

MIKROBIOLOGIE V BIOTECHNOLOGII

Biotechnologie

- Termín biotechnologie byl poprvé použit v roce 1917
 - Procesy, při kterých se na tvorbě výsledného produktu podílejí živé organismy
- Širší definice: biotechnologie se zabývá výrobou komerčních produktů produkovaných metabolickou činností živých organismů
- Moderní biotechnologie předpokládá použití geneticky modifikovaných organismů
- Mikroorganismy jsou v biotechnologii využívány přímo jako zdroj produktů nebo jako nástroj pro genetické manipulace jiných organismů

Průmyslový biotechnologický proces

- Příprava mikroorganismu a surovin nutných pro růst mikroorganismu a produkci požadovaného produktu (upstream processing)
- Fermentace a biotransformace
 - Kultivace mikroorganismu a tvorba požadovaného produktu
- Purifikace produktu z kultivačního média nebo buněčné masy (downstream processing)

Tradiční biotechnologie

- Primárně využívá přirozených metabolických schopností mikroorganismů
- Efektivita procesu zpočátku optimalizována na úrovni konstrukce bioreaktoru, upstream a downstream zpracování
- Zvýšení výtěžku produktu na genetické úrovni realizováno pomocí klasických metod šlechtění
 - Mutace indukované chemickými mutageny nebo zářením
 - Náhodné
 - Selektce produkčních kmenů
 - Zdlouhavé a drahé
 - Zlepšení již existujících dědičných vlastností

Molekulární biotechnologie

- Využívá geneticky modifikované (mikro)organismy
- Vyžaduje znalost genů a manipulaci s nimi
- Zásadní roli měl rozvoj **technologie rekombinantní DNA**
 - Techniky izolace genů a jejich přenosu z jednoho organismu do druhého
- Umožňuje přímější optimalizaci biotransformačního stupně biotechnologického procesu
- Vytváření vysoce produktivních mikrobiálních kmenů, často s novými vlastnostmi
- Rostliny a živočichové jako bioreaktory
- První komerční produkt molekulární biologie = inzulin
 - 1978
 - *Escherichia coli*

Genové inženýrství

- Proces záměrné genetické modifikace buněk změnou nukleotidové sekvence
- **Geneticky upravená buňka (organismus)**
 - Buňka (organismus) jejíž genom byl pozměněn metodami genového inženýrství
 - Buňka (organismus) obsahující klonované geny, které jsou exprimovány
- **2 důležité rysy:**
 - DNA může pocházet z různých zdrojů (do *E. coli* mohou být klonovány geny z člověka, rostlin, jiných bakterií)
 - Izolace těchto genů a jejich zavedení do hostitelské buňky se děje ve zkumavce (*in vitro*) a ne v přirozeném prostředí bakterií (organismů)

Principy genového inženýrství

- Techniky genového inženýrství jsou založeny na základních principech molekulární genetiky a biochemie
- Nutnost znalosti replikace, transkripce, translace a regulace kontroly těchto procesů
- Techniky vycházejí z přirozených procesů v buňce, ale DNA může pocházet z různých organismů (rostlina, člověk, bakterie)
 - Transgen
 - Gen jednoho organismu, který byl vložen do jiného organismu
 - Transgenní organismy

Technologie rekombinantní DNA

- Soubor technik, které zahrnují manipulaci DNA ve zkumavce a jejichž výsledkem je vytvoření nové DNA molekuly
- Rekombinantní DNA
 - DNA molekula obsahující DNA, která pochází ze dvou nebo více zdrojů
 - Vytvořena „in vitro“

Vytváření rekombinantní DNA

- Klonování genů
 - Odstranění genu z jejich běžné DNA sekvence, vložení do vektoru (plasmid nebo bakteriofág) a jeho množení v novém hostiteli (obvykle *E. coli*)
- Exprese genů
 - Pro využití rekombinantní DNA v biotechnologii je nezbytná funkční exprese klonovaných genů

Obecný postup klonování genů

- Izolace a fragmentace zdrojové DNA
- Připojení fragmentů ke klonovacímu vektoru
- Zavedení a udržení klonované DNA v hostitelském organismu

Učebnice Madigan a kol.,
obr. 12.5, str. 317

Klonování technikou „shotgun“

- Náhodné klonování DNA fragmentů (tvorba genové knihovny)
- Jsou klonovány všechny geny organismu a teprve potom je identifikován gen, o který se zajímáme
- Zdrojem DNA je celková genomová DNA
- Využití také pro sekvenování genomů

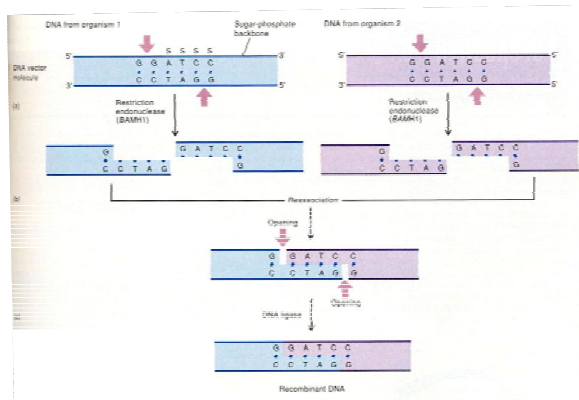
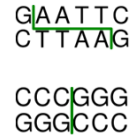
Hlavní kroky „shotgun“ techniky

1. Uvolnění a izolace DNA z buňky
2. Konstrukce rekombinantní DNA molekuly (restrikční endonukleasy, zapojení DNA do plasmidu)
3. Zavedení rekombinantní DNA do hostitelského organismu (*E. coli*) procesem DNA transformace
4. Výběr hostitelských buněk, které obsahují rekombinantní DNA (obvykle inokulací na medium obsahující antibiotikum)
5. Identifikace buněk obsahujících požadovaný rekombinantní DNA klon (hybridizace)

Konstrukce rekombinantní DNA molekuly

- Štěpení DNA **restrikčními enzymy** (endonukleasami)
 - Rozpoznávají a připojují se na specifické sekvence bází v DNA a přerušují fosfoesterovou vazbu
- DNA se musí připojit k **vektoru**
 - DNA molekula, která je schopna nezávislé replikace v hostitelském organismu
 - Plasmidy
 - Snadná izolace a purifikace
 - Množení v mnoha kopiích
 - Přítomnost selekčních markerů
 - Víry
- Připojení k vektoru pomocí **DNA ligasy**
 - Vytvoří kovalentní vazbu mezi DNA vektorem a klonovanou DNA
- **Genová knihovna**
 - Soubor všech genů organismu, které byly vloženy do klonovacích vektorů

Učebnice Madigan a kol., tab. 12.1, str. 315



Funkce restrikční endonukleasy a DNA ligasy

Zavedení rekombinantní DNA do hostitelského organismu

- **Hostitel**
 - Rychlý růst v levném médiu
 - Mikroorganismy
 - Prokaryotní (*E. coli*)
 - Eukaryotní (*S. cerevisiae*, *Pichia pastoris*, buněčné kultury)
- **Metoda transformace**
 - DNA je přenesena přes buněčnou stěnu a cytoplasmatickou membránu
 - Kompetentní buňky
 - Elektroporace
 - Na buňku se působí elektrickým proudem, který způsobí otvory v buněčné stěně a DNA vstupuje do buňky

Selekce buněk obsahujících rekombinantní DNA

- Ne všechny buňky byly transformovány (neobsahují rekombinantní DNA)
- Využití klonování do plasmidu, který obsahuje gen pro rezistenci k určitému antibiotiku
 - Přímá selekce na médiu obsahujícím antibiotikum
 - Vektor musí být rezistentní k antibiotiku, hostitel citlivý
 - Kanamycin, ampicilin

Identifikace rekombinantního klonu

- **Metoda hybridizace nukleových kyselin**
 - DNA nebo RNA sonda (próba)
 - Molekula DNA nebo RNA (i část), která má stejnou sekvenci nukleotidů jako hledaný gen
 - Značení pomocí radioaktivní, fluorescenční nebo barevné značky
 - Využití komplementarity bází
 - Jako vzorek slouží DNA
 - Southern hybridizace
- Pokud je gen exprimován, je možné sledovat **přítomnost proteinu**
 - Kultivace kolonie na specifickém médiu

Učebnice Madigan a kol., obr. 12.18, str. 333

Identifikace rekombinantního klonu

Další zdroje DNA pro klonování

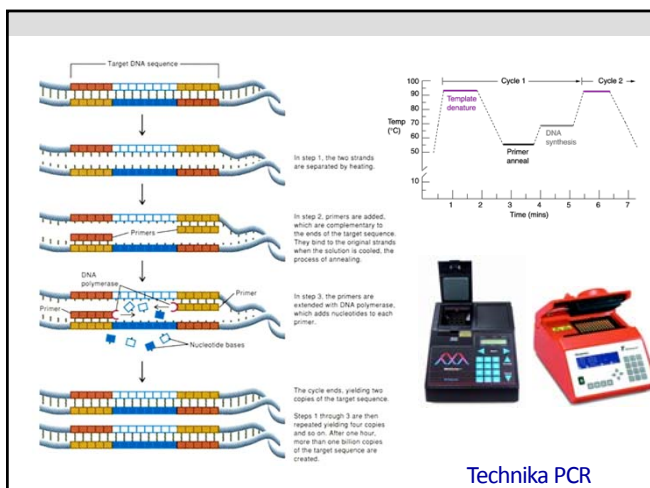
- Gen amplifikovaný pomocí PCR
 - Klonování známého genu
- DNA syntetizovaná z mRNA
 - Reverzní transkriptasa
 - Eukaryotické geny
- Syntetická DNA
 - Využití známé sekvence proteinu
- Postup klonování obdobný jako u shotgun metody
 - Obvykle postačí jednoduchá selekce transformantů

PCR

- PCR = polymerase chain reaction (polymerasová řetězová reakce)
- Úseky DNA mohou být znásobeny *in vitro* až $10^9 \times$ během 1 hodiny
- Výsledkem je velké množství specifických genů pro klonování, sekvenování a cílené mutace
- Využití i pro identifikaci mikroorganismů, které nemohou být kultivovány

Postup při PCR

- Příprava reakční směsi
 - Vzorek DNA
 - DNA polymerasa
 - Směs nukleotidů
 - Primery
 - Krátké syntetické úseky DNA homologní k zesilované DNA
 - Vždy 2
- PCR cyklus
 - Denaturace DNA (teplem, vlákna se oddělí)
 - Připojení DNA primerů na oba konce kopírované DNA (po ochlazení)
 - Syntéza dvou vláken z primerů, každé komplementární k jednomu z původních vláken
 - Termostabilní DNA polymerasa (*Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus*)
 - Opakování cyklu
- Termocykler



Expres klonovaných genů

- Klonování je úspěšné jen tehdy, je-li klonovaný gen exprimován (tj. funkční) v novém hostiteli
- Hostitelská buňka musí rozpoznat promotor, vazebné místo ribozomu, startovací a koncový signál pro transkripci a translaci
 - Původní promotorová oblast a vazebné místo ribozomu může být nahrazeno odpovídajícími sekvencemi *E. coli*
 - Expresní vektory
- Regulace kontroly exprese
 - Fúze klonovaného genu s promotorem a operátorem

Expresí klonovaných genů

- Expresí eukaryotických genů v bakteriích není snadná
- Eukaryotické geny obsahují introny, které bakterie neumí odstranit a geny nejsou exprimovány v *E. coli*
 - Odstranění intronů před klonováním
 - Klonování pomocí mRNA
 - Získání genu pomocí známé sekvence proteinu (syntetický gen)
- Geny musí být umístěny pod bakteriálním promotorem
- Účinnost translace je ovlivněna preferencí kodonů
- Řada posttranslačních modifikací u savčích proteinů, kterých bakterie nejsou schopny
- Čím více jsou organismy příbuzné, tím je pravděpodobnější, že geny budou exprimovány
- Využití eukaryotických hostitelů
 - Kvasinky, buněčné kultury, zvířata, rostliny

Klonování genu pomocí mRNA

- Pro klonování eukaryotických genů
- Izoluje se mRNA (bez intronů)
 - Využití poly-A řetězce k separaci mRNA od ostatní RNA
- *In vitro* se syntetizuje komplementární DNA vlákno
 - Reverzní transkriptasa
- To je převedeno na dvouvláknovou DNA, která je potom naklonována do vektoru

Učebnice Madigan a kol.,
obr. 26.1, str. 763

Klonování genu pomocí proteinu

- Syntéza genu na základě známé sekvence proteinu
- Reverzní translace
 - *In silico*
 - Problémem je degenerace genetického kódu
- Příprava syntetické DNA

Učebnice Madigan a kol.,
obr. 26.2, str. 764

Skládání a stabilita proteinů

- Degradace vytvořeného proteinu proteasami
- Toxicita eukaryotických proteinů pro prokaryotického hostitele
- Tvorba inkluzních tělísek
 - Problémy ze solubilizací proteinů
- Nesprávné skládání proteinu

Aplikace genového inženýrství v biotechnologii

- (Mikro)organismy mohou být manipulovány za vzniku nových vlastností a metabolických schopností
- Množství proteinu kódovaného genem může být u mikroorganismů zvýšeno naklonováním genu do plasmidu vyskytujícího se v mnoha kopiích
- Výroba klinicky důležitých proteinů
- Vakcíny
- Zemědělství
- Další aplikace

Klinicky významné proteiny

- *E. coli* a kvasinky se využívají pro výrobu klinicky důležitých proteinů
 - Hormony
 - Inzulín
 - Růstové faktory
 - Krevní proteiny
 - Faktor VII, VIII, IX (proteiny nutné pro srážlivost krve)
 - Imunomodulátory
 - Interferon α (antivirová a protinádorová aktivita)
 - Interferon β (léčba sklerózy)
 - Lysozym (protizánětlivá aktivita)
 - Terapeutické enzymy
 - DNAasa (léčba cystické fibrosy)

Vakcíny

- Suspenze mrtvých nebo modifikovaných bakterií a virů
- Jsou používány k imunizaci proti nemocem, vyvolávají imunitní odezvu
- Hepatitida A a B, spalničky, vzteklna, chřipka, obrna, cytomegalovirus
- Tetanus, záškrť

Vakcíny

- **Rekombinantní vakcíny**
 - Delece virulentních genů
- **Vektorové vakcíny**
 - Přidání genů udělujících imunitu relativně nepatogennímu organismu
- **Polyvalentní vakcíny**
 - Kombinace obou přístupů
 - Imunita k více patogenům
- **Subjednotkové vakcíny**
 - Klonování pouze specifických proteinů nebo jejich imunizujících částí
 - Např. obalové proteiny viru
 - Využití eukaryotních hostitelů (glykosylace)
- **DNA vakcíny**
 - Využití genetického materiálu patogenu k imunizaci
 - Tvorba imunogenního proteinu v organismu

Bioremediace

- Upravené mikroorganismy se využívají pro degradaci zdraví škodlivých látek (např. olejové skvrny, těžké kovy, herbicidy)

Konstrukce metabolických drah

- Sestavování nových nebo vylepšování existujících metabolických drah
 - Vyšší produkce požadovaných metabolitů
- Obvykle u mikroorganismů
 - Jednodušší manipulace než u vyšších organismů
- Geny kódující enzymy metabolické dráhy mohou pocházet z jednoho nebo více organismů, musí však být klonovány a exprimovány synchronizovaným způsobem
- Modifikované mikroorganismy jsou využity pro výrobu různých produktů
 - Ethanol
 - Rozpouštědla
 - Aditiva
 - Barviva
 - Antibiotika

Aplikace v zemědělství

- Obvykle nepřímý způsob využití mikroorganismů
 - Využití mikrobiálních genů a jejich produktů
 - Využití mikroorganismů pro klonování
- Transgenní rostliny
- Transgenní zvířata

Transgenní rostliny

- Rostliny jsou geneticky upravovány tak, aby získaly různé formy rezistence
 - Rezistence k hmyzu, virovým a bakteriálním onemocněním, herbicidům
 - Rezistence ke stresovým podmínkám (sucho, salinita atd.)
- Zlepšení vlastností
 - Oddálení kažení
 - Zlepšení výživových hodnot
 - Zvýšení výnosu
- Výroba lidských protilátek, proteinů, vakcín („jedlé vakcíny“)
- Využití pro odstraňování těžkých kovů z půdy
- Geny se zavádějí do rostlinného organismu pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens

- Způsobuje nádory na rostlinách
- Schopna přenášet geny do rostlin pomocí Ti (*tumor-inducing*) plasmidu, jehož část (T-DNA) se zabudovává do chromozomu rostlinné buňky
- T-DNA kóduje enzymy pro syntézu rostlinných hormonů
- Geny pro syntézu hormonů mohou být nahrazeny jinými geny, které budou přeneseny do rostliny a začleněny do rostlinné DNA
- Pro expresi genu v rostlině je nutné použít rostlinný promotor, vazebné místo ribozomu a stop signál

Učebnice Madigan a kol., obr. 26.9, str. 775

Princip transformace rostlin pomocí *Agrobacteria tumefaciens*

Bakteriální toxiny jako insekticidy

- *Bacillus thuringiensis* – Bt toxin
- Syntetizuje proteinový krystal v době vytváření endospor
- Různé kmeny syntetizují různé toxiny
 - Toxický pro larvy motýlů a molů
 - Některé kmeny i toxiny proti larvám brouků a much
- Klonování do *Pseudomonas* nebo přímo do rostlin (Bt kukuřice, Bt bavlna)

Rezistence k herbicidům

- Rezistence ke glyfosátu
- Normálně inhibuje syntézu aromatických aminokyselin
- Klonování genu kódujícího rezistentní formu klíčového enzymu a transformace do zemědělsky významných plodin
 - Gen izolován z mutantních bakterií rezistentních ke glyfosátu
- Sója

Transgenní zvířata

- Klonované geny jsou vneseny do oplozeného vajíčka mikroinjekcí
- Transgenní myši jako modelový systém pro studium fyziologie savců
- Zvířecí modely pro studium lidských onemocnění
- Produkce proteinů farmaceutického významu (pharming)
 - Užitečné zejména pro produkci lidských proteinů vyžadujících specifické posttranslační modifikace
- Zlepšování vlastností hospodářských zvířat
 - Produkce methioninu díky zavedeným bakteriálním genům
 - Degradace organického fosfátu (Enviro-pig™)
 - Zvýšená produkce omega-3-mastných kyselin
 - Rychle rostoucí losos

Genové inženýrství a výzkum mikroorganismů

- Využití v základním výzkumu mikroorganismů
- Vytváření nových mikrobiálních kmenů poskytuje nástroj pro studium základních mikrobiálních procesů (vztah struktury a funkce, buněčný růst, regulace enzymů, mikrobiální ekologie)
- Využití cílené mutace, přerušení genů, knockout mutace pro studium mutovaného organismu
- Geny mohou být různě označeny pro zlepšení identifikace proteinu (reportérový gen), zjednodušení purifikačního postupu
 - Fúzní proteiny