

# Genetické manipulácie

Diana Krajmerová - Katedra fytoľógie LF TU

Jana Libantová - Ústav genetiky a biotechnológií SAV, Nitra

# Legislatívna úprava

- Zákon č. 151/2002 Z. z. o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov v znení neskorších predpisov
- Vyhláška Ministerstva životného prostredia Slovenskej republiky č. 399/2005 Z. z., ktorou sa vykonáva zákon č. 151/2002 Z. z. o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov v znení neskorších predpisov
- **Posudok z posudzovania rizika v uzavretých priestoroch**
- **Posúdenie rizika pri zámernom uvoľňovaní, identifikácia účinkov a vykonávanie analýzy kumulatívnych dlhodobých účinkov**

# Komisia pre biologickú bezpečnosť

- **Rozhodnutie ministra životného prostredia Slovenskej republiky z 24.9. č. 46/2004 - 5.2. ktorým sa zriaďuje Komisia pre biologickú bezpečnosť a jej zbor expertov**
- V zmysle § 27 zákona č.151/2002 Z. z. o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov a pre zabezpečenie riadeného narábania s geneticky modifikovanými organizmami
- Stáli členovia a zbor expertov

Fyzická alebo právnická osoba, ktorá chce používať na Slovensku genetické technológie a GMO musí splniť nasledovné podmienky

- požiadať o vydanie súhlasu a splniť podmienky vo vydanom súhlase
- posúdiť environmentálne riziko
- určiť osobu zodpovednú za bezpečnosť používania genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov
- vypracovať havarijný plán
- viesť podrobnú dokumentáciu

Posúdenie rizika pri zámernom uvoľnení zohľadňuje vedecko-technické údaje, ktoré sa týkajú charakteristiky

- a) každého prijímajúceho alebo rodičovského organizmu,
- b) každej genetickej modifikácie, či už je to vloženie, alebo vyňatie genetického materiálu a príslušných informácií o vektore a donorovi,
- c) geneticky modifikovaného organizmu,
- d) zamýšľaného uvoľnenia,
- e) možného prijímajúceho životného prostredia a vzájomného pôsobenia medzi nimi.

# Posúdenie rizika pri zámernom uvoľňovaní, identifikácia účinkov a vykonávanie analýzy kumulatívnych dlhodobých účinkov

Účinky zámerného uvoľňovania geneticky modifikovaných organizmov do životného prostredia môžu byť

- a) **priame**, ktorými sú všetky primárne účinky na zdravie ľudí alebo na životné prostredie, ktoré sú následkom priameho pôsobenia geneticky modifikovaného organizmu,
- b) **nepriame**, ktorými sú všetky účinky na zdravie ľudí alebo na životné prostredie, ktoré sa vyskytujú ako následok náhodného sledu udalostí prostredníctvom mechanizmov, akými je vzájomné pôsobenie s inými organizmami, prenos genetického materiálu, zmeny v používaní alebo v riadení; pozorovania nepriamych účinkov budú pravdepodobne následné,
- c) **bezprostredné**, ktorými sú všetky účinky na zdravie ľudí alebo na životné prostredie pozorovateľné už počas uvoľňovania geneticky modifikovaných organizmov; môžu byť priame, alebo nepriame,
- d) **oneskorené**, ktorými sú všetky účinky na zdravie ľudí alebo na životné prostredie nepozorovateľné počas uvoľňovania geneticky modifikovaných organizmov, ktoré sa však prejavia ako priamy účinok alebo ako nepriamy účinok až v neskoršom štádiu uvoľňovania alebo až po jeho skončení,
- e) **kumulatívne dlhodobé**, ktorými sú všetky sústredené účinky na zdravie ľudí a na životné prostredie vrátane účinkov na rastliny a zvieratá, na úrodnosť pôdy, na čistotu organického materiálu, na potravinový reťazec, na biologickú rôznorodosť, na zdravie zvierat, na odolnosť proti antibiotikám používaným v humánnej liečbe alebo vo veterinárnej liečbe, ktoré sú významné z hľadiska umiestnenia na trh.

# Genetické modifikácie

- Základným predpokladom genetických modifikácií je univerzálna prítomnosť nukleových kyselín ako nosičov dedičnej informácie
- Pôsobenie enzýmov na DNA restriktáza a ligáza - základ pre klonovanie, vznik rekombinantných génov z viacerých druhov organizmov
- Vnesenie (alebo odstránenie) genetickej informácie = úseku DNA
- najčastejšie ide o vnesenie kódujúcej sekvencie génu
- pre tvorbu funkčného proteínu v inom organizme sú potrebné aj regulačné sekvencie
  
- Trans - prenos génov z jedného organizmu do iného - transgenóza
- Cis – vnesenie DNA toho istého organizmu - cisgénne organizmy

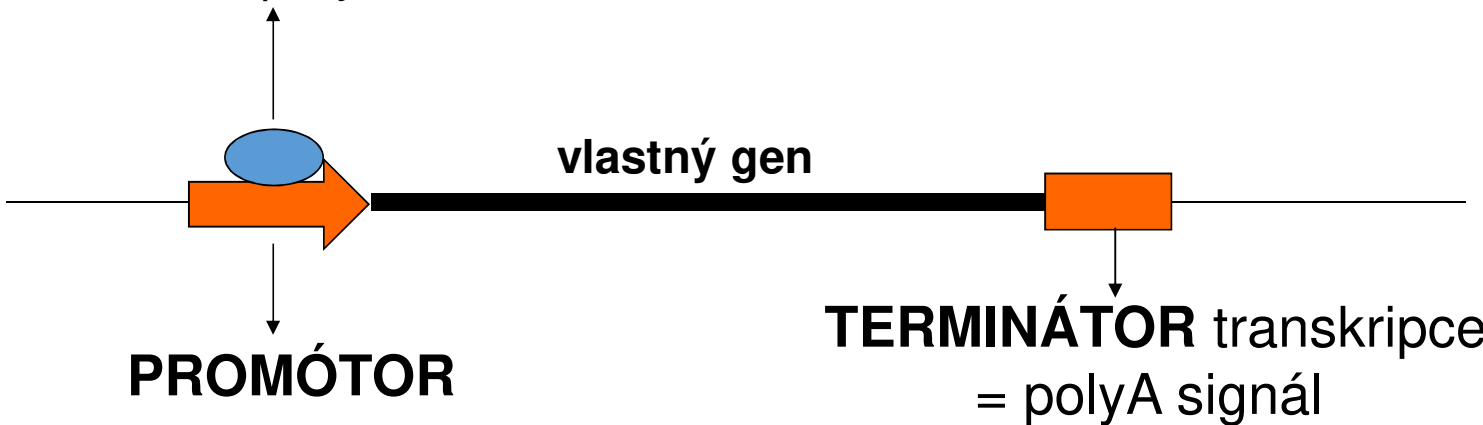
# Gén

- Gén je sekvencia DNA, ktorá kóduje vznik funkčnej molekuly RNA alebo bielkoviny
- Obsahuje sekvenciu pre vznik proteínu a **regulačné mechanizmy**, ktoré ovplyvňujú miesto, čas a mieru expresie
- Obsahuje sekvencie, ktoré sa neexprimujú – intróny (u eukaryotov)
- RNA – funkčná molekula  
templát pre vznik proteínu
- Bielkoviny – enzýmy, ktoré katalyzujú biochemické reakcie  
štrukturálne alebo zásobné jednotky buniek, ktoré sa podieľajú na fenotype



# Gén

Transkripčný faktor



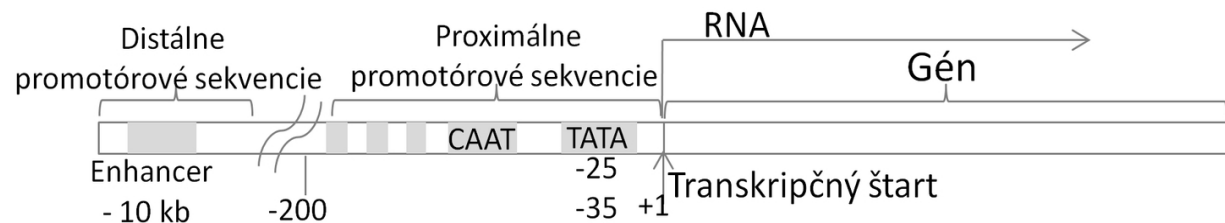
**vlastný gen**

**PROMÓTOR**

**TERMINÁTOR** transkripce  
= polyA signál

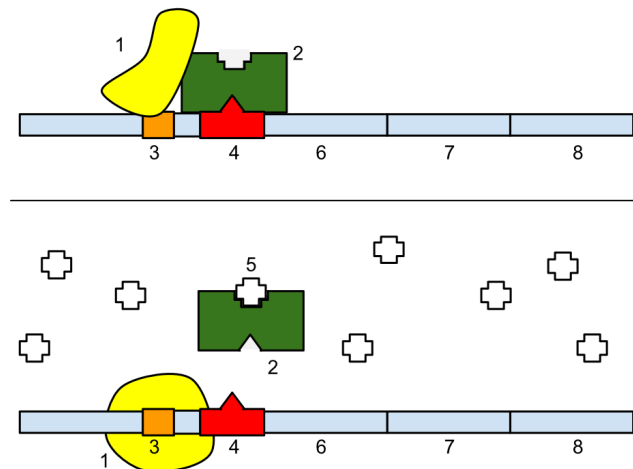
# Promótor

- Nevyhnutný pre naviazanie RNA polymerázy
- Iniciuje transkripciu génu
- Nachádza sa v blízkosti začiatku prepisu
- 100-1000 bp dlhý
- Určuje začiatok a smer transkripcie
- Viaže transkripčné faktory - ovplyvňujú mieru a čas expresie
- Enhancery, silenciery – úseky niekedy aj niekoľko kbp od génu, ohyb DNA pomocou regulačných proteínov – prepojenie s miestom transkripcie



# Transkripčné faktory

- Zapínajú a vypínajú gény
- Zaručujú, že sa gény exprimujú v správnom type buniek a v správnom čase
- Pracujú samostatne alebo s inými proteínmi tým, že napomáhajú alebo bránia naviazaniu RNA polymerázy (aktivátory vs. represory)
- Obsahujú aspoň jednu časť, ktorá sa viaže na DNA



# Identifikácia génov - prokaryotické organizmy

- neobsahujú intróny
- 6 čítacích rámcov (s posunom o jednu bázu, 3 dopredu, 3 dozadu)  
jednoduchý preklad do polypeptidu
- porovnanie s databázou - homologické sekvencie
- gén má typický pomer GC báz, frekvenciu kodónov a zloženie nukleotidov
- čítaciemu rámcu predchádza promótor

# Identifikácia génov - eukaryotické organizmy

- Kódujúce úseky tvoria iba malú časť génov
- Pri identifikácii génov musíme identifikovať všetky exóny a intróny
- Identifikácia hraníc exónov je založená na identifikácii miest splicingu – vystrihovania
  
- Metóda homológie – porovnanie s databázou
- Štatistické metódy na základe zloženia DNA – obsahu báz, dĺžky proteínov
- Kombinácia metód

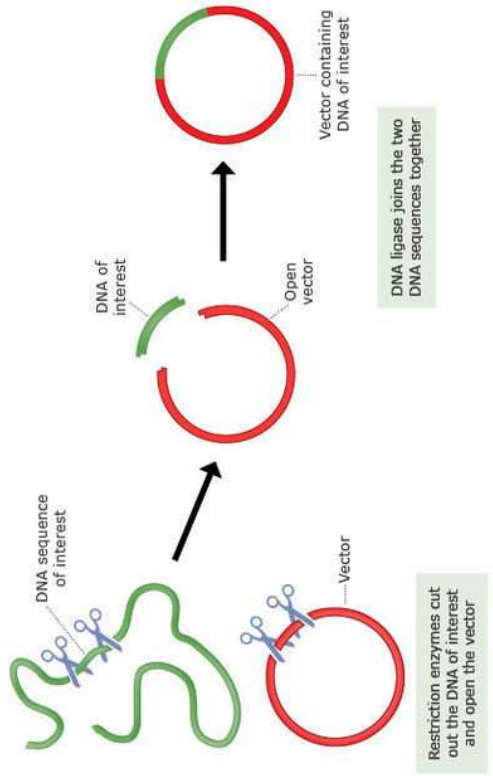
# Klonovací vektor

- Molekula DNA schopná přijat' cudzorodú DNA schopná autonómnej replikácie
- Fragment cudzorodej DNA spojená s klonovacím vektorom sa nazýva rekombinantná DNA
- Plasmid
- Vírusový vektor
- Umelý chromozóm BAC, YAC, HAC môžu obsahovať omnoho dlhšie fragmenty DNA 300 kbp
- Všetky typy vektorov musia obsahovať sekvencie pre replikáciu (origin of replication), polylinker (multicloning site) a selekčný markér.
  - Trasformácia - prenos vektoru do bakteriálnej bunky
  - Transfekcia - prenos vektoru do eukaryotickej bunky
  - Transdukcia - prenos virálneho vektoru

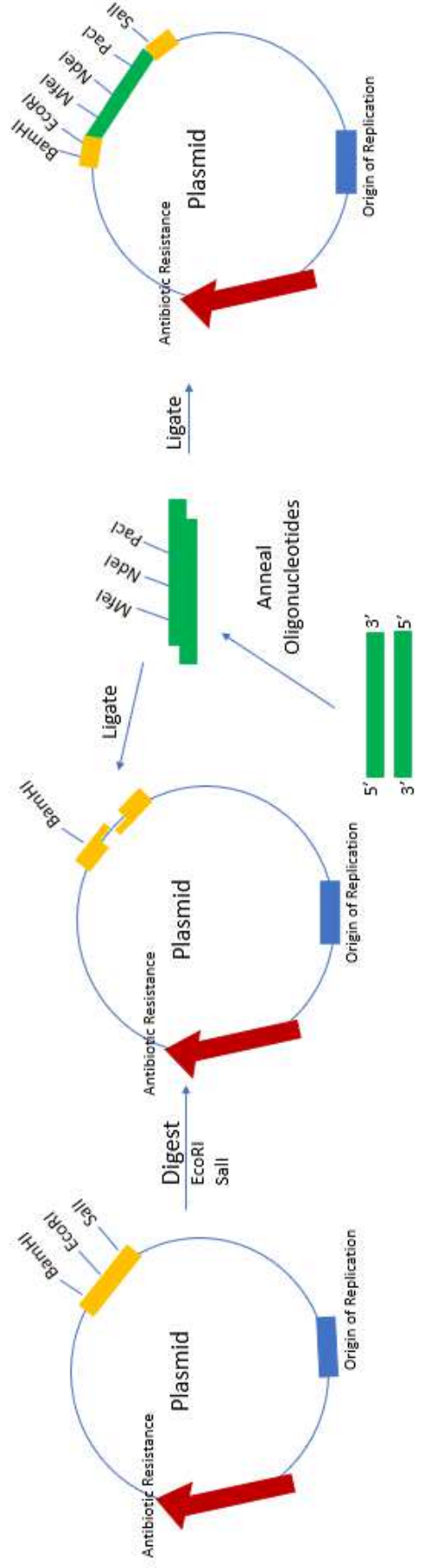
# Základná transgénná expresná jednotka

Promótor – gén záujmu- Terminátor –Promótor – selekčný gén- terminátor

- ak do organizmu vnášame viaceré gény, každá obsahuje vlastné regulačné elementy
- spájanie génu s regulačnými jednotkami sa uskutočňuje technikami rekombinantnej DNA
- vyžaduje to znalosť DNA regulačných sekvencií a génov a molekulárnych nástrojov ako sú restričné endonukleázy a ligázy
- množenie spojených úsekov regulačných jednotiek s génmi sa uskutočňuje po vložení do klonovacieho vektora v *E. coli*



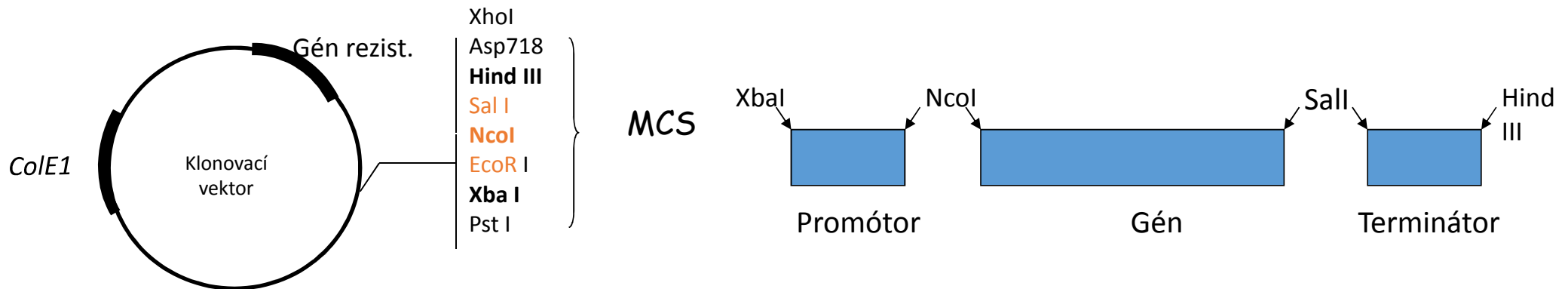
© Copyright, 2014, University of Waikato. All rights reserved.  
www.biotechlearn.org.nz





# Príprava rekombinantnej DNA

- štiepenie **vektora** s restriktívnymi enzýmami, ktoré štiepia vektor len raz v MCS (multiple cloning site) - polylinker
- štiepenie **DNA regulačných jednotiek a génu** vhodne navrhnutými enzýmami
- zmiešanie DNA fragmentov a spojenie komplementárnych koncov vlákien vektora a DNA fragmentov ligázou
- vloženie rekombinovaného plazmidu (rekombinantnej DNA) do *E. coli* transformáciou



# Promótoory

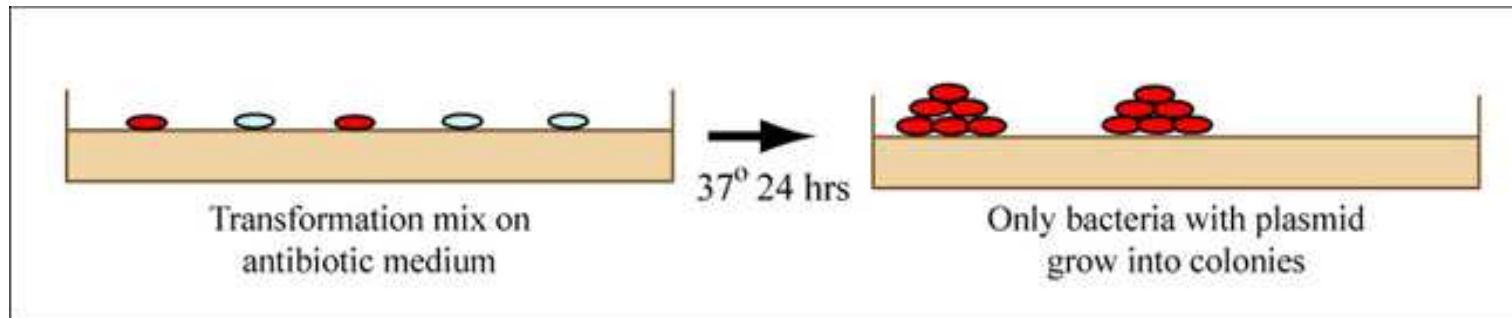
- Iniciácia transkripcie
- Univerzálne (konštitutívne)– transkripcia prebieha stále vo všetkých typoch pletív a vo všetkých typoch rastlín, CaMV 35S dvoklíčnolisté, Ubi (z kukurice) jednoklíčnolisté
- Pletivovo špecifické
- Vývojovo špecifické
- Regulovateľné – transkripcia prebieha za určitých podmienok napr. pri určitej teplote, za svetla, sucha, alebo sa aktivujú špecifickými biochemickými signálmi, napr. pri poranení rastliny alebo pri patogénnom ataku
- Prvá generácia transgénnych rastlín využívala hlavne konštitutívne promótoory. V poľnohospodárstve sa v súčasnosti pestujú transgénne plodiny s konštitutívnou expresiou transgénov. Avšak stále viac sa pozornosť sústreďuje na indukovateľnú, a orgánovo/pletivovo-špecifickú expresiu transgénov v rastlinách, ktorá je menej energeticky a nutrične náročná pre samotné rastliny a v mnohých prípadoch prijateľnejšia z hľadiska bio-bezpečnosti

# Selekčné gény

- Neoddeliteľná súčasť rastlinných transformačných vektorov
- Zabezpečujú svojim nositeľom – transformovaným bunkám selekčnú výhodu
  - odolnosť voči antibiotikám – **kanamycín, hygromycín, gentamycín, streptomycín**
    - Gén kódujúci neomycín fosfotransferázu II - gén nptII z transpozómu Tn5 *E. coli* K12 – inaktivuje aminoglykozidové antibiotiká, funkčnosť tohto génu je zabezpečená rastlinnými regulačnými sekvenciami
  - rezistencia voči herbicídom – **fosfinotricín, glyfosát, atrazín, bromoxynil**
  - gény rastlinných metabolických dráh – 4-metyltryptofán, treonín, adenín, pozitívna , negatívna selekcia, rastové hormóny, ťažko metabolizovateľné cukry



Netransformované pletivo zostáva biele, antibiotikum poškodzuje chloroplasty

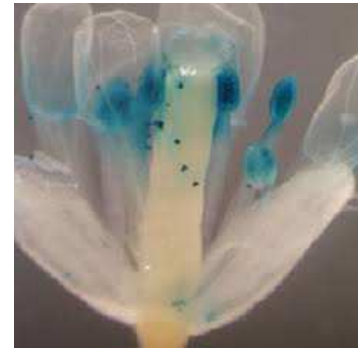
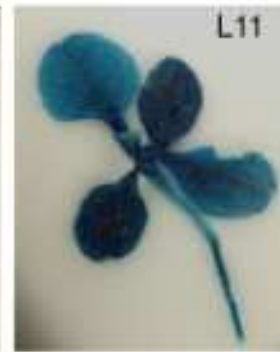


# Reportérové gény

- Poskytujú informáciu, že gén bol nielen vnesený, ale je aj funkčný
- Kódujú produkty, ktoré môžu byť detegované priamo alebo katalyzujú reakcie, ktorých produkty sú ľahko detegovateľné
- Ľahko kvantifikovateľné
- Nízke endogénne pozadie
- Detekcia je jednoduchá, rýchla a lacná
- Ideálny reportérový gén – unikátny a netoxický

# B-glukuronidázový gén - *gus*

- Ľahká kvantifikácia
- Vysoká citlivosť
- Dostatočná špecifickosť enzymatickej reakcie s minimálnou interferenciou bunkovým metabolizmom
- Hydrolyticky štiepi širokú škálu B-glukuronidov
- Kvalitatívna detekcia - histochemická - substrát X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-inodolyl glukuronid) výsledok je produkt modrého sfarbenia
- Izolovaný z *E.coli* K12

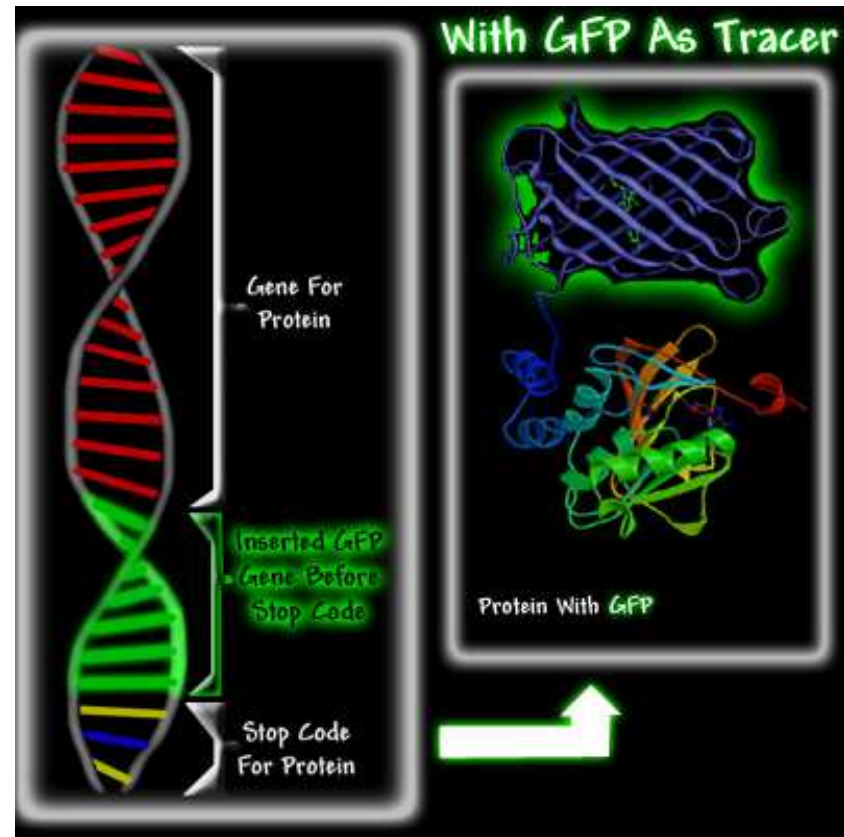
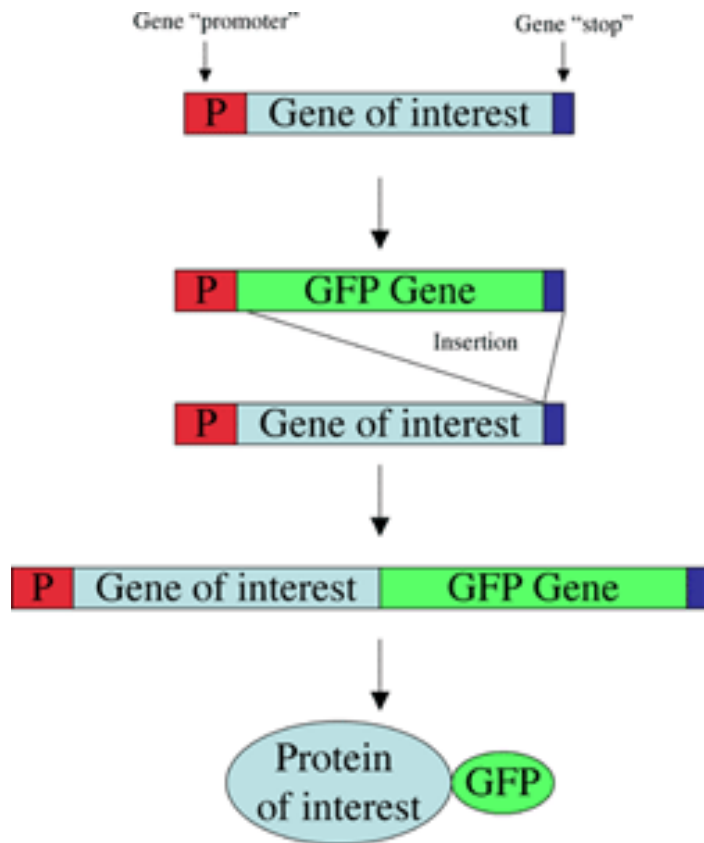


# Zelený fluorescenčný gén

- Kóduje tvorbu zeleného fluorescenčného proteínu
- Detekcia nevyžaduje prítomnosť substrátu
- ľahko detegovateľný pod UV alebo modrým svetlom – nedochádza k deštrukcii rastlinného materiálu
- Izolovaný z *Aequorea victoria*



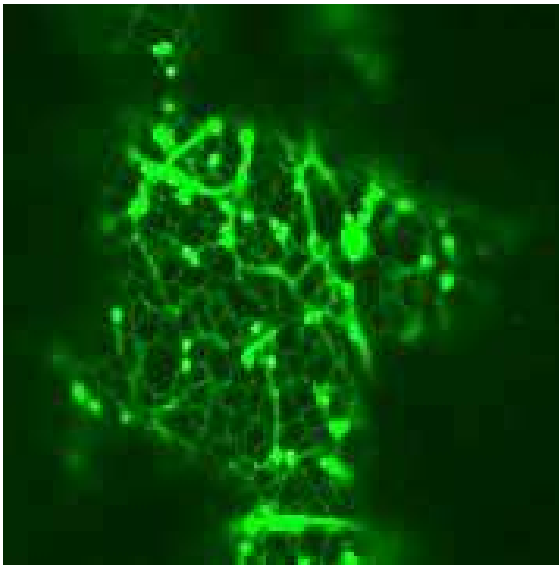
# Tvorba proteinu s GFP



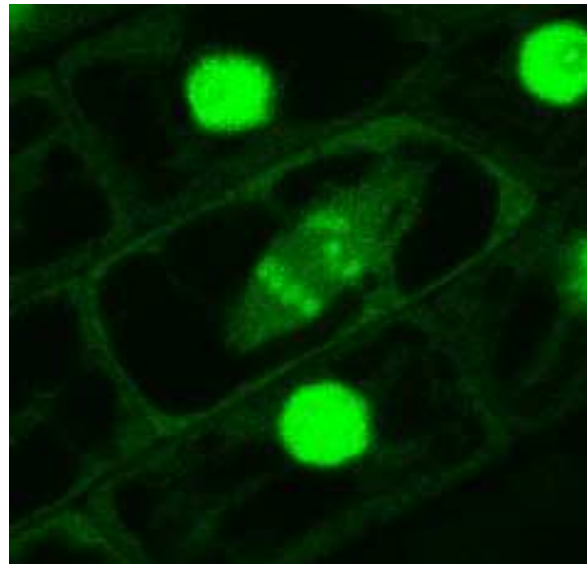


- Štúdium lokalizácie proteínov, proteínových interakcií
- Sledovanie rôznych reakcií v živej bunke – značenie bunkových štruktúr

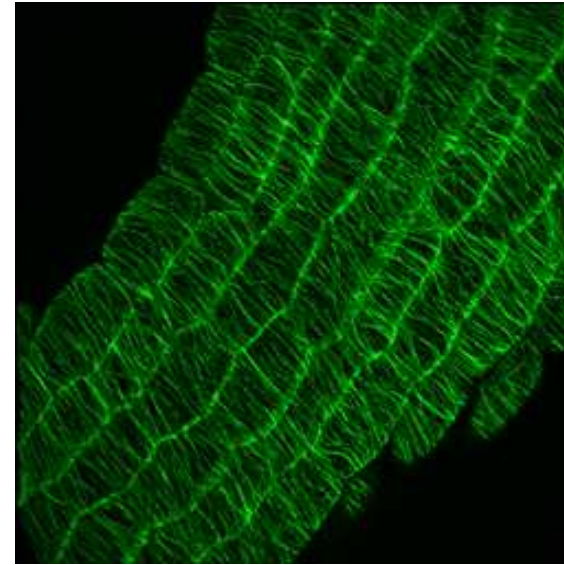
Golgiho aparát



chromozómy

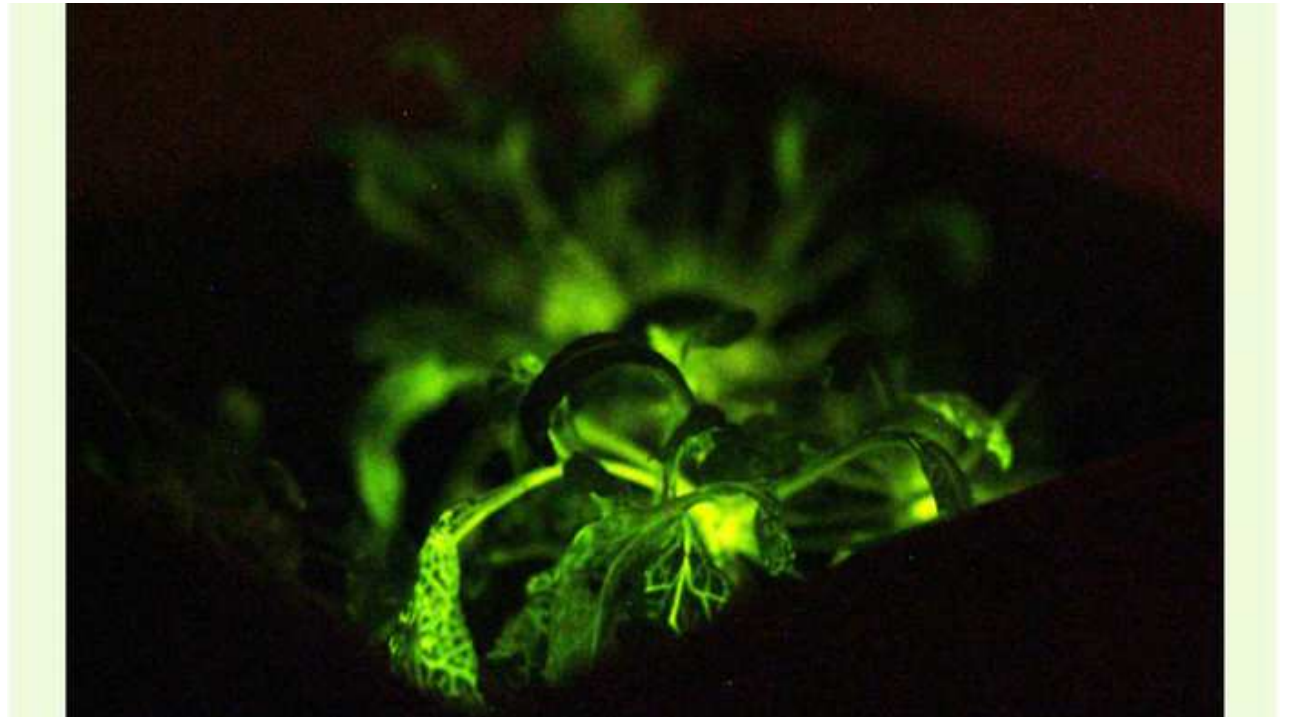


mikrotubuly



# Luciferáza

- Založené na bioluminiscencii – produkcii svetla
- Nevyžaduje externý zdroj svetla
- Vyžaduje substrát luciferín
- Detekcia luminometrom

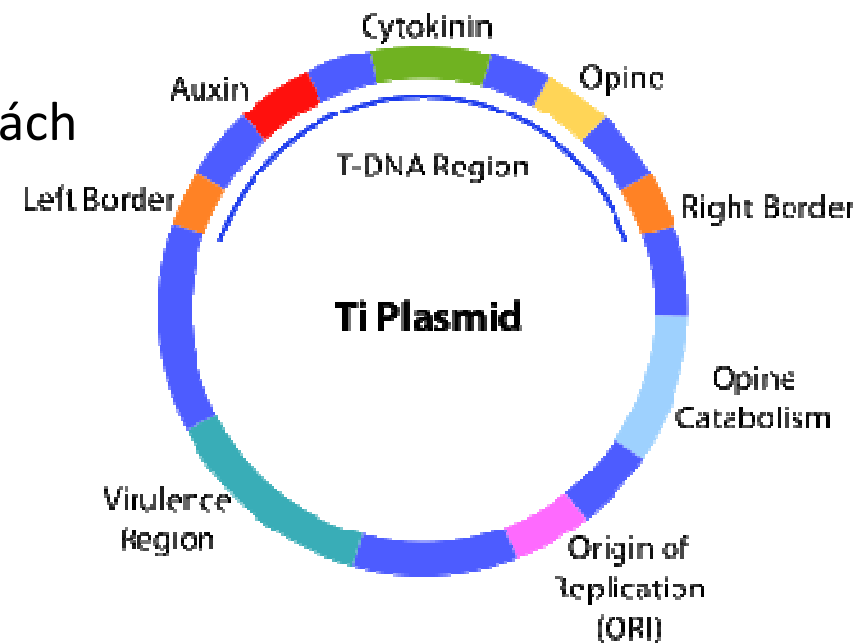


# Metódy a spôsoby genetickej transformácie rastlín

- Nepriame - spôsobené biologickým vektorom prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*
- Priame metódy používajú sa v prípade, keď transformácia prostredníctvom *Agrobacteria* je neúspešná, napr. aj mtDNA a plastidová DNA
  - Mikrobaliatika
  - PEG
  - Elektroforéza a elektroporácia
  - Laserový lúč
  - Mikro a makroinjecie
  - Imbibícia
  - Ultrazvuk
  - Peľový vačok
  - Mikrovláčna karbidu kremíka

# Agrobacterium tumefaciens a genetické inžinierstvo

- Odstránenie sekvencie v Ti plazmide, ktoré indukujú tvorbu nádorov
- Ponechanie sekvencií, ktoré sú dôležité pre prenos a integráciu DNA do hostiteľskej rastliny
  - *vir* oblasť gén virulencie
  - *ori* oblasť oblasť replikácie plazmidu v baktériách
  - Hraničné LB a RB sekvencie



# Rastlinné transformačné vektory

- Ko-integrálne na jednom Ti plazmide majú *ori* a *vir* spolu s LB a RB, medzi ktoré sa umiestňujú expresné kazaty
- Binárne pozostávajú z dvoch plazmidov
  - Odzbrojený Ti plazmid zachované *vir* a *ori* oblasť , odstránená T-DNA oblasť s hraničými LB a RB sekvenciami
  - Menší plazmid s LB a RB sekvenciami, medzi ktoré sa umiestňujú expresné jednotky; má vlastnú *ori* oblasť
  - Vyššia efektívnosť prenosu génov z *E.coli* do *Agrobacteria*
- Všetky kroky prípravy binárneho vektora prebiehajú v *E.coli*, vektor sa prenesie do *A. tumefaciens* – elektropáciou alebo konjugáciou pomocou „helper“ plazmidu

# Transformácia rastlín pomocou *Agrobacterium tumefaciens*

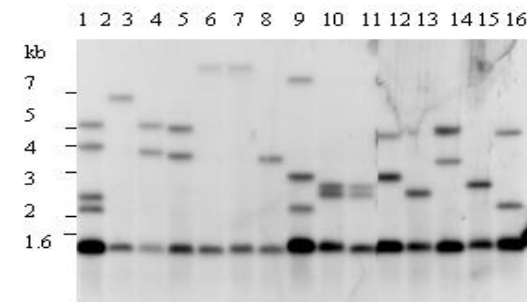
- Poranenie pletiva
- Ko-kultivácia pletiva s pomocou *Agrobacterium tumefaciens*
- Odstránenie zvyškov agrobaktéria (antibiotiká)
- Selekcia transformovaného pletiva podľa selekčného génu
- *In vitro* regenerácia
- Transformované rastliny

## Možné problémy spojené s prenosom transgénu do rastlín

1. Transgén sa vloží do kódujúcej sekvencie iného dôležitého rastlinného génu a dochádza k porušeniu jeho funkcie
2. **Pozičný efekt** – transgén sa vloží do neexprimovanej oblasti genómovej DNA alebo do vysoko aktívnej oblasti genómu
3. **Počet kópií** – neplatí viac kópií transgénu = vyššia expresia  
(preferujú sa transgénne rastliny s 1 kópiou)
4. **Silencing** – obranný mechanizmus rastliny, ide o potlačenie expresie transgénu v dôsledku prítomnosti vysokého počtu kópií alebo nadprodukcii transkriptu

# Analýzy transformovaných rastlín

- Selekčný test – odolnosť voči antibiotikám
- PCR analýzy
- Southern hybridizácia detekcia počtu kópií transgénu v rastlinnom genóme
- RT-PCR - rýchly skríning prepisu transgénu do mRNA
- Northern hybridizácia
- Western blotting - overiť funkčnosť transgénu – tvorbu proteínu
- *In situ* hybridizácia
- Biochemická – histochemická analýza GUS gén a pod.





# Geneticky modifikované rastliny

- prvé transgénne rastliny boli pripravené už v roku 1983
- na väčších plochách sa začali pestovať v roku 1996
- celková plocha, na ktorej sa pestujú GM plodiny vzrástla od roku 1996 (1.7 mil. ha) do roku 2016 (185 mil. ha) takmer 100-násobne
- v roku 2016 ju tvorilo 12% celkovej obrábanej pôdy vo svete
- najväčší pestovatelia GMR – USA, Kanada, Argentína, Brazília, Čína, Južná Afrika
- najviac komerčne pestujú rastliny geneticky modifikované na rezistenciu ku herbicídom a ku hmyzím škodcom
- najviac sa pestuje transgénna sója, kukurica, bavlník a repka olejná

# Hospodársky významné gény

- Modifikácia chemického zloženia aminokyselín, bielkovín, vitamínov, škrobov – zlepšenie nutričných vlastností
- Odolnosť voči patogénom a škodcom
- Odolnosť voči herbicídom
- Odolnosť voči abiotickým faktorom – sucho, mráz, soľ
- Zvýšenie kvality rastlinných produktov – trvácnosť, vlastnosti dreva
- Produkcia biologicky aktívnych a farmaceuticky dôležitých zlúčenín – vakcíny, protilátky
- Fytoremediácia
- Produkcia priemyselných enzýmov – napr. amylázy, celulózy

- **Príklady na produkciu vakcín**

- Produkcia HIV supresorového proteínu v špenáte
- Produkcia vakcíny voči hepatitíde B v zemiakoch

- **Výhody:**

- Priame podávanie, nie je nutná purifikácia,
- výhodne uskladnenie atď.

- **Príklady na produkciu protilátok:**

- v rastlinách sa môžu produkovať monoklonálne protilátky: proti zubnému kazu, herpesovému vírusu,
- hostiteľské rastliny: tabak, kukurica, zemiak

- **Výhoda:**

- GM kukurica môže produkovať až 1 kg protilátok na hektár
- stabilita pri uskladnení pri LT je až 5 rokov

# Rezistencia voči herbicídum

(inhibítomom klúčových metabolických/vývojových dráh)

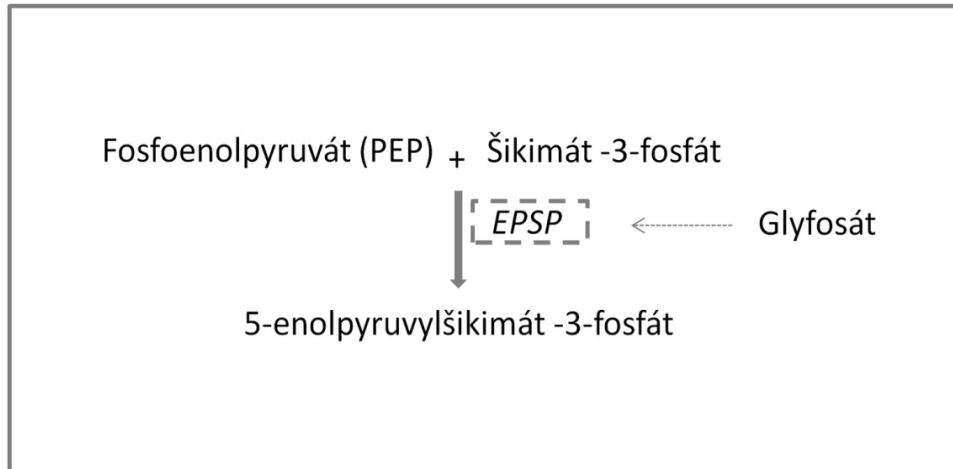
## Výhody:

- menej herbicídov,
- šetrnejší, biodegradovateľné látky
- možné použiť kedykoľvek (keď je to potrebné)

## Vnesený gén kóduje enzým/proteín

- s rovnakou aktivitou ako cieľový proteín, ale nie je citlivý na príslušný herbicíd (Glyfosát Roundup)
- inaktivuje (metabolizuje, odbúrava) herbicíd v rastline (Glufosinát Basta)

# Odolnosť voči glyfosátu Roundup



- gén 5-enolopyruvylšikimát-3-fosfátsyntáza EPSP z *A. tumefaciens*, kmeň CP4
- sekvenciu pre lokalizáciu peptidu EPSP do chloroplastov
- silný konštitutívny promótor CaMV 35S

# Rajčiak Flavr Savr

- Prvý rastlinný GMO produkt komerčne využívaný
- Predĺženie trvanlivosti – spomalený rozklad bunkových stien
- Solanacea – ľahko geneticky transformovateľný
- Veľký trh s rajčiakmi – veľký ekonomický efekt
- Gény spojené s procesom zrenia bol identifikované
- Antisense technológia - antisense RNA, vytvorí s mRNA dsRNA zablokuje transláciu
- Zníženie expresie PG polygalakturonázy – enzým, ktorý napomáha degradácii pektínu v bunkových stenách
- Promótor aktívny v plodoch

# Zlatá ryža

- Produkcia  $\beta$ -karoténu v semenách ryže
- *psy* gén narcisu, *crtI* z pôdnej baktérie *Erwinia uredovora* – katalyzuje viaceré reakcie pri tvorbe lykopénu
- Konštitutívna expresia génu *crtI* promótor CaMv 35S
- *psy* - neskôr nahradený analógom z kukurice – Golden Rice 2, promótor s expresiou v endosperme



# Dreviny

- Zrýchlený rast
- Odolnosť voči hmyzu, chorobám
- Odolnosť voči mrazu, herbicídom
- Zmeny zloženia dreva – lignín, celulóza
- Modifikácia kvitnutia- urýchlenie, zabránenie
- Základná podmienka použitia je sterilita – nemožnosť kríženia s pôvodnými a príbuznými druhmi
- Pinus radiata – elektroporácia, biolistická metóda, Agrobacterium nptII
- topole, eukalypty, brest, gaštan



# Geneticky modifikované mikroorganizmy

- Inzulín 1978 *Escherichia coli*
- Najbežnejšie používané sú baktérie – jednoduchý genóm, ľahká a lacná produkcia
- Ľahká transformovateľnosť - plazmidy
- Ľahká skladovateľnosť – mrazenie -80 °C
- Transformované baktérie:
  - znižujú toxicitu produktov
  - zvyšujú efektivitu produkcie
  - produkujú kvalitnejšie produkty
  - môžu odstrániť nepotrebné reakcie

# Geneticky modifikované mikroorganizmy

- produkcia proteínov pre medicínské účely: inzulín, rastový hormón, zrážacie faktory, erythropoetín, interferony
- rôzne priemyselné produkcie, bioremediácia
- alfa amyláza konvertuje škrob na jednoduché cukry
- chymozín na zrážanie mlieka pri výrobe syrov
- pektínesteráza zlepšuje priehľadnosť ovocných štiav
- *Streptococcus mutans* (pôvodca zubného kazu) neprodukuje kyselinu mliečnu – vo vývoji

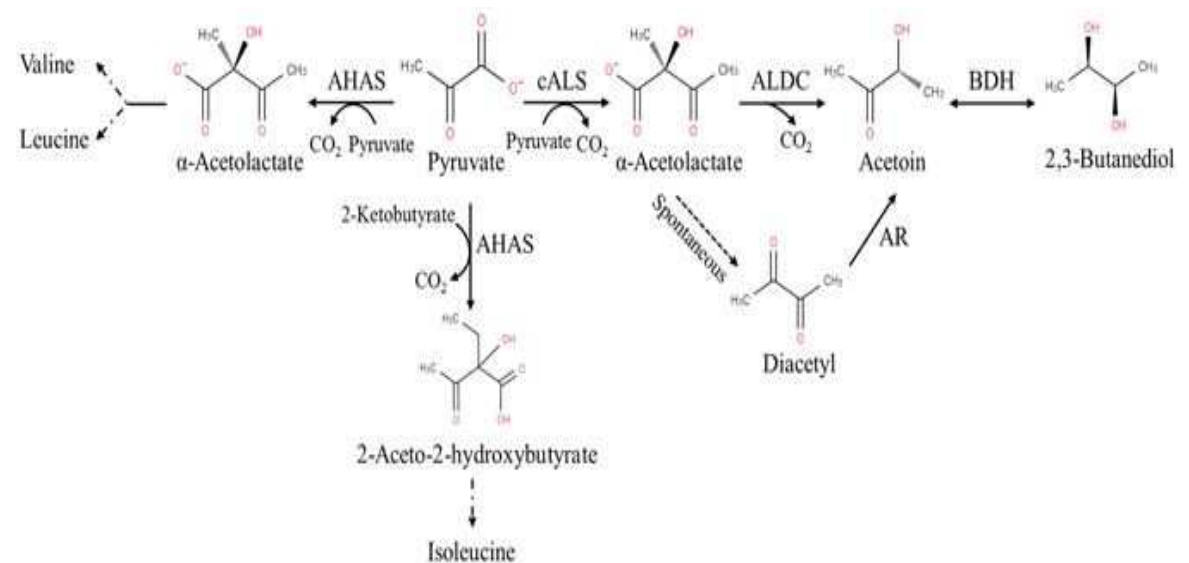
# Geneticky modifikované kvasinky

- odolnosť voči vyšším koncentráciám alkoholu
- modifikácia chuti - chmeľ, banán
- nižšia produkcia H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>
- znížená produkcia diacetylu

Počas zrenia piva je diacetyl redukovaný kvasinkou na acetoín, kt. nemá vplyv na chuť piva

ALDC acetolaktát reductáza z *Acetobacter aceti* priamo konvertuje acetolaktát na acetoín

PGK promótor a terminátor fosfoglycerát kinázového génu *Saccharomyces cerevisiae*



# Geneticky modifikované živočíchy

- človek, myši, prasa, octomilka, komáre
- Mikroinjekcia, vírusové vektory
- štúdium funkcií génov (octomilka, hlísty, myš)
- štúdium ľudských geneticky podmienených chorôb na zvieracích modeloch – navodenie identických mutácií u myší, ale aj primátov (napr. kosmani 2009)
- transgénne ryby s rastovým hormónom (rýchlejší rast, ale hrozba úniku do životného prostredia a kompetícia s prirodzenými druhmi)
- produkcia proteínov pre medicínske účely (protizrážací faktor z kozieho mlieka 2006 ATryn, alfa-1-antitrypsín pre liečbu emfyzému pľúc, faktor zrážanlivosti VIII a IX pre liečbu hemofílie)
- GM hospodárske zvieratá – živé bioreaktory, produkcia v mlieku, sliepky – produkcia proteínov v bielku

Funkcia introdukovaných génov	Očakávané pôsobenie a výsledky
Odolnosť proti chorobám	Eliminácia použitia antibiotík Welfare zvierat Jednoduchší chov, vyššia úžitkovosť
Trávenie a metabolizmus	Menšie množstvo metabolitov do prostredia Lepšie využitie krmív Adaptácia na dostupné krmivá
Zloženie mlieka	Nižšia alergenicita a intolerancia Optimalizácia zloženia bielkovín Optimalizácia zloženia tukov Ochrana proti chorobám Nové funkčné potraviny
Vlnová úžitkovosť	Intenzita rastu Zloženie vlny
Jatočné vlastnosti	Intenzívnejší rast svalov Nižší obsah tukov Optimalizácia zloženia tukov
Reprodukcia	Vyššia plodnosť Vyššia životaschopnosť

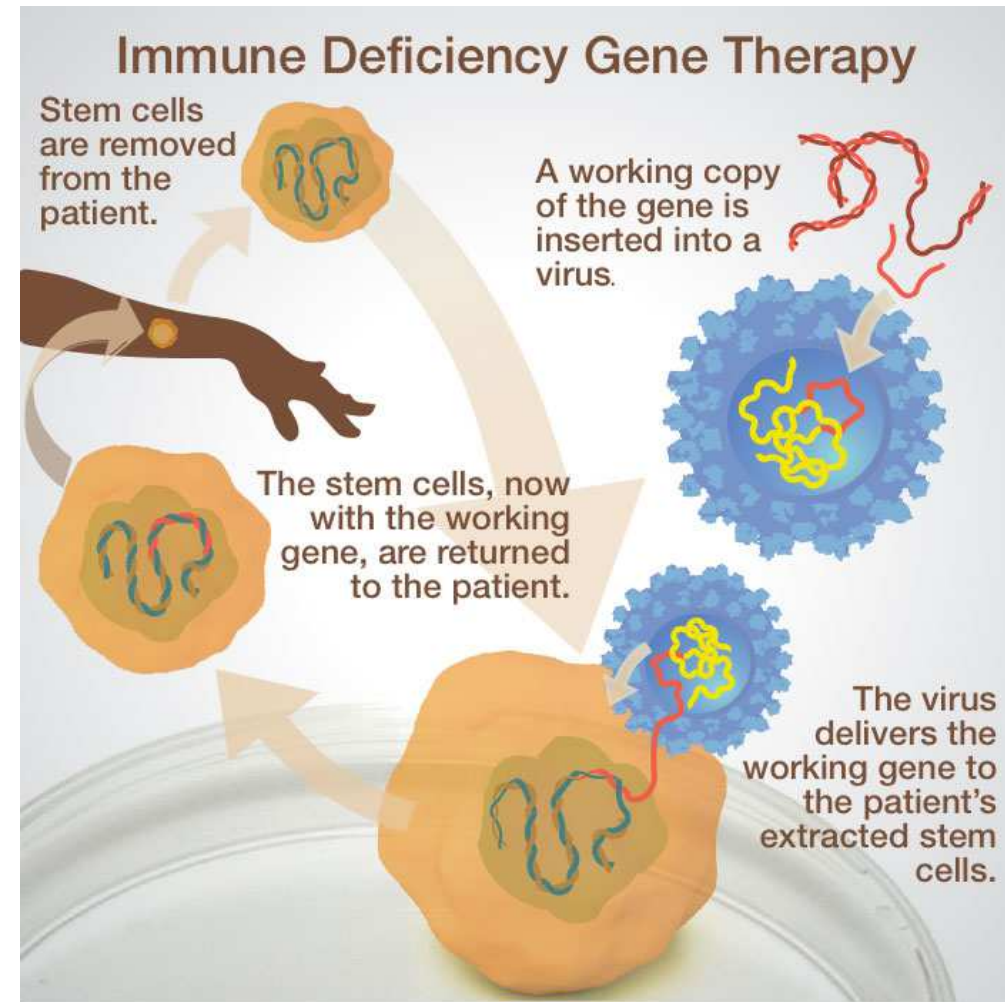
# Gene targeting

- Definovaná zmena endogénneho genómu –od vyradenia génu cez programovanú mutačnú zmenu až po expresiu génu definovaným spôsobom
- Embyonálne kmeňové bunky – zachovaná pluripotencia
- Knock-out- 500 génov u myší, homologická rekombinácia HR, Cre rekombináza
- Knock-in
- Špecifické endonukleázy ZFN, TALEN, meganukleázy, CRISPR/Cas9

# Génová terapia

- Somatická
- Gametická
  
- Náhrada génu vs. pridanie génu
- Zabitie cieľovej bunky
- Cielená inhibícia génovej expresie
- Cielená overexpresia génu

SCID: ADA-SCID, X-viazaná SCID



# Ex vivo Gene Therapy

