

GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ

- Díky novým genetickým metodám a manipulacím se nám otevírají možnosti
- Využití:
 - výzkum
 - diagnostika
 - léčba lidských chorob

GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ

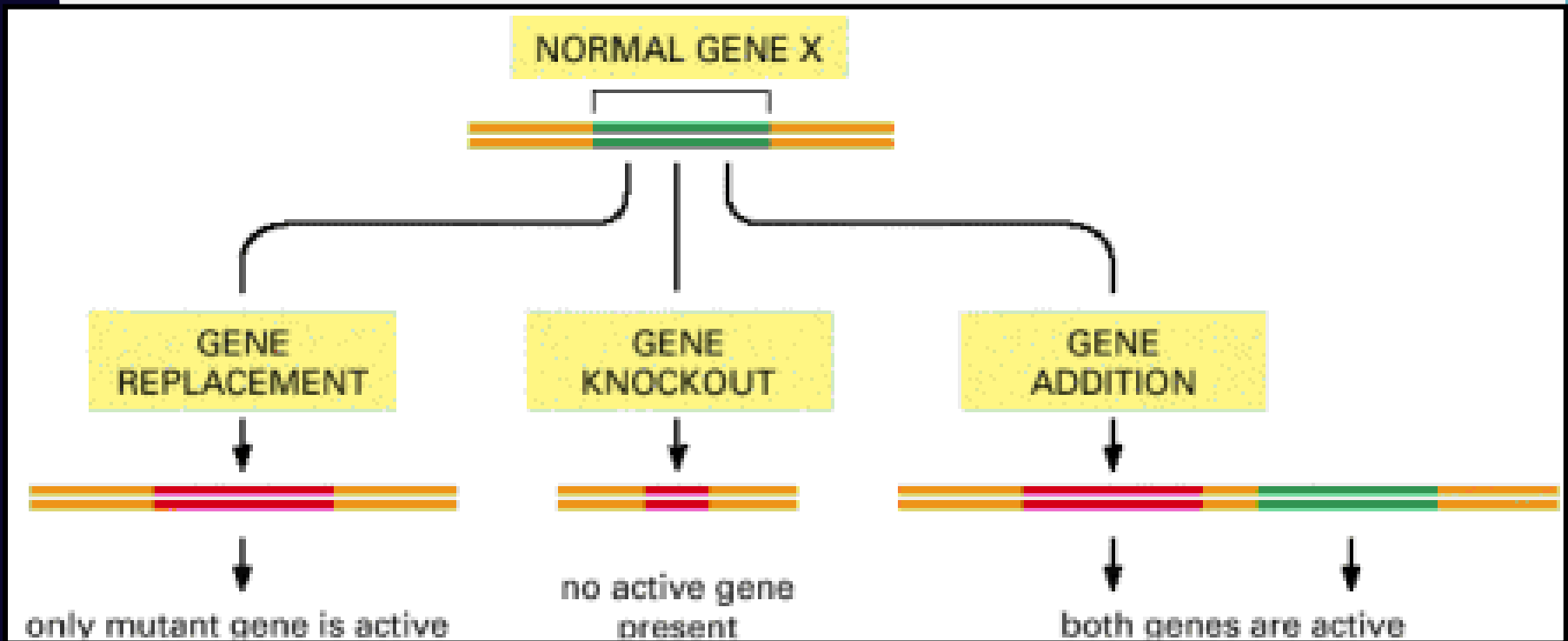
= cílená změna genetické informace (genomu)

Typy změn dle principu:

1. Přidání genu
2. Delece genu (knock-out)
3. Výměna genu (knock-in)

Genové inženýrství x klasické šlechtění
(mutace, selekce... principy klasické dědičnosti)

GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ



GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ VS. DĚDIČNOST

Zatímco pro klasickou dědičnost organismů je typický vertikální přenos DNA ("shora - dolů"; myšleno z generace na generaci), metody genetického inženýrství umožňují i tzv. horizontální přenos (přenos mezi jednou generací).

Ovšem nejen to, neboť přenášenou DNA umíme již i upravovat a různě modifikovat, či dokonce syntetizovat uměle.

ZÁKLADNÍ METODY GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

- Restrikční enzymy
- PCR=řetězová polymerační reakce
- Elektroforéza
- Blotting

RESTRIKČNÍ ENZYMY

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které jsou schopny štěpit dvoušroubovici DNA v určitých specifických sekvencích.

Místa rozpoznávané restrikčními endonukleázami jsou většinou **palindromatické** sekvence (palindromatické sekvence mají stejné pořadí nukleotidů čtené ve směru od 5' konce na obou dvou vláknech DNA).

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

RESTRIKČNÍ ENZYMY

Existuje relativně velké množství takových to endonukleas (izolovaných z různých bakterií), tudíž máme i velké množství možností na vyštěpování žádaných úseků DNA (existují tzv. restriční mapy, kde jsou v genomových sekvencích naznačena místa, kde lze sekvenci určitou endonukleasou štěpit). Prvním významem je tudíž vyštěpování požadovaných (k dalšímu použití) DNA sekvencí z delšího úseku DNA.

RESTRIKČNÍ ENZYMY

V diagnostice dědičných chorob se potom využívá takzvané restriční analýzy, založené na polymorfizmu délky restričních fragmentů (**RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism**).

Jedná se o to, že různí lidé mají různou DNA sekvenci (zvláště v nekódujících oblastech DNA, kde se různé varianty nijak fenotypově neprojeví), tudíž mají i různě umístěná místa, kde mohou restriční endonukleasy štěpit.

RESTRIKČNÍ ENZYMY

Zároveň se využívá skutečnosti, že při různých genetických mutacích mohou být určité sekvence DNA deletovány, nebo naopak přidány.

Po štěpení určité sekvence DNA (ve které se nachází i sledovaný gen) restriční endonukleasou získáme nestejně dlouhé fragmenty DNA, které můžeme elektroforeticky rozdělit a následně vyhodnotit.

ELEKTROFORÉZA

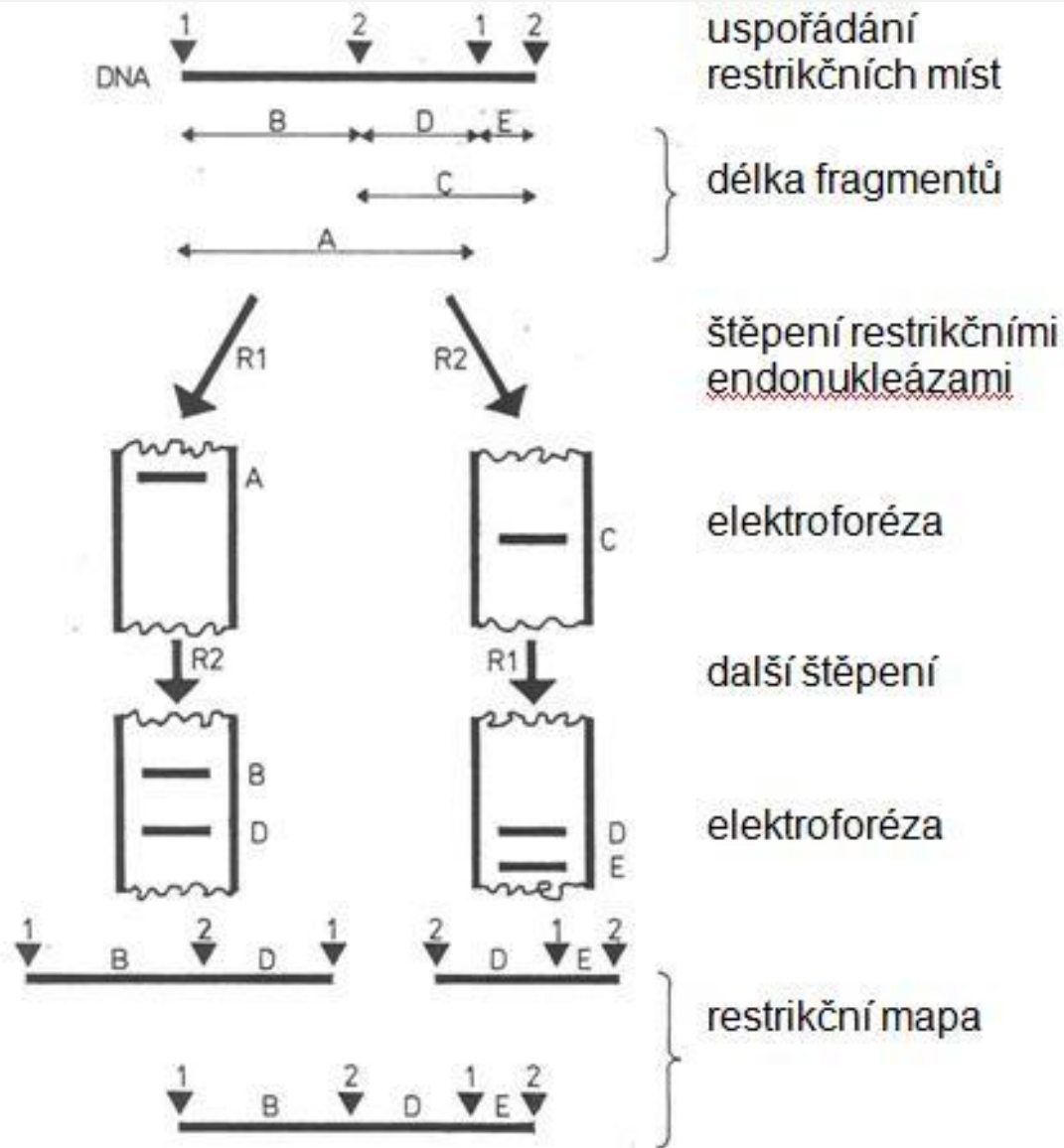
Elektroforéza je dělicí metoda, založená na rozdílné pohyblivosti dělených struktur v elektrickém poli.

Dělení DNA (i RNA) fragmentů je založeno na skutečnosti, že zbytky fosforečné kyseliny (jakožto součásti nukleotidů) mají záporný náboj. Nukleové kyseliny (NK) se tudíž v elektrickém poli chovají jako polyanionty (pohybují se ke kladnému pólu).

ELEKTROFORÉZA

Elektroforetické dělení NK probíhá nejčastěji na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Menší částice (kratší úseky NK) se pohybují rychleji a urazí tedy delší vzdálenost.

Stejně dlouhé fragmenty urazí tudíž stejně dlouhou vzdálenost. Využití nachází elektroforéza NK (nejen) při restriční analýze.



Obr. 4: Princip konstrukce restrikční mapy při použití dvou restrikčních enzymů

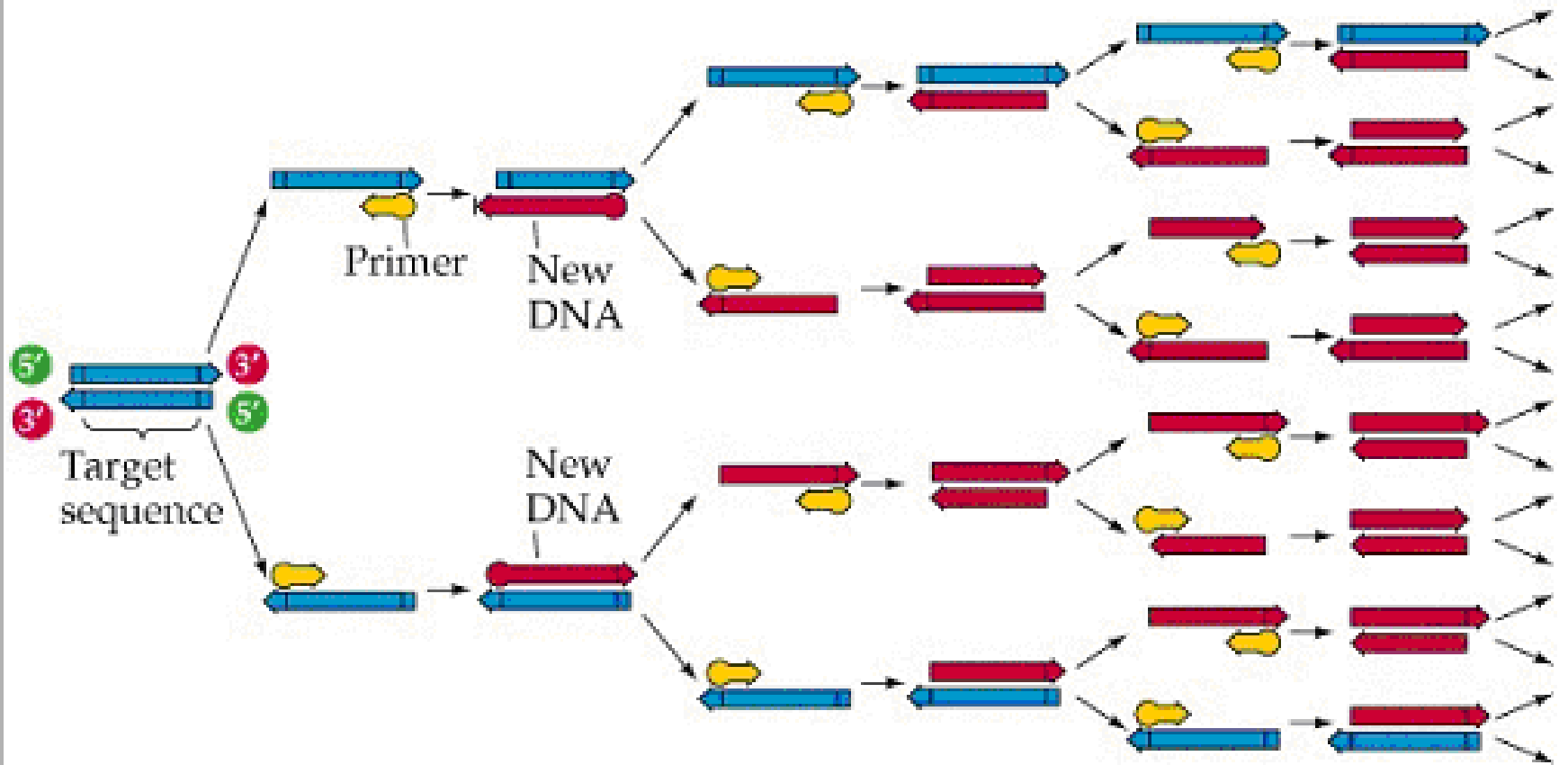
PCR

- Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) je metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA založena na principu replikace nukleových kyselin. Úseky DNA, které se mají namnožit (amplifikovat) musí být ohraničeny na začátku a na konci tzv. primery (krátkými oligonukleotidy DNA). PCR slouží k vytvoření až mnoha milionů exaktních kopií vzorového fragmentu DNA o maximální délce 10 tisíc nukleotidů (v některých případech bylo dosaženo délky až 40 tisíc, což umožňuje provést analýzu DNA i z velmi malého vzorku.

PCR

- Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech.
- Metody se využívá nejenom k vědeckým potřebám, ale například i ke kontrole potravin, pro zjišťování GMO a geneticky modifikovaných složek, nebo v kriminalistice při identifikaci osob.

RESEARCH METHOD



GENOVÉ MAPOVÁNÍ/MAPOVÁNÍ GENOMU

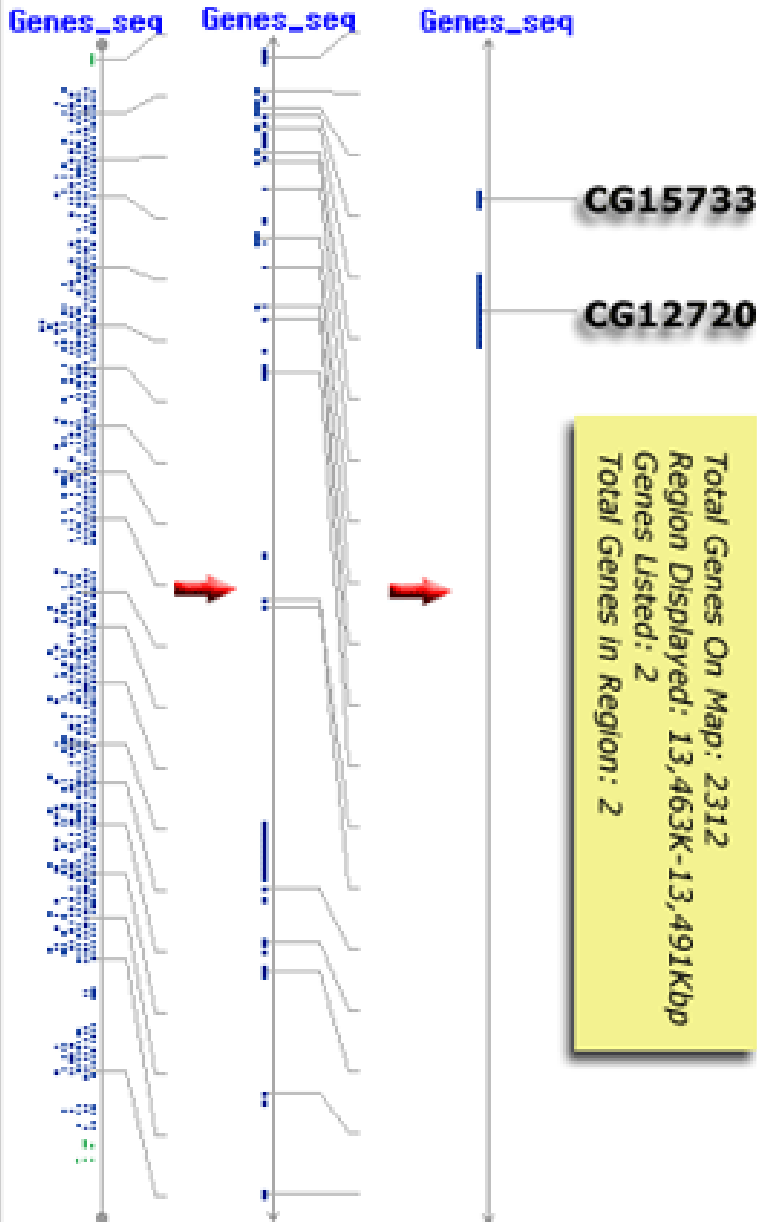
Cílem genetického mapování je určit pořadí genů a jejich vzdálenosti na chromozomech.

- Kolik má organismus chromozomů
- Na kterém chromozomu se jaký gen nachází
- V jakém pořadí jsou geny na chromozomu umístěny; jak jsou od sebe geny vzdáleny

Počet chromozomů lze stanovit běžnými mikroskopickými technikami pomocí vhodného cytogenetického barvení.

Pro stanovení pořadí a vzdáleností genů na chromozomech se využívá zákonů genové vazby. V současné době je již běžné **sekvenování**, což je proces, během kterého zjistíme kompletní sekvenci nukleotidů jaderné molekuly DNA organismu.

1. chromozom *Drosophila Melanogaster*



postupné přiblížení oblasti dvou genů

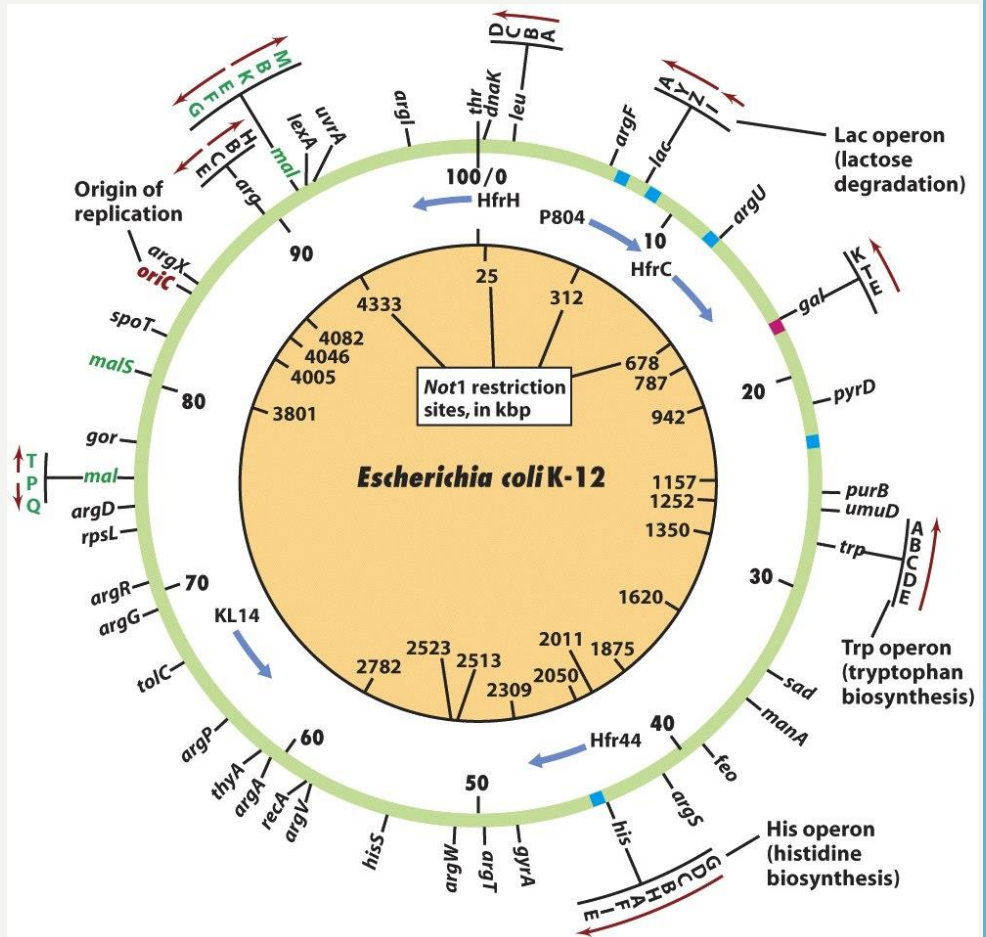


Figure 10-42 Brock Biology of Microorganisms 11/e
 © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

GENOVÉ MAPOVÁNÍ/MAPOVÁNÍ GENOMU

Genomika = obor genetiky, který se zabývá studiem genomů organismů. Spadá sem především získávání sekvencí DNA organismů, genetické mapování a anotace genomů, tedy hledání genů a dalších funkčních elementů (snaha určit význam sekvence) a intergenomický výzkum, tedy snaha srovnávat genomy různých organismů.

Velké množství genů (přesněji jejich mutovaných forem) bylo objeveno až jako původci různých dědičných onemocnění. I obecně platí, že nejlépe funkci genu poznáme, když mutací tento gen vyřadíme z funkce.

Vzhledem k tomu, že z etických důvodů nelze provádět cílenou mutagenezi a některé další pokusy na člověku, jsou pro další výzkum lidského genomu nedocenitelné výsledky získané u jiných organismů, které jsou potom porovnávány s dosavadními výsledky výzkumu u člověka (komparativní genomika).

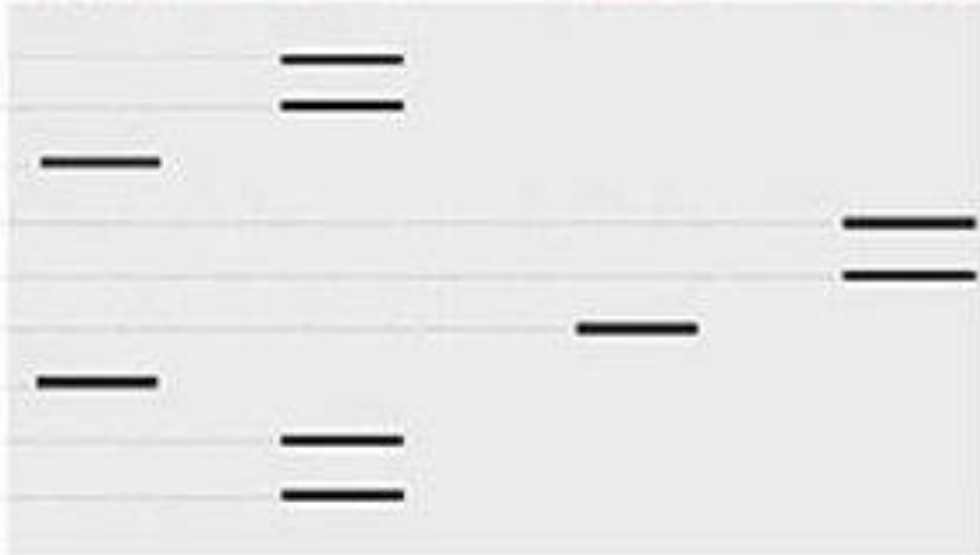
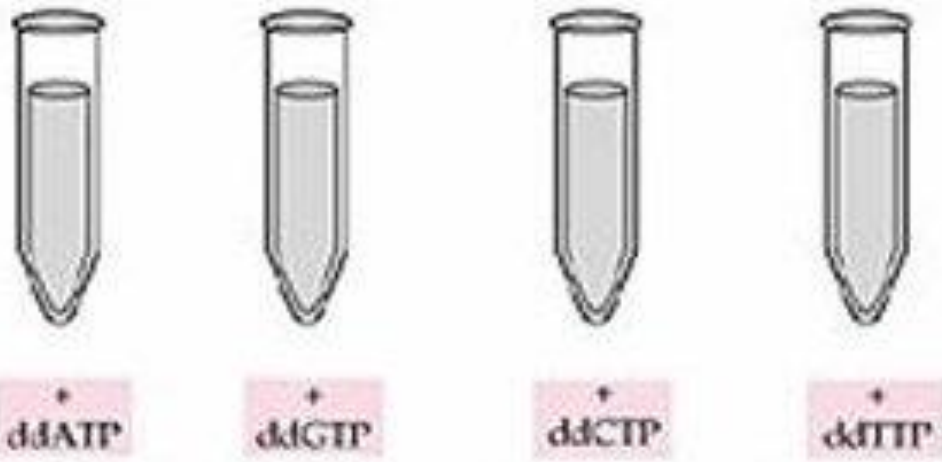
SEKVENOVÁNÍ

- **Sekvenování** DNA (též sekvenace či sekvencování, mnohdy také „čtení“ DNA) je souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA.
- =určení přesné sekvence nukleotidů v úseku DNA
- byly vynalezeny dvě metody - Sangerova a Maxam & Gilbertova.

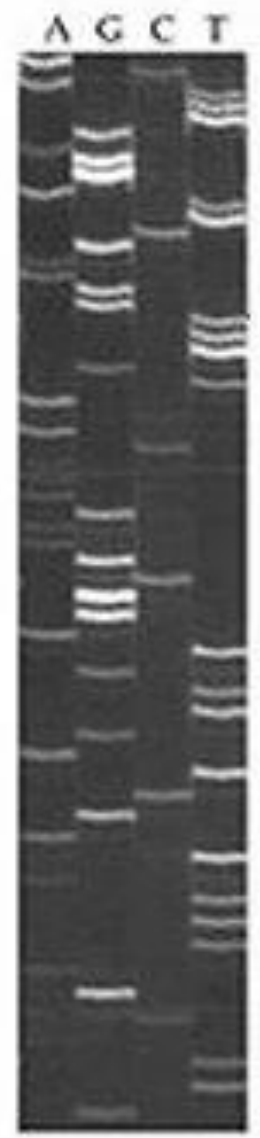
SEKVENOVÁNÍ

Sangerova technika

- Vybraná sekvence se vloží do reakční směsi, jež obsahuje vhodný radioaktivně označený primer, DNA polymerázu, zásobu čtyř esenciálních deoxyribonukleotidů, ale navíc také jeden ze čtyř dideoxynukleotidů. Dideoxynukleotid je schopen se začlenit do replikující se DNA, ale následně zastaví elongaci řetězce, protože nemá OH skupinu, na níž by se připevnil další nukleotid. Každý dideoxynukleotid se vloží do jedné ze čtyř nádob se vzorkem a všechny replikované sekvence v dané nádobě tedy zákonitě skončí dideoxynukleotidem svého typu.
- Výsledkem je směs různě dlouhých sekvencí DNA, které začínají radioaktivním primerem a končí daným dideoxynukleotidem. Když se seřadí na elektroforéze podle délky, můžeme snadno porovnáním čtyř vedle sebe umístěných elektroforetických gelů zjistit, jak za sebou následovaly nukleové báze ve zkoumané sekvenci DNA.



G
G
A
T
T
C
A
G
G



GENOVÁ TERAPIE

- Genová terapie představuje léčbu pomocí úpravy genetické informace.
- První případy této léčby již byly vyzkoušeny i na lidských pacientech.
- Pro současnou experimentální genovou terapii jsou vybírány choroby, pro které jiná léčba neexistuje a které mají velmi těžký, často letální průběh.

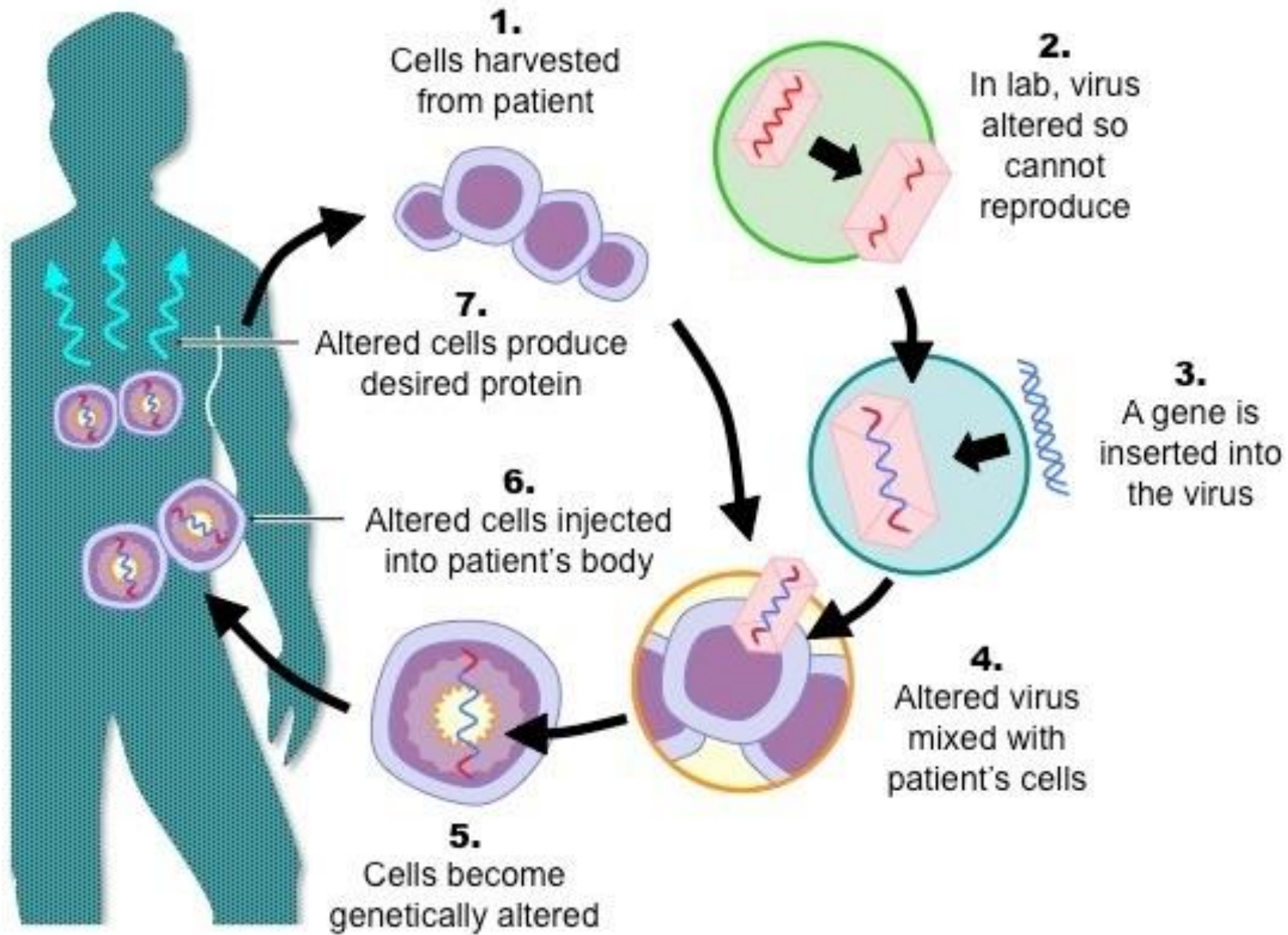
GENOVÁ TERAPIE

- Musíme znát přesnou příčinu genetické choroby. Tedy musíme znát přesný gen(y), jeho umístění, povahu produktu a hlavně mechanismus **patologického účinku**.
- Patologicky totiž může působit jak deficit normálního genového produktu, tak i pozměněný produkt mutovaného genu. **Samozřejmostí je znalost přesné sekvence zdravého genu.**

GENOVÁ TERAPIE

Podle patologického mechanismu:

- patologický nedostatek genového produktu - potom stačí dodatečné zařazení nemutovaného genu kamkoliv do genomu příslušných buněk.
- patologicky působí pozměněný produkt mutovaného genu - je nutné buď **opravit mutovaný gen** (to by byla pravá kauzální terapie – odstranění příčiny) nebo zablokování tohoto genu (odstranění genu, zamezení transkripce...). S tím souvisí i zajištění fyziologické aktivity tohoto genu (posílení, nebo utlumení transkripce, je-li potřeba).
- Součástí strategie je i volba vhodného vektoru (nosiče) a vytipování cílových buněk genové terapie.



GT JE PŘEDMĚTEM DISKUZÍ...

- Výhody vs. nevýhody
- Velmi vysoká finanční náročnost takovéto terapie.
- Technická a technologická náročnost.
- Nízká úspěšnost terapie, pokud jsou problémy s "uchycením" vnášené genetické informace.
- Genová terapie je eticky problematická.

GT JE PŘEDMĚTEM DISKUZÍ...

- Bude potřeba přesně vymezit hranici mezi tím, na co je ještě etické genovou terapii použít a na co už ne.
- Budou v budoucnosti "děti na objednávku"?
- Pokud budeme umět vytvářet děti bez genetických chorob - nemohly by tyto děti být také fyzicky zdatnější?
- Budeme si moc určit barvu očí, vlasů či výšku našich dětí?

- Klíčové pojmy: definice genového inženýrství, genomika, sekvenování,