

Molekulární biologie

12. 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

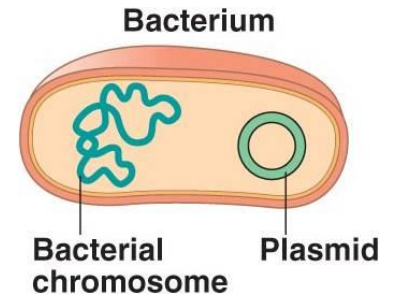
Plasmid

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 cytoplazmatická membrána pro DNA propustná

Metody pro navození propustnosti membrány:

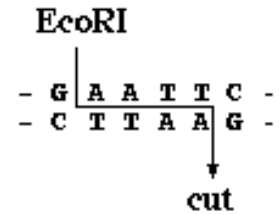
- Chlorid vápenatý (calcium chloride; CaCl_2)
 - membrána normálně propustná pro chloridové ionty
 - nepropustná pro vápníkové ionty
 - vstupem CaCl_2 se do buněk dostává i voda a DNA
- Teplotní šok
 - při 42°C se v bakterii aktivují tzv. heat-shock geny zajišťující přežití ve vyšší teplotě
 - použití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



Restrikční endonukleázy

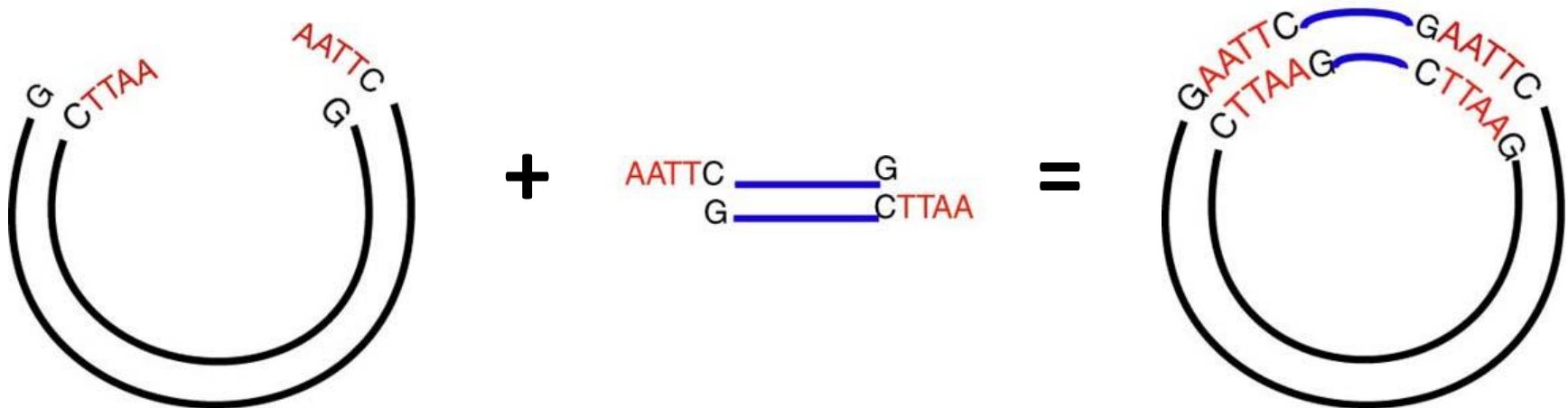
Enzymy, které štípou DNA

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



Restrikční místa (rozpoznávací sekvence pro štěpení):

- jsou často palindromy
- 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

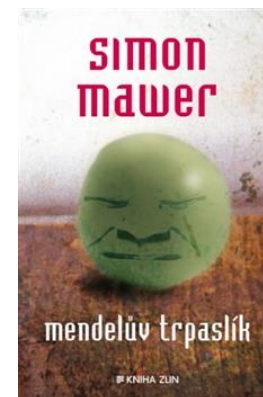
Ligáza: spojuje DNA řetězce



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

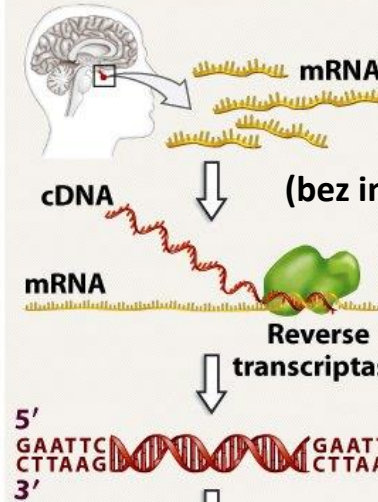
Výroba rekombinantního GH

- 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

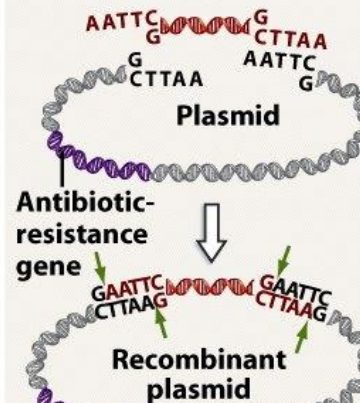
CREATING A cDNA LIBRARY THAT CONTAINS THE HUMAN GROWTH HORMONE GENE



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.

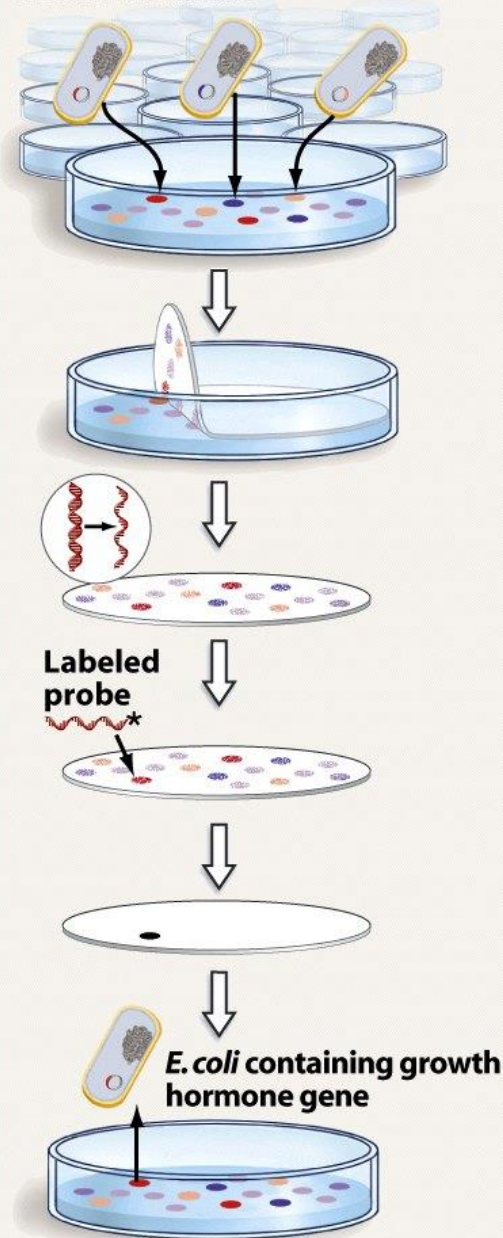
6. Introduce recombinant plasmids into *E. coli* cells via treatment that makes cells permeable to DNA. Grow cells in presence of antibiotic. Cells that can grow become part of cDNA library. Each cell contains one type of recombinant plasmid and thus one cDNA.

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 a cDNA z jejich plazmidu vložíme do jiného plazmidu, který má bakteriální promotor a začne exprimovat růstový hormon

[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.

Figure 19-4 Biological Science, 2/e

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 glyphostatu (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 pletiv, která neobsahují buněčnou stěnu

4. CRISPR

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

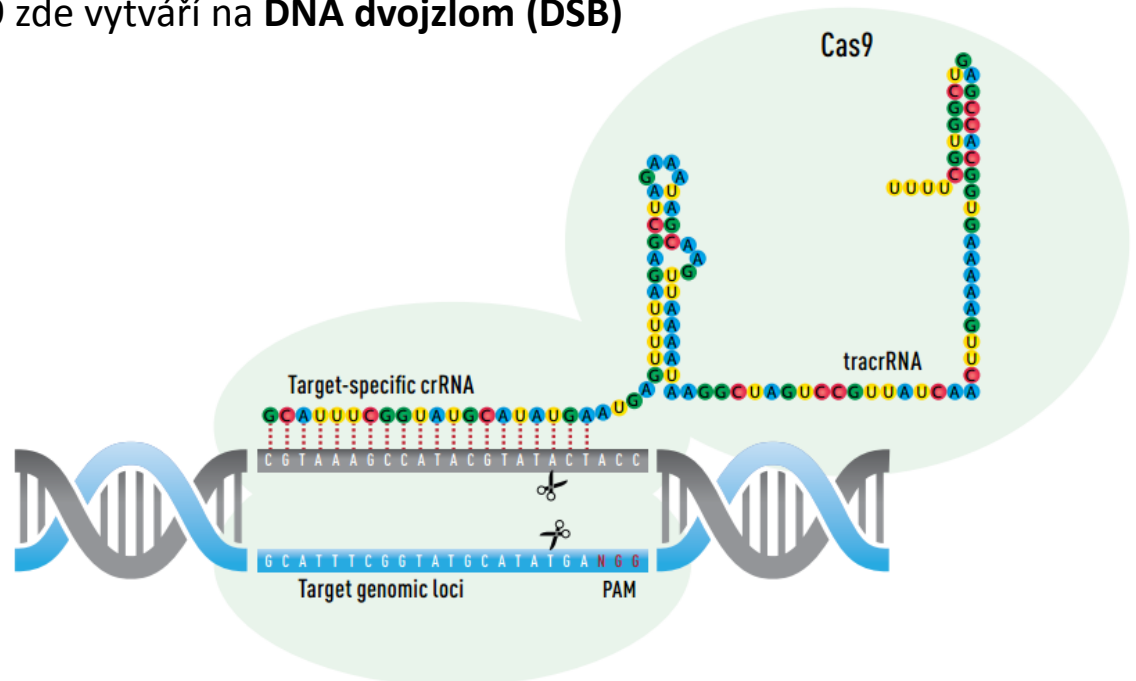
CRISPR - krok 1: vytvoření DNA DSB (double strand break)

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

- editace genomu budoucnosti - přesně nalezne místo na genomu, které chceme upravit
- levnější a přesnější než předchozí systémy (Zinc-finger nucleases a TALEN)
- 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



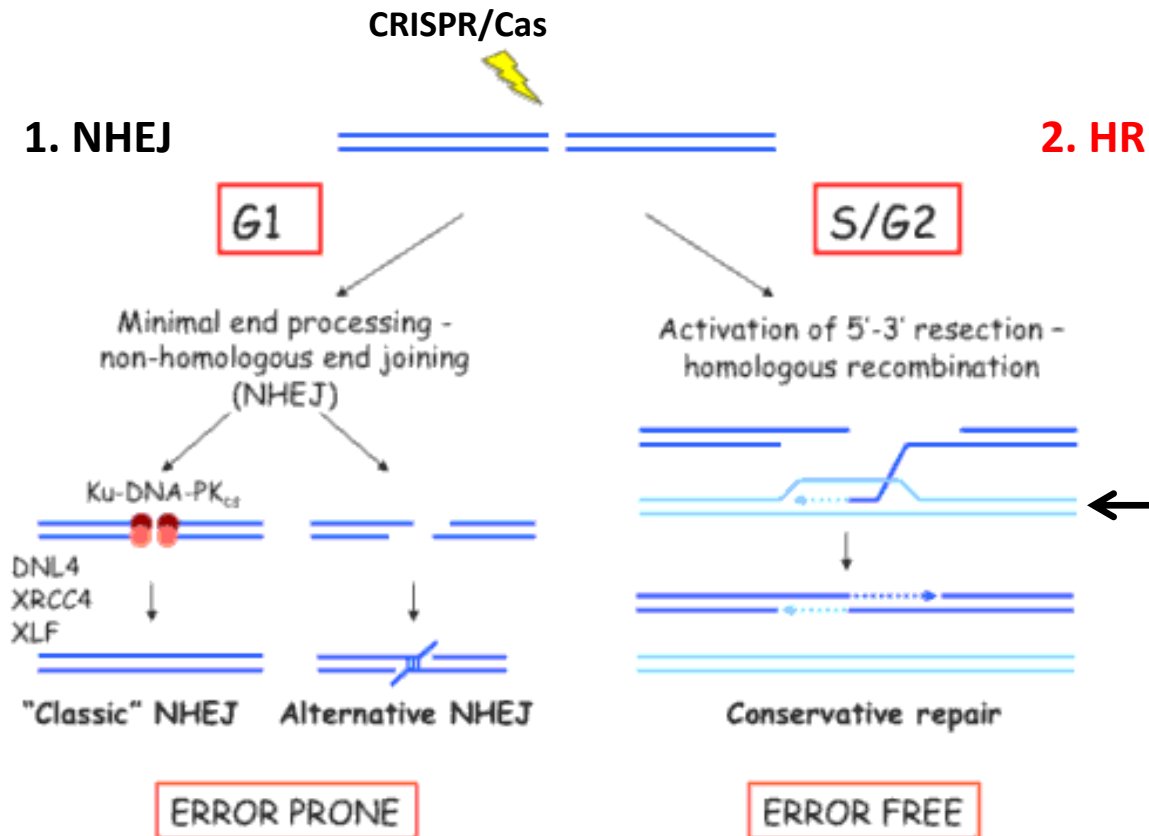
CRISPR - krok 2: vložení genu do místa DNA DSB

- DNA dvojlzomy mohou být opraveny dvěma mechanismy:

1. Non-homologous end joining (NHEJ)

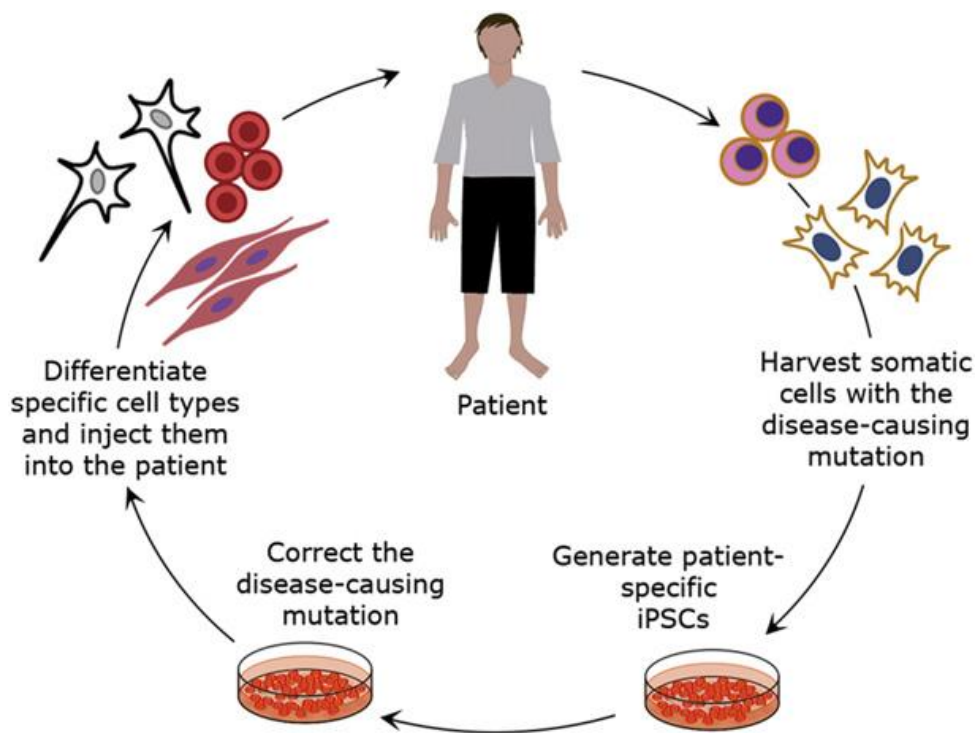
2. Homologní rekombinace (HR)

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



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 však 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 (používal její část - Klenowův fragment)
- musela tedy být přidána nová Polymeráza při každé cyklu

Taq Polymeráza

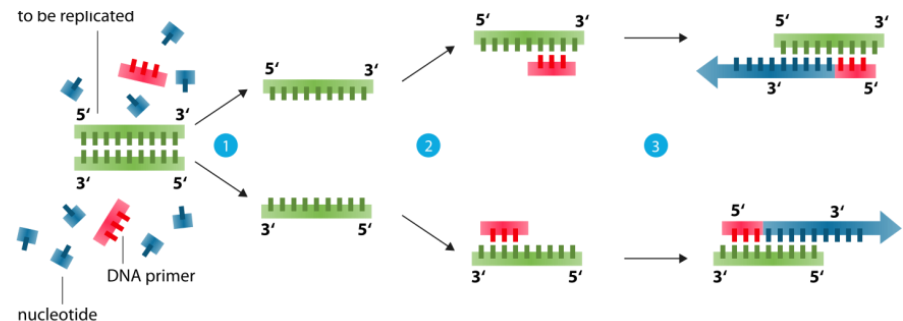
- původně izolována r. 1976 z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*
- bakterie žije v termálních pramenech (poprvé objevena v gejzíru v parku Yellowstone; 70°C)
- optimální aktivita Taq Polymerázy je 75-80°C (vydrží 95°C až 40 min)
- při 73°C připojuje 100 bazí za sekundu



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.

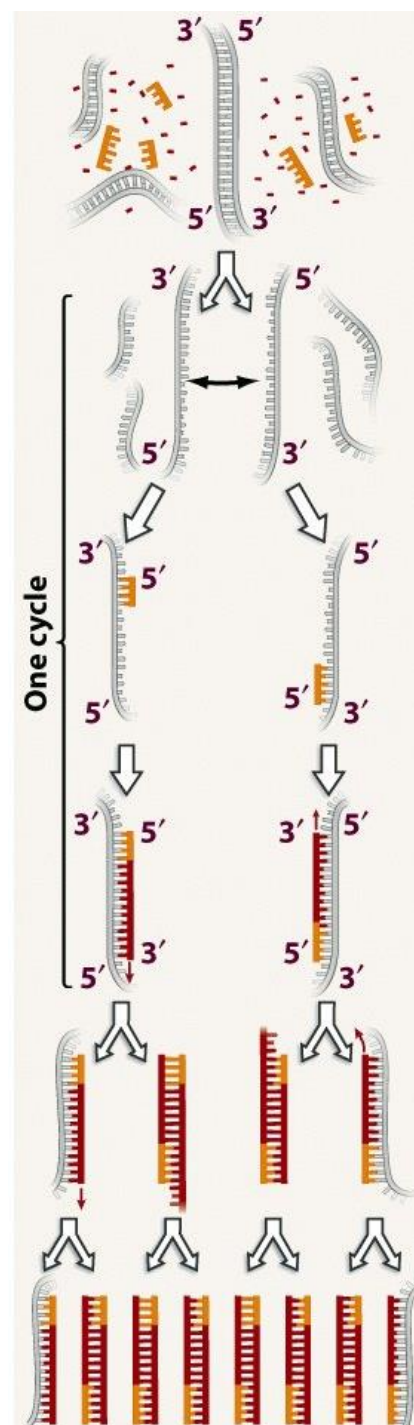


[Video: PCR](#)

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.

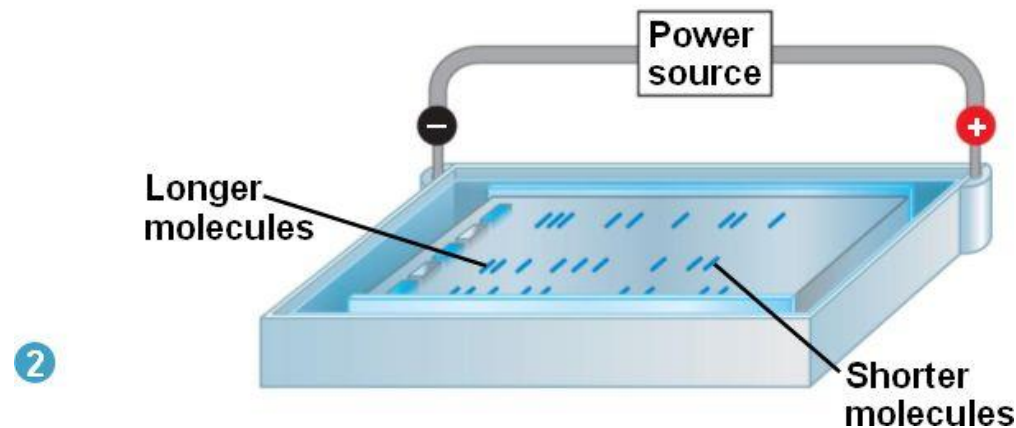
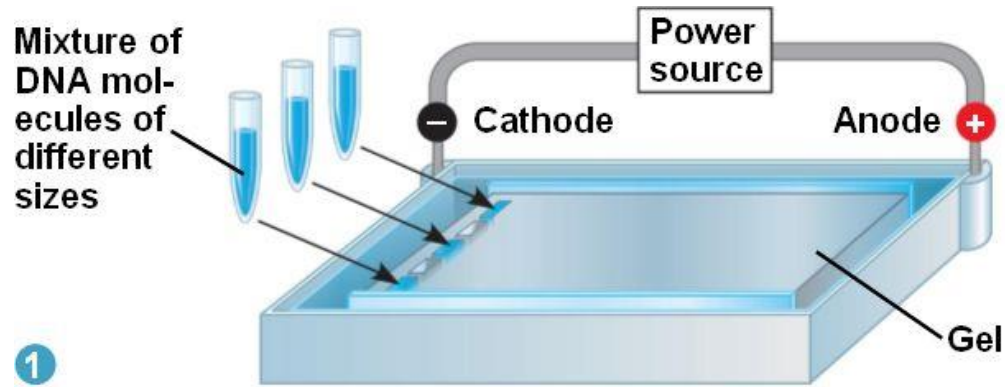
4. Extension
During incubation, DNA polymerase uses dNTPs to synthesize complementary DNA strand, starting at the primer.

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

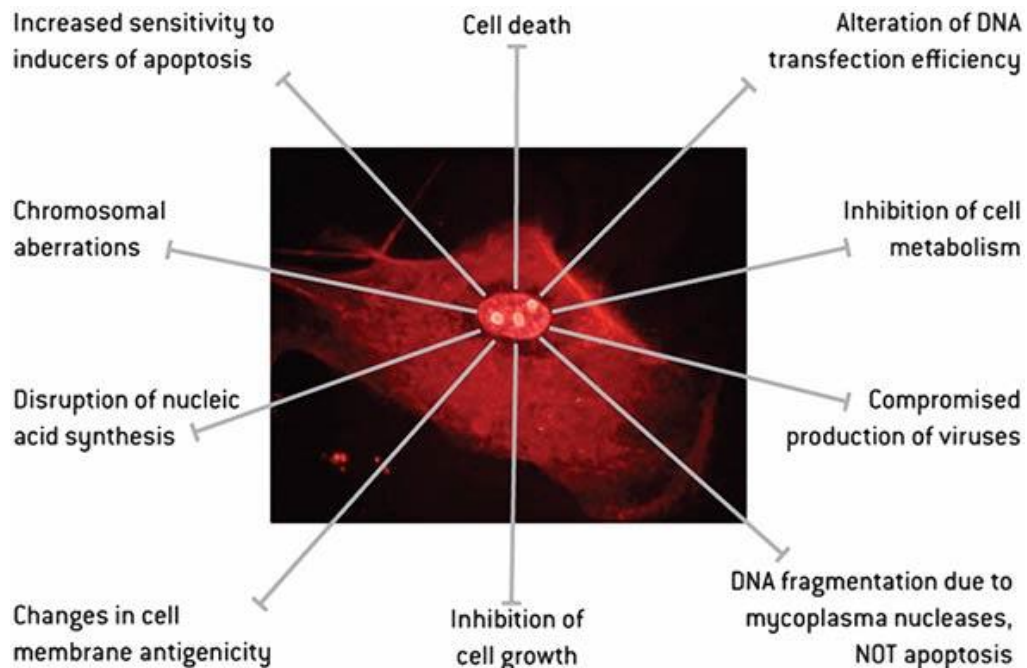
- velikost výsledného DNA fragmentu je ověřena na elektroforetickém gelu
- v elektrickém poli putují **záporně nabitě molekuly DNA** k anodě
- gel tvořen Agarozou a kratší molekuly DNA v něm putují rychleji než delší
- pro vizualizaci fragmentů DNA je gel napuštěn etidium bromidem, který se váže na DNA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

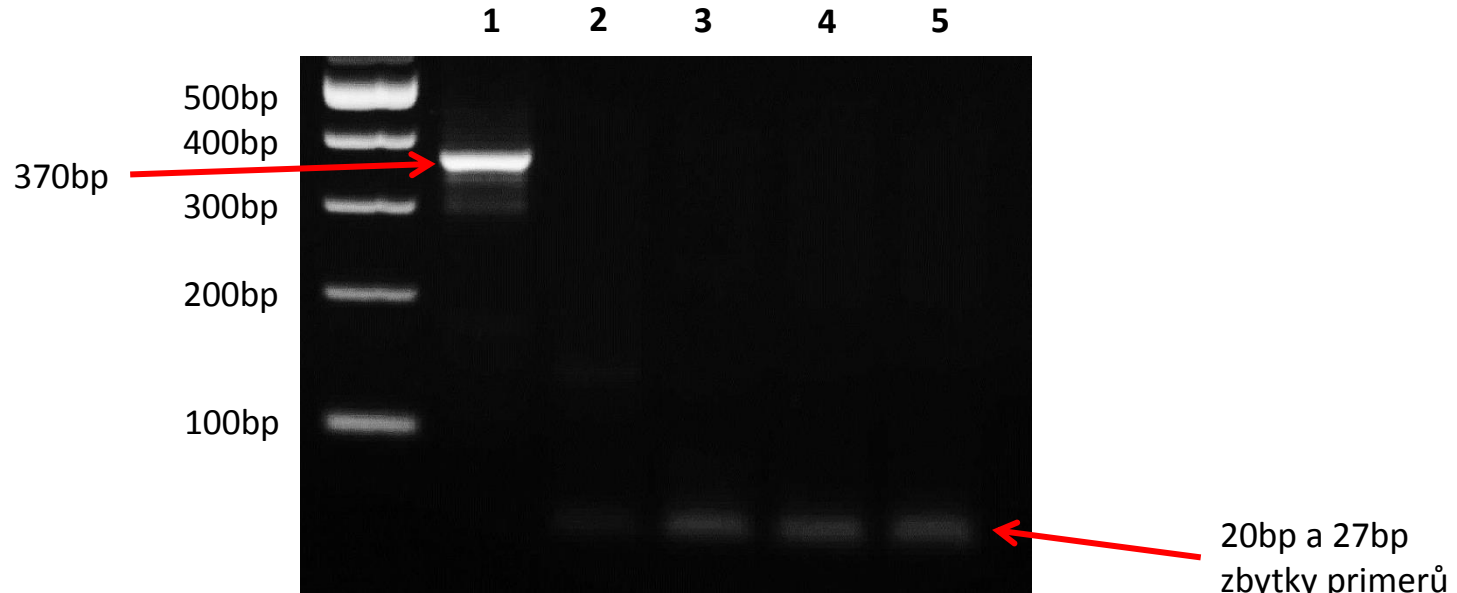
step 7: 4°C forever (zadat čas 0)

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



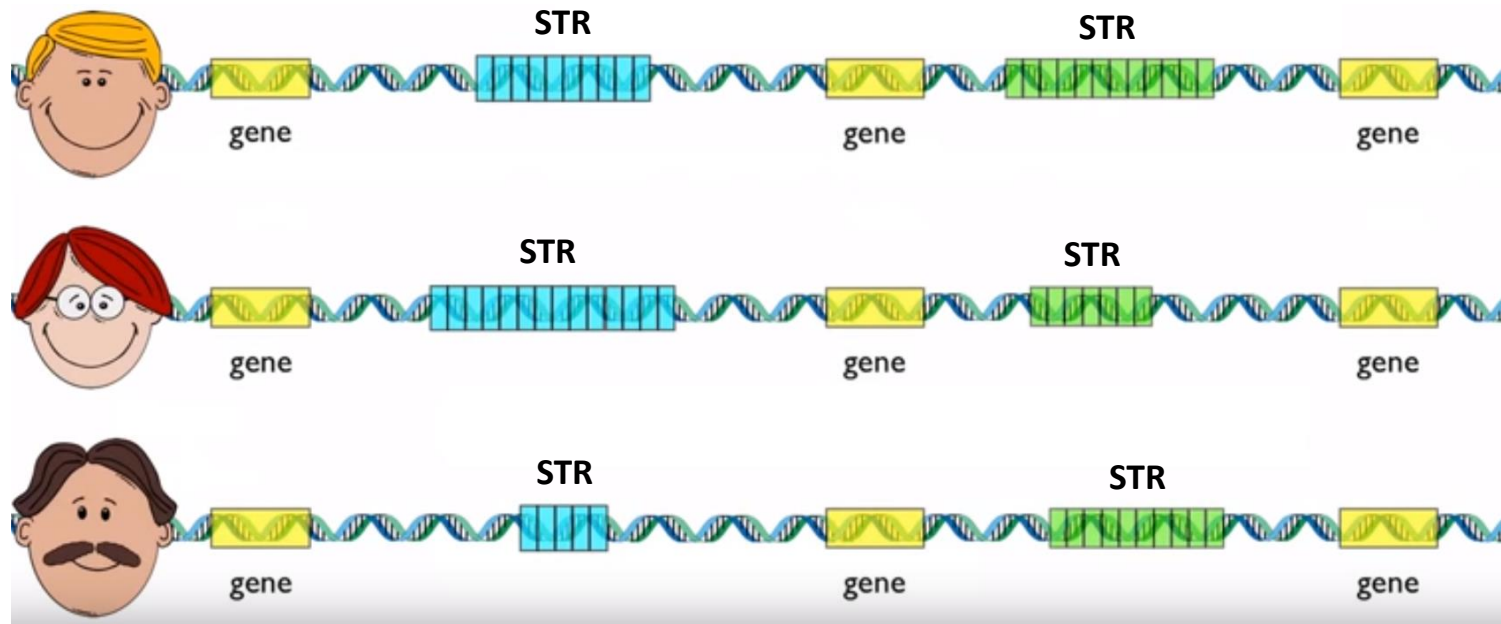
1. pozitivní kontrola - mykoplazmatická DNA
2. negativní kontrola - genomová DNA
3. vzorek č. 1
4. vzorek č. 2
5. vzorek č. 3

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

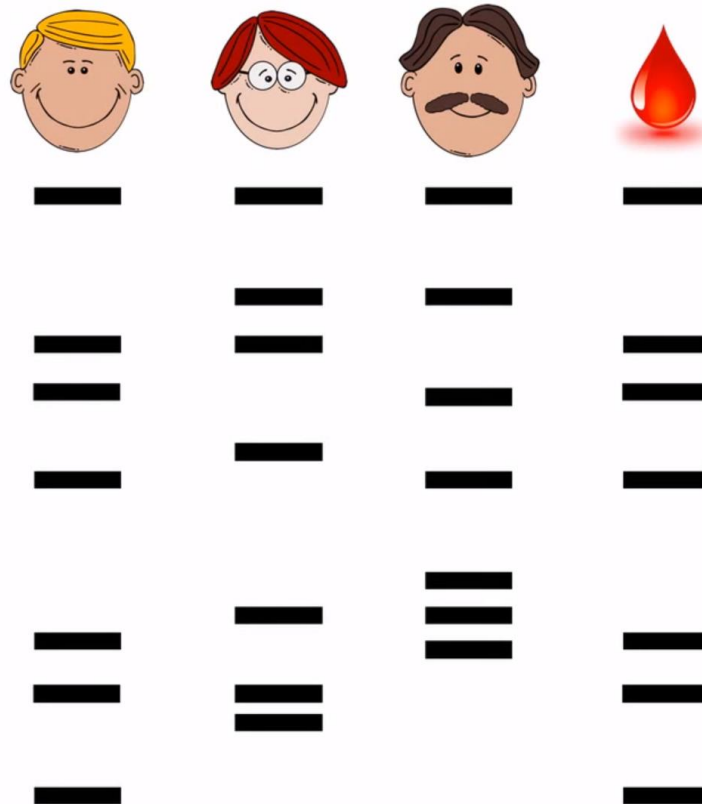


Wikipedia



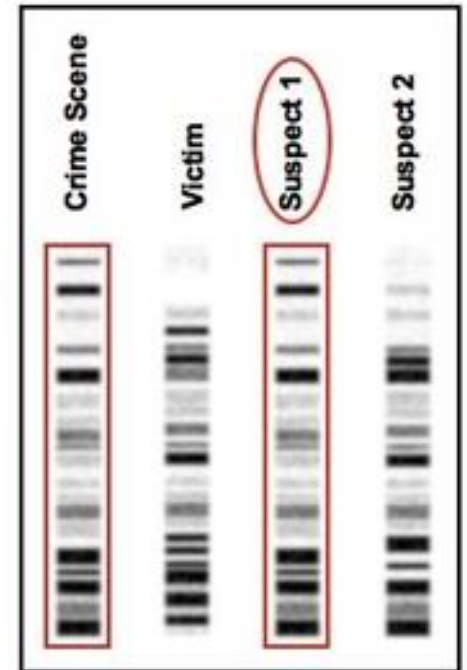
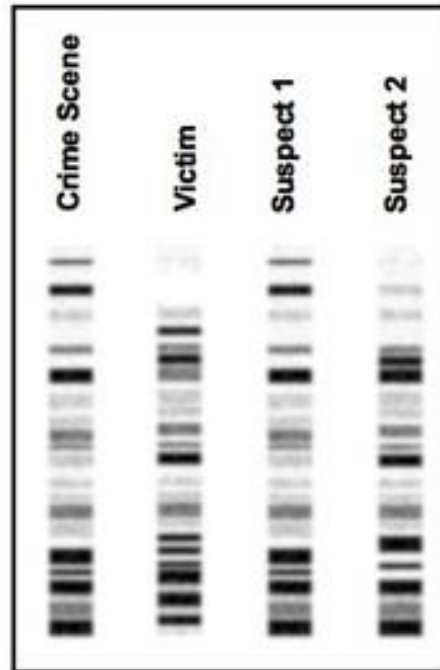
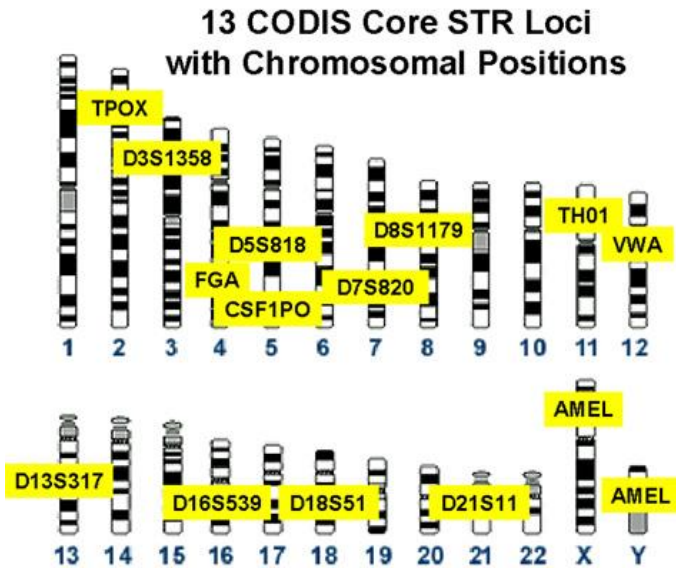
PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

- 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

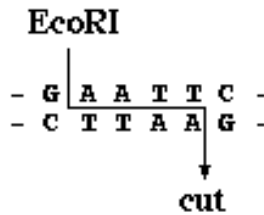
- FBI má databázi DNA zvanou CODIS (Combined DNA Index System)
- dle pravidel CODISu se testuje a uchovává 13 STR genetických markerů na různých somatických chromozomech (2 alely - tzn. max 26 bandů) + amelogenin pro určení pohlaví
 - AMEL: na chromozomu X obsahuje *intron 1* 6bp delecii, na rozdíl od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



DNA fingerprinting - RFLP

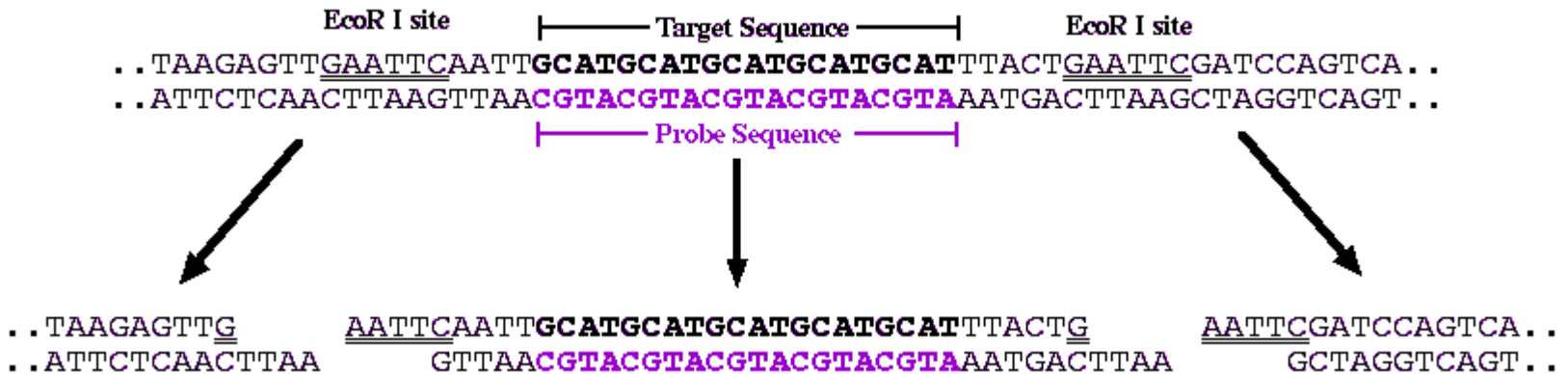
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

- 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



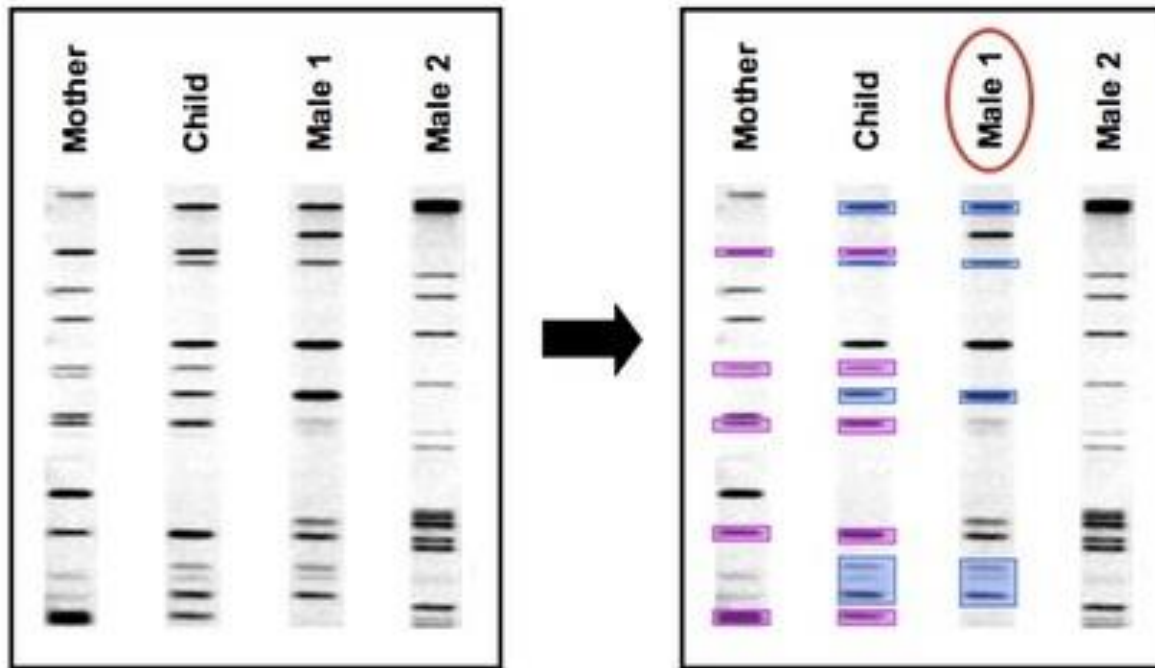
Nevýhody RFLP oproti STR

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



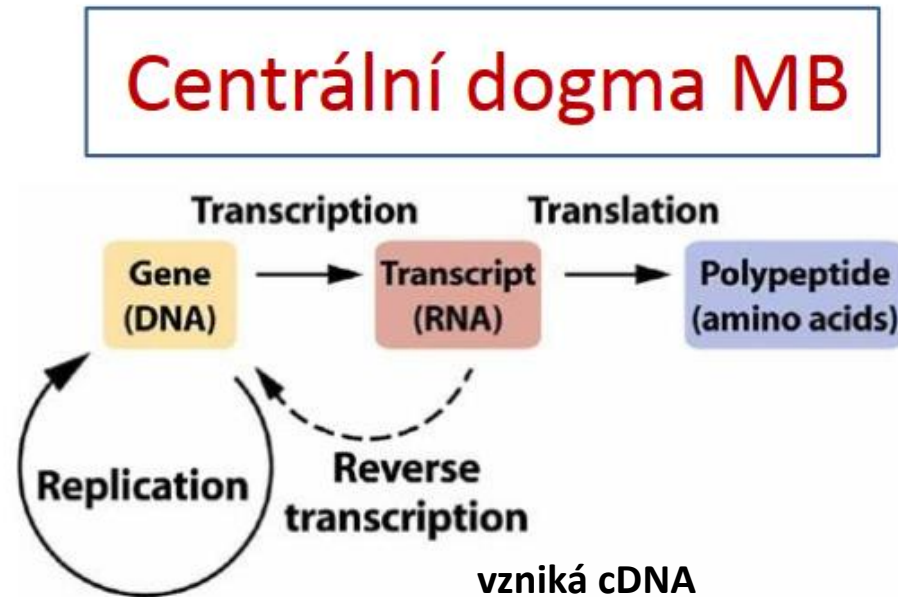
Testování otcovství

- 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 na štěpené 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

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
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)

Dvě základní techniky qPCR:

1. dsDNA fluorofory (nejčast. SYBR Green)

- fluorofor mění své strukturní vlastnosti po navázání na dvojřetězcovou DNA (dsDNA) a rozsvítí se
- detekuje veškerou dsDNA, takže i možné nespecifické produkty, či příp. dimery primerů

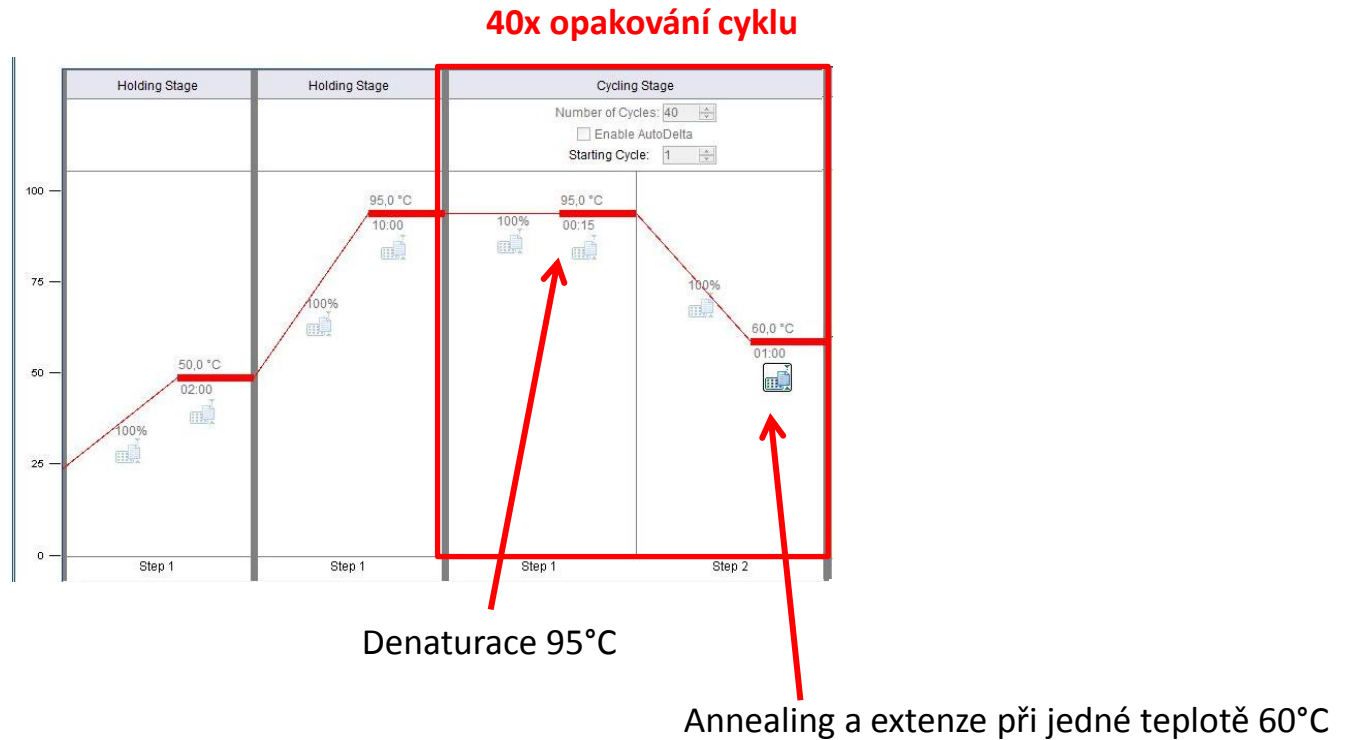
2. Reporterové sondy

- krátké sekvence komplementární DNA označené fluoroforem (reproter) a zhášečem (quencher)
- jsou specifické pro sledovaný PCR produkt (gen)
- mnohem přesnější než barvení dsDNA
- komerčně dostupná tzv. "Universal ProbeLibrary - UPL"
 - soubor DNA 100 sond
 - software navrhne vhodnou sondu pro vybraný gen a také vhodné primery tak, aby vznikal pokud možno jeden produkt PCR (amplikon) a pouze na něj pasovala vybraná sonda



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

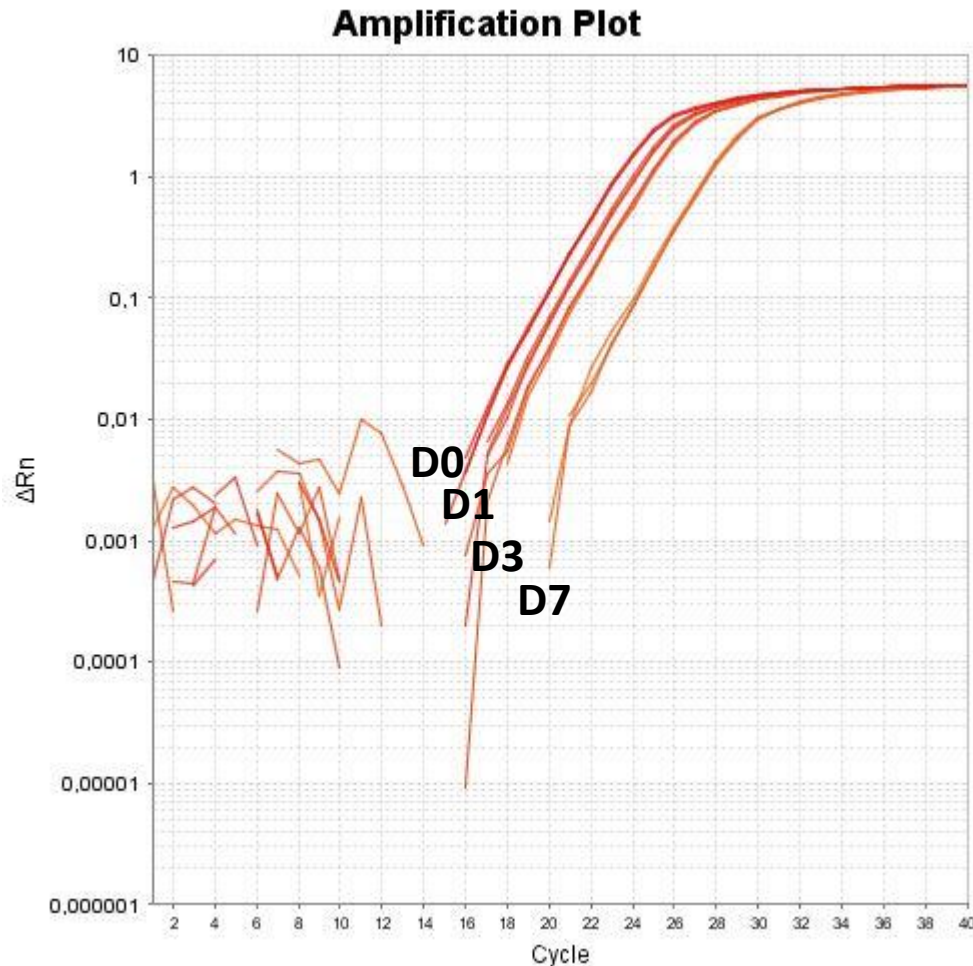
Vyhodnocení dat z qPCR



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

Vyhodnocení dat z qPCR

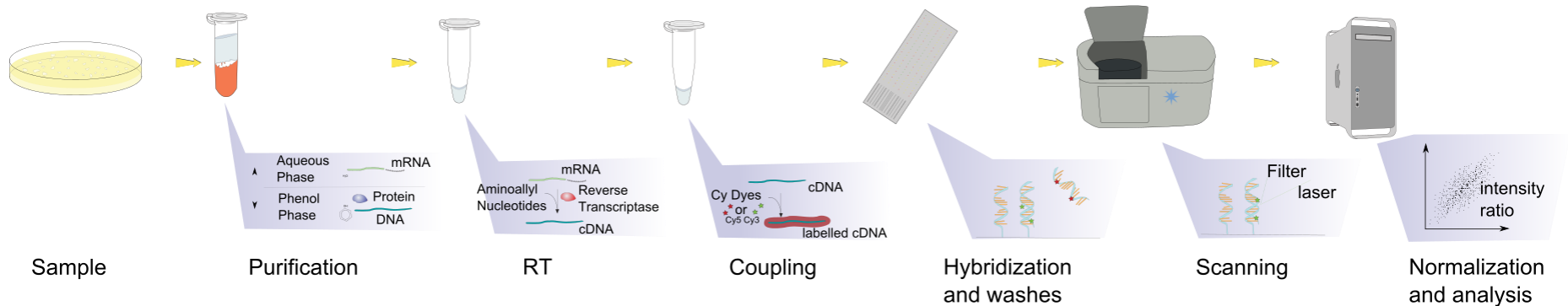
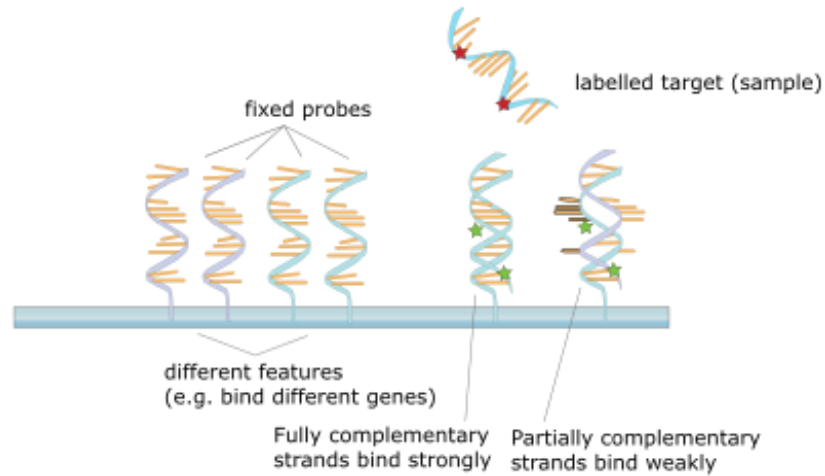
- 4 křivky v triplikátu
- pozdější nárůst = méně cDNA (menší exprese mRNA)
- sledování poklesu exprese genu OCT3/4 v průběhu diferenciace embryonálních kmenových buněk (hESC)
- OCT3/4 je exprimován nejvíce v kmenových buňkách a u diferencovaných buněk je umlčen



1b) Microarray

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

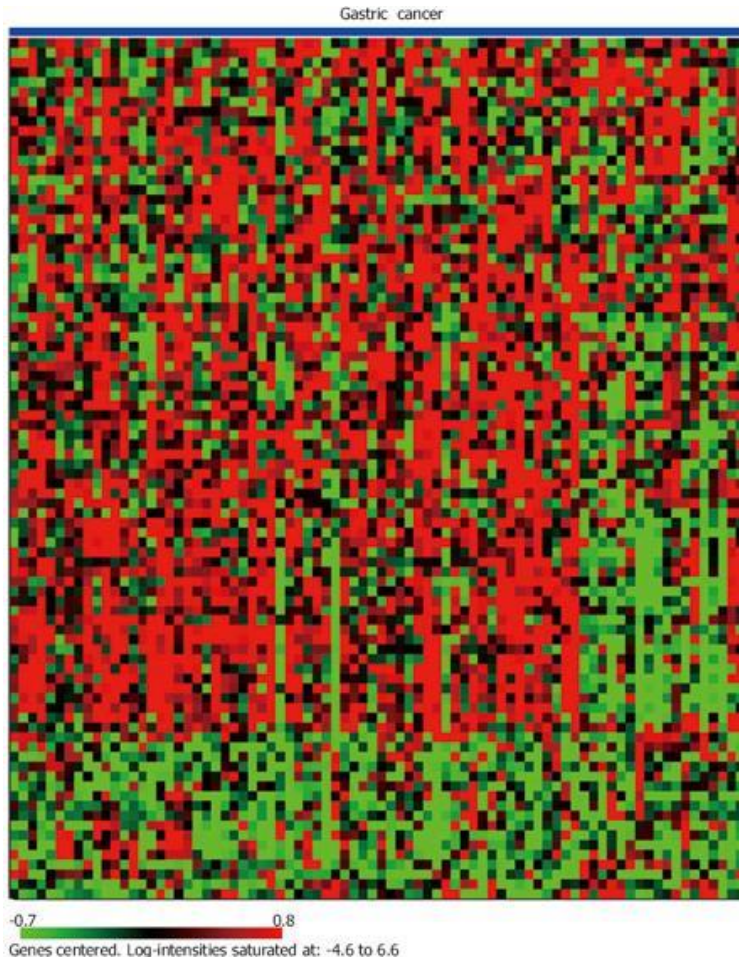
Funkce: zjištění míry genové exprese simultánně u obrovského množství genů
- každý spot (sonda, probe) je větš. krátký usek genu, který se hybridizuje s cDNA



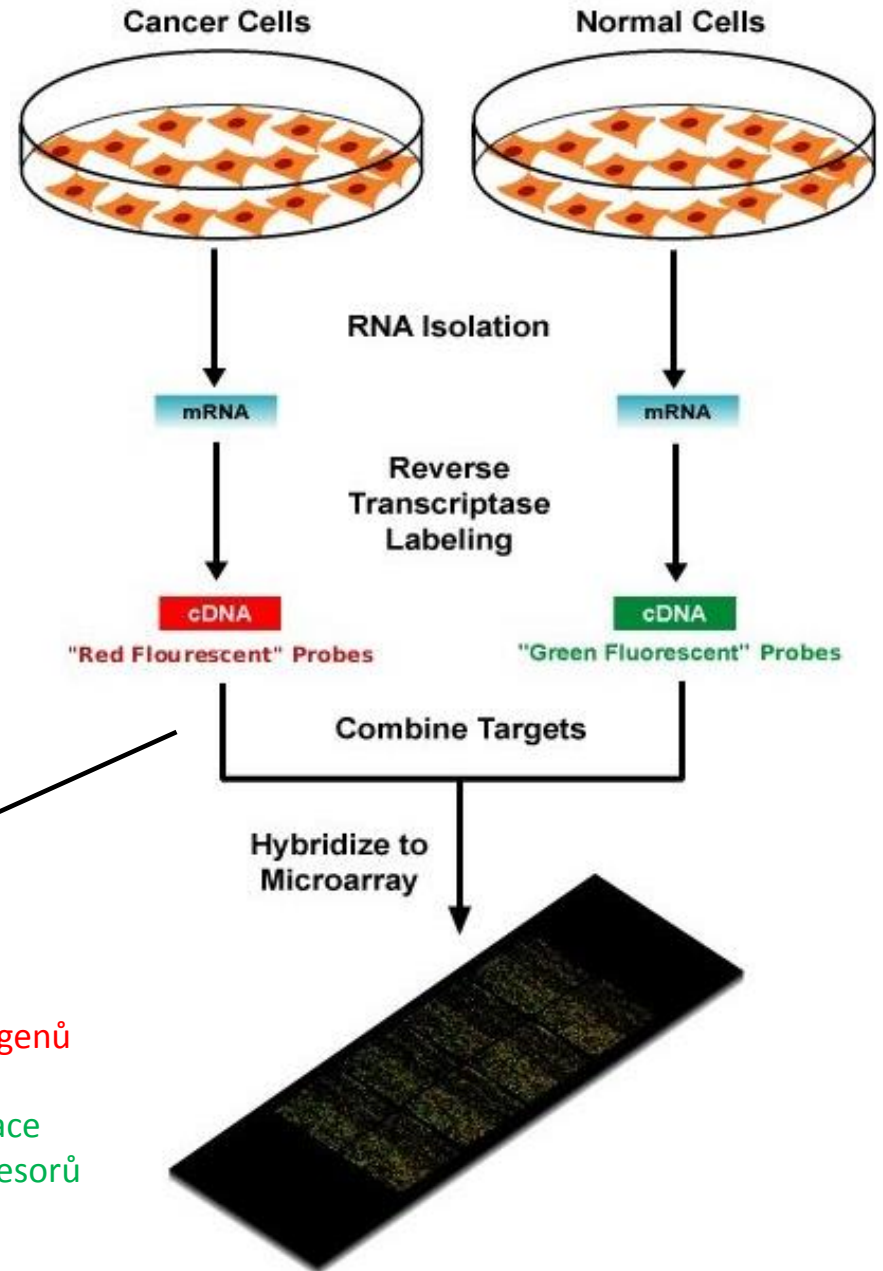
1b) Microarray

Srovnávají se mRNA dvou vzorků, např.:

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



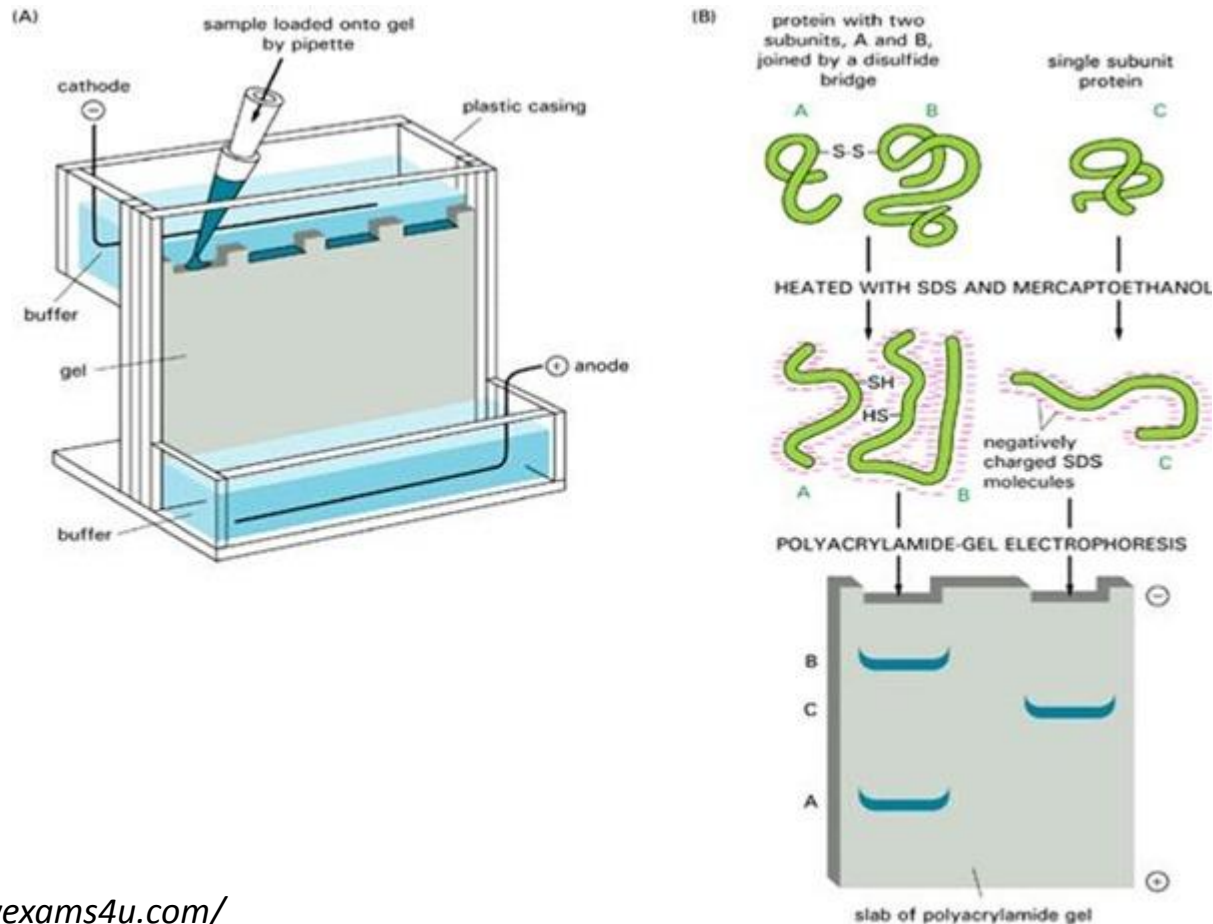
například:
upregulace
proto-onkogenu
downregulace
tumor supresorů



2a) Western blotting

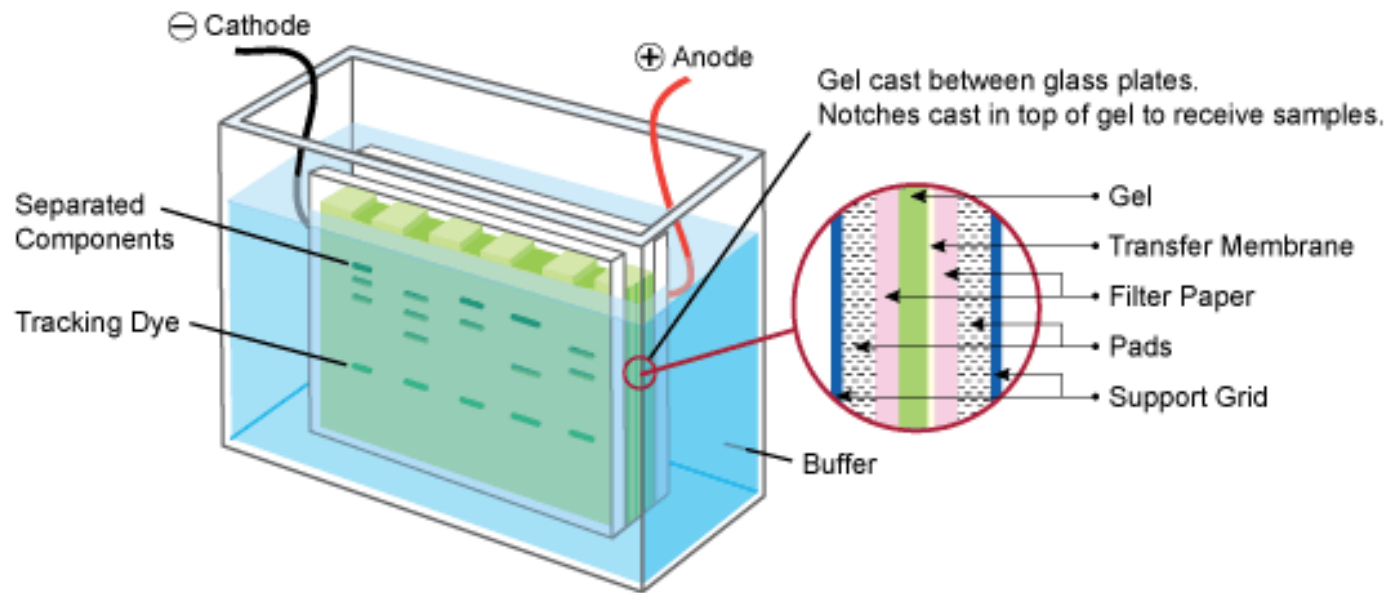
Určení množství určitého proteinu ve vzorku

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



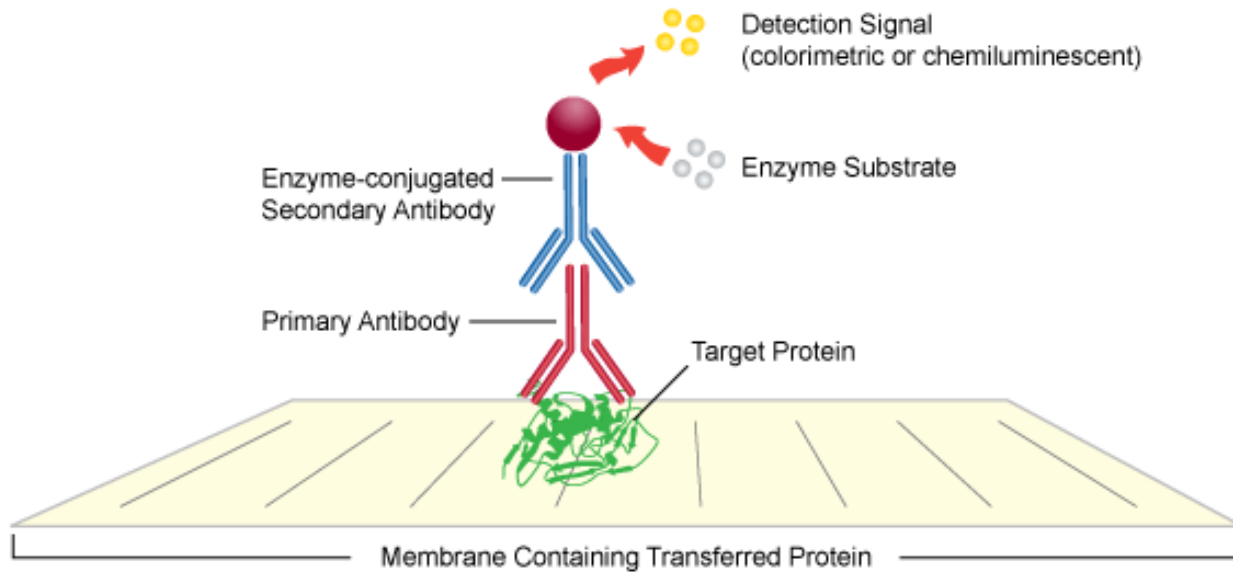
2a) Western blotting

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

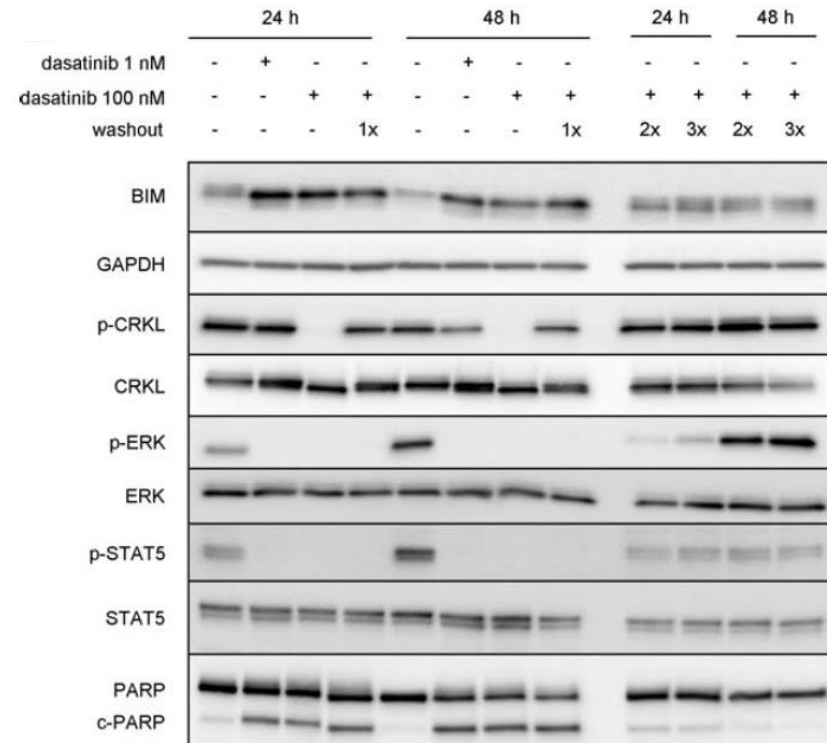


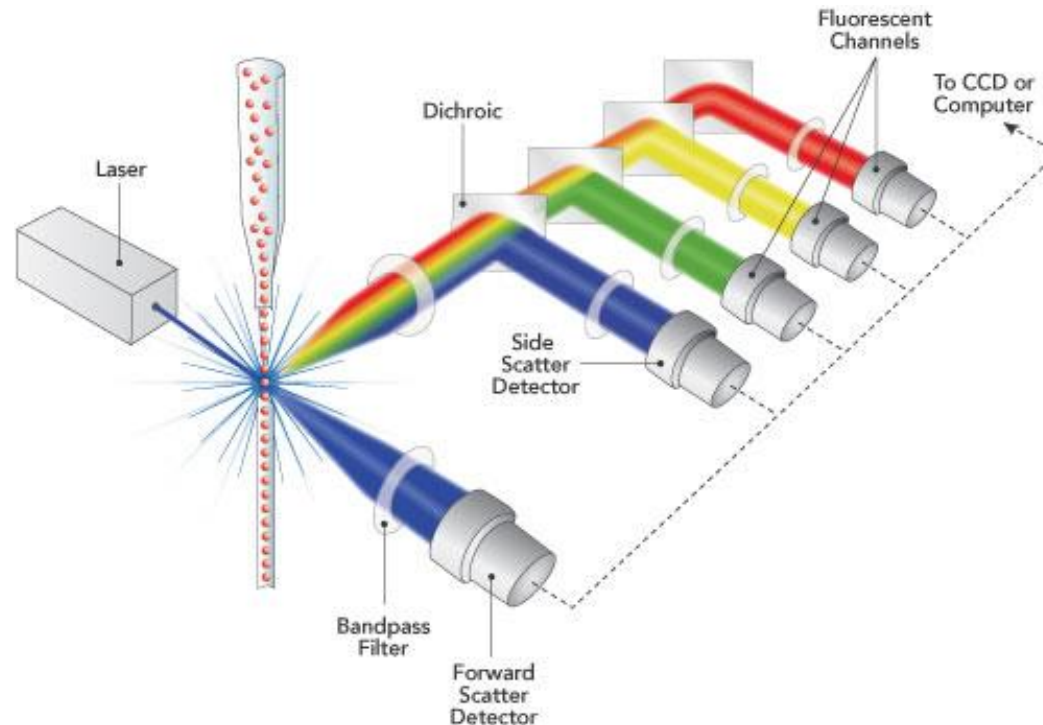
Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5 μ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5 μ M imatinib or 100 nM dasatinib) or a high dose 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

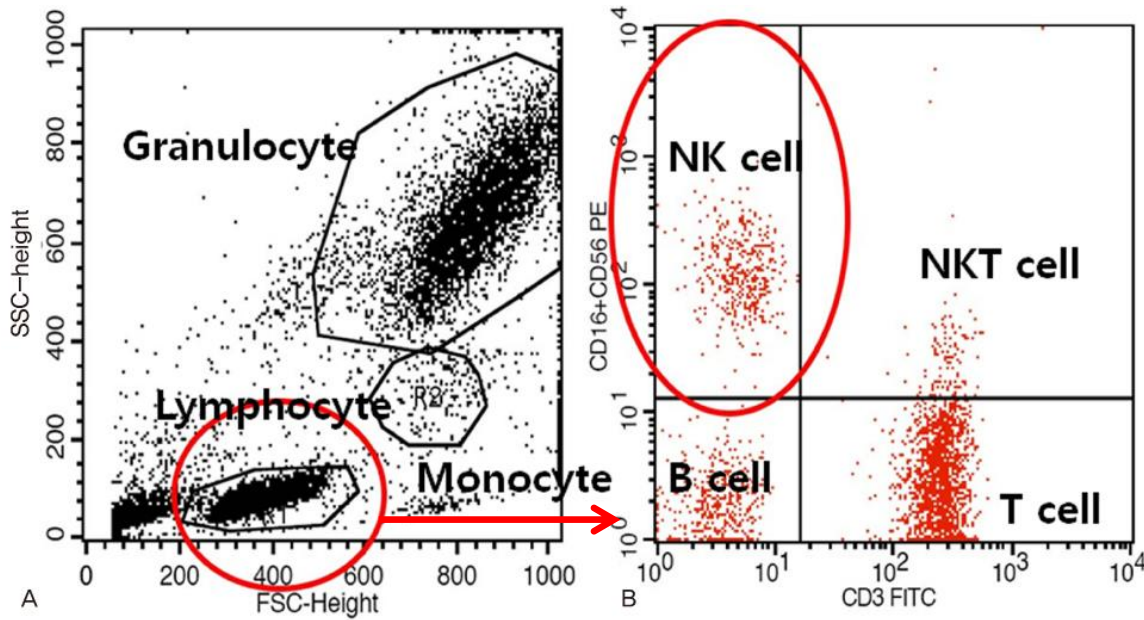
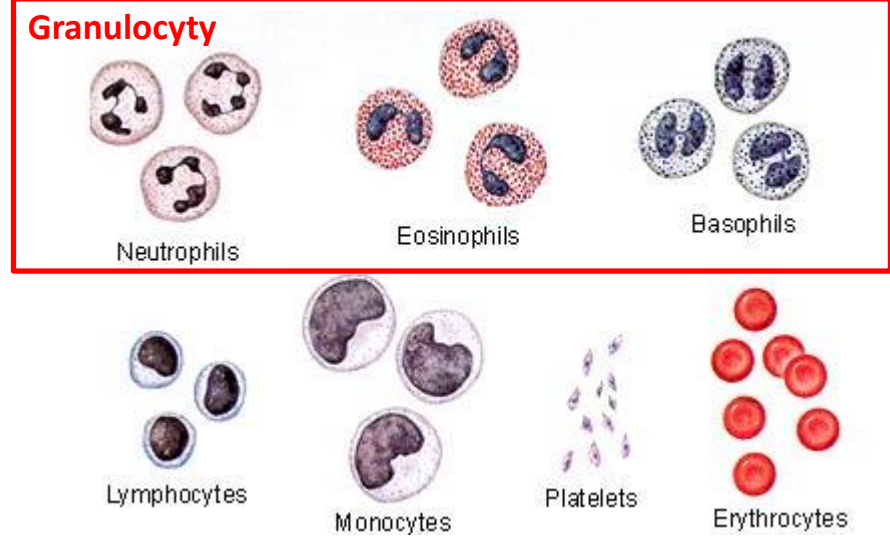
Vyhodnocení:

Leukocyty - bílé krvinky hledání NK buněk

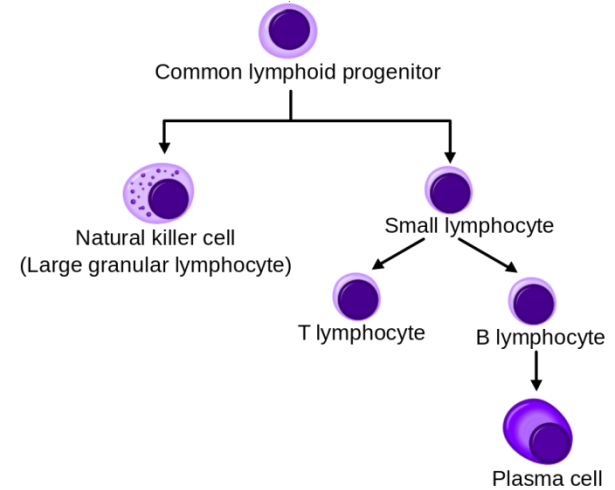
CD3 - T cell receptor

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

CD56 - povrchový antigen NK buněk



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



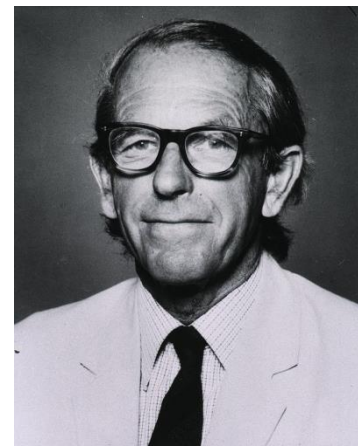
www.biosbcc.net,
www.ogscience.org
wikipedia

*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 replikace se normálně připojuje nový dNTP na OH-skupinu posledního dNTP na 3'-konci řetězce
- pokud se připojí ddNTP - elongace končí

ddNTPs terminate DNA synthesis.

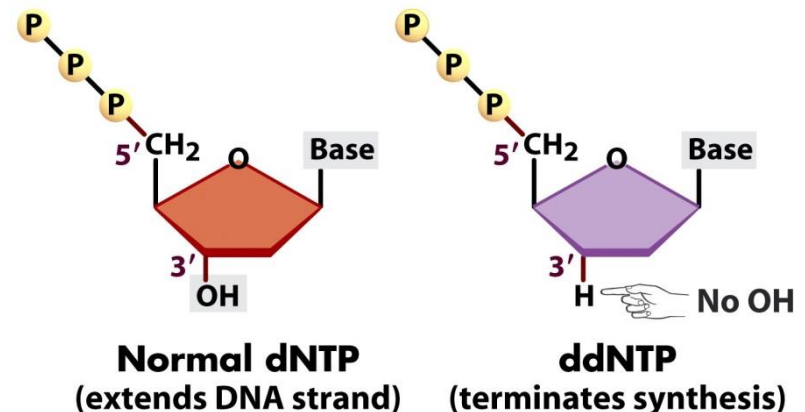


Figure 19-6a Biological Science, 2/e

© 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

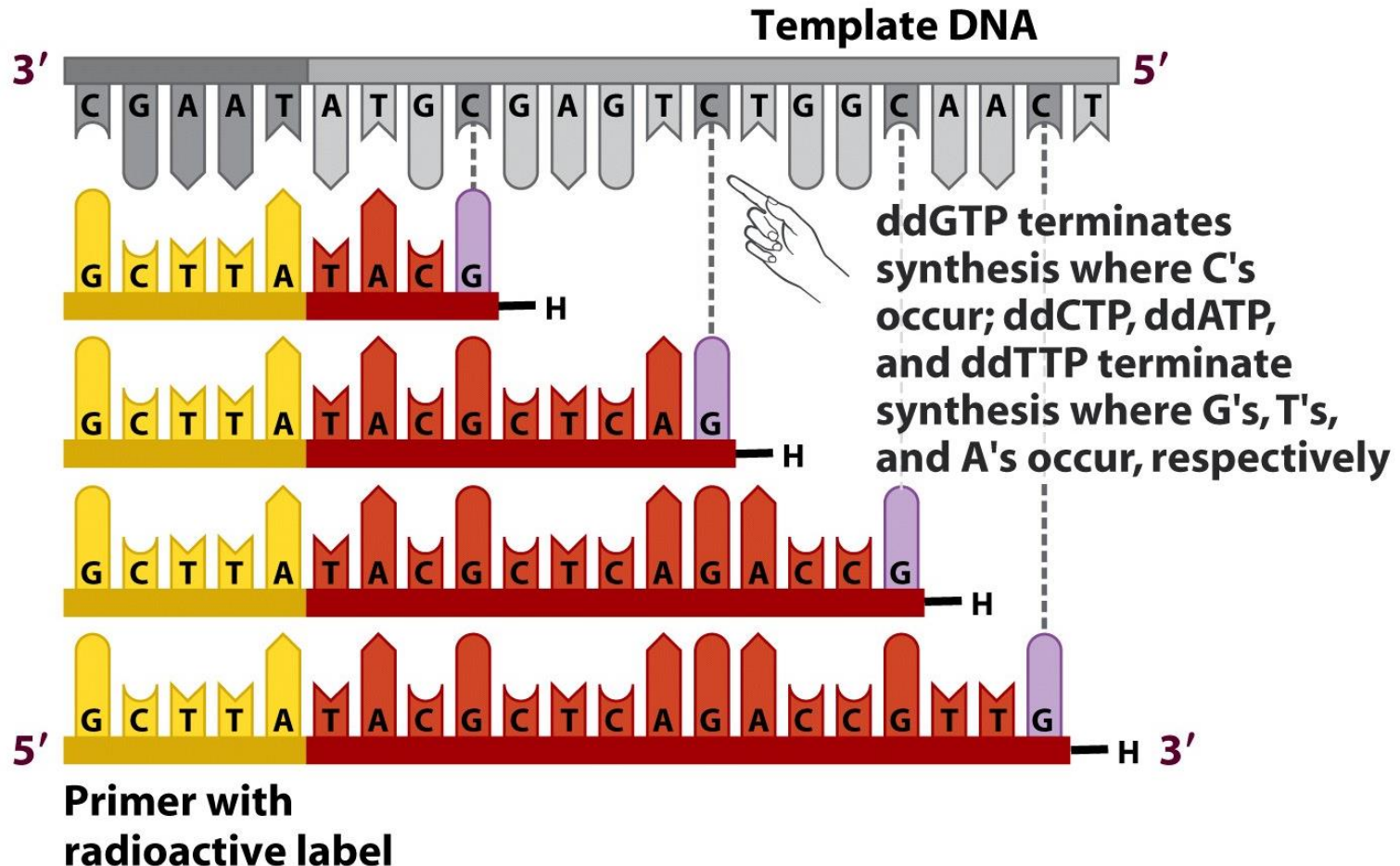


Figure 19-6b Biological Science, 2/e

© 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

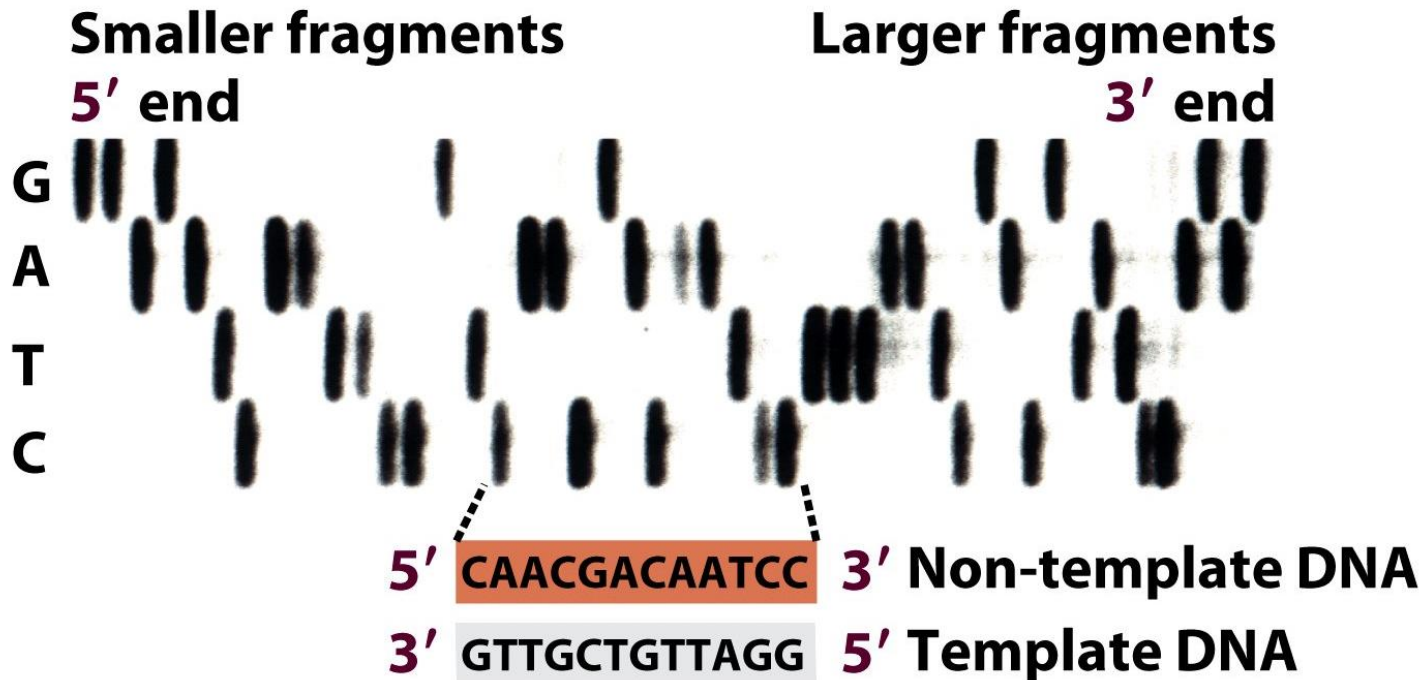


Figure 19-6c Biological Science, 2/e

Modernizace Sangerova sekvenování

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

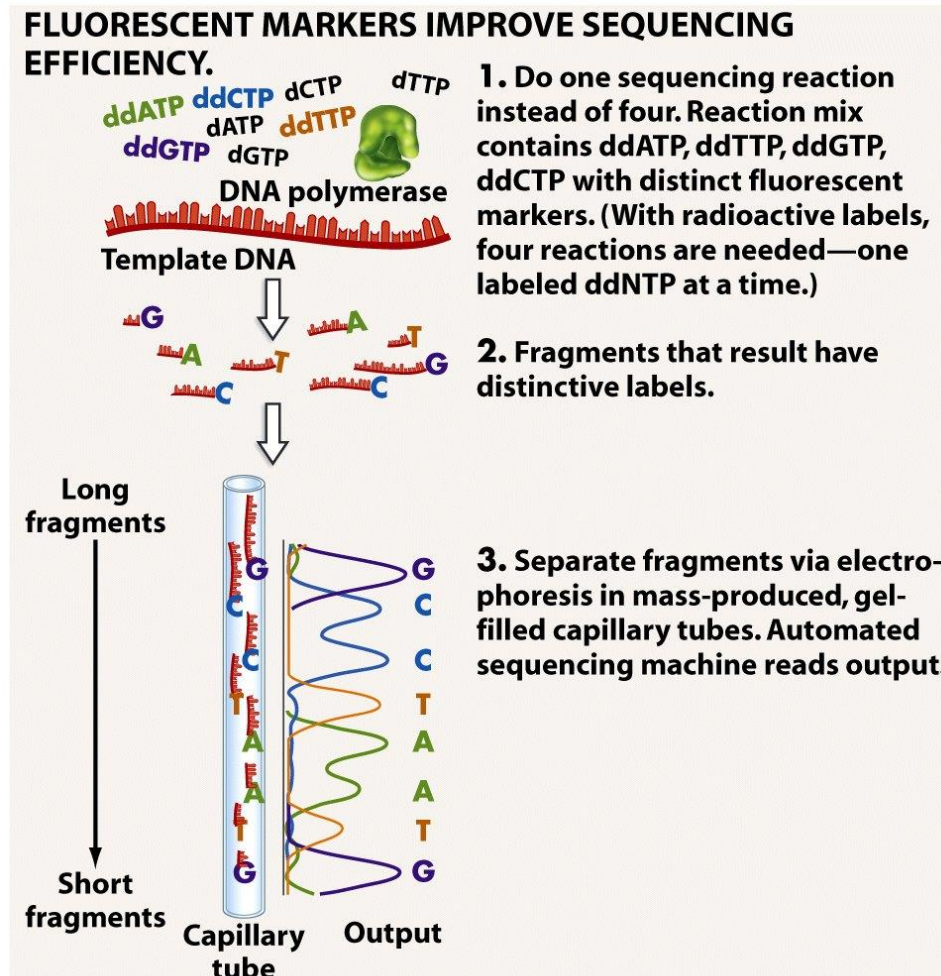


Figure 20-1 Biological Science, 2/e

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>	

* Amabile and Meissner. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. 2009. Cell

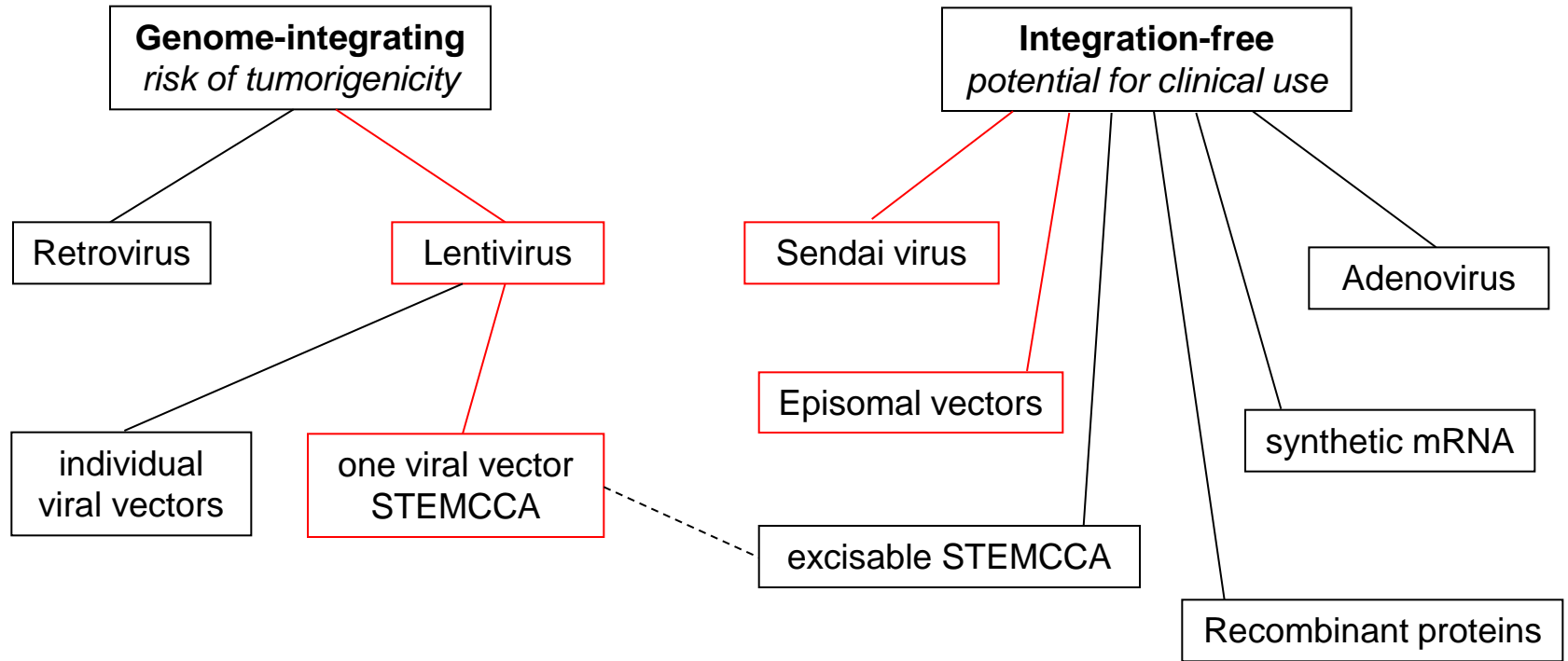
Reset do embryonálního stavu

- diferenciace probíhá většinou jednosměrně a reprogramace či transdiferenciace je vzácná (např. některé nádory)

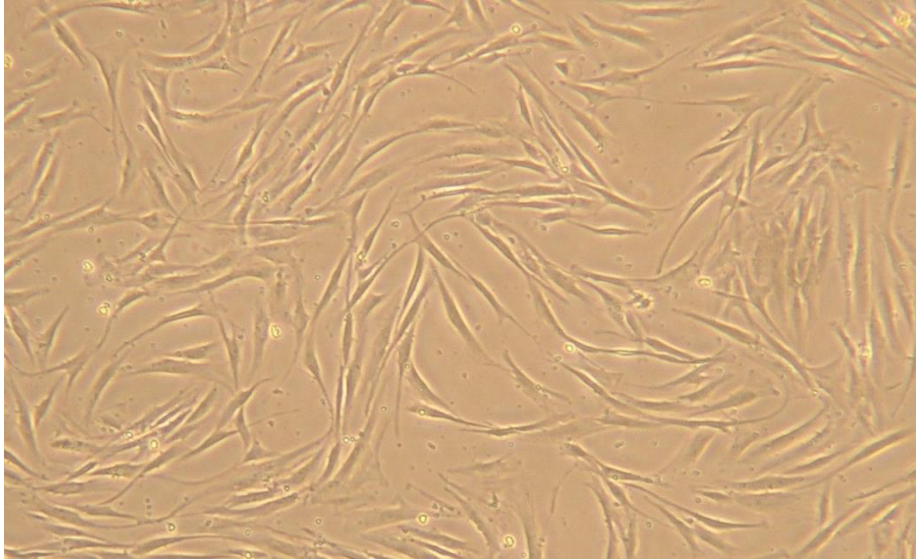
- avšak jádro většiny buněk si zachovává schopnost resetovat se do embryonálního stavu:

- **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
- **Přímá reprogramace** - **indukovaná** overexprese definovaných transkripčních faktorů
2006, Takahashi a Yamanaka: transformovali myšší 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



a) Fibroblasty



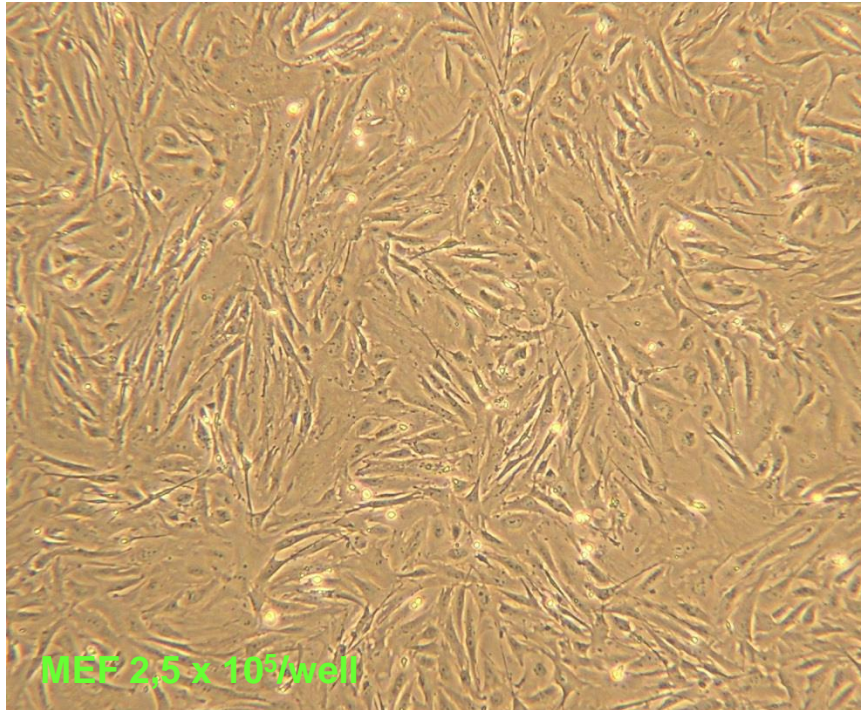
b) Krevní progenitory CD34+

Povrch pro kultivace iPSC

a) MEF feeders

iPSCs kultivovány na vrstvě ozářených myších embryonálních fibroblastů (MEFs; 50Gy)

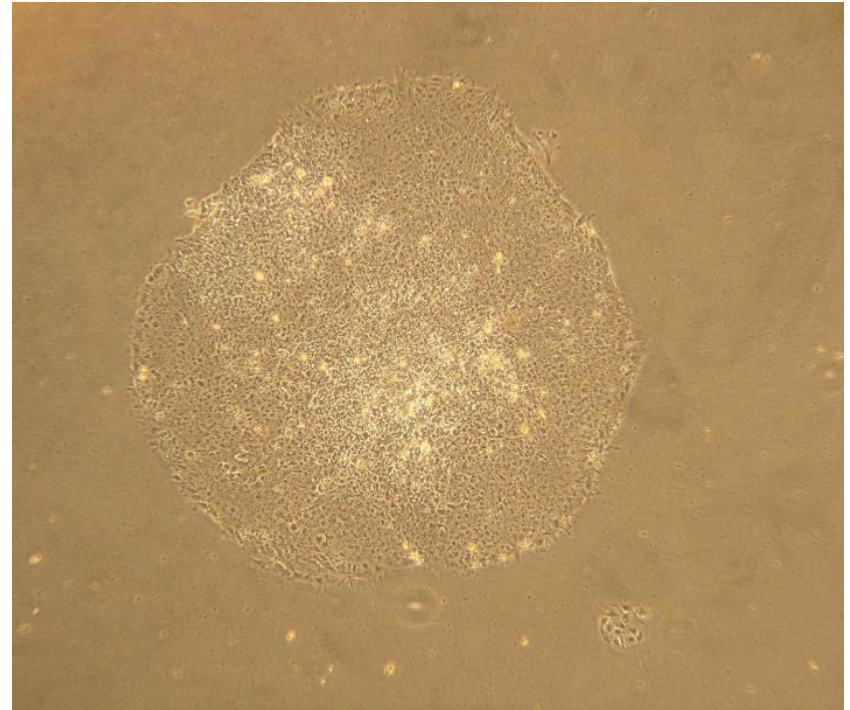
MEFy získávány přímo z myších embryí



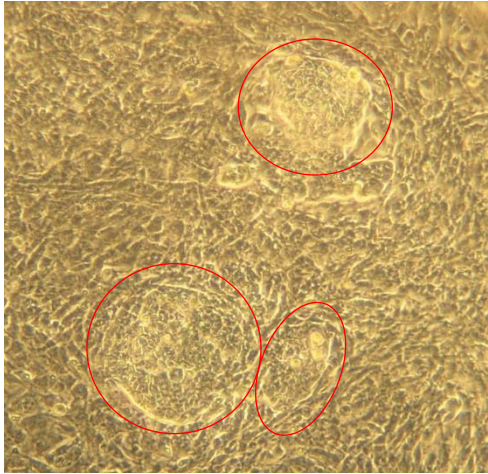
b) Geltrex™ feeder-free system

Kultivační misky pokryty membránovým matrix

Nepřítomnost xenogenních buněk je vhodnější pro klinické aplikace

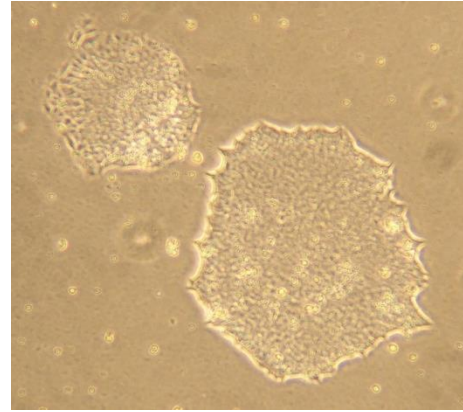


Reprogramming timeline

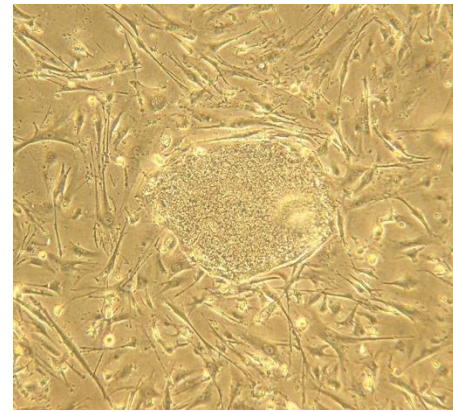


D0
reprogramming

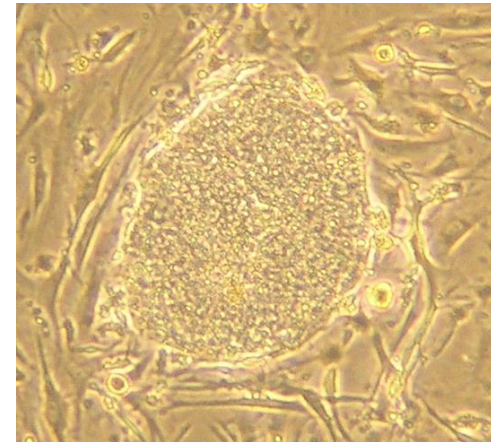
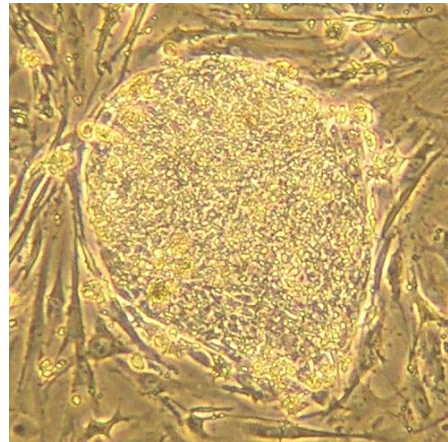
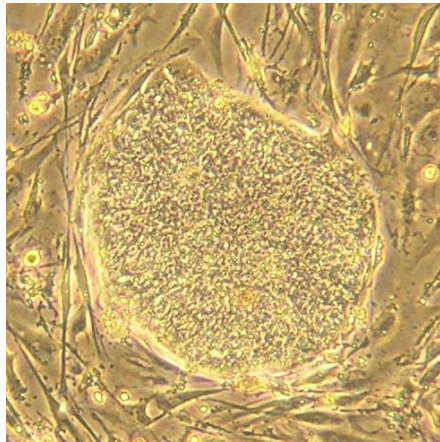
D10
first colonies



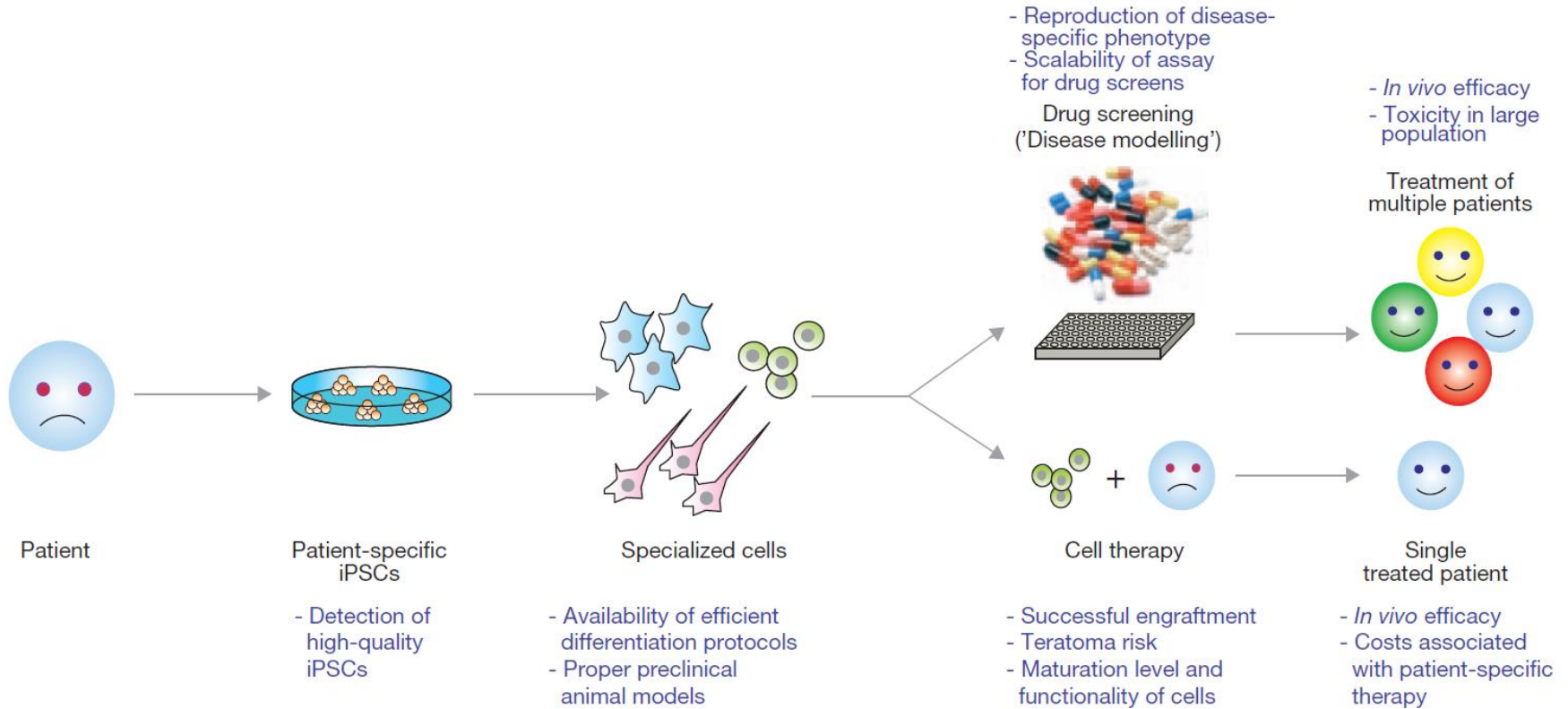
D19
clones picked on fresh
MEFs or Gelrex



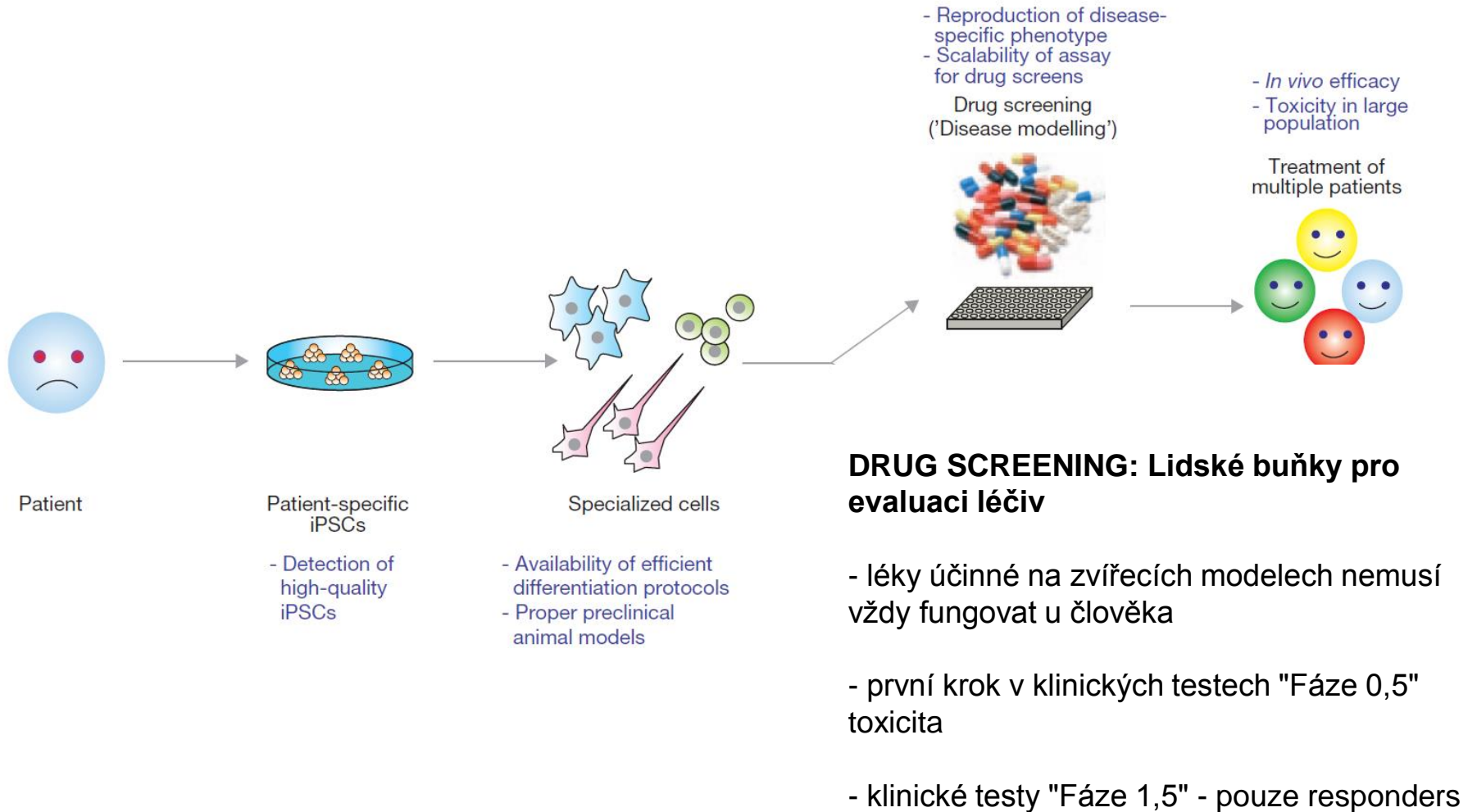
D31
succesfull expansion



Potenciál iPSC v regenerativní medicíně



Potenciál iPSC v regenerativní medicíně



Potenciál iPSC v regenerativní medicíně

PRO A PROTI

- nebezpečí vzniku teratomu
 - vysoké náklady na přípravu iPSC z pacientů
 - určité poruchy nemůžou čekat (poranění míchy)
- + vhodní kandidáti: eg. age-related macular degener.

BUNĚČNÁ TERAPIE (Transplantace)

- nižší riziko odmítnutí štěpu a infekce u autologních buněk
- banky iPSC od dárců s hlavními HLA typy

