

GENOVÉ TECHNOLOGIE

Úvod:

Chemická struktura nukleových kyselin, transkripce a její regulace u prokaryot (sigma factor, LAC operon, aktivátory a represory) a eukaryot (zesilovače transkripce, epigenetika), translace a její regulace u prokaryot a eukaryot.

Sylabus

1. Chemická struktura nukleových kyselin, transkripce a její regulace u prokaryot (sigma faktor, LAC operon, aktivátory a represory) a eukaryot (zesilovače transkripce, epigenetika), translace a její regulace u prokaryot a eukaryot.
2. Modelové organismy využívané v biotechnologii – bakterie (*E. coli*), kvasinky (*Pichia*, *Saccharomyces*) a houby (*Penicillium*), *Caenorhabditis elegans* (hádčátko), *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* (Dáňio pruhované), myš domácí, živočišné buněčné kultury, *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní), viry (bakteriofágy, retroviry). Replikace DNA u eukaryot a prokaryot, opravné procesy, *in-vitro* syntéza DNA (PCR, reverzní transkripce).
3. Základní technologie rekombinantní DNA - enzymy, vektory, metody transformace, konstrukce genových knihoven. Techniky pro editaci genomu (ZFNs, TALENs, CRISPR).
4. Rekombinantní proteiny – exprese proteinů v bakteriích (klonovací strategie, použití kodónů, omezení toxických efektů v důsledku nadprodukce, zvýšení stability a sekrece, glykosylace), exprese proteinů v eukaryontních buňkách (kvasinky, hmyzí buňky, savčí buňky), výhody a nevýhody jednotlivých expresních systémů
5. Genomika a genová exprese – techniky mapování genů, nekódující části genomu, bioinformatické nástroje, farmakogenetika, DNA mikroarrays, RNA-seq techniky, metagenomika, epigenetika.

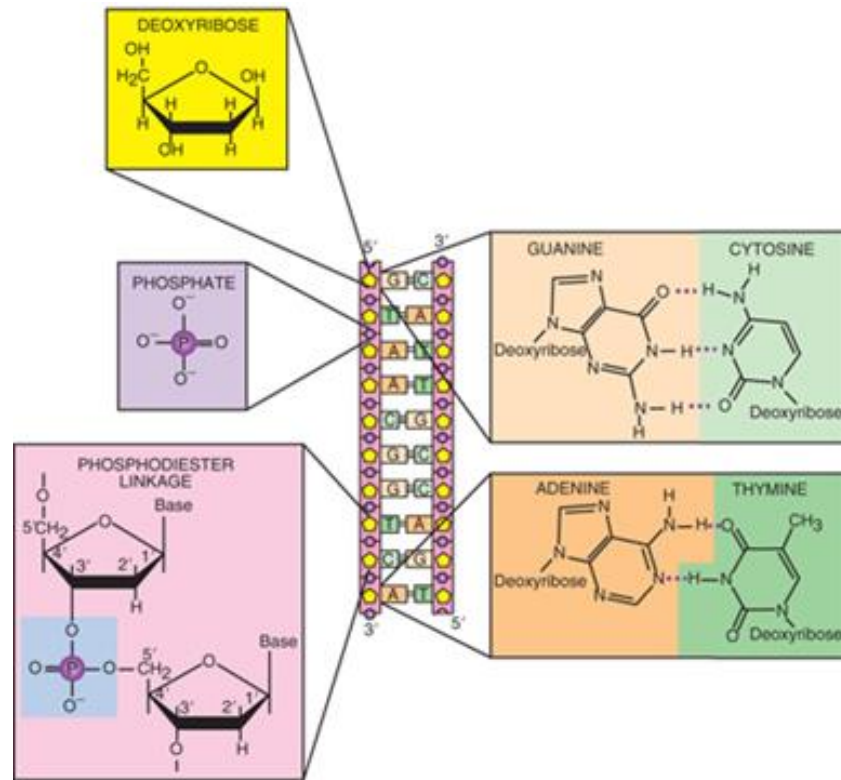
Sylabus

6. Technologie založené na RNA – rozdělení RNA, význam ne-kódujících RNA, antisense RNA a umlčování genů, ribozymy
7. Technologie v imunologii – protilátky (struktura, funkce), cílený návrh protilátek, monoklonální protilátky, ELISA, vakcíny (tvorba a výroba, identifikace potenciálních nových antigen, DNA vakcíny)
8. Transgenní rostliny - tkáňové kultury, genetické úpravy rostlin (Ti plazmid), funkční genomika, biotechnologické aplikace. Transgenní zvířata – techniky tvorby, metody kontroly exprese transgenů, aplikace RNA-technologií, příklady transgenních zvířat.
9. Genová terapie – vrozené defekty u vyšších organismů, identifikace vadných genů, obecný princip genové terapie, genová terapie pomocí retrovirů a adenovirů, agresivní genová terapie, využití RNA v rámci terapie, cílená editace genů.
10. Nanotechnologie – nanočástice, kvantové tečky, DNA origami.

Struktura nukleových kyselin

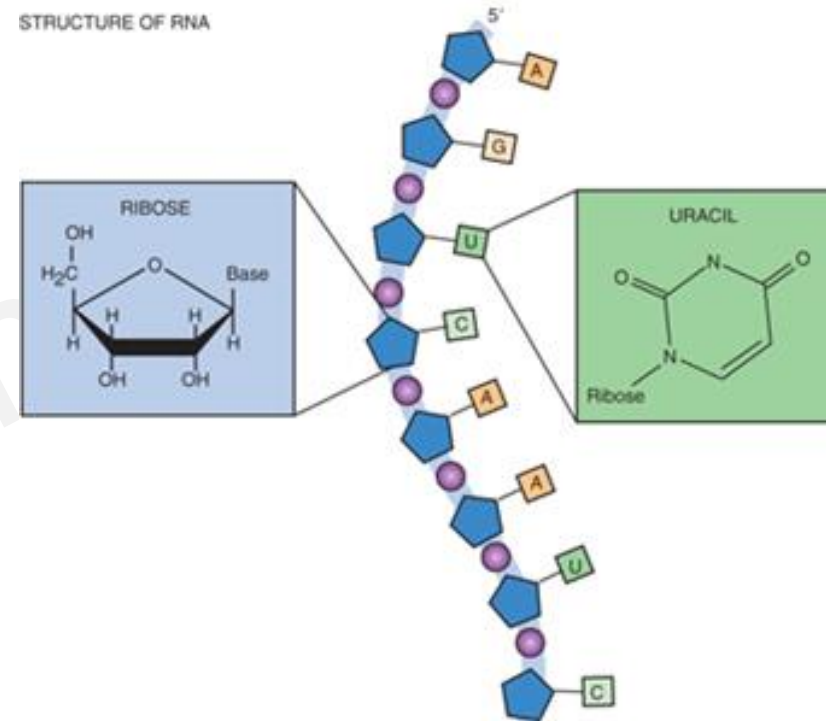
- DNA a RNA - polymery skládající se z podjednotek nazývaných nukleotidy
- Nukleotid – fosfátová skupina, cukr (ribóza, deoxyribóza), báze (A,G,C,T,U)
- Fosfát propojuje dva cukerné zbytky pomocí fosfodiesterové vazby
- Nejvíce stabilní struktura – dvou řetězcová molekula DNA v anti-paralelní orientaci vláken (dvoušroubovice)
- Purinové báze se párují s pyrimidinovými (A-T, G-C, A-U) pomocí vodíkových vazeb; G-C pár stabilnější díky třem vazbám

Struktura nukleových kyselin



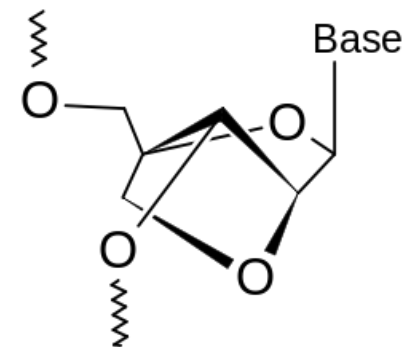
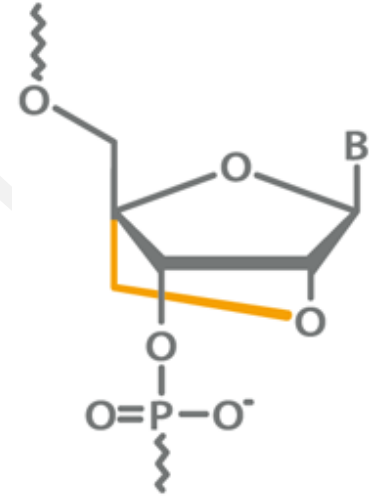
Clark and Pazdernik, 2016

STRUCTURE OF RNA

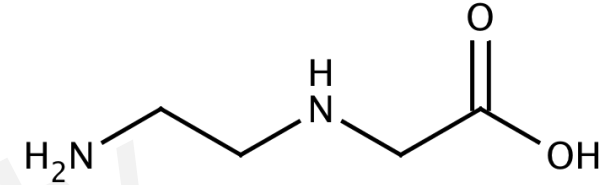


Analogy bází nukleových kyselin

- **Lock Nucleic Acid (LNA), Bridged Nucleic Acid (BNA)**
- 2'-O a 4'-C atomy kruhu ribózy jsou spojeny pomocí methylenového můstku
- **Fixace kruhu ribózy v optimální konformaci pro Watson-Crick párování**
- Pár se rychleji tvoří a má vyšší stabilitu
- LNA oligonukleotidy jsou ideální pro detekci krátkých nebo velmi podobných cílů v rámci DNA/RNA
- Vyšší specifita sond v rámci qPCR (detekce SNPs), jedinečné rozlišení mikroRNA rodin, vyšší stabilita (*in vitro/in vivo*), velmi účinná inhibice malých RNA *in vivo*.

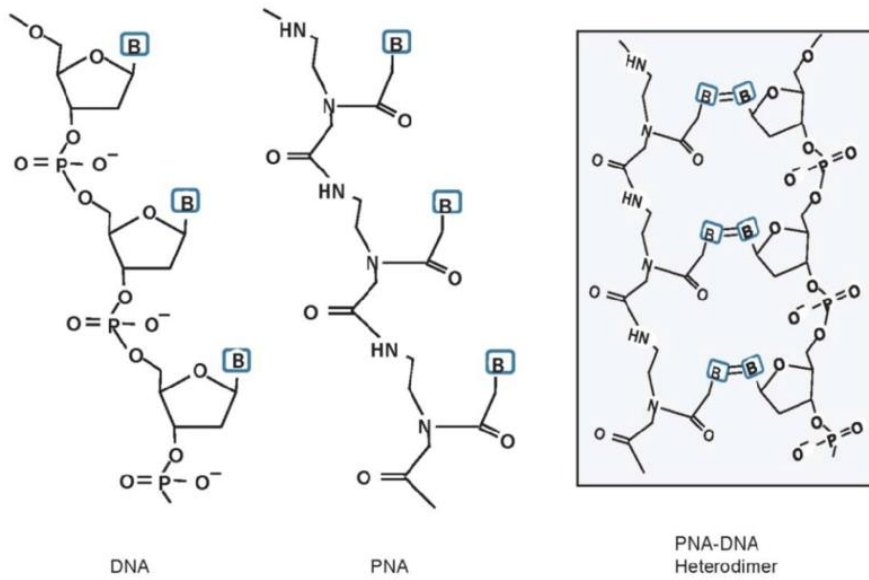


Analogy bází nukleových kyselin

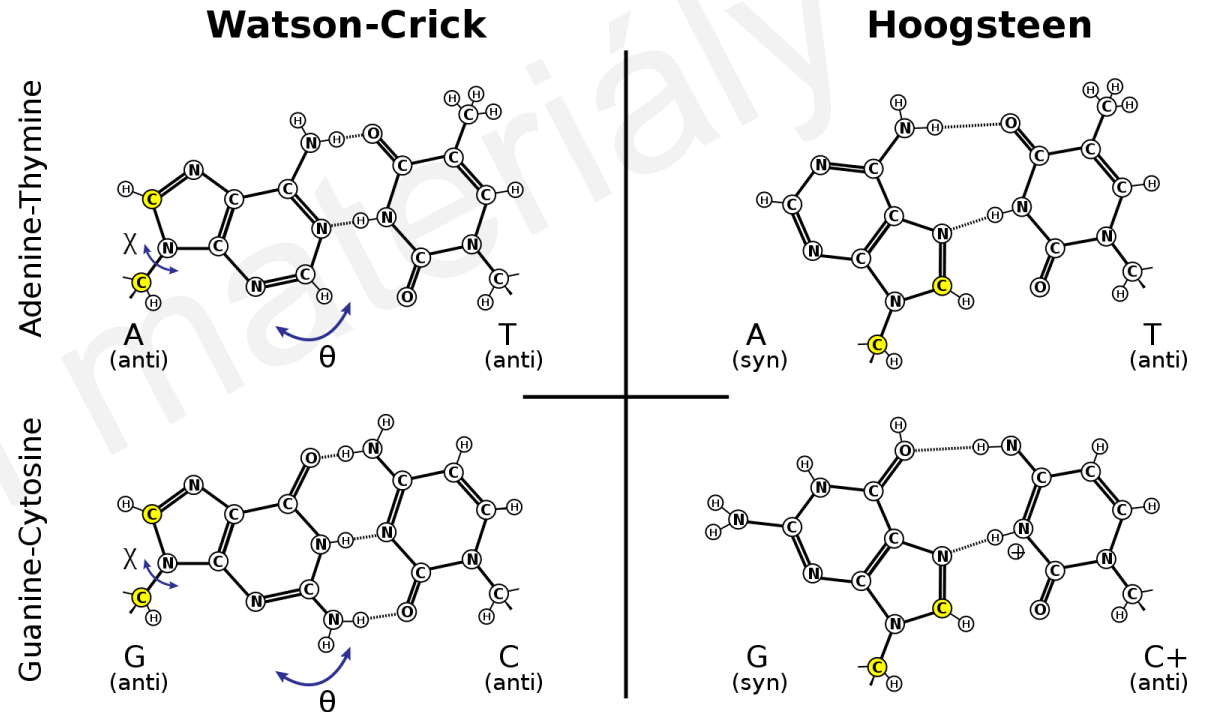


- **Peptide Nucleic Acids (PNAs)** – Nielsen et al., Science, 1991
- DNA analogy, fosfodiesterová vazba je nahrazena N-(2-aminoethyl)glycinem
- **Syntetická kostra - jedinečné vlastnosti v rámci hybridizace**
- PNA je nenabitá = v rámci hybridizace nedochází k elektrostatické repulzi = vysoká stabilita PNA-DNA, PNA-RNA duplexů
- PNA hybridizuje nezávisle na koncentraci solí v roztoku
- Nedochází k degradaci PNA pomocí nukleáz nebo proteáz a nejsou rozpoznávány polymerázami
- PNA se může vázat v anti-paralelním i paralelním uspořádání, tvořit triplex (Hoogsteenovo párování)

Peptide Nucleic Acids (PNAs)



Brind'Amour, Julie. (2020)

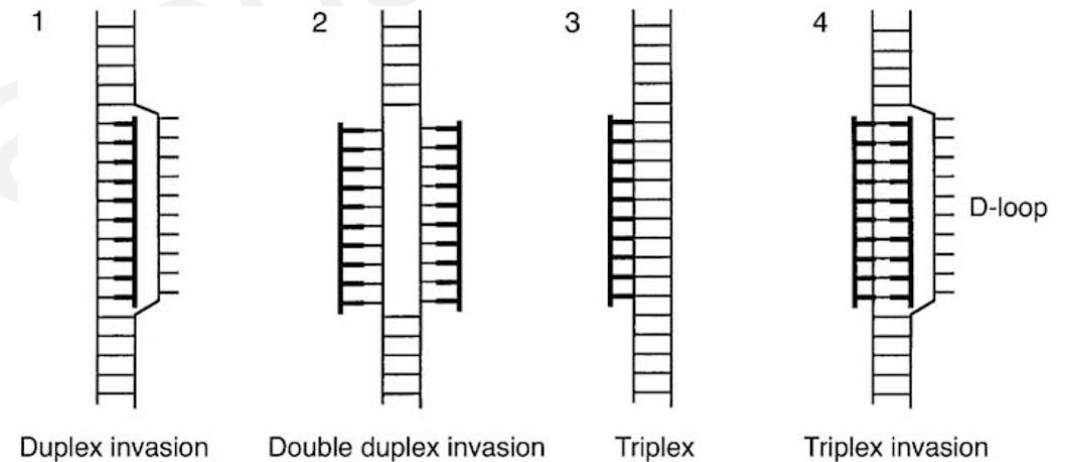


Watson and Crick (1953). Nature 171

Hoogsteen (1963) Acta Crystallographica. 16

Peptide Nucleic Acids (PNAs)

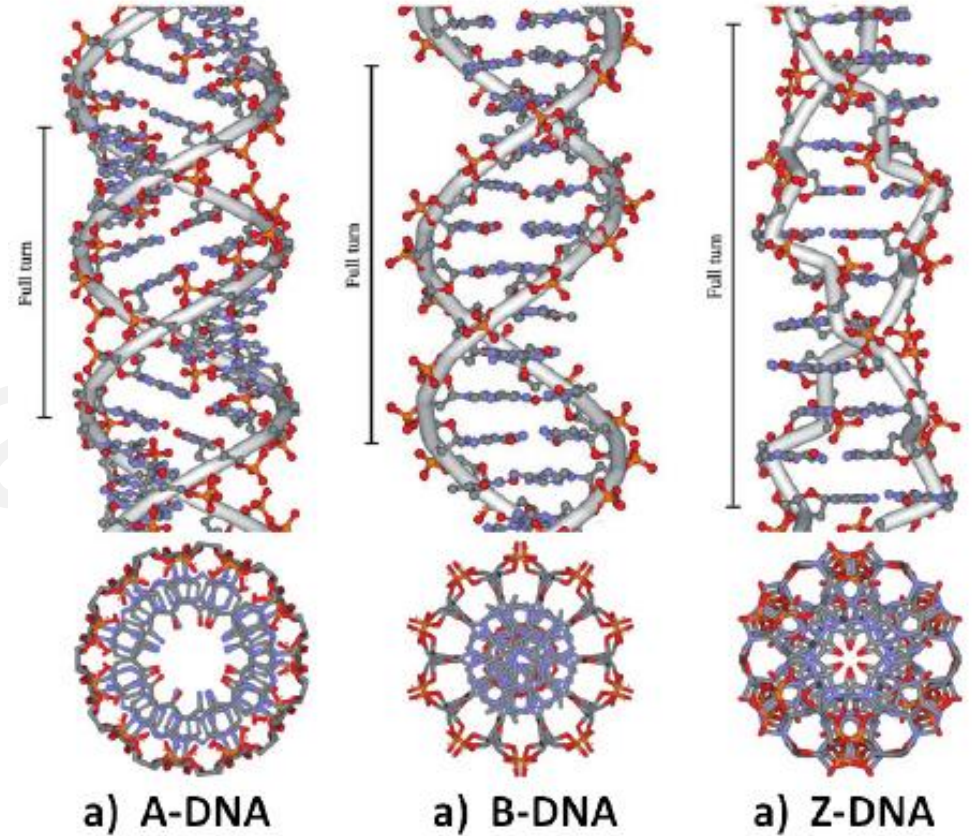
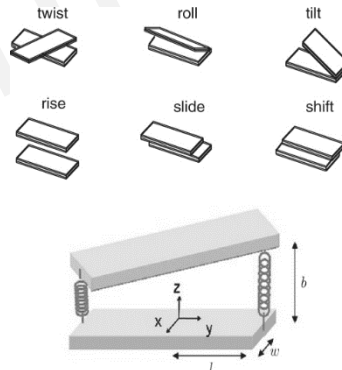
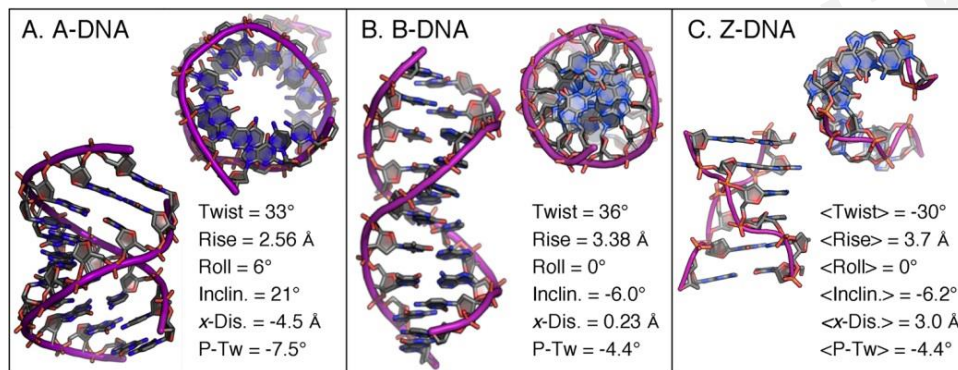
- Použití PNAs *in vivo* limituje nízký přístup do buněk – spojení s DNA oligomery, ligandy receptorů nebo peptidy penetrujících do buněk
- Využití PNA:
 - specifické doručování do jádra
 - využití v rámci PCR a Q-PNA PCR
 - vazba nukleových kyselin (DNA/RNA – capture)
 - hybridizační techniky (PNA-FISH)



Pellestor et al. 2004

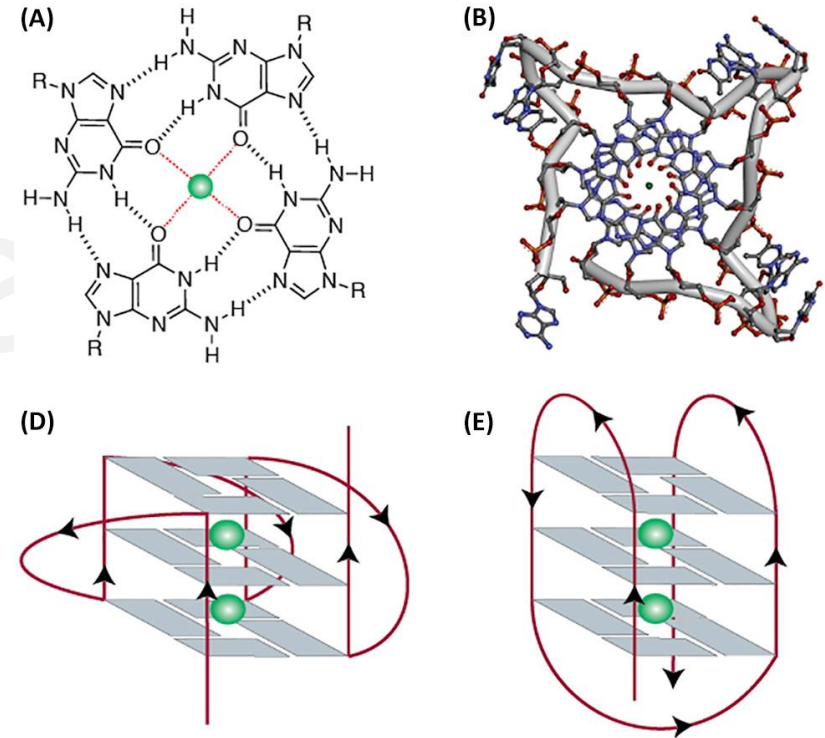
Konformace DNA

- Pravotočivá dvoušroubovice, 1 otáčka cca. 10 páru bazí, 34 Å
- Může zaujímat různé konformace:
 - B-forma - nízká koncentrace solí (10 bp/otáčku)
 - A-forma - vysoká koncentrace solí (11 bp/otáčku)
 - Z-forma - levotočivá dvoušroubovice (12 bp/otáčku)



G-kvadruplexy

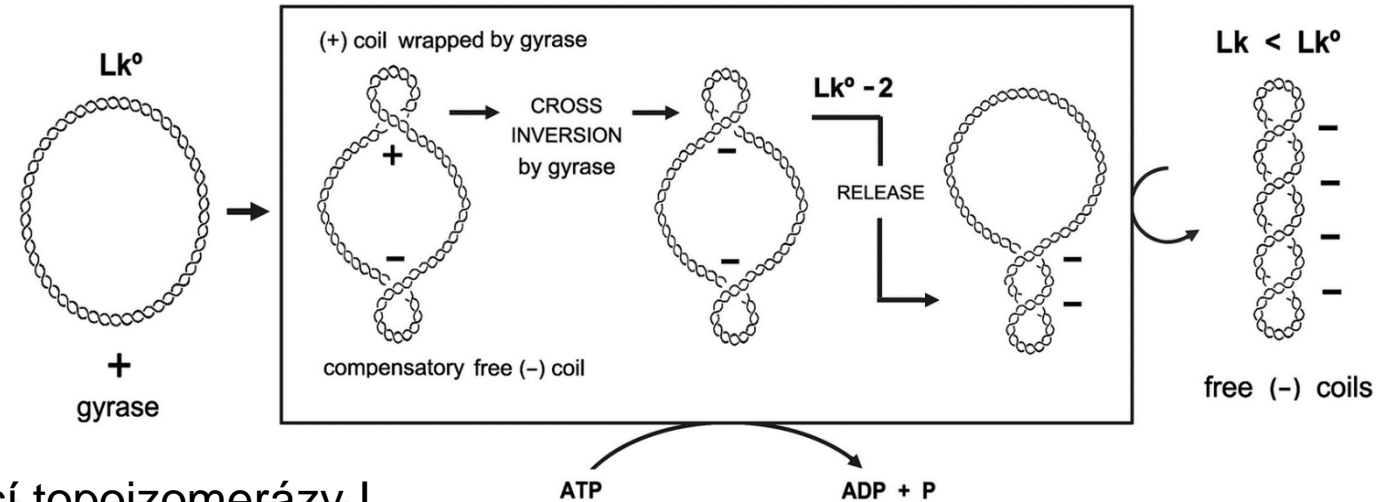
- Tvorba v G-bohatých oblastech
- Struktura stabilizovaná Hoogsteenovým párováním a monovalentním kationtem ($K^+ > Na^+ > Li^+$)
- Čtyř-řetězcová nekanonická struktura DNA
- Klíčové funkce v transkripci, replikaci, stabilitě genomu a epigenetické regulaci
- Význam v léčbě nádorů (použití molekul stabilizujících strukturu G4)
- Objevena celá řada proteinů interagujících specificky s G4



Spiegel et al. 2020

Sbalení nukleových kyselin

- Molekula DNA je příliš dlouhá – nutná kondenzace
- U bakterií dochází k nadšroubovicovému vinutí (supercoiling) pomocí enzymu DNA gyrázy (levotočivé zkroucení)



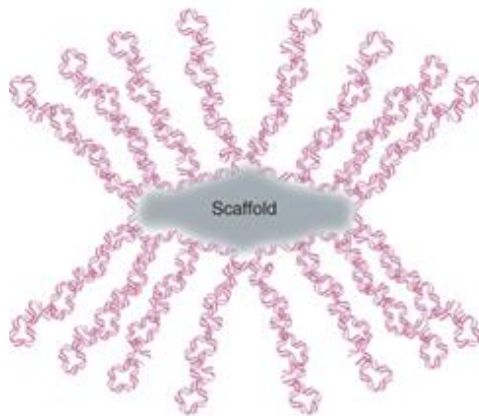
- Rozvolnění kondenzované struktury pomocí topoizomerázy I
- U eukaryot je DNA navinuta na histony nesoucí kladný náboj – chromatin
- Nukleozom se skládá z cca. 200 bp a devíti proteinů (H2A (2x), H2B (2x), H3 (2x), H4 (2x) a H1)
- Chromatin je dále stočen do helikální struktury (30-nm vlákna, 6 nukleozomů/otáčku)
- Vlákna jsou přichycena na chromozomální ose pomocí tzv. “matrix attachment regions“ (MAR)
- MAR mají cca. 200-1000 bp a jsou bohaté na A/T

Sbalení nukleových kyselin

Bakterie



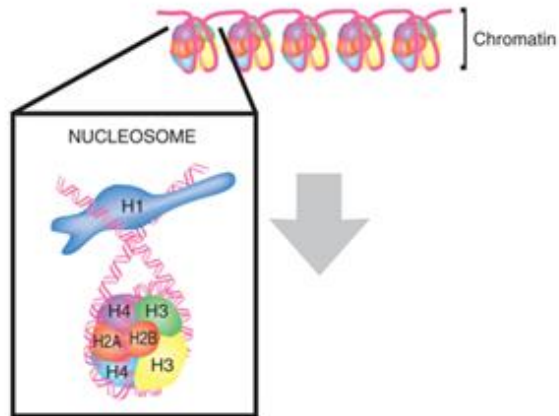
SUPERCOILED



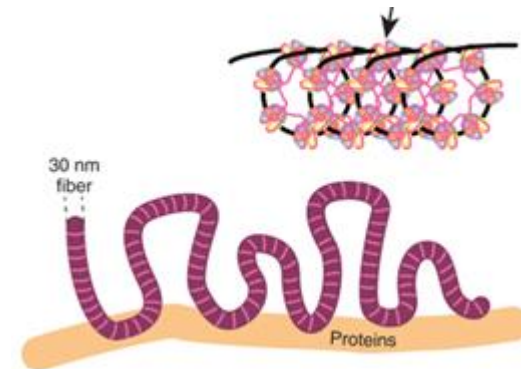
Eukaryota



SUPERCOILED



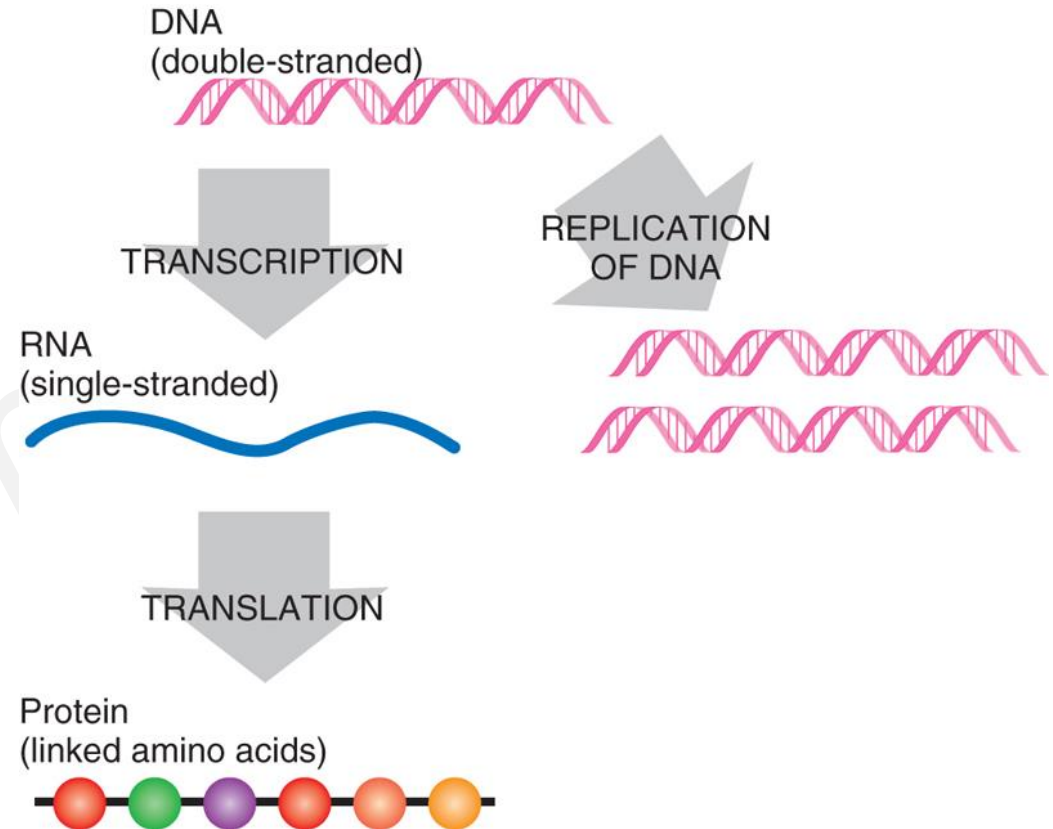
30-nm vlákna, 6 nukleozomů/otáčku



Centrální dogma molekulární biologie

- Klíčové vlastnosti živých tvorů
 - schopnost reprodukovat vlastní genom
 - tvořit vlastní energii
- Nutnost organismů vyrobit proteiny kódované v rámci své DNA
- Proteiny – tvorba energie, kontrola replikace, vnitro- a mezibuněčná komunikace
- Centrální dogma molekulární biologie:

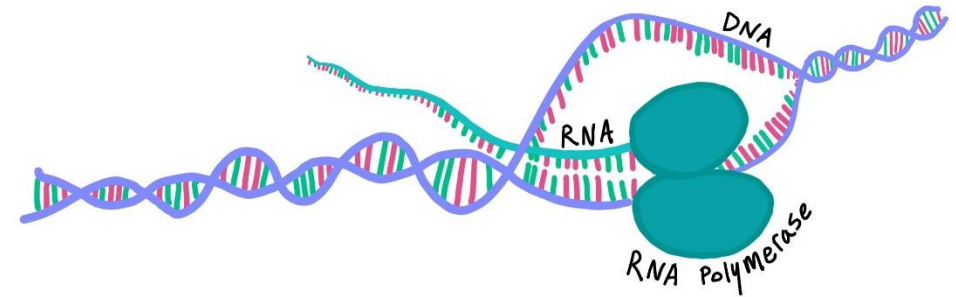
DNA je přepisována do RNA, která je následně překládána do proteinů



Clark and Pazdernik, 2016

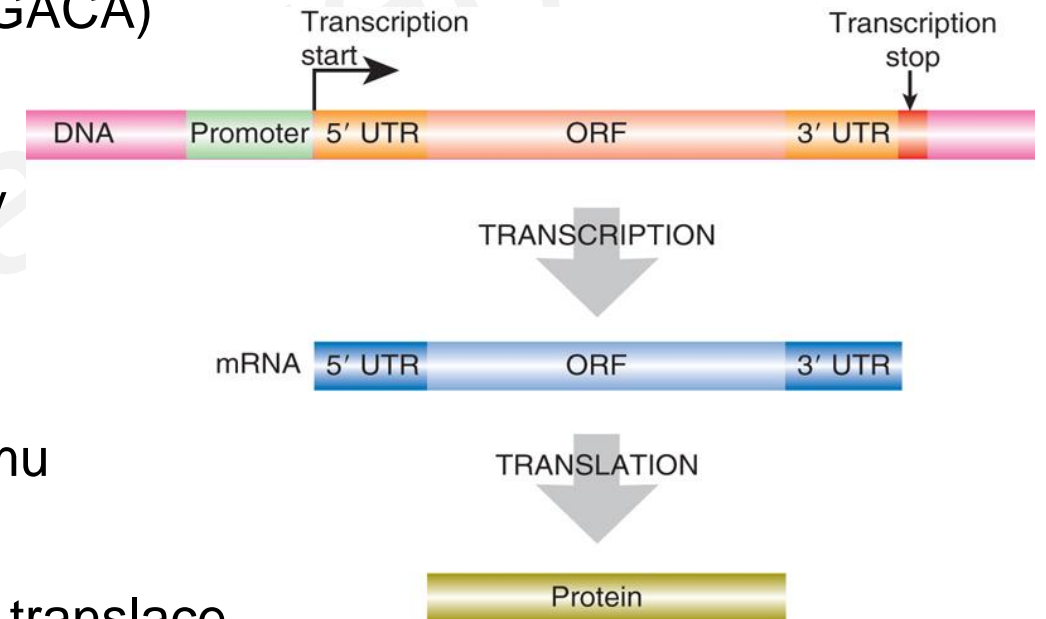
Transkripce

- Tvorba kopií RNA na základě DNA kódu
- Zahrnuje:
 - rozvinutí DNA
 - rozpletení vláken na počátku transkripce
 - odstranění histonů
 - tvorba RNA pomocí enzymu RNA polymerázy (5' → 3' procesivita)
- “Housekeeping“ geny přepisovány kontinuálně
- Indukovatelné geny přepisovány jen za specifických podmínek (lac operon)
- Výsledný kódovaný produkt – protein (mRNA), RNA (tRNA, rRNA, snRNA, ribozym)
- Cistron (strukturní gen) - kódující oblasti genů pro proteiny nebo ne-translatované RNA
- Otevřený čtecí rámec (ORF) – úsek DNA kódující protein nepřerušovaný STOP kodónem



Transkripce

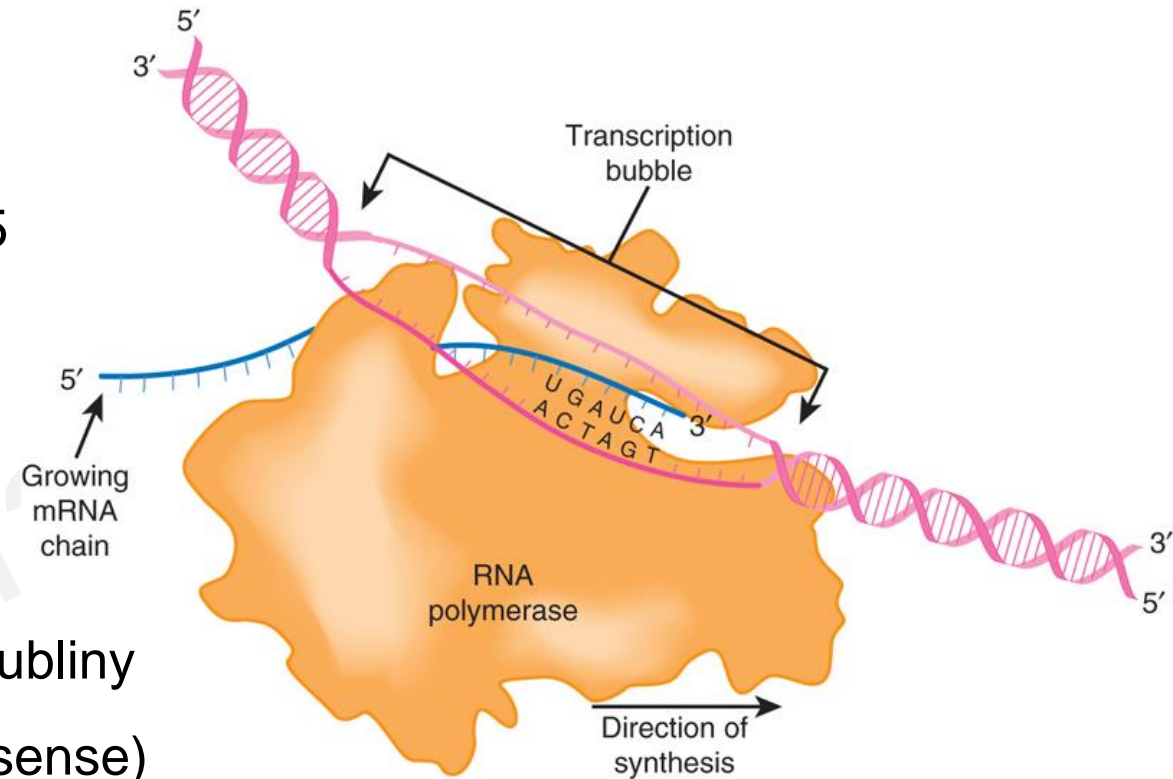
- Každý gen má před kódující sekvencí promotor
- Bakteriální promotory - oblast -10(TATAA) a -35(TTGACA)
- Konstitutivní geny – velká shoda
- Řízené geny – aktivační proteiny/transkripční faktory
- Transkripce:
 - Místo začátku transkripce
 - 5´netranslatovaná oblast (5´UTR) – vazba ribozómu
 - otevřený čtecí rámeček (ORF) – vlastní protein
 - 3´netranslatovaná oblast (3´UTR) – regulace míry translace



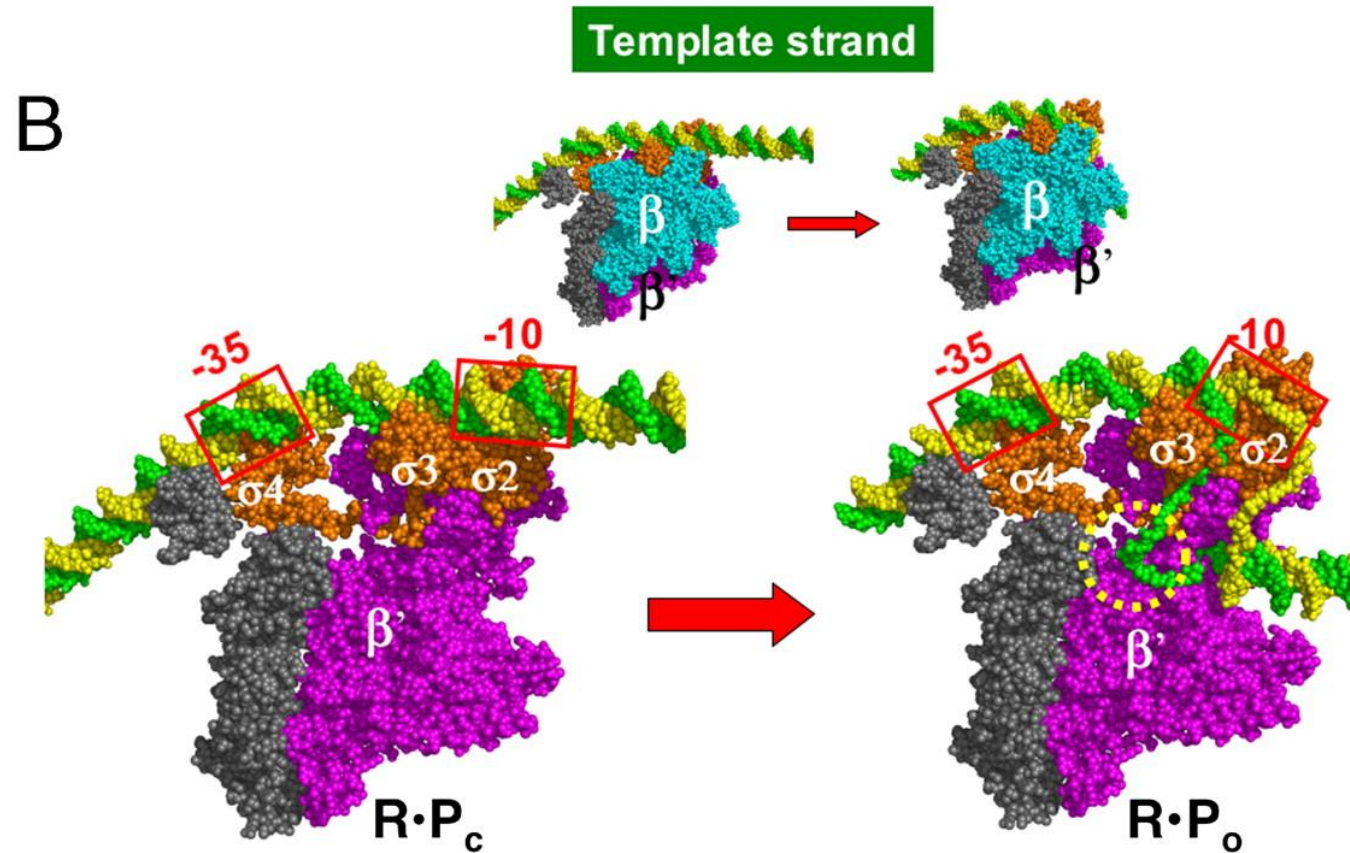
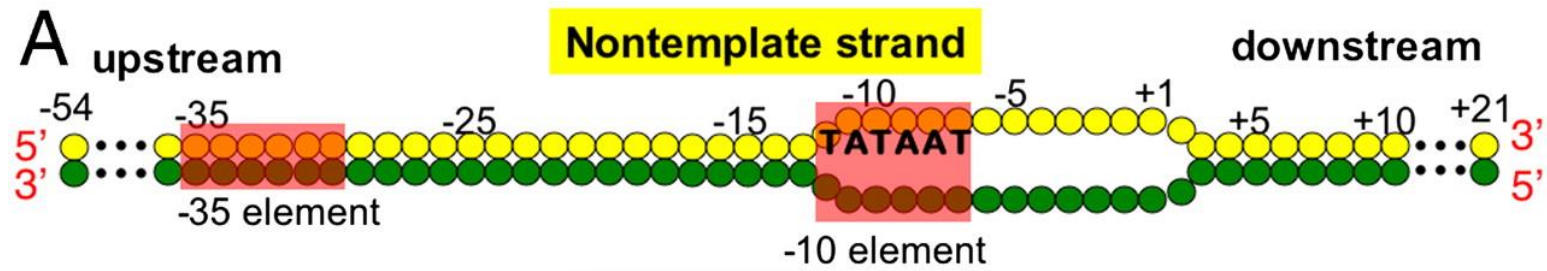
Clark and Pazdernik, 2016

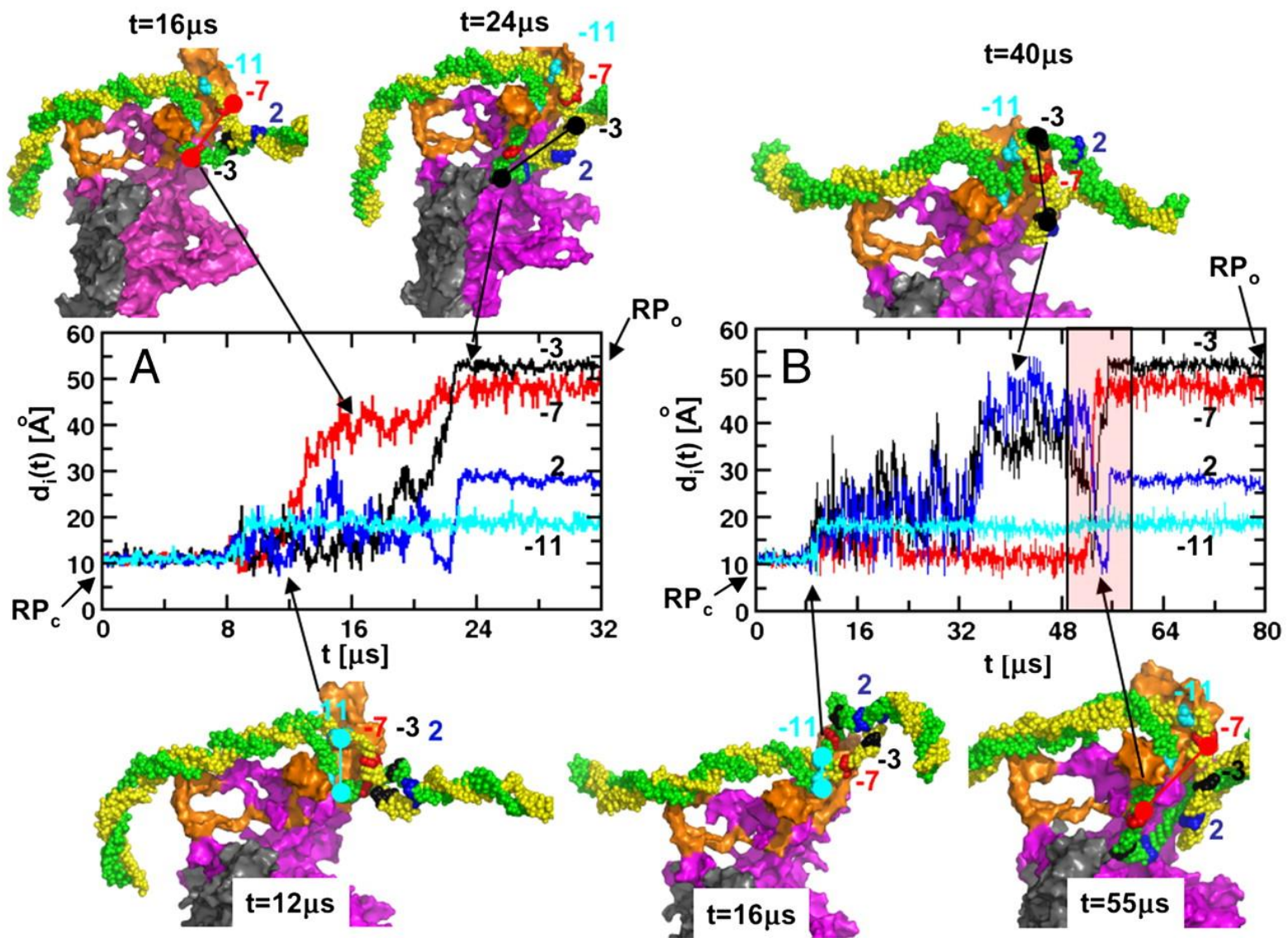
RNA polymeráza

- Složená s několika podjednotek
 - sigma podjednotka – rozpoznání oblasti -10 a -35
 - vlastní enzym katalyzující syntézu ($5' \rightarrow 3'$)
- Enzym má pět podjednotek ($2 \times \alpha$, β a β' , ω)
 - β a β' - vlastní katalytické místo
 - α podjednotky napomáhají rozpoznat promotor
- Po vazbě RNA polymerázy – tvorba transkripční bubliny
- RNA polymeráza používá nekódující řetězec (antisense)
- Sekvence RNA shodná s kódujícím řetězcem
- RNA syntéza začíná od purinu obklopeného pyrimidiny (CAT, CGT)
- Rychlost syntézy 40 bazí/sekundu



Clark and Pazdernik, 2016

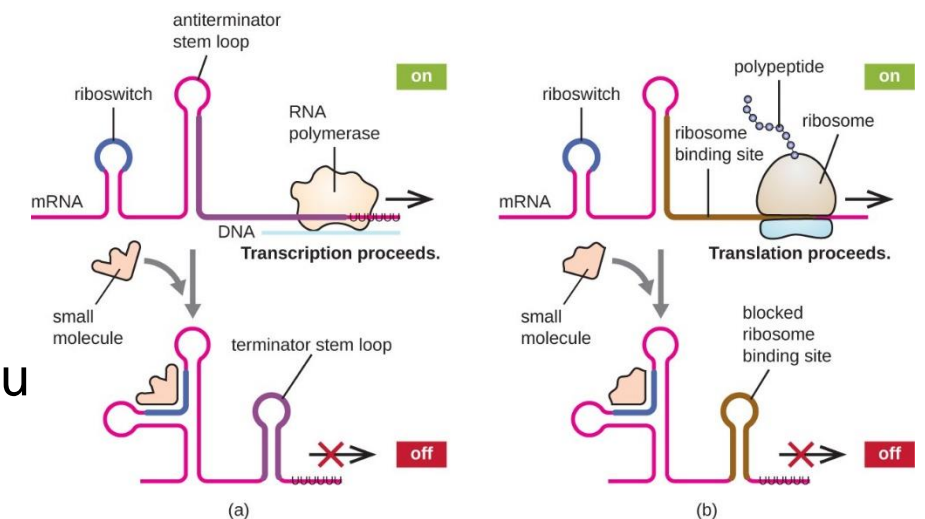
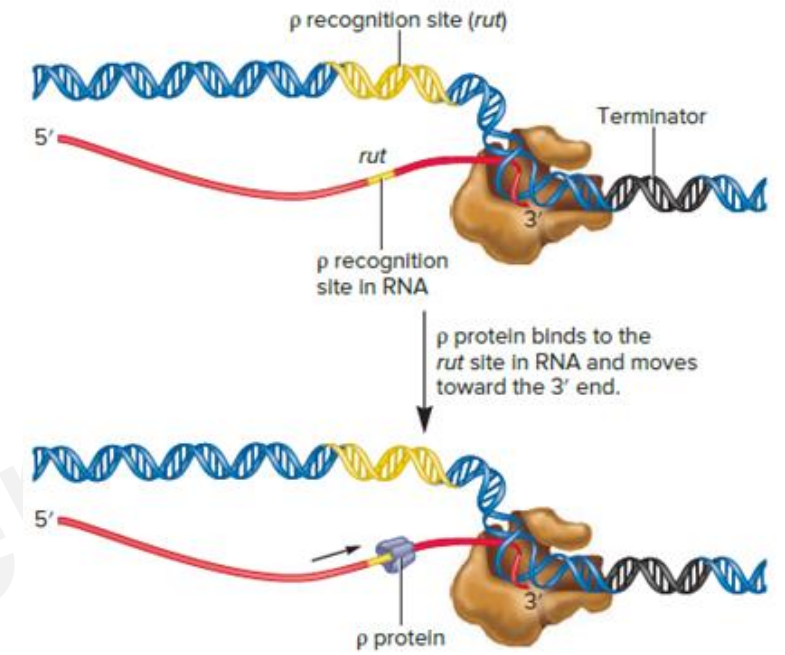




Jie Chen et al. PNAS 2010;107:28:12523-12528

Ukončení transkripce

- Transkripce je ukončena terminačním signálem
- Rho-nezávislý terminátor
 - typicky GC-bohatá vlásenka následovaná poly-T místem
 - RNA polymeráza většinou odpoutá v polovině poly-T sekvence
- Rho-závislý terminátor
 - obsahují dvě obrácené vlásenky
 - Rho je homohexamerní RNA závislá ATPáza
 - váže se na C-bohatou oblast před místem terminace
 - pohybuje se po RNA dokud nedostihne RNA polymerázu u vlásenky



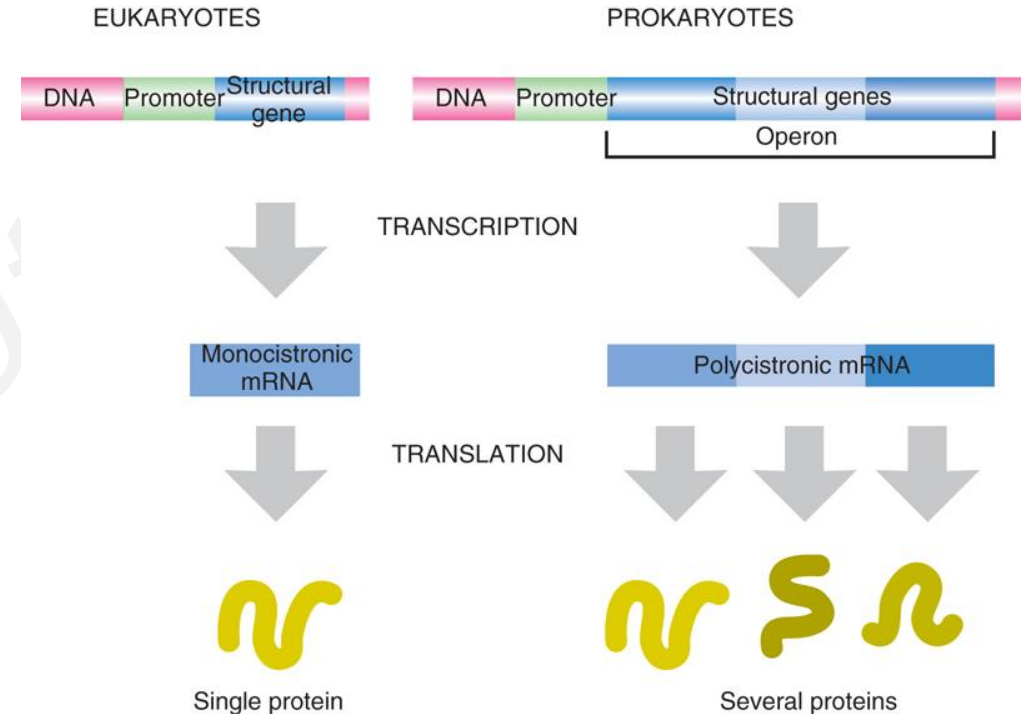
Organizace chromozómů

– Prokaryota

- vzdálenost mezi geny malá
- geny jedné metabolické dráhy vedle sebe (operon)
- polycistronní mRNA

– Eukaryota

- monocistronní mRNA
- u polycistronní se přepisuje pouze první cistron

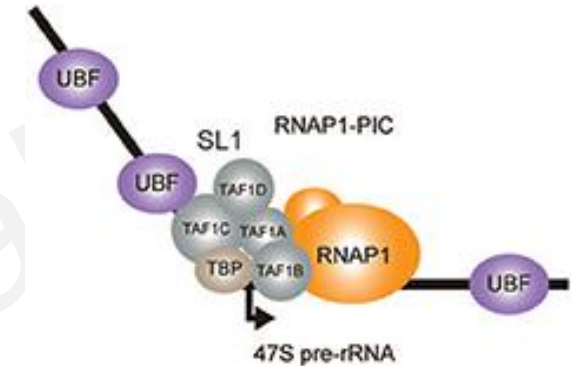


Clark and Pazdernik, 2016

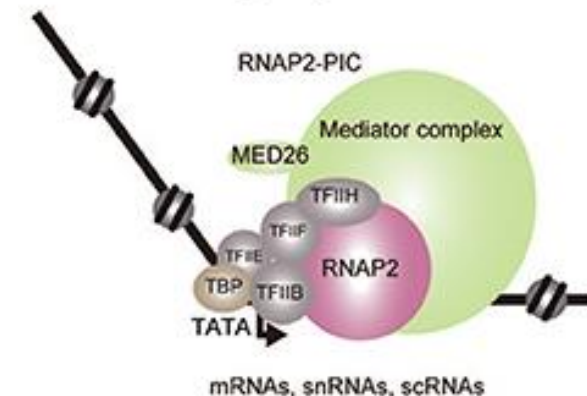
Transkripce u Eukaryot

- Účast tří RNA polymeráz:
 - RNA polymeráza I (transkripce velkých ribozomálních RNA)
 - RNA polymeráza II (transkripce genů kódujících proteiny)
 - RNA polymeráza III (transkripce tRNA, 5S rRNA, malé RNA)
- RNA pol. II potřebuje pro transkripci:
 - iniciační box, TATA box, elementy vázající transkripční faktory
 - základní transkripční faktory
 - specifické transkripční faktory
 - TATA box protein (TBP)

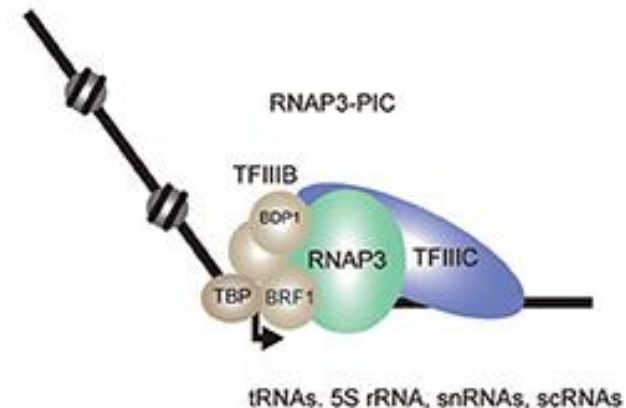
RNA Polymerase I



RNA polymerase II



RNA polymerase III

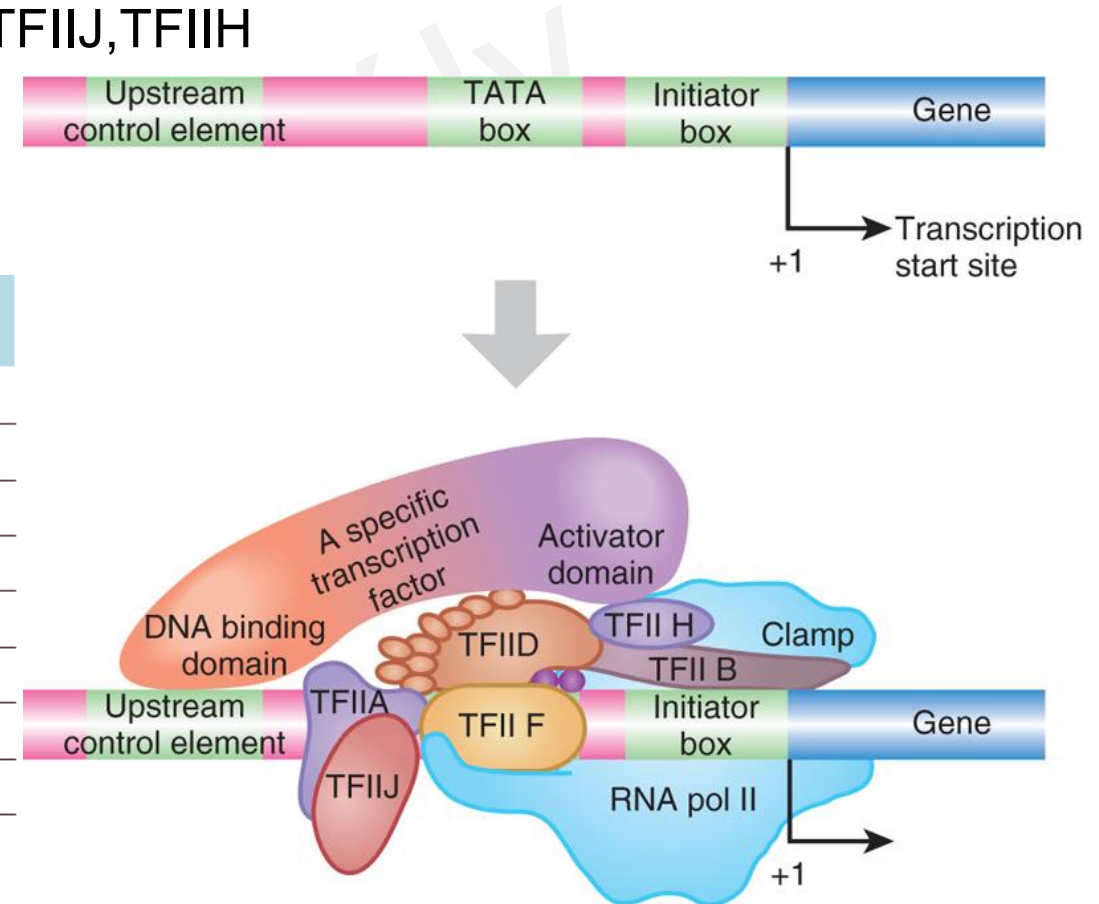


Aktivace RNA polymerázy II

- TFIID → TFIIB → RNA pol. II / TFIIA → TFIIF → TFII E, TFII J, TFII H
- TFII H fosforyluje RNA pol. II
- TFII H zůstává asociovaný s RNA polymerázou II

Table 2.1 General Transcription Factors for RNA Polymerase II

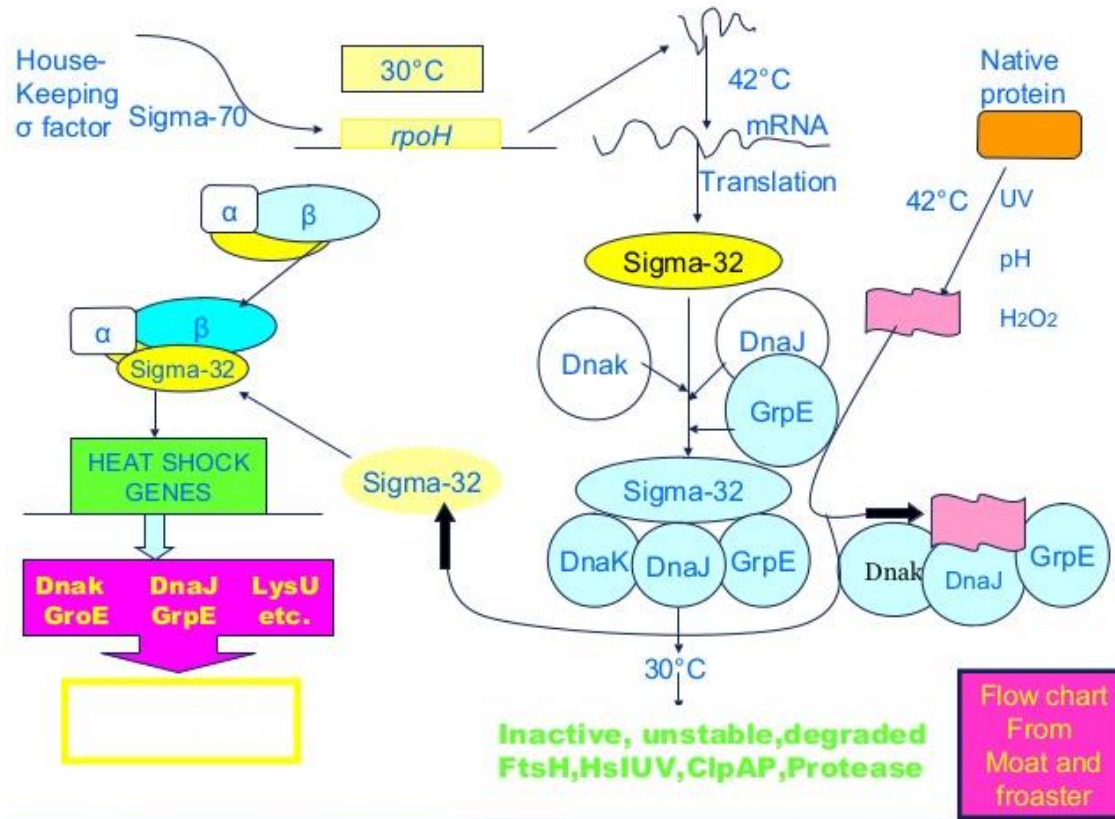
TBF	binds to TATA box, part of TFIID
TFIID	includes TBP, recognizes Pol II specific promoter
TFIIA	binds upstream of TATA box; required for binding of RNA Pol II to promoter
TFIIB	binds downstream of TATA box; required for binding of RNA Pol II to promoter
TFIIF	accompanies RNA Pol II as it binds to promoter
TFIIE	required for promoter clearance and elongation
TFIIH	phosphorylates the tail of RNA Pol II, retained by polymerase during elongation
TFIIJ	required for promoter clearance and elongation



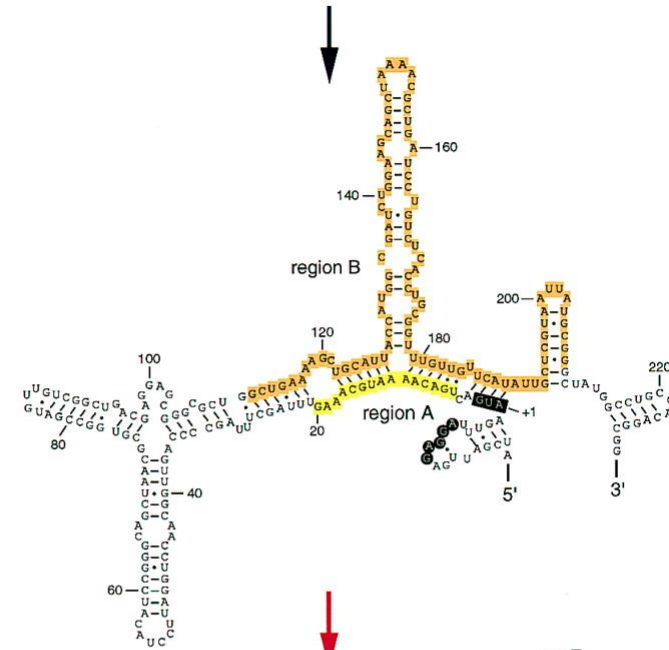
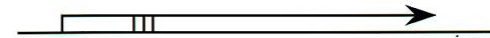
Regulace transkripce u prokaryot

- Zapojení aktivátorů a represorů transkripce
 - aktivátory – pozitivní regulace
 - represory – negativní regulace
- Vazba na promotorovou oblast DNA
- Blokace vazby RNA polymerázy nebo počátku transkripce
- Většina genů je kontrolována kombinací faktorů
- Regulační proteiny mohou zpomalovat elongaci nebo ji předčasně ukončit
- Anti-terminátorové proteiny obchází místo ukončení transkripce
- Klíčová role různých sigma (σ) podjednotek
 - σ^{70} (RpoD) – rozpoznává většinu house-keeping genů
 - σ^{32} (RpoH) – aktivace genů souvisejících s teplotním šokem (chaperoniny a proteázy)

Teplotní šok



transcription



translation



stability

σ^{32} protein

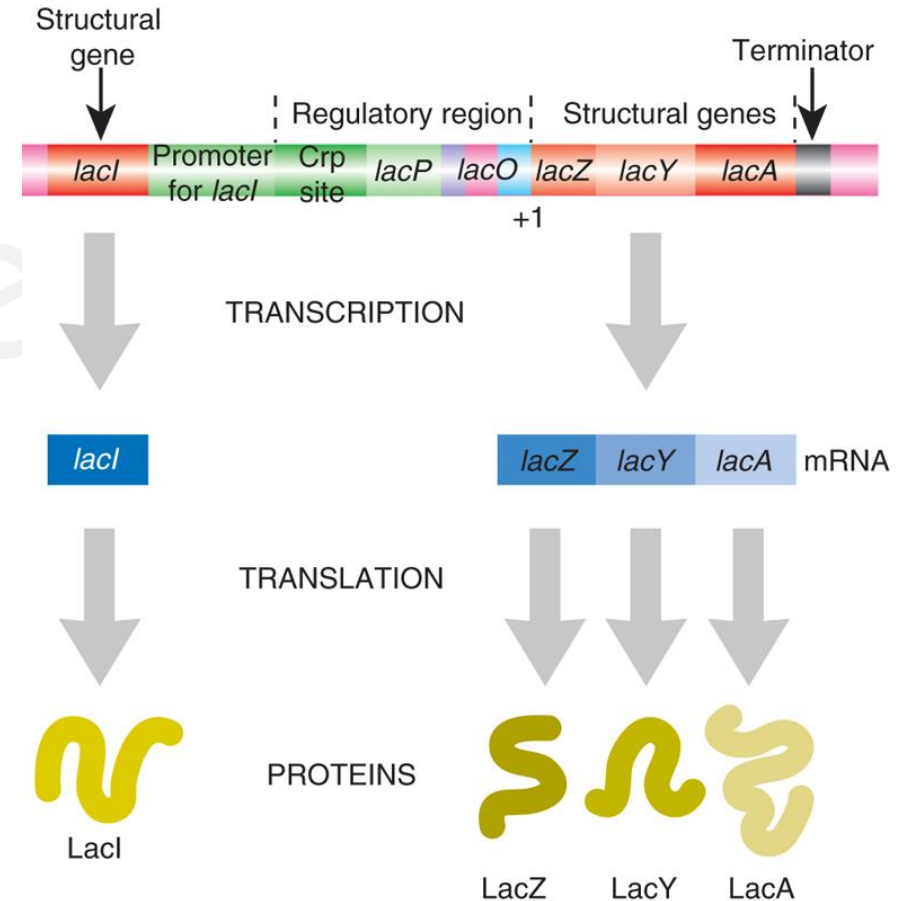
activity

σ^{32} + RNA polymerase

DnaK
DnaJ
GrpE
HflB

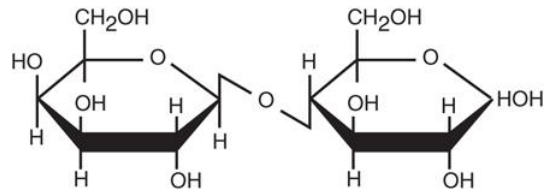
Laktóзовý operon

- Regulační proteiny transkripce existují v aktivní (vázející se) a inaktivní (nevázející se) formě
- Přeclod mezi jednotlivými formami vazbou signálních molekul nebo induktořů
- *lac* operon = polycistronní - *lacZ* (β -galaktozidáza), *lacY* (laktóza permeáza), *lacA* (laktóza acetyláza)
- *lacI* = represor *lac* operonu, kódován v opačném směru
- Promotor obsahuje *lacO* vazné místo (operátor) a Crp místo pro vazbu CRP proteinu (cAMP receptorový protein)
- V případě nedostatku glukózy a přítomnosti laktózy:
 - zvýšená hladina cAMP
 - tvorba alolaktózy (analog isopropyl-thiogalaktosid, IPTG) pomocí β -galaktozidázy

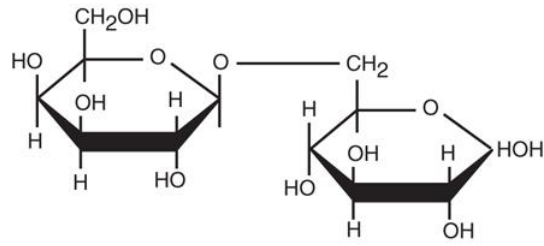


Clark and Pazdernik, 2016

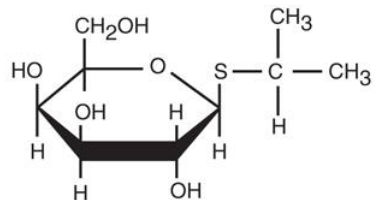
Laktóзовý operon



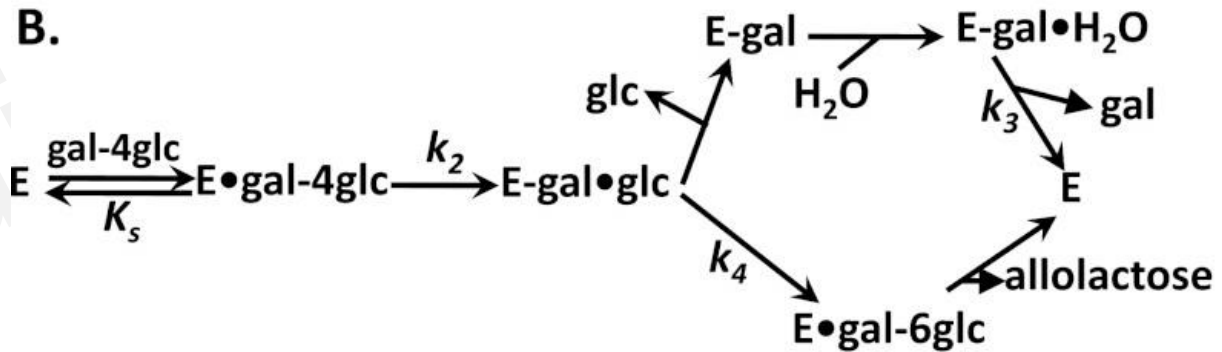
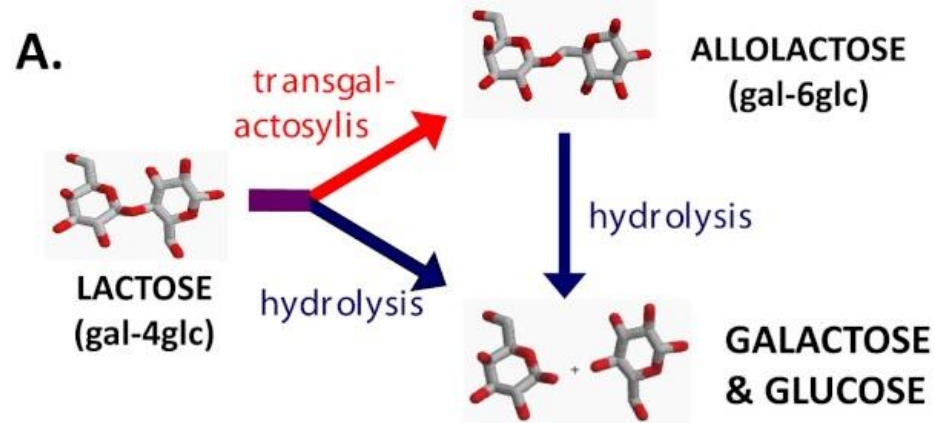
LACTOSE
(galactose & glucose)



ALLO-LACTOSE

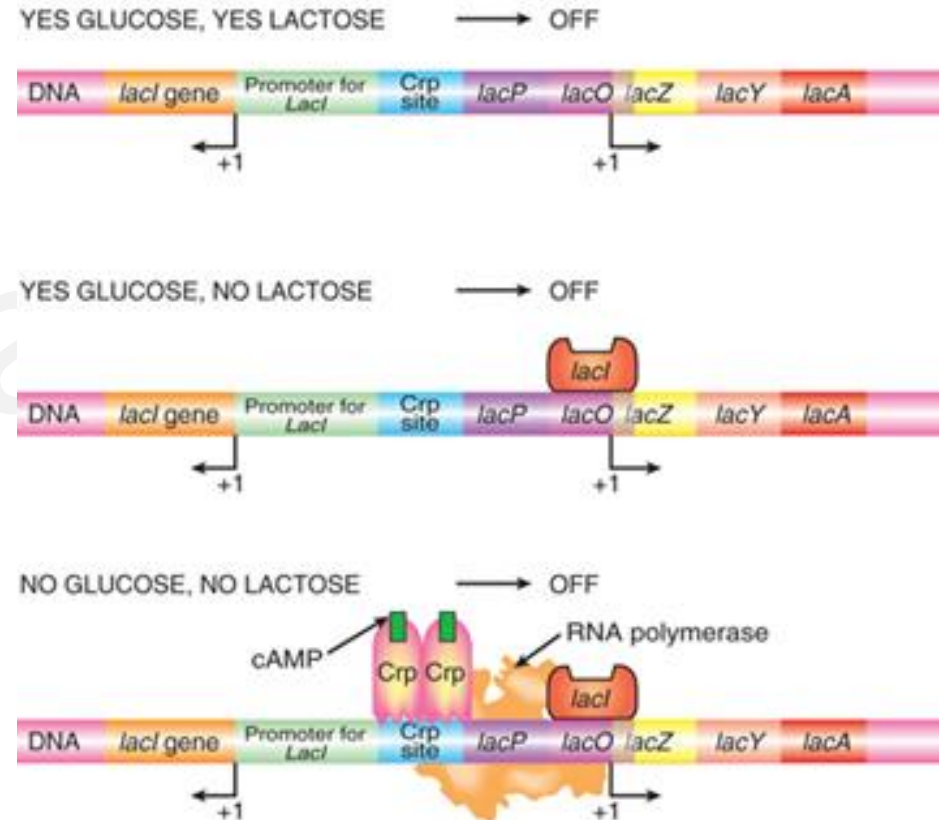
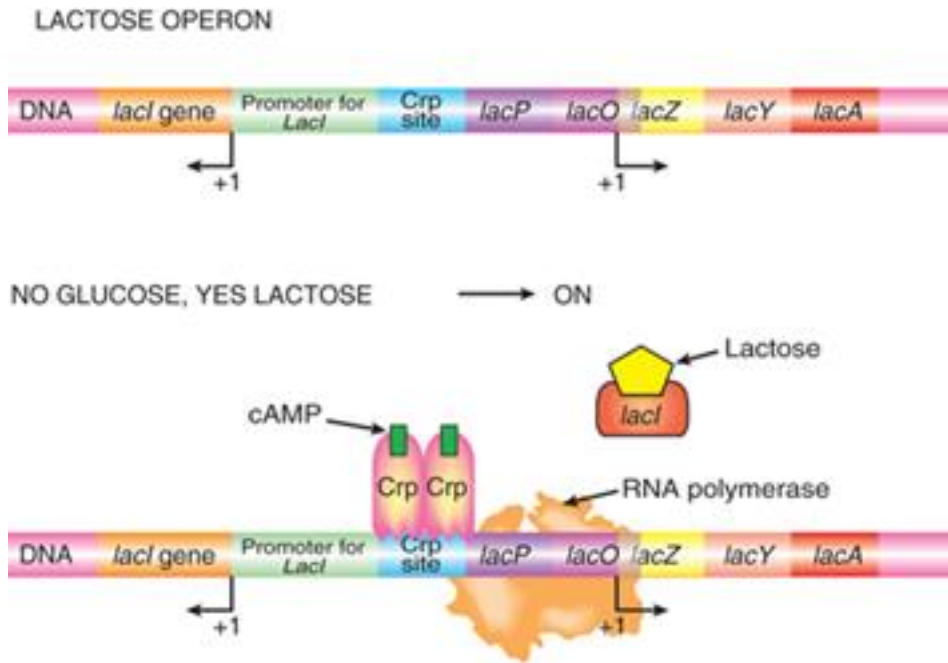


ISOPROPYL- β -D-THIOGALACTOSIDE
(IPTG)



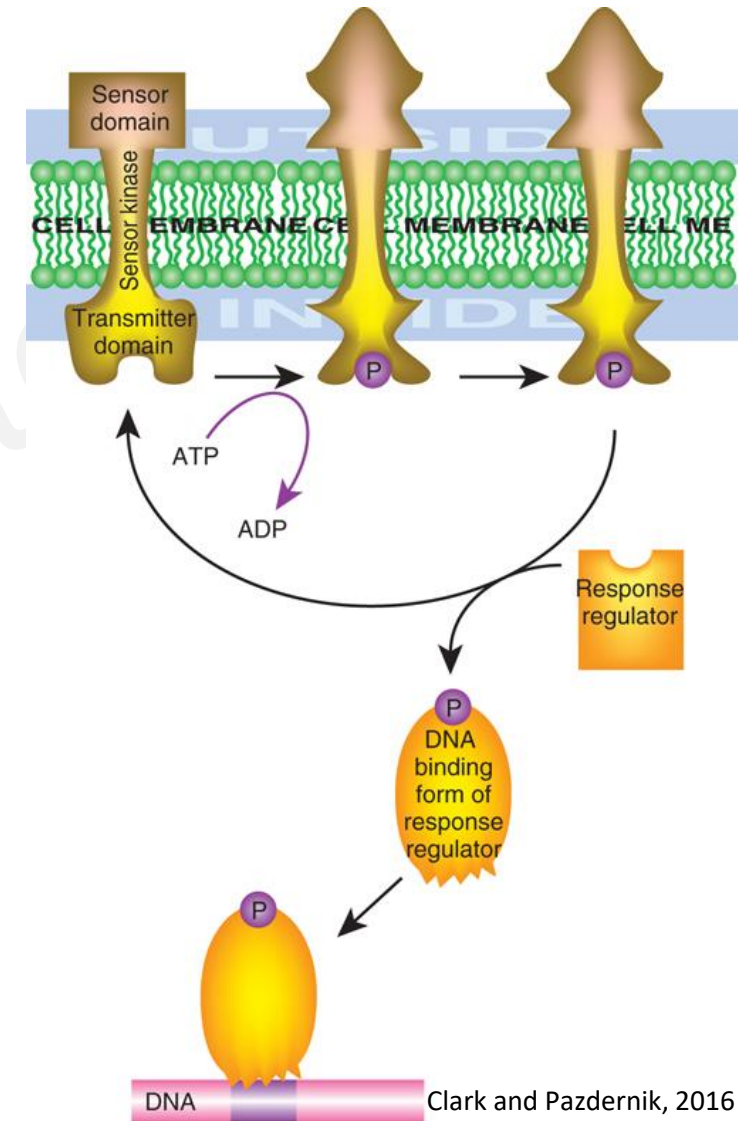
Wheatley et al., 2016

Laktóзовý operon



Dvou komponentní regulační systém

- Často dochází ke kovalentní modifikaci aktivátoru/represoru pomocí různých skupin (methyl, acetyl, AMP-/ADP-ribóza).
- V případě dvou komponentního regulačního systému dochází k přenosu fosfátu ze senzorné kinázy na aktivátor/represor (tzv. “phosphorelay system“)

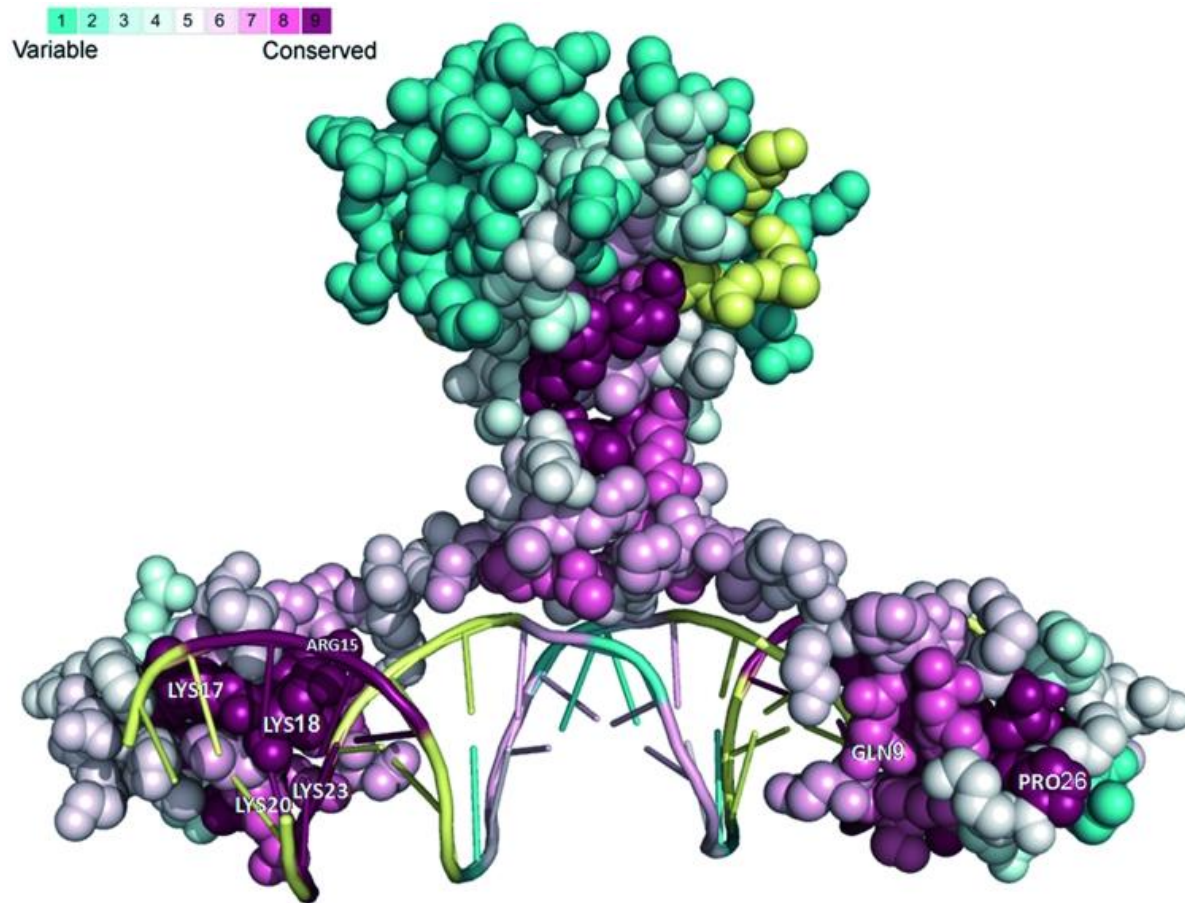


Regulace transkripce u eukaryot

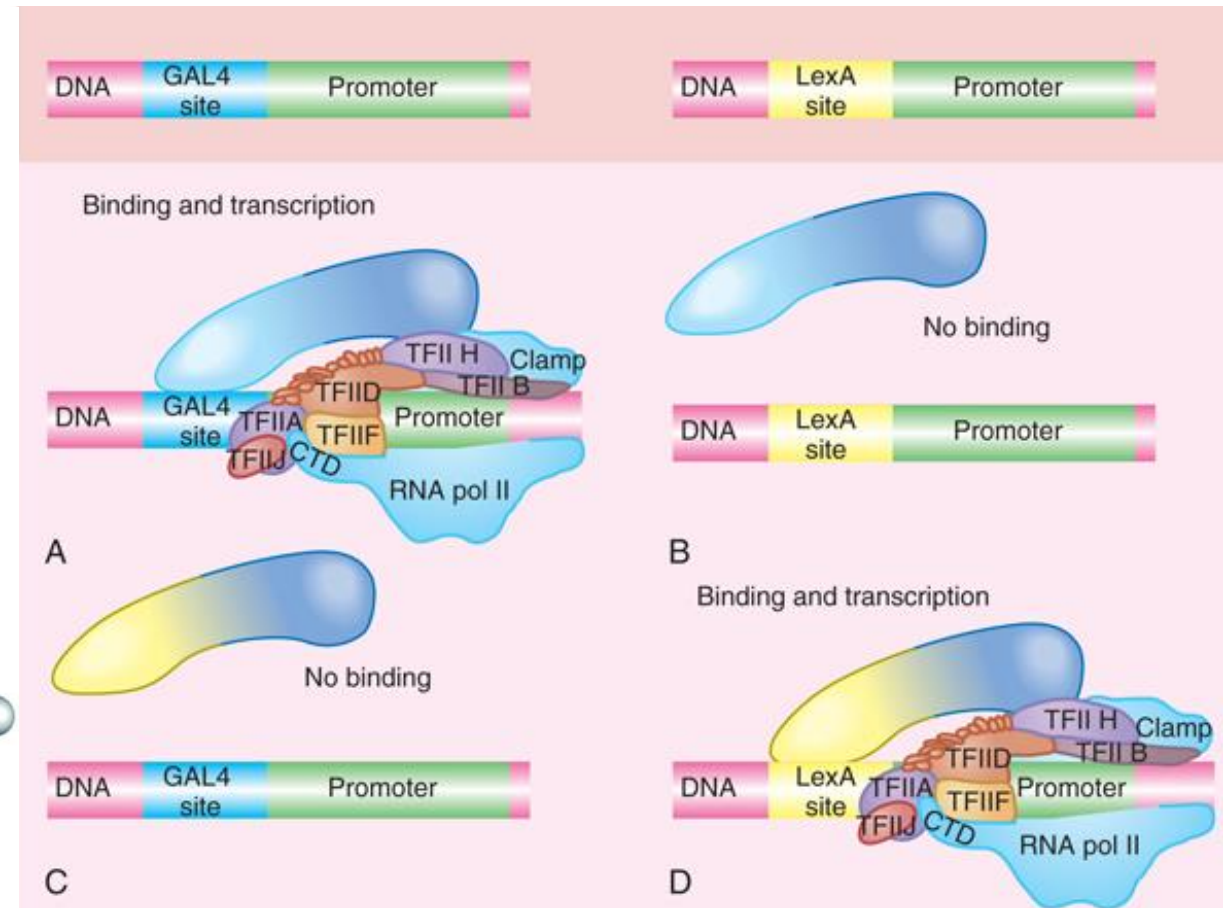
- Daleko více komplexní ve srovnání s prokaryoty
 - DNA je navinuta na histonech
 - jaderná membrána nepropouští většinu proteinů do jádra
 - velká role epigenetických modifikací (DNA, histony)
- Všechny transkripční faktory mají dvě vazné domény – DNA a transkripční aparát

Studijní materiály

Transkripční faktor GAL4



Ashkenazy et al, 2010

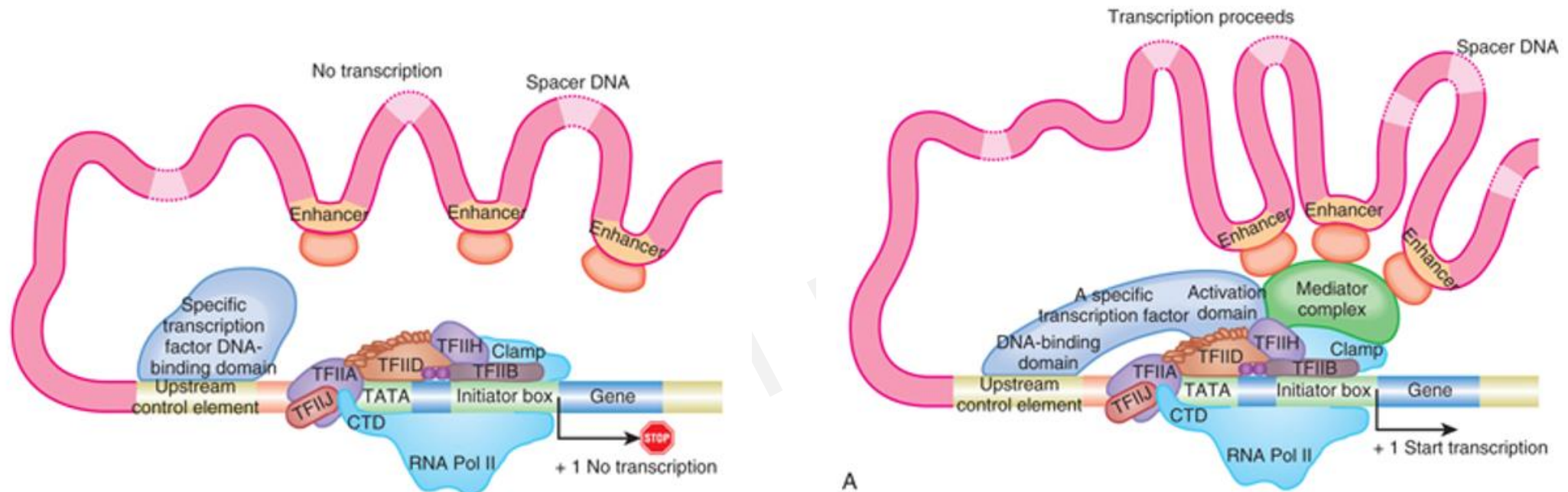


Clark and Pazdernik, 2016

Regulace transkripce u eukaryot

- Daleko více komplexní ve srovnání s prokaryoty
 - DNA je navinuta na histonech
 - jaderná membrána nepropouští většinu proteinů do jádra
 - velká role epigenetických modifikací (DNA, histony)
- Všechny transkripční faktory mají dvě vazné domény – DNA a transkripční aparát
- Transkripční faktory pracují skrze tzv. mediátorový komplex
- Mediátorový komplex:
 - přenáší signál z aktivačních proteinů na RNA polymerázu II
 - obsahuje 26 rozdílných podjednotek tvořících jádro
 - je přímo asociovaný s RNA polymerázou II, kde čeká na informaci
- Transkripční faktory se mohou vázat také na tzv. zesilovače transkripce

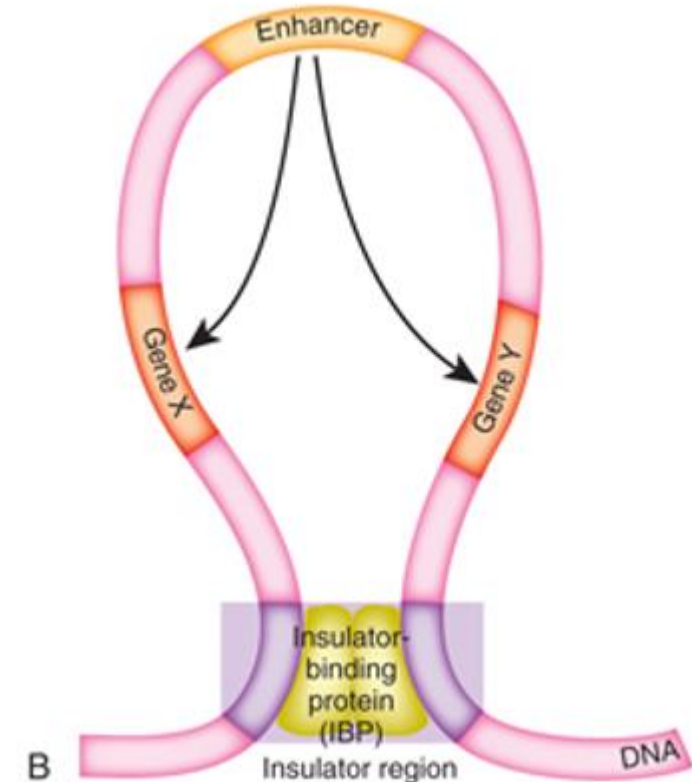
Regulace transkripce u eukaryot



Clark and Pazdernik, 2016

Izolátory (Insulators)

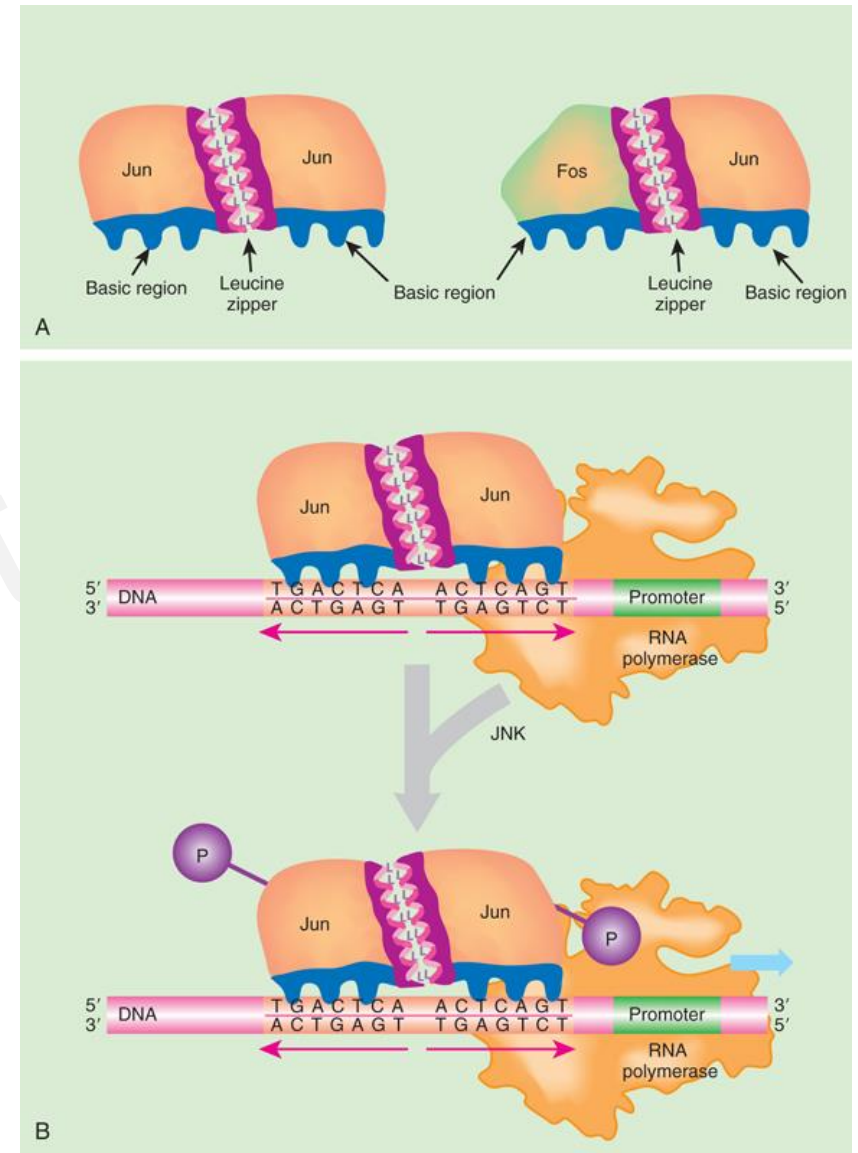
- DNA sekvence zabráňující zesilovačům transkripce chybně aktivovat geny
- Jsou umístěny mezi zesilovač a geny, které nesmí regulovat
- Insulator binding protein (IBP) se váže na tyto sekvence a blokuje zesilovače transkripce
- IBP se nemůže vázat na metylovanou DNA



Clark and Pazdernik, 2016

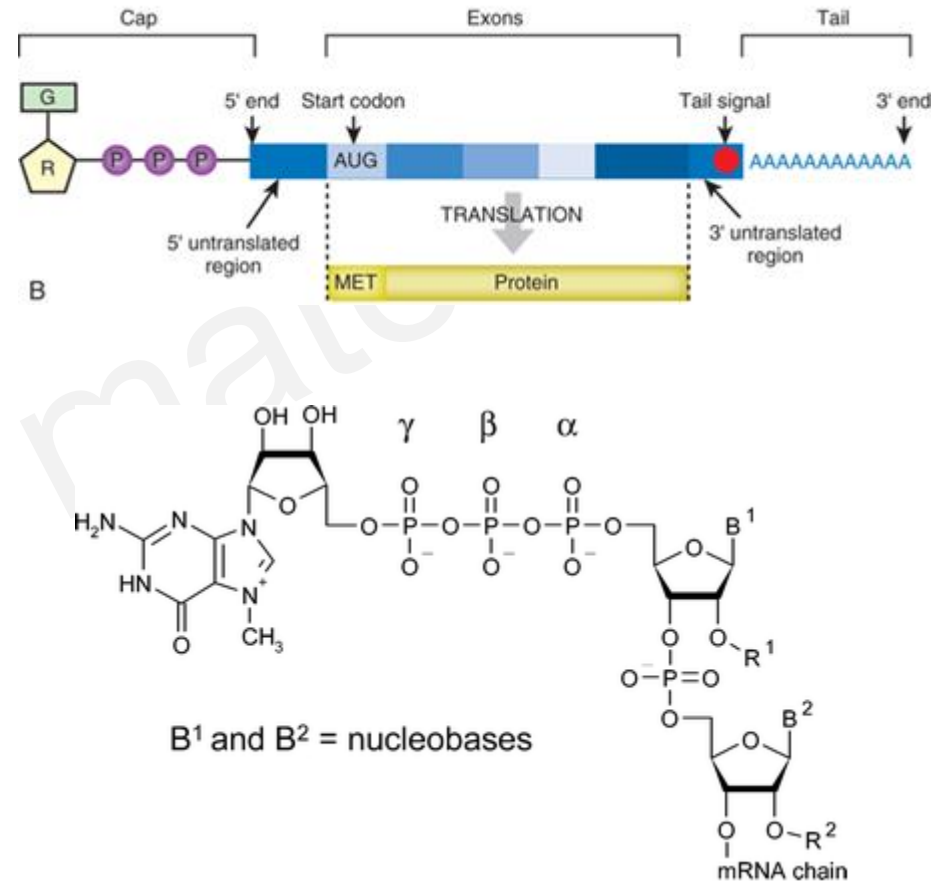
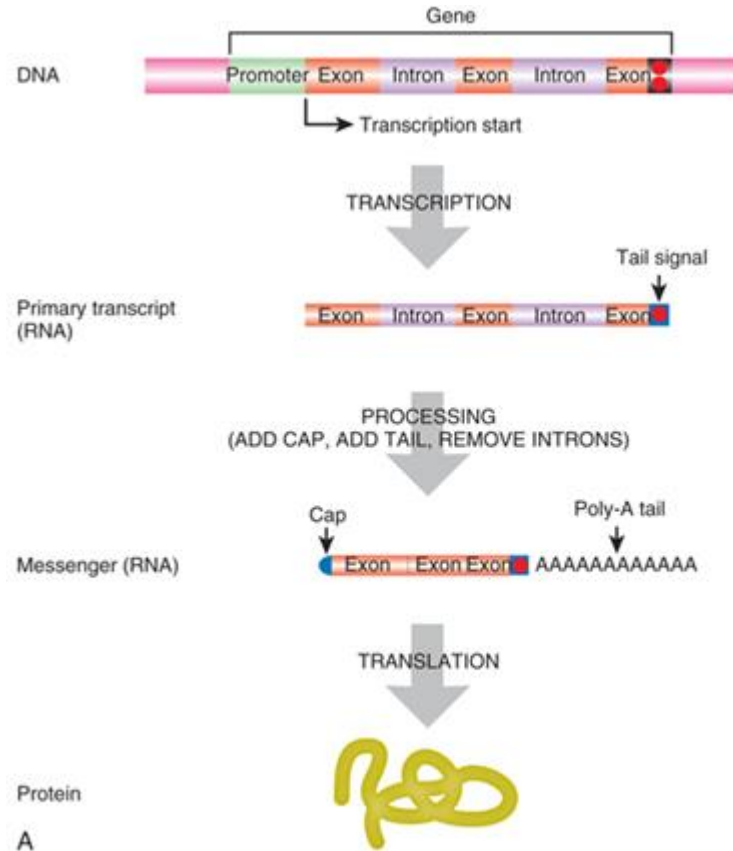
AP-1 (aktivator protein-1)

- Aktivuje široké spektrum genů
- Nejlepší stimulatory AP-1 zahrnují růstové faktory a UV záření
- Dimer dvou proteinů z Fos a Jun rodiny
- Patří do rodiny bZIP DNA vazných proteinů
- Stimulace AP
 - zvýšená exprese Fos a Jun proteinů
 - zvýšená stabilita Fos a Jun proteinů
 - fosforylace aktivační domény pomocí JNK (Jun aminoterminální kináza)



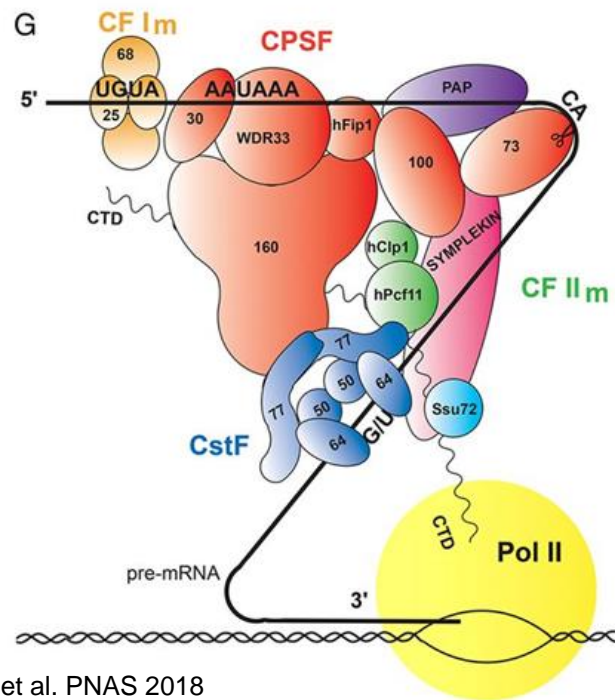
Clark and Pazdernik, 2016

Zpracování eukaryotické mRNA

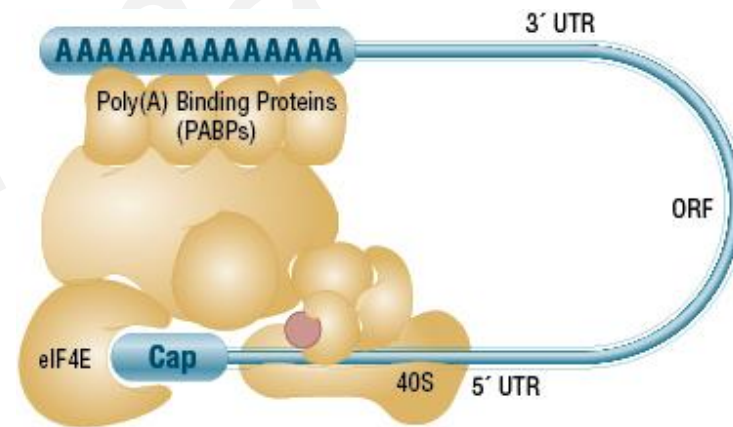


Zpracování eukaryotické mRNA

- dochází k přidání čepičky na 5' konec mRNA (m7GTP)
- dochází k přidání polyA konce na 3' konec pomocí poly-adenylačního komplexu

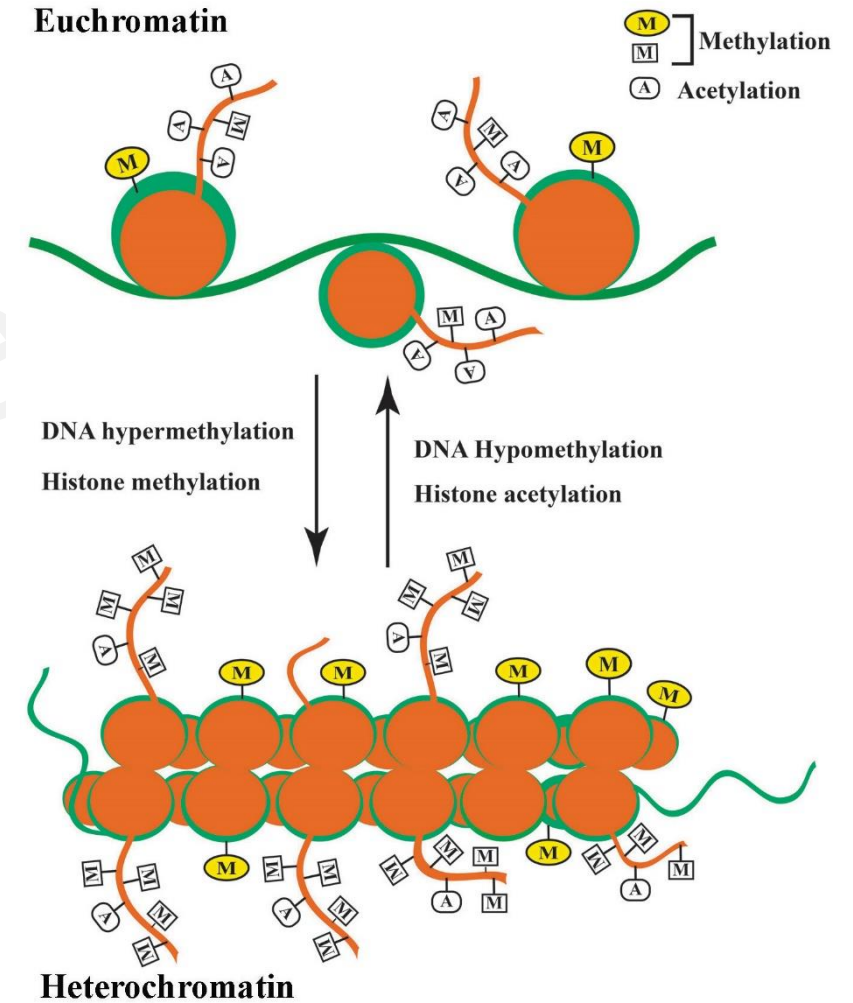


Yadong Sun et al. PNAS 2018



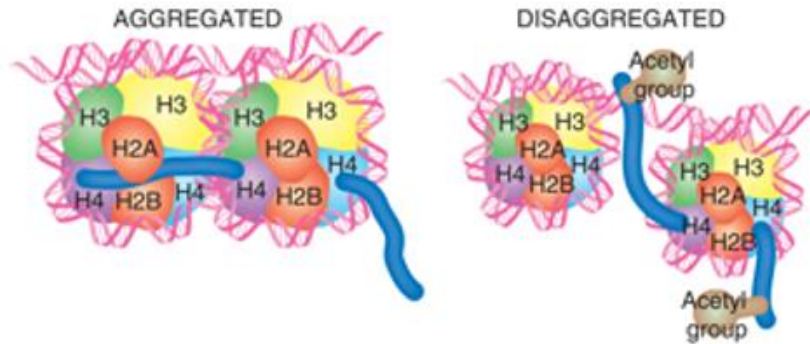
Epigenetika

- Jakákoliv jiná změna v rámci DNA, než v nukleotidové sekvenci
 - A) post-translační modifikace histonů
 - B) metylace DNA
 - C) remodelace nukleozomu
 - D) umlčení zprostředkované RNA
- Většina epigenetických změn ovlivňuje přístup regulačních proteinů k DNA
 - rozvolněný chromatin (euchromatin) - snadný přístup regulačních proteinů
 - kondenzovaný chromatin (heterochromatin) – znemožněn přístup regulačních proteinů

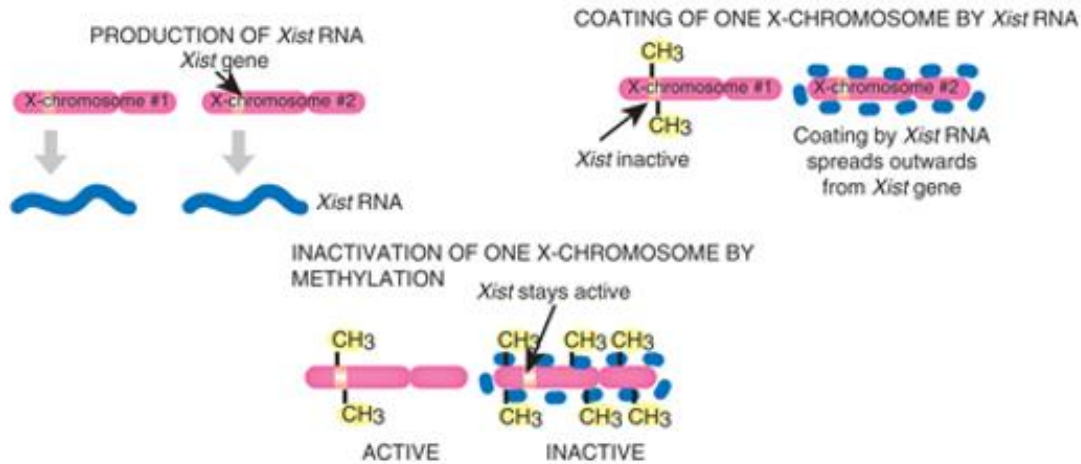


Epigenetika

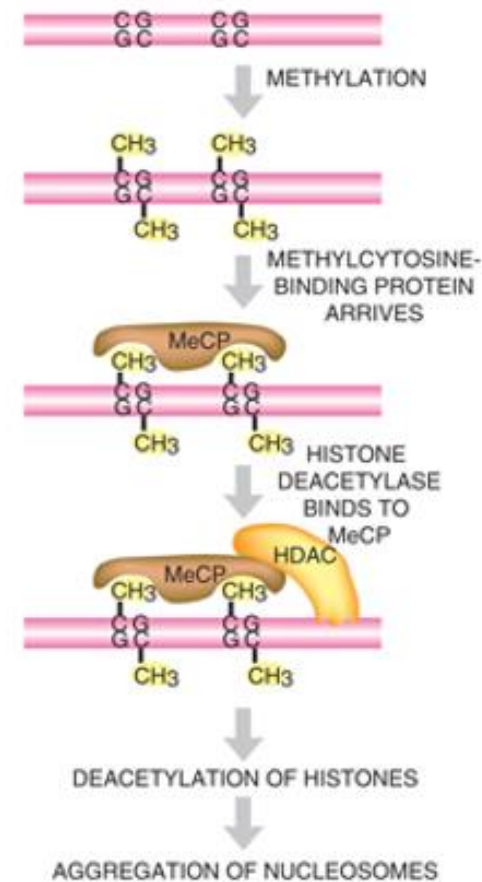
A POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF HISTONES



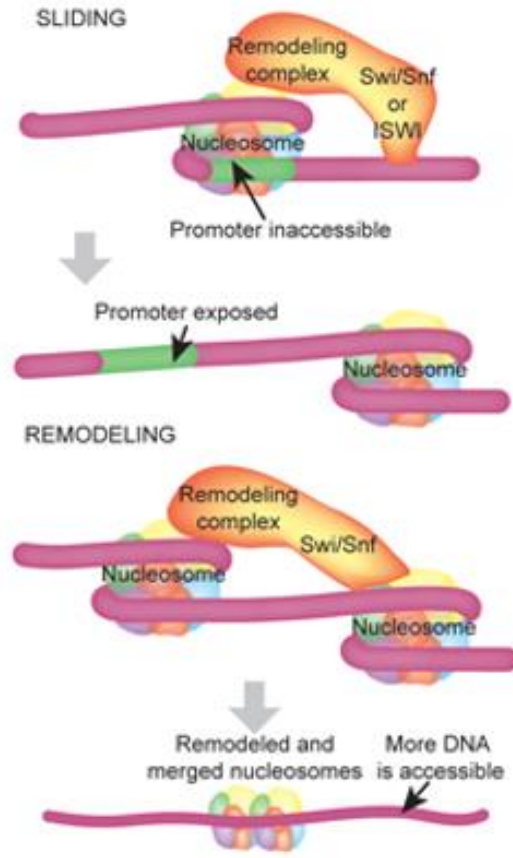
D X-INACTIVATION BY NONCODING RNA



B DNA METHYLATION

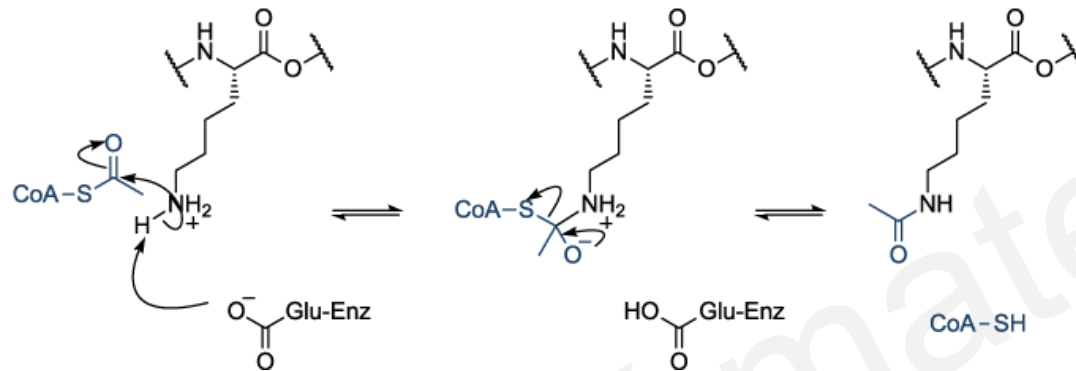


C NUCLEOSOME REMODELING

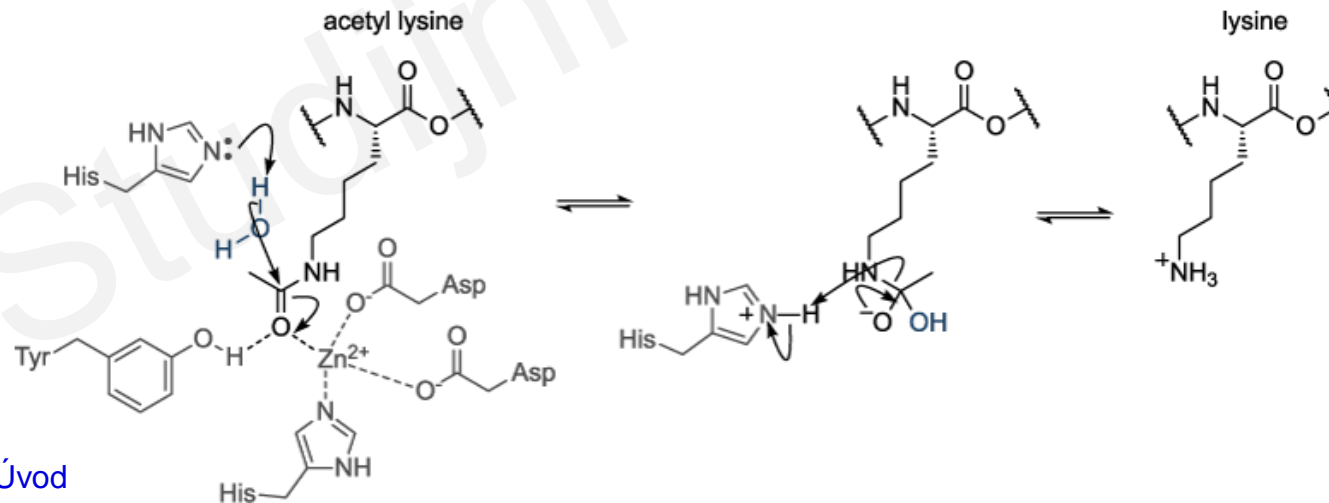


Acetylace histonů

- Histon-acetyltransferázy (HATs) – přenos acetylů na Lys zbytky na koncích histonů

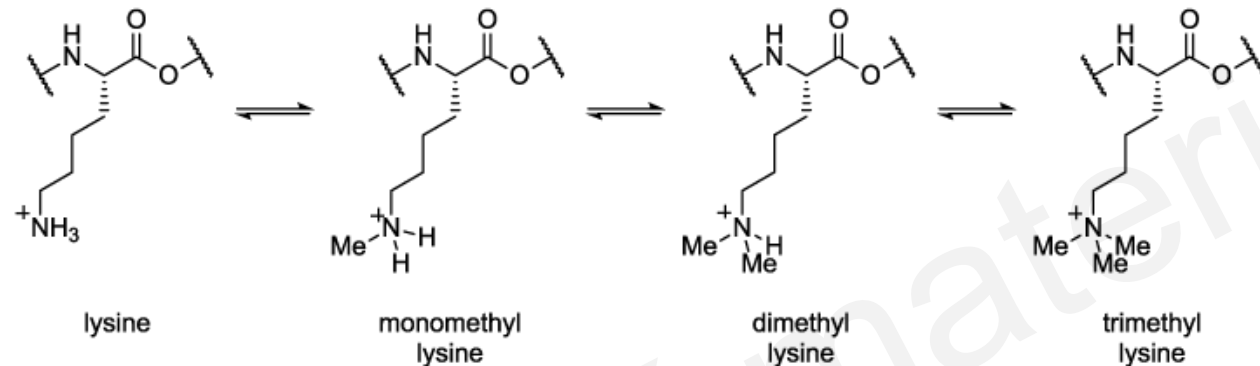


- Histon-deacetylázy (HDACs) – odstranění acetylů z Lys zbytků

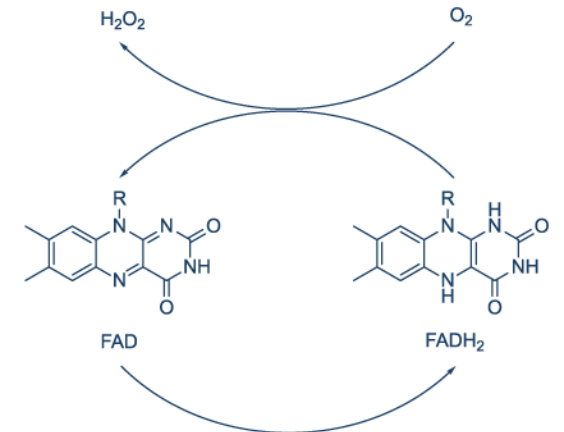
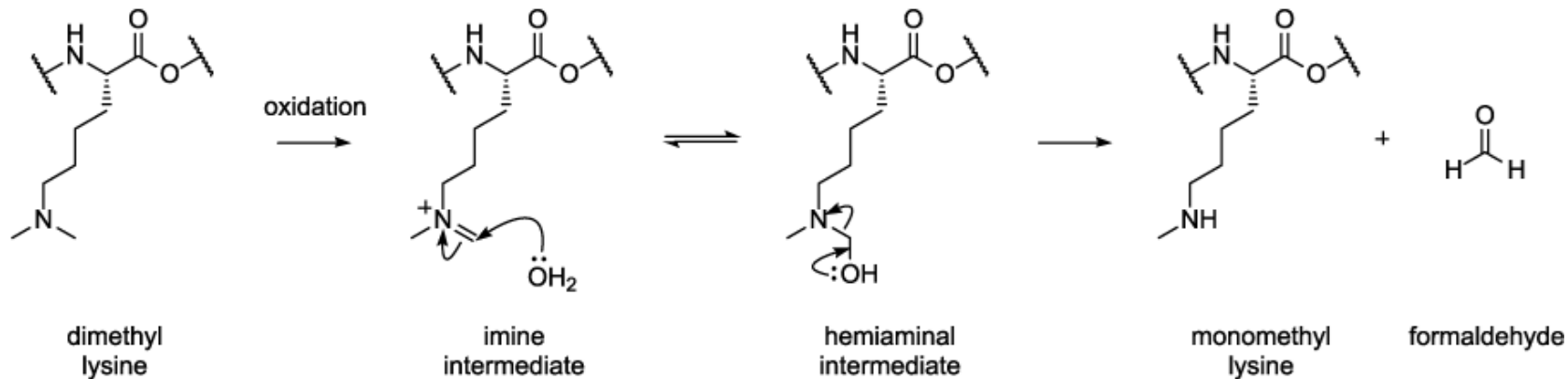


Metylace histonů

- Lysin-metyltransferázy (KMTs) – přenos methylové skupiny na Lys zbytky na koncích histonů



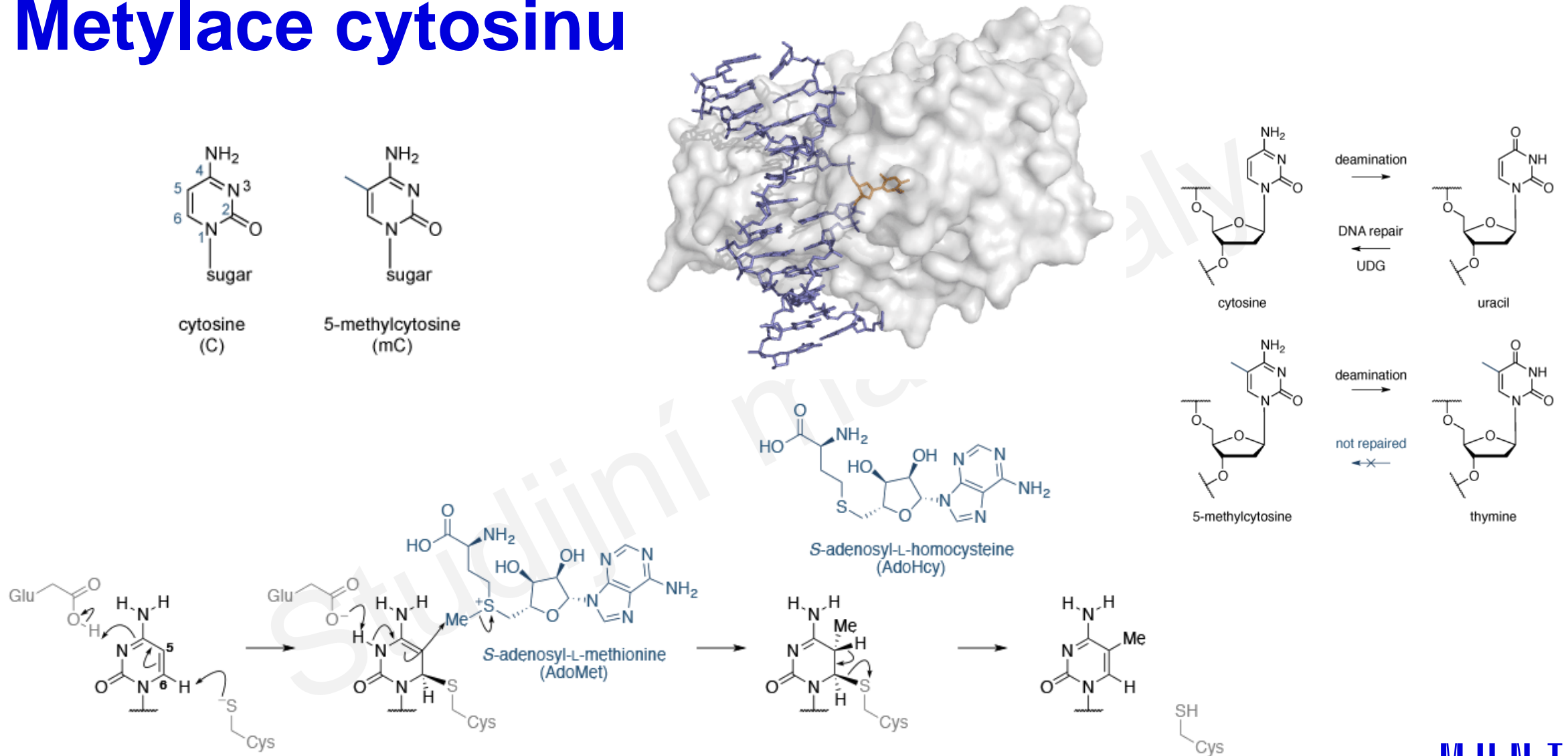
- Lysin-demetylázy (KDMs) – odstranění methylové skupiny z Lys zbytků



Metylace DNA

- U prokaryot metylace odlišuje nově syntetizované vlákno od templátu.
- U eukaryot metylace umlčuje různé geny a brání jejich expresi.
- Metylace se objevuje v motivech CpG nebo CpNpG
 - udržovací metylázy – metylace nově syntetizovaného vlákna DNA
 - de novo metylázy – nově přidávané metylace do DNA
 - demethylázy – odstranění nechtěných metylací z DNA
- Celá řada genů v blízkosti tzv. CpG ostrůvků
- Při metylacích rozsáhlých úseků na DNA CpG ostrůvky váží metylcytosin vázající proteiny, které zároveň aktivují histondeacetylázy = tvorba heterochromatinu

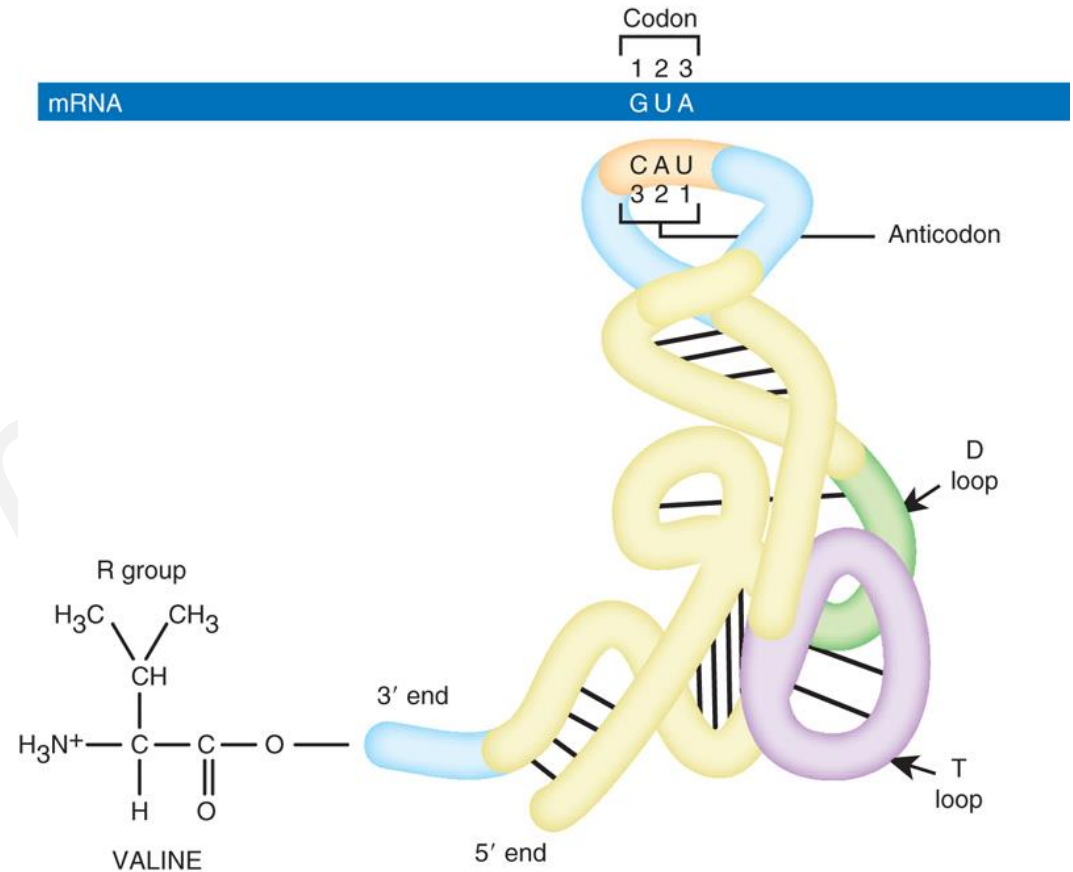
Metylace cytosinu



Proces translace

- Přenos informace v mRNA do konkrétního proteinu
- Každá aminokyselina je v mRNA kódována v rámci tří bazí nazývaných triplety/kodony
- Jednotlivé kodony v rámci mRNA rozpoznávají molekuly transferové RNA (tRNA)
- Aminokyseliny jsou připojovány k příslušným tRNA pomocí enzymů aminoacyl-tRNA syntetáz

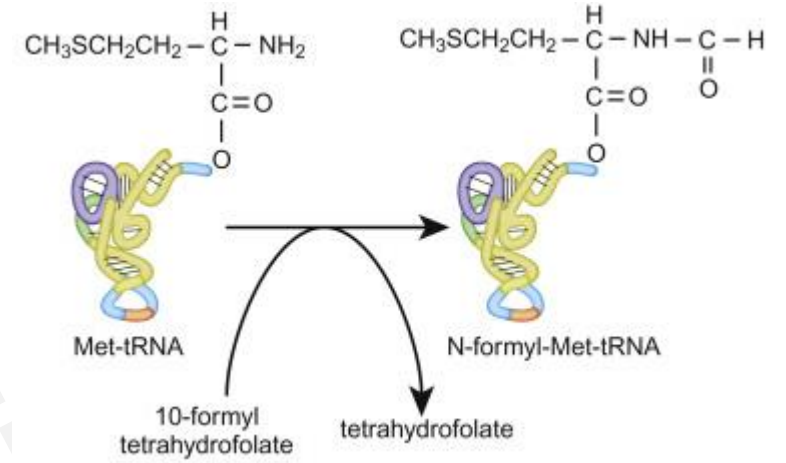
	2nd (middle) base				
1st base	U	C	A	G	3rd base
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA stop UAG stop	UGU Cys UGC Cys UGA stop UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G



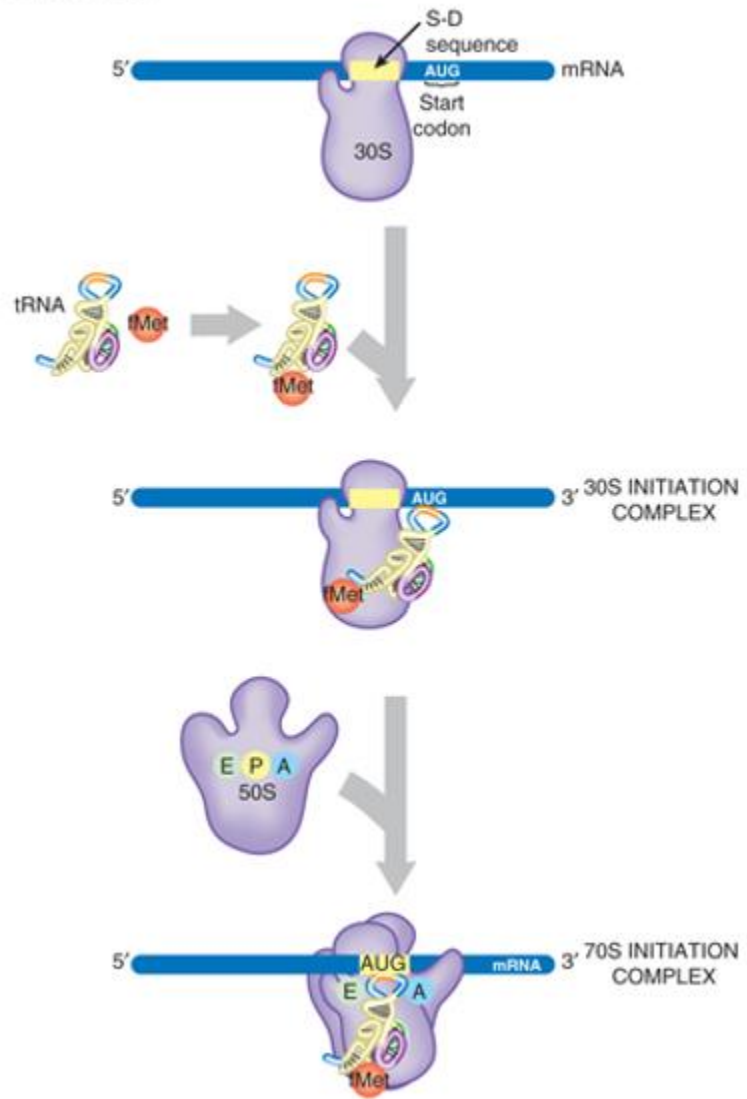
Clark and Pazdernik, 2016

Syntéza proteinů u prokaryot

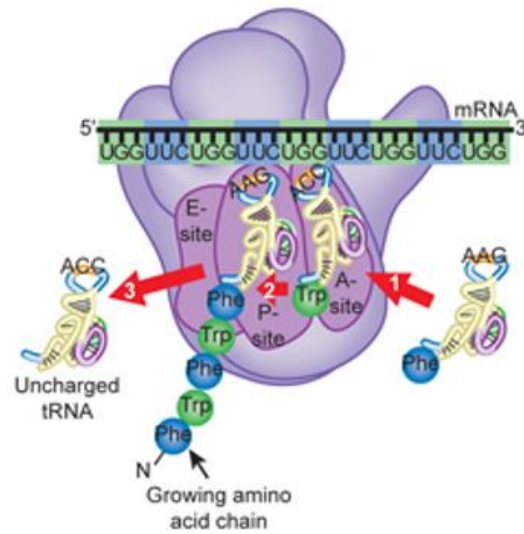
- Probíhá v ribozomech
 - 30S (16S rRNA + 21 proteinů)
 - 50S (5S, 23S rRNA + 34 proteinů)
- Velká podjednotka = tři vazná místa – A (akceptor), P (peptide) a E (exit)
- Translace začíná na AUG kodónu po Shine-Dalgarno sekvenci (UAAGGAGG)
- Translace je iniciována derivátem Met (N-formyl-methionin) navázaný na 30S podjednotku
- Iniciační faktory – složení 30S iniciačního komplexu
- $tRNA_{i}^{fmet}$ se váže do P-místa ribozomu, A-místo obsazuje daná tRNA, peptidyl-transferázová aktivita 23S rRNA katalyzuje tvorbu peptidové vazby
- Přidávání dalších AK v rámci elongace vyžaduje elongační faktory, stop kodón váže RFs
- Několik ribozomů se většinou váže na mRNA za tvorby polyzomu



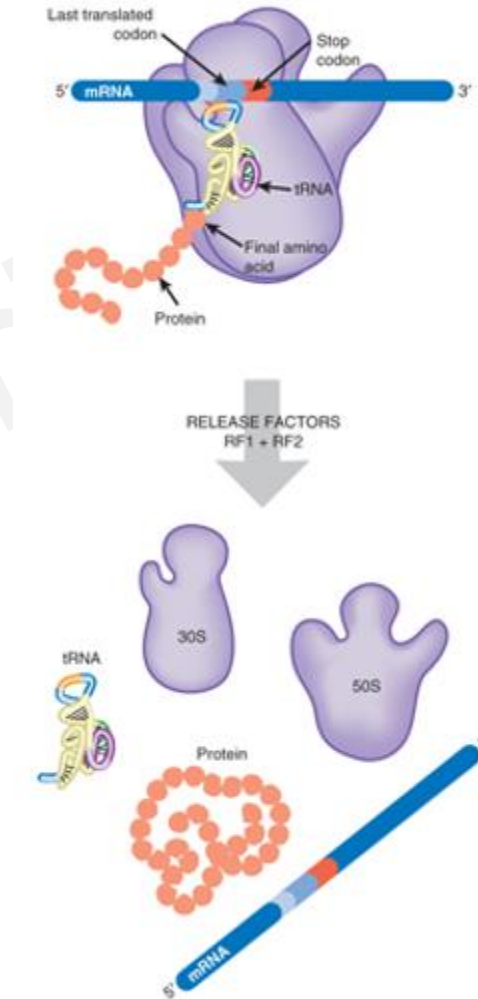
A. INITIATION



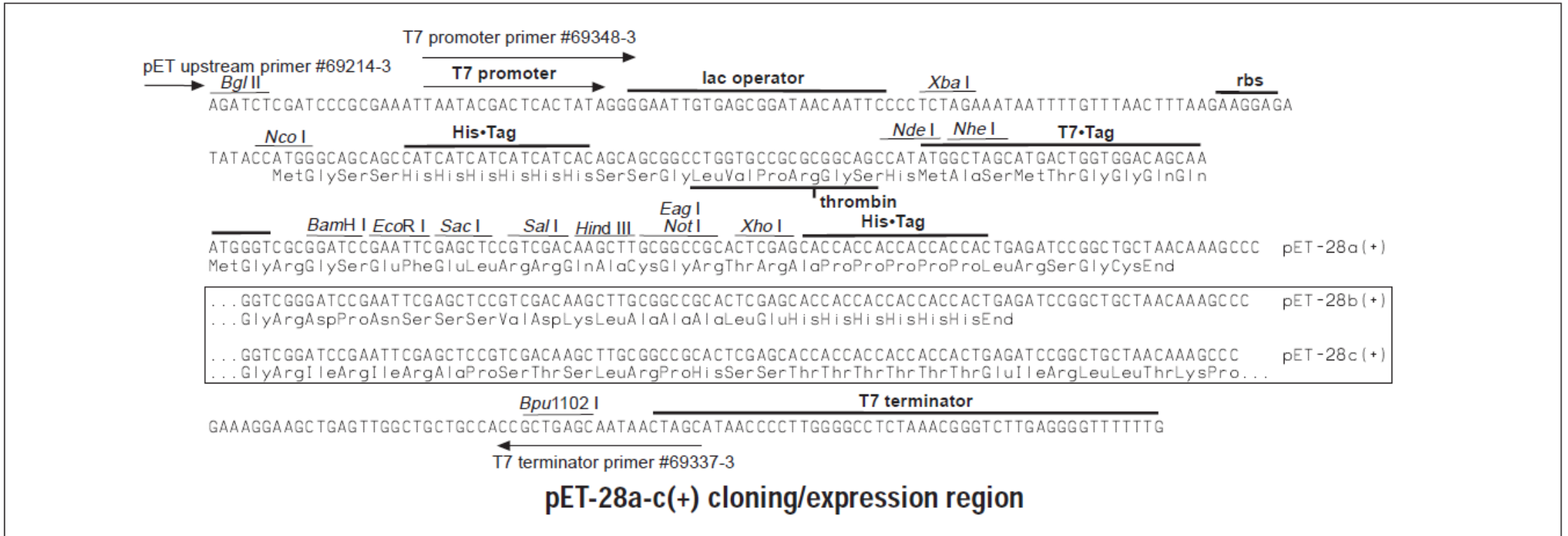
B. ELONGATION



C. TERMINATION

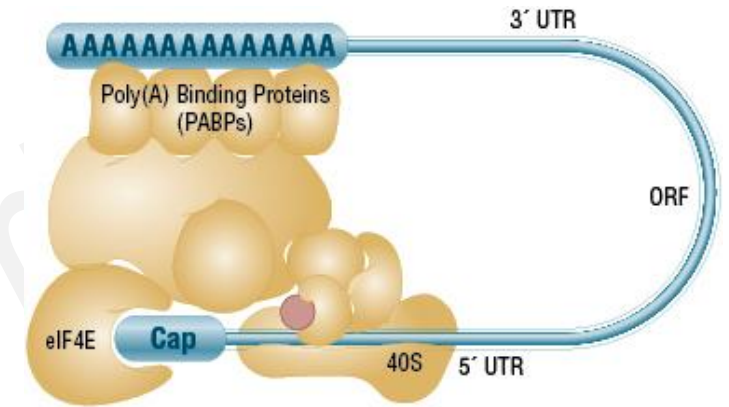


pET28 vektor



Syntéza proteinů u eukaryot

- Translace probíhá v cytoplasmě (drsné ER)
- Nedochozí ke spojení procesu transkripce a translace
- Probíhá v ribozomech
 - 40S (18S rRNA + 32 proteinů)
 - 60S (5S, 5.8S a 28S rRNA + 47 proteinů)
- mRNA neobsahuje Shine-Dalgarno sekvenci, rozpoznání čepičky a Kozak sekvence
- První aminokyselina je Met bez modifikace
- Celá řada eukaryotických proteinů je následně ještě post-translačně modifikována



Syntéza proteinů u eukaryot

