

Molekulární biologie

10. Metody molekulární biologie a základy genového inženýrství

Osnova

metody pro studium genomu,
transkriptomu a proteomu
genetické manipulace

Hlavní zdroje:

*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Universita Brno
ISBN 80-902562*

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms
University of Illinois, Chicago*

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Genové inženýrství

Snaha o manipulaci se sekvencí DNA organismu

Cíle genového inženýrství:

- vylepšit naše vědomostí o tom jak fungují geny
- vytvářet produkty nebo léčit nemoci

Příklad: produkce hormonů pomocí technologie rekombinantní DNA

- např. produkce růstového hormonu při poruchách růstu

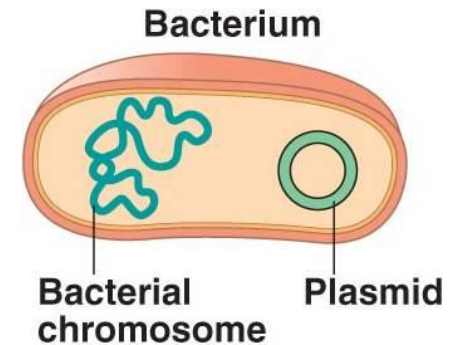
Plasmid

Malá kruhová DNA

- hlavní část bakteriálního genomu je uložena ve velké kruhové molekule DNA - tam jsou "důležité" geny
- na plasmidech jsou "doplňující" geny
- bakterie dokáže přijímat cizí DNA z okolí (hlavně pod stresem) - **Transformace**
- **Konjugace** - výměna plasmidů mezi bakteriemi
- za normálních podmínek není bakteriální ani eukaryotická cytoplazmatická membrána pro DNA propustná

Metody pro navození propustnosti membrány:

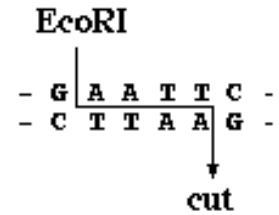
- Elektroporace
 - krátký elektrický šok vytvoří póry v membráně
- Chlorid vápenatý (calcium chloride; CaCl_2)
 - membrána normálně propustná pro chloridové ionty
 - nepropustná pro vápníkové ionty
 - vstupem CaCl_2 se do buněk dostává i voda a DNA
- Teplotní šok
 - při 42°C se v bakterii aktivují tzv. heat-shock geny zajišťující přežití ve vyšší teplotě
 - použití teplotního šoku po ovlivnění CaCl_2 zvyšuje účinnost transformace



Restrikční endonukleázy

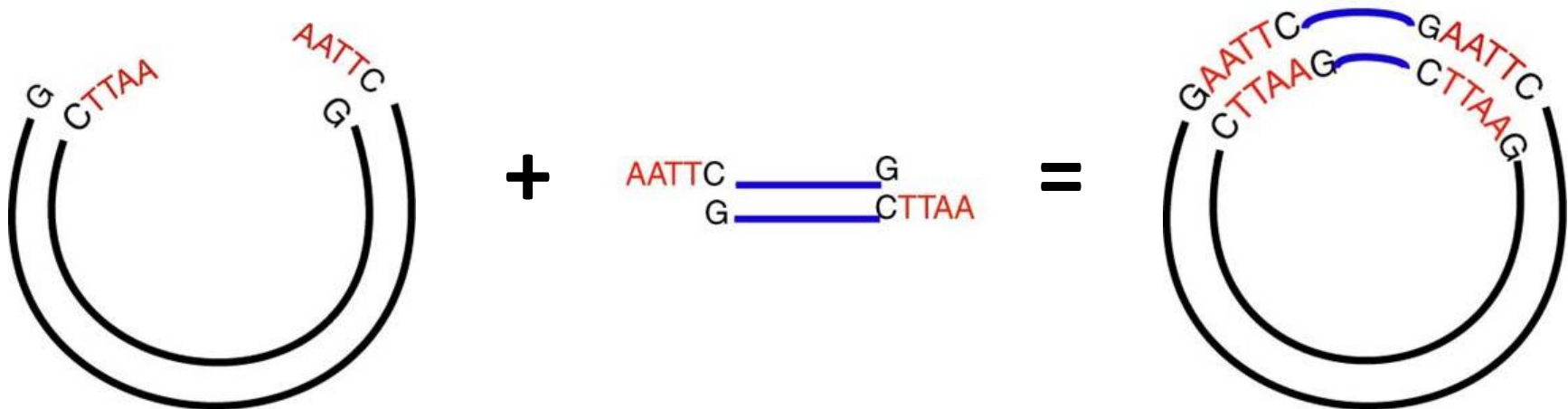
Enzymy, které štípou DNA

- štěpení probíhá v místě kódovaném specifickou sekvencí nukleotidů
- přirozeně používány bakteriemi pro štěpení virové DNA



Restrikční místa (rozpознаvací sekvence pro štěpení):

- jsou často palindromy na komplementárních řetězcích
- methylovány (-CH₃) aby chránily bakteriální DNA a štěpily pouze virovou
- často zanechávají "sticky ends", např. EcoRI ("eco R one") u *E. coli*
- "sticky ends" jsou využívány pro vložení genu do plasmidu



Exonukleáza: štěpí DNA od krajů

Endonukleáza: štěpí DNA od prostředku

Helikáza: oddaluje řetězce DNA nebo RNA

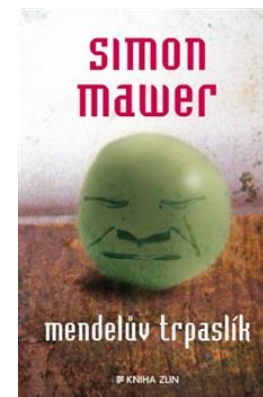
Ligáza: spojuje DNA řetězce



Genové inženýrství v praxi

Growth-hormone deficiency (GHD; pituitary dwarfism) - Nedostatek růstového hormonu

- hypofýza (pituitary gland) neprodukuje dostatek růstového hormonu (GH; growth hormone; somatotropin)
- léčba: injekce hormonu GH
- do roku 1985 GH získáván autopsií z hypofýzy (větš. mrtvá těla, častá kontaminace)
- od roku 1985 je GH vyráběn v geneticky upravené bakterii *E. coli* technologií rekombinantní DNA (rHGH; recombinant human growth hormone)



Většina případů trpasličího vzrůstu je dána dvěma poruchami 1. Achondroplasie (70%) a 2. GDH

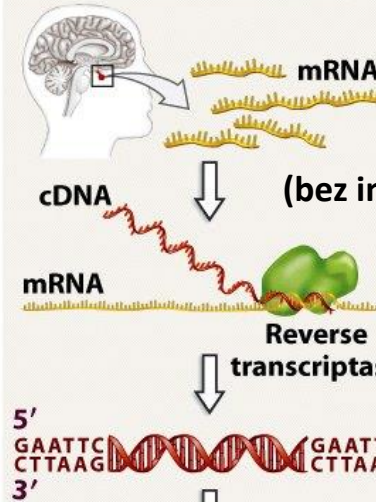
Výroba rekombinantního GH

- izolujeme mRNA z buněk hypofýzy (různé typy mRNA, nejen mRNA pro GH)
- pomocí reverzní transkriptázy přepíšeme mRNA do cDNA
- připojení míst, která rozeznává endonukleáza ke koncům každé cDNA
- vložíme do přichystaného plasmidu s genem na resistenci proti vybranému ATB - při štěpení endonukleázou vznikají tzv. "sticky ends" (komplementární báze)
- cDNA "vlepi" do plasmidu tzv. ligací za katalýzy DNA-ligázou
- vložíme plasmidy do bakterií *E. coli* - ATB v mediu → přežijí pouze bakterie, které přijmou plazmid
- takovou kolekci bakterií nazýváme cDNA knihovna
- nyní musíme najít pouze bakterie, které přijmou GH gen (různé cDNA podle různých mRNA)

cDNA (complementary DNA): dvojšroubovicová DNA syntetizovaná podle templátu mRNA za katalýzy enzymem reverzní transkriptáza
DNA-ligáza: enzym usnadňující spojení DNA řetězců katalýzou formace fosfodiesterové vazby

cDNA knihovna: kombinace cDNA vložených do hostitele, které tvoří část transkriptomu. cDNA podle sestřižené mRNA už neobsahuje introny a je v prokaryotním organismu připravena k translaci

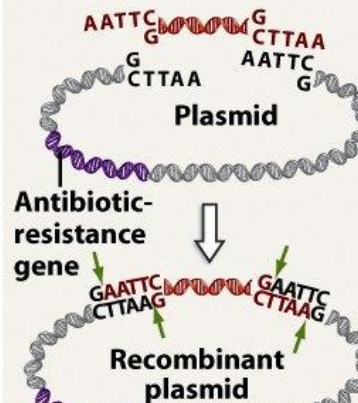
CREATING A cDNA LIBRARY THAT CONTAINS THE HUMAN GROWTH HORMONE GENE



1. Isolate mRNAs from cells in pituitary gland.

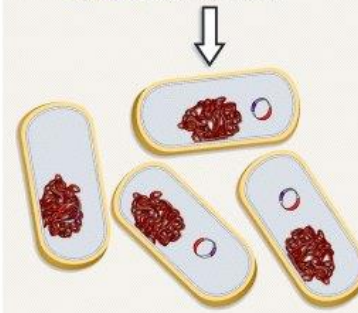
2. Use reverse transcriptase to synthesize a cDNA from each mRNA.

3. Attach a restriction endonuclease recognition site to ends of each cDNA.



4. Cut cDNAs and plasmids with restriction endonucleases; remaining sticky ends join by complementary base pairing.

5. Ligate cDNAs and plasmids with DNA ligase.



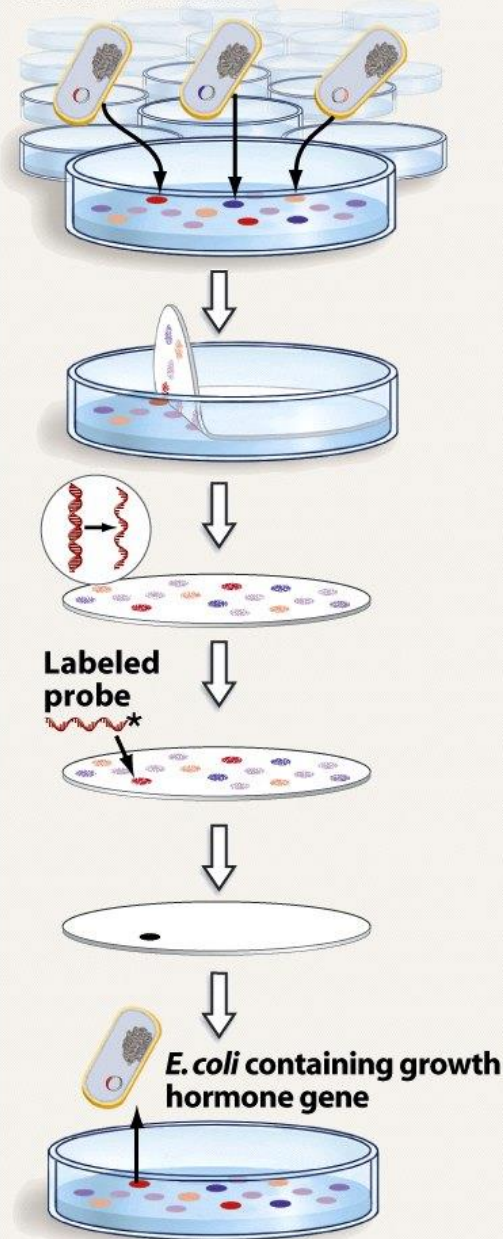
6. Introduce recombinant plasmids into *E. coli* cells via treatment that makes cells permeable to DNA. Grow cells in presence of antibiotic. Cells that can grow become part of cDNA library. Each cell contains one type of recombinant plasmid and thus one cDNA.

Výroba rekombinantního GH

- na Petriho misky s koloniemi položíme filtrační papír - kolonie se přilepí
- rozdělíme dvojšroubovici DNA na jednořetězce a inkubujeme se sondou
- sonda - krátká sekvence DNA, která odpovídá sekvenci v požadovaném genu (značená radioaktivně)
- RTG film vytvoří značky na místech s radioaktivní DNA sondou
- tyto kolonie namnožíme

[Video: Genové inženýrství](#)

FINDING THE GROWTH HORMONE GENE IN A cDNA LIBRARY



1. Grow *E. coli* cells containing plasmids on many plates. Each colony contains a different cDNA.

2. Lay a filter on each plate, then remove. Some cells from each colony stick to filters.

3. Treat filters with chemical to make DNAs single stranded.

4. Probe filters with labeled DNA (short sequence inferred from amino acid sequence of growth hormone).

5. Labeled probe and growth hormone cDNA base pair. Lay X-ray film over filters; black spot marks location of

6. On original plates, find colony of *E. coli* cells that contains growth hormone gene. Sample cells, grow, and analyze.

Další příklady genového inženýrství v praxi

Chymosin

- enzym používaný pro výrobu sýru
- první rekombinantní protein schválený v potravinářství
- produkce v *E. coli*



Inzulín

- rekombinantní inzulín kompletně nahradil inzulín izolovaný ze zvířecích tkání
- lidský gen pro inzulín vložený do *E. coli* nebo kvasinek *Saccharomyces Cerevisiae*

Faktor VII

- plazmatický koagulační faktor pro hemofiliky
- dříve izolován z krve dárců - riziko přenosu nemocí

Vakcína proti žloutence typu B

- produkce povrchových antigenů viru v kvasinkách
- virus hepatitidy B nelze pěstovat *in vitro* (jako např. virus obrny - Poliovirus)

Rostliny rezistentní k herbicidům

- např. sója, kukuřice, bavlna
- vložen rekombinantní gen zajišťující rezistenci proti herbicidu glyphosatu (Roundup)

Genové inženýrství v praxi

Úprava genomu eukaryotických organismů - geneticky modifikované potraviny

1. Agrobacterium tumefaciens

- gramnegativní bakterie - rostlinný parazit s přirozenou schopností genového transferu
- infikuje dvouděložné rostliny (brambory, rajčata a tabák)
- začleňuje do genomu rostliny Ti-plazmid (T-DNA)
- Ti-plazmid obsahuje geny pro produkci rostlinných hormonů
- tvorba nádoru produkujícího aminokyseliny "opiny", sloužící agrobakteriím jako energetický zdroj
- Ti-plazmid je nahrazen umělým plazmidem



2. Gene gun

- pro rostliny, které nejsou napadány Agrobakterií (jednoděložné: pšenice či kukuřice)
- DNA je zkombinována s částicemi zlata a pod tlakem "vstřelena" do buněk
- v buňce se DNA oddělí a je transportována do jádra

3. Elektroporace

- pro živočišné buňky a rostlinná pletiva, která neobsahují buněčnou stěnu

4. CRISPR

- vektorový systém pro editaci genomu eukaryotických buněk
- rostlinné i živočišné buňky

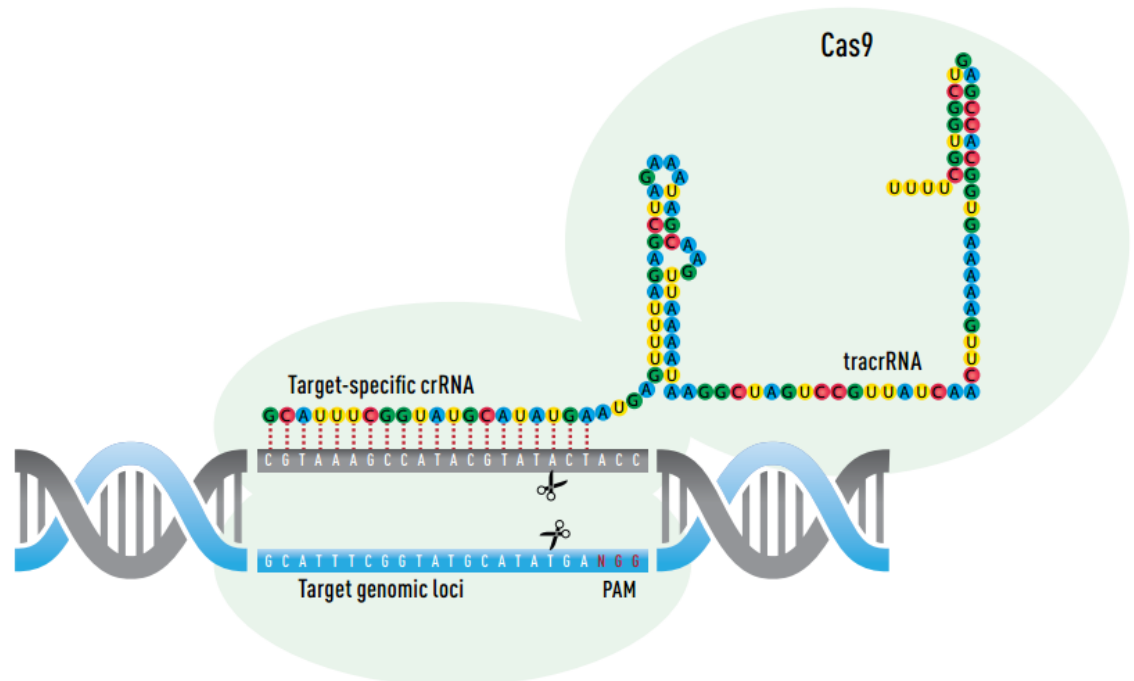
CRISPR - krok 1: vytvoření DNA DSB (double strand break)

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

- editace genomu budoucnosti - přesně nalezne místo na genomu, které chceme upravit
- mechanismus adaptivní imunity bakterií (CRISPR/Cas)
- RNA-guided DNA-nukleáza je přirozeně využívána bakteriemi k inaktivaci virové DNA
- modifikován pro využití k úpravě genomu eukaryot (CRISPR/Cas typ II z *Streptococcus pyogenes*)
- 2 komponenty
 1. Cas9 protein (endonukleáza)
 2. nekódující guide RNA (gRNA)
- zvolíme si 20 nukleotidů dlouhou sekvenci na gRNA (target-specific crRNA), komplementární s místem na genomu, které chceme štěpit
- po navázání gRNA na toto místo, Cas9 zde vytváří na **DNA dvojlom (DSB)**

DSB lze využít

- a) sám o sobě k umlčení genu
- b) vložení jiného genu



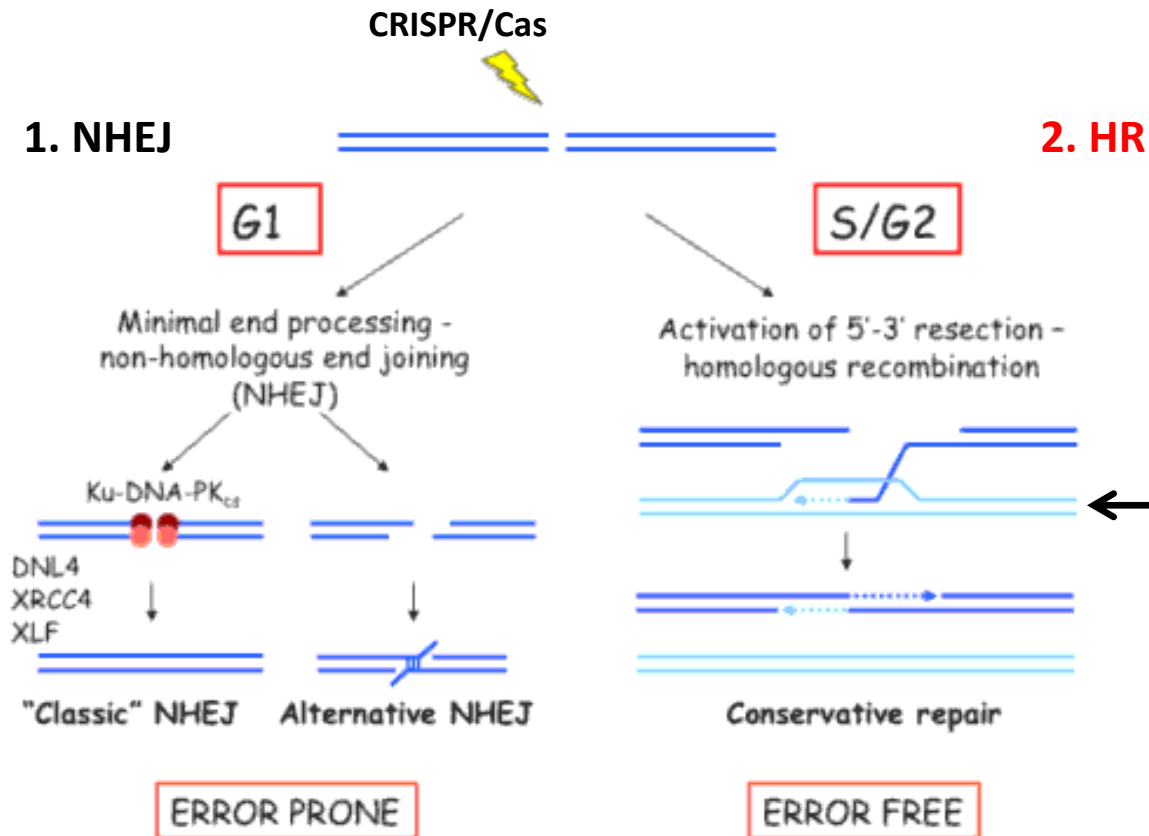
CRISPR - krok 2: vložení genu do místa DNA DSB

- DNA dvojlomy mohou být opraveny dvěma mechanismy:

1. Non-homologous end joining (NHEJ)

2. Homologní rekombinace (HR)

- pokud do buňky zároveň vložíme **templátovou DNA**, pak je šance na zabudování této nové DNA právě ve zvoleném místě, kde jsme vytvořili dvojlom pomocí CRISPR/Cas



templát je:

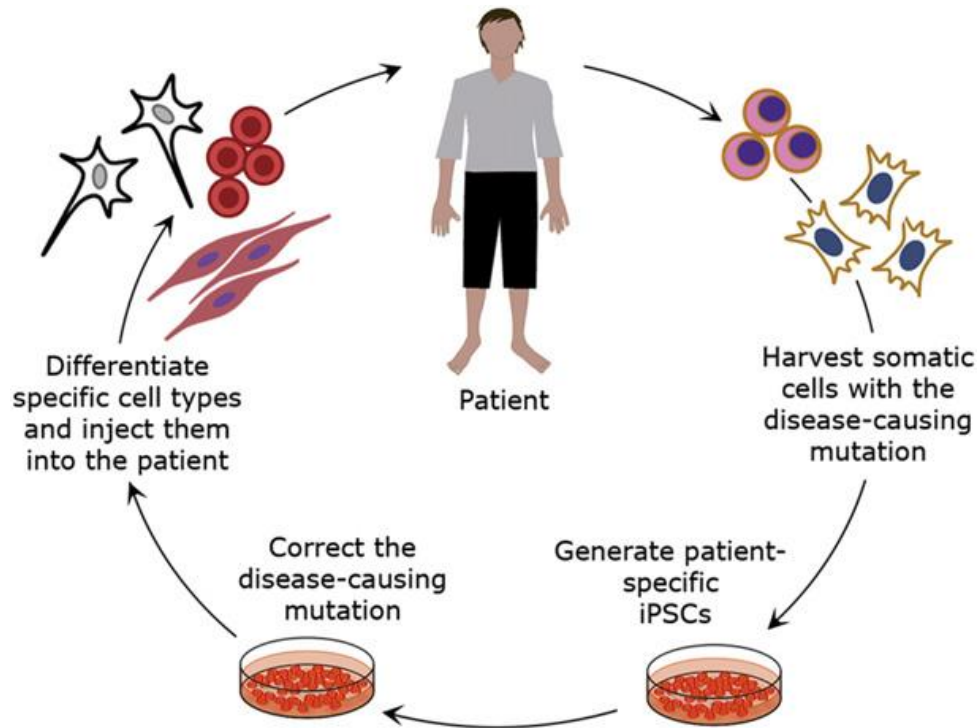
1. sesterská chromatida v S/G2

2. nesesterská chromatida v G1

3. exogenní DNA templát

GENOVÉ KOREKCE

- proof-of-principle: Korekce defektního genu pro β -globin, způsobujícího srpkovitou anémií (sickle cell anemia); na myším modelu*



* Hanna J. et al, Science 2007; reviewed in Simara P. et al, Transl Res 2013

PCR - Polymerase Chain Reaction

Metoda pro masivní replikaci úseku DNA



www.nobelprize.org

Kary Mullis

- metodu vynalezl počátkem 80. let
- 1993 - Nobelova cena - jediná za výzkum v komerční biotechnologické firmě (Cetus)
- používal dva primery, které ohraničili úsek DNA, který chtěl amplifikovat
- nově vytvořená DNA se musela denaturovat (oddělit oba řetězce) při teplotě nad 90°C aby mohl začít další cyklus amplifikace
- teplotou nad 90°C se ovšem inaktivovala DNA Polymeráza I
- musela tedy být přidána nová Polymeráza při každém cyklu

Taq Polymeráza

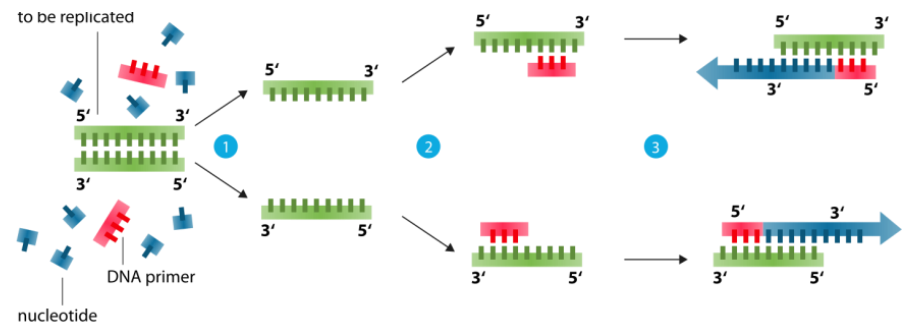
- původně izolována r. 1976 z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*
- bakterie žije v termálních pramenech (gejzír v parku Yellowstone; 70°C)
- optimální aktivita Taq Polymerázy je 75-80°C (vydrží 95°C až 40 min)
- při 73°C připojuje 100 bazí za sekundu



Patent

- Roche koupil r. 1993 patent na PCR od Cetus Corp. za \$330 milionů
- odhadovaný výtěžek pro Roche je \$2 miliardy

1. Denaturation (90°C)
2. Annealing (55°C)
3. Extension (73°C)



PCR - Polymerase Chain Reaction

Reakce probíhá v přístroji zvaném termo-cykler, který velmi rychle střídá teploty.

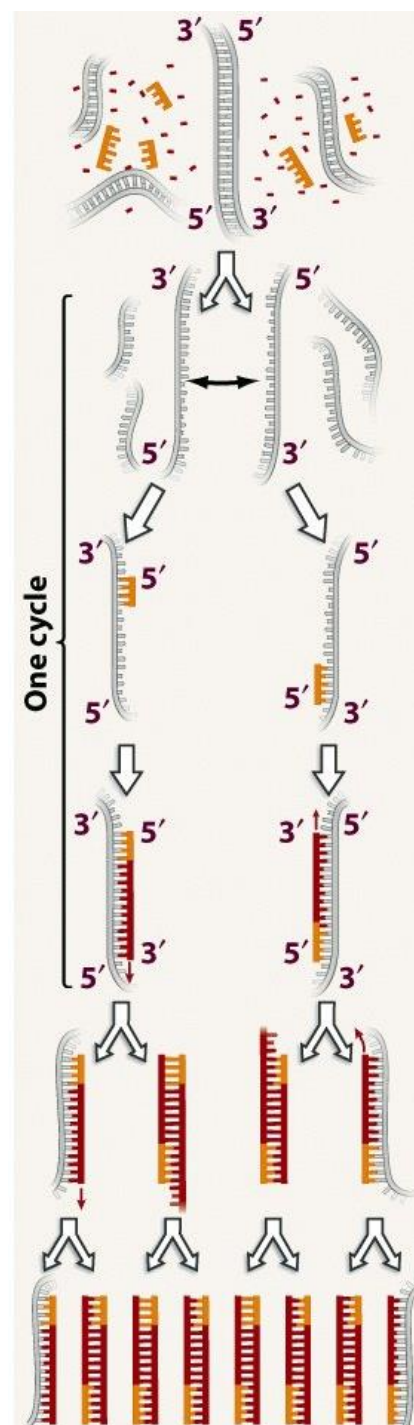


[Video: PCR](#)

30s 94°C

30s 55°C

30s 73°C



1. Start with a solution containing template DNA, synthesized primers, and an abundant supply of the four dNTPs.

2. Denaturation
Heating leads to denaturation of the double-stranded DNA.

3. Primer annealing
At cooler temperatures, the primers anneal to the template DNA by complementary base pairing.

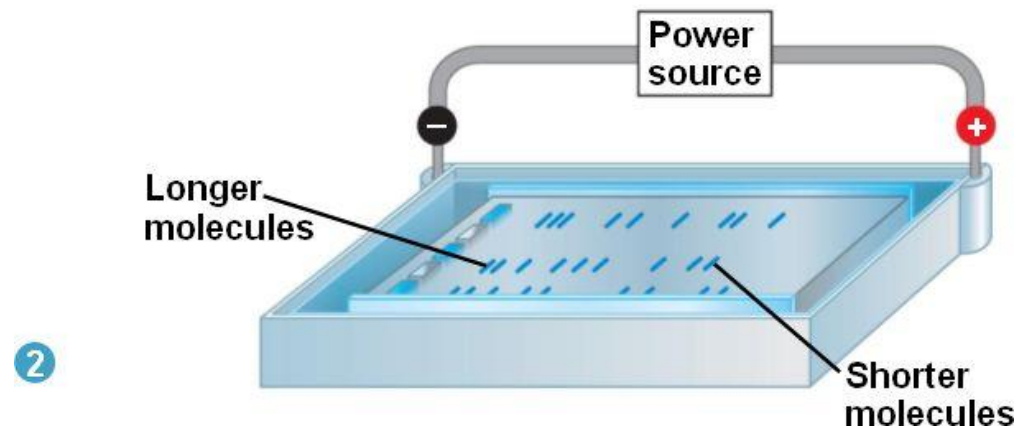
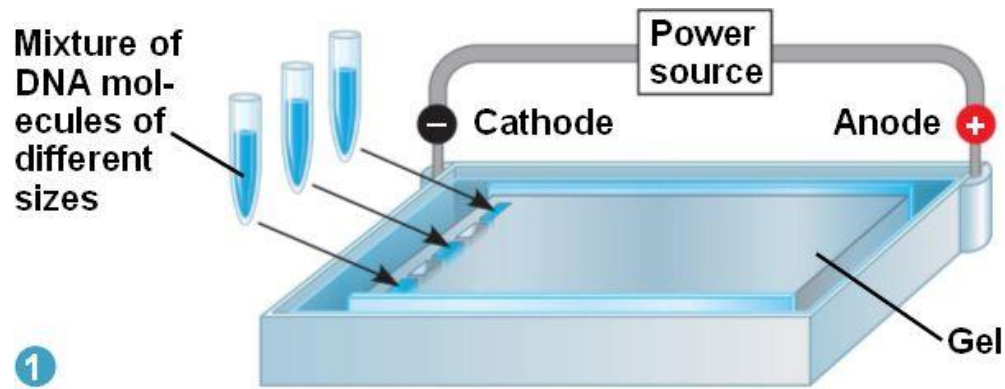
4. Extension
During incubation, DNA polymerase uses dNTPs to synthesize complementary DNA strand, starting at the primer.

5. Repeat cycle of three steps (2–4) again, doubling the copies of DNA.

6. Repeat cycle again, up to 20–30 times, to produce millions of copies of template DNA.

PCR - Polymerase Chain Reaction

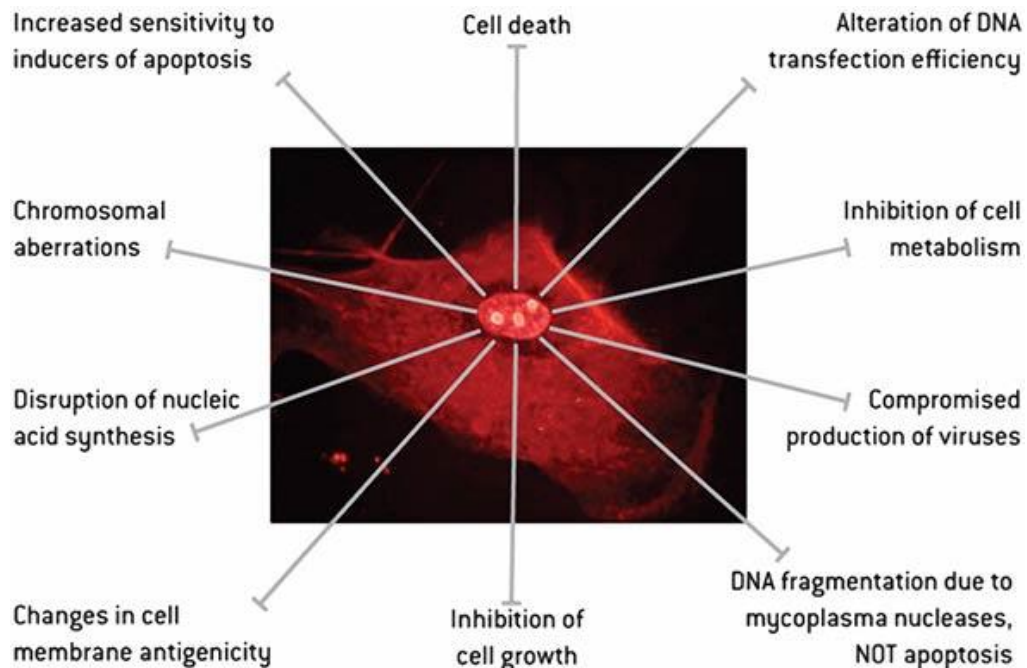
- velikost výsledného DNA fragmentu je ověřena na elektroforetickém gelu
- v elektrickém poli putují **záporně nabitě molekuly DNA** k anodě (+)
- gel tvořen Agarozou a kratší molekuly DNA v něm putují rychleji než delší
- pro vizualizaci fragmentů DNA je gel napuštěn etidium bromidem, který se váže na DNA a po ozáření UV světlem svítí



PCR v laboratorní praxi

Detekce kontaminace buněčné kultury mykoplasmaty

5x Green buffer	10ul	
PCR Nucleotide mix (20mM)	0,5ul	(final 0,2mM)
F primer (100uM)	0,25ul	(final 0,5uM)
R primer (100uM)	0,25ul	(final 0,5uM)
Taq DNA polymeráza	0,25ul	(final 1,25U)
Templátová DNA	x ul	(final 100ng)
Doplnit vodou pro PCR na 50ul		



Cycler byl nastaven:

název programu – MYCOPLAS

„Calculated“

step 1: teplota a čas (iniciální 2min 94°C)

1 cyklus {

- step 2: 0:30min 94°C - denaturace
- step 3: 0:30min 55°C - annealing
- step 4: 0:30min 73°C - extenze

step 5: GoTo step 2 35cycles

step 6: final extension 5min 73°C

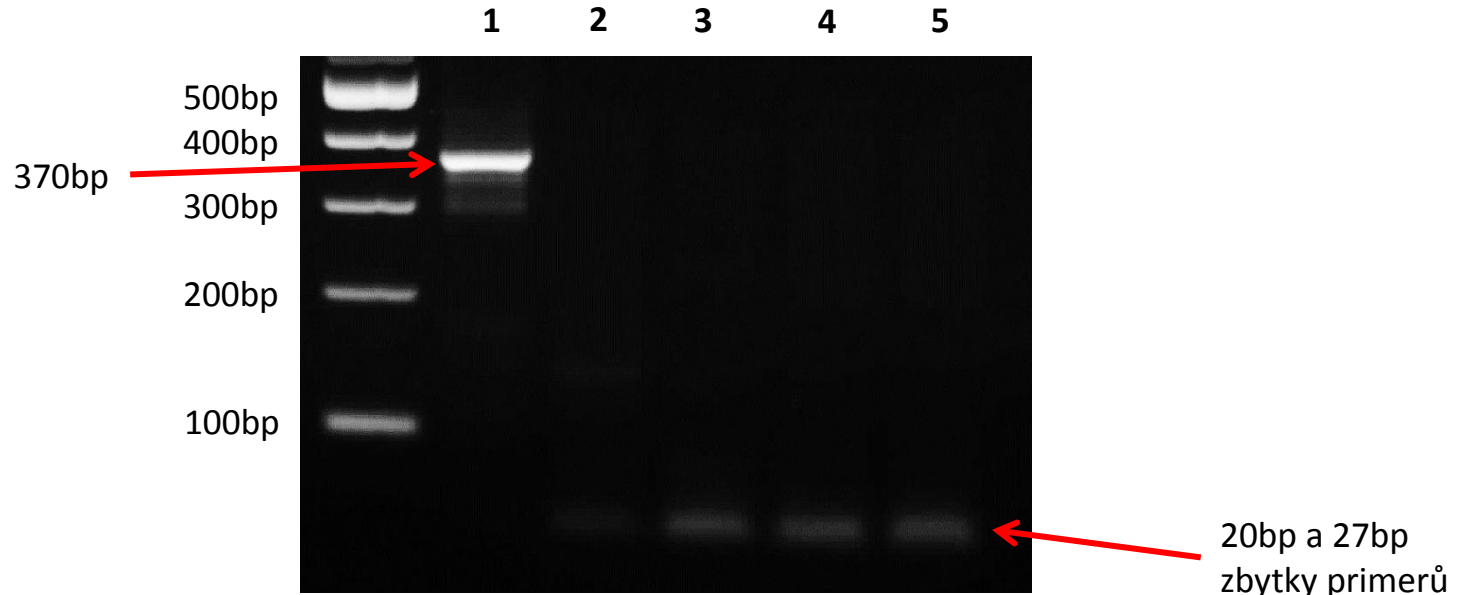
step 7: 4°C forever (zadat čas 0)

Mycoplasma: nejmenší a nejjednodušší rod bakterií (cca 0,1µm), nemají buněčnou stěnu (neúčinkují běžná ATB), často patogenní. V buněčných kulturách negativně ovlivňují růst buněk.

PCR v laboratorní praxi

Detekce kontaminace buněčné kultury mykoplasmaty

- PCR primery navrženy tak, aby nasedaly pouze na sekvence přítomné v DNA mykoplasmat
- PCR produkt vzniká pouze pokud je přítomna DNA mykoplasmat
- velikost produktu je 370bp
- do gelu přidán EtBr (DNA interkalátor) - vizualizuje DNA pod UV lampou



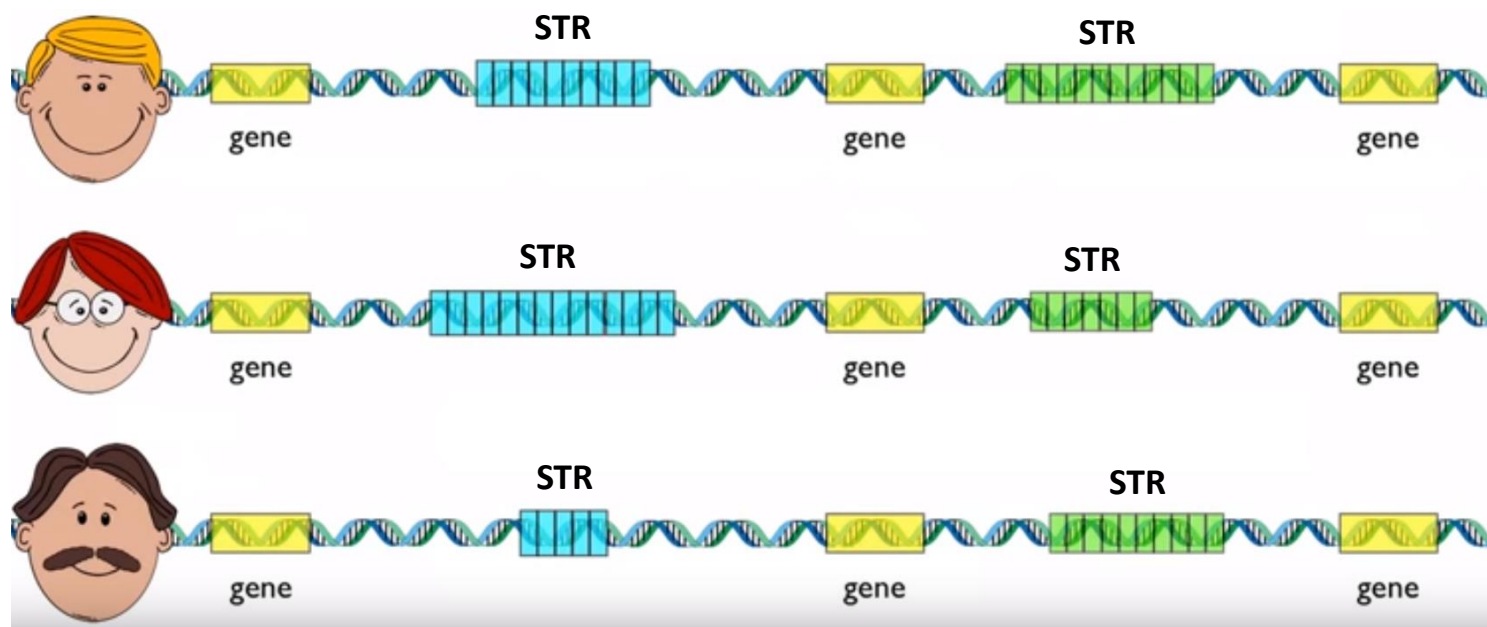
1. pozitivní kontrola - mykoplazmatická DNA
2. negativní kontrola - genomová DNA
3. vzorek č. 1
4. vzorek č. 2
5. vzorek č. 3

PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

- navrhnul Alex Jeffreys r. 1984
- sledují se nekódující regiony DNA zvané **Short Tandem Repeats (STR)**
 - krátké sekvence o 2-5 bazích opakující se 5-50x
 - každý člověk má unikátní sestavu (s výjimkou jednovaječných dvojčat)
- primery jsou navrženy před a za STR sekvencí
- DNA vyizolovaná z buněk je amplifikována pomocí PCR v nekodujících úsecích DNA vytipovaných pro STR
- na elektroforetickém gelu se detekuje velikost fragmentu

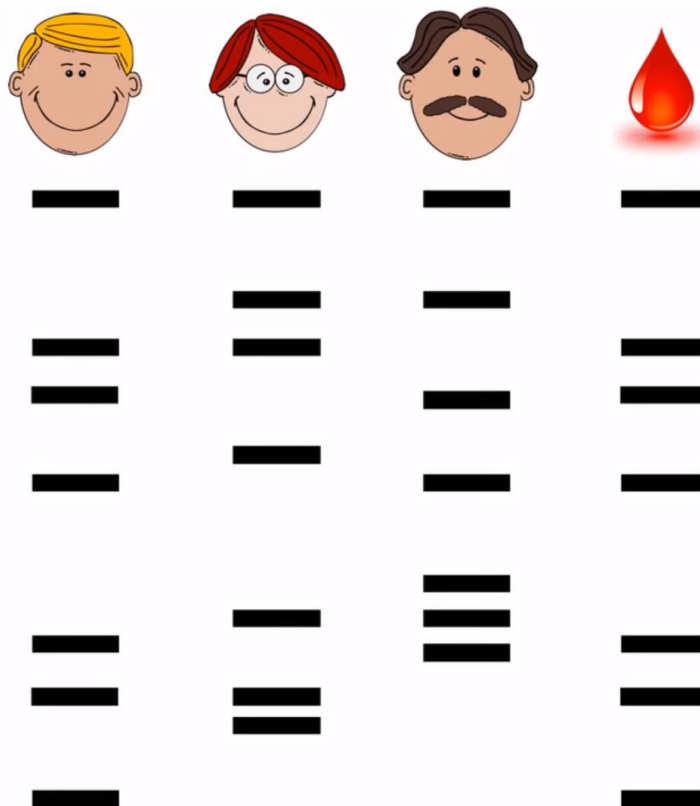


Wikipedia



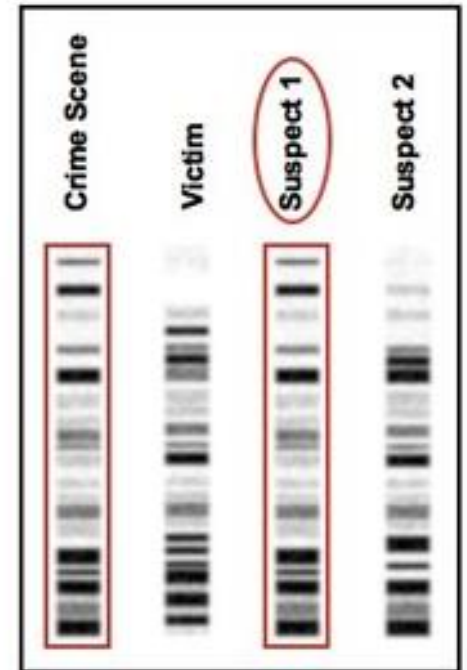
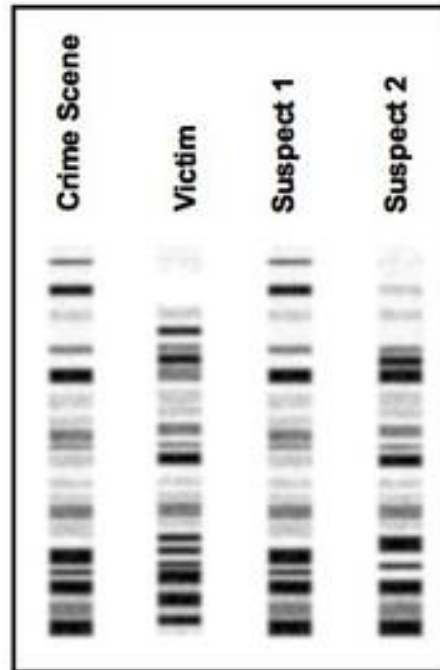
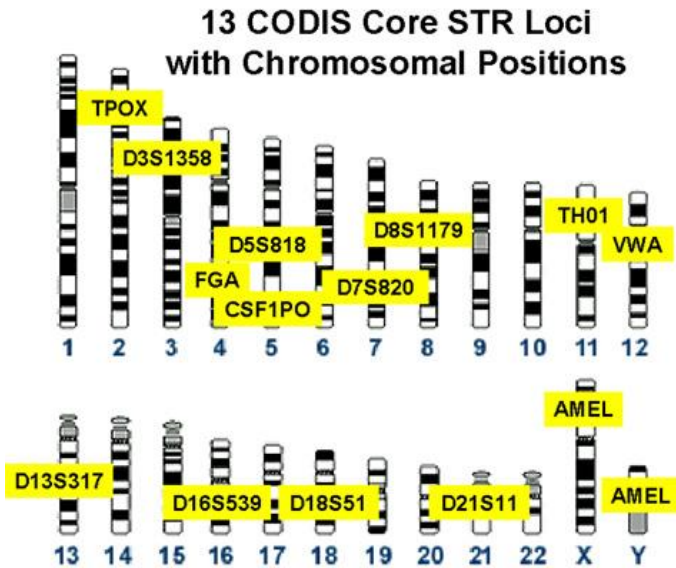
PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

- porovnání s DNA nalezenou na místě činu (z krve, semene, kůže za nehty...)
- používají se STR s 4- nebo 5-nukleotidovými repeticemi



PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

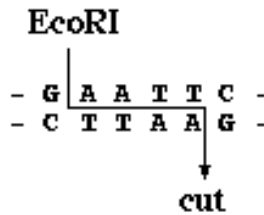
- FBI má databázi DNA zvanou CODIS (Combined DNA Index System)
- dle pravidel CODISu se testuje a uchovává 13 STR genetických markerů na různých somatických chromozomech (2 alely - tzn. max 26 bandů) + amelogenin pro určení pohlaví
 - AMEL: na chromozomu X obsahuje *intron 1* 6bp delecí, na rozdíl od Y (žena XX pouze 1 band 106; muž XY: bandy 106 a 112)



DNA fingerprinting - RFLP

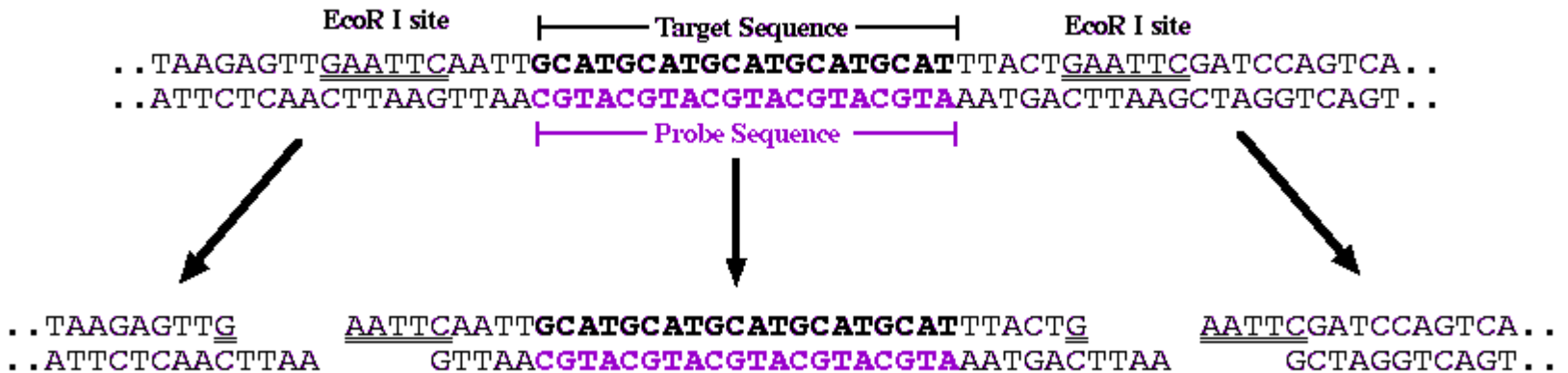
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

- starší metoda pro testování identity na základě DNA
- restriční enzymy naštipou DNA ve specifických místech a vznikají různě dlouhé fragmenty DNA unikátní pro každého člověka



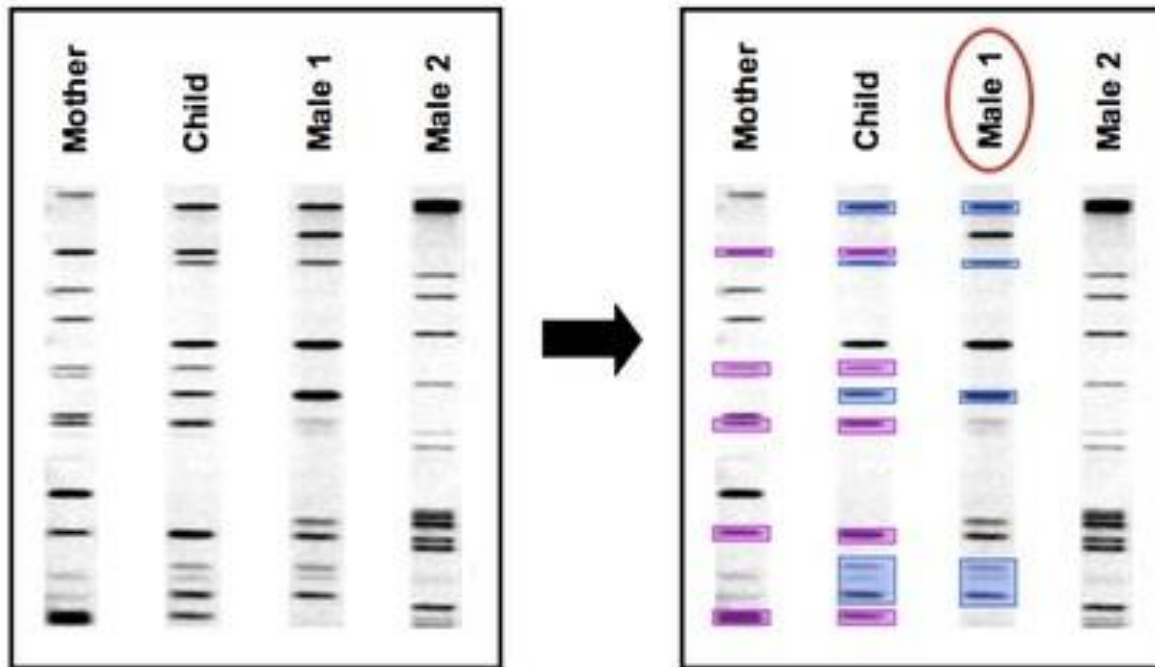
Nevýhody RFLP oproti STR

- pomalá, náročná metoda a méně přesná metoda
- vyžaduje velké množství DNA



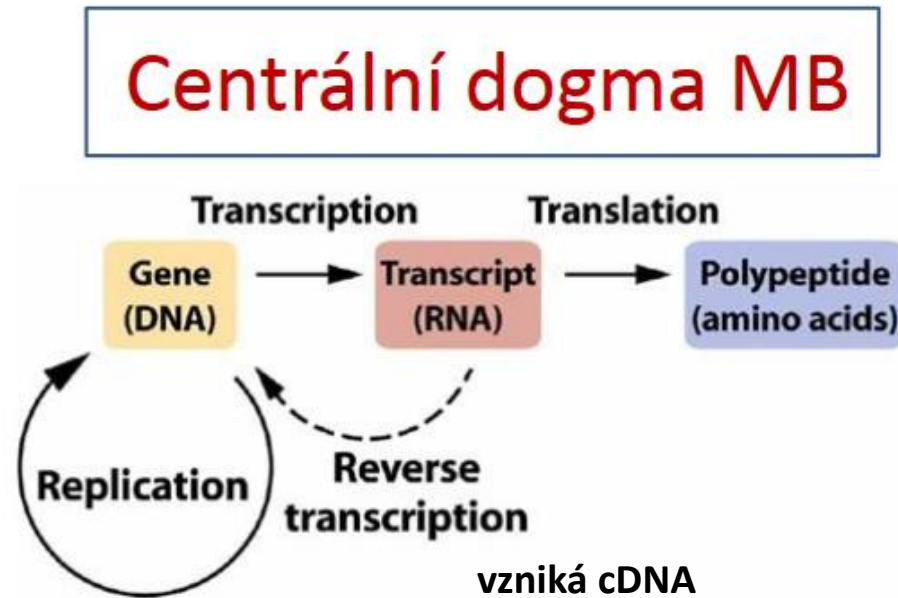
Testování otcovství

- dříve bylo používáno hlavně **vyloučení** otcovství na základě krevních skupin či dalších leukocytárních antigenů
- přesnější je testování DNA metodou RFLP, v současnosti hlavně STR
- typickým výsledkem je 0% pro negativní a 99,99% pro pozitivní test
- každý proužek DNA dítěte musí odpovídat proužku na vzorku otce nebo matky nebo obou
- je zde zanedbatelná možnost unikátního fragmentu, který u dítěte vznikne v důsledku crossing-overu a/nebo mutace



Kvantifikace exprese genů (aktivita genu)

1. pro určení množství transkribované **mRNA** z určitého genu
 - a) **Real-time PCR**
 - b) **Microarrays**
2. pro určení množství vyrobeného **proteinu** určitého genu
 - a) **Western blotting**
 - b) **Flow cytometrie**



1a) Real-time PCR (kvantitativní; qPCR)

Měření nárůstu nově syntetizované DNA po každém cyklu PCR

Funkce: určit výchozí množství mRNA ve vzorku a tím sledovat aktivitu genů

Postup:

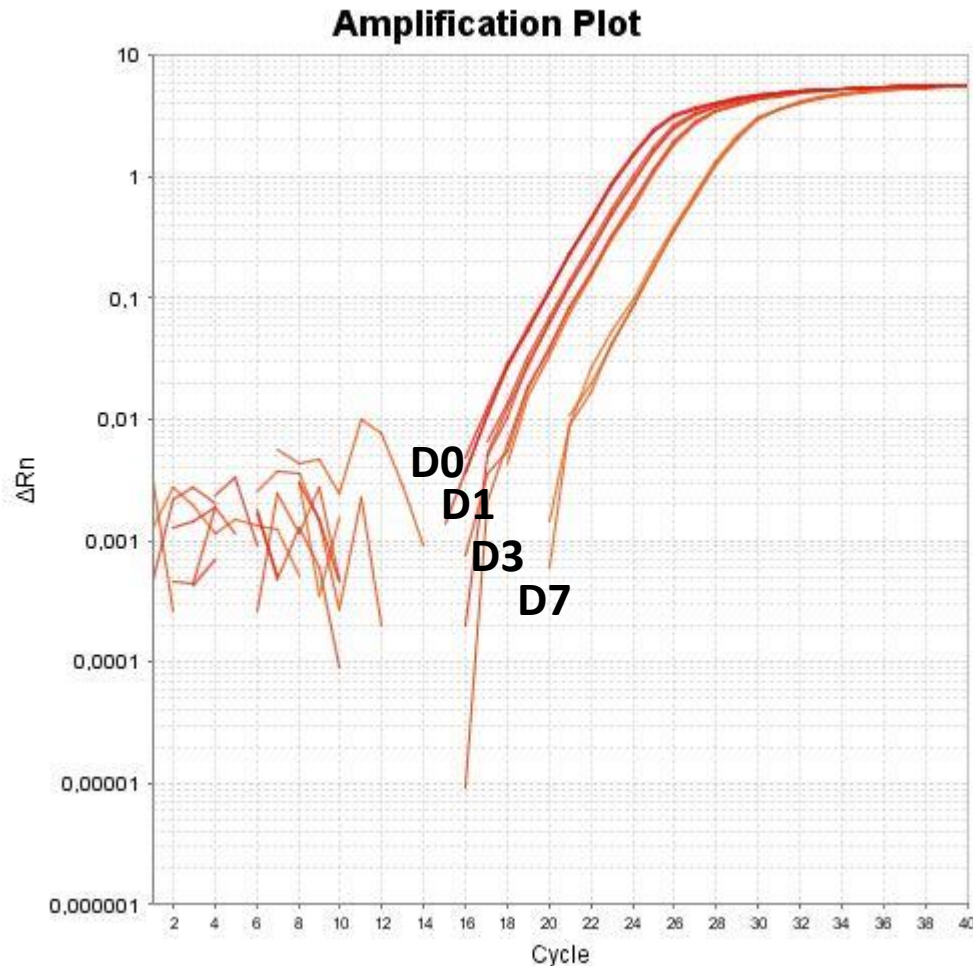
1. izolujeme mRNA (pomocí kitu)
2. přepis mRNA do komplementární DNA (cDNA) pomocí enzymu reverzní transkriptázy
3. provedeme PCR podle principu popsaného výše, ale přidáme navíc fluorofor*
4. PCR reakci provedeme ve speciálním termo-cykleru s detektorem fluorescenčního záření
 - po každém cyklu přístroj zaznamená intenzitu fluorescence
 - vyšší intenzita = více DNA
 - přímé porovnání množství mRNA daného genu mezi vzorky
5. software vyhodnotí *relativní genovou expresi* (počet kopií mRNA)

***Fluorofor (=fluorochrom):** molekula, která po osvětlení světlem určité vlnové délky absorbuje energii tohoto záření a prakticky okamžitě jí ztratí emisí záření o delší vlnové délce. Tomuto jevu se říká fluorescence. Fluoroforem může být malá molekula, typicky organická sloučenina s aromatickým jádrem, nebo i celý protein (např. GFP). (Wikipedia)

1a) Real-time PCR (kvantitativní; qPCR)

Vyhodnocení dat z qPCR

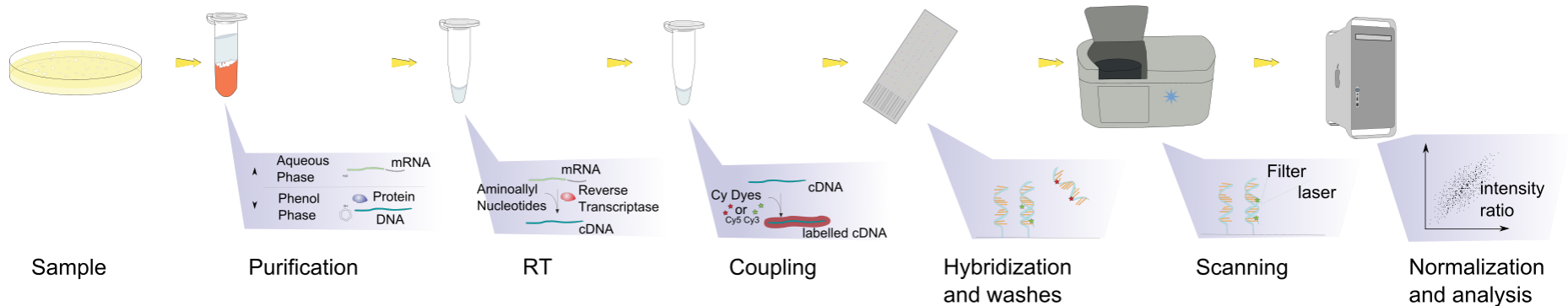
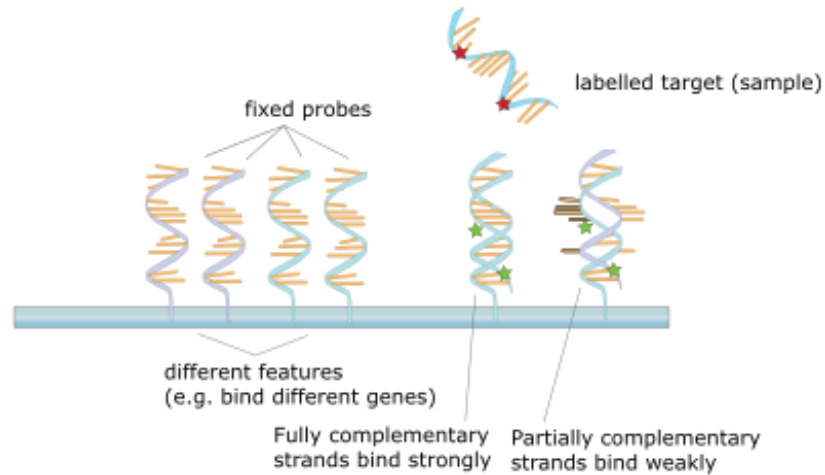
- 4 křivky v triplikátu
- pozdější nárůst = méně cDNA (menší exprese mRNA)
- sledování poklesu exprese genu OCT3/4 v průběhu diferenciace embryonálních kmenových buněk (hESC)
- OCT3/4 je exprimován nejvíce v kmenových buňkách a u diferencovaných buněk je umlčen



1b) Microarray

Mikroskopické spoty DNA fixované na pevném povrchu (chip, microarray)

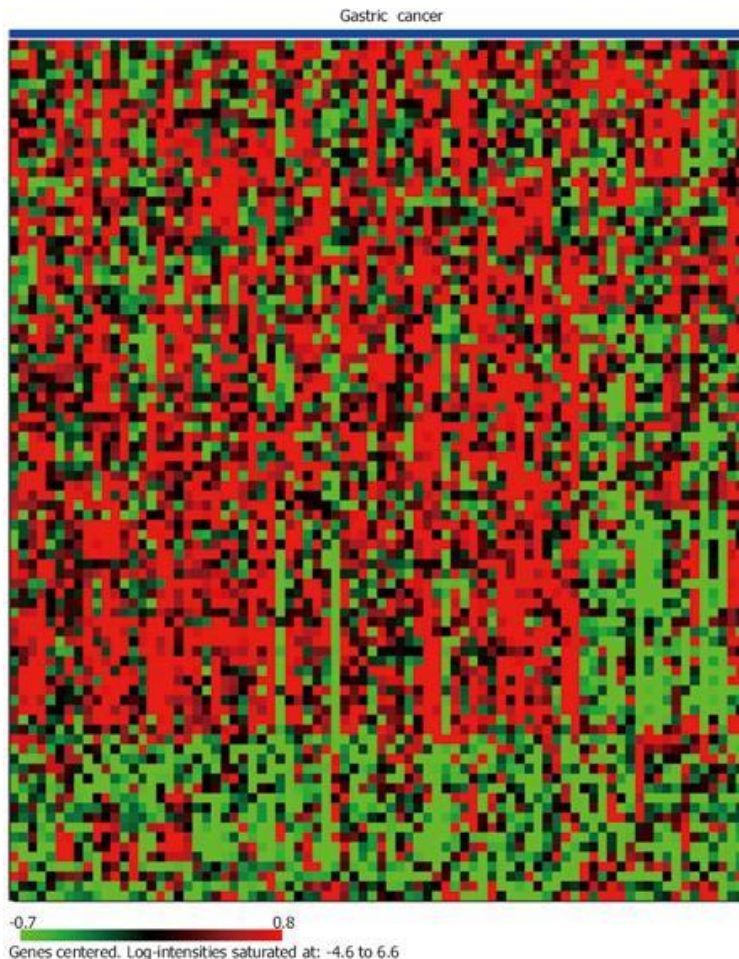
Funkce: zjištění míry genové exprese simultánně u obrovského množství genů
- každý spot (sonda, probe) je větš. krátký usek genu, který se hybridizuje s cDNA



1b) Microarray

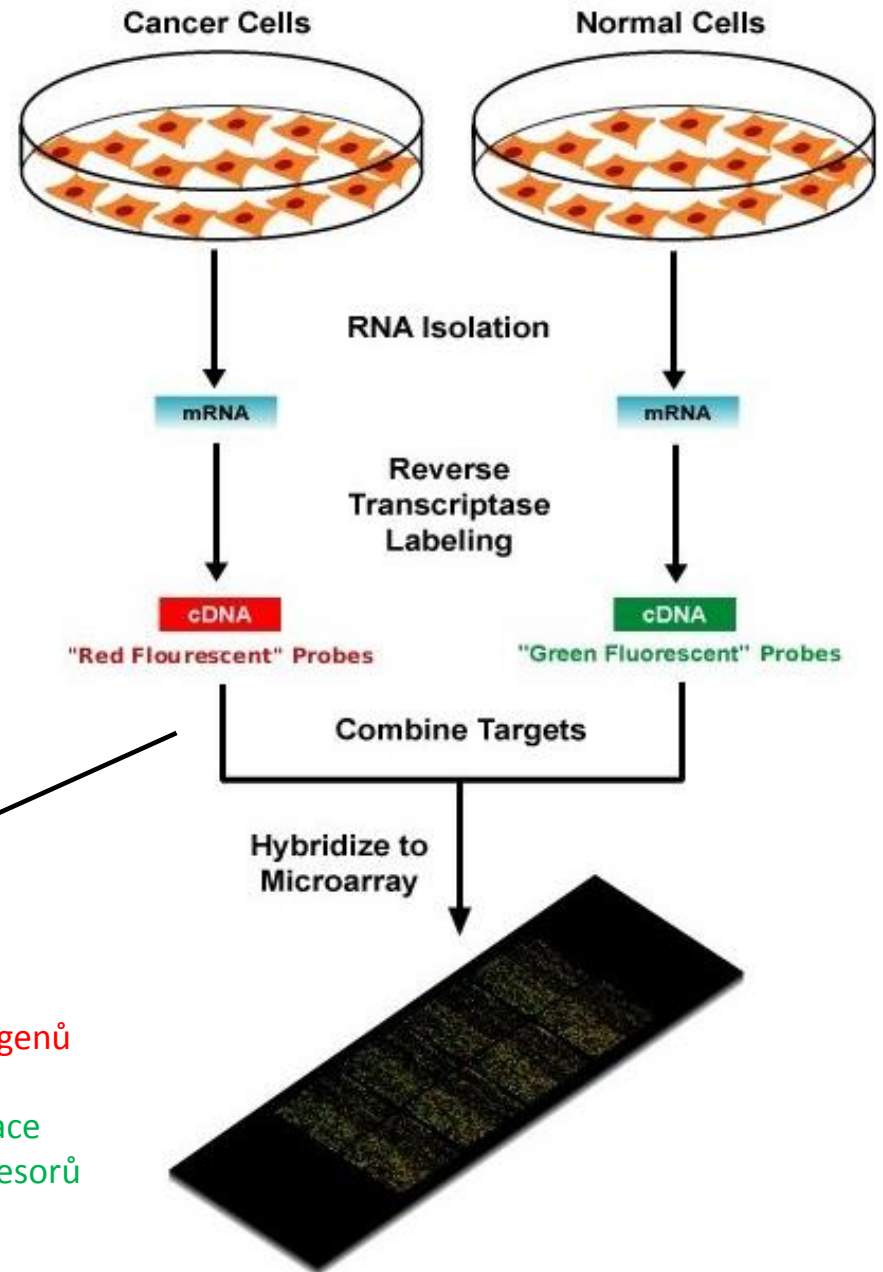
Srovnávají se mRNA dvou vzorků, např.:

- vzorek/referenční DNA
- zdravý/nemocný
- před/po léčbě



například:
upregulace
proto-onkogenu

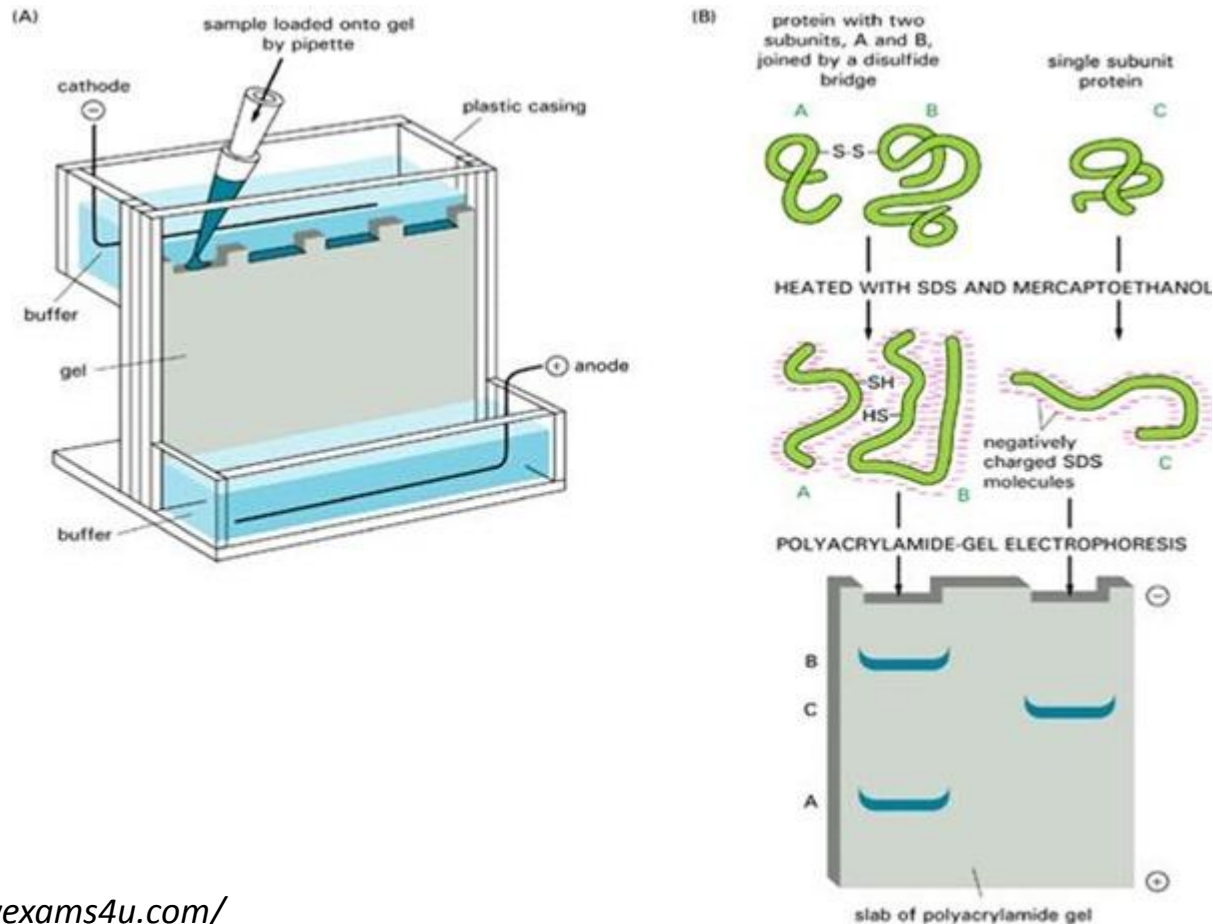
downregulace
tumor supresorů



2a) Western blotting

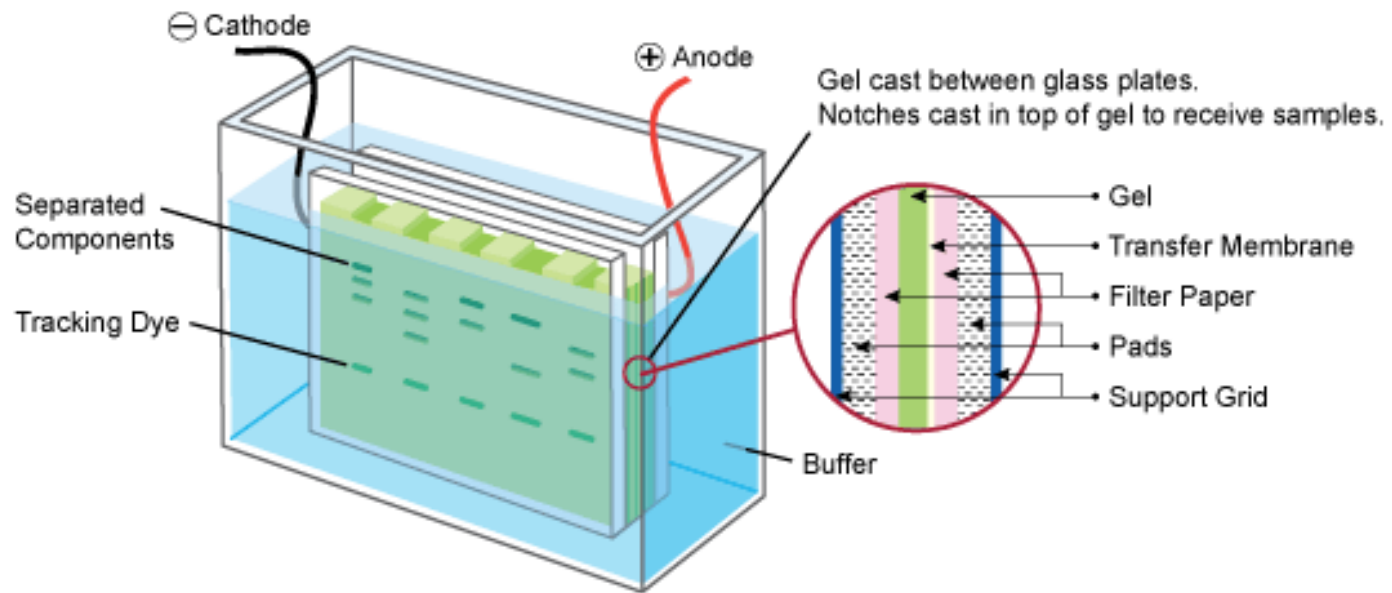
Určení množství určitého proteinu ve vzorku

1. vyizolovat celkový protein ze vzorků a změřit jeho koncentraci
2. zahřát s mercaptoethanolem a SDS pro přidělení negativního náboje a rozpojení disulfidických můstků
3. smíchat s barvičkou a nanést ve stejných koncentracích na polyakrylamidový gel



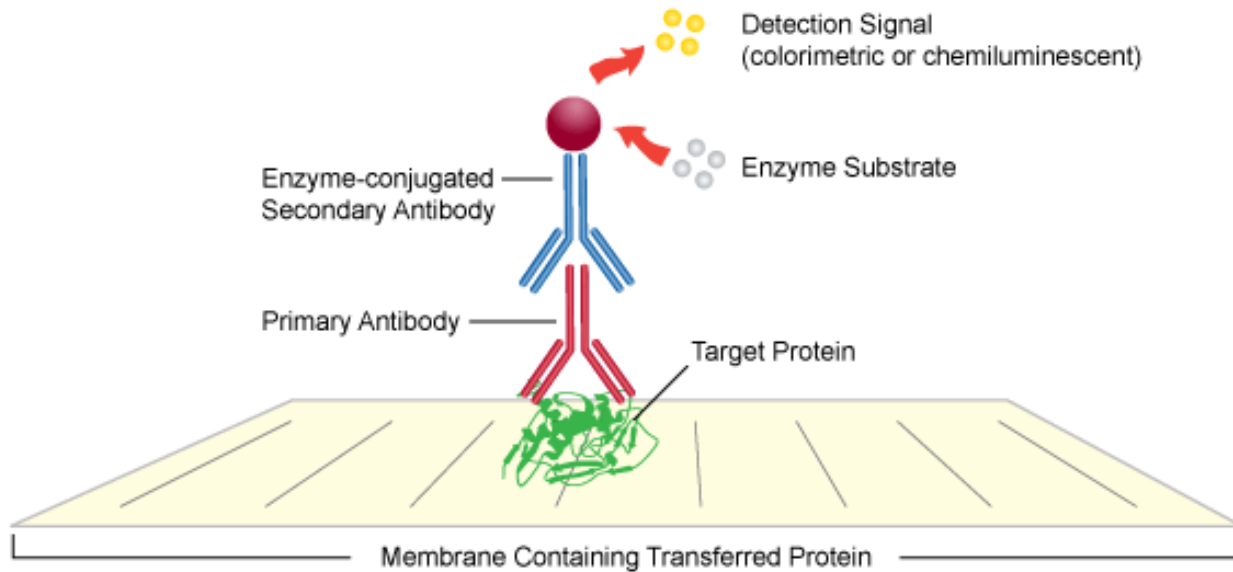
2a) Western blotting

4. přenést proteiny z gelu na nitrocelulozovou membránu



2a) Western blotting

5. inkubovat membránu s primární protilátkou proti sledovanému proteinu
6. inkubovat se sekundární protilátkou konjugovanou s enzymem (např. křennová peroxidáza; HRP)
7. nanést na membránu vyvolávací roztok se substrátem pro daný enzym (např. luminol)



2a) Western blotting

8. vyvolat membránu

- HRP katalyzuje oxidaci luminolu na 3-aminoftalát za emise světla
- nízká intenzita světla při 428nm
- přítomnost dalších chemikálií (fenoly) ve vyvolávacím roztoku amplifikuje světlo až 1000x
- tato amplifikace se nazývá "enhanced chemiluminescence - **ECL**"

- detekce pomocí CCD kamery
- vyvolání na fotografický film

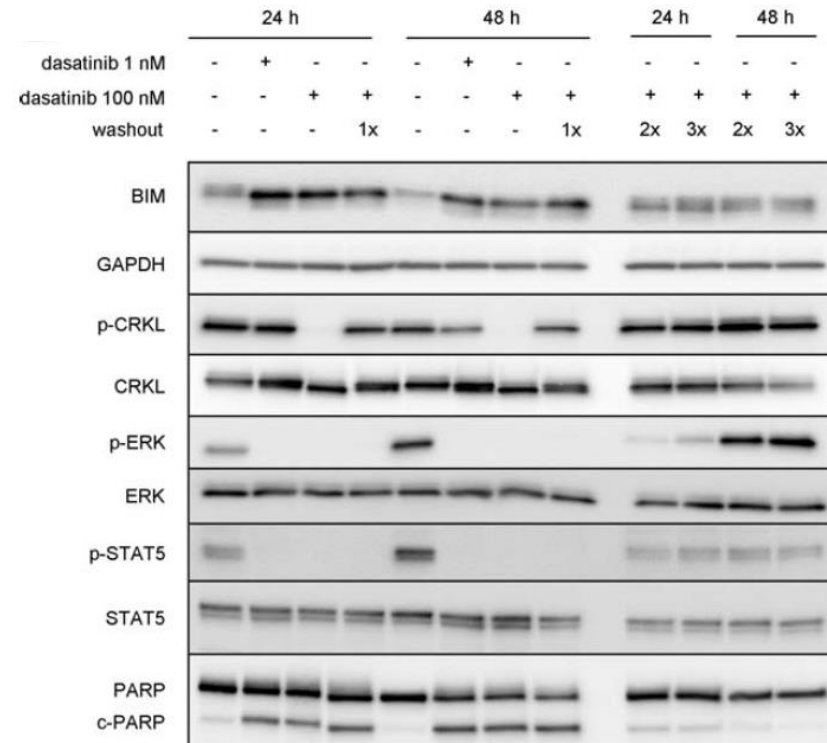


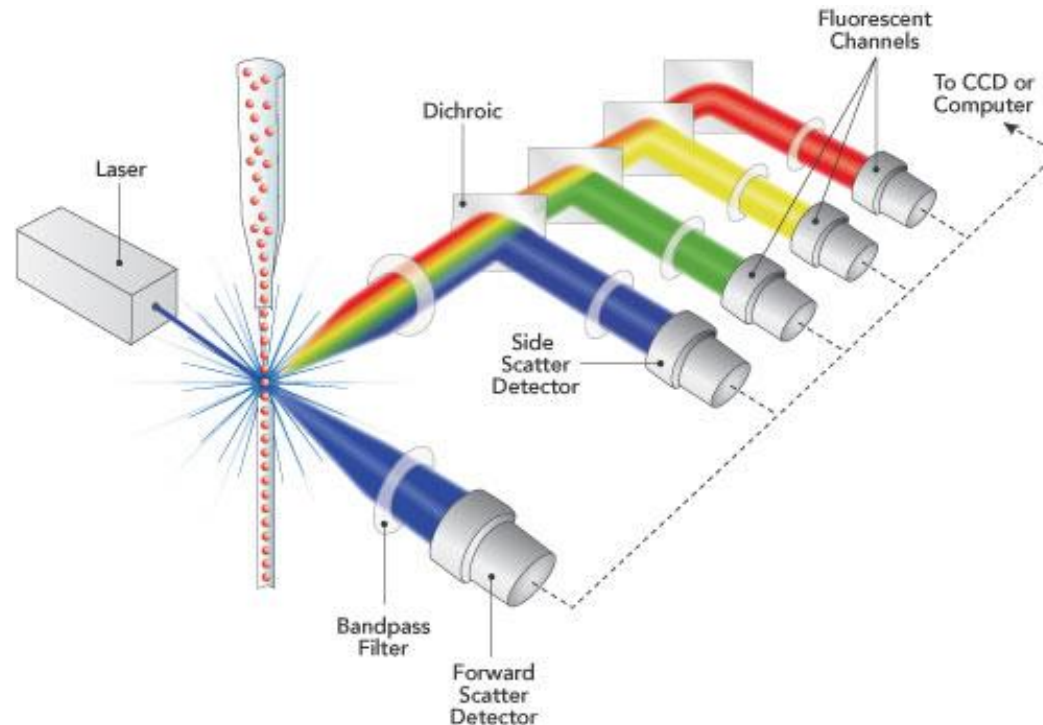
Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5 μ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5 μ M imatinib or 100 nM dasatinib) or a high dose transiently (washout 1 \times , 2 \times , or 3 \times). The cells were then lysed and analyzed by Western blotting. The incubation time was 24 and 48 hr.

2b) Flow cytometrie

Technika pro analýzu velkého množství buněk.

Na buňkách je možné rozlišit

- **velikost** (forward scatter)
- **tvar** (granularitu; side scatter)
- expresi **povrchových proteinů** (protilátka proti povrchovým antigenům konjugovaná fluochromem)
- expresi **intracelulárních proteinů** (buňky nutno usmrtit a permeabilizovat membránu)



2b) Flow cytometrie

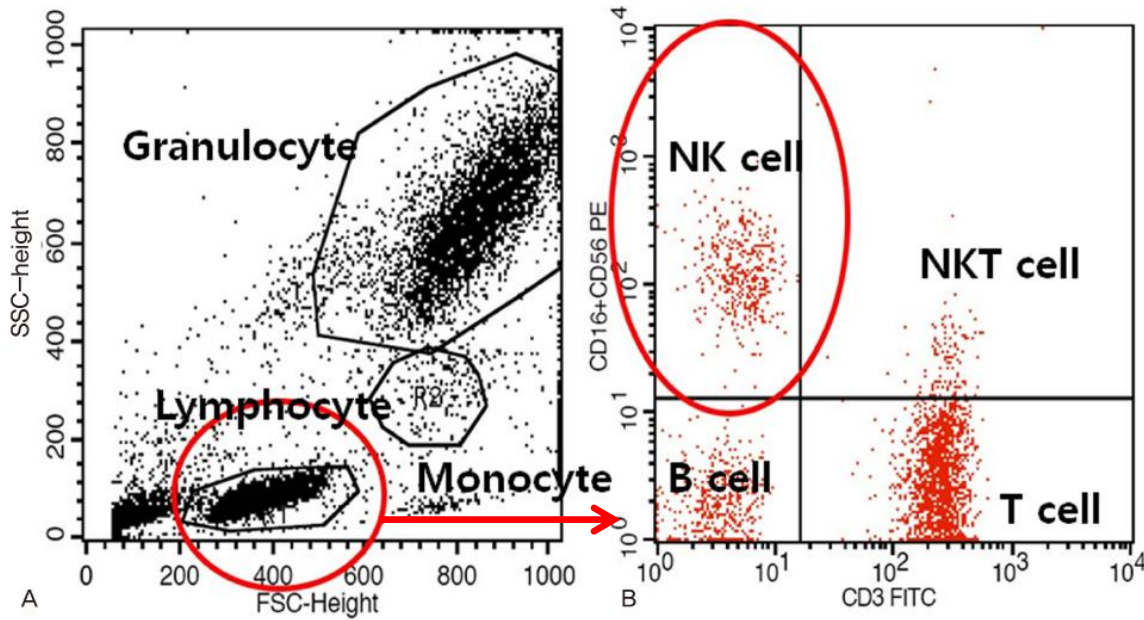
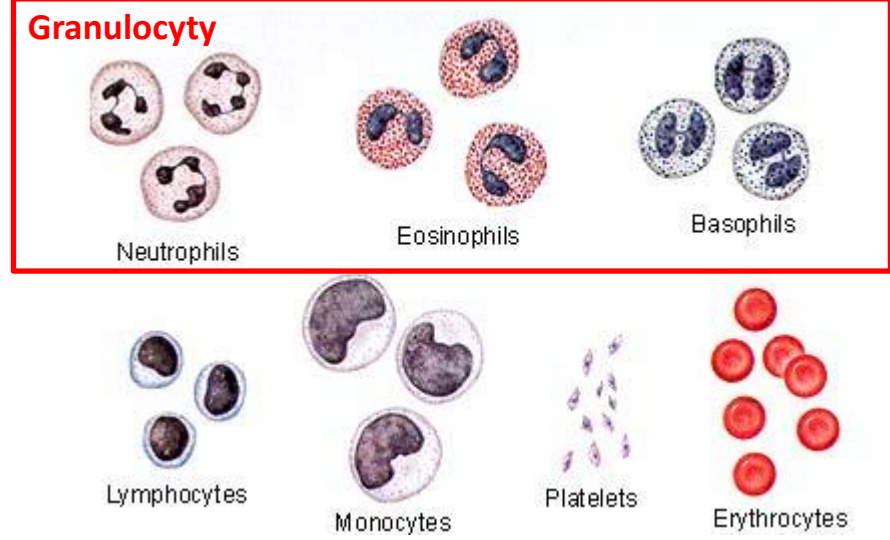
Vyhodnocení:

Leukocyty - bílé krvinky hledání NK buněk

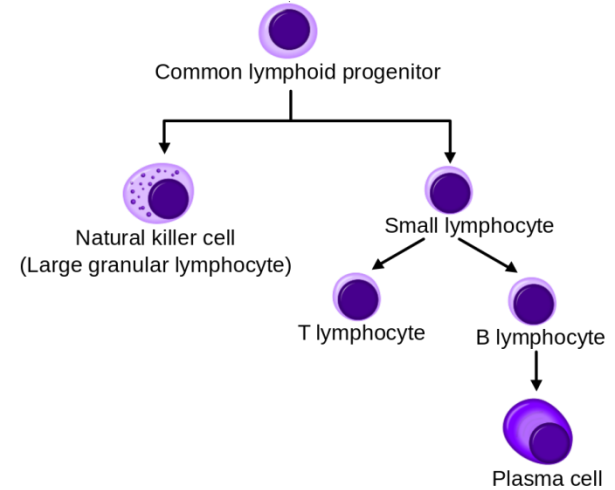
CD3 - T cell receptor

CD16 - povrchový antigen na NK buňkách,
neutrofilech, monocitech a makrofázích

CD56 - povrchový antigen NK buněk



R1 (lymphocyte) gating → CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺ (upper right) part reading



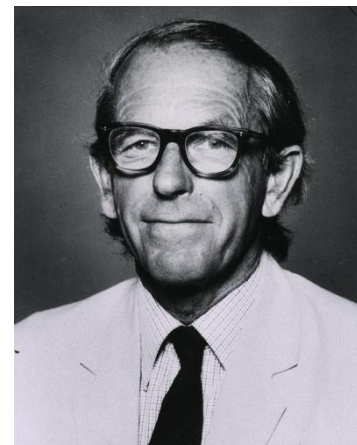
www.biosbcc.net,
www.ogscience.org
wikipedia

*NK cells - imunitní odpověď proti rakovinným buňkám a buňkám infikovaným virem
Granulocyty - přítomnost granulí v cytoplasmě a zaškrcení jádra*

Frederick Sanger (1918 - 2013)

Vynálezce metody dideoxy sekvenování DNA (též Sangerovo sekvenování)

- dvojnásobný držitel Nobelovy ceny za chemii (1958 a 1980)
 - 1952 definoval pořadí aminokyselin ve dvou řetězcích bovinního inzulínu
 - 1977 publikoval dideoxy metodu pro rychlé a přesné sekvenování



Wikipedia

Sangerovo sekvenování

Sekvenování je určování pořadí nukleotidů v molekule DNA

- principem je použití dideoxyribonukleosid trifosfátu (**ddNTP**) namísto deoxyribonukleosid trifosfátu (**dNTP**)
- při replikaci se normálně připojuje nový dNTP na OH-skupinu posledního dNTP na 3'-konci řetězce
- pokud se připojí ddNTP - elongace končí

ddNTPs terminate DNA synthesis.

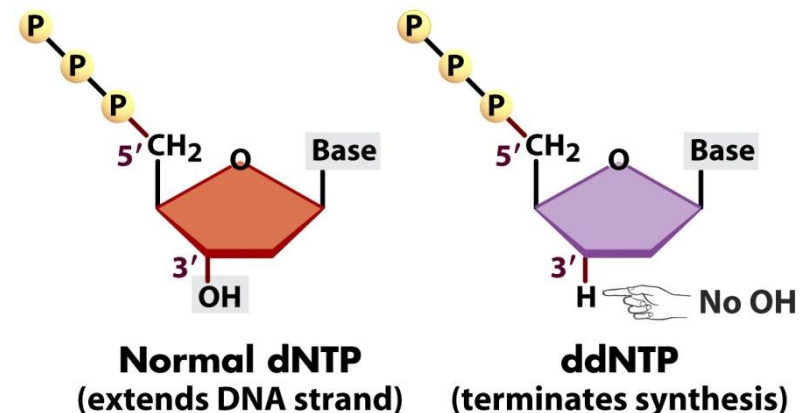


Figure 19-6a Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Sangerovo sekvenování

- smícháme templátovou DNA + DNA polymerázu + dNTP (T, A, C, G) + 1 ddNTP (např. G) + radioaktivně značený primer → elongace řetězce se zastaví na místech zabudování ddGTP
- vznikají nám různě dlouhé řetězce DNA

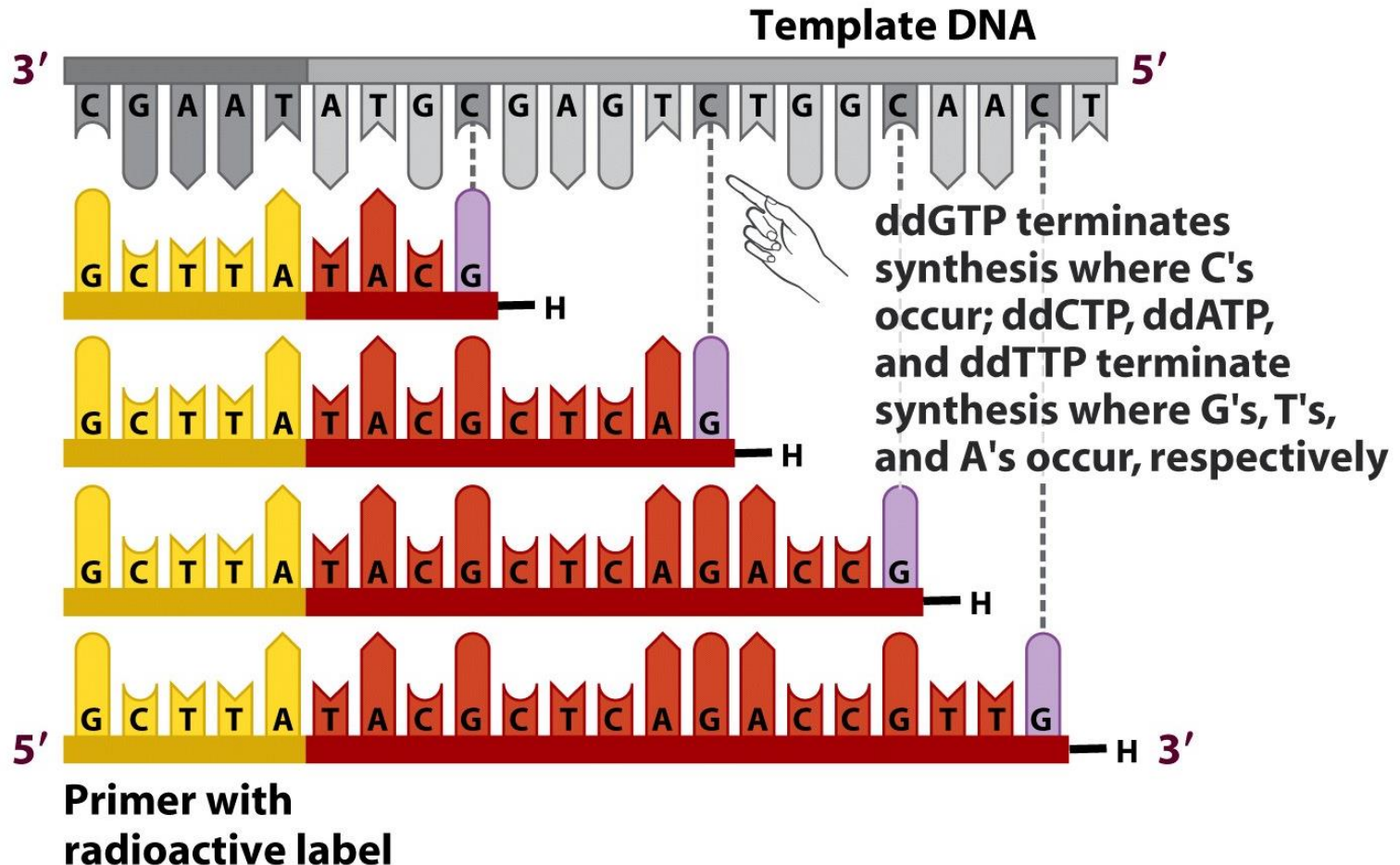


Figure 19-6b Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Sangerovo sekvenování

- Reakci provedeme 4x, pro každý dideoxyribonukleosid zvlášť (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP)
- produkty těchto 4 reakcí nanese do 4 jamek elektroforetického gelu a roztrídíme podle délky
- sekvence DNA je jasná z gelu

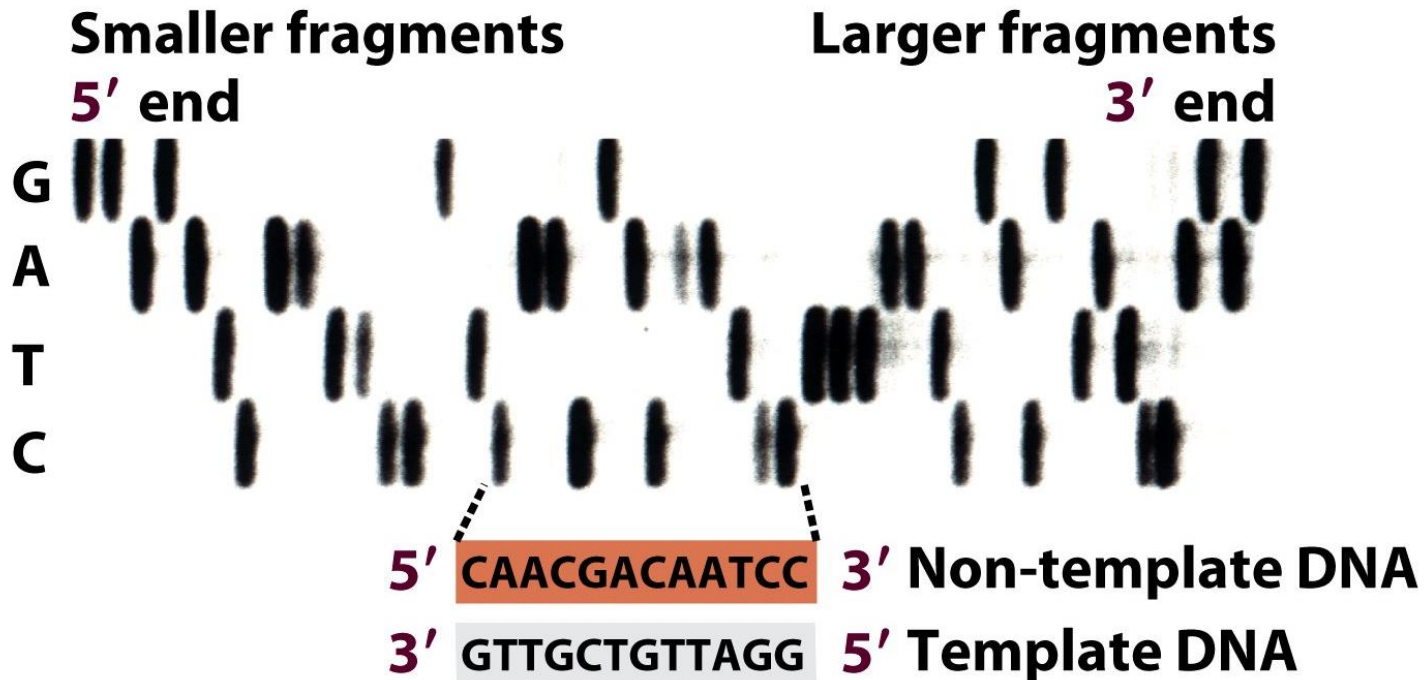


Figure 19-6c Biological Science, 2/e

Modernizace Sangerova sekvenování

- ddNTP jsou značeny fluorescenčně, každý jinou barvičkou a proto lze všechny 4 ddNTP smíchat do jedné reakce
- fragmenty jsou separovány v kapilárách naplněných gelem
- automatické zaznamenávání délky jednotlivých fragmentů

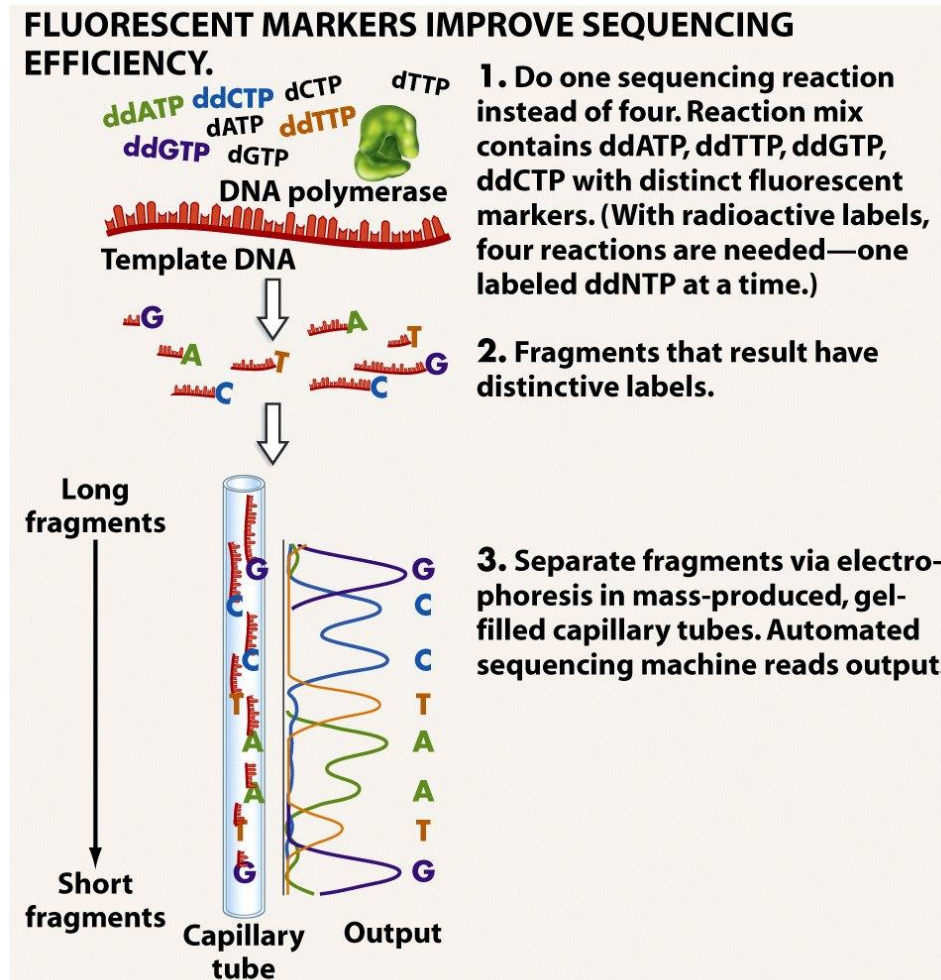


Figure 20-1 Biological Science, 2/e

Buněčné reprogramace

Příprava lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC)

Tyto jsou schopny diferencovat do tkání všech třech zárodečných listů

Jedním z možných využití je příprava progenitorů pro transplantace (např. krevní, pankreatické, jaterní...)



Shinya Yamanaka

nar. 1962

Nobelova cena 2012 (sdílená s J. Gurdonem)

Sebeobnova (self-renewal) a diferenciacie

"Stem cell is capable of self-renewal and gives rise to a specialized cells"

Typy kmenových buněk

Totipotentní...	dává vznik celému organismu <i>např. zygota; časná blastomera</i>	} pouze v embryu
Pluripotentní...	diferencuje do všech 3 zárodečných listů, ale ne do extraembryonální tkáně <i>např. inner cell mass; ESC; iPSC</i>	
Multipotentní...	diferencuje do různých buněčných typů v rámci určité linie <i>např. hematopoietic stem cell</i>	} existují i v dospělých
Unipotentní...	diferencuje pouze do jednoho buněčného typu <i>např. spermatogonium</i>	

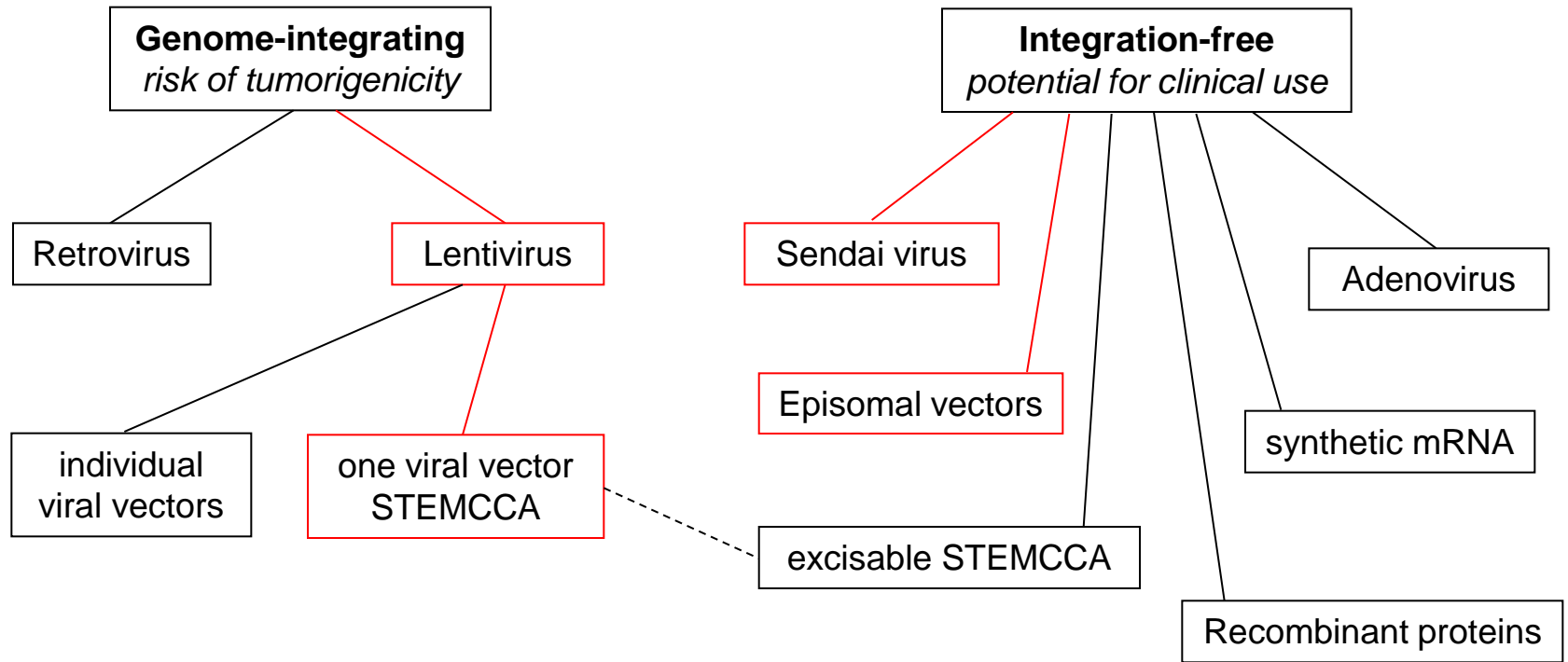
Reset do embryonálního stavu

- diferenciaci probíhá většinou jednosměrně a reprogramace či transdiferenciaci je vzácná (např. některé nádory)

- avšak jádro většiny buněk si zachovává schopnost resetovat se do embryonálního stavu:

- **Nukleární transfer** - jádro somatické buňky je vystaveno faktorům oocyty
1952, Briggs, 1962 Gurdon: transplantace jádra z buňky blastuly do žabích vajíček
1997, Wilmut: ovečka Dolly, první naklonovaný savec
neprovedeno na lidech; je potřeba značné množství oplozených vajíček, neetické
- **Přímá reprogramace** - **indukovaná** overexpresi definovaných transkripčních faktorů
2006, Takahashi a Yamanaka: transformovali myší fibroblasty do pluripotentních buněk vložením 4 genů - Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc (OSKM)
2007, Takahashi; Yu: iPSC z lidských fibroblastů

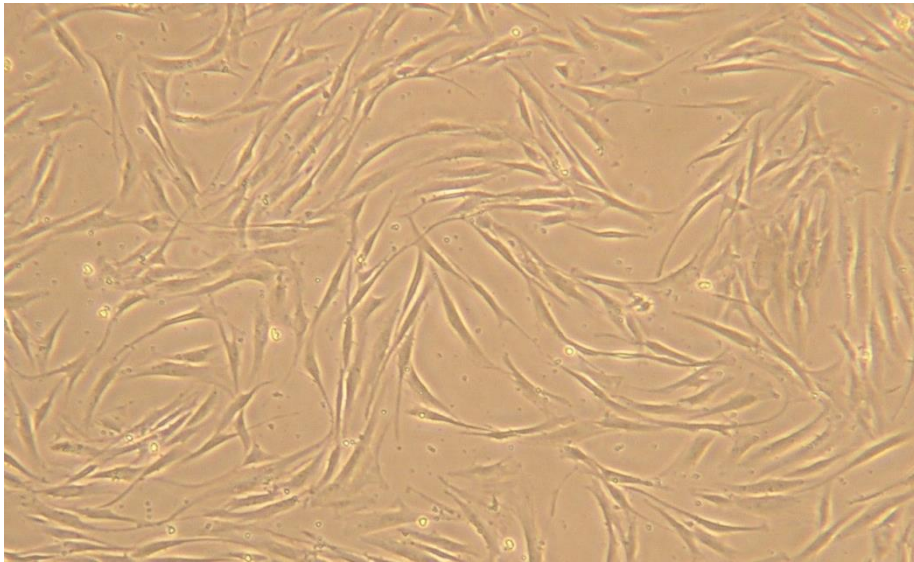
Jak připravit lidské iPSC?



Zdrojové buňky

Libovolná somatická (tělní) buňka

Nejčastěji kožní fibroblast nebo krevní buňka



Fibroblasty



Krevní buňky (mononukleáry)

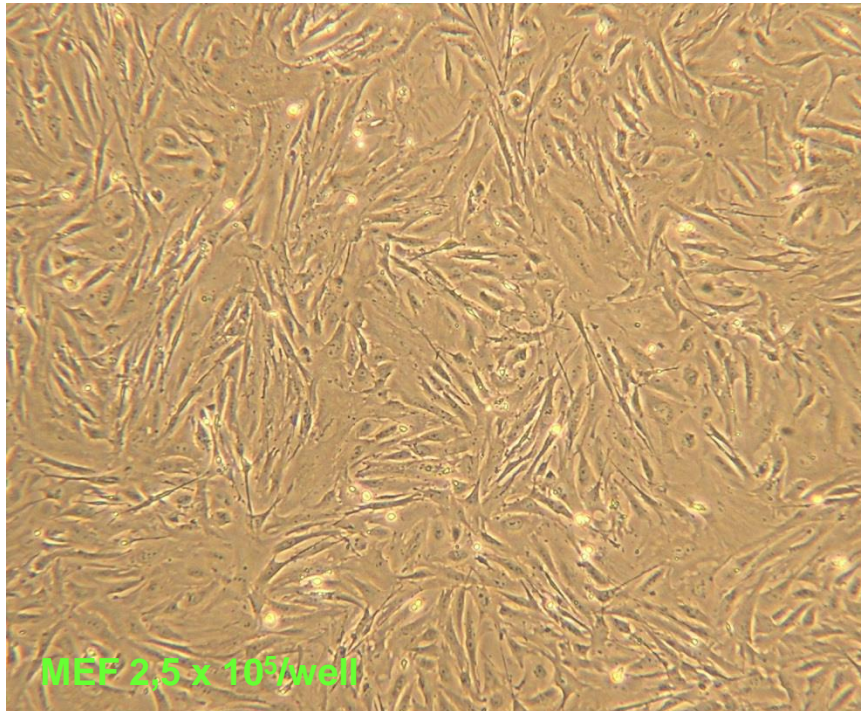
Povrch pro kultivace iPSC

a) MEF feeders (myší embryonální fibroblasty)

iPSCs kultivovány na vrstvě ozářených MEF (50Gy)

MEF zajišťují uchycení iPSC a produkují potřebné růstové faktory pro iPSC

MEFy získávány z myších embryí

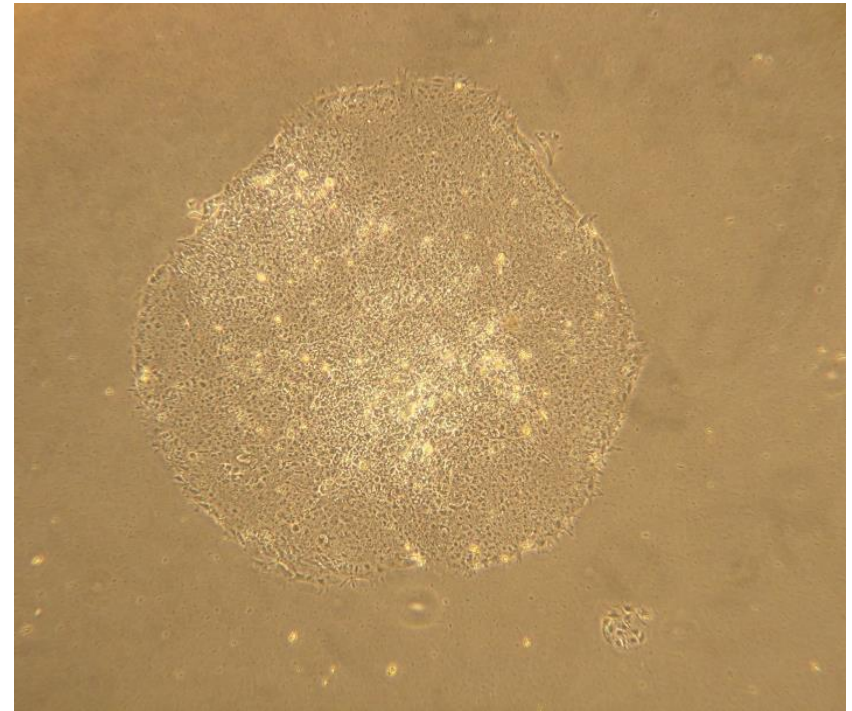


b) Geltrex™ feeder-free system

Kultivační misky pokryty membránovým matrix

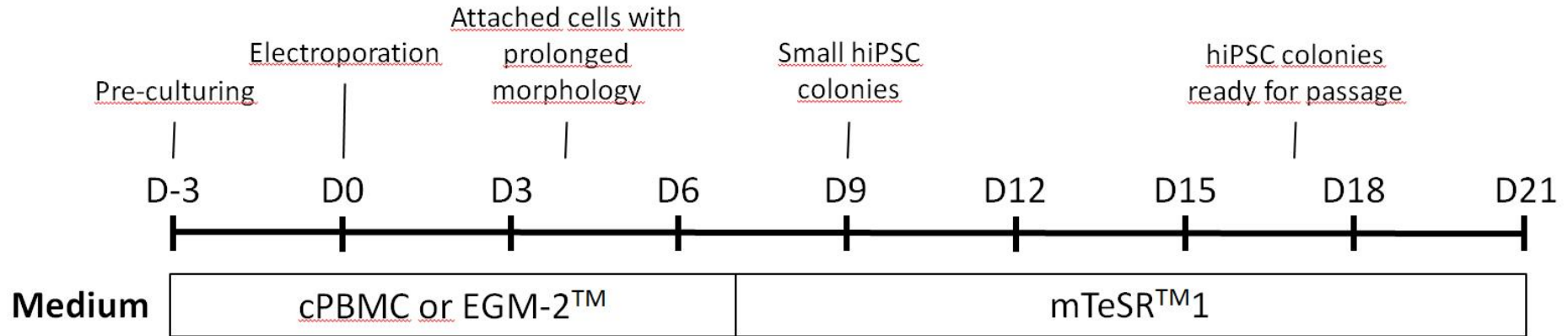
Nepřítomnost xenogenních buněk je vhodnější pro klinické aplikace

Nutné medium, které obsahuje chybějící růstové faktory (mTeSR, E8...)

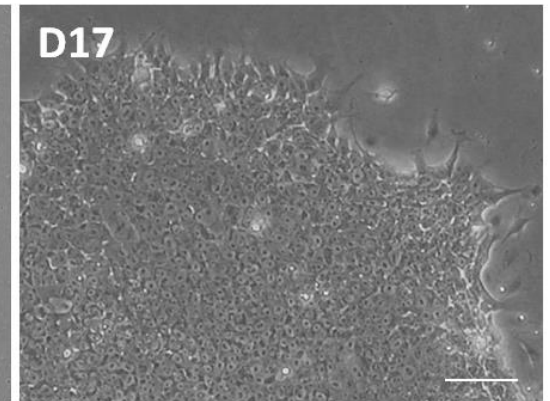
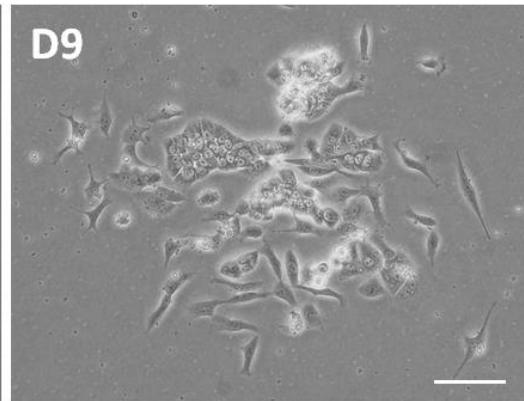
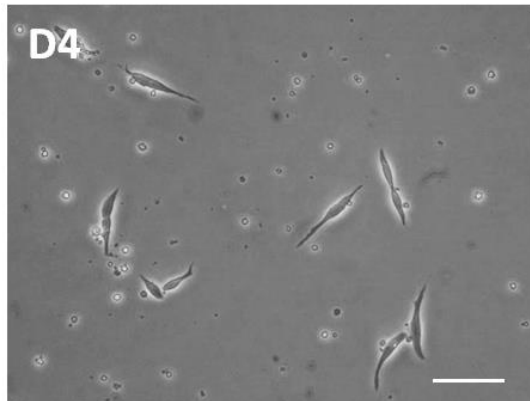


Reprogramming timeline

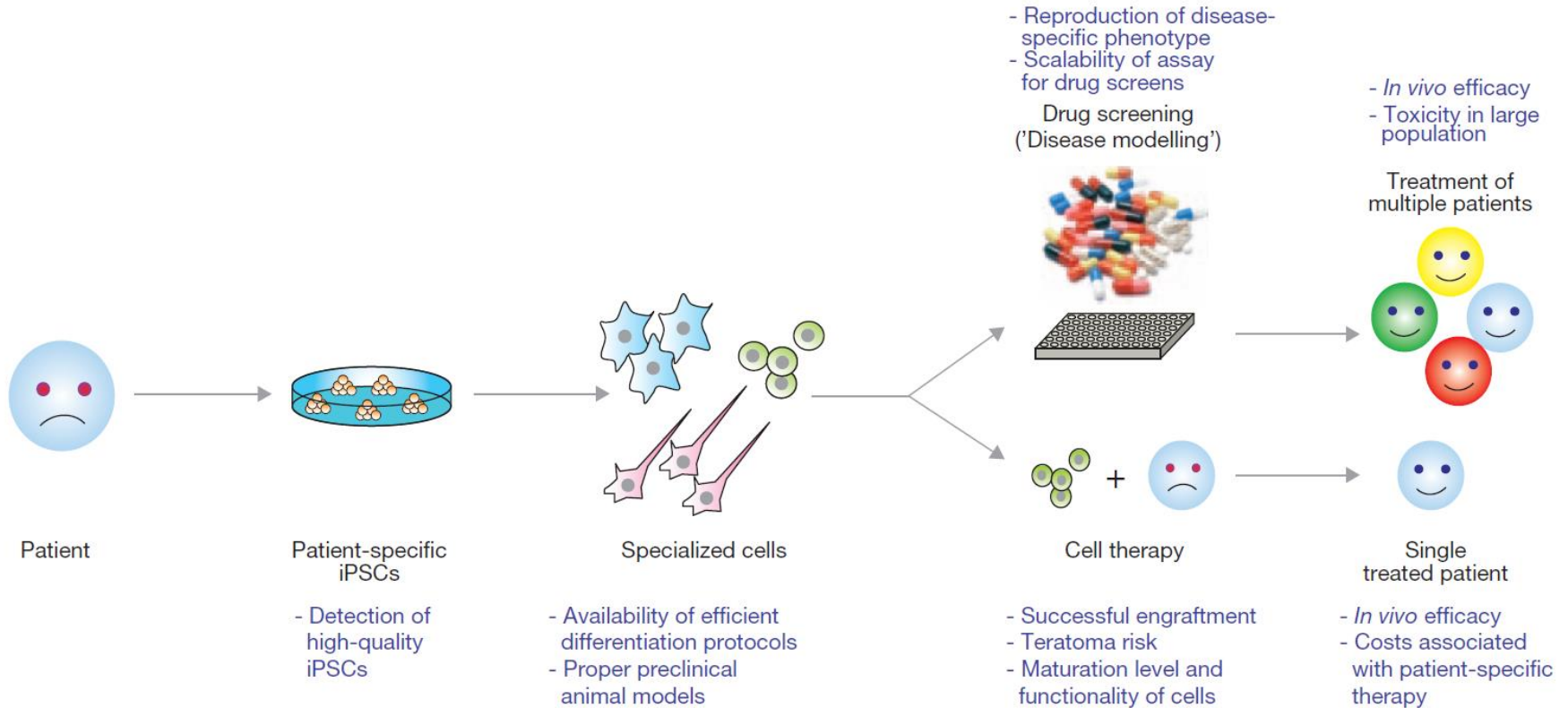
Reprogramace krevních buněk episomálními vektory na Geltrexu



cPBMC: StemPro®-34 SFM + SCF, Flt-3L, IL-3, IL-6

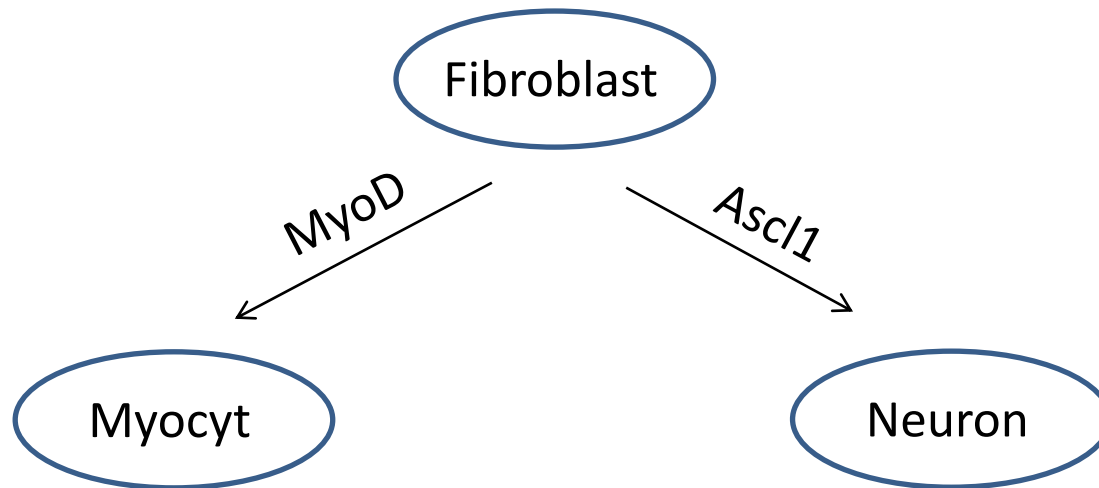


Potenciál iPSC v regenerativní medicíně



Buněčné transdiferenciace

- vydifferentovaná buňka má schopnost, změny na jinou buňky, při použití vhodných transkripčních faktorů
- z kožního fibroblastu lze vytvořit svalový myocyt (1970s) nebo neuron (2000s)
- lze přeskočit mezikrok kmenová buňky



Chimerní organismus



Chiméra

Podle řecké mytologie, hybridní tvor, složený z částí více než jednoho zvířete. Obvykle zobrazován jako lev s hlavou kozy a ocasem z hadí hlavy.

Tvorba chimerních organismů

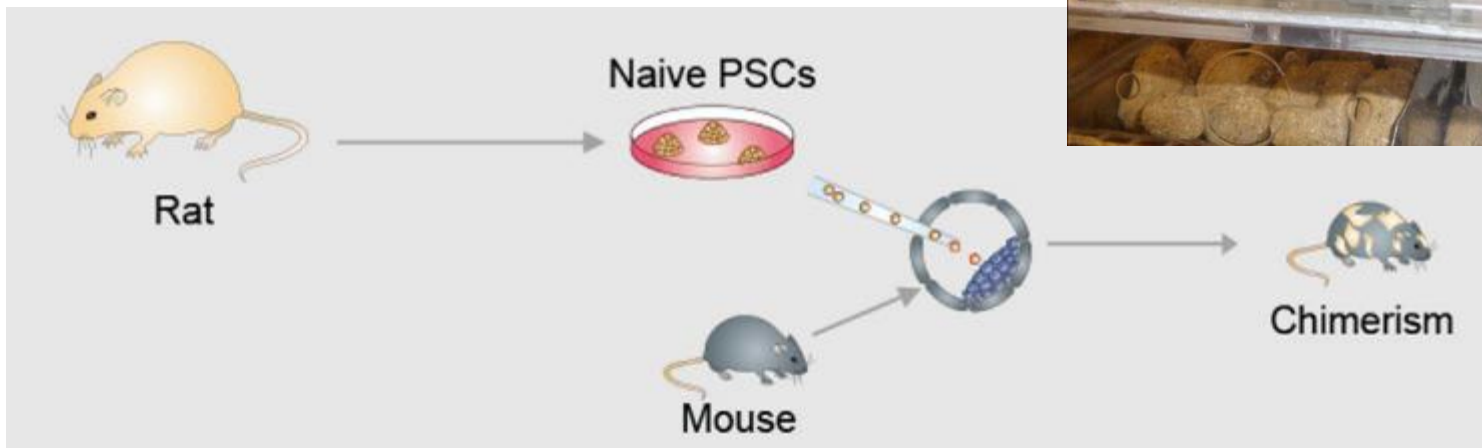
a) vložit orgán jednoho organismu do jiného

- pravděpodobně bude odmítnut imunitním systémem hostitele

b) vložení kmenových buněk jednoho organismu do embrya jiného organismu

- buňky lze směřovat do určitého orgánu tak, že v hostitelském embryu pomocí CRISPR/Cas9 vyřadíme např. geny pro vývoj slinivky a slinivka vyrostе pouze z buněk dárce
- imunitní systém hostitele ještě neexistuje a cizí buňky se naučí tolerovat
- km. buňky dárce ovšem mohou proniknout částečně i do jiných orgánů (mozek, spermie)

"Kryso-myš"

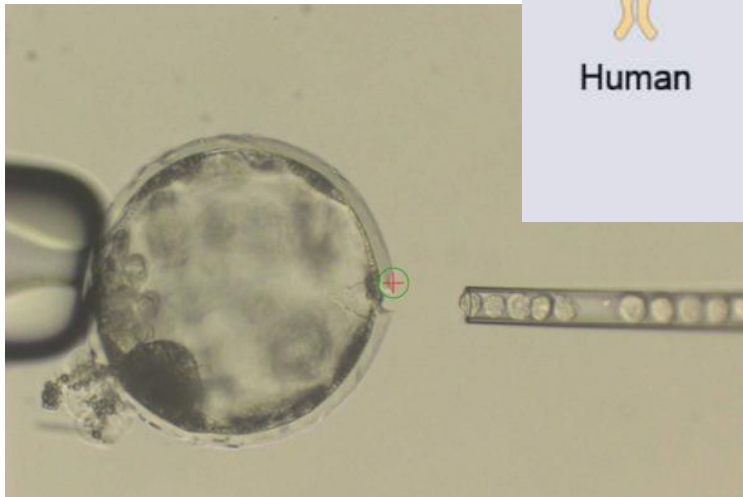


Tvorba chimerních organismů z lidí

Lidské embryonální buňky mají schopnost integrovat se do embrya jiného druhu a diferencovat tam

Wu et al., Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells.

- vložili 3-10 buněk lidských hiPSC do prasečího embrya (167 embryí; blastocysta 7dní)
- embrya vložena do děloh bachyní a analyzována po 3-4 týdnech vývoje
- chimerní embrya měla sice zpomalený růst oproti kontrolním prasečím embryím, ale obsahovala v průměru 100 000 lidských buněk



An image of a pig blastocyst being injected with human cells.

