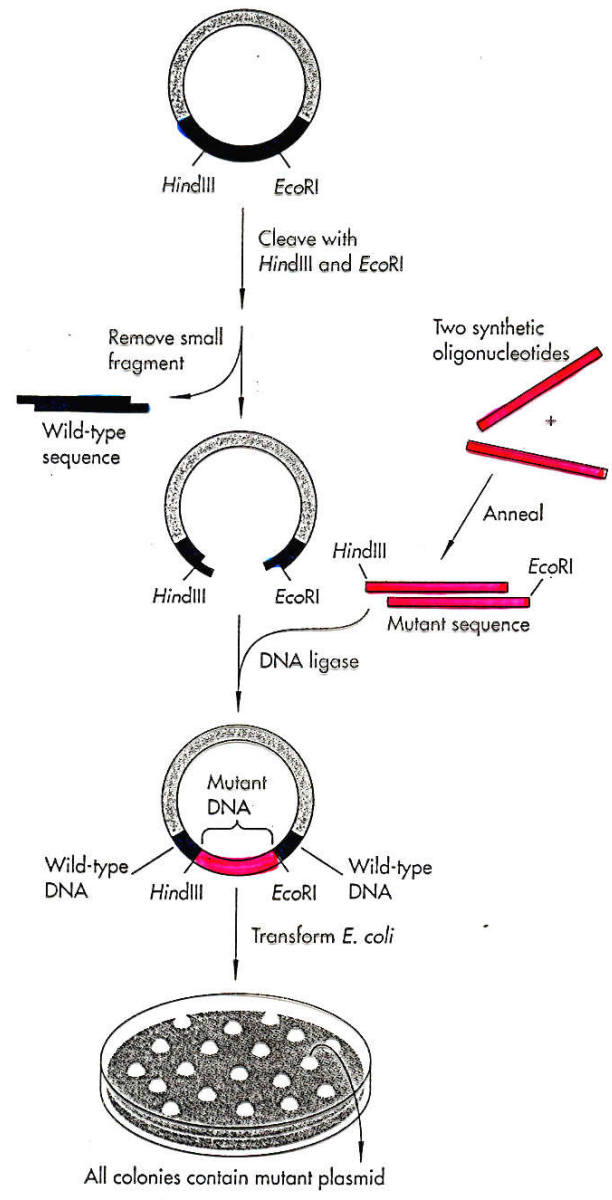
Modifikace subtilizinu se změněným požadavkem na kofaktory (postupná mutagenze pomocí mutagenních oligonukleotidů)



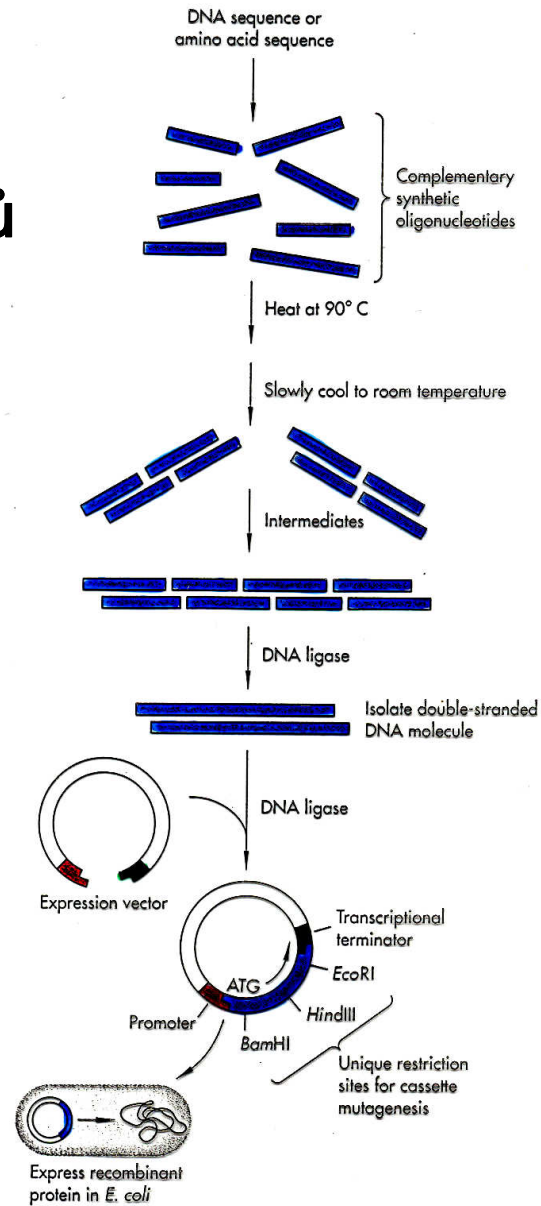
Vlastnosti přirozeného lysozymu (wt) a šesti jeho modifikovaných variant připravených oligonukleotidovou mutagezí

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

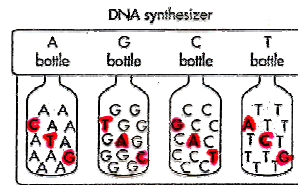
Kazetová mutageneze



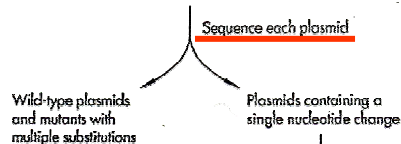
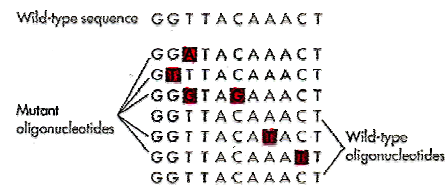
Syntéza genů postupným spojováním kratších oligonukleotidů



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



„kontaminované“ zásobní roztoky nukleotidů

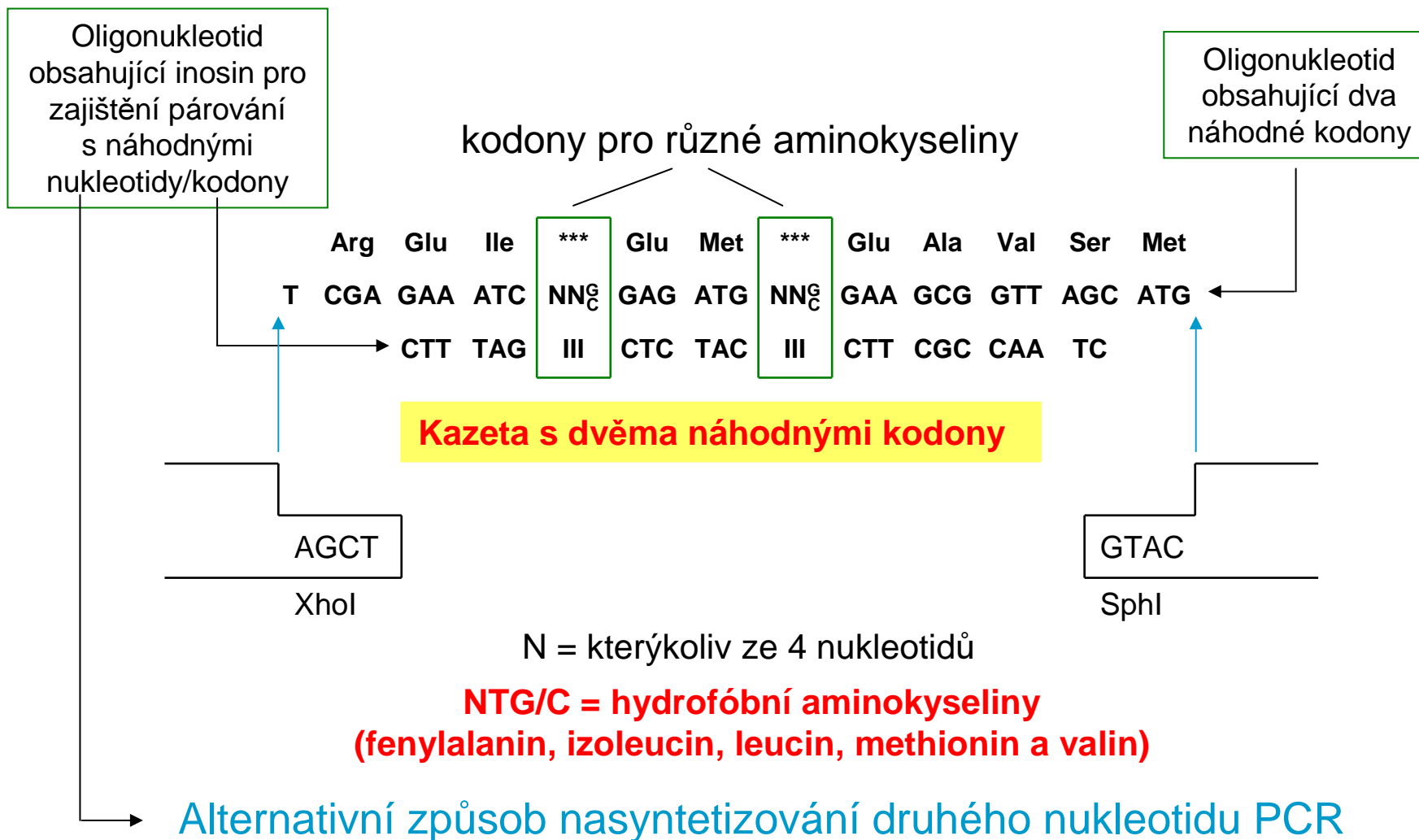


546 klonů
224 wt
218 - 1x subst.
104 - více subst.

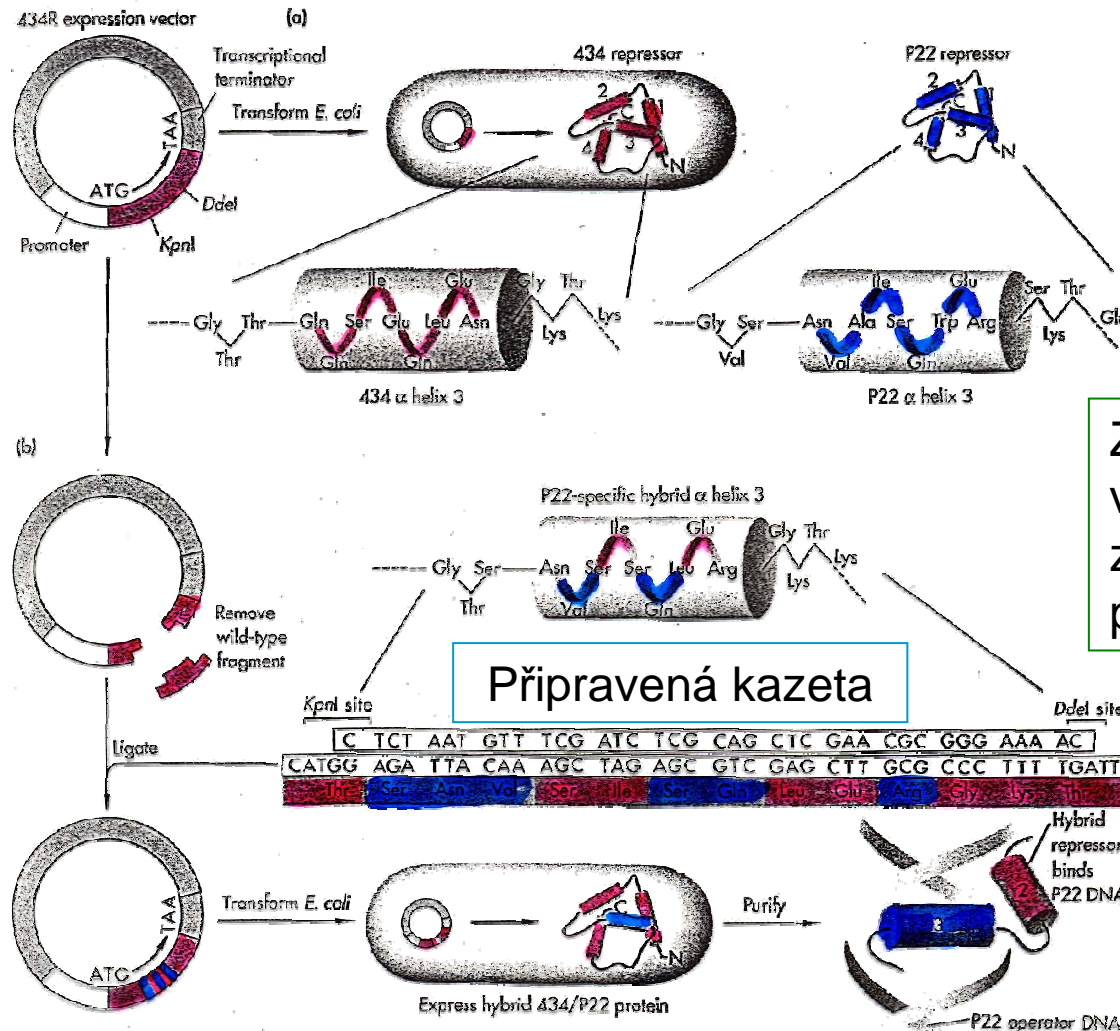
Skríning např. fágovým displayem

Test for function

Mutageneze pomocí „doped“ oligonukleotidů



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

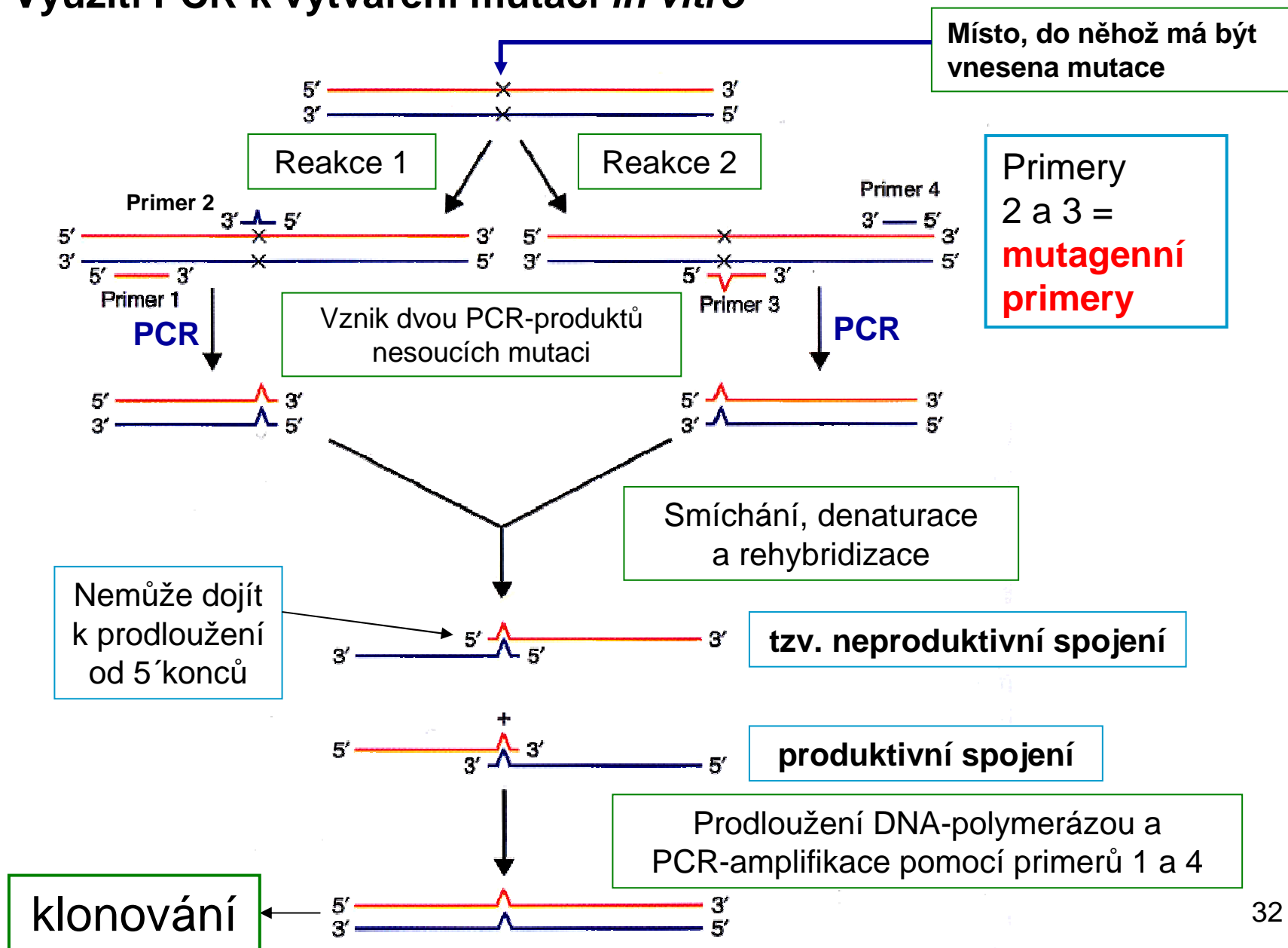


Záměna aminokyselin
v doméně represoru
zodpovědné za roz-
poznání operátoru P22

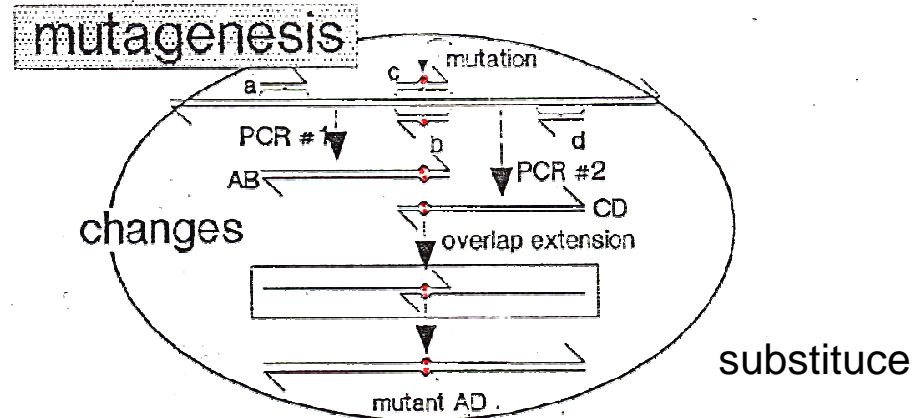
Výhody PCR

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

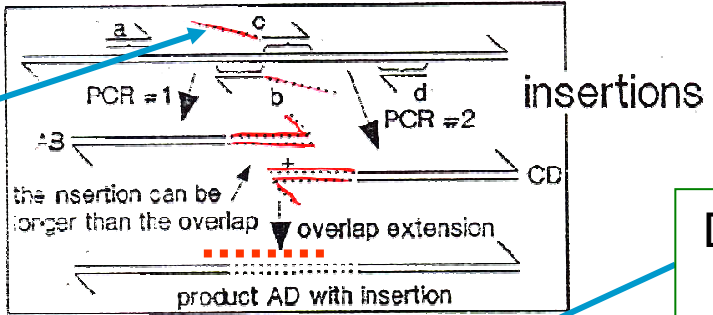
Využití PCR k vytváření mutací *in vitro*



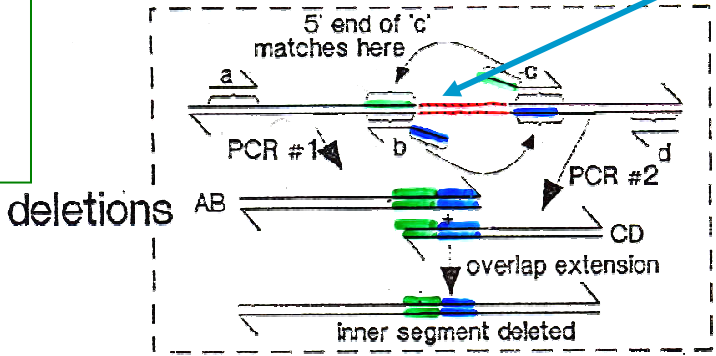
Vnášení mutací pomocí PCR



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

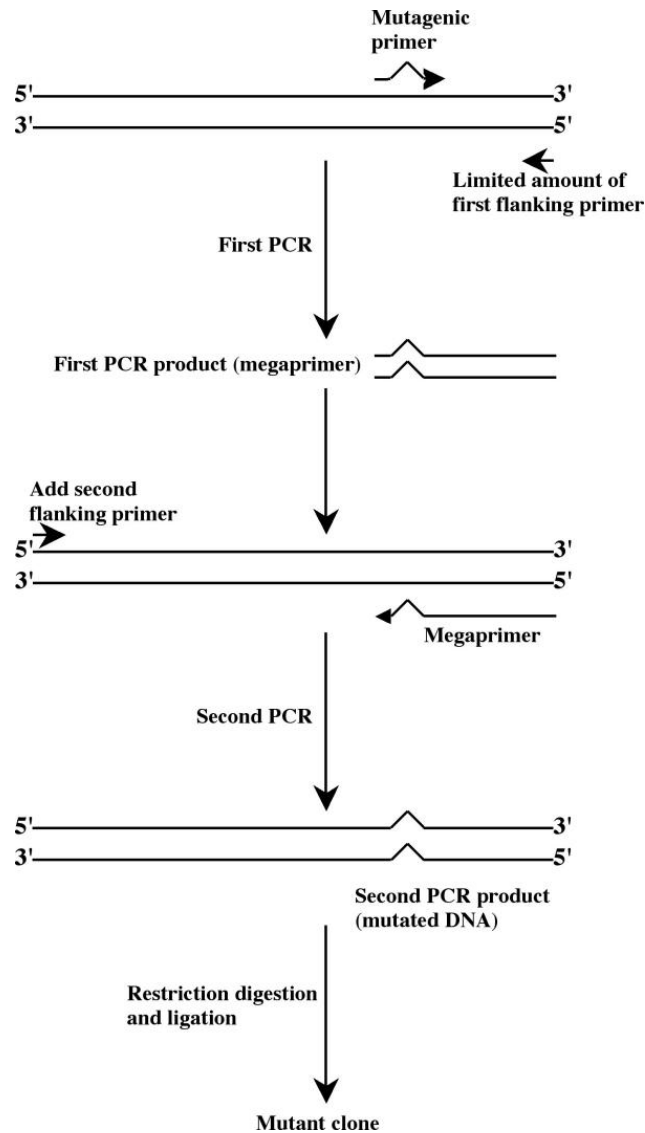


Deletovaná sekvence
(extenze jsou
komplementární k
sekvenci vedle místa
delece)



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

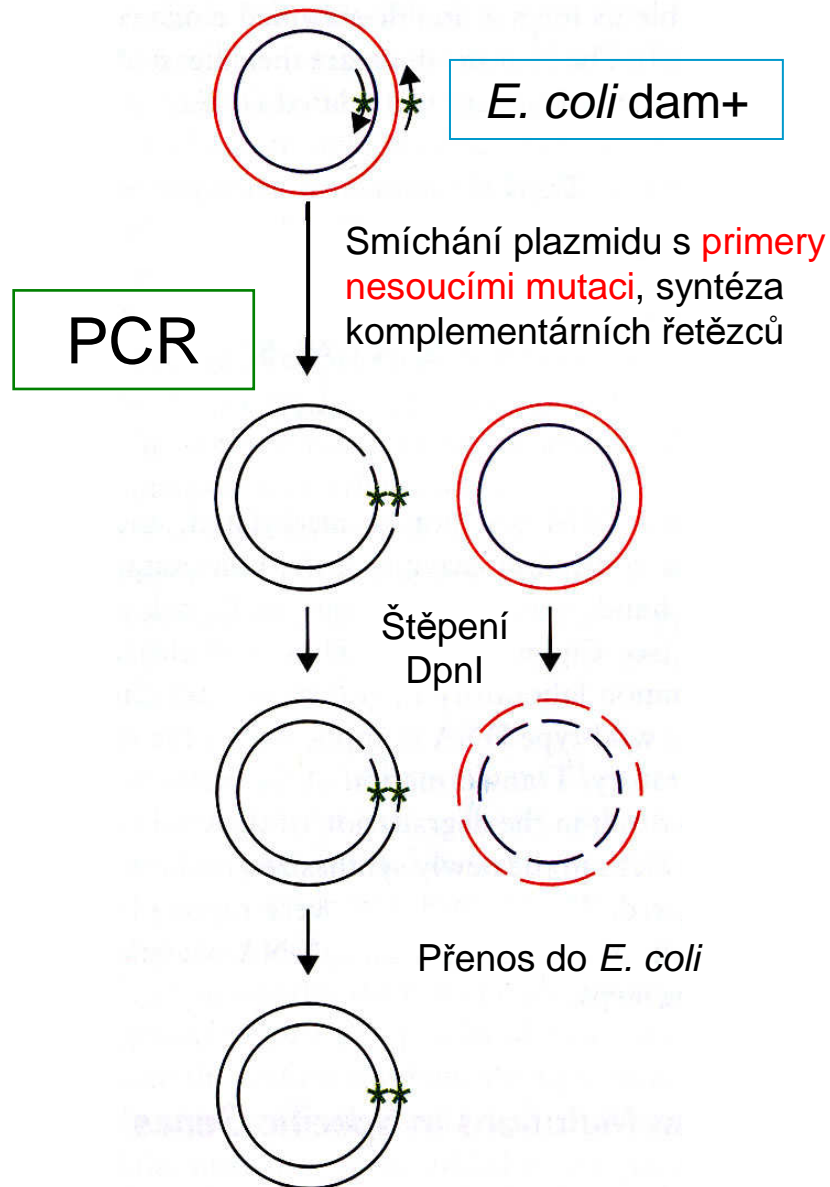
PCR-mutageneze pomocí megaprimeru



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.

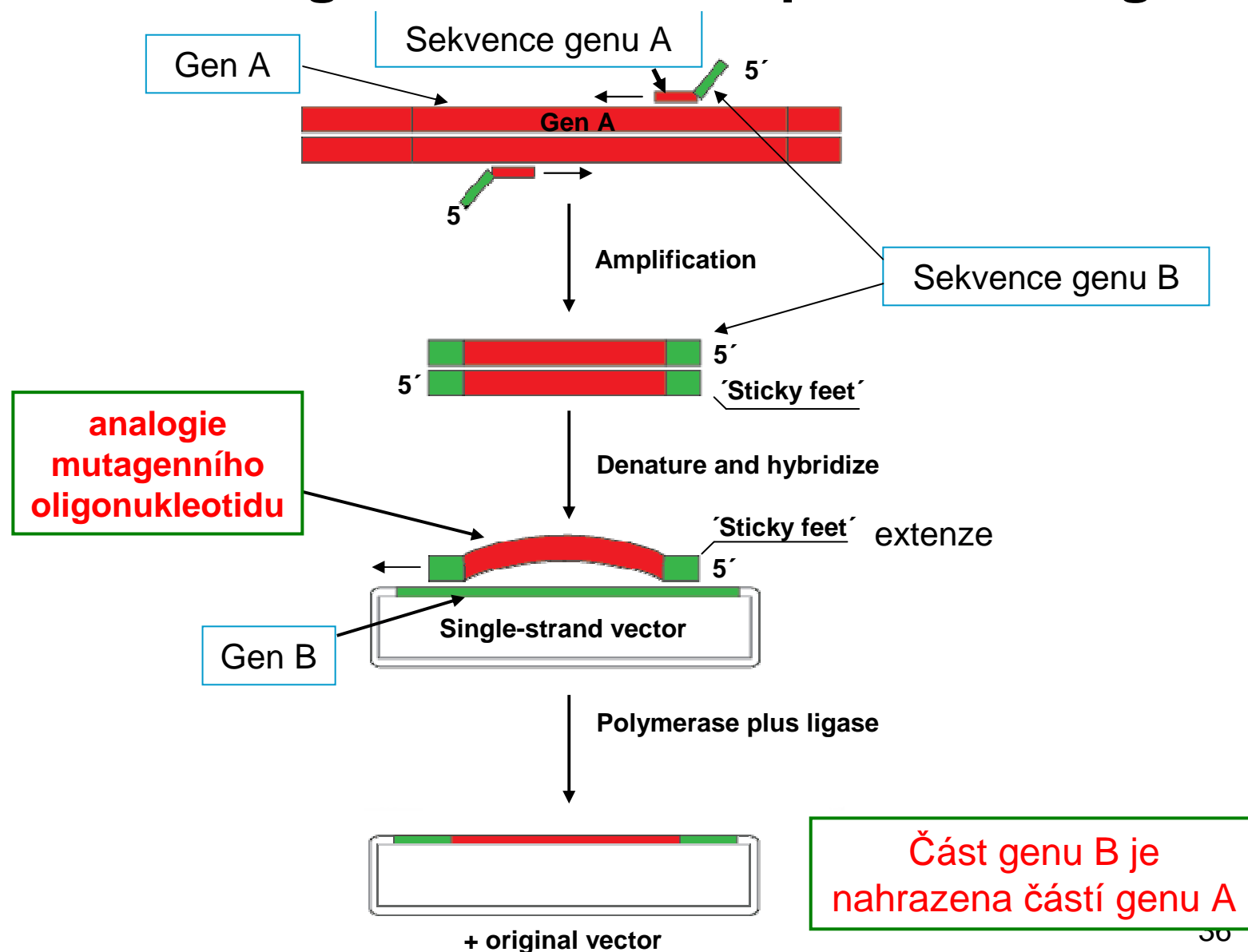
Nová modifikace: The first PCR (5 cycles) contains a limiting concentration of the first flanking primer and is followed by a prolonged extension step. The second flanking primer is then added and the entire mutated template is amplified by PCR (25 cycles). The second PCR product is digested with appropriate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

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

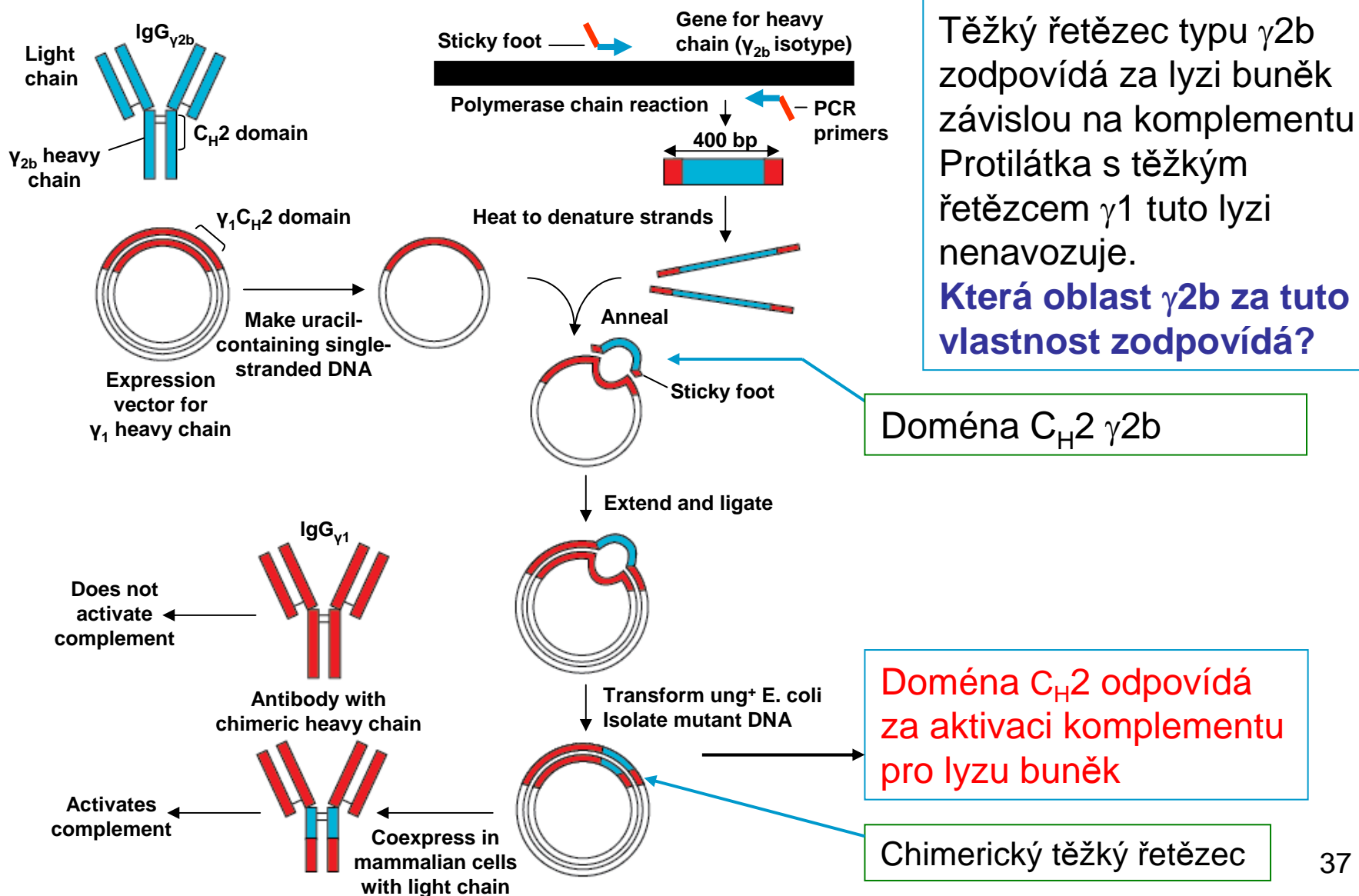


- jako templát je využita dsDNA plazmidu
- po proběhnutí PCR se vytvoří dva komplementární řetězce nesoucí mutaci ve stejném místě, které jsou schopny se párovat za vzniku kružnice s posunutými zlomy
- po proběhnutí PCR jsou produkty štěpeny DpnI, která je schopná štěpit jen metylovanou DNA
- rodičovské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

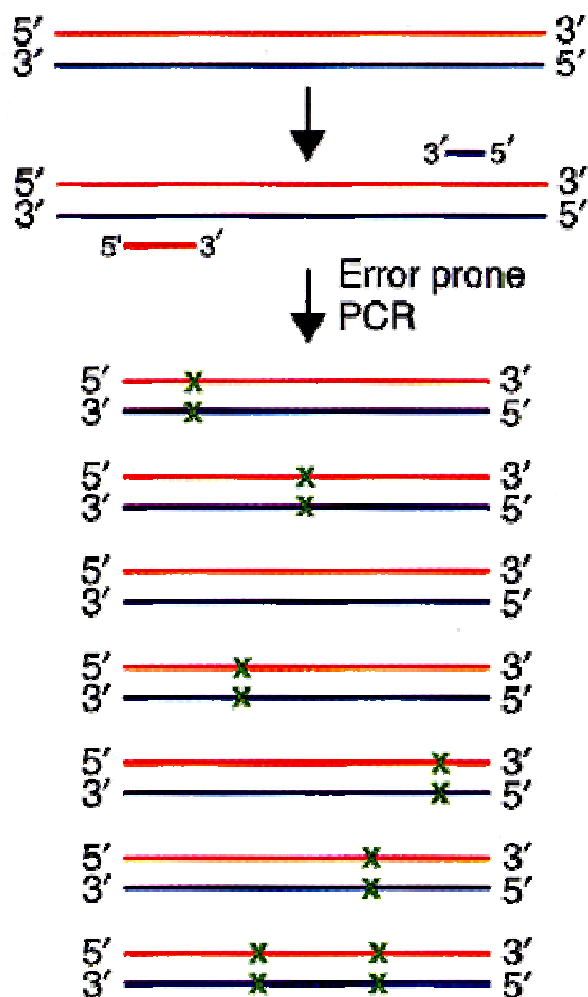
Náhrada části genu sekvencí z příbuzného genu



Konstrukce genu pro chimerickou protilátku

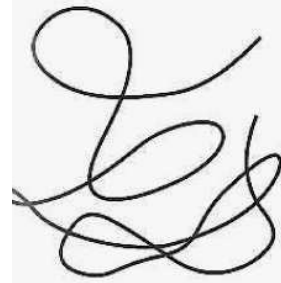


Vytváření náhodných mutací - „error-prone“ PCR



- 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. transice, zatímco transverze nevznikají)

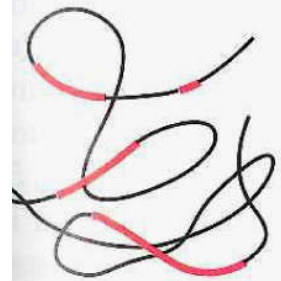
Způsoby zavádění změn do proteinů



Standradní typ
proteinu



Náhodná mutageneze
nebo error-prone PCR

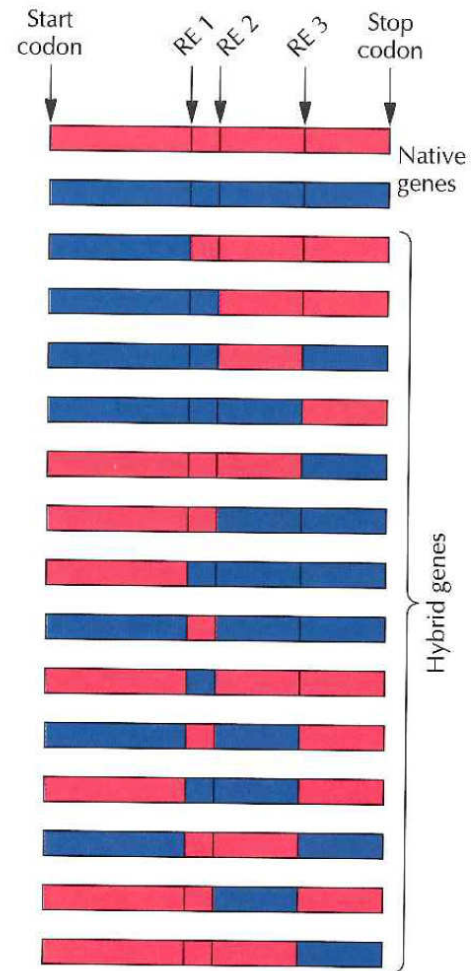


Kombinace oblastí/úseků (tzv. DNA-
shuffling) pocházejících z genů
genových rodin (interferon)

Výsledek (např):

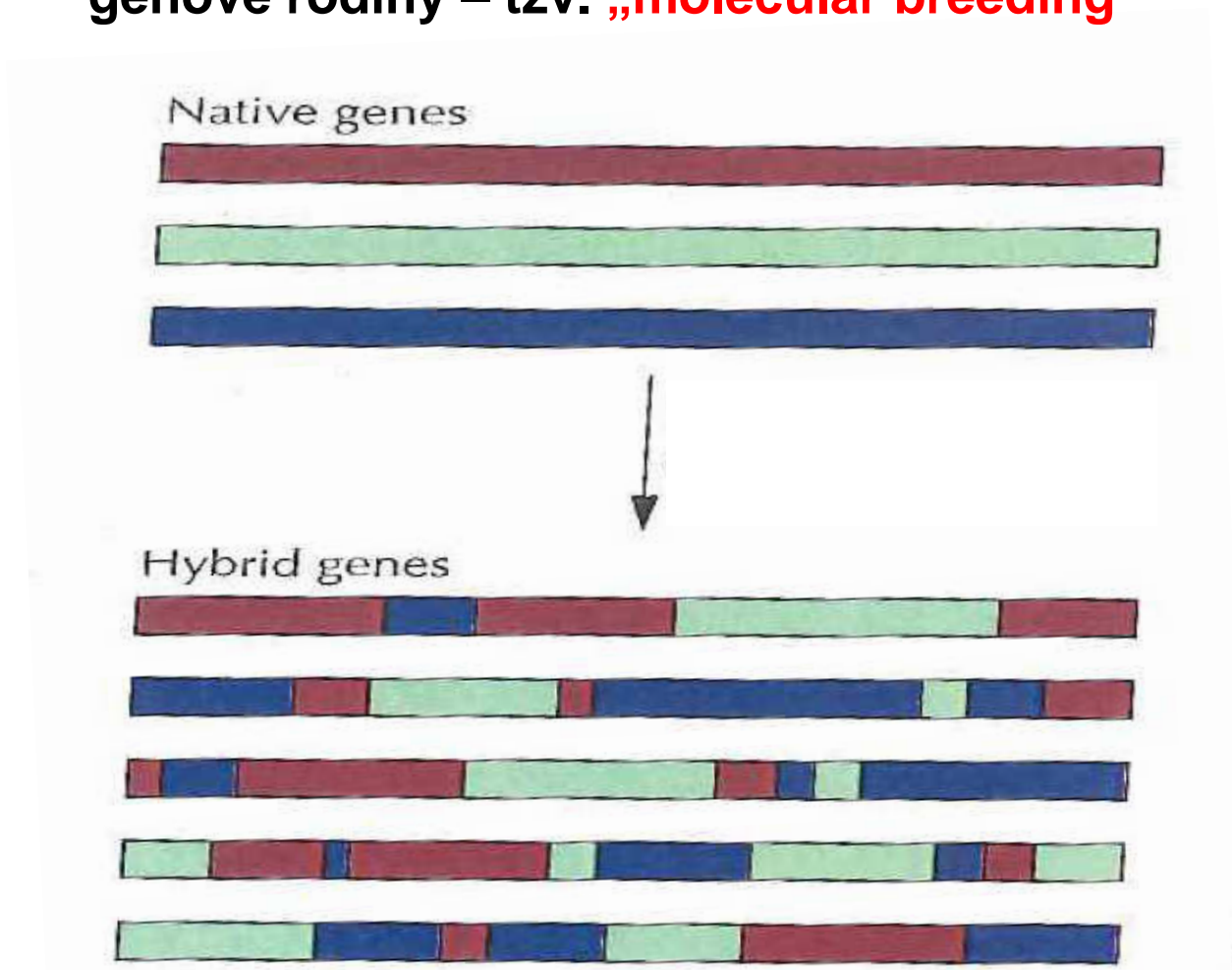
- vyšší aktivita
- termostabilita

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

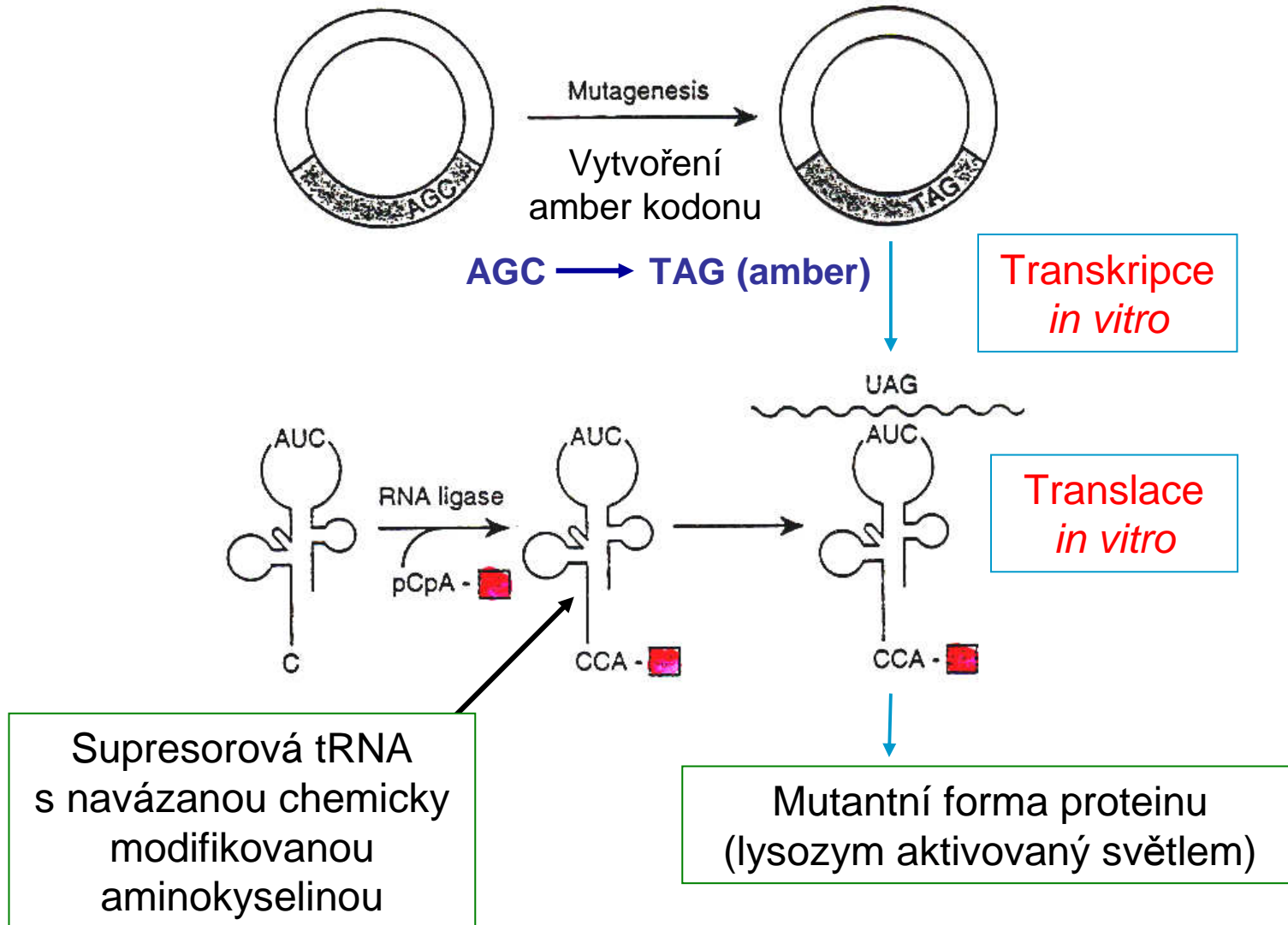
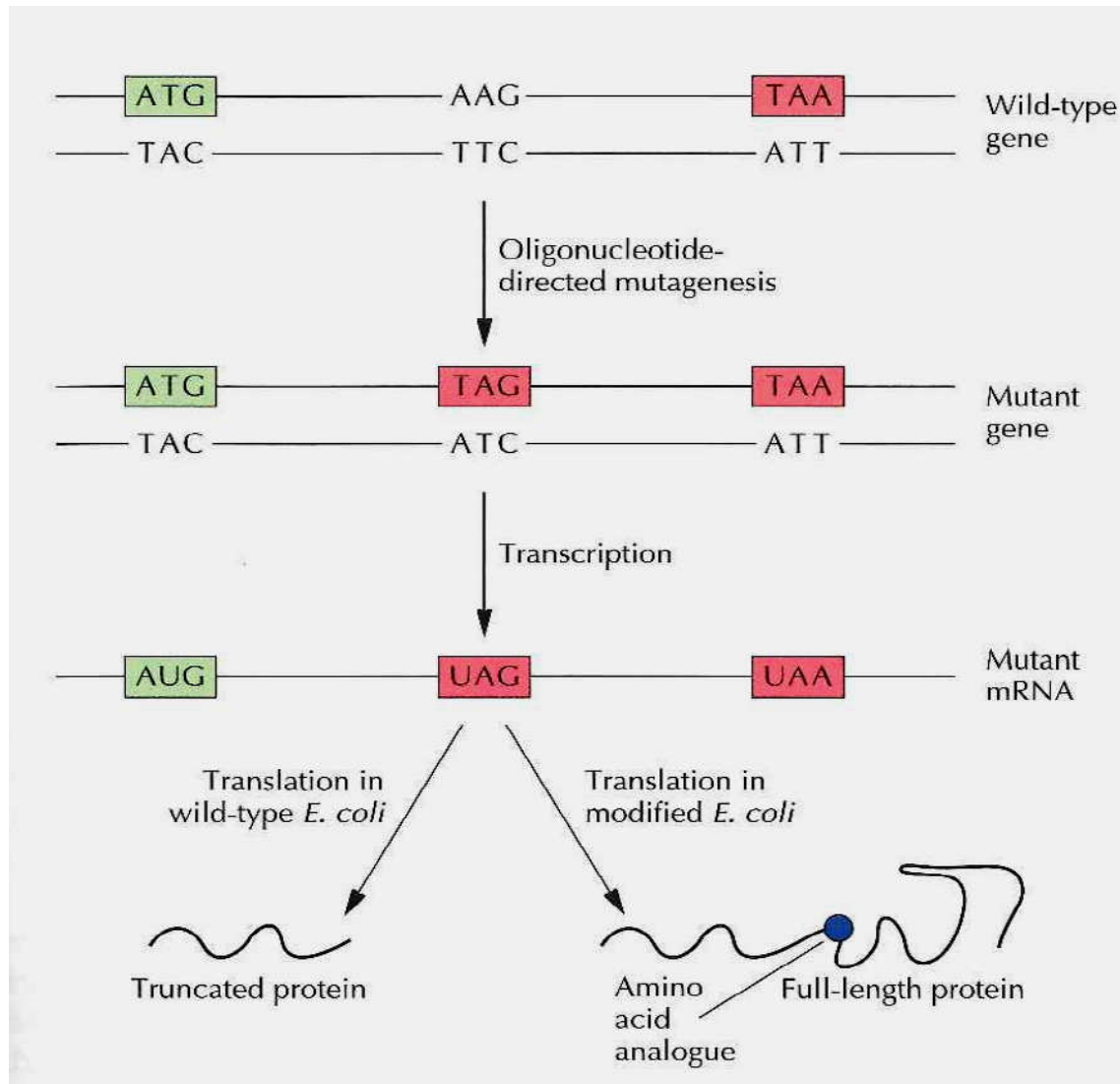


Table 4.4 Nonsense Suppressors Employed to Generate Altered Proteins

Suppressor	Codons recognized	Amino acid inserted	Efficiency (%)	References
A. přirozené				
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. Uměle připravené				
tRNA ^{Phe} _{CUA}	UAG	Phenylalanine	48–100	g
tRNA ^{GluA} _{CUA}	UAG	85% Glutamic acid 15% Glutamine	8–100	h, i
tRNA ^{Cys} _{CUA}	UAG	Cysteine	17–51	g
tRNA ^{HisA} _{CUA}	UAG	Histidine	16–100	h, i
tRNA ^{ProH} _{CUA}	UAG	Proline	9–60	h, i
tRNA ^{Lys} _{CUA}	UAG	Lysine	9–29	h, i
tRNA ^{Ala} _{CUA}	UAG	Alanine	8–83	h, i
tRNA ^{Gly1} _{CUA}	UAG	Glycine	39–67	h, i
FTORI 26	UAG	Arginine	4–28 4–47*	j h

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

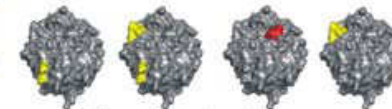
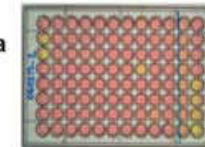
3. Transformace

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

