

Metody přenosu DNA do buněk

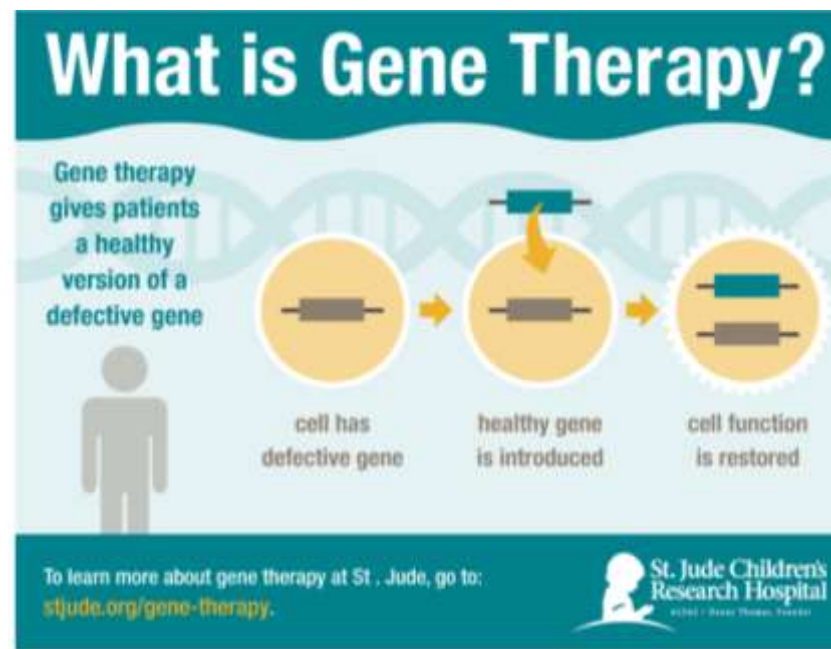
Mgr. Zuzana Bábková

Ústav molekulární biologie a farmaceutické
biotechnologie



Proč je výhodné přenášet DNA do buněk?

- vhodné pro studium
 - funkce genů a mechanismů řídících genovou expresi
- biotechnologie
 - produkce proteinů ve velkém rozsahu
- genové terapie
- a další ...



Zdroj: <http://desispeaks.com/gene-therapy/>

Transfekce nebo transformace?

- přenos izolované DNA do buněk
- **transformace:** přenos DNA do prokaryotických buněk
- **transfekce:** přenos DNA do eukaryotických buněk
- transfekuje/transformuje se buňka, nikoliv DNA!

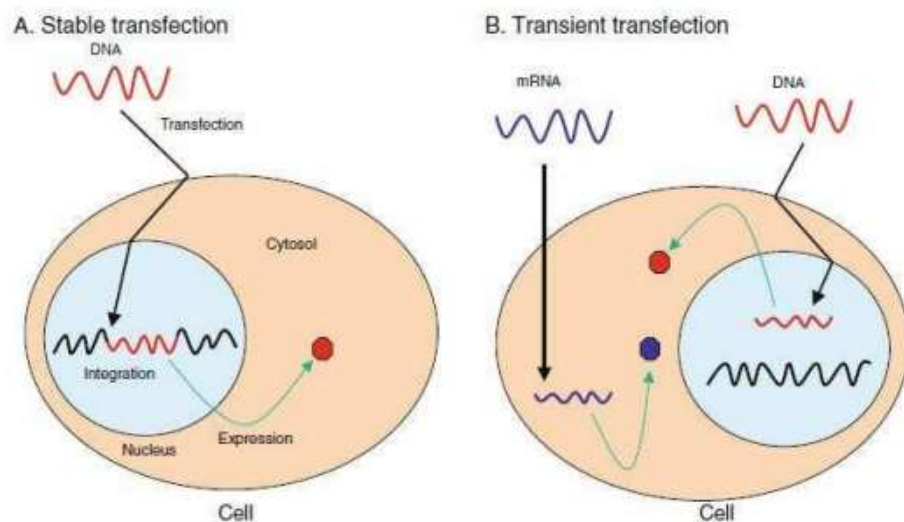
Klasifikace transfekčních postupů

Podle stability transgenu

- transfekce přechodná
- transfekce stabilní

Podle způsobu penetrace membrány

- postupy biochemické
- postupy fyzikální
- postupy biologické



Transfekce dle stability transgenu

1. Transfekce přechodná

- přenášená DNA se dostává do buňky, ale zůstává v extrachromozomálním stavu, transgen se přepisuje po omezenou dobu
- jedna transfekovaná buňka může obsahovat větší počet kopií transfekční DNA (vyšší exprese transgenu)
- vhodná pro studium přenášených genů a produkci proteinů v malém rozsahu
- experimentování je časově omezeno z důvodu postupného vyředění exogenu
 - přenos izolované DNA do buněk

Transfekce dle stability transgenů

1. Transfekce stabilní

- přenášená DNA se začleňuje do chromozomu hostitelské buňky (tento děj nastává s nízkou frekvencí 10^{-5} – 10^{-6})
- nízká pravděpodobnost výskytu dvou nebo více kopií transgenů v jedné buňce
- zajistí dlouhodobou a reprodukovatelnou expresi exogenu
- vhodná pro studium funkce genů a mechanismy jejich regulace, produkci proteinů ve velké rozsahu, genovou terapii

Transfekce dle stability transgenů

1. Transfekce stabilní

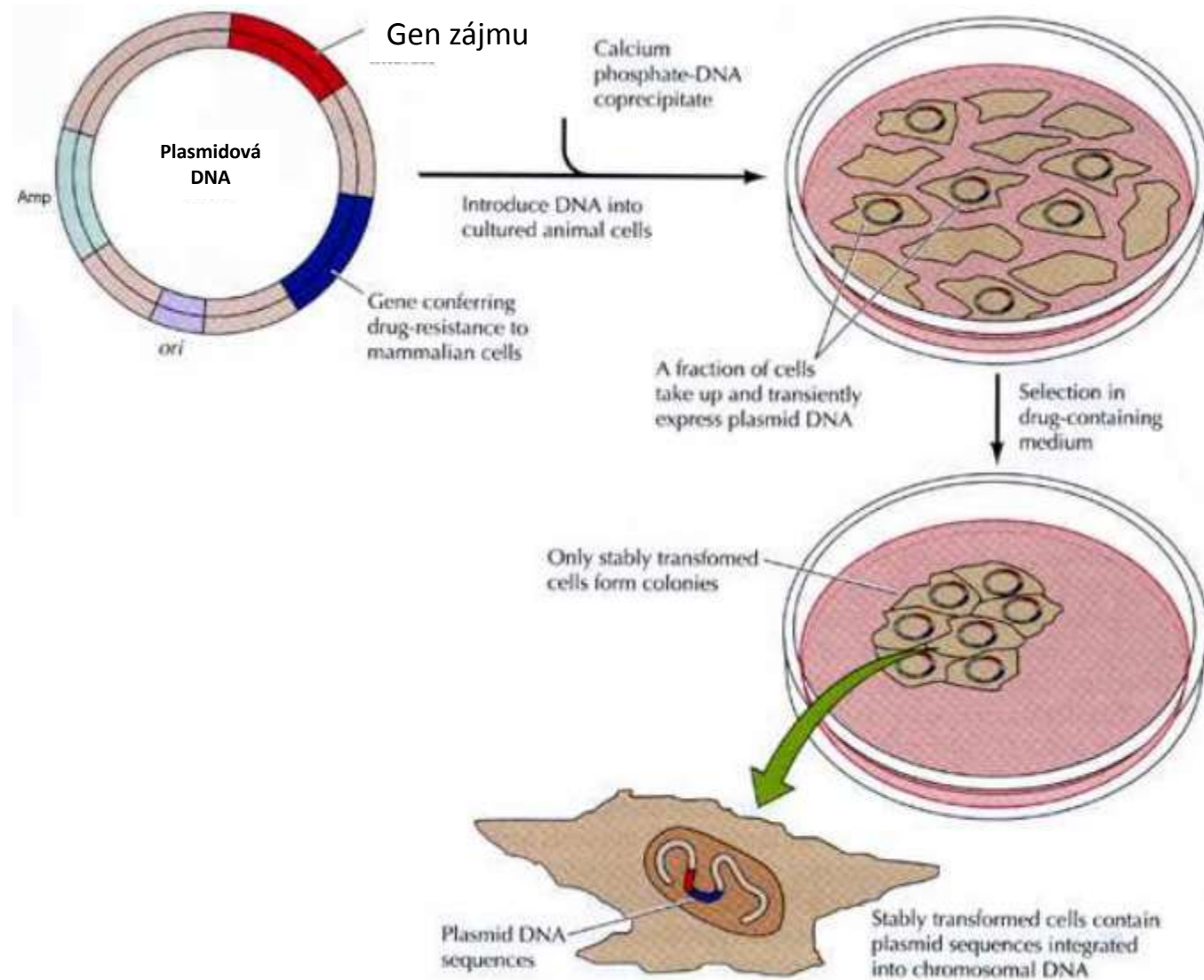
- vyředění exogenu nehrozí, v genomu se udržuje jako stabilní znak
- přenášený gen musí překonat plazmatickou i jadernou membránu
- místo integrace může rozhodovat o účinnosti exprese (integrace do heterochromatinu vede k nízké nebo žádné expresi)
- lze řešit dodáním specifických sekvencí do vektoru, které umožní místně specifickou integraci

Biochemické transfekční postupy

1. Transfekce zprostředkovaná fosforečnanem vápenatým:

- DNA se smíchá s chloridem vápenatým ve fosfátovém pufru
- vytvoří se jemná sraženina DNA a fosforečnanu vápenatého
- precipitát je pohlcován buňkami endocytózou
- účinnost transfekce je relativně vysoká: až 50% buněk může cizorodou DNA přijmout
- „hrubostí“ sraženiny lze regulovat poměr cytotoxicity a účinnosti transfekce
- Použití:
 - přechodná i stabilní transfekce fibroblastů a jiných adherujících i neadherujících buněk

Transfekce srážením a endocytózou



Biochemické transfekční postupy

2. Transfekce zprostředkovaná DEAE-dextranem

- **Dietylaminoetyl(DEAE)-dextran:**
 - vysokomolekulární kladně nabitý polymer
 - slouží jako most mezi negativně nabitou DNA a povrchem buňky
- **Princip:**
 - negativně nabitá DNA se váže ke kationtům DEAE- dextranu
 - komplex se přidá k buňkám, do kterých proniká endocytózou
- **Použití:**
 - adherující i neadherující buňky (značná variabilita účinnosti u různých typů buněk)
 - nevhodné pro stabilní transfekci (toxicita)
 - jednoduchost, rychlost, spolehlivost
 - omezuje růst, způsobuje morfologické změny, vyžaduje dočasné snížení koncentrace séra

Biochemické transfekční postupy

3. Transfekce lipofekcí

- Princip:
 - transfekčním činidlem je lipofilní molekula, která obklopí přenášenou DNA
 - transfekční činidlo má pozitivně nabitě skupiny – usnadnění vazby k negativně nabitě DNA
 - lipidy s navázanou DNA fúzí s buněčnou membránou a zajistí tak přenos DNA do buňky
- Použití:
 - rozmanité buněčné typy, často velmi dobrá účinnost

Fyzikální transfekční postupy

1. Transfekce genovou pistolí („gene gun“)

- Princip:
 - nastřelování buněk kovovými projektily pokrytými DNA
- Použití:
 - pro transfekci rostlinných buněk
 - je třeba optimalizovat řadu parametrů:
 - počet buněk vystavených transfekci (buněčnou hustotu, rychlost proliferace buněk)
 - typ média
 - stupeň vakua ve střelné komoře
 - míru tlaku hélia na mikroprojektily
 - vzdálenost mezi puškou a buňkami
 - velikost mikroprojektilů (obvykle částice zlata nebo wolframu o průměru 0,6-1,6 μm)

Mikroprojektilová pistole



Fyzikální transfekční postupy

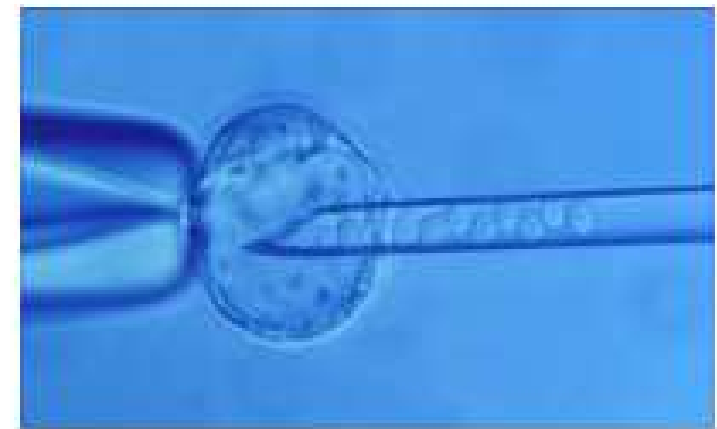
2. Transfekce elektroporací

- Princip:
 - DNA a buňky se smísí v empiricky definovaném pufru
 - směs se vystaví krátkému elektrickému pulzu o vysokém napětí
 - následkem elektrického šoku dojde k přechodnému otevření pórů v plazmatické membráně
 - póry proniká do buňky DNA
- Použití:
 - metoda je rychlá a použitelná pro mnoho typů adherujících i neadherujících buněk

Fyzikální transfekční postupy

3. Transfekce mikroinjekcí

- Princip:
 - Mechanický přenos DNA do buněk jemnou jehlou mikromanipulátoru pod kontrolou mikroskopu (2 – 5 pikolitrů)
- Použití:
 - Vhodnými objekty jsou velké buňky jako oocyty



Microinjection of embryonic stem cells into a blastocyst

Biologické transfekční postupy

1. Virové vektory

- transdukce
- nejdříve musí dojít k úpravě virů (odstranění patogenních genů, ale zachování genů udržujících správný životní cyklus viru)
- živé vektory
- mají vysokou účinnost přenosu do buněk
- jsou vhodné pro genové manipulace s živočišnými buňkami bez plasmidu
- každý druh viru je limitován svojí klonovací kapacitou (maximální možné množství bází, které lze vložit do genomu viru)
- především v genové terapii
- adenoviry s dsDNA, adeno-asociované viry se ssDNA, retroviry s ssRNA, lentivirus (retrovir, ale začlení se i do nedělících se buněk) a herpesviry s dsDNA

Biologické transfekční postupy

2. Fágové vektory

- rekombinantní DNA lze sbalit do kapsidů a přenést do hostitelských buněk infekcí (vyšší účinnost)
- vhodné pro klonování větších fragmentů DNA (tvorba genových knihoven)
- vektory pro eukaryotní buňky
 - kvasinky
- nejvýznamnějším je bakteriofág λ
 - má dsDNA
 - klonovací kapacita je až 23 kbp (asi dvakrát více než u plasmidových vektorů)

Selekční systémy eukaryotických buněk

- podmínka izolace vzácných stabilních transfektantů
- původně založeny na obnovení porušených metabolických drah v buňce (70. léta 20. století)
- například: mutantní buňky s inaktivní **tymidinkinázou** (znemožněna syntéza tymidinu) byly transfekovány genem HSV-TK (herpes virus simplex TK)
- nevýhoda: nutnost inaktivace TK v cílových buňkách

Selekční systémy eukaryotických buněk

- 80. léta 20. století
 - objev dominantních selekčních markerů
 - bakteriálních enzymů využitelných u eukaryot
 - není třeba používat mutantní buněčné linie
- **guanin-fosforibozyltransferáza (gpt)**
- **aminoglykozid-fosfotransferáza (neo)**
- **hygromycin β -fosfotransferáza**
- **puromycin-N-acetyltransferáza**

Hypoxantin/guanin-fosforibozyl transferáza (HGPRT)

- katalyzuje syntézu GMP/IMP
- za přítomnosti **aminopterinu a kyseliny mykofenolové**, kdy je blokována syntéza GMP *de novo*, je přežití buňky závislé na integraci a expresi gtp
- **aminopterin** inhibuje dihydrofolát reduktázu
- **kyselina mykofenolová** specificky inhibuje inosinát dehydrogenázu
- tento blok lze uvolnit xantinem, pokud mají buňky k dispozici funkční produkt genu gtp *E. coli*

Aminopterin

- inhibitor dihydrofolát reduktázy
 - enzym nezbytný pro syntézu nukleotidových prekurzorů DNA a RNA
- aminopterin je syntetický analog kyseliny foliové, obsazuje vazebné místo dihydrofolát reduktázy a vytěsňuje tak přirozený substrát reakce (folát)
- výsledkem působení aminopterinu je inhibice replikace DNA, transkripce a translace
- první chemoterapeutikum pro léčbu dětské leukémie (Sidney Farber, 1947)

Aminoglykozid-fosfotransferáza

- poskytuje hostitelským buňkám rezistenci na antibiotikum G418 – geneticin (strukturně příbuzné gentamicinu)
- produktem je *Micromonospora rhodorangea*
- pokud se do růstového média přidá G418 (geneticin) závisí přežití buněk na stabilní integraci a expresi genu *neo*
- G418 narušuje funkci ribozomů a tak blokuje proteosyntézu v prokaryotických i eukaryotických buňkách
- bakteriální **aminoglykosid-fosfotransferáza** pozměňuje G418 do netoxické formy

Další selekční markery

- PAC (N-acetyl transferáza)
 - zdroj: *Streptomyces alboniger*
 - princip: poskytuje rezistenci na **puromycin**
- HPH (hygromycin β aminoglykozid fosfotransferáza)
 - zdroj: *E. coli*
 - princip: poskytuje rezistenci na **hygromycin β**
- DHFR (dihydrofolát reduktáza)
 - mutantní varianta, která neváže metotrexát
 - zdroj: myš
 - princip: poskytuje rezistenci na **metotraxát**

Účinnost transfekce lze sledovat reportérskými geny

- Reportérský systém
 - uměle vytvořený konstrukt DNA, který obsahuje promotor a potenciální regulační signály jednoho genu připojené k jinému genu, který kóduje snadno detekovatelný produkt (například: GFP)
 - transfekce buněk reportérským konstruktem a analýza jeho exprese umožňuje kvantifikaci účinnosti transfekce

Děkuji za pozornost

