

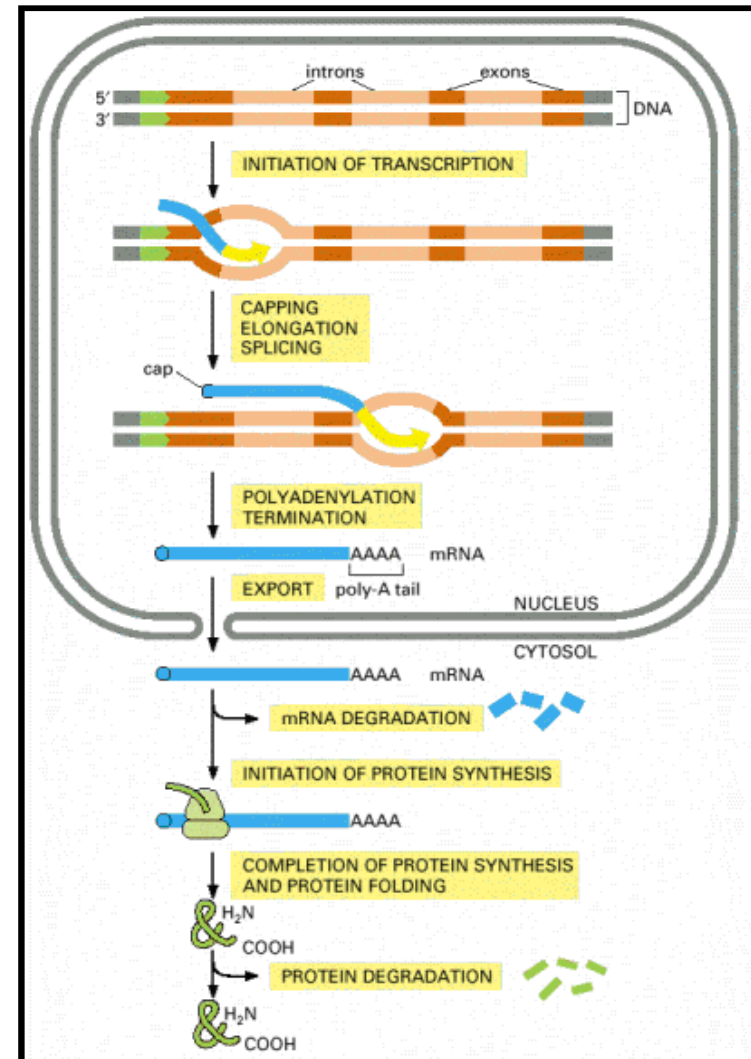
Regulace genové exprese,
metody transfekce/transdukce,
CRISPR/Cas system

Moderní techniky studia buňky

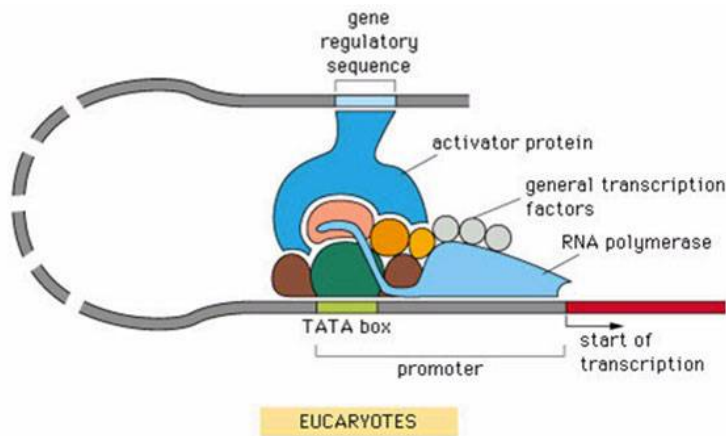
Aneta Vrzalová

Genová exprese u eukaryot

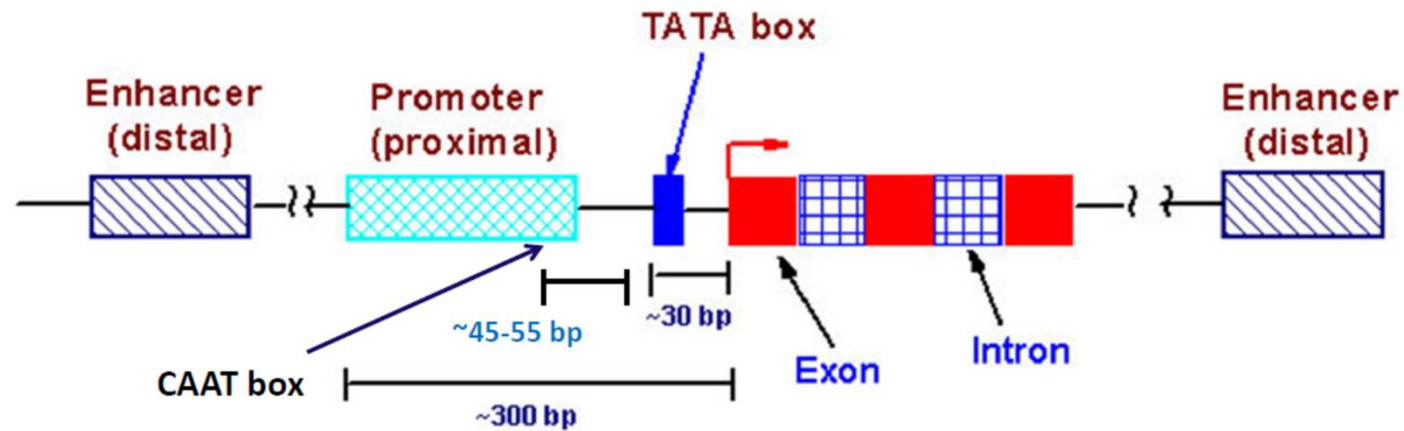
- Produkce funkčního proteinu podle informace kódované v DNA (gen)
- **DNA obsahuje několik typů informací:**
 1. tripletový zápis AMK sekvence proteinu
 2. informaci o začátku a konci transkriptu
 3. informaci o začátku a konci exonů
 4. informaci o začátku a konci ORFu
 5. informaci o REGULACI (např. stabilita mRNA)
- **Primární sekvence proteinu určuje:**
 1. Lokalizaci proteinu (signální sekvence)
 2. Posttraslační modifikace (např. Asn-X-Ser)
 3. Konformaci proteinu



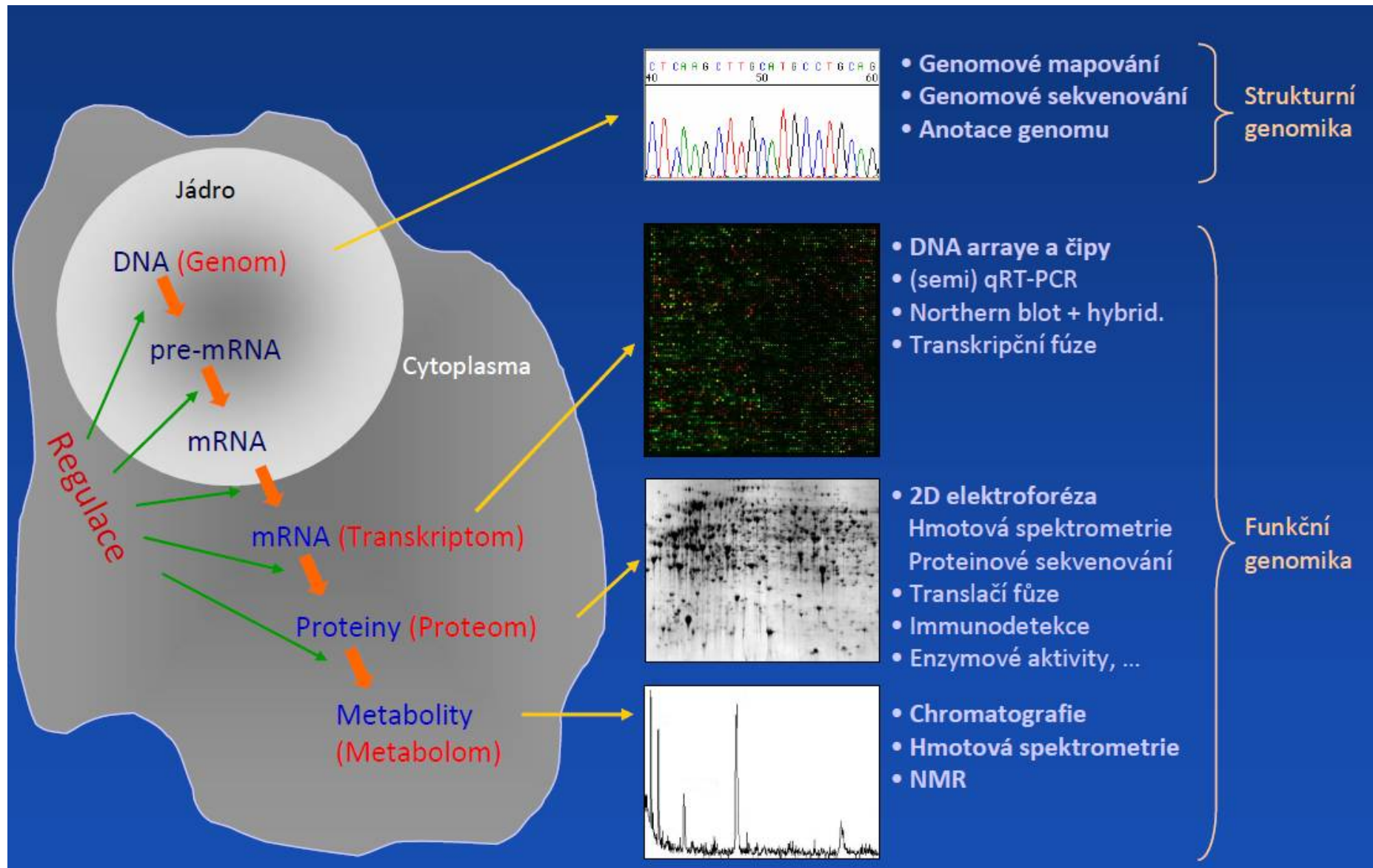
Regulace transkripce u eukaryot



Tvorba preiniciačního komplexu

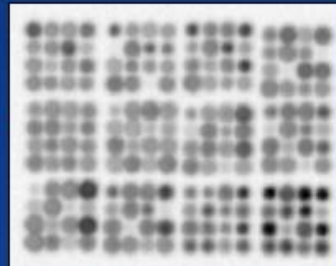


Analýzy toku informací v buňce

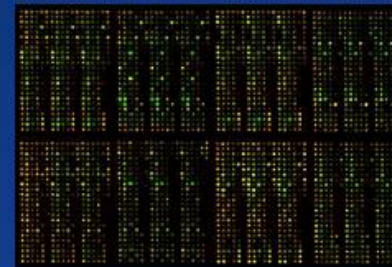


Sledování transkripce genů

Metody založené
na hybridizaci NK



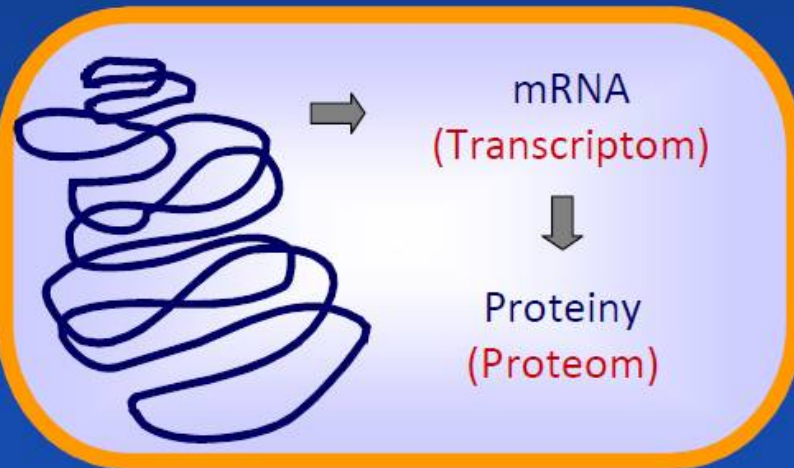
Macroarrays



Microarrays

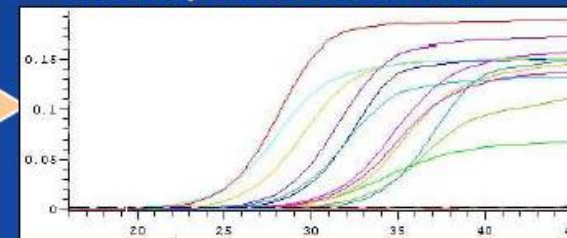


Hybridizace na
Northern blotu

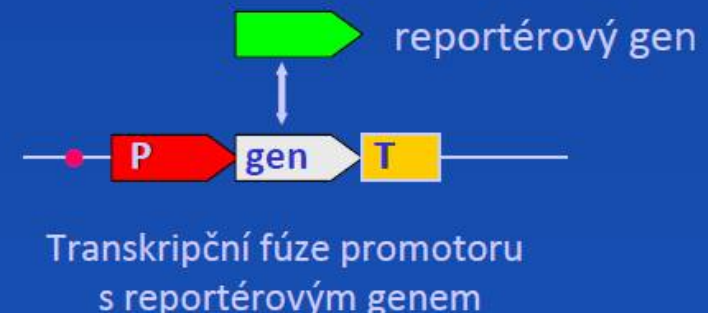


Transkriptom - soubor všech mRNA přítomných v dané buňce, pletivu

Metody založené na PCR



Real time PCR
qRT-PCR;
Semikvant.
RT-PCR



Proč vnášíme cizorodou nukleovou kyselinu do animálních buněk?

1. Over-exprese (zesílení exprese genu)
2. Silencing (knockdown exprese genu)
3. Expres reportérového konstrukt (např. luciferázového)
4. Expres fuzního proteinu (např. GFP varianty, tag)
5. Expres mutantního proteinu (konstitutivně aktivního, nefunkčního – funkční studie)

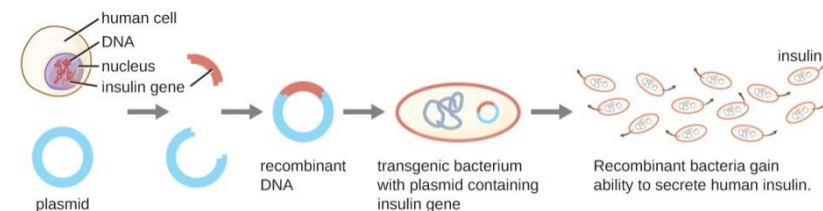


Klonování – proces tvorby klonů

- KLON: soubor geneticky identických buněk (resp. organismů), odvozených ze společného předka



- Klonování DNA: tvorba klonů DNA; umožňuje izolovat z komplexního genomu jeho dílčí úseky (např. geny), ty ve formě rekombinantních molekul mnohonásobně namnožit a zpřístupnit dalšímu studiu
- Klon DNA: soubor identických molekul DNA, připravených např. množením rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo PCR (*in vitro*)
- Rekombinantní molekula DNA: molekula DNA vytvořená spojením dvou cizorodých fragmentů DNA, např. klonované DNA s klonovacím vektorem



Klonování

Molekulární klonování

- Multikrokový proces, který vytvoří kolekci definovaných **fragmentů dané DNA** za pomoci enzymatických systémů živých buněk
- 1. Spojení vybraných DNA fragmentů (většinou jednoho genu) se speciálním nosičem – **vektor**
- 2. Přenos vzniklého konstruktu do živých buněk (často bakterie)
- 3. Mnohonásobné namnožení vložených DNA fragmentů replikací v živé buňce

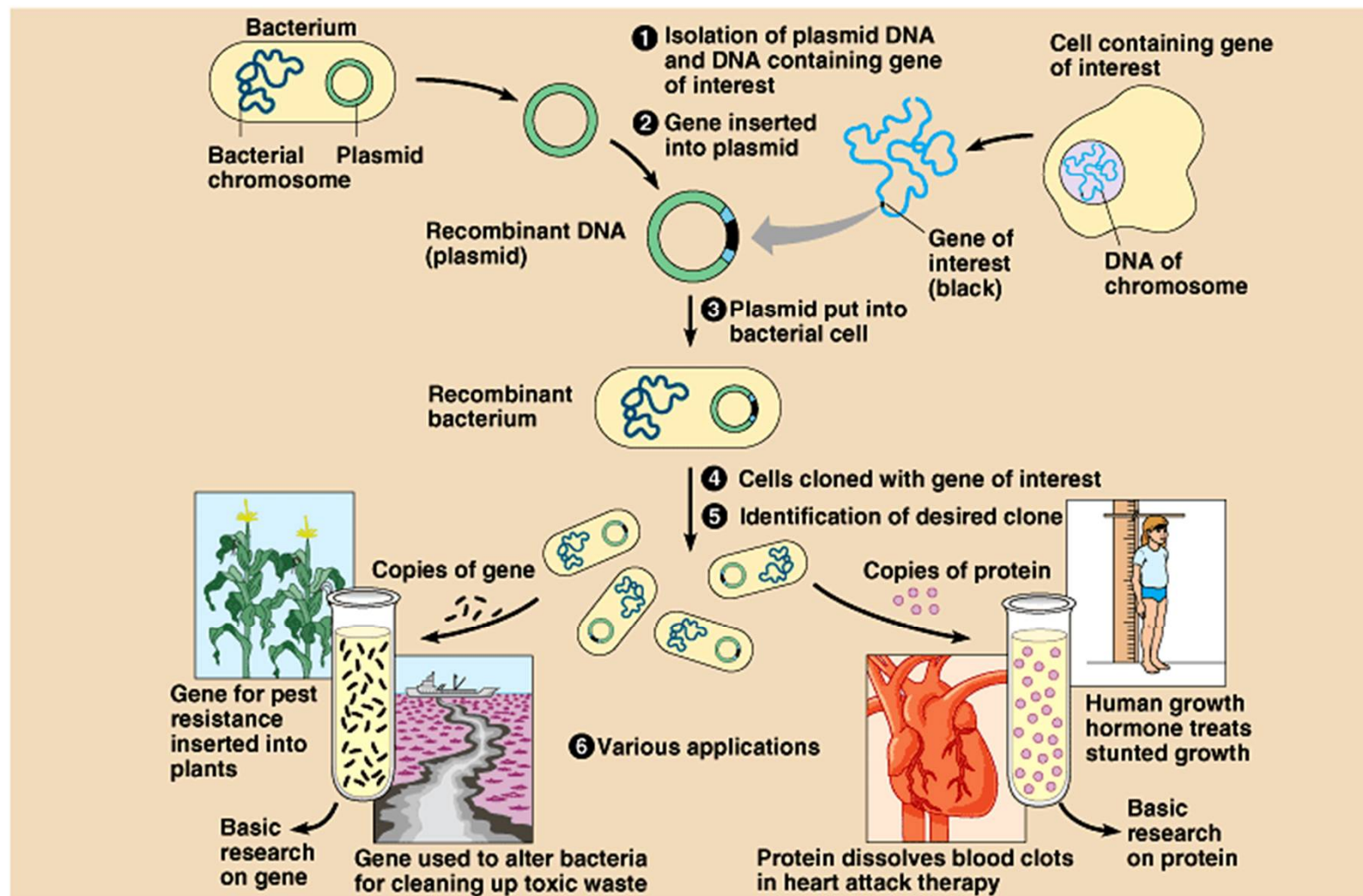
DNA KLONY

Využití: zemědělstí, průmysl, základní výzkum, farmaceutika, medicína

Buněčné klonování

- vytváření geneticky identických **buněk** (organismů)
- v živé přírodě přirozené: kolonie bakterií, řízkování rostlin, jednovaječná dvojčata

Příklady využití klonování DNA



Definice v buněčné a molekulární biologii

- **Transfekce** - metoda, při které dochází k vložení nukleové kyseliny (DNA, plazmidová DNA, RNA, siRNA – ale také proteinu nebo Ab) **do buněk** bez použití virových metod.
- **Transformace** - proces, při kterém vkládáme nukleovou kyselinu nevirovými metodami **do bakterií** (a neživočišných eukaryotických buněk).
- **Transdukce** - proces, při kterém vkládáme nukleovou kyselinu do buněk **virovými vektory**.
- **Plasmid** – extrachromosomální DNA bakteriálního původu, která se **replikuje nezávisle na chromozomální DNA**. Většinou je cirkulární dsDNA.
- **Vektory** – slouží pro přenos klonované DNA do buněk a její následnou propagaci

Definice v buněčné a molekulární biologii

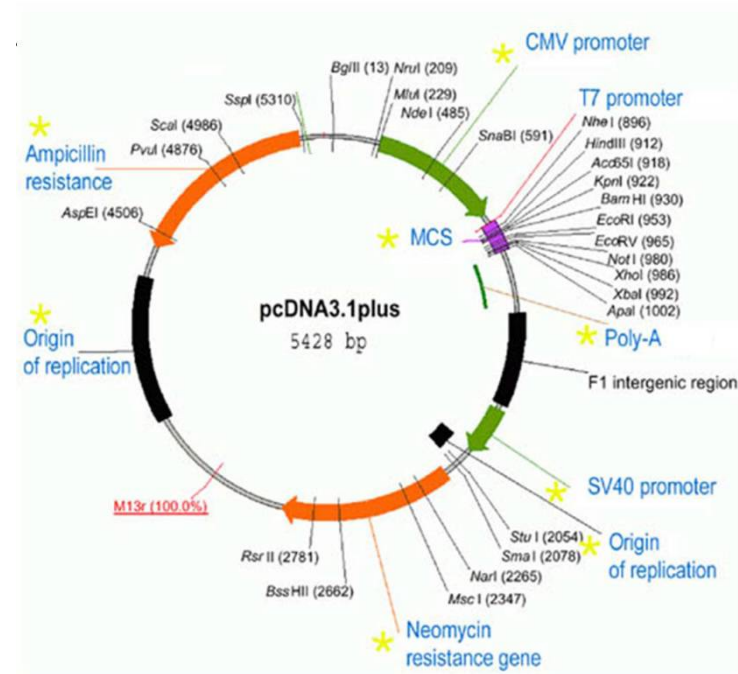
- **Transgen** - cizorodý gen modifikující genom a fenotyp hostitelského organismu (nebo buňky)
- **Transgeneze** - vnesení cizorodého genu (transgenu) za účelem dosažení **změny fenotypu organismu**. K této změně za normálních, tj. přirozených podmínek, nedochází.
- **Geneticky modifikované organismy (GMO)**. Jako geneticky modifikované organismy (GMO) lze označit **produkty genové manipulace** rostlin nebo živočichů.

Savčí **EXPRESNÍ VEKTOR**

Plasmid pro klonování DNA je v genetickém inženýrství nazýván **VEKTOR**

Základní komponenty

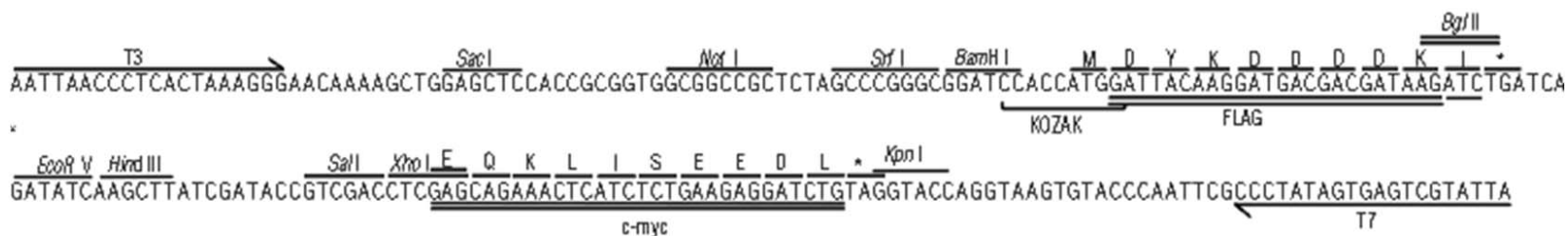
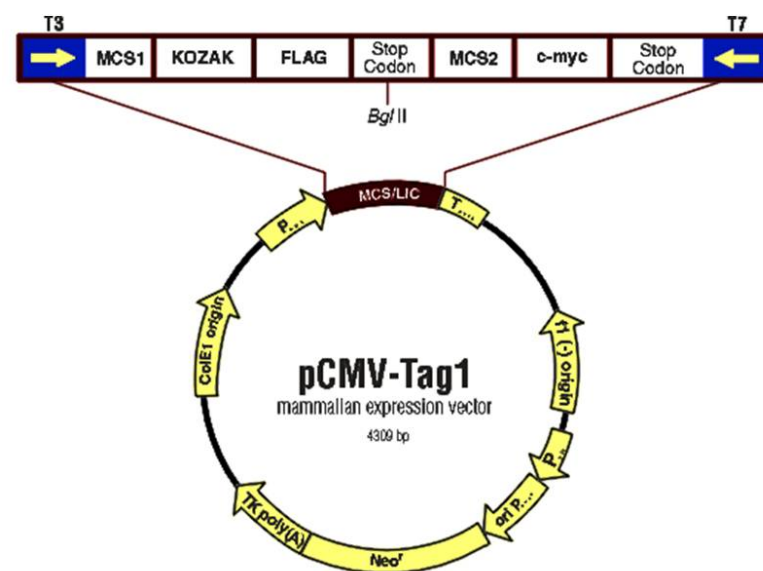
- **Multiple cloning site (MCS, or polylinker)** – krátká sekvence s unikátními místy pro restrikční enzymy, umožňující vložit insert do vektoru.
- **ori** (pUC, fi, ColE1 ori)-origin of replication v *E. coli*.
- **amp** (*ampR*)-**ampicilinová rezistence**- β -laktamáza selekce pozitivně transformovaných *E. coli*.
- **T7, T3, SP6 fágové promotory** – T7 RNA polymeráza transkribuje in vitro RNA, bývají protisměrně umístěny
- **CMV, SV40, TK, EM-7 aj. promotory**- „silné“ promotory obsahující TATA box a vazebné místa pro transkripční faktory, spouští transkripci insertu nebo savčího selekčního markeru
- **Chimeric Intron** – zvyšuje expresi insertu
- **(TK, SV40, BGH) Poly A tail**– poly A sekvence pro vytvoření poly A konce RNA
- **Selekční marker** – *selekce stabilních linií*
- **KOZAK** – translační start - je rozpoznávána ribozomem jako translační start v expresních vektorech Acc**AUGG** nebo ANNAUGG



Expresní vektory s tag epitopem

- Krátké peptidové sekvence modifikující primární struktury exprimovaného proteinu pro imuno(histo)checkou detekci nebo imunoprecipitaci specifickou protilátkou proti epitopu tagu nebo pro afinitní chromatografii
- Tagy mohou být enzymaticky odstraněny, mohou být na N- i C-koncích
- Pozor na modifikaci funkce proteinu

Epitop		Sekvence
HIS	detekce protilátkami nebo purifikace na základě tvorby komplexů s nikelnatými pryskyřicemi, agarózou nebo kolonkami (Quiagen)	HHHHHH
c-MYC	c-Myc onkogen	EQKLISEEDL
HA	z hemagglutininu	YPYDVPDYA
HSV		QPELAPEDPED
V5	C-konec protein SV viru 5 (Invitrogen)	GKPIPNPLLGLDST
FLAG	imunodetekce (Sigma)	DYKDDDDK



Použití fluorescenčních proteinů k detekci organel

Living Colors® Subcellular Localization Vectors
Organelle Lights®

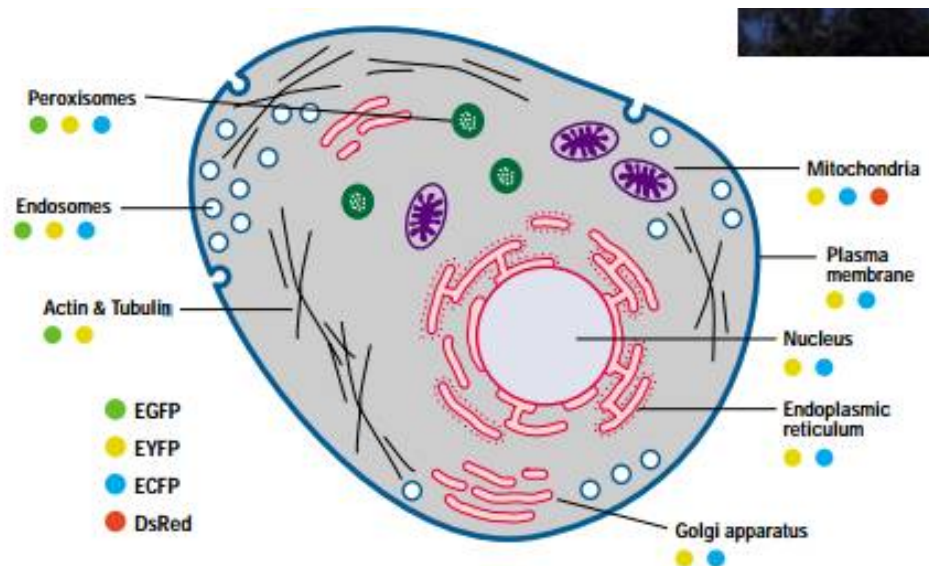
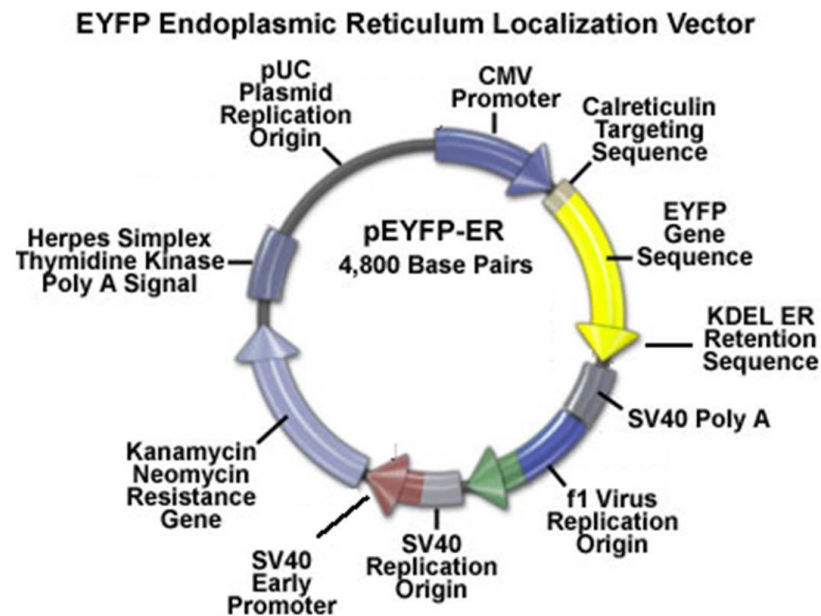


Figure 9. Organelles targeted by Living Colors™ Subcellular Localization Vectors.

pEYFP-ER (Clontech) - vektor exprimuje fúzní protein EYFP spolu s na N-konci umístěnou sekvencí kalretikulinu a na C-konci sekvencí KDEL. Tyto sekvence cílí EYFP do endoplazmatického retikula.

Metody přenosu cizorodé DNA do buňky

○ Biochemické metody:

DEAE-dextran

Kalcium fosfátová metoda

Lipofekce - lipozómy

○ Fyzikální metody:

Mikro-injekce

Biolistic particle delivery (gene gun)

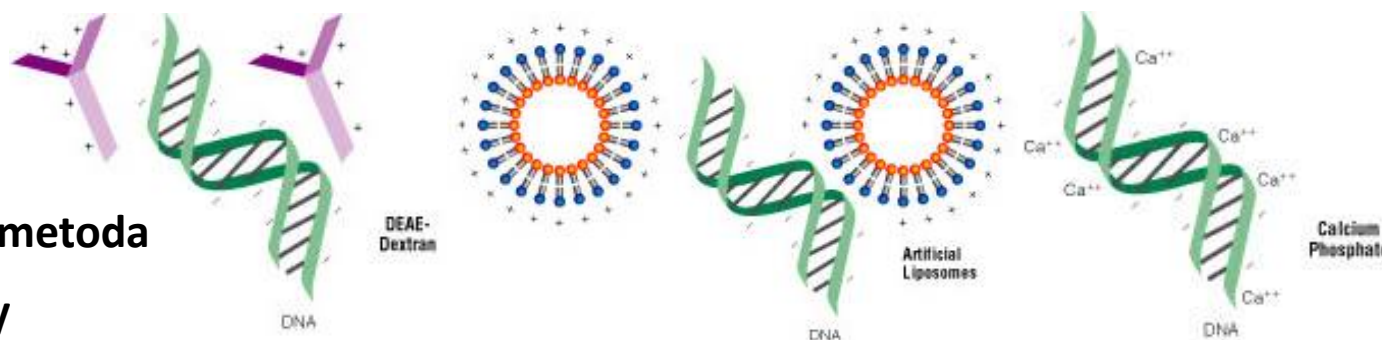
Elektroporace

Heat shock

Magnet Assisted Transfection (MATra)

1. Transfekce – biochemické metody

- DEAE-dextran
- Kalcium fosfátová metoda
- Lipofekce lipozómy



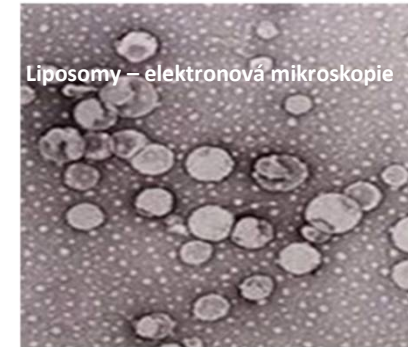
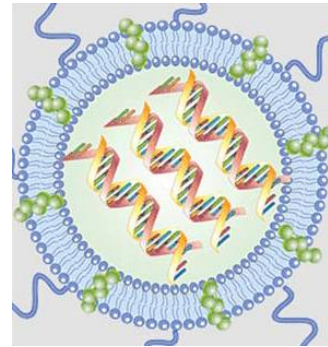
Nukleové kyseliny s negativním nábojem (DNA i RNA) nemohou projít lipidovými membránami, které jsou také negativně nabitě.

Biochemické transfekční metody „obalí“, nebo neutralizují nebo ji dokonce udělí pozitivní náboj. To usnadňuje vstup komplexu DNA/transfekční roztok do buňky.

Uptake do buňky je zprostředkován endocytózou. Pak se komplexy se dostávají do endozómů, poté do jádra.

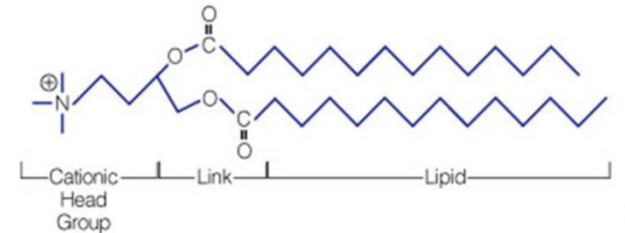
- DEAE-dextran- není vhodný pro stabilní transfekci.
- Kalcium fosfátová metoda- velice levná metoda pro stabilní i transientní expresi.
- Obě metody se používají s glycerolovým, DMSO nebo teplotním šokem.

Lipofekce



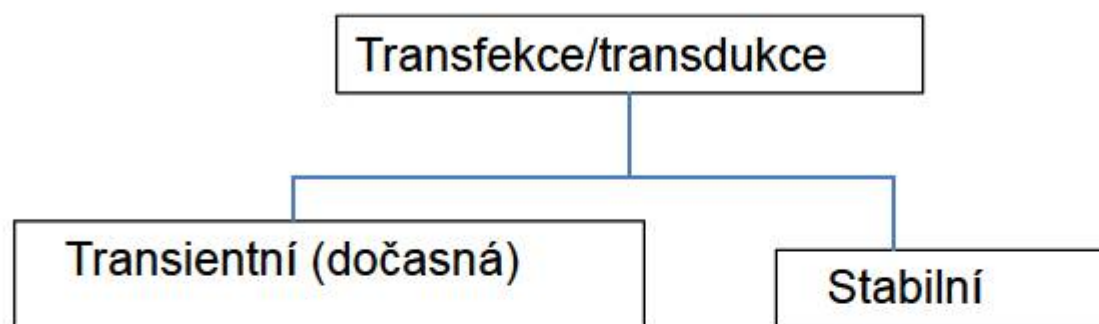
- Lipofekční reagenty jsou syntetické analoga fosfolipidů biologických membrán, které „enkapsulují“ nukleové kyseliny do lipozomů.
- Vysoká účinnost i u linií netransfekovatelných kalciumfosfátovou nebo DEAD-dextranovou metodou.
- Možnost transfekce oligo DNA, RNA, siRNA, až yeast artificial chromosomes
- *In vivo* transfekce, stabilní exprese
- Transfekce v sérovém médiu
- Nutnost optimalizace poměru DNA/reagent, nutnost optimalizovat toxicitu

Obecná struktura kationického transfekčního reagentu



TransFast™ (Promega), Lipofectamine2000 (Invitrogen), FuGeneHD (Roche), Transfectine (BioRad), jetPEI (Polyplus) aj.

Příprava stabilně transfekovaných / geneticky modifikovaných živočišných buněčných linií lipofekcí



Transientní transfekce trvá 24-72 h



- 1 z 10^4 buněk integruje vektorovou DNA do genomu
- inkorporace je náhodná, může zasáhnou důležité regulační geny
- nelinearizovaný plazmid může být „otevřen“ a inkorporován nesprávně- může být nefunkční v důsledku porušení cDNA, polyA konce nebo promotoru

Linearizovat nebo nelinearizovat vektorpřed stabilní transfekcí

??

- obojí přístup je možný
- linearizovaný plazmid se hůře dostává do buňky transfekcí
- naopak, není náhodně „otevírán“-nedojde k porušení funkce
- linearizovaný i nelinearizovaný plazmid se začleňuje do genomu náhodně

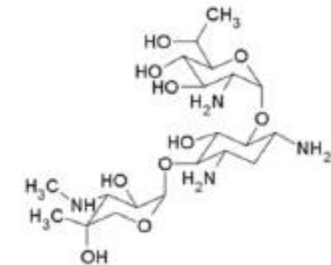
Selekční média

Antibiotika

- Neomycin, Hygromycin, Puromycin, Blasticidin, Zeocin

Fluorescenční barvy- GFP a analoga (průtoková cytometrie)

Membránové epitopy – selekce MACS- imunomagnetická „cell sorting“-povrchové membránové markery“-CD4, H-2K^k nebo LNGFR.



Antibiotika

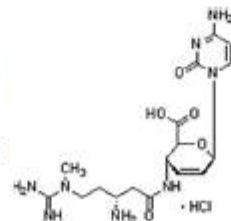
Hygromycin (Hygro) -resistance gene *hph*

Puromycin (Puro)- resistance gene *pac*

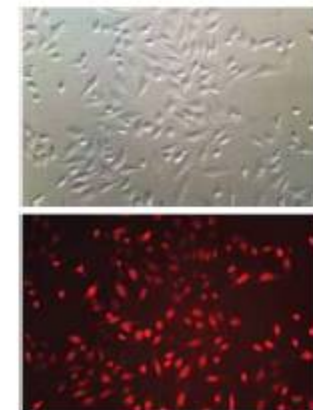
Neomycin a kanamycin (Neo/Kan)- neomycin phosphotransferase-II (NPT-II) gene

-používá se především Geneticin (G418)

Blasticidin (Bla) - acetyl transferase gen-
bsr and *BSD*



Zeocin™ (Zeo) – měďnatý glykopeptidový
chelát *Streptomyces CL990* -gen (*Sh ble gen*)



2. Fyzikální metody

- **Mikro-injekce**

Vnesení DNA do embryonálních kmenových buněk pro vytvoření transgenních organismů



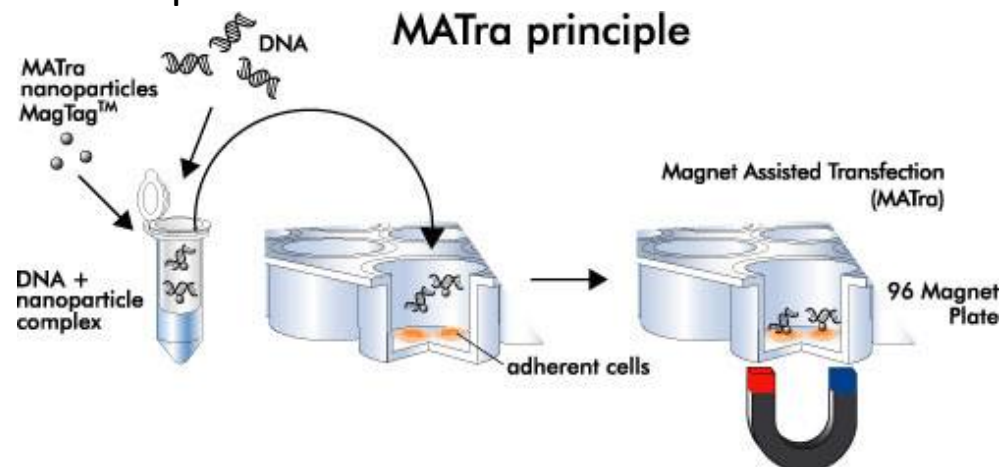
- **Biolistic particle delivery (gene gun)**

Částice obalené DNA jsou „nastřelovány“ do buněk



- **Magnet Assisted Transfection (MATra)**

Nukleové kyseliny jsou uchyceny na magnetických nanočásticích MagTag™, do buňky se dostávají v silném magnetickém poli.



Elektroporace

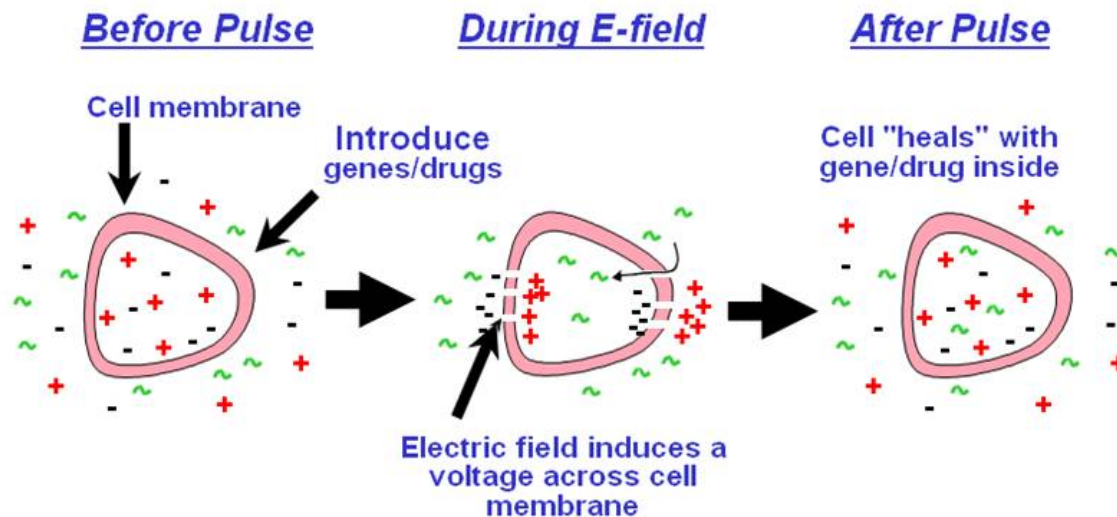
Amaxa® Cell Line Nucleofector®



4D-Nucleofector™ System



- Elektroporace je vysoce účinná metoda vnesení nukleové kyseliny do živočišných buněk
- Elektrické impulzy způsobují vznik pórů buněčné membrány a vstup exogenní nukleové kyseliny
- Metoda potřebuje optimalizované elektroporační pufrы



Výhody/nevýhody:

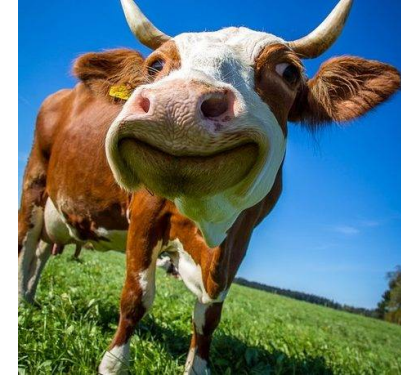
Metoda rychlá, mnoho ověřených protokolů, vysoká účinnost

X

Drahé jsou elektroporační roztoky a kyvety (jednorázové)

rbST (bovine somatotropin)

- gen z genomu krávy naklonován do baktérie
- hormon zvyšující u krav produkci mléka
- přidává se do krmiva v kravínech
- dříve se používal hormon pracně izolovaný z hypofýzy poražených krav
- Žádná studie neprokázala vliv na kvalitu mléka či masa z chovů používajících růstový hormon.
- Pokud by se samotný hormon jakoukoli cestou dostal do potravního řetězce, nemůže škodit. rbST je stravitelná bílkovina, kterou každý živočich včetně člověka tráví obdobně jako vaječnou bílkovinu



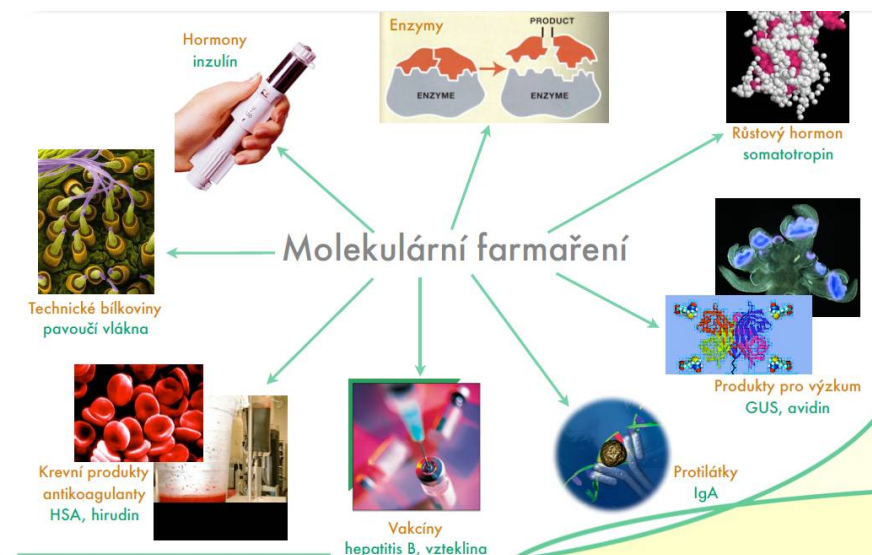
Pavoučí mléko

- fa NEXIA produkovala transgenní kozy exprimující geny pro produkci pavoučího proteinu, ze kterého pavouk vyrábí síť, do mléka
- pavoučí vlákno je odolnější než ocel a používá se na výrobu neprůstřelných vest



Molekulární farmaření (Molecular Pharming)

- Termín pro nové použití transgenních rostlin (nikoli živočichů) k produkci komerčně zajímavých bílkovin (nesouvisejících s obživou)
- Metoda začleňování cizorodých genů do rostlin (kodující protein cizího organismu, který je zajímavý pro farmaceutický průmysl)
- Nevýhody *in vitro* systémů – vysoké náklady, malá výtěžnost, obtížná syntéza velkých bílkovin, řada bílkovin postrádá biologickou aktivitu
- **VYUŽITÍ: produkce farmaceutických bílkovin, jedlé vakcíny, technické/průmyslové bílkoviny**



LIDSKÉ FARMACEUTICKÉ BÍLKOVINY

Růstový hormon – tabák, slunečnice – 1. lidská bílkovina exprimovaná v rostlině (1986)

Lidský sérový albumin – tabák, brambor – 1. velká lidská bílkovina exprimovaná v rostlině (1990)

Erythropoetin – tabák – 1. lidská bílkovina produkovaná sekrecí z kořenů a listů

Kolagen – tabák – 1. lidský polymer strukturního proteinu v rostlině (2000)

REKOMBINANTNÍ VAKCÍNY

Plášťový protein hepatitidy B – tabák – 1. potencionální vakcína produkovaná v rostlině (1992)

Cholera toxin, podj. B – tabák, brambor – 1. potencionální vakcína exprimovaná v chloroplastech (2001)

Glykoprotein viru vztekliny – rajče – 1. příklad jedlé vakcíny produkované v jedlém rostlinném pletivu (1995)

CRISPR/Cas



Jennifer Doudna

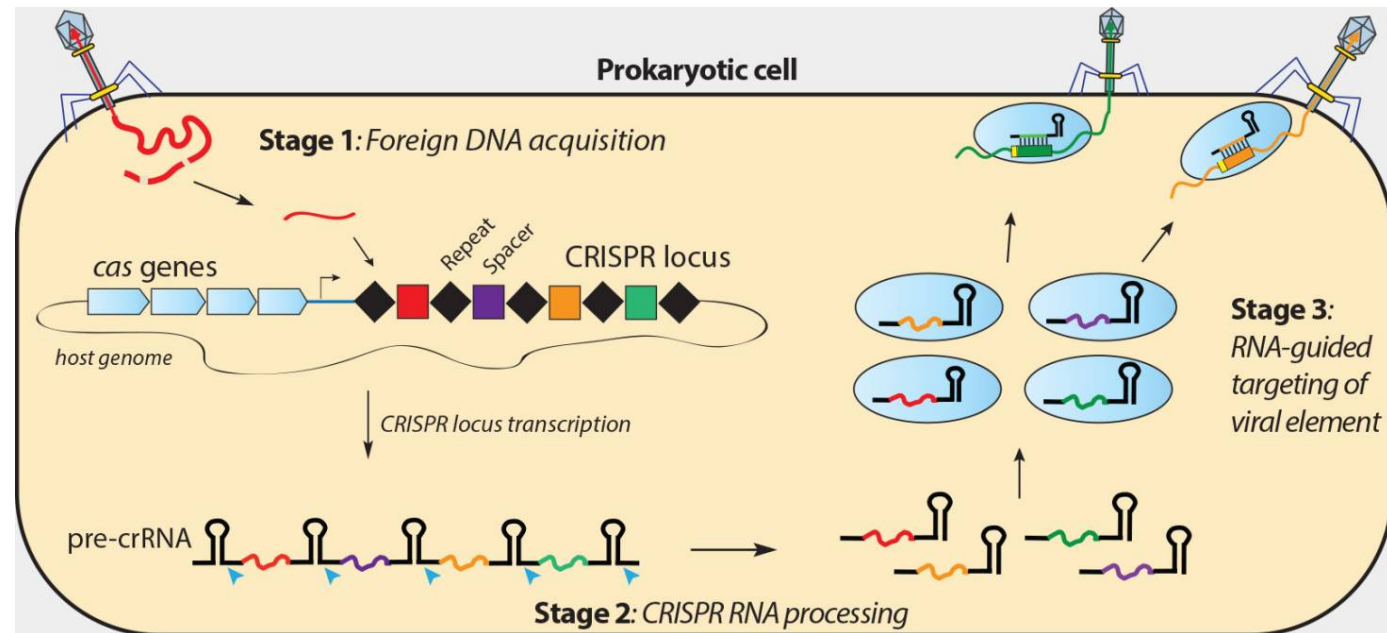
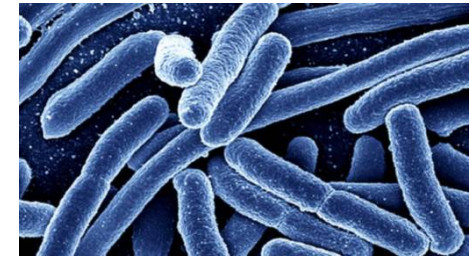
Emmanuelle Charpentier



Co je CRISPR/Cas technologie?

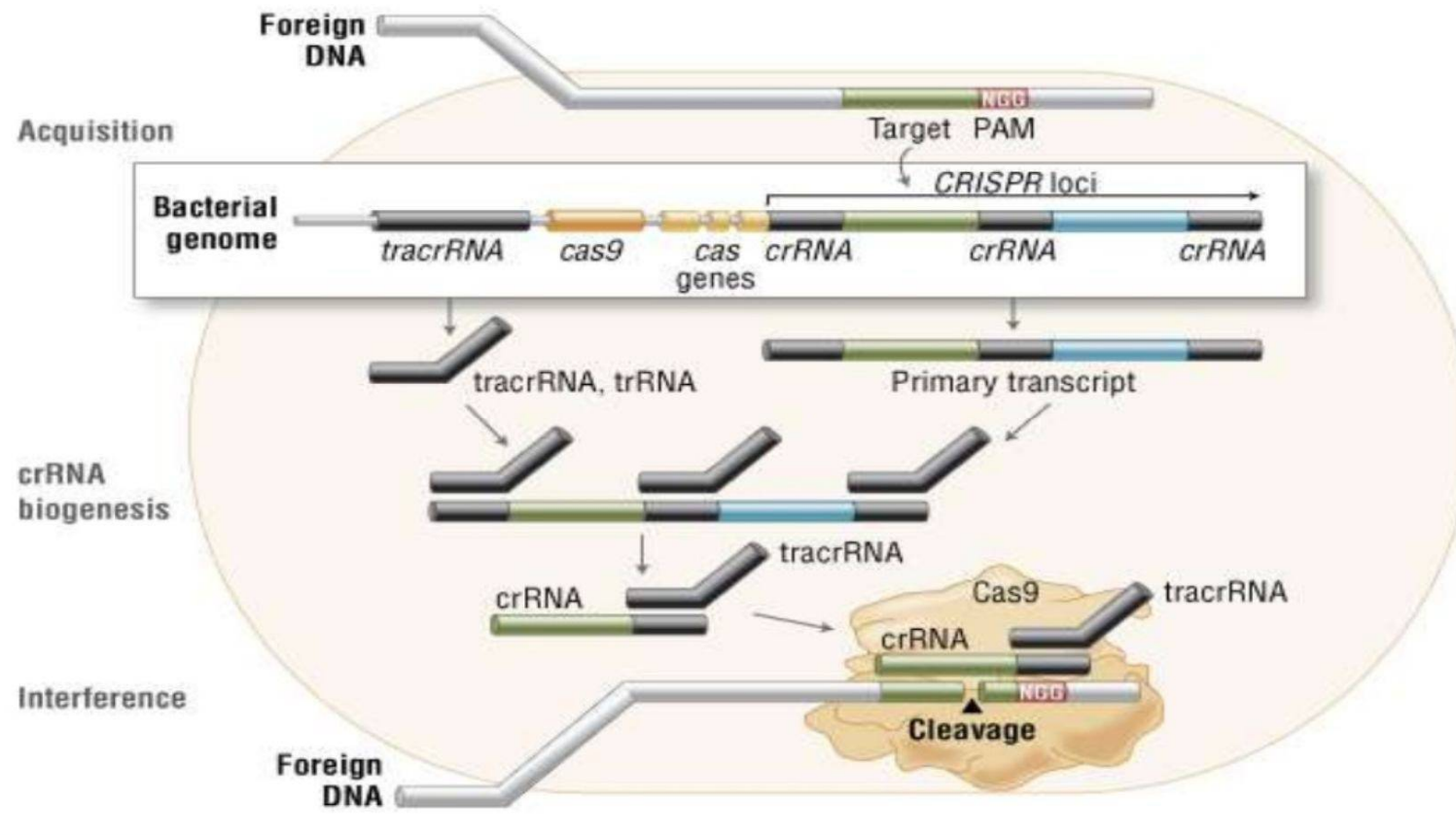
Clustered
Regularly-
Interspaced
Short
Palindromic
Repeats

Prokaryotický imunitní systém, který zajišťuje rezistenci vůči cizím genetickým elementům, jako jsou plastidy nebo fágy, a představuje tedy formu získané imunity.



Klastry pravidelně rozmístěných palindromických repetit

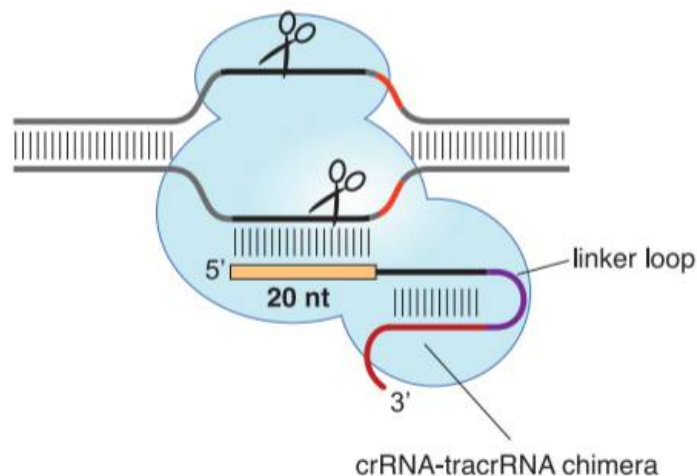
Přirozená obrana *Streptococcus pyogenes* proti bakteriofágům či cizorodé plasmidové DNA



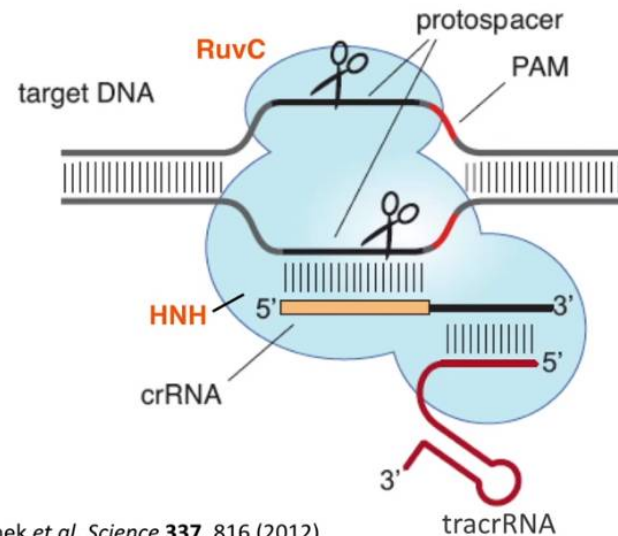
Hlavní komponenty CRISPR Cas systému

- **crRNA** – obsahuje naváděcí RNA
- **tracrRNA** – váže se s crRNA a tvoří aktivní komplex (transaktivací crRNA)
- **gRNA** – jednotlivé naváděcí RNA jsou kombinované RNA složené z tracrRNA a alespoň jedné crRNA

Cas9 programmed by single chimeric RNA



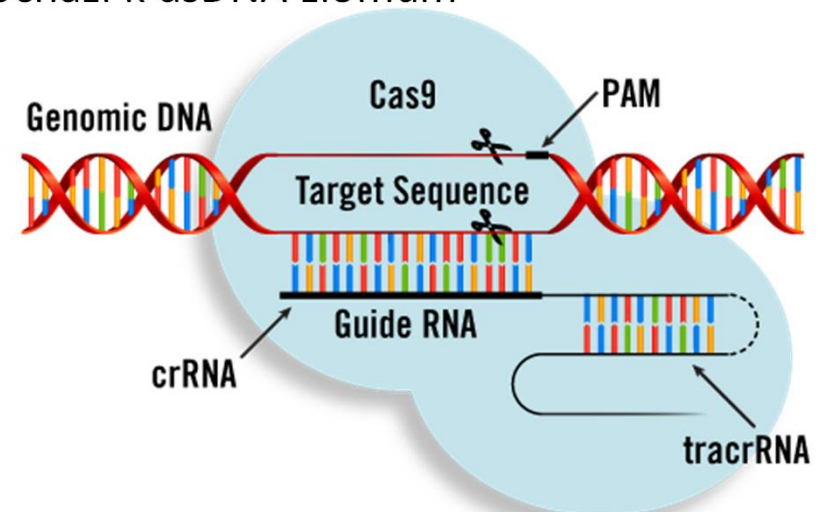
Cas9 is a dual-RNA-guided dsDNA endonuclease



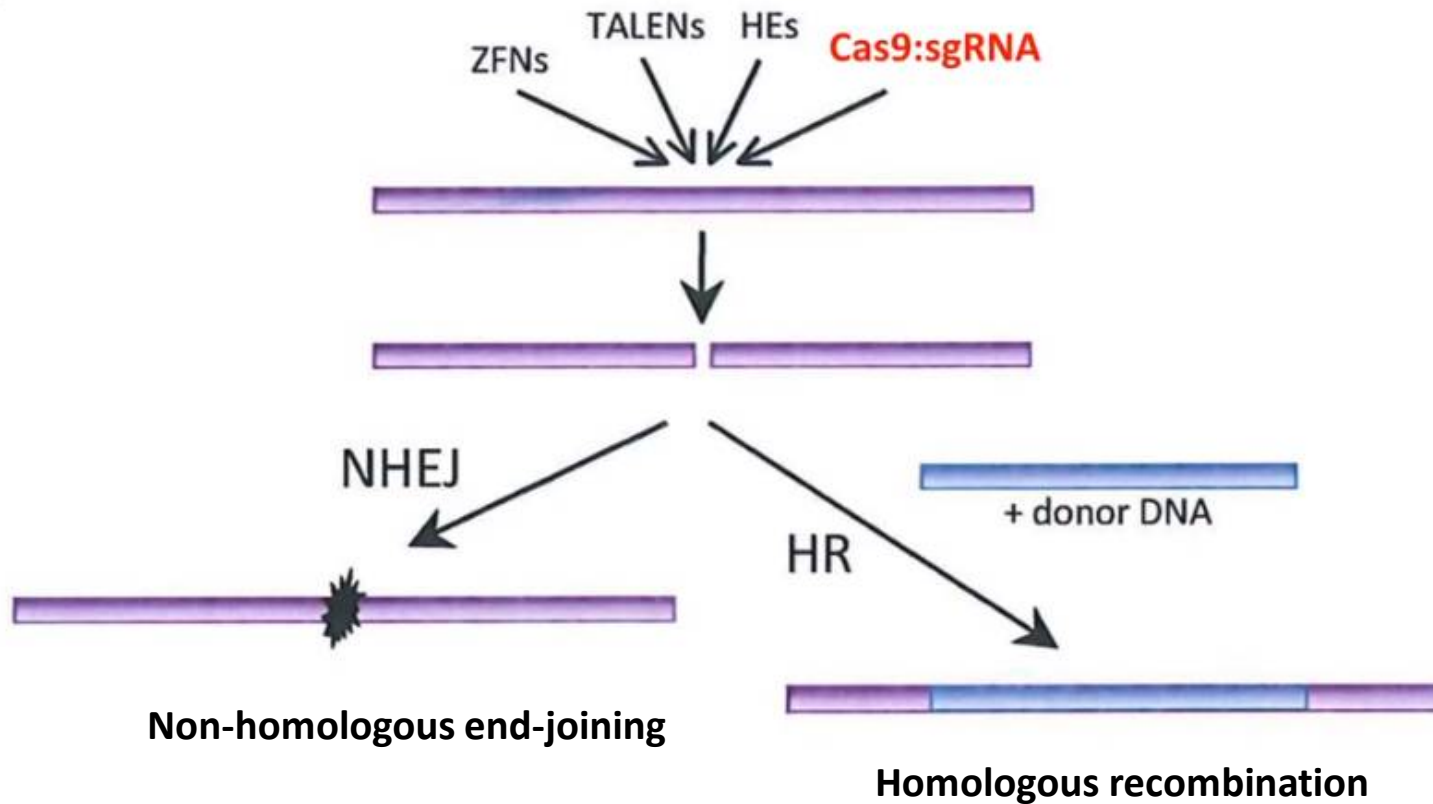
Jinek et al. *Science* **337**, 816 (2012)

Hlavní komponenty CRISPR Cas systému

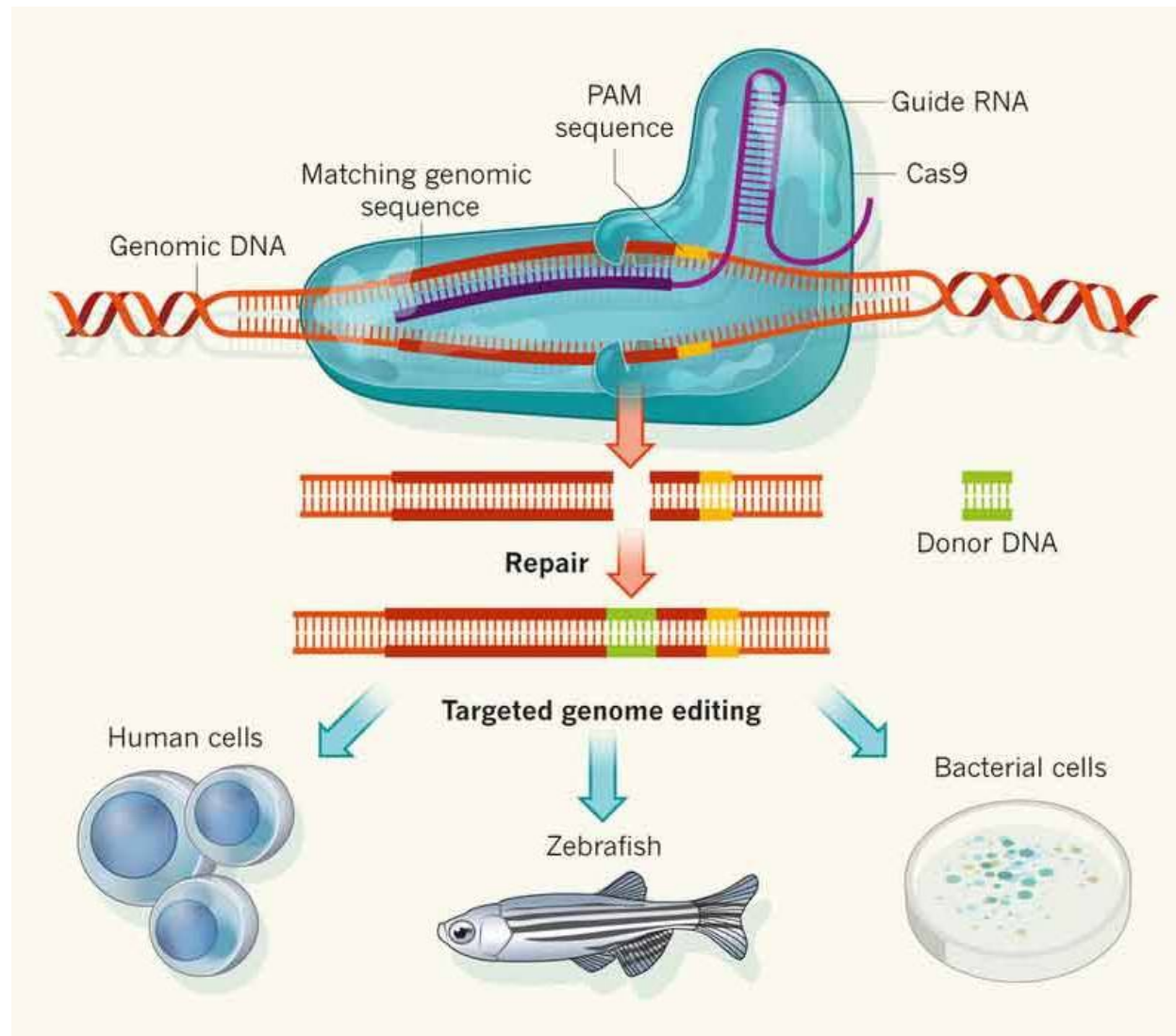
- **Cas** – protein jehož aktivní forma je schopna modifikovat DNA,
 - existuje mnoho variant s rozdílnými funkcemi (tj. jedno-vláknové zlomy, dvou-vláknové zlomy, vazba DNA),
- **Cas9** - CRISPR asociovaný protein 9, RNA naváděná endonukleasa, katalyzující místně specifické štěpení DNA v blízkosti PAM
- **PAM** (protospacer-adjacent motif) – NGG; na cizorodé DNA důležitý pro rozpoznání aktivované Cas9 v jehož blízkosti dochází k dsDNA zlomům



Genome editing begins with dsDNA cleavage

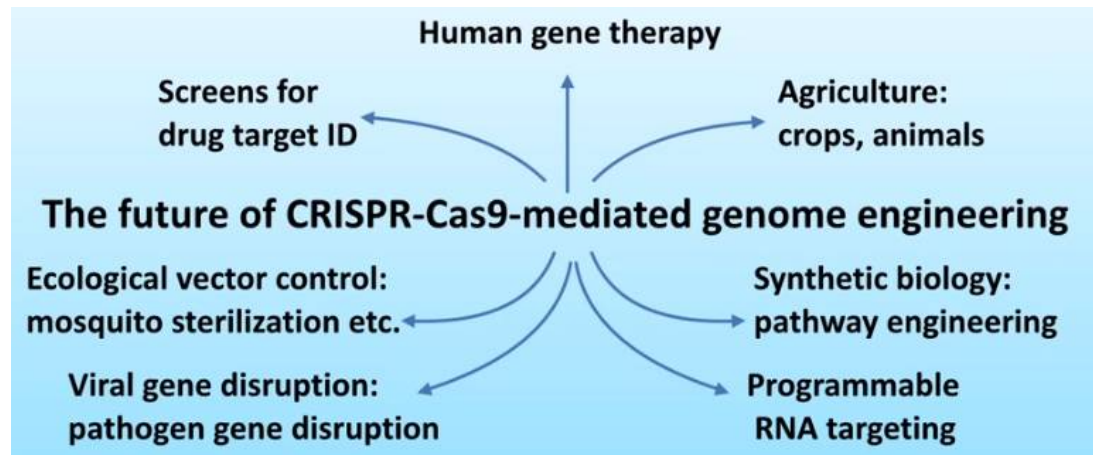


- **Tracr RNA a crRNA** mohou být spojeny do jedné molekuly, k úspěšnému knock-outu v jakémkoli organismu, pak potřebujeme pouze dvě komponenty - fragment pro guidedRNA a gen pro Cas9

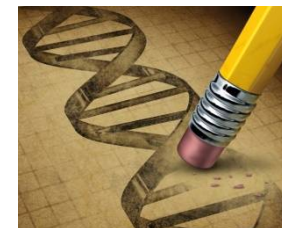


Potenciál využití technologie CRISPR

- DELECE GENŮ – frame-shift mutace v jakémkoli genu téměř jakéhokoli organismu, studium funkce k čemu gen je
- AKTIVACE NEFUNKČNÍHO GENU (důležité pro genové terapie)
- Inhibice/aktivace (CRISPR interference) - použití „mrtvé“ verze Cas9 (dCas9) eliminuje schopnost CRISPR štěpit DNA; nosič pro syntetické transkripční faktory, které aktivují specifické lidské geny
- Modelové organismy (tyrosinemie typu I, virus HIV)
- Biomedicína - zacílení virulentních faktorů, genů kódujících rezistenci na antibiotika (omezení replikaci herpetických virů, odstranění DNA viru Epstein-Barrové; EBV)



Potenciál využití technologie CRISPR



- **Huntingtonova choroba** - neurodegenerativní onemocnění, které vyvolává mutace v jednom jediném genu zvaném huntingtin (HTT), která spočívá ve zmnožení počtu kopií tripletu CAG na cca 40 a více; projevuje se trhavými pohyby, rozkolísáním nálad, snížením mentálních schopností a narušením imunitního systému.
- **Angelmanův syndrom** - mikrodeleční syndrom, způsobený nejčastěji delecí na maternálním chromosomu 15
- **Spinocerebelární ataxie** - vzácné autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění, které je způsobeno expanzí nestabilních CAG tripletů kódujících polyglutaminový řetězec korespondujícího proteinu, ataxinu-7, na 3. chromozomu.
- **Duchennova svalová dystrofie (DMD)**- gonozomální recesivní vrozené onemocnění způsobené mutací genu kódujícího protein dystrofin (na krátkém raménku chromozomu X). Vzhledem k faktu že onemocnění zapříčiňuje pouze jediný gen, je DMD ideálním cílem pro genovou terapii.
- **Srpkovitá anemie** - autozomálně recesivní dědičné onemocnění, které se projevuje změnou tvaru červených krvinek z tzv. promáčknutých piškotů na protažené srpky. Tato změna tvaru je způsobená mutací genu pro hemoglobin, při níž je na 6. pozici v β -řetězci valin místo glutamové kyseliny (plodová forma hemoglobinu)

Potencionální zneužití – etické problémy



Příliš předčasný hazard

- Čínský vědec Che Ťien-kchuej odsouzen za „nelegální a neetické medicínské praktiky“.
- Cílem jeho výzkumu bylo zbavit děti HIV pozitivních rodičů potencionální infekci virem HIV.
- Pomocí metody CRISPR upravil genom embryí dvojčat. Provedl mutaci receptoru CCR5, který je využíván virem HIV pro infiltraci lidských buněk
- Světová zdravotnická organizace (WHO) připravuje globální registry pro sledování výzkumu úpravy lidského genomu

Děkuji za pozornost!