

Otázka: Genové inženýrství

Předmět: Biologie

Přidal(a): krojčík

GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Příprava umělých kombinací genů a jejich zavádění do genomu organismů s cílem rekonstruovat jejich genetickou výstavbu.

- Klonování DNA
- Příprava rekombinantních molekul DNA
- Zakládání genových knihoven
- Mutageneze IN VITO
- Příprava transgenních organismů (GMO)
- Genová terapie
- Klonování živočichů

Historie biologických živočichů

- **1933** T.H. Morgan – NC funkce chromozomů při studiu dědičnosti
- **1944** O. Avery, C. Macleod, M. McCarty – DNA určuje dědičné vlastnosti
- **1953** J.D. Watson, F.H. Crick, M.H.F. Wilkins – popsali strukturu DNA, NC v 1962
- **1968** M.W. Nirenbergs a G. Khorama – NC za vyřešení genetického kódu

- **1968** R. Holley – NC za objev struktury tRNA
- **1997**– Naklonování ovce Dolly
- **2001**– rozluštění 93% lidského genomu, kompletní genom publikován v r. 2003
 - Projekt HUGO (human genom organization)
 - Člověk má cca 20 – 25 000 genomů – počet zjištěných (předpokládaných je cca 39 000)
 - Rozsah lidského genomu je cca 3×10^9 BP

KLONOVÁNÍ DNA

- Je to tvorba klonu DNA (soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA připravených genovým inženýrstvím)

Využití klonované DNA:

- Izolace genů -> studium její struktury a FCE
- Studium regulačních oblastí, které řídí exprese genů
- Fyzikální a genetická analýza genomů
- Exprese cizích genů v nepříbuzných hostitelích a získávání jejich produktů ve velkém množství

Cílem – příprava látek využitelných v průmyslu (enzymy) (zdravotnictví – hormony a vakcíny)

KLONOVÁNÍ DNA PROBÍHÁ VE 3 FÁZÍCH

1. DNA určena ke klonování se restrikčními enzymy = restrikční endonukleázy (stříhající) rozštěpí na kratší úseky = restrikční fragmenty.

- Tyto restriční fragmenty se musí zabudovat do tzv. vektorové DNA do hostitelských buněk.
- Jako vektorová DNA se používá molekulární DNA z bakterií kvasinkových plazmidů nebo z bakterií rostlinných a živočišných virů.
- Spojování klonované DNA s vektorem DNA umožňuje enzym DNA - ligáza => vzniká tzv. rekombinantní DNA

2. Přenos rekombinantní molekuly DNA do vhodné hostitelské buňky a její pomnožení.

- Pro klonování DNA (genu) se jako hostitelský organismus používá bakterie E. Coli (eischerischi)
- Přenos plazmidů z rekombinantní DNA do E.Coli se uskutečňuje těmito procesy:
 - **TRANSFORMACE**
- Při ní bakteriální buňky přijímají volnou DNA z okolního prostředí
 - **ELEKTROPORACE**
- Na bakteriální buňky působíme krátkým elektrickým pulzem o vysokém napětí, to udělá v B.S. dírky (póry), jimiž DNA vstoupí do buňky
 - **BATERIOFÁG (lambda)**
- Přenos je zprostředkován přirozenou fágovou infekcí

3. Selekcce klonu buněk obsahující požadované molekuly rekombinantní DNA

- Nejdříve si musíme založit tzv. Genovou knihovnu pro daný organismus => soubor klonovaných fragmentů genomové DNA, ty nám reprezentují celý genom daného organismu
- V této genové knihovně se potom klon obsahující urč. gen vyhledává pomocí molekulárních sond:
 - sondy pro vyhledávání sekvencí DNA
 - sondy pro vyhledávání produktů hledaných genů

TRANSGENNÍ ORGANISMY

- **transgen**= gen upravený metodami gen. inž. přenesený do nového hostitel. organismu
- **transgenní organismu** = GMO (genom GMO obsahuje stabilně začleněný transgen)
- **transgenoze** - postupy, kterými se do organismů vnášejí cizorodé geny z nepříbuzných organismů
- **využití:**
 - zvýšení výnosů a nutričních hodnot plodin (obilniny, kukuřice, rýže), produkci zvířat
- transgenní organismy se vyznačují tím, že mají vlastnosti, které by se volně v přírodě v průběhu evoluce volně nevytvořily

GENETICKY MODIFIKOVANÉ JEDNOBUNĚČNÉ ORGANISMY

- využívány jsou hlavně bakterie a kvasinky. Šlechtěním a metodami gen. inž. byly jejich metabolické dráhy upraveny tak, aby se zlepšily vlastnosti produktu nebo aby se zvýšilo množství
- využívají se hl. v těchto oborech:
 - sladovnictví, pekařství, výroba sýrů
 - likvidace odpadních látek (čištění odpadních vod, odstraňování radioaktivního odpadu, likvidace pneumatik a ropných havárií)
 - chemický průmysl (výroba enzymů, antibiotik, org. kyselin, aminokyselin, vitamínů a alkaloidů)
 - lékařství, farmaceutický průmysl (výroba lidského inzulinu a růstových hormonů, očkovací vakcíny proti hepatitidě B)

TRANSGENNÍ ROSTLINY

- pro přenos cizorodých genů do rostlinných buněk používáme následné způsoby:
 - pomocí půdních bakterií rodu AGROBACTERIUM
 - pomocí vektorů odvozených od rostlinných DNA virů (např: virus zlaté mozaiky rajčete, virus mozaiky kvěťáku)
 - biolistická metoda - nastřelování
 - lipofekce
 - elektroporace
 - mikroinekce DNA do buněk
 - makroinekce DNA do pletiv

VYUŽITÍ TRANSGENNÍCH ROSTLIN

- odolnost proti hmyzím škůdcům
- odolnost proti virům
- odolnost proti herbicidům
- navození lepších vlastností plodů a semen (rajčata)
- zdroj nových surovin
- zdroj látek s farmakologickými účinky

TRANSGENNÍ ŽIVOŽICHOVÉ

- metody přenosu modifikovaných genů do živočicha:
 - transfekace
 - elektroporace
 - lipofekce
 - fúze eukaryotických buněk s bakteriálními protoplasty, které obsahují cizorodou klonovanou DNA
 - mikroinekce
 - přenos pomocí virových vektorů

PŘÍPRAVA TRANSGENNÍCH SAVCŮ

- Modelový organismus je myš. Přenos DNA do oplozených vajíček myši.
- Přenos DNA do embryonálních genových kmenových buněk myši

TRANSGENNÍ HOSPODÁŘSKÁ ZVÍŘATA

1. příprava hospodářských zvířat s lepšími užit, vlastnostmi

Můžeme toho docílit:

- změnou metabolických drah
- změnou hormonální rovnováhy
- tvorba zcela nových proteinů

Např:

- prasata s vyšším obsahem tuku v mase
- ovce, jejichž vlna má výhodnější chem. složení
- drůbež, která má vyšší obsah lysozymu v bílku
- ryby, které jsou tolerantní ke změnám obsahu soli ve vodě nebo odolné na znečištění vody

2. Vytváření transgenních zvířat, z jejichž tělních tekutin lze získat farmakologicky významné látky

Např:

- transgenní ovce, jejichž mléko obsahuje vysoké procento látek pro léčbu hemofilie

GENOVÁ TERAPIE

- V buňkách pacientů -oprava gen. poruch genetické informace nahrazením defektních genů funkčními alelami
 - GENOVÉ TERAPIE IN VITRO
 - GENOVÉ TERAPIE IN VIVO

1. GENOVÁ TERAPIE IN VITRO

- Do buněk odebraných z těla pacienta se vnesou geny. Ty buňky, ve kterých došlo k expresi daného genu se pomnoží a vrátí se zpět do pacienta, kde zajistí normální FCI

Principy gen. terapie:

- zvýšení počtu kopií genů
- cílené usmrcení specifických buněk
- cílená oprava mutace
- cílené potlačení gen. exprese

2. GENOVÁ TERAPIE IN VIVO

- Při tomto způsobu se geny přenášejí pomocí vhodného vektoru do buněk nacházejících se v těle pacienta.
- U člověka je povoleno z etických důvodů upravovat gen. defekty pouze v somatických tělních buňkách (NE V ZÁRODEČNÝCH BUŇKÁCH !!!), protože by se upravená gen. informace přenášela na potomstvo a pak v dalších generacích by mohla uškodit

Metody gen. terapie pro léčbu molekulárních gen. poruch:

- Zvýšení počtu kopií genů
 - vnesení několika kopií standartního genu do defektních buněk zvýší hladinu jeho produktů na úroveň, která zajistí normální fenotyp organismu
 - Vhodný způsob v autozomálně recesivních dědičných chorob vzniklých mutací
- Cílené usmrcení specifických buněk
 - gen vnesený do cílových buněk vytváří toxický produkt, který tyto buňky usmrtí
 - vhodný způsob při léčbě rakovin a nádorů
- Cílená oprava mutace
 - výměna mutačních alel za alely standartní homologickou rekombinací
- Cílové potlačení gen. exprese
 - a) exprese genu je zastavena na úrovni DNA => zablokování replikace
 - b) na úrovni RNA => inaktivace m- RNA
 - c) na úrovni proteinu - specifické intracelulární protilátky se navážou na tyto defektní proteiny a inaktivují je

LÉČBA NĚKTERÝCH DĚDIČNÝCH ONEMOCNĚNÍ

- vrozené vady metabolismu (hemofilie, cystická fibróza)

KLONOVÁNÍ ŽIVOČICHŮ

- Vytvoření identických kopií buněk nebo organismů nepohlav. cestou
- KLON = soubor identických buněk nebo organismů odvozených od společného předka nepohlavní cestou (mitóza - eukaryota, dělení - prokaryota)

Genetika člověka

- šimpanz s člověkem se liší pouze v 1,5% nukleotidů
- 96% sekvencí máme stejných
- podle nejnovějších průzkumů máme 23 000 genů (26 500), (předpoklad 40 000)
- máme jen o 1000 genů více než háďátko
- většina DNA nemá genovou FCI, nedeterminuje
- chromozom nese nejvíce genů - 23 genů, nejméně nese chromozom Y - 5 genů
- genetika člověka se řídí obecně platnými zákonitostmi, ale má odlišné metody výzkumu - etika => člověk nesmí být využíván ke gen. pokusům