

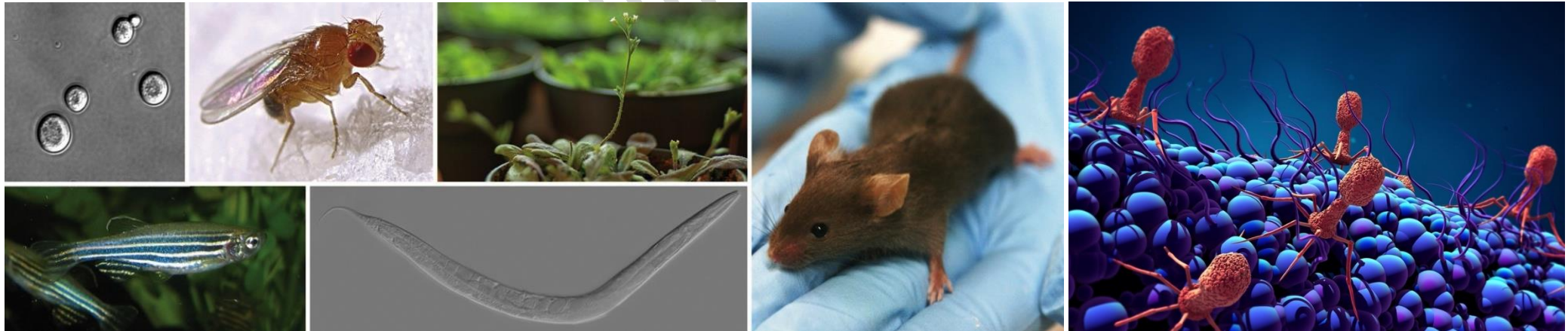
# GENOVÉ TECHNOLOGIE

## Modelové organismy:

Modelové organismy využívané v biotechnologii – bakterie (*E. coli*), kvasinky (*Pichia*, *Saccharomyces*) a houby (*Penicillium*), *Caenorhabditis elegans* (hádátka), *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* (Dánio pruhované), myš domácí, živočišné buněčné kultury, *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní), viry (bakteriofágy, retroviry).

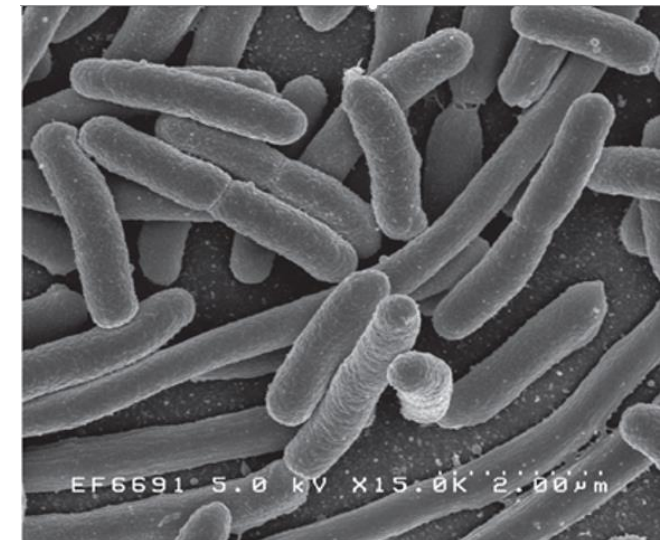
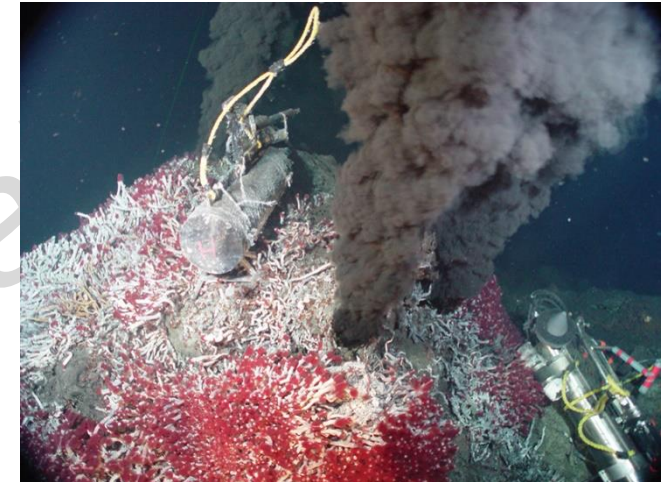
# Modelové organismy

- DNA se nachází ve všech živých organismech a virech
- Detailně je zkoumán pouze zlomek tzv. modelových organismů
- U modelových organismů dnes známe kompletní genom
- Modelové organismy využíváme:
  - jako model pro studium podobných organismů
  - v celé řadě biotechnologických procesů



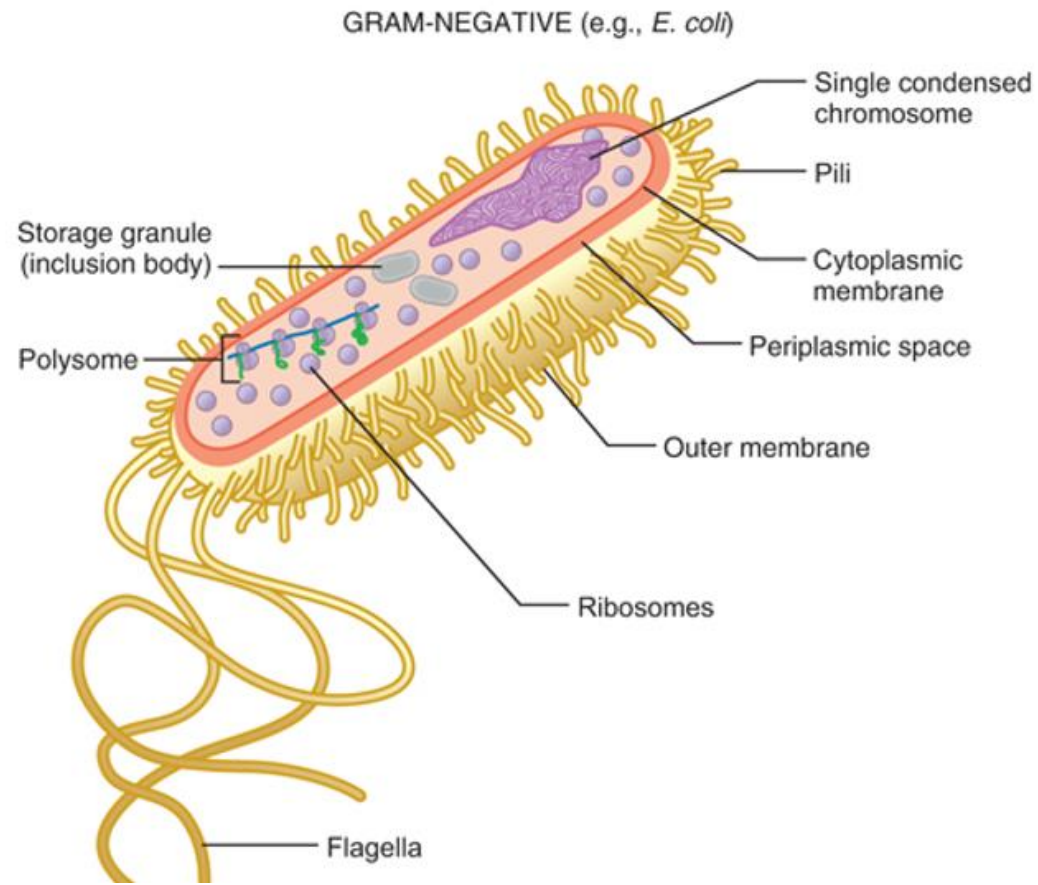
# Bakterie

- Tahoun modelových organismů
- Tvoří cca. 50% všech živých organismů ( $5 \times 10^{30}$ )
- Schopnost přežití v extrémních podmínkách –teplota (*Thermus aquaticus*), pH (*Acidothiobacillus*)
- Nejčastěji využívaná je *Escherichia coli*:
  - gram-negativní tyčka
  - na povrchu má cca. 10 flagel a tisíce pili
  - většina kmenů je neškodná
  - *E. coli* O157:H7 – dva toxiny zodpovědné za krvavé průjmy



Clark and Pazdernik, 2016

# Bakterie

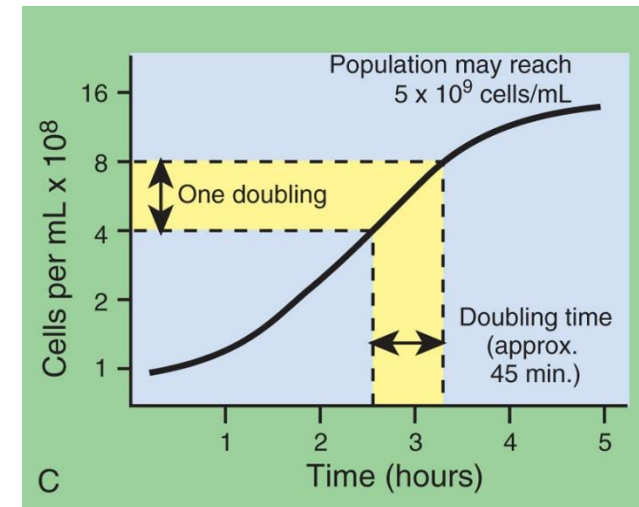
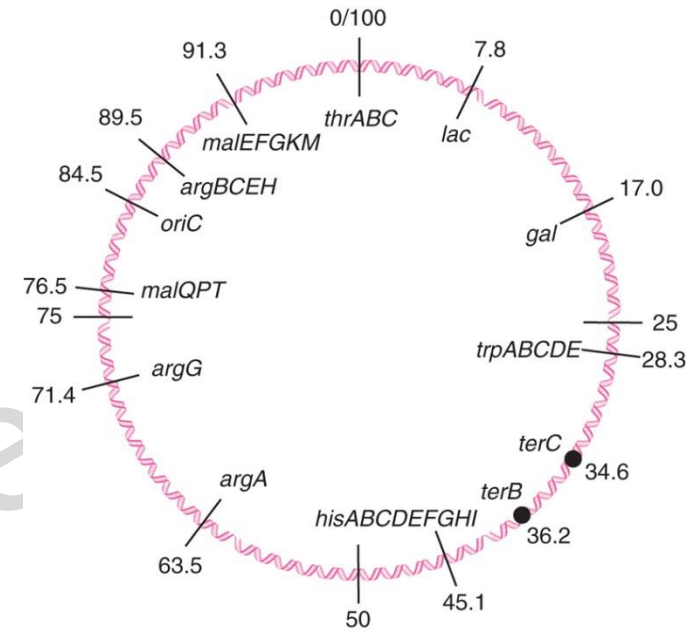


Clark and Pazdernik, 2016



# *E. coli*

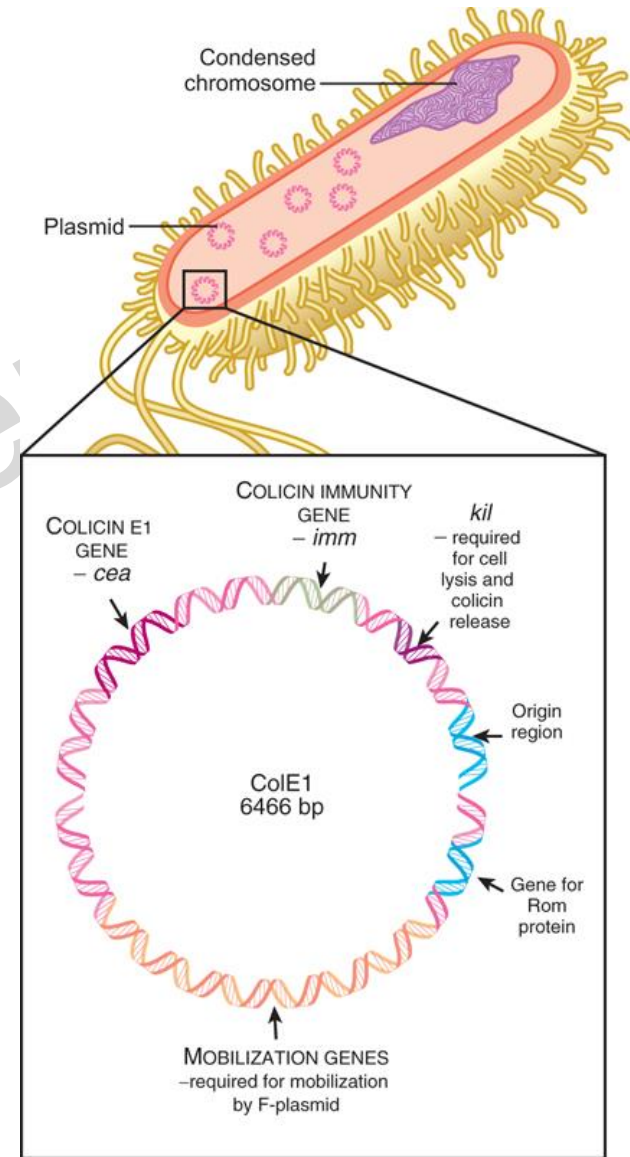
- Rychlý nárůst kultury
- Může růst pouze v médiu obsahujícím minerální soli a cukr
- Tekutá kultura vydrží týdny v lednici
- Může být zamražena na  $-70^{\circ}\text{C}$  až na 20 let
- Může růst jak za aerobních tak anaerobních podmínek
- Má jeden kruhový chromosom obsahující asi 4000 genů



Clark and Pazdernik, 2016

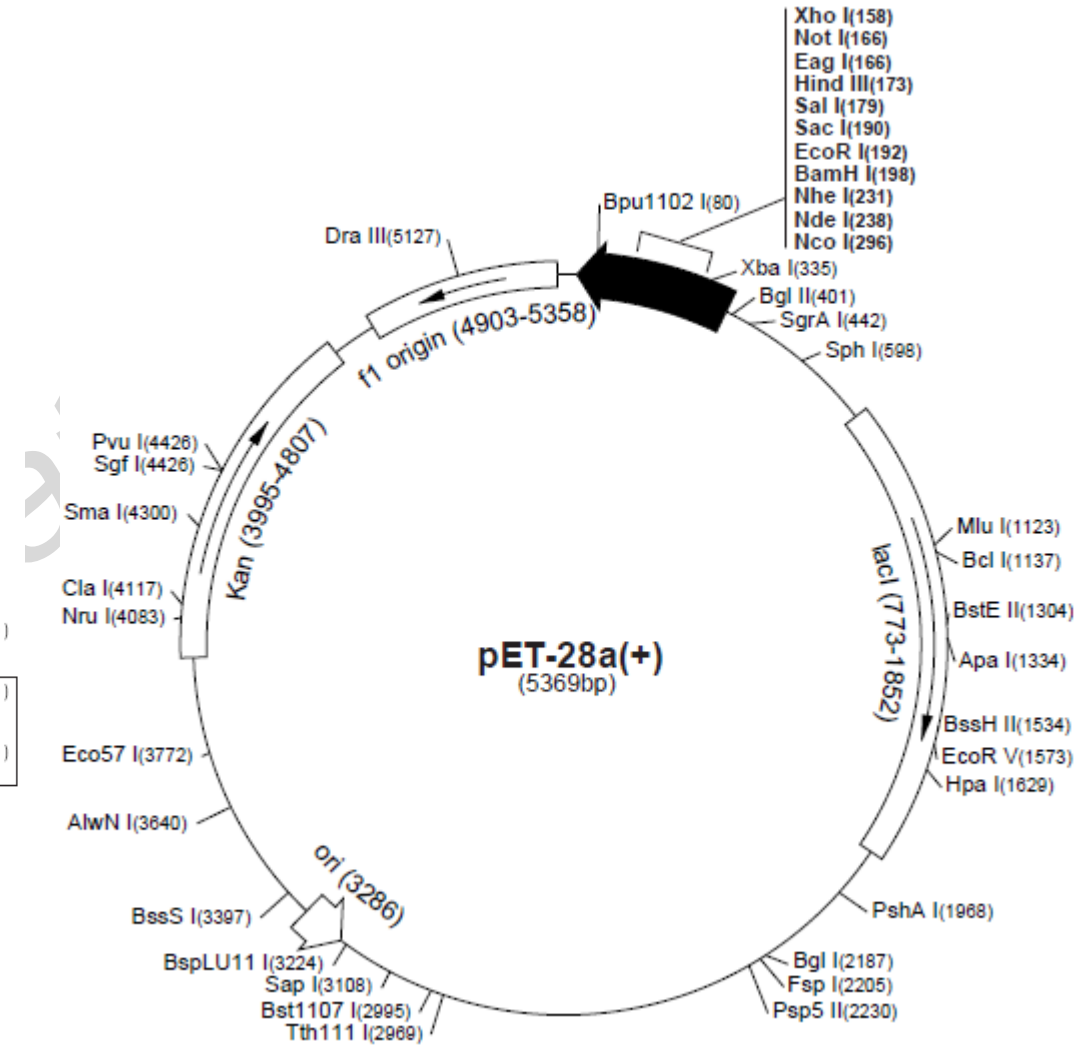
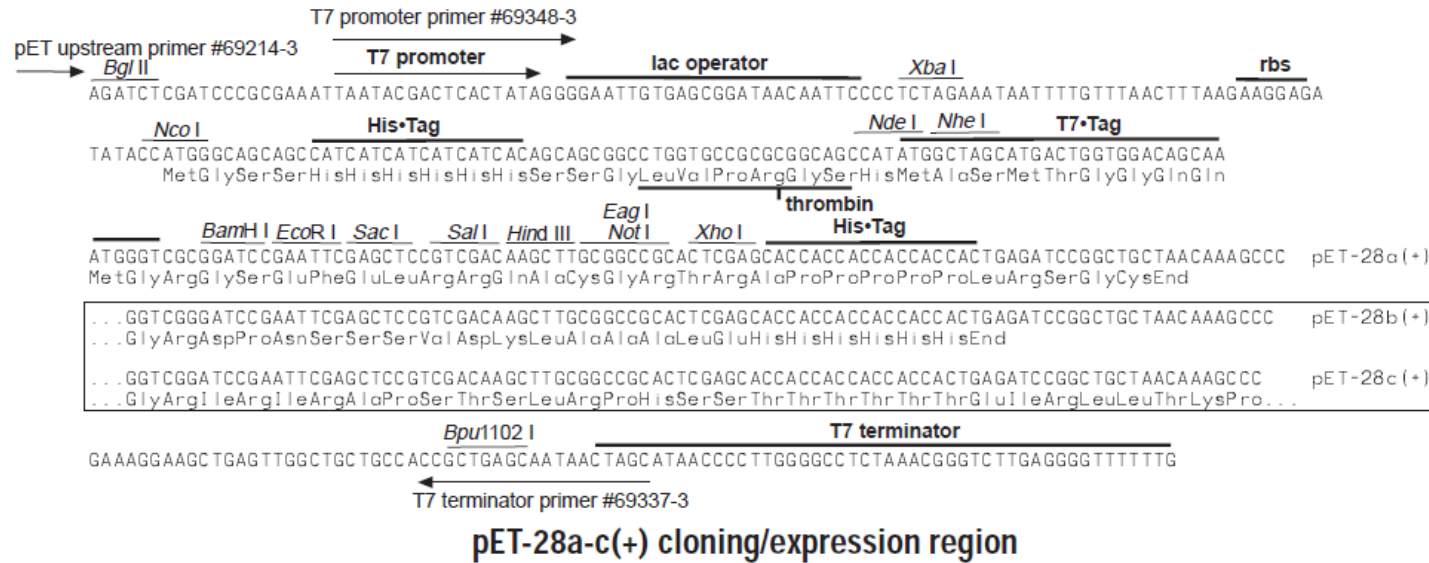
# Plasmidy

- V rámci strategie přežití nutná kompetice s ostatními organismy
- Celá řada bakterií sekretuje toxiny nazývané bakteriociny
- *E. coli* produkuje tzv. koliciny (E1, M) – proděravění plasmatické membrány, degradace DNA/RNA
- Imunitní proteiny bakterie neutralizují účinek toxinů
- Schopnost produkce kolicinů je dána přítomností plazmidů (ori místo)
- Tyto plazmidy byly modifikovány pro biotechnologické účely



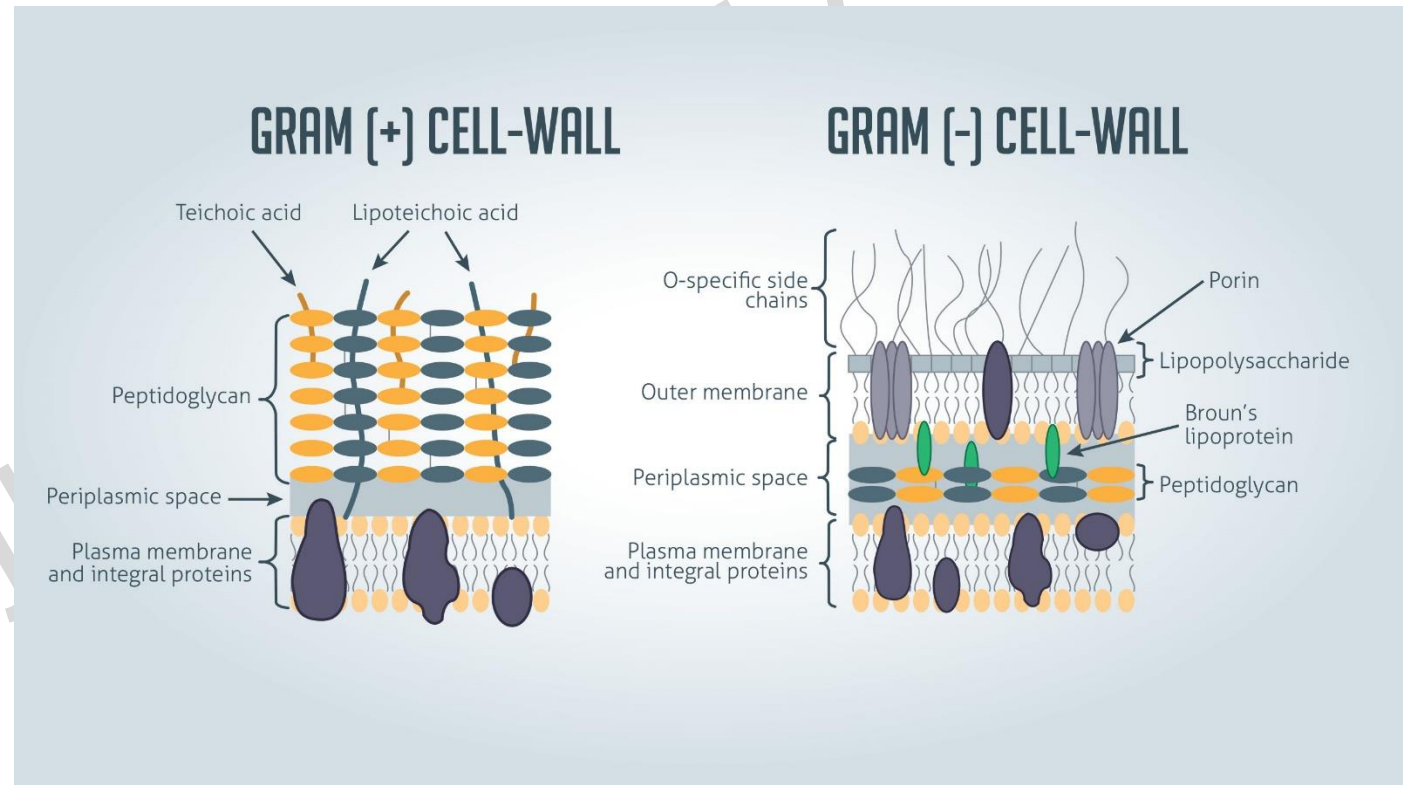
Clark and Pazdernik, 2016

# Plasmid pET28



# Bakterie v biotechnologii

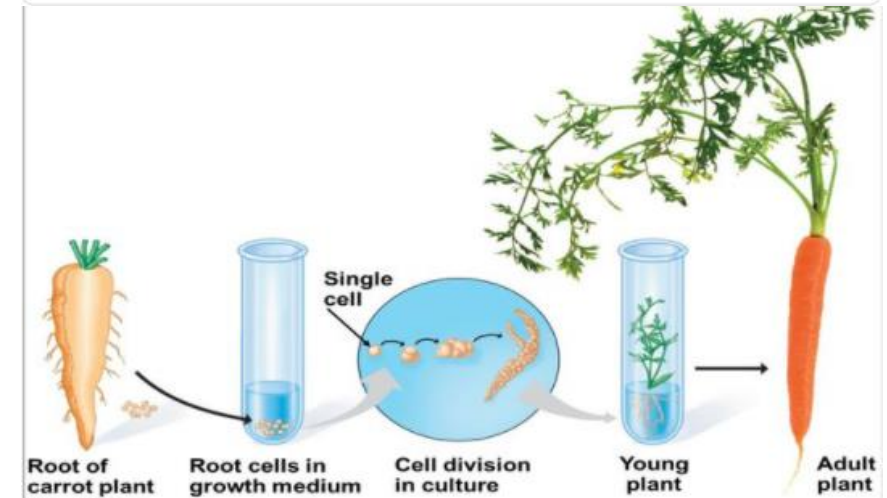
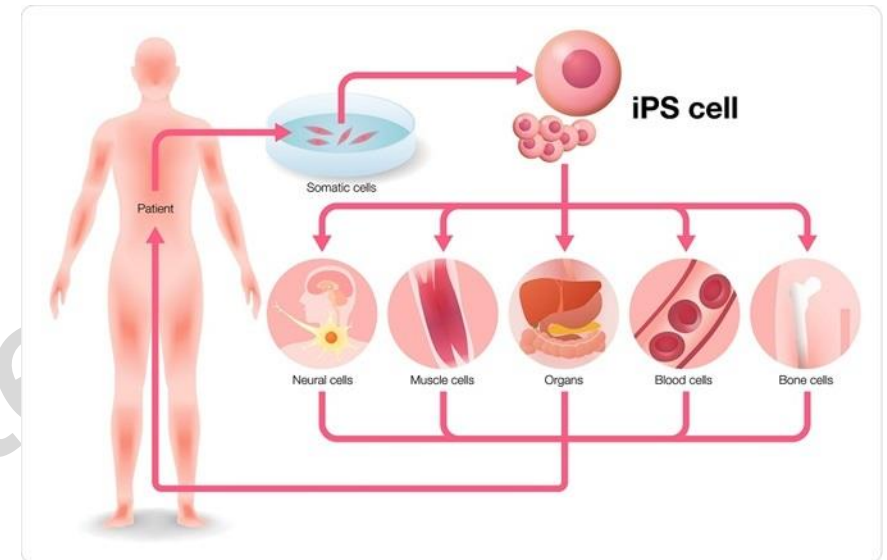
- *Bacillus subtilis* – produkce proteáz a amyláz
- *Pseudomonas putida* – schopnost degradace celé řady aromatických látek
- *Streptomyces coelicolor* – degraduje celulózu a chitin, produkce celé řady antibiotik
- *Corynebacterium glutamicum* – produkce L-glutamátu a L-lysinu
- *Streptococcus zooepidemicus* – produkce k. hyaluronové





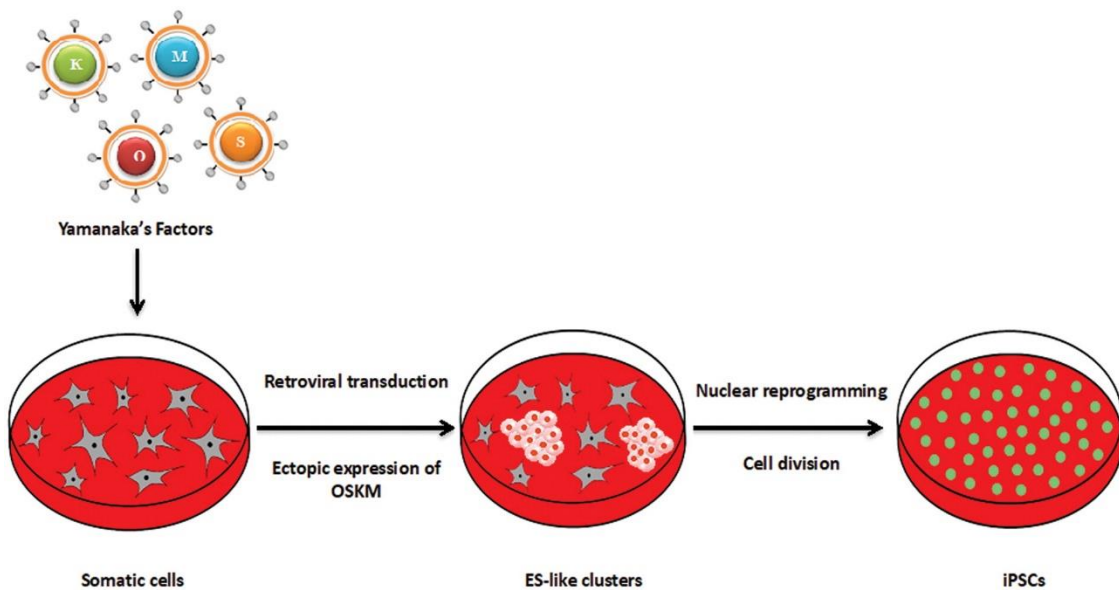
# Eukaryota

- Celá řada eukaryot je diploidní (dvě kopie každého chromozomu)
- Celá řada rostlin je naopak polyploidní (pšenice = hexaploidní, rajče = tetraploidní)
- U zvířat je rozdíl v zárodečných a somatických buňkách
  - z diploidních zárodečných linií vznikají haploidní gamety (vajíčka a spermie)
  - somatické buňky jsou diploidní – somatické mutace se přenáší v rámci organismu
  - somatické mutace se nepřenáší na potomstvo
- U většiny rostlin jsou buňky totipotentní
- U zvířat tuto vlastnost nesou pouze kmenové buňky

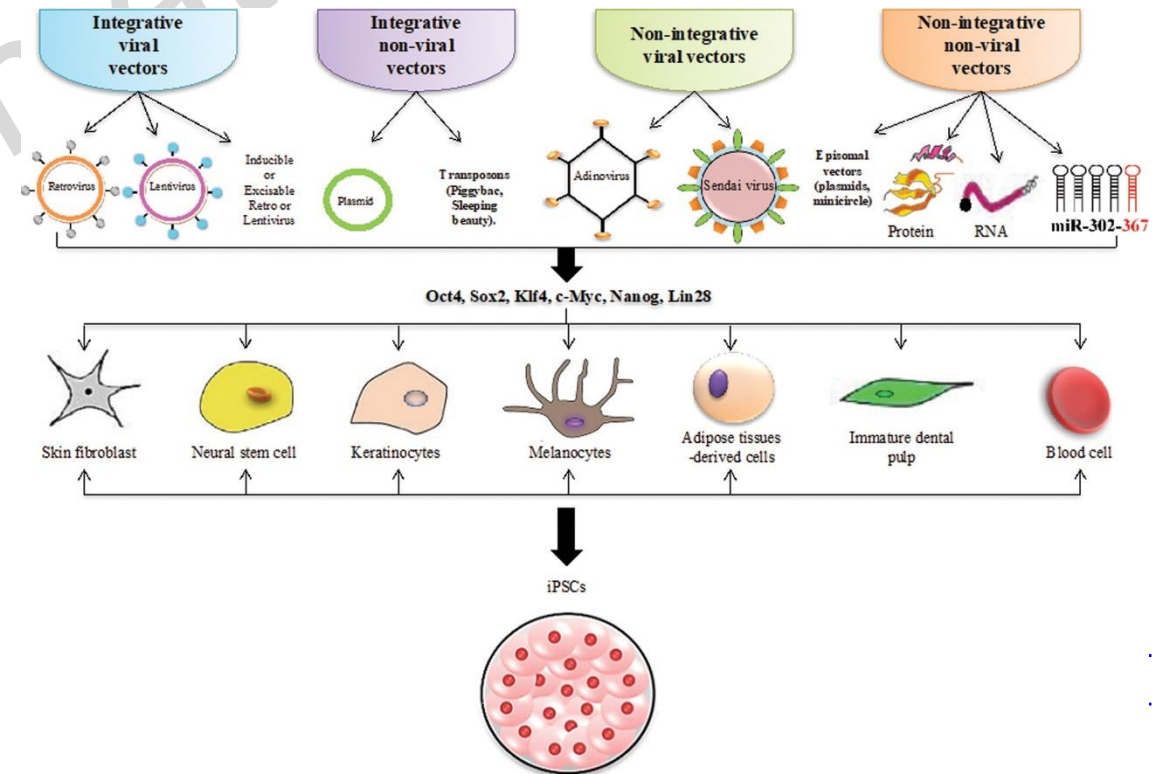


# iPSC (induced Pluripotent Stem Cell)

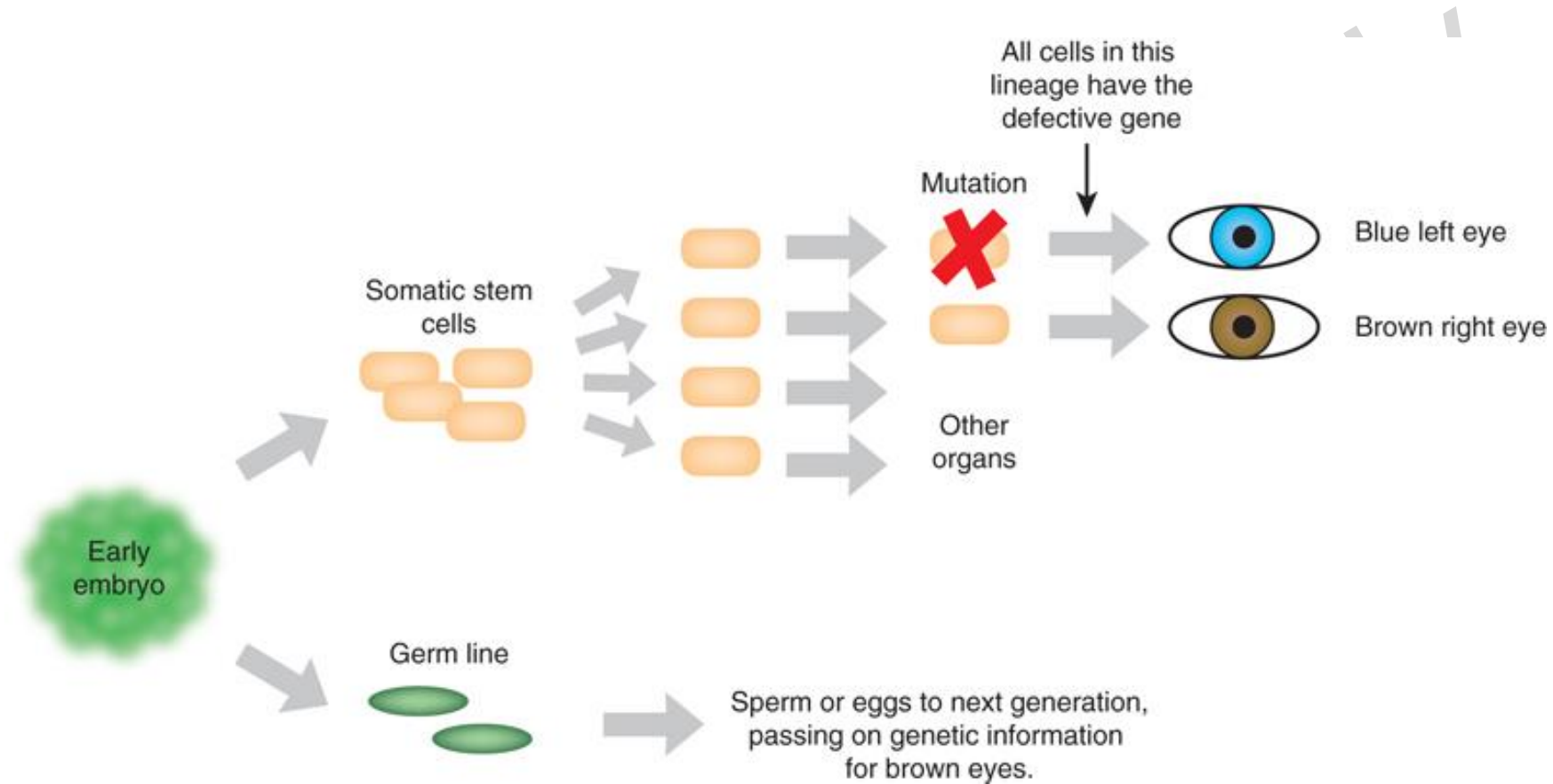
- Metoda prvně popsána v práci Takahashi a Yamanaka (2006) na indukci iPSC z fibroblastů
- Nutnost exprese 4 transkripčních faktorů - octamer-binding transcription factor 3/4 (Oct3/4), SRY (sex determining region Y)-box 2 (Sox2), Krüppel-like factor 4 (Klf4) a cellular-Myelocytomatosis (c-Myc) (OSKM).



Abbar et al., 2020



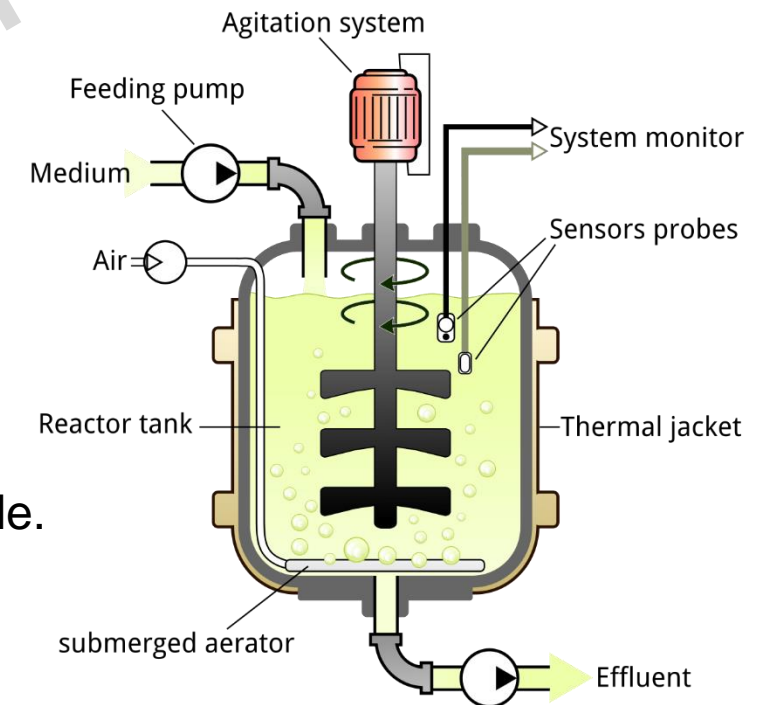
# Somatické mutace



Clark and Pazdernik, 2016

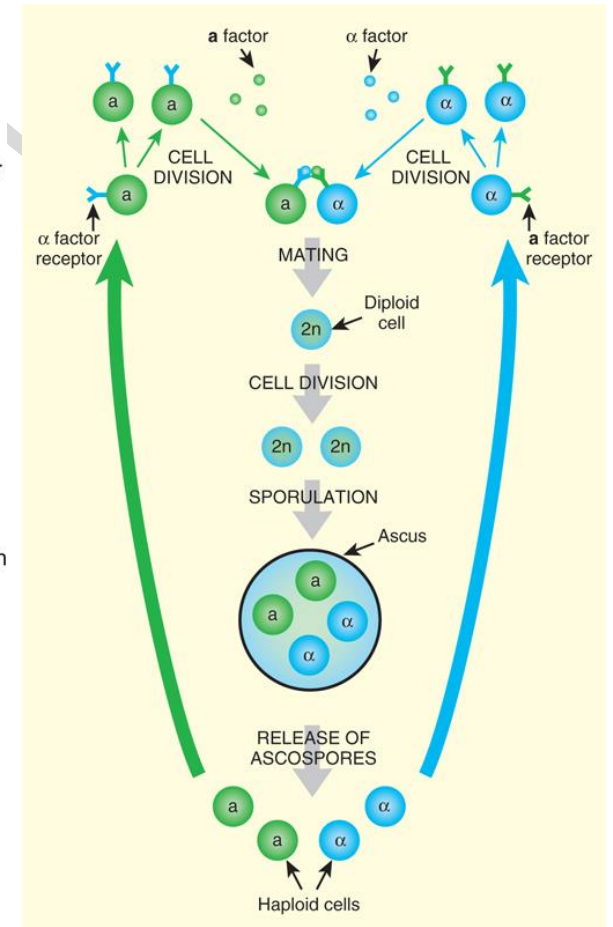
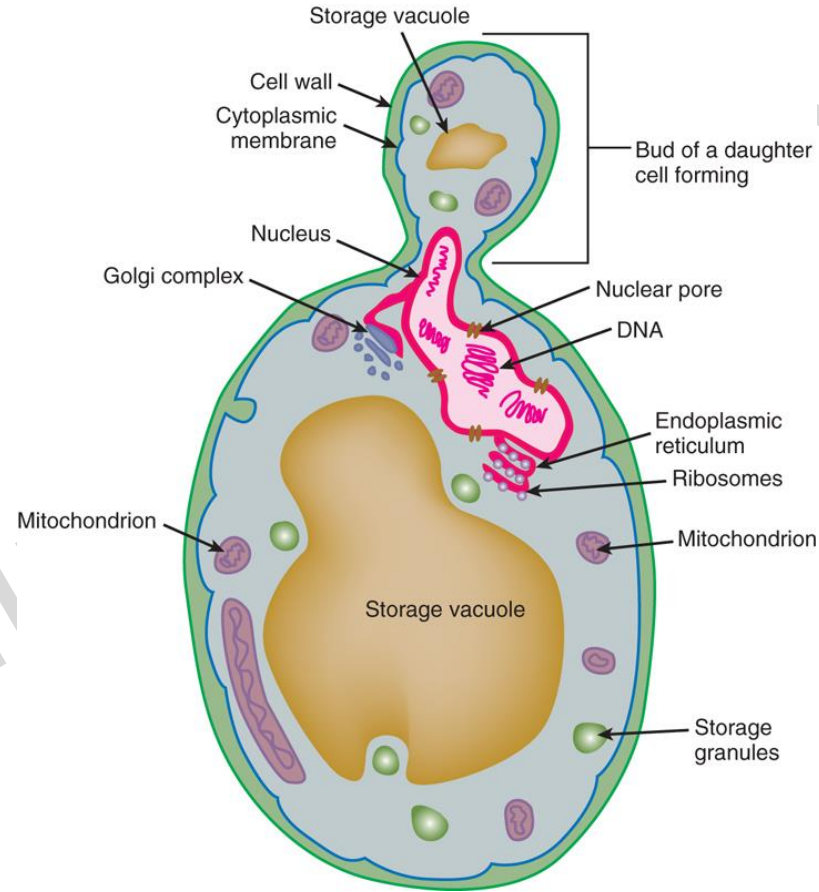
# Kvasinky a Houby

- Houby jsou tradičně používány v biotechnologii – *Penicillium roqueforti* (Roquefort), *P. candidum*, *caseicolum* a *camembertri* (Camembert), *Aspergillus oryzae* (sojová omáčka), *Penicillium notatum* (Penicilin), *Aspergillus niger* (k. citronová)
- Obvykle kultivovány v bioreaktorech
- Kvasinky mají výhody bakterií i eukaryot
- Nejpoužívanější kvasinkou je *Saccharomyces cerevisiae*
- Genom kvasinek je oddělen jadernou membránou
- *S. cerevisiae* má 16 chromosómu obsahujících telomery a centromery
- Některé kvasinky mají extrachromozolální elementy, tzv. 2.micron circle.



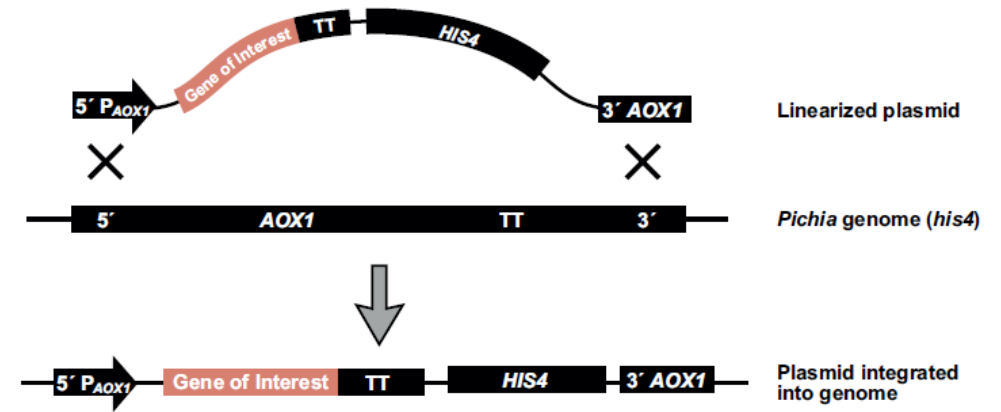
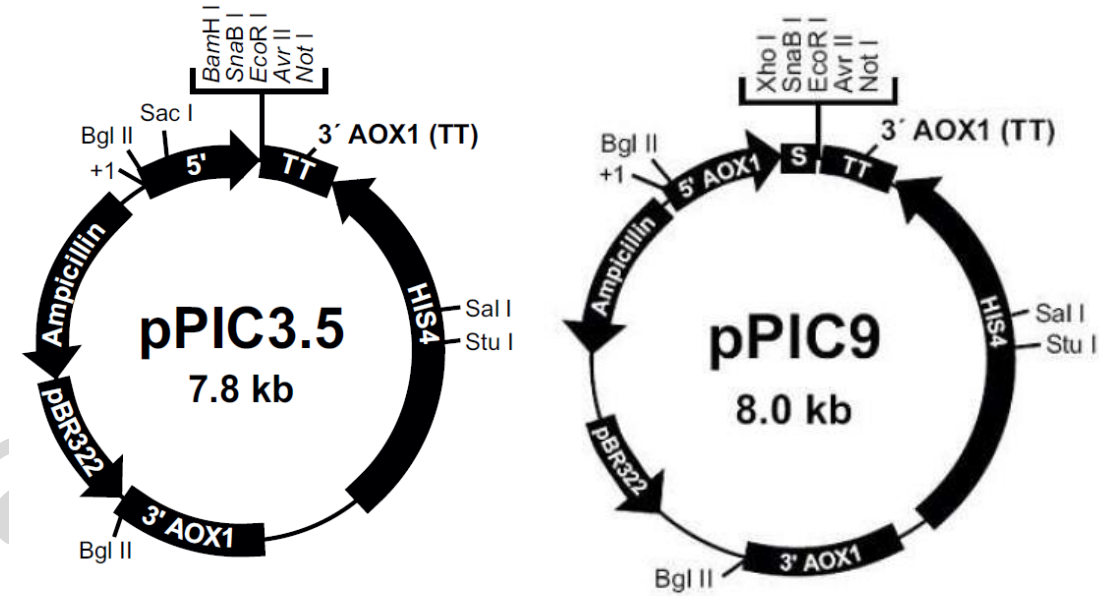
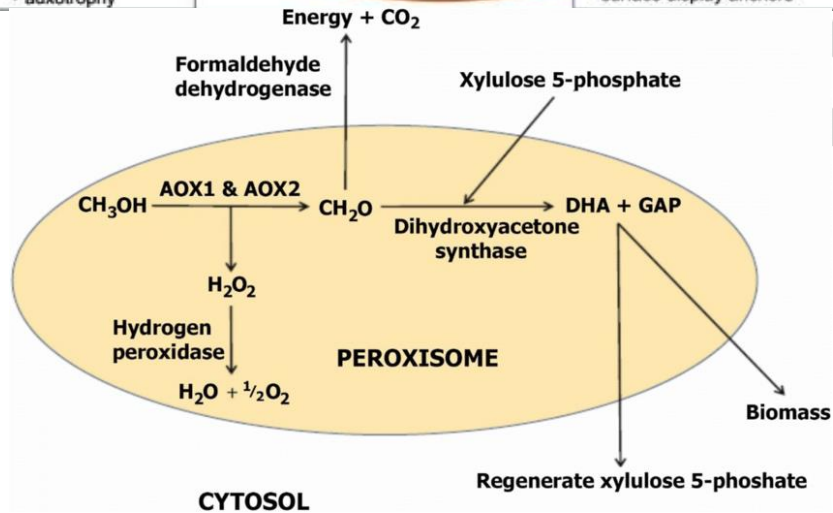
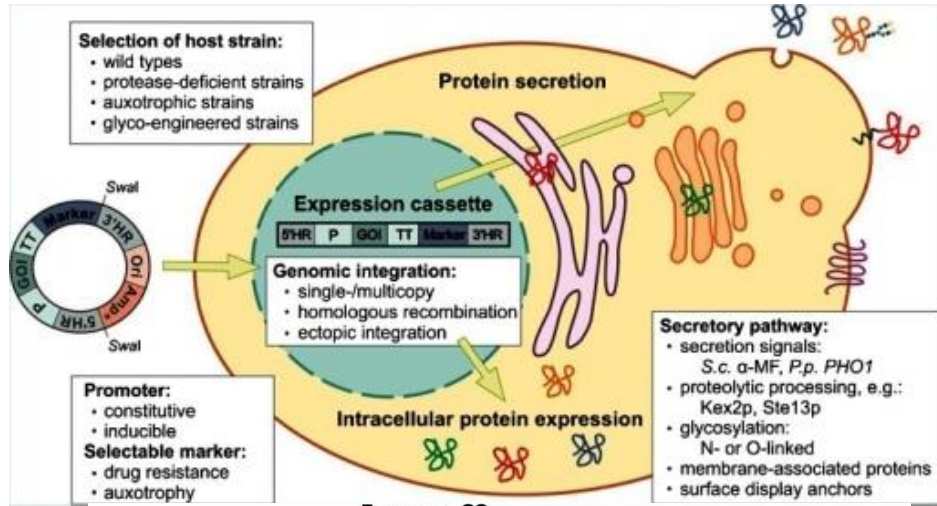
# Kvasinky

- Kvasinky se množí pučením
- Pučení vytváří identické buňky – dělení mitózou
- Kvasinky mají diploidní a haploidní fáze v rámci životního cyklu
- Za kritických podmínek kvasinky podstupují meiózu – tvorba haploidních spor, tzv. askospor v asku)
- Za příznivých podmínek spory klíčí a vzájemně konjugují za tvorby diploidních buněk
- U kvasinek může dojít ke konjugaci pouze mezi dvěma různými pářícími typy ( $a$ ,  $\alpha$ )



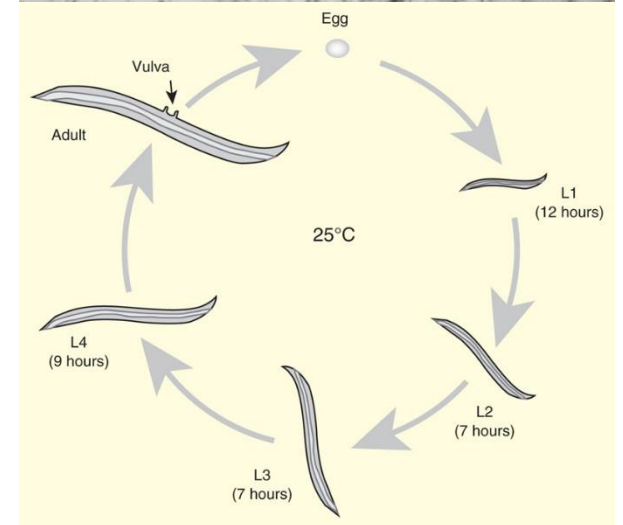
Clark and Pazdernik, 2016

# Pichia pastoris



# *Caenorhabditis elegans* (Hád'átko obecné)

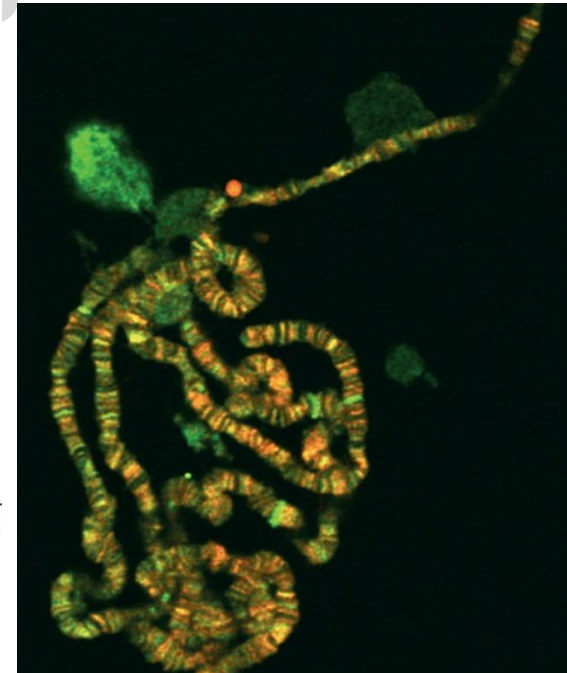
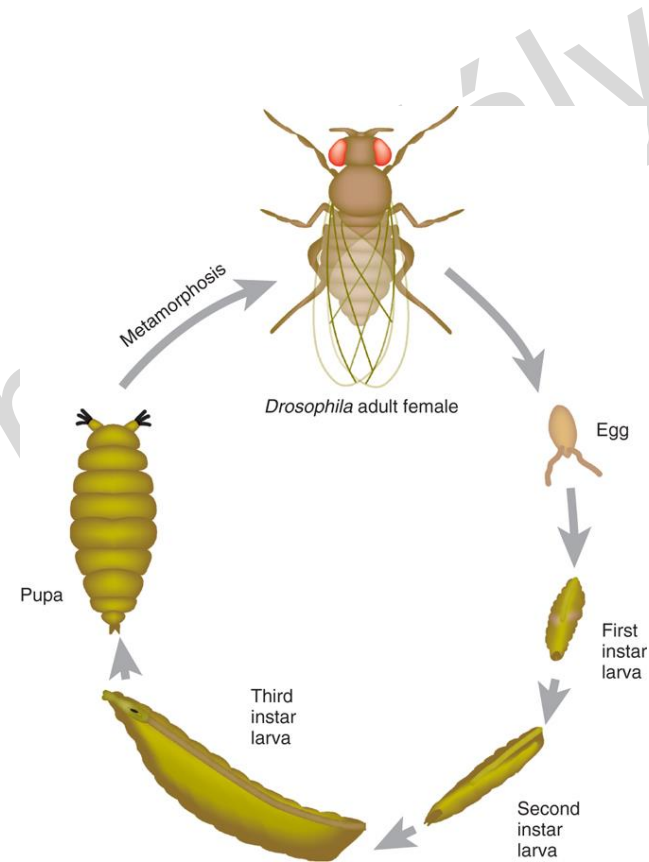
- Malá nematoda (hlístice) žijící v převážně v půdě s kořenovou zeleninou
- Má dvě pohlaví – 99.9% hermafrodit (samooplodnění) a 0.1% sameček
- Tělo tvoří jednoduchá trubice pokrytá kutikulou
- Uvnitř těla – 959 somatických buněk zahrnujících cca. 300 neuronů
- Hlavička má celou řadu sensorických orgánů (chuť, čich, teplota, hmat)
- Tělo je průsvitné = snadné použití fluorescenčních technik, generační cyklus 3 dny
- Poprvé u něj provedena RNA interference – ideální nástroj pro reverzní genetiku
- První známý úplný genom mnohobuněčného organismu (100 MBp)



<https://www.hsph.harvard.edu/mair-lab/c-elegans/>

# *Drosophila melanogaster* (octomilka)

- Hojně požívaný organismus v genetických studiích
- Snadné pěstování , 2-týdenní životní cyklus
- Z vajíčka se líhne larva (24h), několik larválních stádií po dospělé
- Dostupná celá řada mutantů – identifikace genů podílejících se na vývoji (homologie s člověkem)
- Genom má 165 Mb – 3 páry autosomů a X/Y chromosomy
- Během rychlého larválního vývoje vznik polyténích chromozómů



Clark and Pazdernik, 2016



# *Danio rerio* (Dánio pruhované)

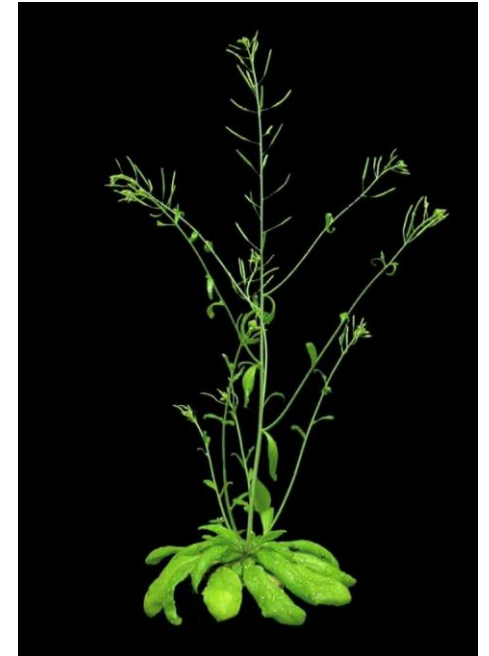
- Jednoduchý modelový obratlovec využívaný v molekulární biologii
- Jednoduché pěstování a množení v akváriích, dostupnost celé řady mutantů
- Embryonální vývoj mimo tělo matky, vývoj z jedné buňky po jedince trvá 24 hodin
- Embryo je průsvitné – snadné sledování efektu mutací na vývoj
- Genom obsahuje 25 párů chromozómů (1700 Mb), 70% genů kódujících proteiny u člověka má ortology u Dánia
- Model studia celá řada lidských onemocnění
- Embrya jsou často používána pro skrínig nových léčiv



<https://theconversation.com/animals-in-research-zebrafish-13804>

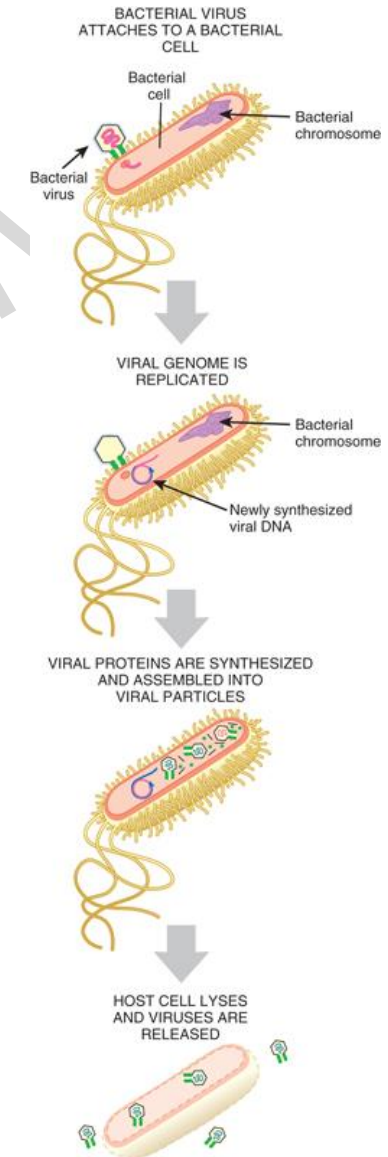
# *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní)

- Nejpoužívanější modelový organismus v rostlinné genetice a molekulární biologii
- Podobná odpověď na stresové faktory a choroby jako hospodářské plodiny
- Mnoho genů zodpovědných za vývoj a množení je shodných s hospodářskými plodinami
- Snadné pěstování, nenáročnost na prostor, generační doba 6-10 týdnů, mnoho semen
- Může být udržována v haploidním stavu
- Malý genom – pět chromosomů (125 Mb), 25 000 genů
  - rýže (430 Mb), 40 – 50 tis. genů
  - pšenice (17 Gb), rajče (950 Mb), tabák (4.5 Gb)



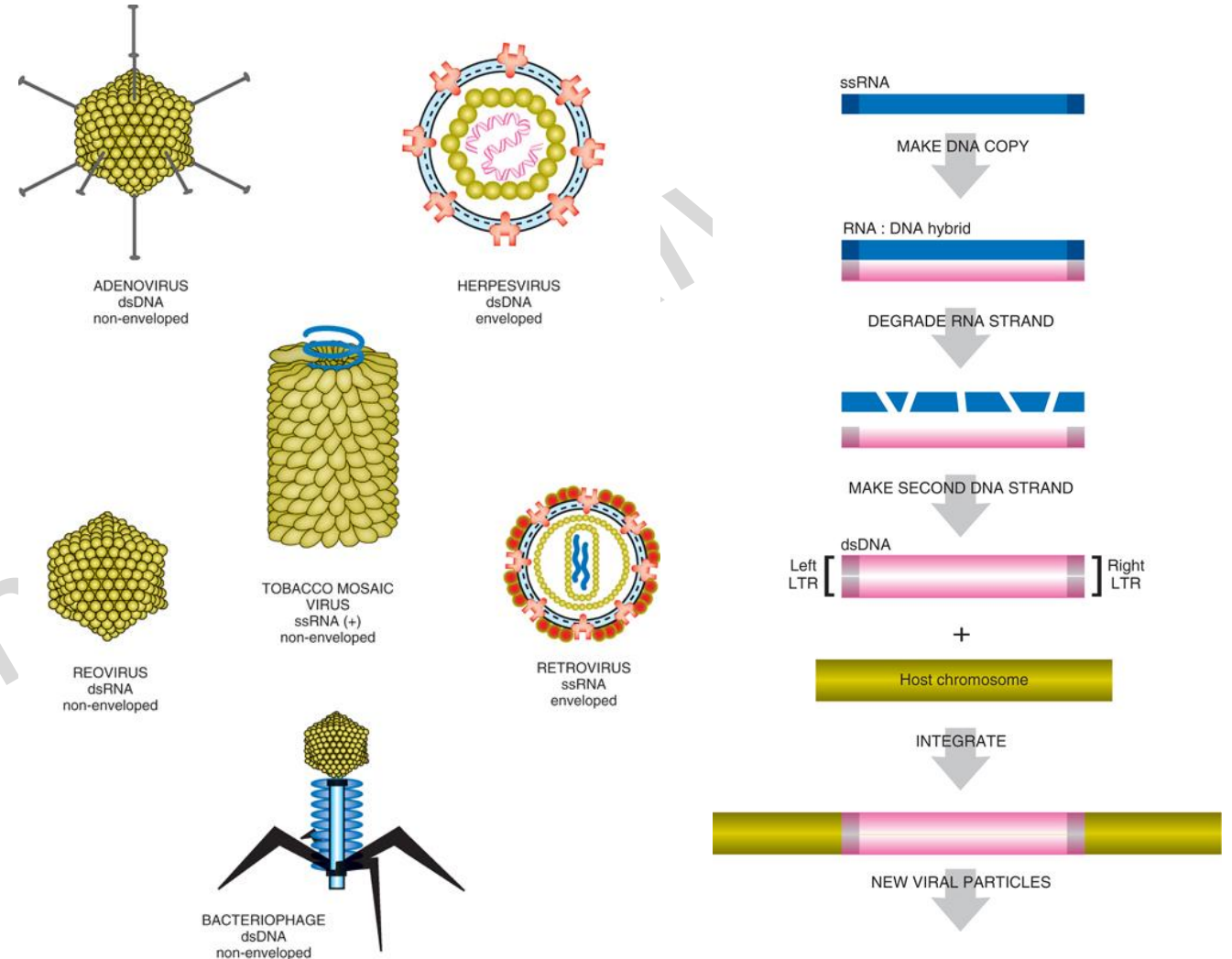
# Viry

- Entity na hraně definice života, patogeny napadající hostitelské buňky
- Skládají se z proteinové obálky nazývané kapsida obalující DNA/RNA genom
- Nachází se u všech živých organismů (bakterie, rostliny, živočichové)
- Bakteriální viry = bakteriofágy (fágy)
  - přichycení na hostitele
  - vstup virového genomu
  - replikace virového genomu
  - výroba nových virových proteinů
  - složení nové virové částice
  - uvolnění virionů z hostitele
- Mnoho virů prochází latentní fází – lysogenie u bakterií
- Často dochází k integraci viru do genomu hostitele – tvorba proviru (profágu)



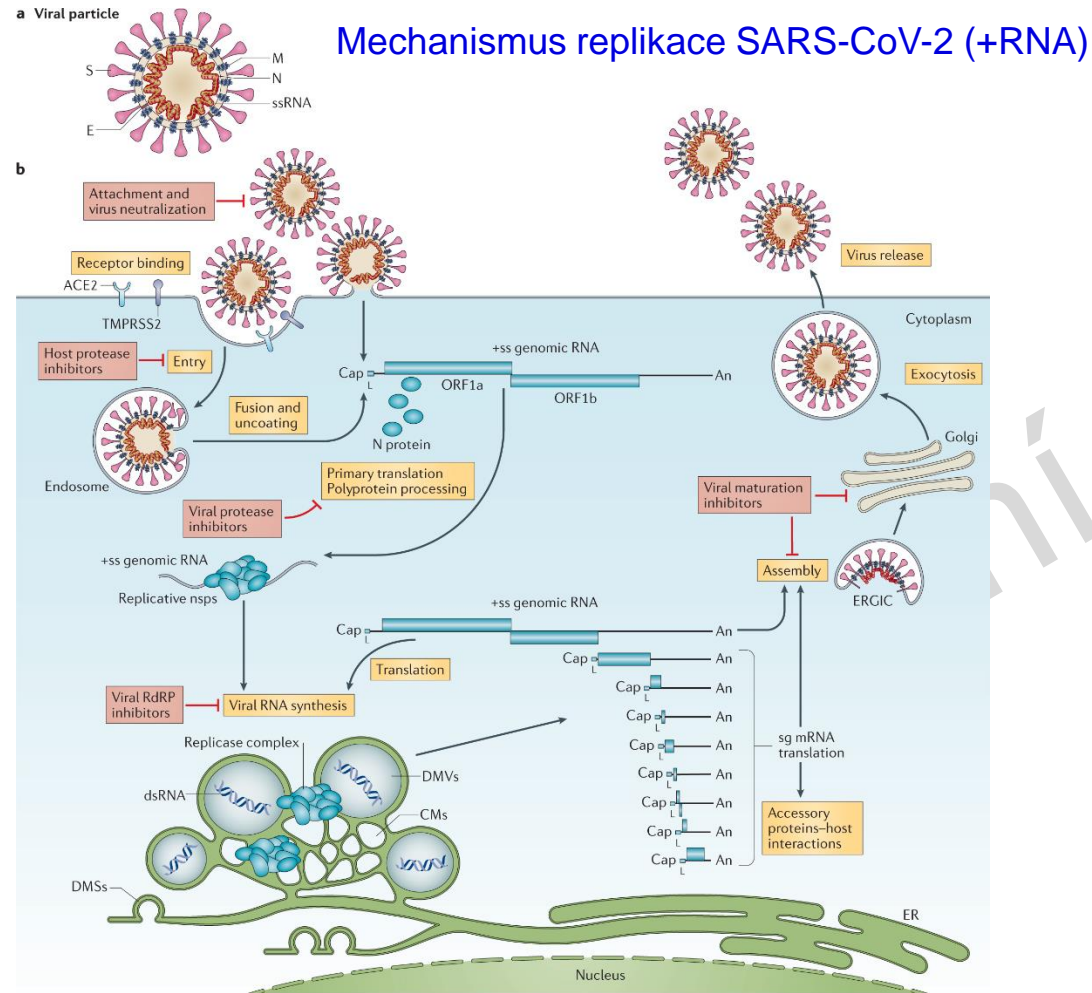
# Viry

- Můžeme rozdělit na základě tvaru kapsidy (sférické, komplexní, vláknité)
- Komplexní = bakteriofágy (T4, P1, Mu)
- ssRNA viry mají pozitivní (+) nebo negativní (-) genom
- Retroviry obsahují reverzní transkriptázu (přepis RNA do DNA), pomocí long terminal repeats (LTRs) se integrují do genomu



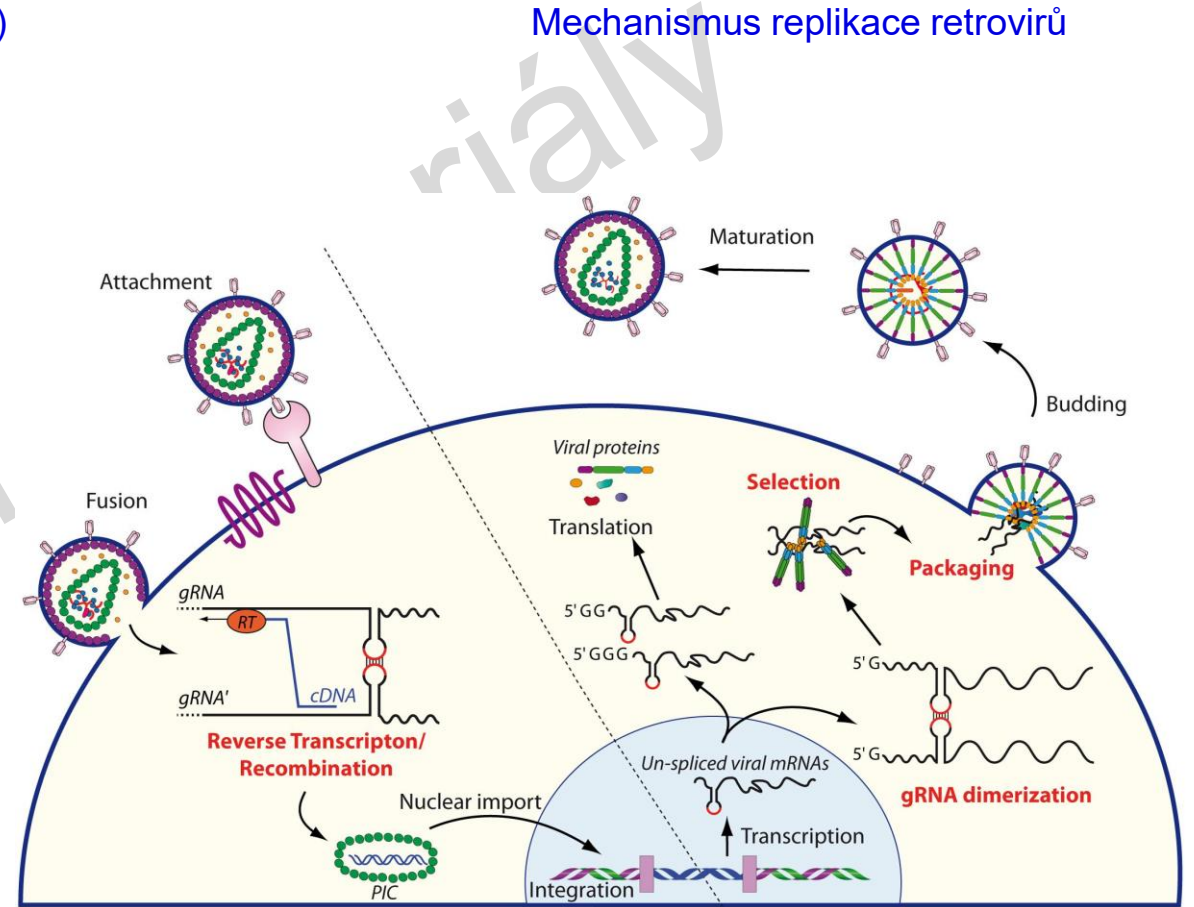
Clark and Pazdernik, 2016

# Životní cyklus RNA virů



V'kovski et al. 2021

## Mechanismus replikace retrovirů



Dubois et al. 2018