

Διαμόλυνση (transfection) κυττάρων

Μέθοδοι μεταφοράς γενετικού υλικού

μη ιϊκές μέθοδοι (transfection): χημικές και φυσικές μέθοδοι
ιϊκές μέθοδοι (infection)

Είδη μεταφερόμενου γενετικού υλικού

πλασμίδια (φορείς έκφρασης γονιδίων)
αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (DNA, RNA)
μονόκλωνο και δίκλωνο RNA (siRNA, miRNA)

Πρωτόκολλα διαμόλυνσης

παροδική (transient)
μόνιμη (stable)

Καθορισμός της αποτελεσματικότητας διαμόλυνσης

Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης

Μέθοδοι βελτιστοποίησης των συνθηκών διαμόλυνσης

Μη ιϊκές μέθοδοι

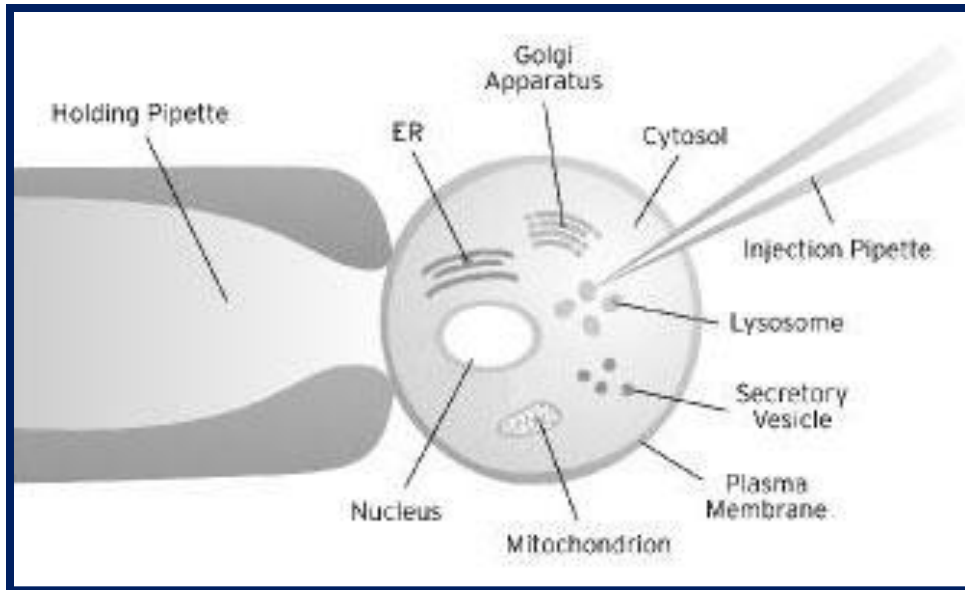
Φυσικές μέθοδοι

- Μικροένεση (microinjection)
- Γονιδιακό όπλο (gene gun, biolistics)
- Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)
-

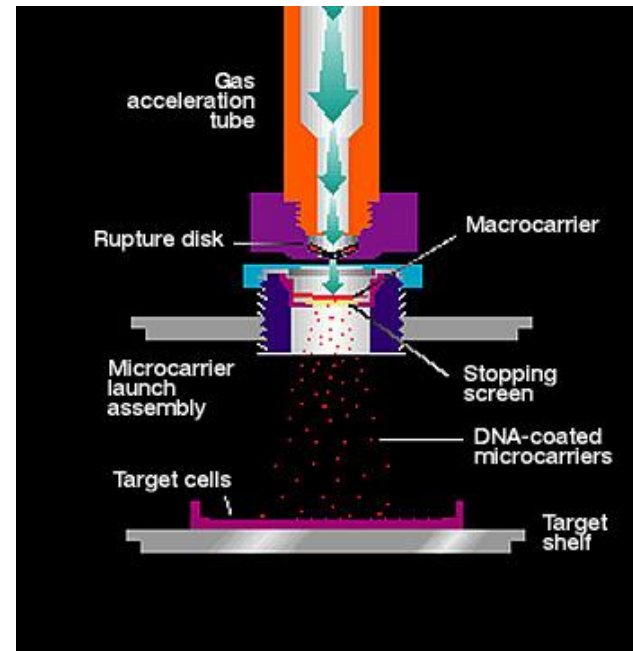
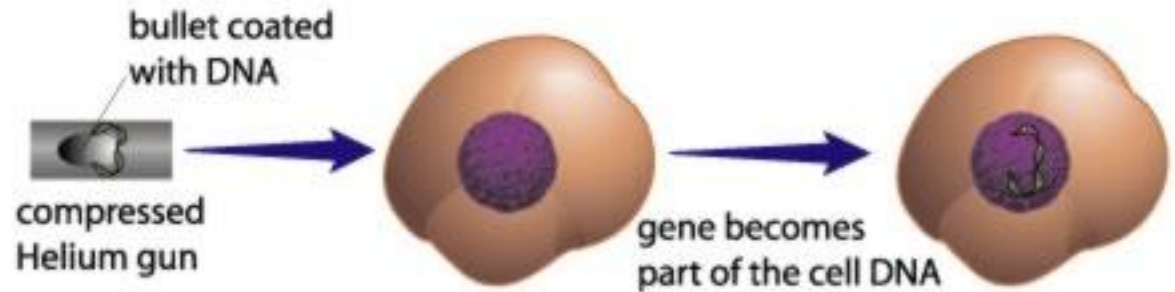
Χημικές μέθοδοι

- Φωσφορικό ασβέστιο
- DEAE- dextran
- Λιποσώματα (κατιονικά)

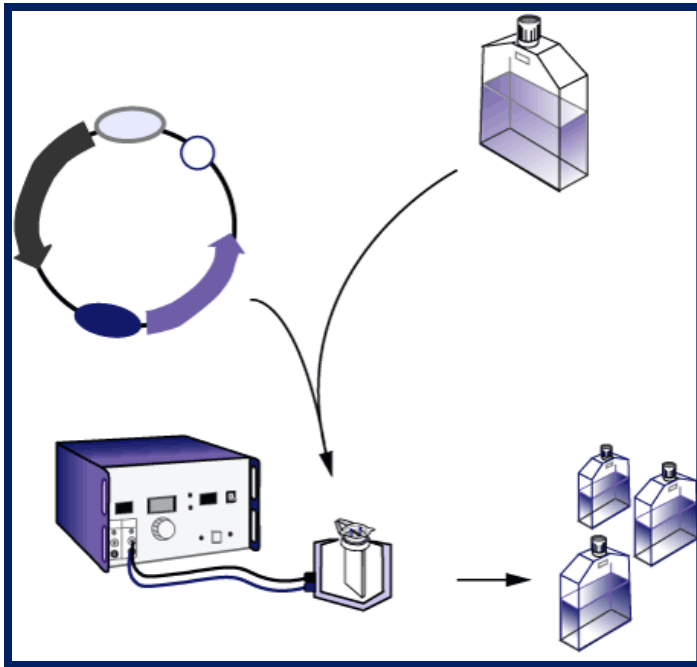
Μικροένεση, μικροέγχυση (microinjection)



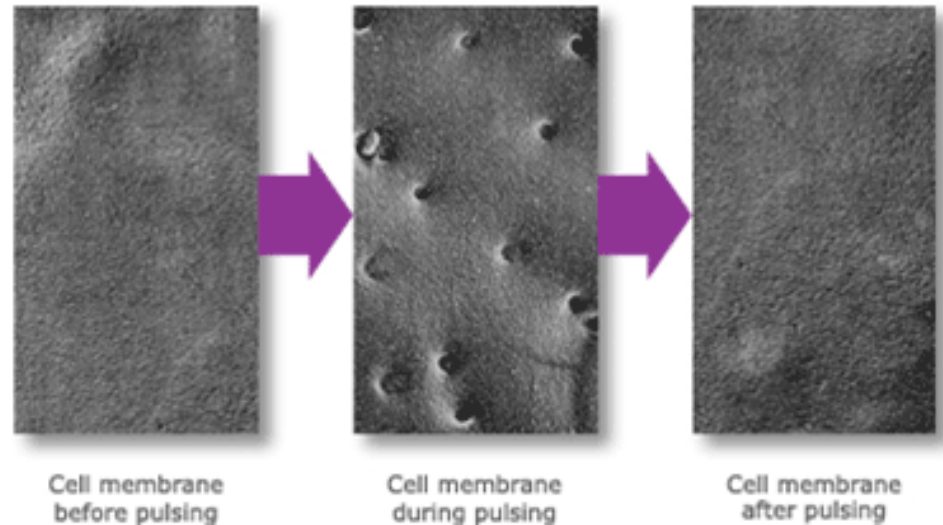
Γονιδιακό όπλο (gene gun, biolistics)



Ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)



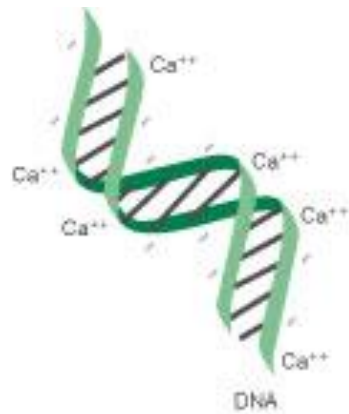
The phenomenon of electroporation



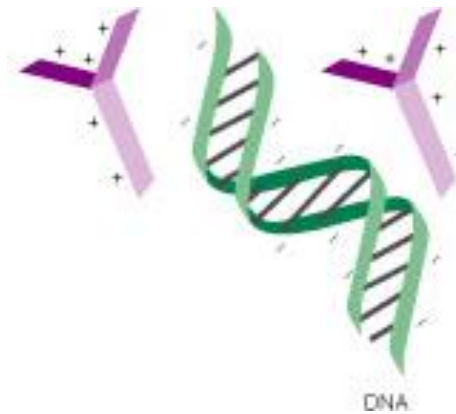
Αλλαγή συνθηκών ηλεκτροδιάτρησης (διάρκεια και ένταση ηλεκτρικού πεδίου) ανάλογα με τον τύπο κυττάρων

Χημικές μέθοδοι

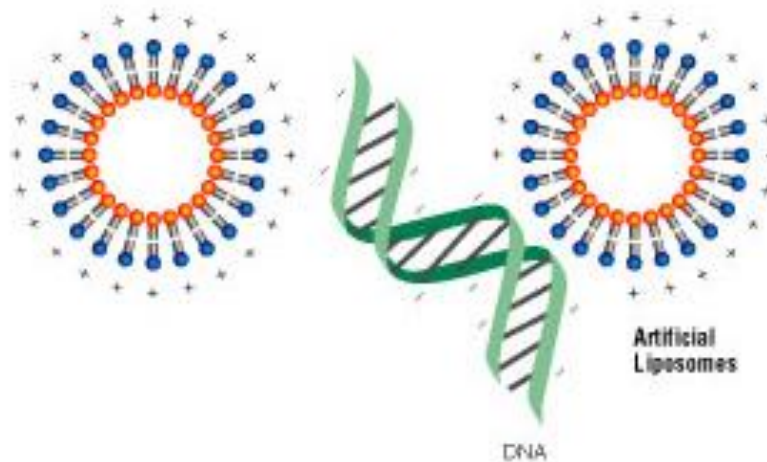
φωσφορικό ασβέστιο
(calcium phosphate)



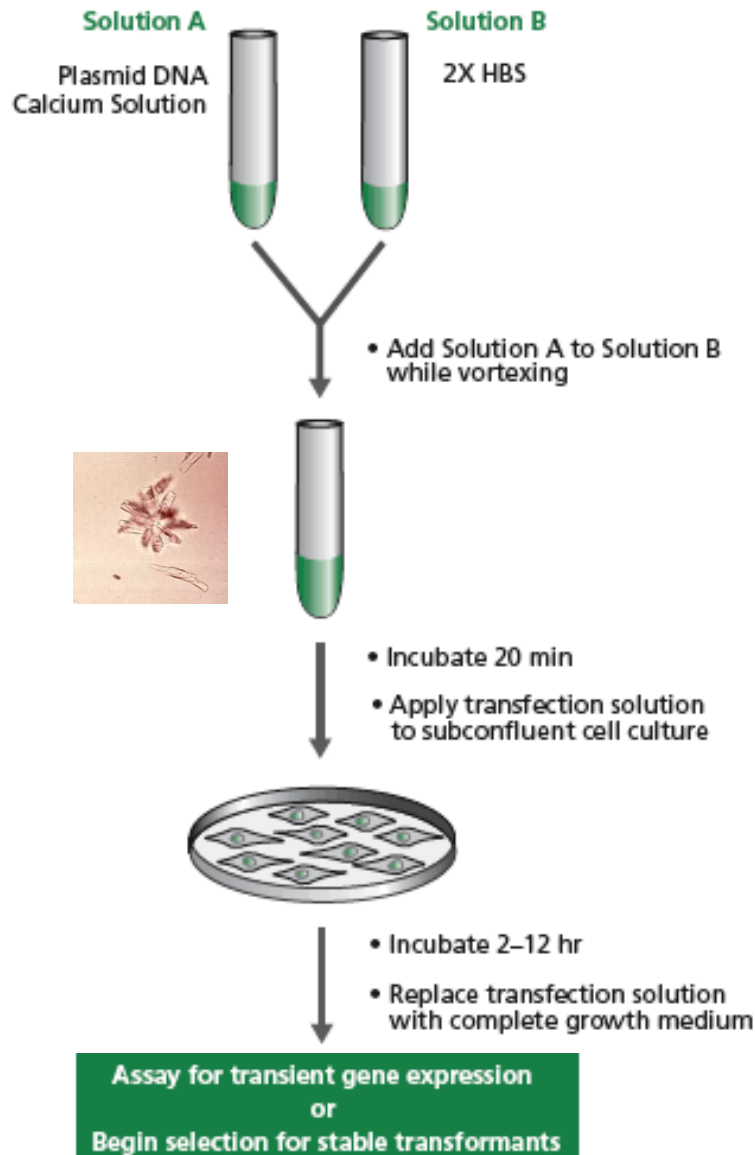
κατιονικό πολυμερές
DEAE-dextran



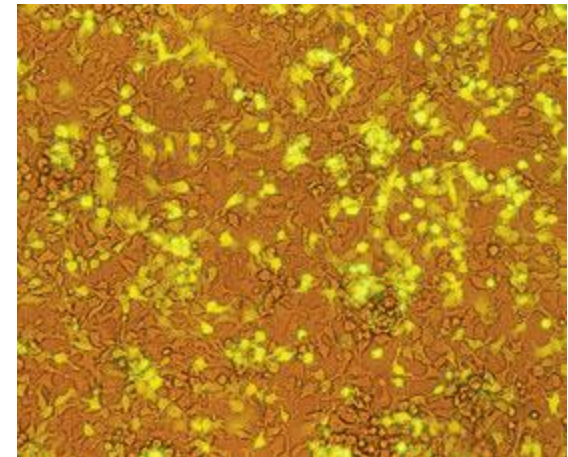
Κατιονικά λιπίδια, λιποσώματα



Διαμόλυνση κυττάρων με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου



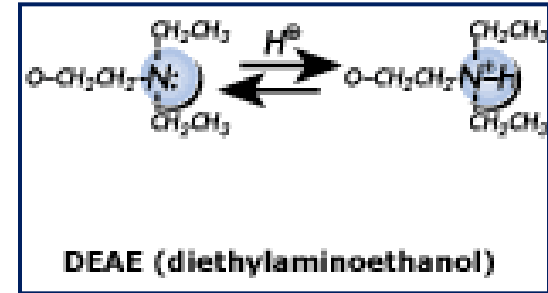
	Per 60mm Plate	Per 100mm Plate
Tube 1		
DNA	6-12μg	10-20μg
2M CaCl ₂	37μl	62μl
sterile, deionized water to a final volume of	300μl	500μl
Tube 2		
2X HBS	300μl	500μl



εύκολη εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων

Διαμόλυνση κυττάρων με DEAE-dextran

DEAE-dextran αλληλεπιδρά με το DNA και το σύμπλοκο συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη και εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης



Ανάμιξη DNA σε διάλυμα DEAE-dextran



Επώαση κυττάρων με το μείγμα
(30 λεπτά, 37°C)



Προσθήκη chloroquine σε μέσο καλλιέργειας
μαζί με το σύμπλοκο DNA /DEAE-Dextran
(2.5 ώρες, 37°C)

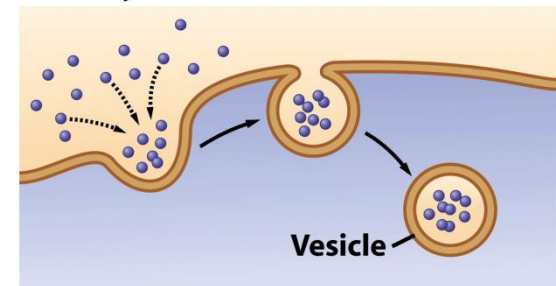


DMSO "shock" για 1 λεπτό



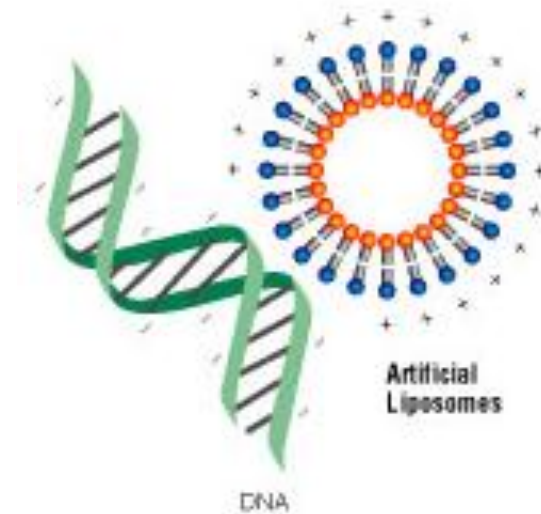
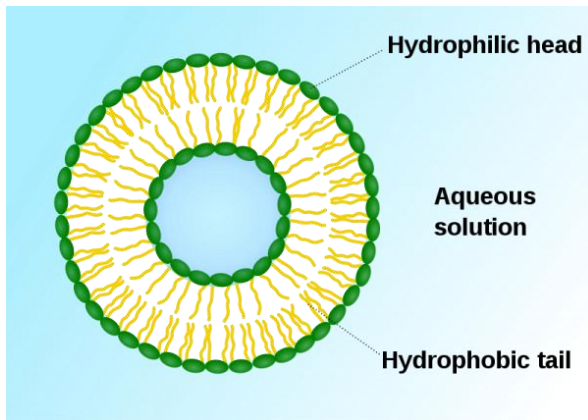
Ανανέωση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Endocytosis

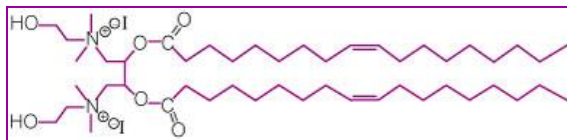
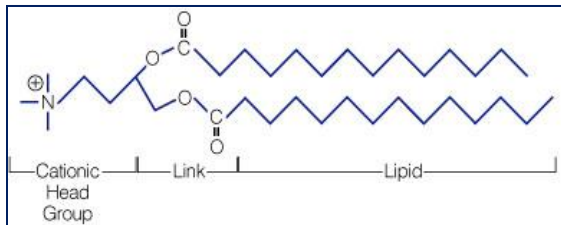


- αποτελεσματική διαμόλυνση προκαλεί θάνατο σε ποσοστό 25-75% των κυττάρων
- Βασικοί παράμετροι ποικιλότητας: αριθμός κυττάρων, συγκέντρωση του DNA, συγκέντρωση DEAE-Dextran

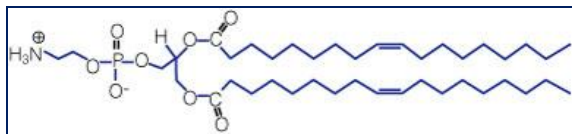
Λιποσώματα



Δομές συνθετικών κατιονικών λιπιδίων



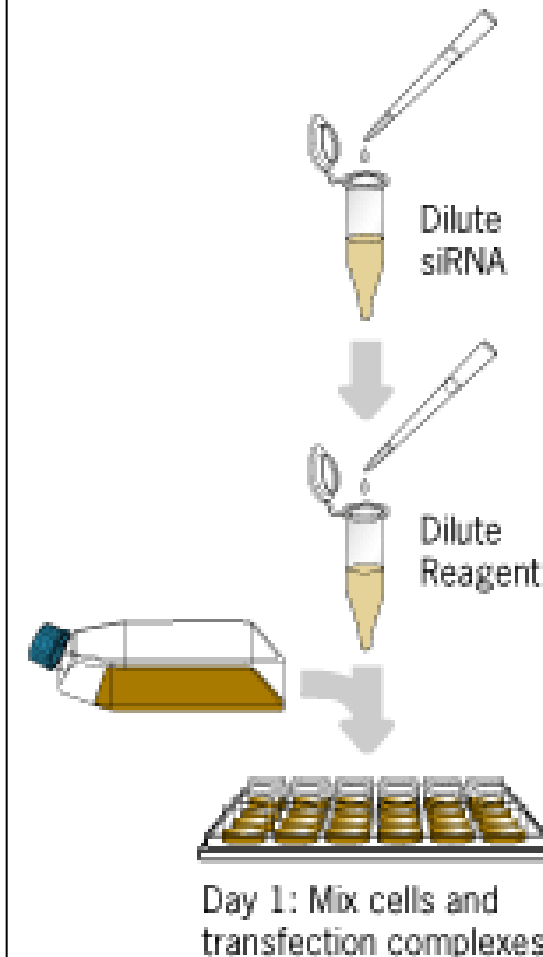
Δομή ουδέτερου λιπιδίου



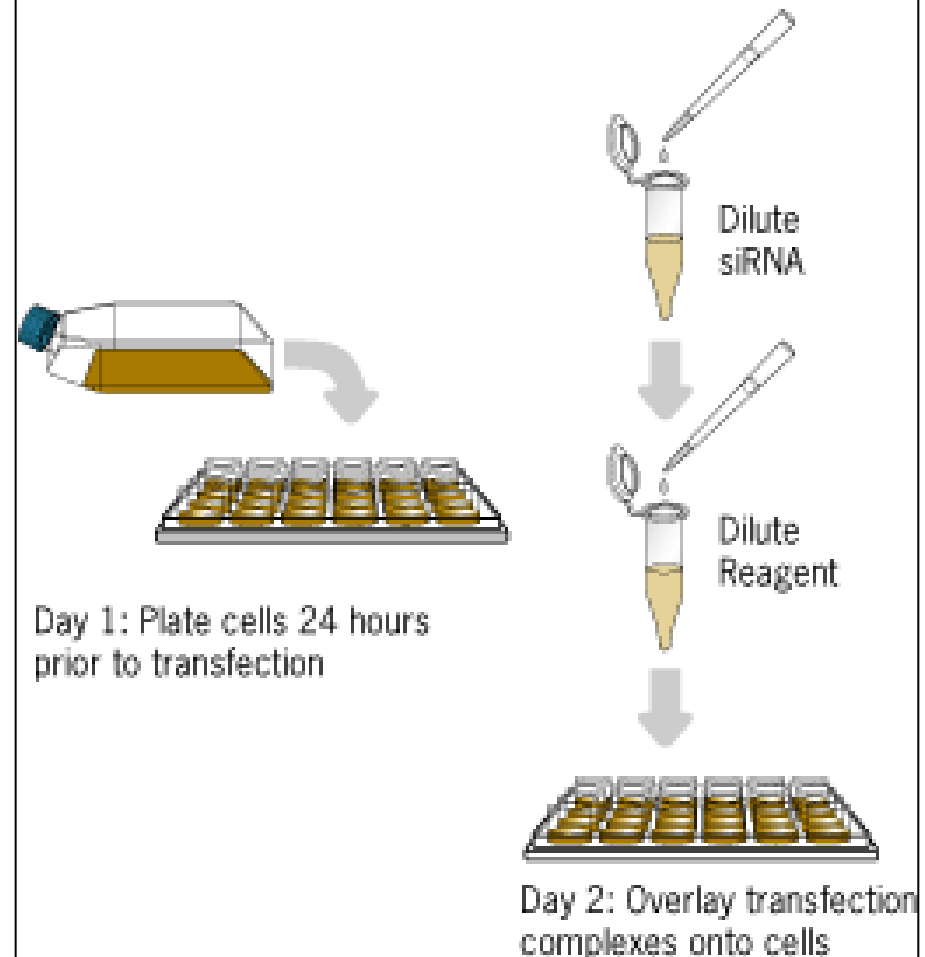
- χημικές και φυσικές ομοιότητες με βιολογικά λιπίδια
- αυθόρμητος σχηματισμός συμπλόκων με το DNA
- είσοδος στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης
- ? μεταφορά σε πυρήνα
- υψηλή αποτελεσματικότητα διαμόλυνσης ποικίλων κυτταρικών σειρών
- μεγάλο μέγεθος μεταφερόμενου γενετικού υλικού

Πρωτόκολλα διαμόλυνσης με λιποσώματα

1 Day Method



2 Day Method



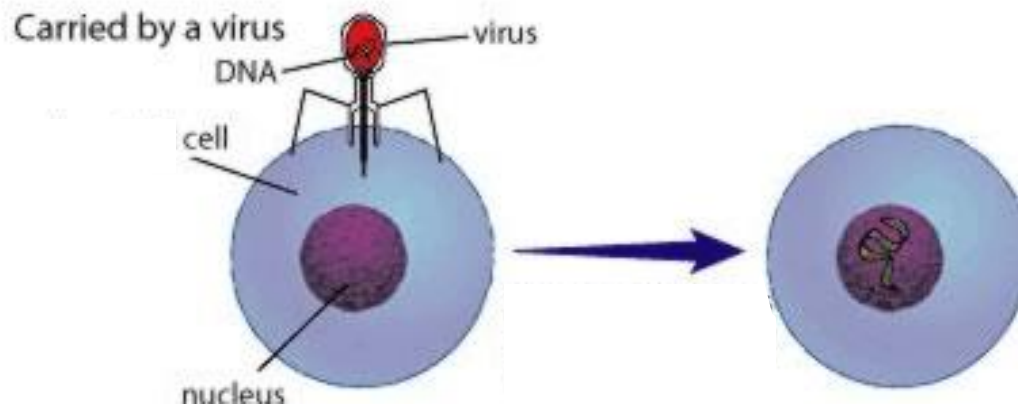
Μεταφορά γενετικού υλικού μέσω ιών (infection)

Retrovirus

lentivirus

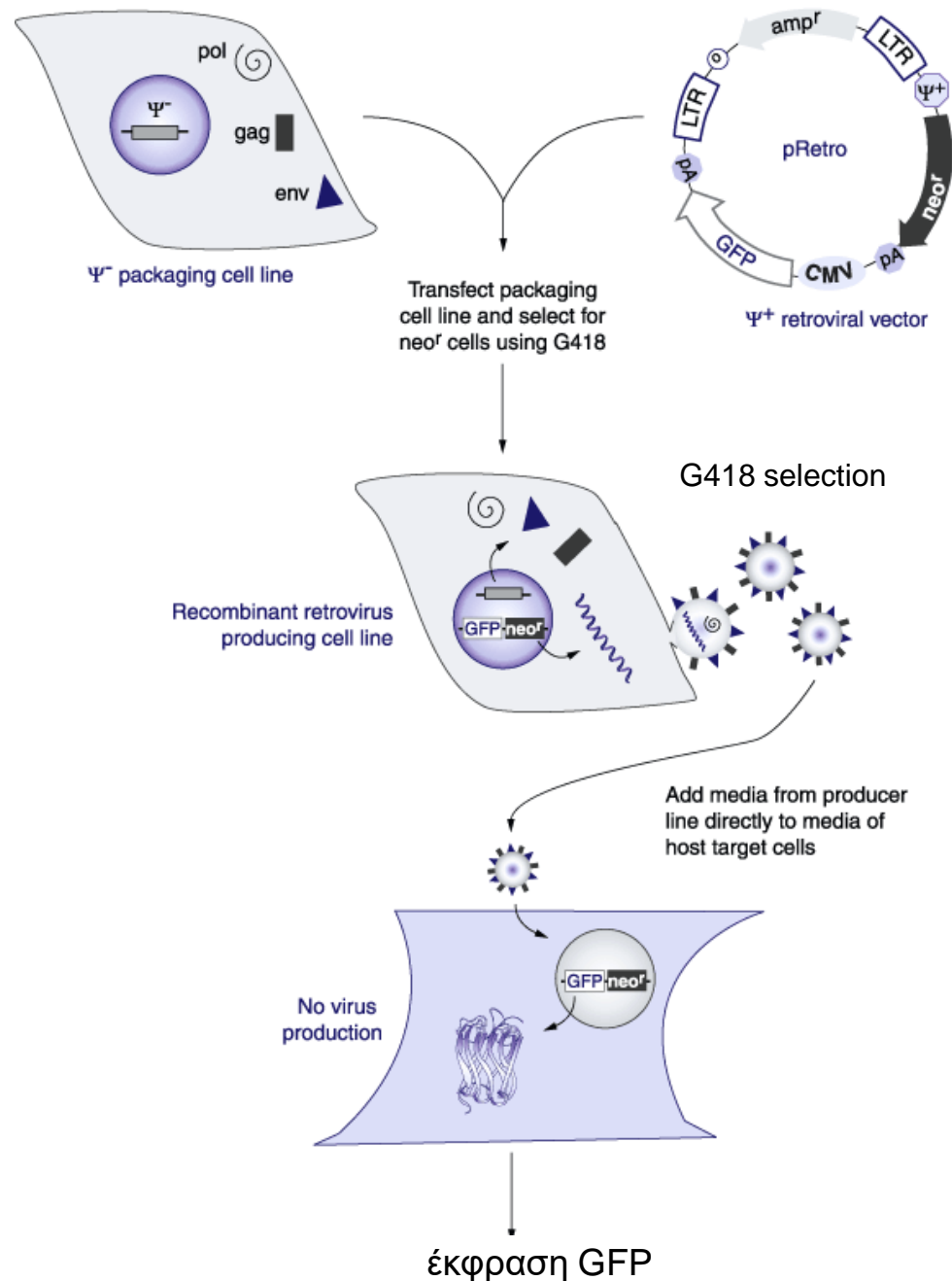
Adeno-virus

Adeno-associated virus



Retroviral infection

1. Δημιουργία ρετροϊικού φορέα
2. Δημιουργία packaging cell line (διαμόλυνση με πλασμίδια που φέρουν gag, pol, env)
3. Διαμόλυνση packaging cell line με τον ρετροϊικό φορέα (πχ με λιποσώματα) και επιλογή της παραγωγού κυτταρικής σειράς (producer cell line)
4. Μεταφορά μέσου καλλιέργειας της παραγωγού κυτταρικής σειράς σε κύτταρα-στόχους
5. Επιλογή κυττάρων με βάση έκφραση γονιδίων του ρετροϊικού φορέα

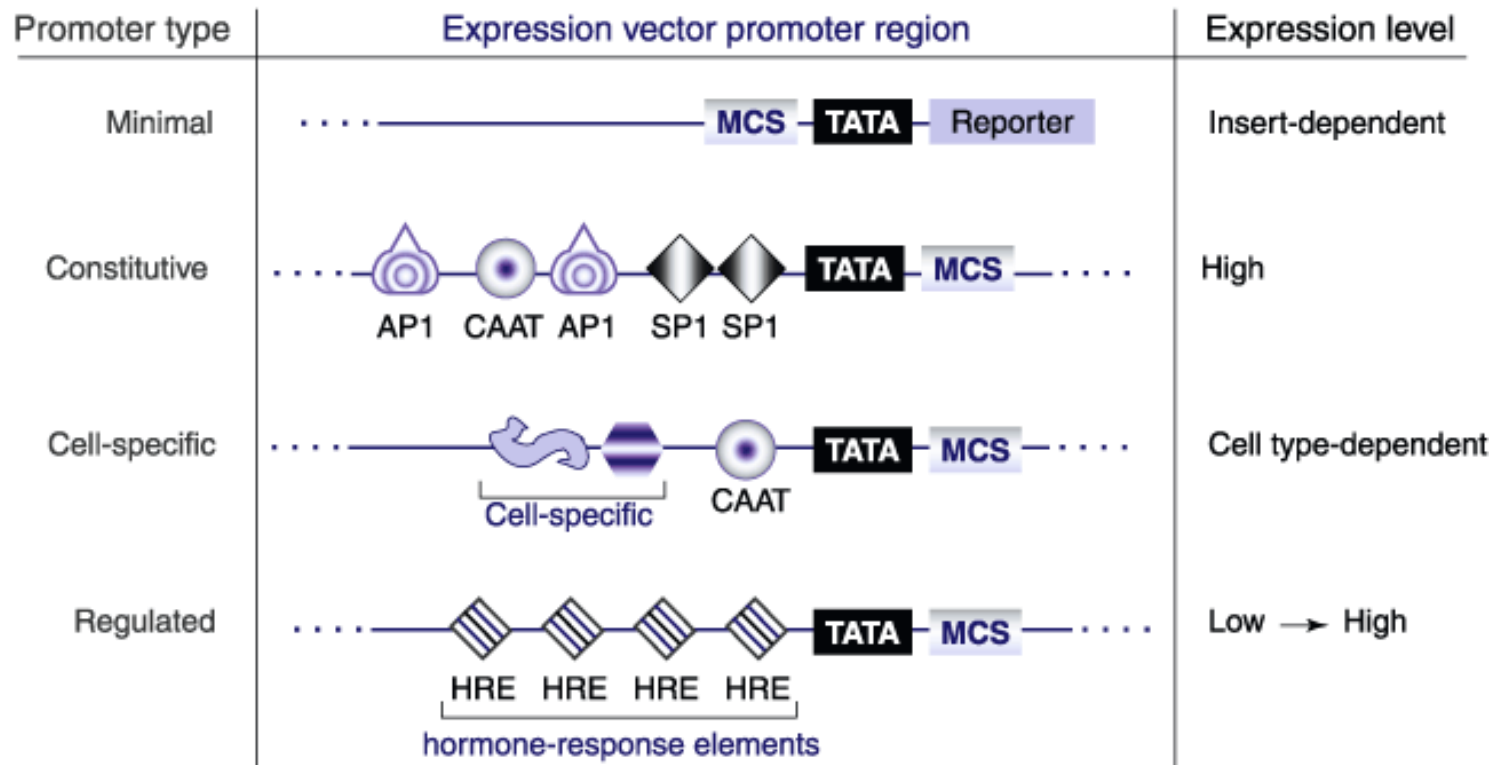


Γενετικό υλικό που χρησιμοποιείται σε πειράματα διαμόλυνσης

- Φορείς έκφρασης γονιδίων (gene expression vectors) πλασμίδια: γονίδια, ρυθμιστικές αλληλουχίες, γονίδια αναφοράς (reporter) και γονίδια επιλογής- μάρτυρες (marker)
- Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια
- Μονόκλωνο RNA (hammerhead ριβοένζυμα)
- Δίκλωνο RNA (dsRNA, shRNA, siRNA, miRNA) διαδικασία παρεμβολής RNA (RNAi, RNA interference)

Τύποι φορέων γονιδιακής έκφρασης

- ❖ **Minimal promoters** (μελέτη ρυθμιστικών αλληλουχιών π.χ. ενισχυτών)
- ❖ **Constitutive promoters** (συστατική έκφραση γονιδίου)
- ❖ **Cell-specific promoters** (έκφραση σε ειδικό τύπο κυττάρων)
- ❖ **Regulated promoters** (ρυθμιζόμενη έκφραση γονιδίων)



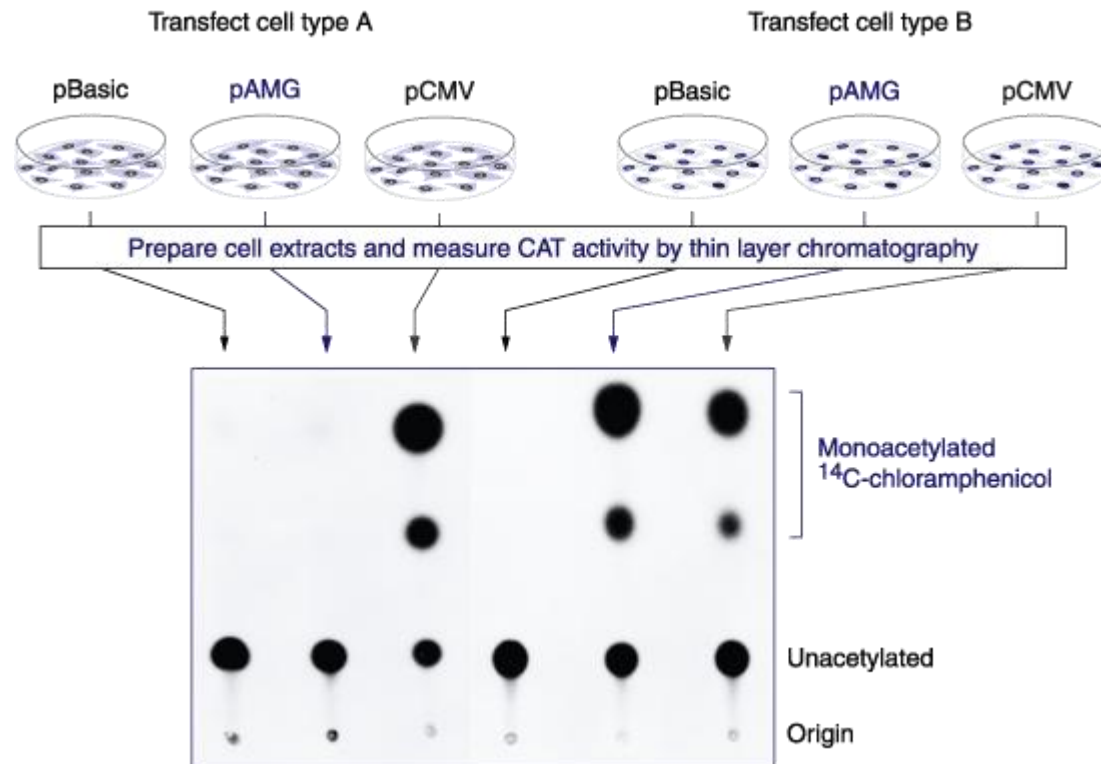
Γονίδια αναφοράς (reporter genes)

Η έκφραση του γονιδίου αναφοράς οδηγεί στη σύνθεση μιας εύκολα ανιχνεύσιμης πρωτεΐνης

- ❖ άμεση συσχέτιση μεταξύ των σταθερών επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης
 - ❖ τα γονίδια αναφοράς κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δεν εκφράζονται σε κύτταρα-στόχους
 - ❖ η δοκιμή ανίχνευσης της πρωτεΐνης-αναφοράς πρέπει να έχει μεγάλη ευαισθησία, δυνατότητα εύκολης αναπαραγωγής (οικονομική)
 - ❖ η δράση του γονιδίου αναφοράς δεν πρέπει να επεμβαίνει στις κυτταρικές λειτουργίες
-
- βακτηριακό ένζυμο chloramphenicol acetyl transferase (CAT)
 - γονίδιο λουσιφεράση (luciferase, luc)
 - βακτηριακό ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (b-gal, lacZ)
 - Green Fluorescent Protein (GFP)

Δοκιμή CAT

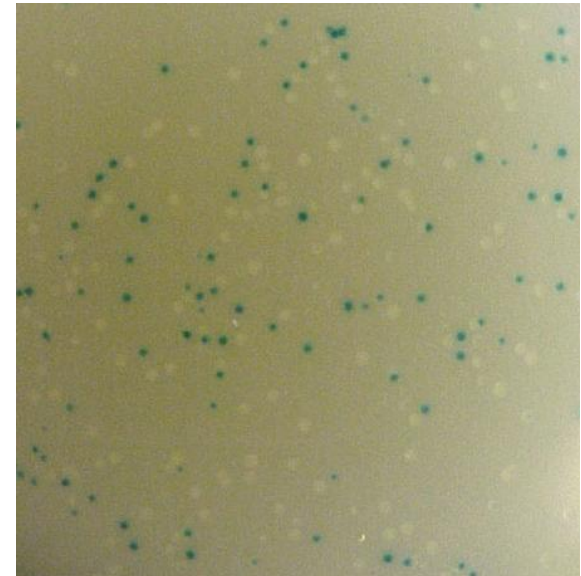
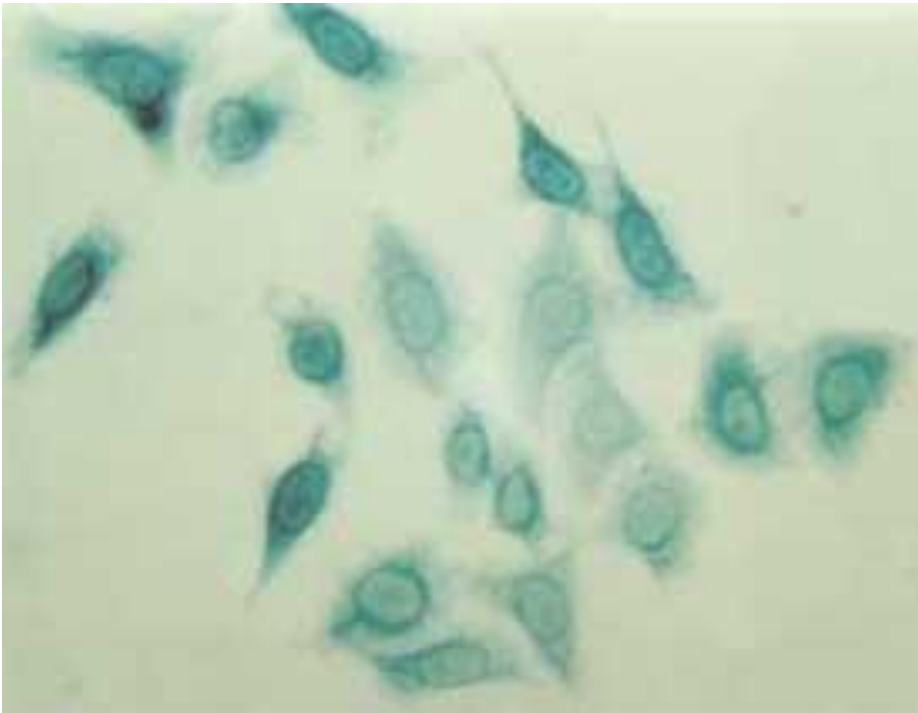
- Το ένζυμο CAT καταλύει την μεταφορά ακετυλιωμένων ομάδων από το ακετυλο-συνένζυμο A στο αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη
- Παρέχει προστασία σε βακτήρια γιατί απενεργοποιεί τη χλωραμφαινικόλη
- Χρήση ^{14}C - χλωραμφαινικόλης και διαμόλυνση κυττάρων με διαφορετικούς φορείς → ποσοτικοποίηση μονο-ακετυλιωμένης χλωραμφαινικόλης



β-γαλακτοσιδάση (b-galactosidase, b-gal)

Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων, επώαση με άχρωμη ONPG (υπόστρωμα b-gal) και μέτρηση φωτομετρικής απορρόφησης, π.χ. παρουσία ενεργότητας b-gal το ONPG υδρολύεται σε προϊόν κίτρινου χρώματος με επακόλουθη αύξηση της απορρόφησης

Ιστοκυτταροχημική μέθοδος: επώαση κυττάρων με X-gal και εκτίμηση παρουσίας μπλε ιζήματος (προϊόν πέψης του υποστρώματος από το b-gal)

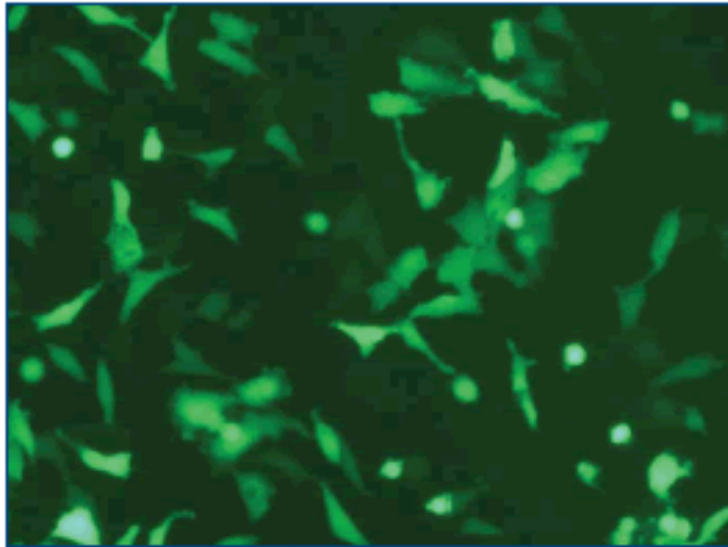


Λουσιφεράση (Luciferase, luc)

Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων και ανίχνευση της πρωτεΐνης-προϊόν του γονιδίου luc με ειδικό μηχάνημα (luminometer) (μέτρηση φωτός που εκπέμπεται από την οξείδωση ουσιών που καταλύει η λουσιφεράση)

Green Fluorescent Protein (GFP)

Μικροσκόπιο φθορισμού
Κυτταρομετρία ροής

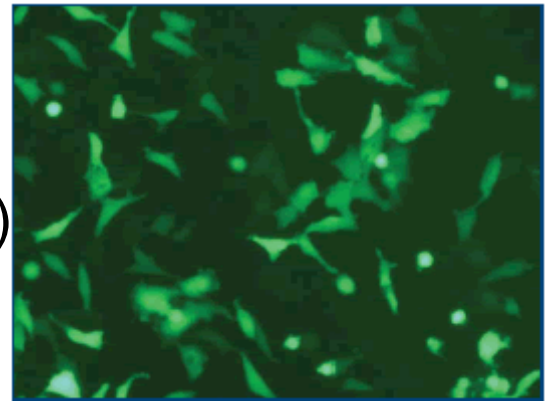
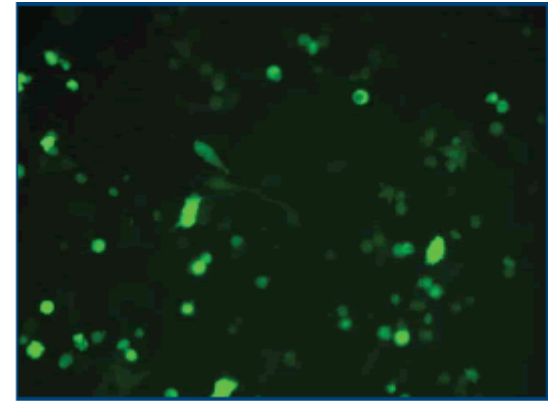


Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης

Χρήση των γονιδίων αναφοράς: ανίχνευση πρωτεϊνών - προϊόντων γονιδίων αναφοράς

Άμεσες δοκιμές για το γονίδιο-πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει (π.χ. ενζυμική δοκιμή)

Για πειράματα διαμόλυνσης που στοχεύουν σε απενεργοποίηση γονιδίων (μέσω siRNA, miRNA) η αποτελεσματικότητα εκτιμάται και με ανίχνευση των επιπέδων των mRNA-στόχων (RT-PCR) ή των επιπέδων των πρωτεϊνών-στόχων (western)

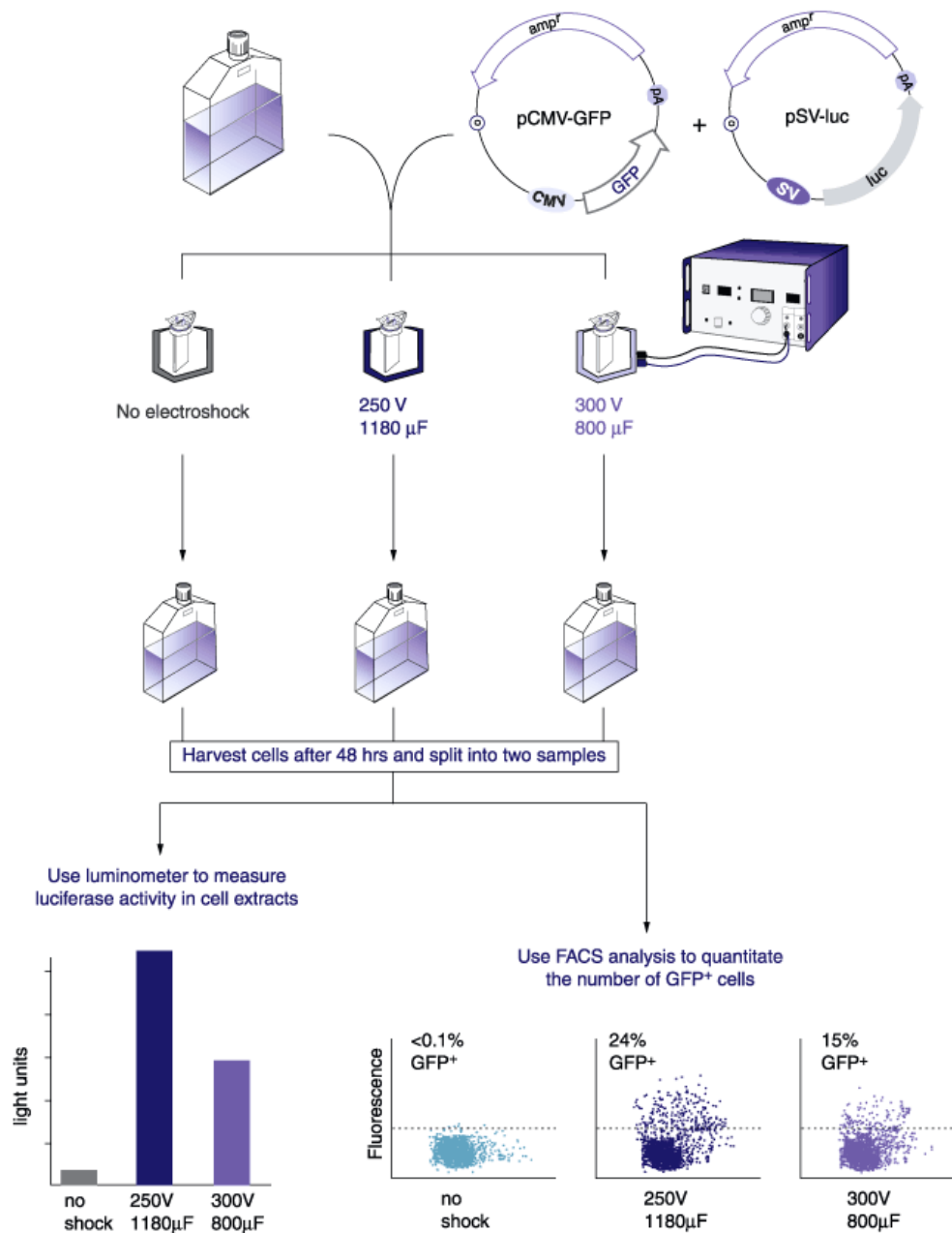


Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

Σχετικά μικρός χρόνος μεταξύ της διαμόλυνσης των κυττάρων με DNA και της συλλογής των κυττάρων

Ιδανικά για κάθε πείραμα πρέπει να ερευνηθεί ο βέλτιστος χρόνος συλλογής των κυττάρων (συχνά 24-72 ώρες). Ο χρόνος αυτός εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, το σκοπό της έρευνας και τα ειδικά χαρακτηριστικά της έκφρασης των μεταφερόμενων γονιδίων

Πρωτόκολλο παροδικής διαμόλυνσης



Μόνιμη διαμόλυνση κυττάρων

Στόχος = η απομόνωση και ο πολλαπλασιασμός μεμονωμένων κλώνων κυττάρων που περιέχουν το μεταφερόμενο DNA, το οποίο έχει ενσωματωθεί στο κυτταρικό γονιδίωμα

Απαιτείται η **θετική επιλογή των κυττάρων**, που βασίζεται στην παρουσία ενός γονιδίου μάρτυρα- επιλογής, πχ κωδικοποιεί ένα ένζυμο που δίνει ανθεκτικότητα σε κάποιο φάρμακο

Αρχικά ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την παροδική διαμόλυνση και τα κύτταρα διατηρούνται σε μη ειδικό μέσο για 1-2 μέρες

Ακολουθεί προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου επιλογής, που περιέχει το φάρμακο (τοξική ουσία) και διαρκεί 2–3 εβδομάδες, με συνεχείς αλλαγές στο θρεπτικό υλικό, μέχρι να εμφανιστούν διακριτές αποικίες (προϊόν μεμονωμένων κυττάρων που έχουν ενσωματώσει το γονίδιο)

Οι μεμονωμένες αποικίες επιλέγονται και απομονώνονται με ειδικούς κυλίνδρους και μετά από μεταχείριση με τρυψίνη μεταφέρονται σε νέα πιάτα για παραπέρα πολλαπλασιασμό παρουσία θρεπτικού μέσου επιλογής

Γονίδια επιλογής (marker genes)

Marker	Gene product	Selection method
neo	aminoglycoside phosphotransferase; <i>neo</i> gene from the bacterial transposon Tn5	select cells in G418 (0.1-1.0 mg/ml), an aminoglycoside that blocks protein synthesis
hyg	hygromycin-B-transferase; <i>hyg</i> gene from <i>E. coli</i>	select cells in Hygromycin-B (10-300 mg/ml), an aminocyclitol that inhibits protein synthesis
pac	puromycin-N-acetyl transferase; <i>pac</i> gene from <i>Streptomyces alboniger</i>	select cells in puromycin (0.5-5 mg/ml), an antibiotic that inhibits protein synthesis
zeo	bleomycin binding protein; a <i>zeo</i> gene is located on the bacterial transposon Tn5	select cells in bleomycin or Zeo (50-500 mg/ml), an antibiotic that binds DNA and blocks RNA synthesis
gpt	xanthine-guanine phosphoribosyltransferase; <i>gpt</i> gene isolated from <i>E. coli</i>	select cells in guanine-deficient media that contains inhibitors of de novo GMP synthesis and Xanthine; this selects for <i>gpt</i> ⁺ cells that can synthesize guanine from xanthine

Cell line	Specie	Tissue	Culture medium	G418 μ g/ml
HeLa	Human	Uterus	DMEM	200-800
293	Human	Kidney	DMEM	400-1000
B16	Mouse	Melanoma	RPMI	400-1000
CHO	Hamster	Ovary	Ham's	200-400

Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης

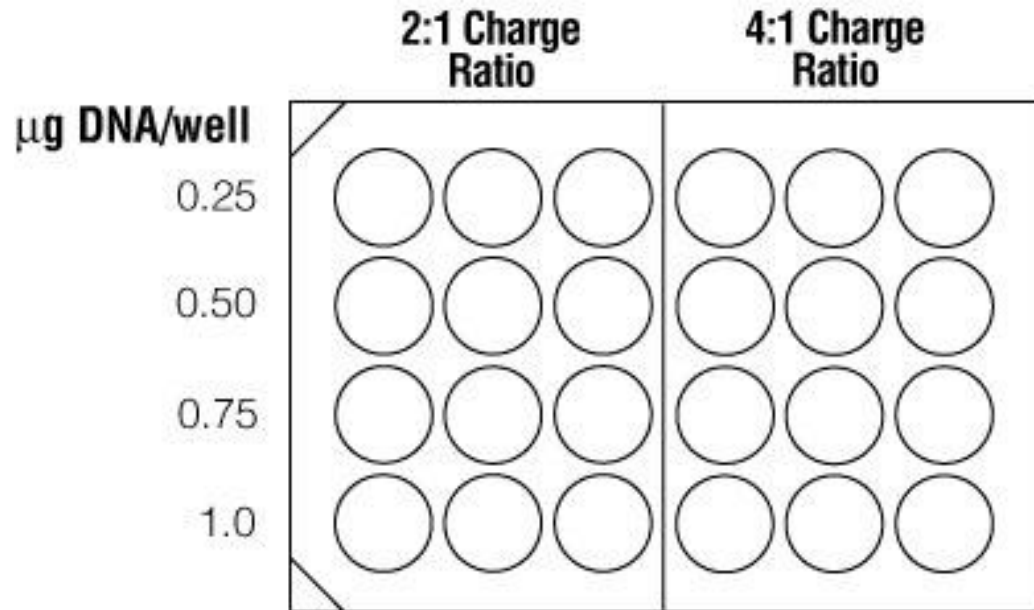
- Υγεία κυττάρων
- Μόλυνση κυτταρικής καλλιέργειας
- Βαθμός κάλυψης του πιάτου καλλιέργειας (40-60%)
- Αριθμός περασμάτων κυττάρων
- Ποσότητα και ποιότητα του DNA

Η χρήση οποιουδήποτε αντιδραστηρίου ή μεθόδου διαμόλυνσης προκαλεί και κάποιο ποσοστό κυτταρικού θανάτου

Βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας διαμόλυνσης

- αναλογία αντιδραστηρίου διαμόλυνσης (λιποσώματα) προς DNA
- η ποσότητα του μεταφερόμενου νουκλεϊκού οξέος
- ο χρόνος επώασης των κυττάρων με το αντιδραστήριο διαμόλυνσης
- παρουσία ή απουσία ορού

Σχεδιασμός πειράματος για την εύρεση των καλύτερων συνθηκών διαμόλυνσης με λιποσώματα



Χρήση των γονιδίων αναφοράς για τον καθορισμό των άριστων συνθηκών (έκφραση του μεταφερόμενου DNA σε συνδυασμό με μειωμένο κυτταρικό θάνατο)

Διαμόλυνση κυττάρων με siRNA ή miRNA

