

Živočišné buňky (komentáře)

Stránka 4

Živočišné buňky obvykle přijímají cizorodou DNA ochotně (ale ne vždy – primární buňky vs. ustanovené linie, adherentní vs suspenzní buňky, ...). Začlenění většinou náhodně ale i homologní rekombinací (lze vyselektovat – viz dále). Dráhy vlevo ukazují transfekci v tkáňových kulturách. Dráhy vpravo přípravu transgenního živočicha – využití zárodečných buněk

Stránka 5

Původně se používaly metabolické markery (TK, XGPRT, HGPRT). Nyní se častěji využívají antibiotika. Hojně je používán G418. Z metabolických se používá hlavně XGPRT. Některé geny i jiné využití než selekce.

Např. DHFR – pro amplifikaci klonovaných genů (viz dále)

Stránka 7

Používají se markery u buněk, jež mají poškozenou některou z drah zajišťující biosyntézu nukleotidů za standardních podmínek. U těchto buněk pak selekčním činidlem zablokujeme alternativní dráhu (případně dodáme i výchozí substrát).

HAT medium – aminopterin potlačí syntézu purinu i pyrimidinu, thymidin s TK nahradí pyrimidiny, hypoxantin je zdroj purinu (medium XAT – místo hypoxantinu se použije xantin), lze využít i mykofenolovou kyselinu jak selekční činidlo a XGPRT jako dominantní selekční marker. Některé formy HGPRT (a Ecogpt) umí metabolizovat Xantin na XMP.

Stránka 9

Transientní exprese se využívá tehdy, pokud chceme studovat fungování nějakého genu, stačí nám k tomu relativně krátká doba; obvykle se transientní exprese provádí po vnesení genů na nějakých vektorech, které se v těchto buňkách nereplikují (po určité době z buněk mizí), ale udrží se tam až 48-72 hodin, což stačí na analýzu. Pro stabilní transfekci potřebujeme selektovat buňky, do kterých se transgen začlenil trvale. Pozor na určitá omezení při využití selekce - začlenění transgenu do heterochromatinu, poškození genu zájmu při začlenění (selektujeme na marker a ne na gen zájmu), atd.

Stránka 11

S procesem přenosu cizorodé DNA do buněk však může být spojena celá řada nespecifických efektů, z nichž ty nejznámější jsou znázorněny na tomto schématu. Výsledkem je pak vlastně vznik komplexního buněčného fenotypu (stránka 12).

Stránka 14

Nosičová DNA – používala se na zvýšení účinnosti transfekce – př. Salmon sperm DNA, herring sperm DNA a zároveň na snížení vstupního množství plazmidu, také snížení artefaktů spojených s příliš velkou expresí cílového genu z plazmidu ...

Stránka 16

metoda je použitelná obecně; cílem izolovat funkční gen pro tk (tymidinkináza), z buněk, které jsou tk+ se izoluje genomová DNA, ta se naštěpí náhodně na fragmenty, některé z fragmentů ponese gen pro tk, potom se do buněk, které jsou tk- vnese jednak soubor fragmentů, dále pak rozštěpený plazmid, který bude „zachraňovat“ gen pro tk, tento plazmid má rezistenci k amp; v buňkách tk- dochází k tomu, že se fragmenty náhodně spojují s molekulami plazmidu, vznikají primární transfektanti - obsahují fragmenty z kuřecích buněk, navíc ještě mohou obsahovat plazmid (samostatně nebo v konkatemerní formě); u primárních transfektantů problém v tom, že ne vždy je gen pro tk spojen přímo s plazmidovou DNA. Proto se celý postup opakuje, vznikají sekundární transfektanti (zvýšení šance, že selektujeme klon, kde plazmid bude přímo spojen s TK) – vyřadí se plazmidy nespojené přímo s TK genem

Stránka 17

Příklad izolace genů se snadno selektovatelným fenotypem.

Stránka 19

vycházelo se z jednoduchých plazmidů jako pBR322, amp rezistence, počátek replikace, bez problému se replikuje v E. coli, tento plazmid byl spojen se sekvencemi pocházejícími z genomu opičího viru SV40 a to z toho důvodu, že právě z tohoto viru byla převzata celá řada regulačních sekvencí; jednak to byl počátek replikace (ori SV40), dále promotor T-antigenu, intronová sekvence - introny se používají z toho důvodu, že se zjistilo, pokud je klonován eukaryotický gen, k jeho expresi dochází mnohem účinněji, když je poblíž genu začleněn intron; eukaryotické geny mají své introny, ale protože jsou dlouhé, často se vnášejí do vektorů cDNA, která už introny nemá; používá se také polyA signál viru SV40. Nakonec se přidá nějaký eukaryotický selekční marker. Z těchto vektorů byla zkonstruována celá řada expresních plazmidů.

Stránka 23 a 24

Součástí sekvence mohou být i ty, jež se využívají pro odštěpení koncové značky – toho se využívá například po purifikaci proteinů, kdy při následující charakterizaci vlastností proteinu nechceme, aby přítomnost této značky ovlivňovala vlastnosti proteinu – příklady těchto sekvencí jsou na stránce 24.

Stránka 25

P = promotor, TT = terminátor transkripce, pa = polyadenylační signál

Stránka 30

Netřeba znát

Stránka 31

Tento postup nahrazuje postup na straně 30

Stránka 32

PNS = pozitivně/negativní selekce – metoda selekce buněk, u kterých došlo k začlenění pomocí homologní rekombinace, nejprve selektujeme na geneticin buňky, kde došlo k začlenění konstruktů (kamkoli), následuje druhá selekce gancyclovirem, buňky jež přežijí nemají gen pro TK (TK metabolizuje gancyclovir na toxický produkt) a tedy pravděpodobně k začlenění došlo homologní rekombinací

Stránka 33

Použití například pro náhradu mutantní alely alelou standardní. Gen, který se vnáší není genem neo (rezistence ke geneticinu) přerušen. Vektor se nejprve linearizuje - linearizuje se ve sledovaném genu zájmu; linearizace molekul upřednostní místo začlenění - lineární konce jsou tzv. rekombinogenní, vyhledávají komplementární sekvence; celý konstrukt se začlení do vyznačeného místa, buňky u nichž došlo k začlenění selektují geneticinem, následně kultivují buňky bez selekčního tlaku a intrachromozomální rekombinací nebo výměnou sesterských chromatid se vyčlení jedna z těchto variant (vyselektují buňky rezistentní na FIAU) - buď mutantní nebo standardní gen, následně provedu sekvenaci a vyberu ty buňky, jež mají požadovanou nahrazenou formu genu

FIAU – po metabolizaci TK toxický

Stránka 35

marker DHFR – enzym účastnící se biosyntézy nukleotidů, selekční látkou je metotrexát, když se vnese gen do buněk na vektoru s tímto markerem a buňky se vystaví postupně se zvyšujícím koncentracím metotrexátu ->spontánní amplifikace genu DHFR a s ním i genu zájmu -> tím je transgen amplifikován -> tady je možno dosáhnout mnohonásobku amplifikace -> velmi zvýšená produkce proteinu

Stránka 37

původní systém obnášel dvě molekuly vektorů; vlastní klonovací vektor (gen zájmu nahrazuje pozdní oblast) a pomocný vektor (defektní časná oblast); výsledkem je smíšené potomstvo virů (polovina obsahuje gen zájmu, polovina pomocný vektor), touto populací virů infikujeme cílové buňky a v nich se produkuje gen zájmu

Stránka 38

COS buňky – trvale produkují T-antigen, používají se pro produkci virových částic z vektorů, kde gen zájmu nahrazuje časnou oblast, poměrně nízká klonovací kapacita

Stránka 40

Virus kravských neštovic, vektory používané k vakcinaci, široké rozmezí hostitelů, velký genom (nelze jej modifikovat klasickými metodami v E. coli), proto se využívá začleňování genů homologní rekombinací. Nejprve se připraví kyvadlový vektor v buňkách E. coli, z viru vakcinie má pouze malou část - promotor a gen pro tk. Transgen vložen do klonovacího místa (BamHI), vzniká rekombinantní molekula, kde mezi úseky genu pro tk, je vložen gen zájmu. Do buněk se vnese současně tento konstrukt a současně se buňky (TK-) infikují virem vakcinie stand. typu. Pokud dojde k homologní rekombinaci, vznikají virové částice bez funkčního genu TK (takové buňky lze selektovat). Virové částice purifikujeme a můžeme použít pro produkci cílového genu nebo jako živou vakcínu.

Stránka 44

živá vakcína je vlastně **rekombinantní virus nesoucí antigeny**

Stránka 45

Bakuloviry jsou obalené viry z čeledi *Baculoviridae*, s genet. informací v dvouvláknité, kruhové DNA. Rozmnožují se výhradně v bezobratlých a byly izolovány z více než 200 druhů hmyzu, roztočů a korýšů. Virová infekce se projevuje zejména v larválním stadiu živočichů (polyedrie). V napadených

buňkách tvoří inkluze složené z jedné nebo více virových částic tvaru tyčinek. Polyhedriny jsou obalové proteiny těchto virů.

Schéma - vnitřní část (modrá) se zamění za gen zájmu (zelená) v plazmidu; buňky se infikují bakulovirem a zároveň se transfekují rekombinantním plazmidem; uvnitř buněk proběhne rekombinace, vytvoří se rekombinantní viry, které budou obsahovat místo genu pro polyhedrin cizorodý gen - rekombinace nemusí proběhnout 100%, je potřeba mít selekční systém - liší se plaky, které vytváří viry standardního typu, jež tvoří polyhedrin, a rekombinantní plaky, které polyhedrin nevytváří

Stránka 46

Vylepšení systému ze strany 45. Bez homologní rekombinace nedojde k obnově pro život viru důležitého genu 1629.

Stránka 47

K produkci bakulovirů se používají mimo jiné buňky z larev této Spodoptery.

Stránka 48

Hmyzí buňky jsou schopné provádět složité posttranslační modifikace – vliv na funkci proteinů.

Stránka 50

bacmid - kyvadlový vektor pro E.coli a hmyzí bunky

Stránka 53

Klonovací kapacita - souvisí s velikostí RNA, která se může do virové kapsidy zabalit (max. 9, někdy 10 kb); i když eukaryotické geny bývají větší, lze klonovat cDNA bez intronů, čímž je ten limit dostatečný

Stránka 54

LTR obsahují silné promotory, vektor A má omezenou klonovací kapacitu, vektory B a C potřebují k tvorbě virových částic transfekci/infekci pomocnými vektory

Stránka 45

Vede ke vzniku smíšeného potomstva (vznikají pomocné i rekombinantní viry)

Stránka 56, 57, 58

Problém vzniku směsné populace virionů vyřešen zde. Pomocná buněčná linie produkuje RNA viru, která se však díky mutaci ve sbalovacím místě nemůže sbalit. Ostatní geny se však normálně produkují. Tuto buňku lze transfekovat rekombinantní DNA s virovou sekvencí, kde oblast mezi LTR sekvencemi je nahrazena genem zájmu a selekčním markerem. V buňkách pak vznikají pouze rekombinantní virové částice, které lze použít pro infekci jiných buněk a produkci cílového proteinu. Celkové schéma je znázorněno na stránce 58.

Stránka 59

Z důvodu bezpečnosti se lentivirové vektory klonují ve 3 či 4 odělených vektorech (DNA nemůže být mobilizována).

Stránka 61

Vektory lze využít nejen pro produkci proteinů, ale také pro regulaci produkce proteinů /například díky RNA interferenci).