

Библиотеки генов

Берем тотальную ДНК и всю режем ее рестриктазой. Получаем кучу фрагментов на фореze. Можно отобрать из них по метке те что близки по массе к нужному. Потом все проклонировать, рассадить – и потом сделать блот по колониям (отпечатывают колонию на мембрану и заливают зондом – можно понять какая колония нужна).

Библиотека - набор колоний, в которые заклонированы все гены (часть) данного организма по кусочкам (в одной колонии по фрагменту).

Резать рестриктазами не очень хорошо – большой разброс размеров (маленькие не несут гена, большие плохо размножаются в плазмиде). Можно щепить случайно-статистически. Удобно еще тем, что получающиеся фрагменты перекрываются. Тогда схватив ген за один кусок (т.е. имея зонд только к одному участку гена) можно делая зонды на его края найти весь ген, собрав его по кусочкам. Расщеплять можно ультразвуком, еще можно взять две неспецифические рестриктазы (с короткими сайтами) и щепить в условиях не исчерпывающих – т.е. когда не по всем сайтам будет разрезано (низкая концентрации рестриктаз).

Сколько нужно клонов чтобы быть уверенным что библиотека полная?

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - l/L)}$$

N – объем библиотеки, l – средний размер фрагмента, L – длина генома, P – вероятность обнаружить данный ген в библи.

Для человека при мегабазных размерах фрагментов объем библиотеки должен быть ~15000...

В плазмиду так не вставишь – используют космиды или искусственные дрожжевые хромосомы. Или бактериальные хромосомы. Еще векторы на основе бактериофага лямбда.

Бактериофаг лямбда

Живет по двум путям – литический путь – не встраивается в хромосому, дико размножается и всех убивает
лизогенный путь – может встроится в днк и ждать индукции

ДНК фага лямбда – линейное днк с липкими концами в 12 нуклеотидов (комплиментарны друг другу – *coc*-сайты). Длина 48 килобаз. На литическом пути живет в виде циклического днк. Ранняя репликация – стандартным путем, поздняя – по катящемуся кольцу.

Чем он хорош для векторов? Во-первых, фаговые частицы, содержащие упакованную ДНК, способны проходить литический цикл развития внутри бактериальных клеток и, следовательно, образовывать стерильные пятна (бляшки) на газоне бактерий. Такие бляшки содержат в концентрированном виде как сами фаговые частицы с упакованными в них рекомбинантными молекулами ДНК, так и все продукты метаболизма зараженных бактериальных клеток, включая белки и ферменты, которые появляются в результате экспрессии клонированных бактериальных генов. Каждая бляшка возникает вследствие развития индивидуальной фаговой частицы, содержащей рекомбинантную ДНК только одного типа, а, следовательно, все фаговые частицы одной бляшки (около 10^{10}) представляют собой клон идентичных фаговых частиц. Все это позволяет легко обнаруживать в фаговых бляшках искомые ферментативные активности или последовательности нуклеотидов и идентифицировать клонированные последовательности ДНК.

Во-вторых, по краям у него гены нужные для литического пути, а в центре 40 килобаз, ответственных за лизогенный путь. Успешная его жизнь зависит от правильной длинны. Вставить можно всего – 2-3 килобазы. Но лучше делать вектор замещения – от 9-23 килобаз можно вставить вместо не очень важных генов посередине. При инфицировании бактерий только фаговой ДНК эффективность в 10^4 раз ниже чем при инфицировании фаговыми частицами. Хорошо бы научиться упаковывать ДНК в капсид *in vitro*.

Упаковка фага лямбда *in vivo*: Капсидный белок – ген *E* – собирается в капсулы без всякого ДНК сами по себе. Длинная ДНК содержащая много повторов генома фага влезает в капсид, потом эндонуклеаза (ген *A*) режет по сайтам рестрикции, образуя липкие концы. Еще некоторое число белков достраивающих капсид.

Как это делают *in vitro*: Берут два штамма *ecoli* с фагом в лизогенной стадии. В одном не работает ген *E* – нет капсида. Он экспрессирует все белки сборки кроме собственно капсидного. В другом есть рабочий капсидный ген, но нет другого гена *A* (эндонуклеазы). Поэтому эти колонии сами по себе живут без проблем – не лизируясь. Если смешать белковые лизаты этих двух штаммов и нужной ДНК то *in vitro* пройдет сборка фага.

Устройство вектора:

левое плечо __ полилинкер __ середина __ полилинкер __ правое плечо

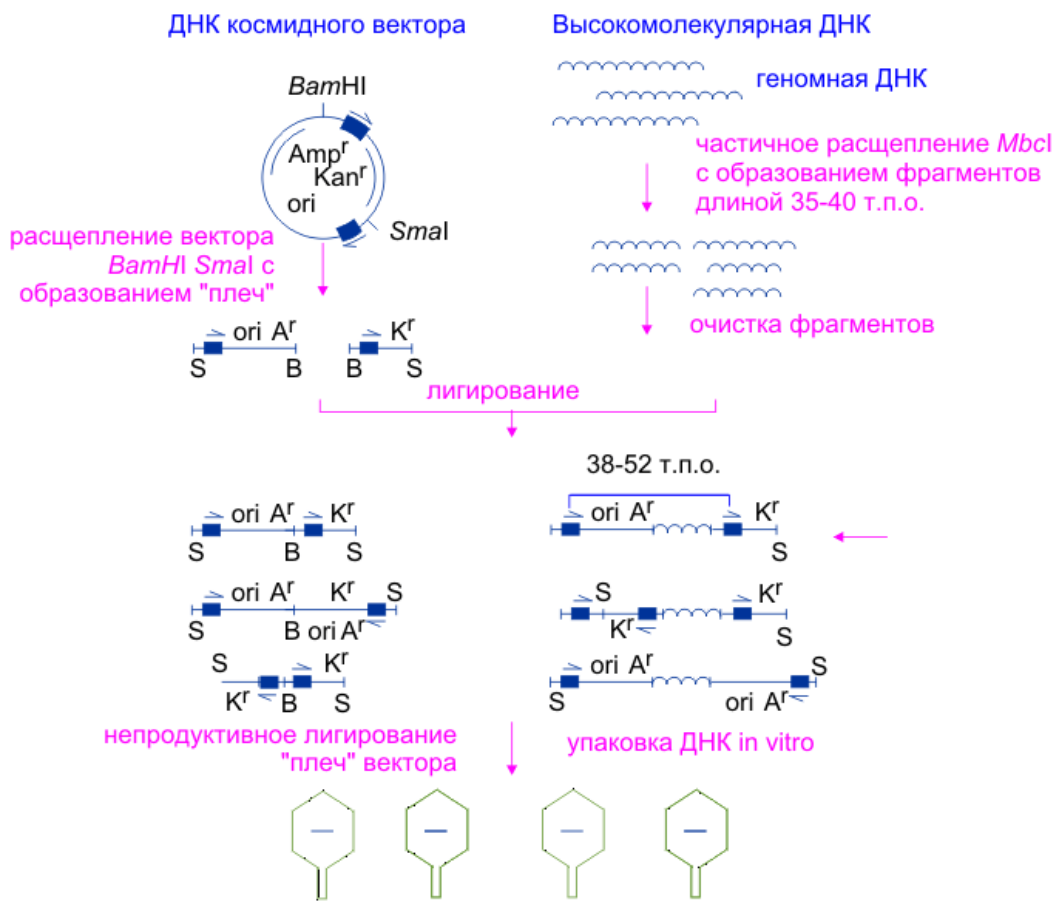
в плечах нужные гены, в середине – нет. Режем двумя рестриктазами и получаем два плеча с одинаковыми концами и серединку с другими концами – она уже не прилипнет. От мелких кусочков между сайтами можно избавиться осадив длинные куски изопропанолом. Далее правильными рестриктазами режем геном, снимаем фосфаты с 5' и спокойно лигируем.

Еще неплохо убрать фракцию коротких кусков ДНК из нарезанного генома до лигирования.

Приятно то что ДНК не получившая обоих плечей не будет собираться в частицу. Кроме того слишком длинные или слишком короткие ДНК тоже скорее всего не будут собираться.

Чтобы убрать те фаги у которых сохранилась середина используют то что фаг *P* ингибирует лямбду если у него есть середина. Поэтому используют лизогенные по фагу *P* штаммы *ecoli*. Те фаги что сохранили середину расти не будут.

Космиды



Космиды представляют собой небольшие плазмиды, в которые *in vitro* введены *cos*-сайты ДНК фага лямбда. В ДНК нормальных фаговых частиц *cos*-сайты расположены на концах молекул, они разделяют мономеры фаговой ДНК в конкатемерах, объединяющих несколько соединенных "голова к хвосту" мономеров, которые являются предшественниками зрелых фаговых ДНК перед упаковкой в фаговые частицы. В таких конкатемерах соседние *cos*-сайты располагаются на расстоянии 35-45 т.п.о. друг от друга и заключают между собой весь фаговый геном. В процессе упаковки *cos*-сайты узнаются компонентами ферментативной системы и по ним происходит последовательное отрезание упакованной в фаговую частицу лямбда-ДНК от остальной неупакованной ДНК конкатемера.

Наличие *cos*-сайтов в ДНК является единственным необходимым условием упаковываемости ДНК в фаговые частицы. Это означает, что последовательность нуклеотидов лямбда-ДНК, расположенная между двумя *cos*-сайтами, которая заключает в себе весь фаговый геном (35-45 т.п.о.), может быть замещена *in vitro* на аналогичный по длине фрагмент чужеродной ДНК и упакована в фаговые частицы. Такая искусственная фаговая частица оказывается нежизнеспособной. Однако после адсорбции химерной фаговой частицы на поверхности бактериальной клетки заключенная в ней ДНК проникает (вводится фаговой частицей) внутрь бактерии и начинает автономно реплицироваться как плазмида, размер которой составляет 30-40 т.п.о. Поскольку такая плазмида (космида) содержит в своем составе селективируемые маркеры в виде генов устойчивости к антибиотикам, ее поддерживают в бактериальных клетках путем выращивания бактерий на среде с соответствующими антибиотиками. Несмотря на то, что емкость космидных векторов значительно выше фаговых, эффективность клонирования в космидах ниже, хотя и достигает в ряде случаев 105-106 колоний на 1 мкг клонируемой ДНК. При такой эффективности упаковки требуется всего лишь 2-4 мкг клонируемой ДНК для получения полной клонотекы большинства эукариотических геномов.

Стадия упаковки ДНК космид в фаговые частицы используется лишь для облегчения процесса введения рекомбинантных ДНК большого размера внутрь бактериальных клеток. Такой процесс имитирует проникновение фаговой хромосомы в бактерии во время фаговой инфекции. В случае космид сходство между их проникновением в бактериальные клетки и фаговой инфекцией на этом заканчивается. Однако сходство является более глубоким в случае векторов, называемых фазмидами. Фазмиды представляют собой векторные молекулы ДНК, которые содержат в себе генетические элементы плазмид и хромосом бактериофагов. Они могут обладать емкостью в отношении клонируемой ДНК, характерной для лямбда-векторов, и существовать в определенных условиях в бактериальных клетках в виде плазмиды или же упаковываться в фаговые частицы *in vivo* при изменении этих условий.

Недостатки:

1. Скринировать фаговые бляшки легче, чем бактериальные колонии;
2. Фаги легче хранить и амплифицировать.

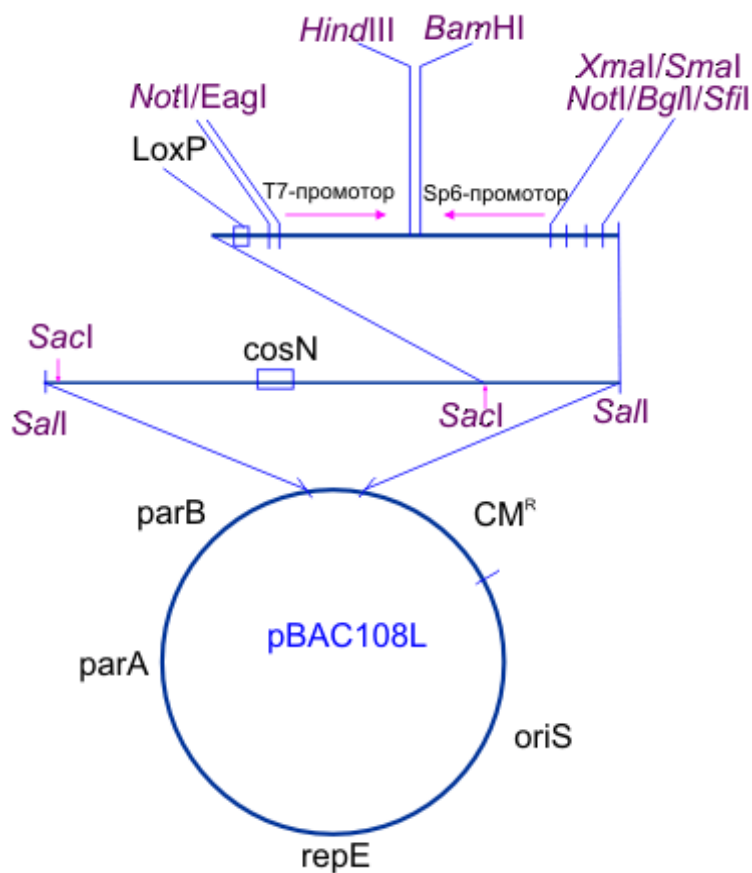
Аmplификация библиотек

- 1. Начинать с более, чем полной библиотеки;
- 2. Рост при низкой плотности блюшек (колоний), иначе возможна рекомбинация;
- 3. Не амплифицировать второй раз;
- 4. Не амплифицировать в жидкой среде;
- 5. Лучше сделать новую библиотеку, чем использовать амплифицированную

Системы для клонирования больших вставок

Космида	35-45
BAC	100-300
PAC	100
YAC	100-1000

BAC - bacterial artificial chromosome



В векторных системах BAC используется ДНК хорошо изученного полового фактора (F-фактора) *E. coli* - гигантской плазмиды мужских бактериальных клеток, которые являются донорами бактериальной ДНК при конъюгации с женскими клетками.

Типичный F-фактор содержит гены **oriS** , **repE** , **parA** и **parB**. Гены *oriS* и *repE* обеспечивают однонаправленную репликацию F- фактора, а гены *parA* и *parB* поддерживают число его копий на уровне одной-двух на бактериальную клетку.

Классический вектор BAC (pBAC108L) включает в себя все эти гены, а также ген устойчивости к хлорамфениколу, используемый в качестве селективируемого маркера. Вектор содержит также сегмент ДНК, по которому производится клонирование. В этом сегменте имеется типичный полилинкер, а также два уникальных сайта рестрикции *HindIII* и *BamHI* , фланкированные промоторами T7- и Sp6- РНК-полимераз. Эти промоторы могут быть использованы для получения РНК-зондов, необходимых для осуществления "прогулок по хромосомам" , а также прямого секвенирования клонированной ДНК в месте стыковки с вектором. Кроме того, во фрагменте имеется сайт *cosN* , обеспечивающий расщепление вектора со вставкой в уникальном месте с помощью терминазы фага лямбда без применения ферментов

рестрикции. Этот фермент используется бактериофагом для специфического разрезания конкатемеров своей хромосомы при упаковке в фаговые частицы. Для той же цели может быть применен и сайт *loxP* бактериофага P1 , который является мишенью для фаговой эндонуклеазы Cre . Эти сайты используются для получения специфических концов клонированной ДНК с целью ее дальнейшего рестрикционного картирования путем введения концевой метки с последующим неполным расщеплением с помощью рестриктаз и электрофоретическим разделением образовавшихся фрагментов.

BAC-векторы позволяют клонировать фрагменты ДНК длиной до 300 т.п.о. и выше. Рекомбинантные молекулы вводятся в клетки *E. coli* с помощью электропорации, причем эффективность образования трансформантов в 10-100 раз выше, чем при обычной трансформации сферопластов дрожжей векторами семейства YAC . Это позволяет уменьшить исходное количество ДНК, необходимое для конструирования репрезентативных клонотек генов. При скрининге таких клонотек используются традиционные методы работы с бактериальными колониями.

Поскольку рекомбинантные BAC-векторы существуют в бактериальных клетках в виде одной копии, исключаются совместное клонирование в одной клетке разных фрагментов ДНК и образование химерных молекул, что весьма существенно для физического картирования больших геномов методами "снизу вверх" .

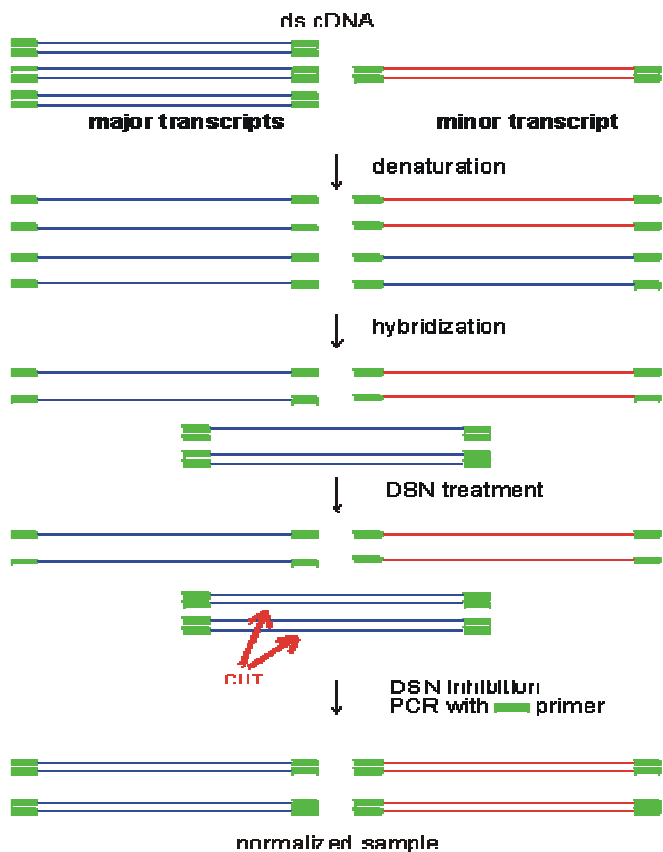
Весьма существенным свойством системы клонирования, основанной на векторах семейства BAC, является ее генетическая стабильность. Исходная структура клонированных фрагментов ДНК в пределах точности использованных методов сохраняется в таких векторах даже после 100 серийных пересевов бактериальных клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК.

Векторы PAC

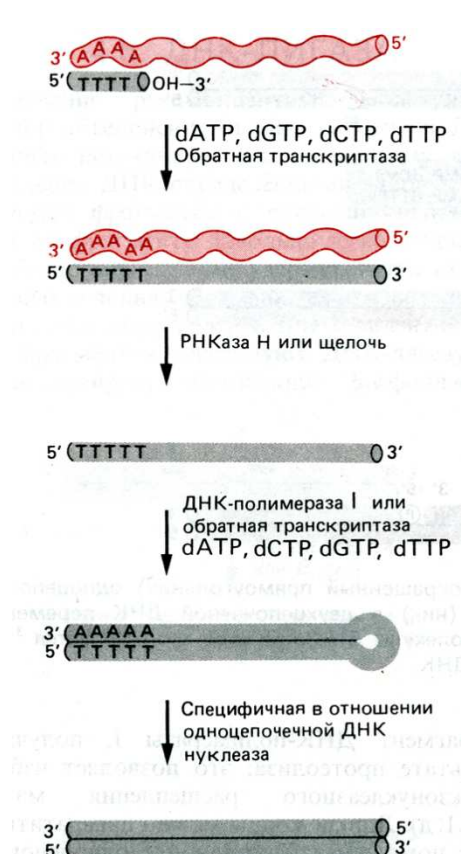
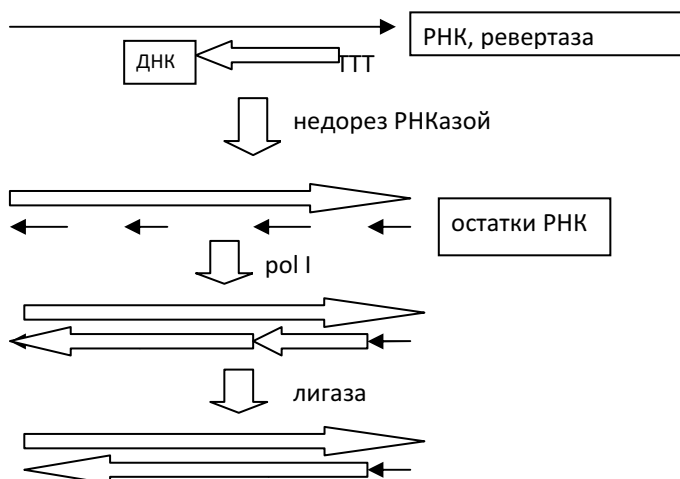
Векторы семейства PAC (P1-derived artificial chromosome) содержат гены бактериофага P1, обеспечивающие репликацию фаговой хромосомы в зараженных бактериальных клетках. Рекомбинантные ДНК на их основе (размер вставки 150-200 т.п.о.) вводятся в бактериальные клетки с помощью электропорации.

STS – sequence target site – пара праймеров с которых можно амплифицировать данный уникальный фрагмент генома – это маркер.

Библиотеки к-ДНК

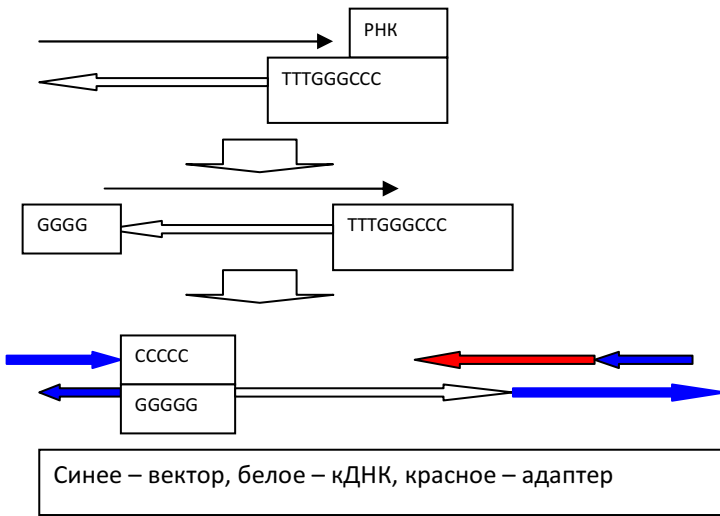


Библиотеки ДНК соответствующих мРНК. Делают ревертазами. Проблема - разница в уровнях экспрессии генов в клетке. Нормализация кДНК приводит к выравниванию концентраций транскриптов в образце тотальной кДНК. Использование нормализованных библиотек позволяет значительно повысить эффективность поиска редких генов. Метод нормализации кДНК использует уникальные свойства термостабильной дуплекс-специфической нуклеазы камчатского краба (DSN), которая гидролизует дцДНК и ДНК-РНК гибриды и почти не гидролизует оцДНК или РНК. Метод основан на более высокой скорости ренатурации (образования дцДНК) многокопийной кДНК по сравнению с низкокопийной. Получают кДНК так: используют неспецифический праймер ТТТТТТ – комплементарный поли-А концу. Ревертаза синтезирует одну цепь кДНК – получается РНК-ДНК гибрид. Далее обрабатывают РНКазой Н (щеплет РНК только в гетеродуплексе) или щелочью – в итоге остается только однонитевая кДНК. Далее либо ДНК-полимеразой I или той же ревертазой достраивают вторую цепь. В качестве праймера используется 3'концевая шпилька на конце однонитевой кДНК – она точно есть. Чтоб убрать шпильку берут нуклеазу S1 – режет одноцепочечную НК – убирает шпильку. Недостаток метода – исчезает кусок 5'-конца. Но так делали раньше, еще делают так: РНКазой Н режут не до конца – недорезанные остатки гетеродуплекса используются как праймеры (типа фрагментов Оказаки) для полимеразы I которая выщепляет ник-трансляцией лишние куски РНК. Еще доливают ДНК-лигазу для зашивания кусков фрагментов.



С кДНК библиотеками легче чем с генами – они короче – можно брать любые векторы!!

Но нет липких концов. Для этого к ним лигируют линкеры – двухцепочечные короткие куски ДНК содержащие сайт рестрикции и еще немного для посадки рестриктазы. Их берут в избытке чтоб наверняка, потом режут рестриктазой и получают липкие концы.. Но беда в том, что рестриктаза может порезать кДНК посередине. Чтоб избежать этого сперва обрабатывают кДНК метилазой метилирующей по тому сайту который потом будут лигировать в линкере.



Но использование рестриктаз все равно несколько портит кДНК. Поэтому лучше обойтись без них. Чтоб избежать рестриктаз делают так: режут вектор с получением 3'-выступающих концов, потом неспецифически присоединяют поли-С хвост. Если надо то потом можно поли-С хвост откусить другой рестриктазой с одного из хвостов вектора поли-С. При ревертировании РНК к праймеру поли-Т присоединяют еще хвост – GGGCCC. После ревертирования на 3' хвост одноцепочечной кДНК неспецифически вешают поли-Г. Потом отжгают полученную кДНК на поли-С хвост вектора. Для того чтобы второй хвост кДНК тоже прилип к вектору используют адаптор – одноцепочечная ДНК одним хвостом комплементарная GGGCCC другим – липкому хвосту вектора.

Если надо амплифицировать библиотеку кДНК, то можно ввести специфические праймеры прикрученные к поли-А праймеру и к поли-С комплементарному поли-Г который вешают на 3'-конец одноцепочечной кДНК. При этом ревертаза сразу же доделывает этот 3' конец до комплементарного.

Скрининг библиотеки

Колонии отпечатывают на нитроцеллюлозную мембрану, лизируют клетки, фиксируют ДНК (щелочью, щелочь при этом лизируют клетки) промывают и отжигают зонд.

Можно проводить **иммунохимический скрининг** - если есть антитела к интересующему белку. Но для этого вектор должен быть экспрессионным. Можно использовать обычные экспрессионные вектора (но 1/6 что попадет в нужную рамку/ориентацию). Чтоб быть уверенным про наличие промотора и RBS используют экспрессию fusion-белков – сайт рестрикции для встройки нашей кДНК в вектор идет после куска какого-нибудь белка экспрессия которого настроена так как надо. Это заодно помогает стабильности полученного пептида.

Еще бывает **дифференциальный скрининг** – тканеспецифичные библиотеки, или библиотеки по индуцируемым генам. Берут две реплики одной библиотеки (полностью идентичные чашки). Далее гибридизуют их с зондами (одну с одной, другую с другим) в качестве которого используют меченную кДНК или мРНК из одной ткани и из другой (или до и после индукции). Колонии светящиеся в одном случае и не светящиеся в другом – чувствительны к данному различию.

Вычитательная гибридизация

Хотим получить библиотеку генов которые экспрессируются в Б и не экспрессируются в культуре А. Получают одноцепочечную кДНК из обеих тканей. Но на кДНК из А вешают биотин. Далее кДНК из Б гибридизуют с избытком кДНК из А. Далее убирают всех у кого есть биотин (он сорбируется на стрептомицин-агарозу) – остается только то из Б чего нет в А.

Эукариотические системы хозяин-вектор. Saccharomyces cerevisiae.

Удобны – легко работать, быстро делятся, не содержат бактериальных токсинов (если есть желание синтезировать лекарства). В дрожжах посттрансляционные модификации более адекватны модификациям высших эукариот. Например гликозилирование секретируемых белков – присоединение маннозы.

Но все таки используют их только для экспрессии, а не для манипуляция с последовательностями. Все манипуляции делают в бактериях, поэтому используют шатл-векторы – могущие работать и в эу- и в про- кариотах.

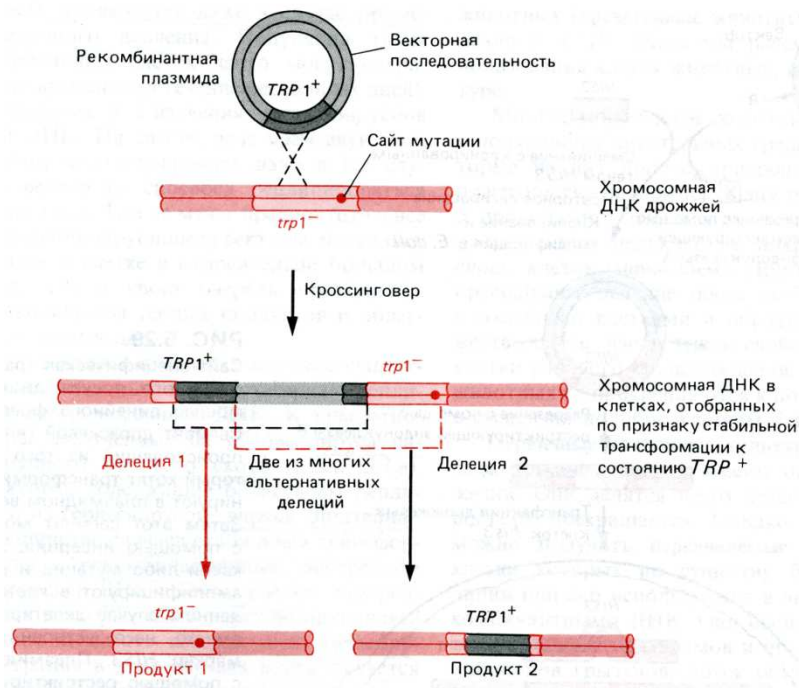
Для дрожжей в качестве селективного маркера используют URA3, LEU2, TRF1, HIS3 – используют штаммы не автотрофные по урацилу, лейцину и т.д. На среде без не растут. На среде бедной по данному метаболиту растут только колонии получившие векторы.

Дрожжи хороши тем что в них можно вставлять много плазмид – они не конкурируют как в бактериях.

Дрожжевые векторы:

1. YIp интегративные
2. YEр эписомальные
3. YRp репликативные
4. YCp центромерные
5. YAC дрожжевые искусственные хромосомы

Интегративные (Yip)

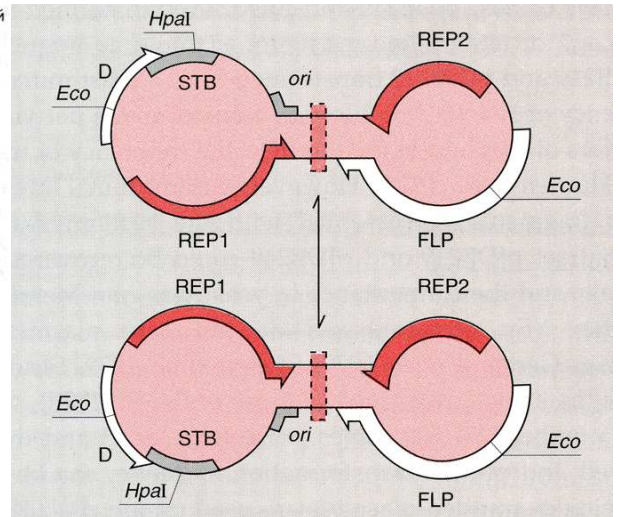


Эписомальные плазмиды

2 мкм дрожжевая плазмида – 6318 bp – собственная многокопийная циклическая плазмида дрожжей. Кодировывает гены репликации (REP1, REP2), сайт-специфическую рекомбиназу (FLP), содержит локус амплификации (D) и локус ответственный за разделение плазмид между материнской и дочерней клетками (STB).

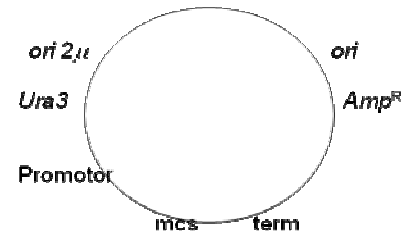
Рекомбиназа высоко специфична, сама плазмида содержит 2 сайта и за счет этой рекомбиназы существует в двух изомерных формах.

На основе эписомальной плазмиды делают шатл-векторы. Там есть *ori*, селективные маркеры, промотор под организм в котором хотим экспрессировать белок.



Репликативные плазмиды (YRp)

ARS (autonomously replicating sequence) – точки начала репликации у дрожжей. Если взять плазмиду и сунуть в нее ARS то такая плазмида будет сама реплицироваться. Получается 1-20 копий на клетку. Проблема в том что они не стабильны – остаются преимущественно в материнской клетке. Поэтому с ними не работают



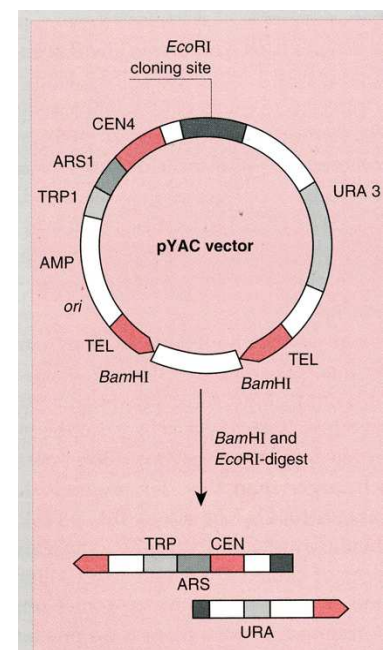
Центромерные плазмиды (YCp)

С вставленным центромерным участком (CEN). Низкокопийны, но хорошо расходятся между клетками при делении. (при мейозе – по Менделю). Используют если не нужна гиперэкспрессия.

YAC

Фокус в том что линейные (а не циклические как выше) куски ДНК при увеличении объема только увеличивают стабильность. Для этого центромерную плазмиду фланкируют теломерами (TEL). Для собственно вставки используют циклический вектор, у которого есть два плеча (левый и правый теломер – каждый содержит по своему селективному маркеру) – если вставка содержит не оба плеча – он сдохнет.

Еще там есть ARS. Это искусственная хромосома, соответственно низко копияна. Т.к. сам вектор размножается в бактериях в нем есть все что надо для жизни в бактериях – *ori* и ампицилиновая устойчивость. Чем больше вставка тем стабильнее хромосома.



Экспрессия в клетках дрожжей

Дрожжевые промоторы состоят из **TATA**-бокса (минимальный промотор) - -40-100 bp. Для более эффективной транскрипции нужны еще **UAS** – upstream activated sequence - 100-1400 bp. Еще есть **URS** – upstream repressing sequence - 20-400 bp.

Промотор / сила / регуляция

PGK (фосфоглицераткиназный) 4+ 20-кратная индукция глюкозой

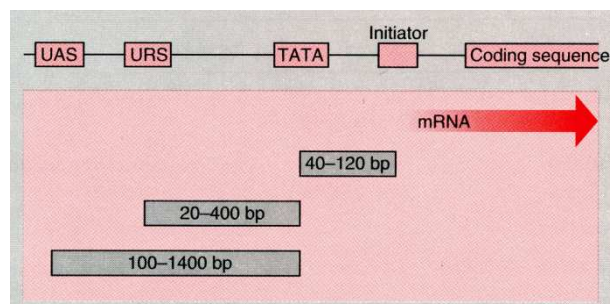
GAL1 (галактокиназный) 3+ 1000-кратная индукция галактозой

PHOS (кислой фосфатазы) 2+ 200-кратная репрессия фосфатом

ADH (алкогольдегидрогеназный) 2+ конститутивный

CUP1 (металлотинеиновый) + 20-кратная индукция ионами меди

Для трансляции надо: CAP, после кэпа рибосома ищет первый стартовый кодон в хорошем контексте: ANNATGG или хотя бы PuNNATGPu, Pu – пурин.



Двугибридные системы

Дрожжевая двугибридная система – метод, позволяющий не только исследовать взаимодействие пары известных белков, но и искать новые взаимодействующие белки *in vivo*, используя дрожжевую клетку, как живую пробирку. Активаторы транскрипции у дрожжей состоят из двух доменов – ДНК связывающий (DBD) и активаторного домена (AD).

Идея проста: DBD приделываем к одному белку (A) а AD к другому (B) (эти белки подозреваются на взаимодействие); если взаимодействие есть – то будет собираться работающий регулятор. Тогда если под промотор этого активатора положить репортерный ген, то его экспрессия не будет активироваться при экспрессии только A или B, а только при экспрессии обоих. Так можно узнать взаимодействуют они или нет.

Так же можно искать белок из библиотеки связывающийся с данным. – отбираем колонии где работает репортерный ген.

Структура:

В качестве ДНК-связывающего домена используют: DB домен белка Gal4 (локализуется в ядре, т.к. содержит NLS); бактериальный белок LexA (не содержит NLS, однако эффективно транспортируется в ядро).

Оба белка связываются со специфическими сайтами ДНК (UAS Gal или LexA операторами) в виде димеров.

Bait-protein – тот белок которому мы ищем партнера – приделан к DBD.

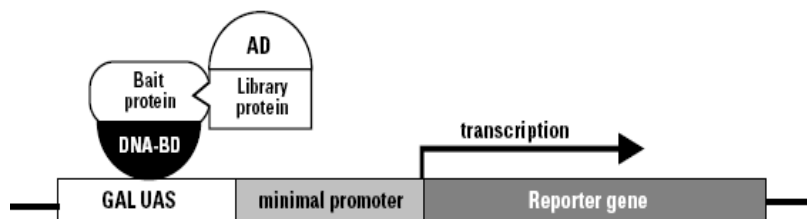
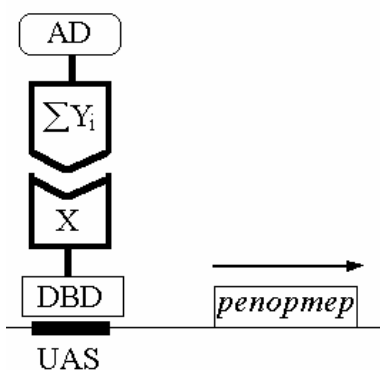
В качестве активирующих доменов берут активирующие домены разной силы (сильный AD белка Gal4, очень сильный AD белка P16 вируса герпеса, слабый бактериальный AD B42) и приделывают ко всем членам библиотеки.

В качестве репортерных генов используют: lacZ – позволяет количественно (по величине бета-галактозидазной активности – бело-голубой скрининг) оценить силу взаимодействия между белками, ген lacZ может находиться как на мультикопийной плазмиде, так и быть интегрированным в дрожжевой геном.

HIS3 (LEU2) - гены, кодирующие ферменты, необходимые для синтеза определенной аминокислоты. Обычно они интегрированы в дрожжевой геном. Позволяют проводить селекцию. На среде, не содержащей гистидин или лейцин, вырастают только те клоны, в которых в результате взаимодействия двух гибридных белков активируется транскрипция репортерного гена.

Схема скрининга библиотеки кДНК для поиска белков, взаимодействующих с белком X

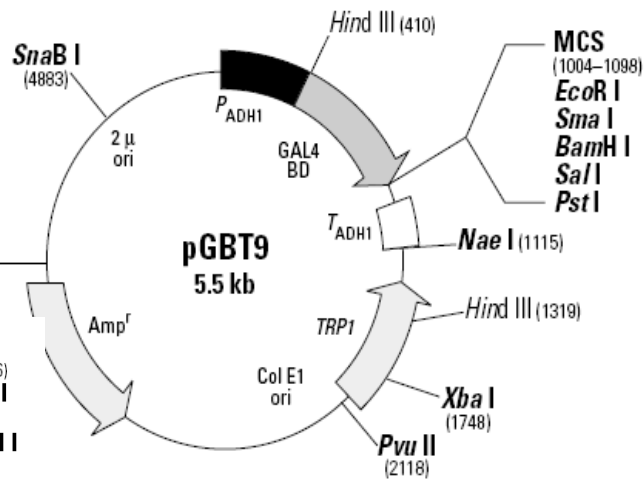
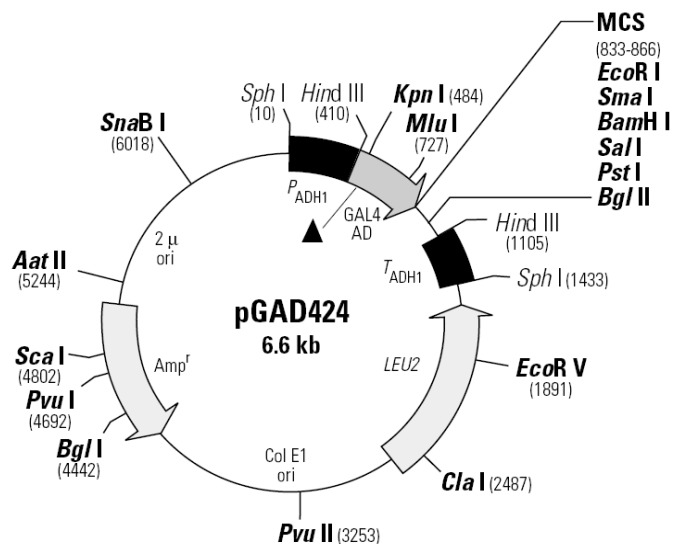
1. Клонирование кДНК белка X в вектор для получения DBD-X. (в бактерии)
2. Проверяем что DBD-X экспрессируется в дрожжах (иммуноблот)
3. Тест на автоактивацию. Т.е. не активирует ли DBD-X транскрипцию сам по себе. Если активирует – плохо дело.
4. Совместная экспрессия DBD-X и библиотеки AD. (котрансформация соответствующими плазмидами)
5. Отбор колоний, выросших на селективной среде: тройная селекция
6. Проверяют на работу второго репортерного гена (для очистки выборки – по бело-голубой селекции)
7. Выделение библиотечной плазмиды. Из дрожжей плохо выделяются плазмиды. Можно ПЦРить..
8. Проверка выделенной библиотечной плазмиды в двугибридной системе, тест на специфичность
9. Секвенирование кДНК из библиотечной плазмиды
10. Проверка взаимодействия белков независимыми методами (коиммунопреципитация, *in vitro* связывание)
11. Проверка биологической функциональности найденного взаимодействия (подробности ниже)



Вектор для получения DBD-X:

- Промотор (P) и терминатор (T) ADH1 (алкогольдегидрогеназный);
- DB домен белка Gal4 (содержит NLS);
- MCS (полилинкер);
- Селективные маркеры TRP1; (Amp^r);
- Ориджины репликации 2m – дрожжи, ColE1 - e.coli

Вектор для получения AD-Y:



При встраивании библиотеки кДНК в полилинкер (MCS) вектора pGAD424 экспрессируются химерные белки, содержащие AD GAL4 на N-конце.

Слитые с AD GAL4 белки транскрибируются с укороченного (слабого) промотора ADH1 и содержат сигнал ядерной локализации (NLS) Т-антигена вируса SV40 (черный треугольник).

Селективные маркеры LEU2; (Amp^r); Ориджины репликации 2m, (ColE1);

Двойная и тройная селекции

Штамм *S.cerevisiae* HF7c (ura3- 52, his3- 200, ade2- 101, lys2-801, trp1- 901, leu2- 3)

Репортерные гены: 1) GAL1 UAS -GAL1 TATA - HIS3,
2) GAL4 17-mers(x3) -CYC1 TATA – lacZ

Двугибридные плазмиды кодируют: DB-X (TRP1) и AD-Y (LEU2)

Селекция: Двойная (-Trp, -Leu) - вырастут все клетки, трансформированные обоими плазмидами;
Тройная (-Trp, -Leu, -His) - вырастут только те клетки, в которых X и Y взаимодействуют.

Проверка специфичности взаимодействия в двугибридной системе

- | | |
|----------------|-------|
| | b-gal |
| • DB-X + AD-Y | blue |
| • DB + AD-Y | white |
| • DB-UP + AD-Y | white |
- (UP-unrelated protein(s))

Варианты двугибридной системы:

Обратная двугибридная система – поиск мутаций убивающих связывание, или поиск белка катализирующего диссоциации (репортерный ген – токсичен и не позволяет клеткам расти).

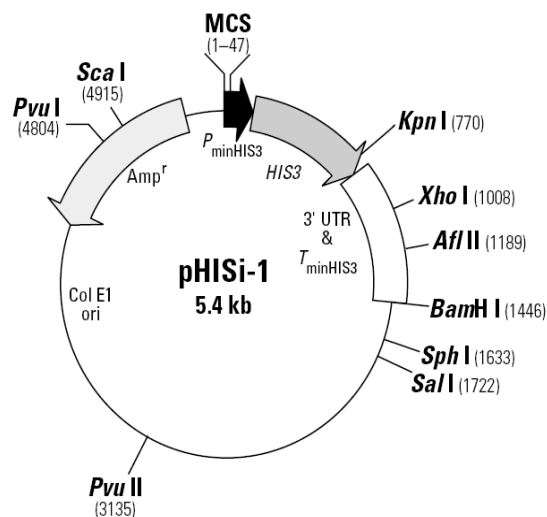
Сплит-система – репортер является регулятором в каком-либо ином опероне.

Поиск белков, взаимодействующих с РНК

Белковая тригибридная система – экспрессируются химерные белки DBD-X, AD-Y и третий белок (или библиотека белков), который может служить «мостиком» для взаимодействия X-Y, модификатором этого взаимодействия.

Одногибридная дрожжевая система – поиск белков взаимодействующих с ДНК, транскрипция репортерного гена активируется при узнавании белком X специфической последовательности ДНК Y.

репортерный вектор pHISi-1 Вектор содержит дрожжевой ген HIS3 под контролем минимального промотора локуса HIS3 (P_{minHIS}). Исследуемые фрагменты ДНК встраивают в полилинкер (MCS). Ген HIS3 служит селективным маркером для интеграции линеаризованного по Xho I или Afl II сайтам репортерного вектора в нефункциональный локус his3 дрожжевого штамма. Без активации транскрипция гена HIS3 с минимального промотора P_{min} HIS в дрожжевых клетках очень низка, но достаточна для селекции при интеграции репортерной плазмиды.



Белковый сплайсинг

Был обнаружен белок (АТФаза) который в клетке имеет массу 69кД, а ген кодирует 119 кД, при этом у него посередине вставка неясно чего – отсутствует в гомологах. Решили что это испорченный ген, стали искать нормальный – но его нет. Подтвердили что этот ген таки кодирует этот белок. Остался вопрос куда девается вставка? Проверяли не интрон ли она? Но мРНК без вставки найти не смогли. Не смогли найти и сайтов сплайсинга. Потом взяли клетки с поврежденным сплайсингом – но белок по прежнему экспрессировался. Потом ввели терминирующий триплет в вставку, вот тогда белок перестал образовываться. Т.е. стало очевидно что белок синтезируется со вставкой., которая далее вырезается, при этом две получившиеся половинки соединяются, что собственно и странно, т.к. белки нарезаемые на части были известны. Показали наличие вырезанной вставки – 50 кД. Проблема что никак не удавалось найти полного белка предшественника, но дело было в том что он слишком быстро сплайсировался. Потом точечными заменами сплайсинг замедлили и нашли предшественник.

Синтезировали этот белок в клетках млекопитающих (он был дрожжевой) и показали что сплайсинг идет и там. Экспрессировали его в есо1 оказалось что он и там сплайсируется давая оба продукта. Этому два объяснения – либо аппарат для сплайсинга есть во всех живых организмах, либо это самосплайсинг. Оказалось самосплайсинг. Потом показали что за сплайсинг отвечает собственно вставка.

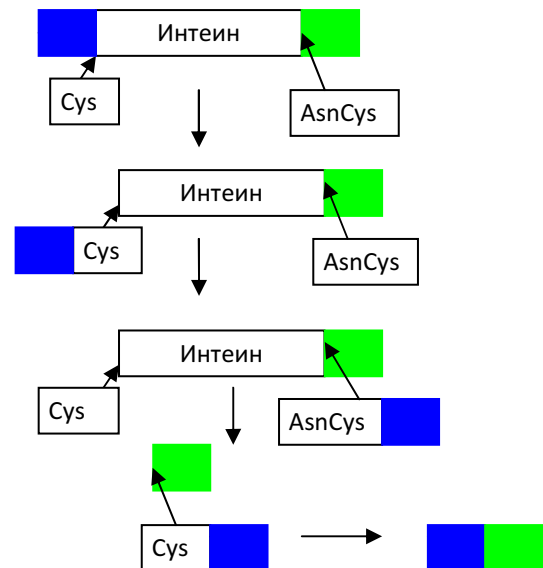
Интроны – интеины, экзоны – экстеины.

Примеры белкового сплайсинга: RecA у одной из микобактерий вызывающей туберкулез (у проказной тоже есть)– интеин в 440 ак. При этом интеин мало консервативен; VenT полимеразы. Не удавалось сделать ее рекомбинантной. Оказалось что ген кодирует в двое больший белок чем надо. Из соображений гомологии было обнаружено целых два интеина. Оказалось что второй интеин выщепляет себя сам, а вот первый интеин сам не выщепляется.

Механизм: Cys начала интеина атакует пептидную связь перед ним и образует тиоэфир с предыдущей аминокислотой. Далее cys начала второго экстеина атакует тиоэфирную связь и принимает карбоксил на себя. Далее asn конца интеина атакует следующую пептидную связь и выщепляет окончательно интеин. Свободный азот на N-конце экстеина перехватывает карбоксил из тиоэфира.

На основе этого можно делать удобные фьюжин белки самоотрезающие таг. Для этого можно убрать asn с конца интеина. Тогда в результате самосплайсинга будут получаться тиоэфирные производные которые ломаются меркаптоэтанолом

Интроны иногда кодируют эндонуклеазы которые могут репликативно встраивать интроны в другое место. Эндонуклеаза узнает место куда надо ее встроить – т.е. если данный организм гетерозиготен по этому интрону то станет гомозиготным... Эндонуклеаза очень специфична – 30 п.о., делает липкие концы. Это называется homing интрона. Для многих интеинов показано что они работают также (происходит это при мейозе). Т.е. это типа паразитов.



Трансдуцирующие домены

Т.к. продуцировать белки в клетках высших эукариот тяжело то хотелось бы экспрессировать их в бактериях, а потом просто добавлять их у исследуемой культуре. Однако есть белки которые умеют проникать через клеточную мембрану. Например белок Tat из HIV-1. Фактор транскрипции (Autennepedia) из дрозофилы. VP22 из HSV-1. Далее точечным мутагенезом нашли короткую последовательность отвечающий за трансдукцию (в середине белка) – трансдуцирующий домен. Оказалось что последовательность вся сплошь заряжена: RKKRKQRKR. Оказалось что эта последовательность сама может проникнуть в клетку. казалось что она похожа на NLS – таким образом можно закачивать белок прям в ядро.

Идея как лечить ВИЧ – убить зараженные клетки. Возмем прокаспазу, вставим ей вместо про-домена (не нужно, он отщепляется при активации) трансдуцирующий домен. А сайты для протеазы в прокаспазе заменим на сайты распознаваемые вирусной протеазой. Таким образом каспаза будет активироваться только в присутствии ВИЧа. Показали что это работает in vivo.

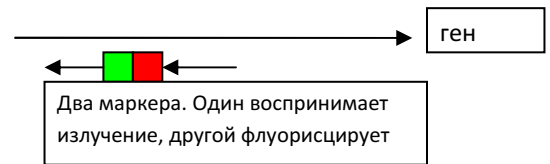
Здорово что у многих внутриклеточных патогенов есть свои специфические протеазы. Т.е. подход выглядит универсальным.

Можно ли при помощи пцр сравнивать кол-во ДНК?

Так просто не выйдет, т.к. рост экспоненциальный с насыщением. Надо отслеживать кол-во днк после каждого цикла: Real-time PCR. Для определения концентрации ДНК используют флуоресцентные красители, усиливающие флуорисценцию в присутствии ДНК – за счет интеркалирования.

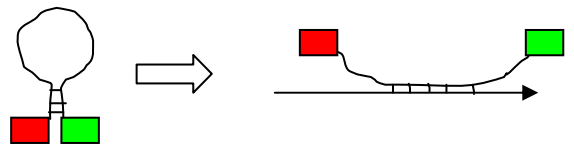
Бромистый итидий не очень хорош т.к. флуоресцирует и без ДНК, и не так то сильно светится в присутствии ДНК. Используют SYBRGreen. Плох тем, что он не специфичен к ДНК – не отличает мусор от правильного.

Двойной гибридационный зонд: два меченых флуоресцентной меткой олигонуклеотида, комплементарных амплифицируемому гену друг за другом. Один зонд несет донор – пигмент могущий воспринимать излучение. Второй – репортер – то что собственно флуоресцирует. Такая метка будет флуоресцировать только если донор и репортер рядом. Резонансный перенос энергии между донором и флуорофором. облучают длиной волны соответствующей возбуждению донора



TaqMan – используют олигонуклеотид – на одном конце флуорофор, с другой стороны тушитель. Пока он целый – не светится. У taq-pol есть 5-3 экзонуклеазная активность – она при своей работе гидролизует маркер и отделяет репортер от тушителя – он начинает светиться.

Шпиличный зонд – делают олигонуклеотид – середина комплементарна тому что мы амплицируем, а на краях делают шпильку. На них вешают репортер и тушитель. Такой маркер не гидролизуется полимеразой.

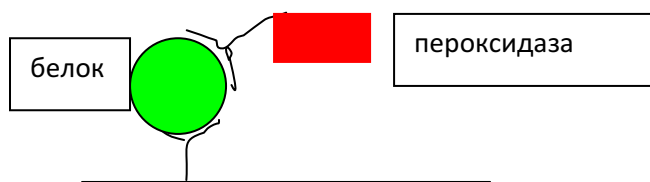


Sunrise – зонд и праймер – одно и то же. Представляет из себя такую же шпильку как и шпиличный зонд, но 3-конец работает как праймер. Когда он включается в цепь (и образует дуплекс) начинает светиться.

Можно следить за несколькими генами если маркеры на них светятся в разных длинах волн. Это называется multiplex PCR.

Применяют real-time PCR так: принимают некоторое значение флуоресценции как пороговое (в 10 раз больше фона) – по нему получают номер порогового цикла (номер цикла на котором флуоресценция достигла порога). Делают калибровочную кривую – $\ln(\text{число копий})$ от номера порогового цикла. По ней можно узнать число копий в образце. Так можно проверять уровень экспрессии.

Иммуоферментный анализ – антитела на анализируемый белок иммобилизуют на подложке. На другое место белка делают антитело с пришитой например пероксидазой. Ферментативная активность прямо пропорциональна концентрации анализируемого белка.



Чтоб поднять чувствительность вместо пероксидазы вешают ДНК. Ее кол-во потом определяют real-time PCR или ПЦРом проверяют наличие/отсутствие. ДНК привязывают не ковалентно (от этого она могла бы попортиться) а при помощи биотина – вешают биотин и на антитело и на ДНК, и есть белок связывающий биотин – сшивает ДНК и антитело. Это называется **иммуно-ПЦР**. Можно одновременно проверять наличие нескольких белков. Чувствительность в 100-1000 раз больше чем при просто иммуоферментном анализе.

Белок-ДНК взаимодействие 1

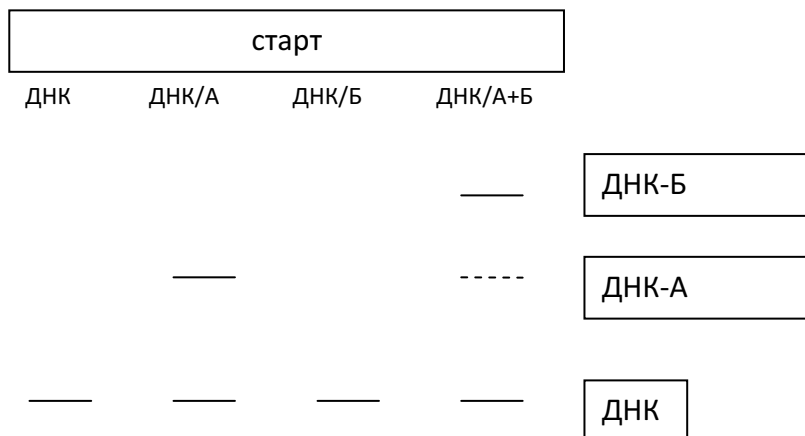
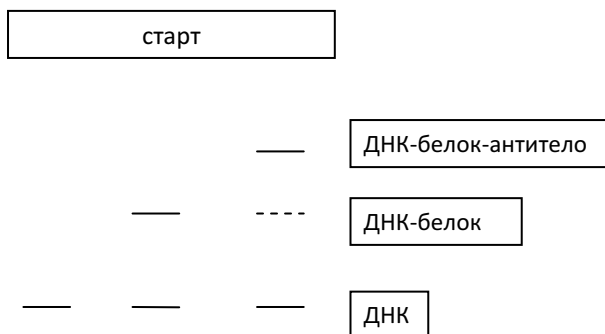
Как проверить есть ли взаимодействие? EMSA (электрофоретический сдиг кажется называется) – фореz ДНК+исследуемый белок – если взаимодействие есть то комплекс идет на фореze медленней чем просто ДНК (т.к. изменится заряд и масса). Берут короткие фрагменты ДНК – чтоб разница была побольше. Зонды метят. Т.к. исследуемый белок берут из клеточных лизатов надо сперва брать белки связывающиеся неспецифично – для этого берут много ДНК не содержащего исследуемого сайта.

Контроль – вытеснение меченой ДНК из комплекса немеченой ДНК с тем же сайтом.

Т.е. по одной дорожке – экстракт, зонд, неспецифическая ДНК, в другой все то же + зонд без метки.

Белок-ДНК взаимодействие 2

Еще хотелось бы убедиться что именно наш белок связывает зонд, а не кто-нибудь еще, например белок, чья экспрессия контролируется исследуемым. Тогда добавляю еще антитело. С ним наш комплекс еще тяжелее, еще меньше пройдет – называется super-shift. Антитело может не сделать дополнительную полосу, а просто ослабить полосу ДНК-белок – за счет того что при связывании с антителом у белка падает сродство к ДНК. Нужны контроли!



Есть белки А и Б, они взаимодействуют. А взаимодействует с ДНК, вопрос сохраняется ли взаимодействие А-Б при взаимодействии А с ДНК. Тогда экспрессируем А и Б в разных культурах:

Наличие белков в комплексе проверяем антителами, центр связывания проверяем точечными мутациями.

Проблема конечно что это *in vitro*. Т.е. белок с ДНК взаимодействовать может, но если он локализован в цитоплазме то *in vivo* взаимодействия не будет.

Иммунопреципитация хроматина (ChIP)

Знаем какой белок и с каким местом ДНК должен взаимодействовать. Хотим знать есть ли взаимодействие *in vivo*. При обработке формальдегидом белки ковалентно пришиваются к ДНК. Такую обработку делают до разрушения клеток. Потом формальдегид убирают а клетки лизируют в денатурирующих условиях – чтобы все белок-белковые взаимодействия кончились. Далее ДНК неспецифически разрушают – до 300-500 п.н. – хоть ультразвуком. Обрабатываем полученное антителами к нашему белку. Далее выделяют комплекс при помощи А-белка стафилокока (его Z-домен связывает Ig). А-белок на чем-то там иммобилизован. Осталось понять есть ли в осадке ДНК. Далее ПЦРом проверяют наличие ДНК. Но сперва убирают наш белок при помощи протеазы, которую потом ингибируют. Контроль - все то же но берем антитела к другому белку (фрагмента быть не должно)

Секвенирование ДНК:

Метод Максвелла и Гилберта. Для него один из концов ДНК должен быть меченым. Берут исследуемый фрагмент, фосфатазой снимают 5-концевые фосфаты, потом полинуклеотид киназой и меченой по гамма-фосфору АТФ привешивают метку. Т.к. метка должна быть только на одном конце, то другую убирают рестриктазой. Далее в четырех разных пробирках гидролизуют ДНК после данного нуклеотида. Т.е. есть условия при которых ДНК щепится четко после данного нуклеотида. В каждой пробирке после своего. Гидролиз проводят в таких условиях чтобы щепилось не до конца (т.е. в среднем на молекулу ДНК по разрыву) – тогда все возможные фрагменты образуются. Осталось определить длины фрагментов ДНК – делают в денатурирующем акриламидном геле (чтобы не было двуцепочечных ДНК и шпилек).

Метод плох тем что расщепление по данному нуклеотиду не супер специфично (Т и С иногда путаются) плюс это долго и трудоемко.

Метод Сенгера

Сенгер получил 2 Нобелевки – за белки и за секвенирование.

Используем ddNTP – они по 2` и по 3` дезокси. После встраивания таких остатков в цепь она дальше не продолжается. Делают 4 пробирки, в каждую кладут праймер, все dNTP и еще данный ddNTP. В итоге получаем кучу одноцепочечных ДНК. В каждой пробирке цепи терминированны на данном остатке – т.е. итог точно такой же как и в Максвелле-Гилберте. Можно метить праймеры – например радиоактивно. Можно подмешивать меченные нуклеотиды (по альфа-фосфату). Прочитать можно порядка 500 п.о.

Но с тех пор он усовершенствовался:

Во-первых метка флуоресцентная. 4 разных метки вешают на ddNTP. Поэтому все можно проводить в одной пробирке. Форез делают проточной хроматографией на колонке (капилляр с гелем), на выходе из нее стоит 4 детектора. Еще можно немного амплифицировать – периодически плавить и отжигать – тогда каждая матрица отработает несколько раз.

Для секвенирования больших фрагментов их режут часто режущей рестриктазой но в условиях недореза. Потом все фрагменты клонируют, размножают и секвенируют. Потом собирают – можно т.к. они перекрываются.

Экспрессия генов в клетках млекопитающих

1. Транзитная (временная) экспрессия - вирусные плазмиды, т.к. они не реплицируются – скоро закончатся. Работает только потому что клетки млекопитающих делятся редко.
2. Стабильные клеточные линии – либо гены интегрируют в хромосомы (так в основном и делают), либо плаزمиды должны автономно реплицироваться.
3. Системы, основанные на гомологичной рекомбинации (gene targeting, knock-out)

Методы введения генов в клетки:

1. Транфекция
2. Инфекция (вирусные векторы)

Транфекция:

Не нужен ori и селективный маркер, высокая копияность – т.к. можно записать в одну клетку много плазмид. Они распределяются так что если уж в клетку попали плазмиды, то попали много. Может трансфицироваться 10-40% клеток, но зато в них до 100 копий. Чтобы убедиться, что трансфекция прошла используют смесь нужной плазмиды с репортерной – кодирующей GFP – флуоресцентный белок.

Методы трансфекции:

I. Химическая трансфекция:

ДНК в составе положительно заряженного комплекса, который взаимодействует с отрицательно заряженной клеточной мембраной и промотирует эндоцитоз (Са-фосфатный метод; DEAE-декстран; полиэтиленимин);

ДНК в составе липосом, которые сливаются с клеточной мембраной (липофектин, липофектамин, унифектин);

II. Физическая трансфекция:

Электропорация;

Ультразвук;

Бомбардировка ДНК-содержащими металлическими частицами;

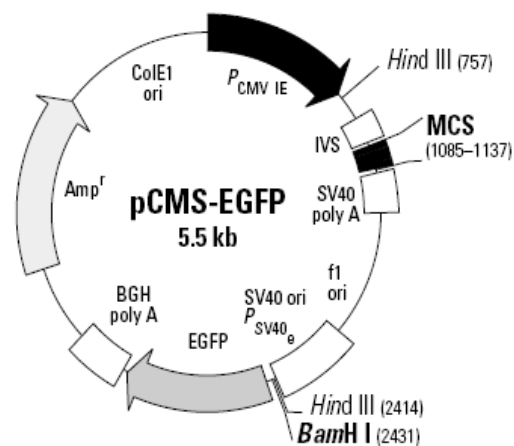
Микроинъекции ДНК в ядро.

Транзитная (временная) экспрессия

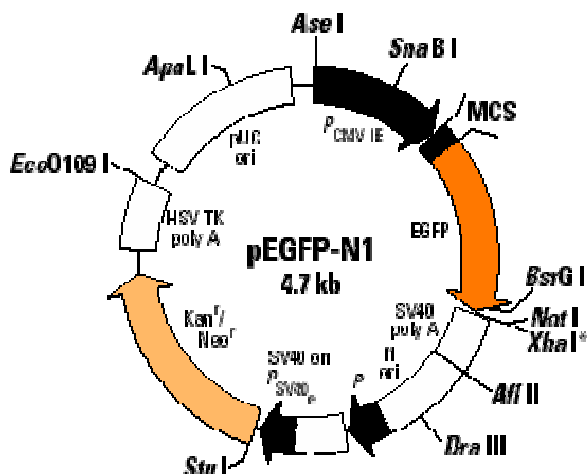
1. Нет необходимости в **ori**, **селективном маркере**;
2. Высокая копияность;
3. Использование репортерных генов.

Все что надо для бактерий + эукариотический промотор и терминатор:

- Промоторы: SV40 early < RSV < CMV;
- Терминаторы: SV40 poly A, BGH poly A;
- Полилинкер: MCS;
- Интрон: IVS (может увел. экспрессию)
- Репортерные гены:
 1. *lacZ* - *б-галактозидаза* (бело-голубой скрининг)
 2. *GUS* - *б-глюкуронидаза*
 3. *CAT* - *хлорамфеникол ацетил трансфераза* (подвижность)
 4. *Luc* - *люцифераза* (окисл. люцефин с хемолюменисц.)
 5. *GFP* – *зеленый флуоресцирующий белок*



Использование слитых с GFP белков – например для определения локализации исследуемого белка. Есть векторы для приделывания GFP и к С и к N концу. Если вектор нужен для интеграции в хромосому то в нем должен быть селективный маркер для млекопитающих.



Стабильные клеточные линии

- I. Интеграция в случайные участки генома: челночные векторы (селекционный маркер, нет ori), ретровирусные векторы (Недостатки: инсерционный мутагенез, сайленсинг)
- II. Стабильно реплицирующиеся внехромосомные ДНК (эписомы)

Селективные маркеры:

Neo - (аминогликозид фосфотрансфераза) – устойчивость к ингибитору трансляции G-418 ;

Puro (пурамицин-N-ацетил трансфераза) - ацетирует ингибитор трансляции пурамицин;

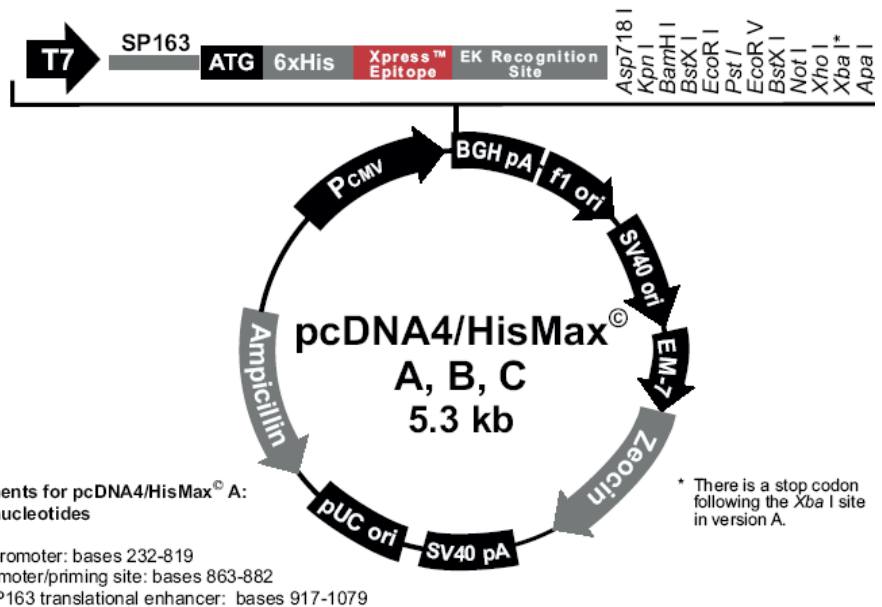
Hygro - устойчивость к гигромицину. Гигромицин В – антибиотик, ингибитор белкового синтеза (влияет на рибосомный А-сайт и на транслокацию). Ген устойчивости – Hph (гигромицин фосфотрансфераза), фосфорилирование гигромицина приводит к его инактивации.

Zeocin – антибиотик широкого спектра, медь-содержащий гликопептид, выделенный из Streptomyces. Механизм действия – интеркаляция в ДНК и ее деградация.

Ген устойчивости - Sh ble (Streptoalloteichus hindustanus bleomycin), кодирует белок 13.7 kDa, который связывает Zeocin и ингибирует его активность.

Для получения **стабильной клеточной линии** вектор линейрируют (это не делает трансфекцию более эффективной, но увеличивает шансы интеграции без повреждения экспрессионной кассеты). После трансфекции проводят селекцию.

Шаттл-вектор:



Ретровирусные векторы.

Схема жизненного цикла ретровируса:

- Проникновение ретровирусной частицы в клетку зависит от клеточного рецептора;
- Синтез провирусной ДНК (ревертаза);
- Интеграция провируса в геном делящихся клеток;
- Транскрипция провирусной ДНК;
- трансляция с образованием вирусных белков;
- Вирусная РНК упаковывается в белки капсида;
- Оболочка вириона формируется из мембраны клетки при выходе вирусных частиц из клетки путем отпочковывания.

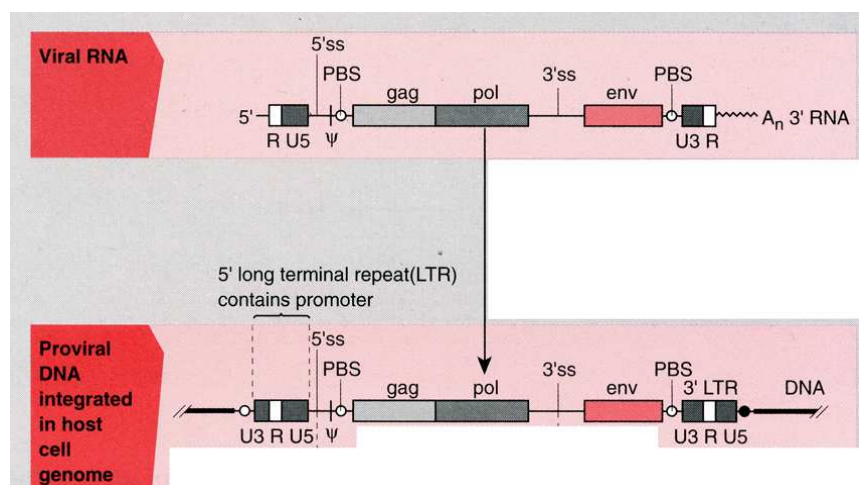
Геном ретровируса

Элементы с транс-функциями, гены:

- gag - MA (матриксный), p12, CA (капсидный), NC (белок нуклеокапсида);
- pol - PR (протеаза), RT (обратная транскриптаза/РНКазы), IN (интеграза);
- env - SU (поверхностный gp70), TM - трансмембранный белок;

Элементы с цис-функциями:

- Ψ - последовательность - сигнал упаковки/димеризации вирусной РНК,
- PBS - primer binding site,
- 3' и 5' SS - акцепторный и донорный сайты сплайсинга,
- LTR – длинные концевые повторы (содержат энхансер, промотор, и att – послед, по которым идет интеграция в геном)



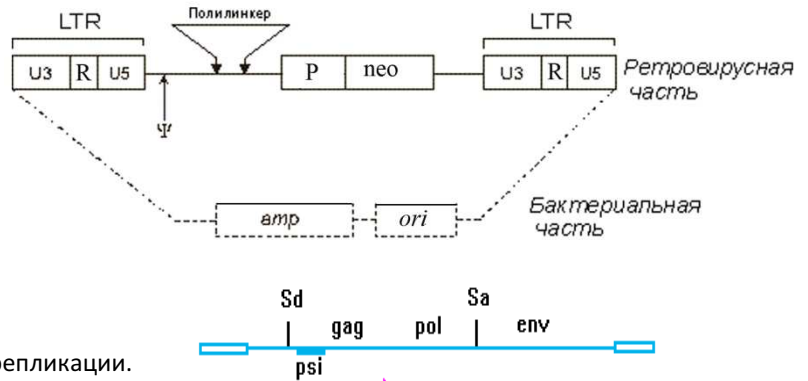
В результате альтернативного сплайсинга образуется полноразмерная РНК, направляющая синтез продуктов генов gag и pol, так и сплайсированная субгеномная РНК, являющаяся матрицей при синтезе белков оболочки (продукты гена env).

Конструирование ретровирусного вектора

Возьмем провирусную ДНК и выкинем из нее гены gag, pol, env, оставив 3'- и 5' LTR и psi - сайт. А вместо выкинутых генов вставим интересующий нас ген (до 8 kb).

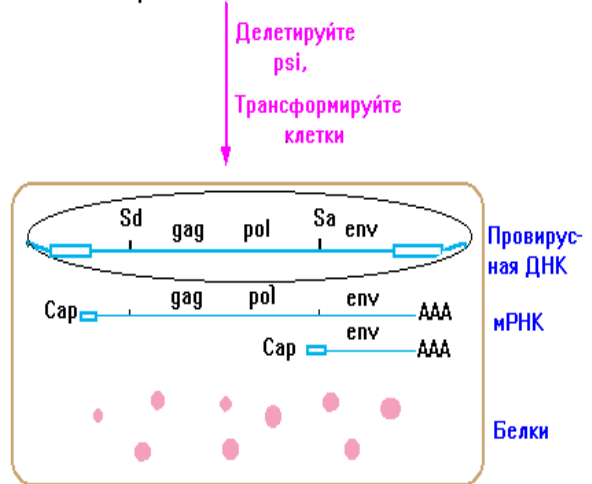
Ретровирусный вектор наряду с цис-элементами генома (LTR и сигнал упаковки) содержит:

- 1) селективный маркер со своим промотором (позволяющий проводить отбор клеток с интегрированным вектором на селективной среде);
- 2) полилинкер;
- 3) бактериальной селективный маркер и ориджин репликации.

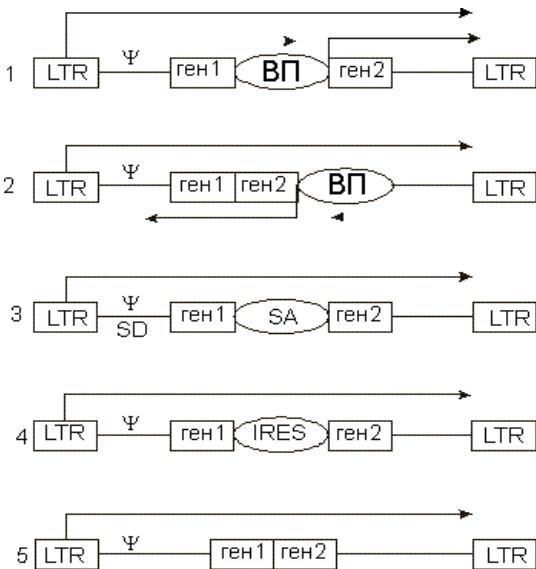


Конструирование упаковочных клеточных линий

- Из ретровирусной ДНК удаляют последовательность сигнала упаковки psi и трансформируют клетки.
- Провирусная ДНК встроится в клеточный геном.
- Она будет направлять синтез вирусных РНК и вирусных белков.
- Но сам ретровирус не будет продуцироваться (т.к. РНК неспособна упаковаться с образованием вирусных частиц).



Экспрессия нескольких генов в одном векторе

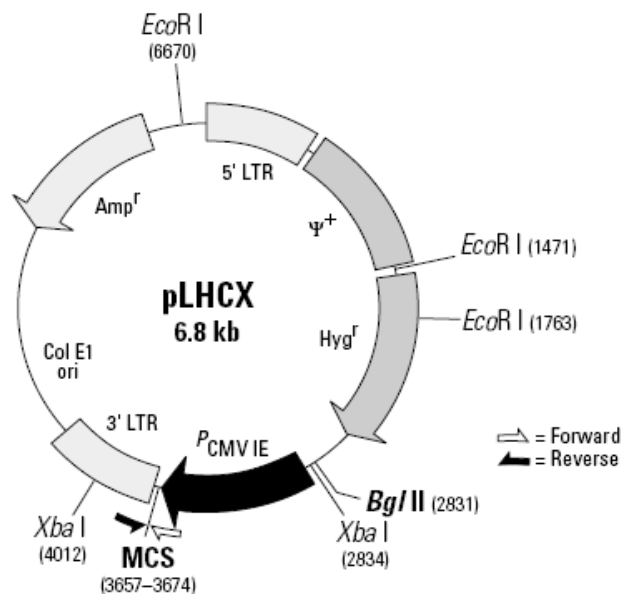


- 1, 2 - использование двух разных промоторов для экспрессии генов;
- 3 - использование для экспрессии двух генов ретровирусной системы сплайсинга;
- 4 - использование IRES (internal ribosome entry site) элемента для трансляции полицистронных мРНК;
- 5 - вектор, кодирующий "fusion"-белок.

- Ψ - сигнал упаковки;
- ВП - внутренний промотор;
- SD, SA - донорный и акцепторный сайты сплайсинга.

Пример ретровирусного вектора:

Есть 2 LTR и psi. Плюс селективный маркер, ну и все остальное (в том числе бактериальное).



Полезные свойства ретровирусов:

1. Ограниченное число копий – от 1 до 5
2. Не происходят перегруппировки встроенного материала
3. Предпочтительно встраивается в транскрипционно активные участки
4. Легкость доставки – можно заражать не только культуры, но и ткани или эмбрионы – можно получать трансгенные организмы
5. Отсутствие цитопатического действия (не гробит клетку)
6. Широкий спектр видовой и тканевой специфичности – т.к. ретровирус имеет определенные клетки-хозяева. В случае ретровирусных векторов способность заражать клетки того или иного вида (тропизм) определяется белками оболочки вируса-помощника (ген *env*). Можно направленно изменять тропизм (псевдотипирование). Для этого часто используют гликопротеид вируса везикулярного стоматита VSV-G.

Ограничения/трудности использования ретровирусов и их преодоление

1. Ретровирусы заражают только делящиеся клетки (это связано с неспособностью провируса в комплексе с белками проникать в ядро. В ходе митоза ядерная мембрана разрушается и провирус получает возможность встроиться в геном).
- !!! Лентивирус - сложно устроенный ретровирус, для которого характерна способность инфицировать неделяющиеся клетки. Содержит сРРТ (центральный полипуриновый тракт), отвечающий за ядерный транспорт пре-интеграционного комплекса.
2. Уровень экспрессии интегрированного трансгена зависит от **эффекта положения**.
Транскрипционный сайленсинг – метилирование цитозина (CpG) *de novo* индуцирует деацетилирование гистонов и конденсацию хроматина.

В **лентивирусном** векторе меньше CpG динуклеотидов, чем в ретровирусном векторе.

Лентивирусы обычно интегрируют в транскрипционно-активные участки генома (MuLV интегрирует вблизи стартов транскрипции и CpG островков).

!!! Борьба с **сайленсингом** (использование цис-элементов):

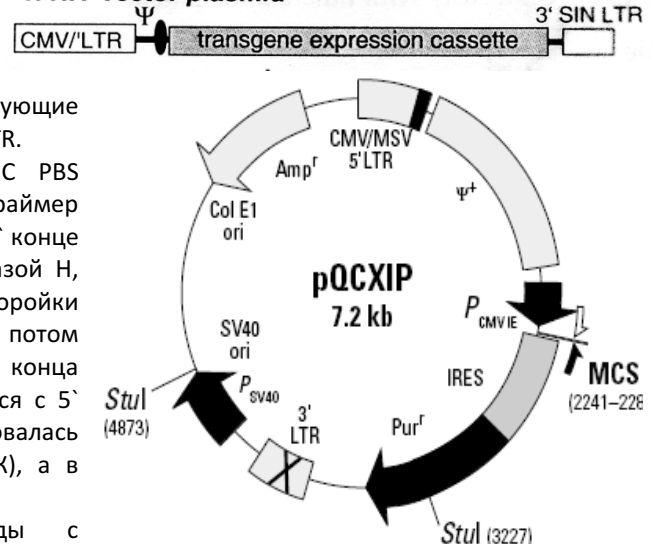
- 1) LCRs (locus control regions, гиперчувствительность к ДНКазе I);
 - 2) chromatin insulators (защита от соседних энхансеров и сайленсеров);
 - 3) S/MARs (scaffold/matrix attachment regions).
3. Возможна рекомбинация между дефектным ретровирусом, и эндогенным ретровирусным элементом в упаковочной линии клеток. В результате рекомбинации может возникнуть репликативно-компетентный инфекционный ретровирус (настоящий вирус).
 - !!! Стараются как можно дальше развести интегрированный вектор упаковочной линии и собственно используемый вектор. Векторы с мутированным **PBS** для предотвращения обратной транскрипции были получены с использованием искусственной тРНК для продукции псевдовирусных частиц.
 4. Инсерционный мутагенез – ввод LTR (а он сильный энхансер и промотор) он может вызвать экспрессию чегонить нетого. Или наоборот чтонить сломать (ген-супрессор опухолеобразования или активировать онкоген)
 5. Было бы хорошо осуществлять таргетинг векторов к определенному положению в геноме (встроить в интегразу специфический ДНК-связывающий домен, напр. пре-интеграционный комплекс в безопасные участки генома).
 6. **Самоинактивирующийся вектор** – вектор который не активирует соседние гены. В 5' сильный промотор, а в 3' слабый (U3 участок LTR делетируют – исчезает активность энхансера и промотора). При прохождении жизненного цикла – на стадии копирования ДНК по РНК 3' LTR копируется на 5'. В итоге через жизненный цикл вирус инактивируется. Это называется SIN.

Гибридный 5' LTR состоит из CMV энхансера транскрипции и промотора MSV (мышинного вируса саркомы). Это обеспечивает высокий уровень транскрипции в упаковочной линии. Самоинактивирующие свойства вектора – делеция энхансерного участка U3 в 3' LTR.

На РНК есть – R_U5_PBS_____U3_R С PBS связывается тРНК и она становится праймером. Потом праймер перескакивает и участком R связывается с 3' концом. В итоге на 5' конце ДНК уже U3_R_U5. Параллельно вся РНК гидролизуется РНКазой H, кроме кусочка который используется как праймер для достройки второй цепи, которая сперва делается по 5' концу а потом перескакивает на 3' конец. В итоге оба U5 делаются с 3' конца исходной РНК, R должен быть комплиментарен, а U3 делается с 5' конца. Это нужно чтобы в пакующей линии РНК синтезировалась хорошо (т.к. при ее трансфекции используют ДНК а не РНК), а в конечной культуре вектор будет уже не так активен.

Чтобы избежать рекомбинации нашей плазмиды с интегрированным вектором из упаковочной линии в упаковочной

1. HIV vector plasmid



линии вводят не вирус а три отдельных плазмиды – с регуляторными белками, у капсидным, и с белками которые лежат внутри вируса (это про лентивирусные векторы). Тут надо слишком много рекомбинаций чтобы собрать полный вирус.

Вирус SV40

Вирус содержит кольцевую двуцепочечную ДНК 5243 пн. Содержит собственный ori. Для репликации нужно два ранних вирусных белка – Т и т антигены. Еще 3 капсидных белка – поздние (VP1, VP2, VP3). Промотор и ori находятся рядом. Вирус очень много копиин – до 1000000 копий, в итоге клетки лизируются – т.е. создать стабильную клеточную линию так невозможно. В непермиссивных клетках вирус может интегрировать в геном.

I. Литические (трансдуцирующие) векторы: репликация + упаковка в вирионы.

- размер ДНК до 5300 н.п. (емкость до 2.5 kb);
- необходим ori;
- вирус-помошник кодирует Т- антиген и/или структурные гены VP1, VP2, VP3.

Можно использовать клетки COS – клетки зеленой африканской мартышки, в геном которых интегрирован Т-антиген.

Недостатки: малая емкость; лизис.

II. Плазмидные SV40-векторы – репликация без упаковки в пермиссивных клетках.

- ori + большой Т-антиген (используют COS – клетки, до 100000 копий вектора на клетку).
- Нет ограничений на размер ДНК;
- Нет лизиса клеток.

III. Трансформирующие векторы – интеграция в хромосому непермиссивных клеток

Стабильно реплицирующиеся внехромосомные ДНК (эписомы)

Преимущества эписомных векторов:

1. Трансген не может быть поврежден в процессе интеграции и не подвержен регуляции соседними участками ДНК;
2. Отсутствие инсерционного мутагенеза;
3. Многокопийность и ядерная локализация;
4. Более высокая эффективность получения стабильных клеточных линий по сравнению с интегрирующими в геном плазмидами.

	размер	селективный маркер	копийность
Вирус полиомы BKV	5 kb	neo	20-120 копий
Бычий вирус папилломы BPV	16 kb	neo	20-300 копий
Вирус Эпштейна-Барр EBV	172 kb	neo	5-100 копий

Вектор на основе BKV

Вирус содержит кольцевую дцДНК 5153 н.п. /ранние гены кодируют Т и т антигены / поздние гены кодируют капсидные белки VP1, VP2 и VP3; / между ними расположен регуляторный участок (содержит сайты связывания Т-антигена, ori, промотор и энхансер транскрипции).

BKV эписомы реплицируются один раз за клеточный цикл. Стабильная репликация требует наличия ori, большого Т антигена и ряда клеточных белков репликации. Участки поздней вирусной ДНК делетируют и вставляют на это место экспрессионную кассету трансгена.

BKVE, ранний промотор; Bkt, малый t антиген; BKT, большой Т антиген.

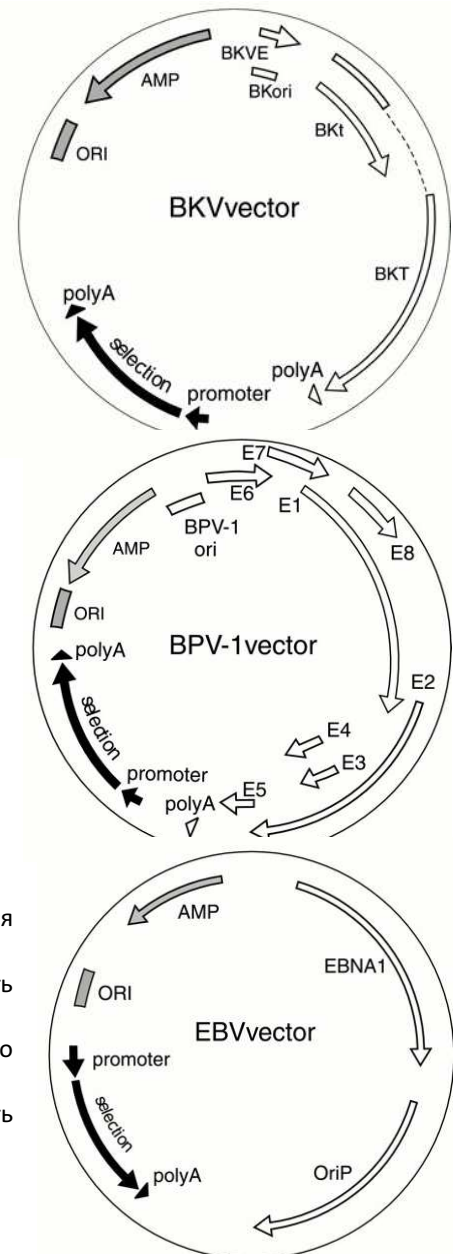
Вектор на основе BPV

- Кольцевая дцДНК.
- E (ранний район) содержит 8 ORF (E1-E8), кодирует белки репликации, регуляции транскрипции и трансформации.
- L (поздний район) кодирует структурные белки вириона L1 и L2.
- Для стабильной репликации плазмид на основе BPV-1 нужны:
 - ori и MME (minichromosome maintenance element) in cis;
 - белки E1 and E2 in trans;
 - клеточные белки репликации.

Улучшение вектора: оставили гены E1, E2 и регуляторный район BPV-1 для предотвращения интеграции в хромосому и избавления от трансформирующей активности (делетировали E5, E6 и E7 – потенциальные онкогены).

Вектор на основе EBV

- Стандартный EBV-вектор содержит oriP и ген EBNA1 и стабильно реплицируется в виде эписомы (один раз за клеточный цикл).
- Емкость 172 kb. Искусственные человеческие минихромосомы могут быть полезны для скрининга библиотек генов.
- Без селекции эписомные EBV векторы охраняются продолжительное время, но не бесконечно.
- Векторы, несущие только oriP, можно использовать, чтобы быстро убить опухолевые клетки, экспрессирующие EBNA-1 (Burkitt’s lymphoma).



Трудности использования эписомных векторов для генной терапии

- Необходима экспрессия вирусных транс-факторов, которые могут вызывать раковую трансформацию.
- Большой Т антиген вирусов ВКВ и SV40 взаимодействует с опухолевым супрессором р53 (влияние на генную экспрессию, хромосомные aberrации, трансформация).
- Хотя белки E5, E6 и E7 являются основными трансформирующими факторами ВРV-1, некоторые трансформирующие свойства приписывают и E2.
- EBV oriP сходен с энхансером вблизи гена *c-мус*. Поэтому EBNA1 может де-регулировать протоонкоген *c-мус* (экспрессия EBNA1 повышает вероятность В-клеточных лимфом у мышей).

Оптимизация экспрессии генов в клетках млекопитающих

Промоторы:

- конститутивные: SV40 early < RSV < CMV;
- индуцибельные:
 1. Тетрациклиновая система
 2. Экдизоновая система

Оптимизация трансляции: удаление протяженных нетранслируемых областей; хороший контекст инициаторного кодона ACC ATG G; оптимизация кодонов.

Тетрациклиновая система

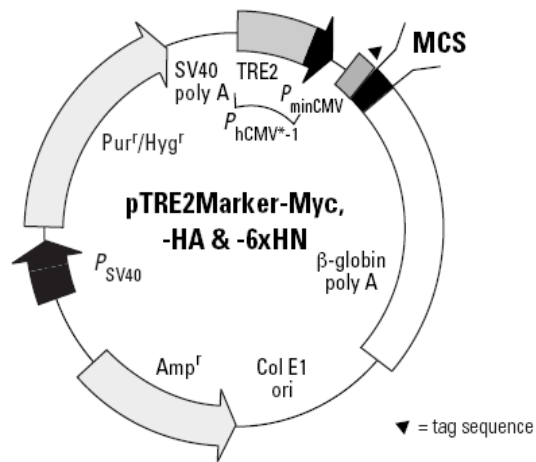
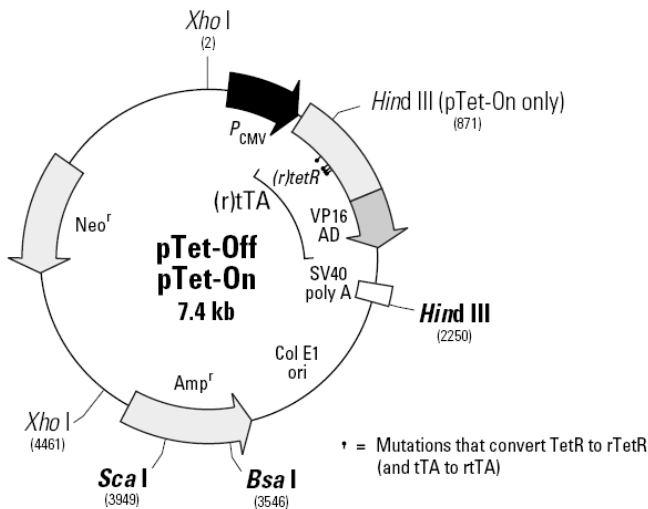
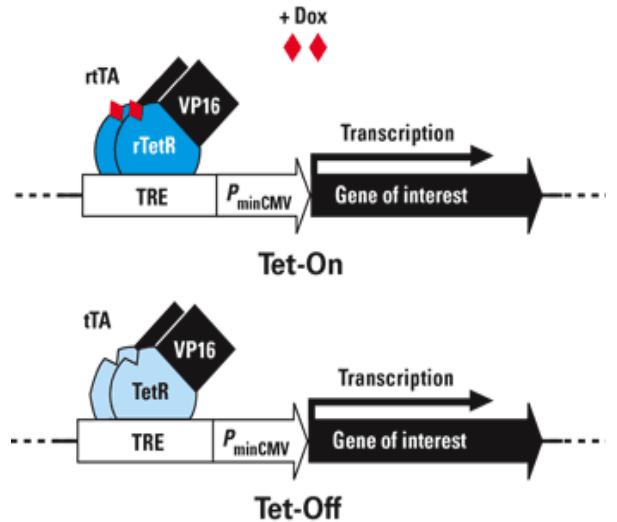
(на основе T10 транспозон E.coli, tetracycline-resistance оперон).

pTRE: 7 x (Tet O - оператор) – PCMV (слабый промотор)- ген-ра

pTet-off: кодирует TetR – AD VP16 (HSV) - связывается с TetO в отсутствие Тс, активирует транскрипцию гена, при добавлении Тс транскрипция выключается.

pTet-on: кодирует rTetR – AD VP16; связывается с Tet O в присутствии Тс и активирует транскрипцию.

Используют две плазмиды – на одной две субъединицы тетрациклинового рецептора. Вторая плаزمида – собственно для клонирования нашего гена.



Конструирование клеточных линий Tet-On/Off: Трансфицировать клетки регуляторными плазмидами pTet-Off или pTet-On; Селекция с помощью G-418 (neo); Выделить ряд клонов, устойчивых к G-418; Трансфицировать клоны репортерной плазмидой pTRE2hyg-Luc и скринировать на низкий фоновый уровень и высокую степень индукции люциферазной активности в ответ на тетрациклин.

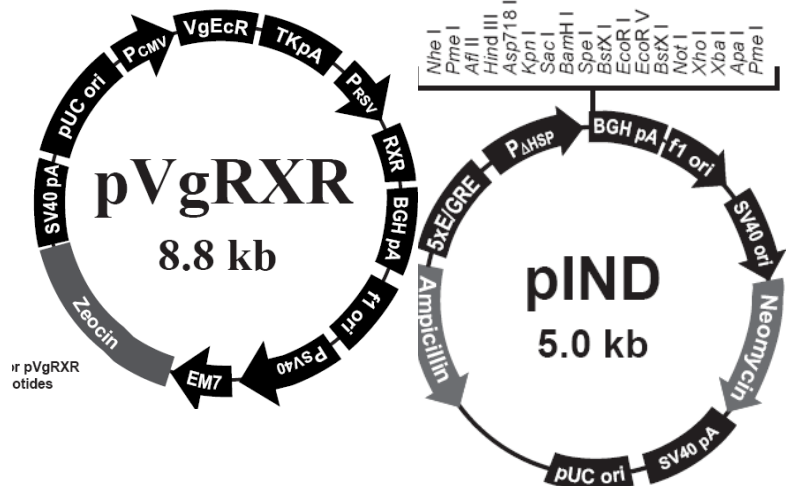
Пример – онкогенные мыши, у которых ген опухоли находится под контролем Tet-рецептора.

Экдизоновая система

1-ая плазмида pVgRXR – конститутивная экспрессия двух субъединиц экдизонового рецептора RXR и VgEcR.

2-ая плазмида pIND – индуцибельный экспрессионный вектор;

5 x E/GRE – PHSP – ген -- ра
Гибридный ecdyzon- минимальный терминатор
response element промотор транскрипции
Индукция аналогами экдизона.



Системы, основанные на гомологичной рекомбинации (gene targeting, knock-out)

Селективные маркеры :

Neo - (аминогликозид фосфотрансфераза) – УСТОЙЧИВОСТЬ к G-418;

Hygro - устойчивость к гигромицину;

Zeocin – устойчивость к зеоцину;

DHFR – (дигидрофолатредуктаза), устойчивость к метатрексату;

GPT - (ксантин гуанин фосфорибозилтрансфераза), устойчивость к микофеноловой кислоте.

Негативная селекция:

HSV-tk - при добавлении gancyclovir (FIAU) синтезируется токсичное вещество.

DIPa - ген дифтерийного токсина.

Идея проста – вводим селективный маркер фланкированный участками гомологичными нокаутуемому гену.

Гомологичная рекомбинация стимулируется свободными концами ДНК.

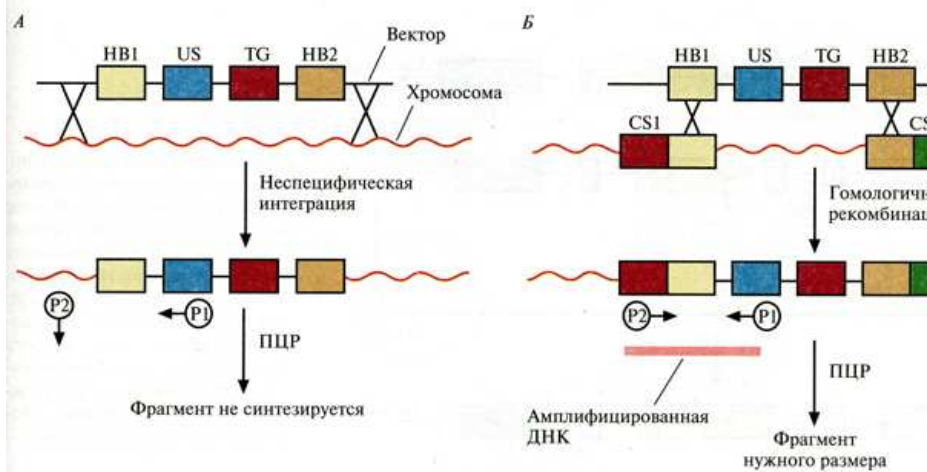
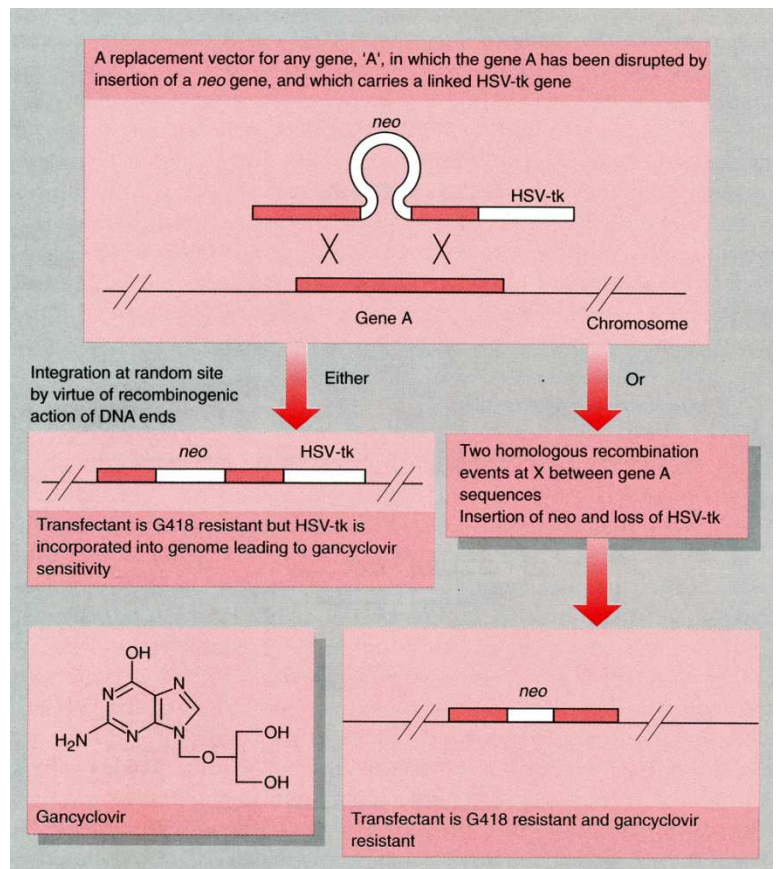
Один акт ГР – дупликация гена;

(G-418 устойчивость, gancyclovir чувствительность); те же последствия дает случайная интеграция.

Два акта ГР – замещение аллеля.

(G-418 и gancyclovir устойчивость).

Нужно провести селекцию на два акта ГР (негативно – позитивная).



Идентификация клеток, несущих трансген в специфическом сайте, с помощью ПЦР:

Ввести мутацию в ген можно за счет двух рекомбинация – берется циклический вектор с нужным геном с нужной мутацией и двумя маркерами, первая рекомбинация приводит к дупликации гена (один старый, другой новый) и вводу обоих маркеров, их отбирают по позитивной селекции, потом ждут второй рекомбинации (она вырезает оба маркера и с вероятностью ½ оставляет ген с нужной мутацией) и делают селекцию по негативному маркеру.

Трансгенная мышь

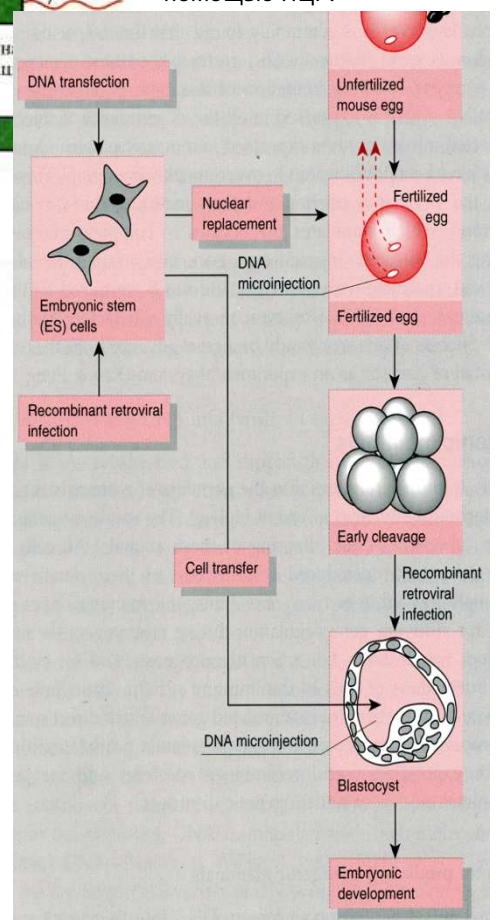
1. ES культура

переносят в эмбрионы мыши на стадии бластоцисты;

дифференцировка клеток, часть половых клеток несет введенную мутацию (мозаичные мыши);

их потомство гетерозиготно по трансгену (ПЦР ДНК хвоста).

При скрещивании гетерозиготных мышей получают гомозиготные по данной мутации мыши.



2. Микроинъекция ДНК в оплодотворенное одноклеточное яйцо;
3. Инфицирование эмбрионов рекомбинантными ретровирусами, затем имплантация.

Системы специфической рекомбинации: Cre-lox, Flp-frt

Cre – вирусная специфическая (только в определенных местах) рекомбинация. Система такая – если наш ген фланкирован с обеих сторон прямыми повторами loxP то при добавлении рекомбиназы можно вырезать ген (в виде кольцевой структуры) - в хромосоме останется один loxP.

Систему можно прогонять и в обратную сторону (т.е. экспрессируем рекомбиназу и добавляем много циклической ДНК с нашим геном и loxP – он встроится. Для этого нужны штаммы клеток с loxP в хорошем месте.

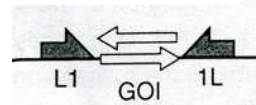
Кроме того это позволяет делать условные нокауты – фланкируем интересующий ген loxPами, когда нужен нокаут активируем синтез рекомбиназы. Это позволяет работать с летальными мутациями.

Факт P1: Cre (causes of crossing over) – рекомбиназа,

loxP - инвертированный повтор (13 bp инвертированные повторы и 8 bp центральная область).

Дрожжи: FLP – рекомбиназа,

FRT – инвертированные повторы.



Условный нокаут (conditional gene inactivation): Скрещивание с трансгенной мышью (Cre/FLP под контролем индуцибельного промотора).

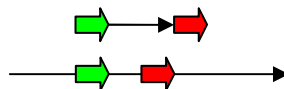
Индукция приводит к делеции гена GOI.

Интеграция в уникальный сайт (RMCE, recombinase-mediated cassette exchange)

Т.к. сайт специфические рекомбиназы имеют специфические сайты то при фланкировании гена с двух сторон разными сайтами можно избежать вырезания гена, а оставить только его замену:

Негативная селекция (устойчивость к ганцикловиру)

“Promoter trap” Позитивная селекция (устойчивость к G-418)



можно встроить верхнее в нижнее при экспрессии обеих рекомбиназ, но при этом точно ген не вырежется

Интерференция РНК

Генетический нокаунт (knock-down). Антисмысловые технологии – ввод комплементарного мРНК олигонуклеотида (РНК или ДНК) при этом образуется дуплекс что приводит к аресту трансляции (рибосома не может разрушить дуплекс) но возможно что более важен механизм нуклеазного расщепления – РНКазы разрушают РНК в гетеродуплексе с ДНК. Кроме того олигонуклеотид может сам гидролизовать РНК.

Собсно интерференция РНК. Неожиданно оказалось что смесь антисмысловой и смысловой РНК подавляет экспрессию в несколько раз лучше чем только антисмысловая РНК (или ДНК). Т.е. эффективно подавляет экспрессию двухцепочечная РНК. Работает так: фермент DICER режет введенную РНК на двухцепочечные куски по 20-25 п.н., потом комплекс RISC (RNA induced silencing complex) хватает эти двухцепочечные РНК, далее под действием АТФ одна из нитей выкидывается, потом комплекс ищет мРНК комплементарную ее олигонуклеотиду и режет ее. В растениях и нематодах этот путь еще может усиливаться – там маленький фрагмент используется как праймер (старт) для РНКзависимой РНКполимеразы - она по мРНК стоит ей комплементарную цепь и в итоге количество двухцепочечной РНК возрастает и подавление идет каскадом, может даже передаваться в соседние клетки. Кроме того при интерференции может идти подавление экспрессии на уровне транскрипции – мешает транскриптазе.

Особенности интерференции РНК в млекопитающих. Долго считали что в млекопитающих интерференция не работает. Дело в том что двухцепочечная РНК вызывает активацию PKR он фосфорилирует eIF2 что приводит к тотальной подавлению трансляции. Кроме того двухцепочечная РНК активирует РНКазу L которая просто гробит все мРНК. Все это контролирует интерферон. Поэтому казалось что при вводе двухцепочечной РНК просто происходит подавление трансляции. Но оказалось что в млекопитающих система для интерференции есть (есть DICER и RISC). Но чтоб все работало надо отключить интерфероновую систему. Для этого используют двухцепочечные РНК длиной 20-30 то интерфероновый ответ не работает, а интерференция РНК работает, поэтому в млекопитающих используют короткие РНК для интерференции.

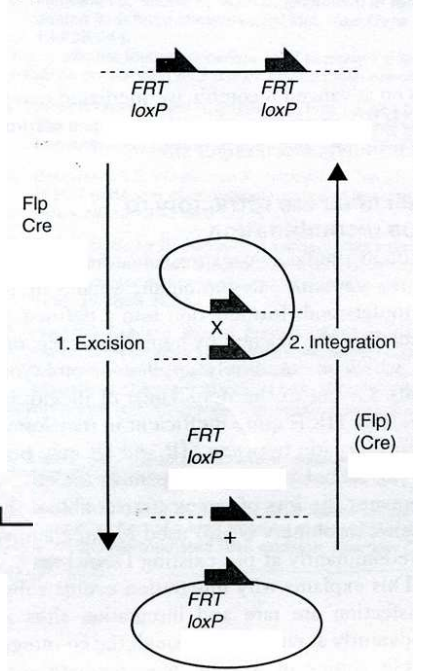
Интерференция удобнее тем что она быстрее, проще, дешевле, и эффект можно контролировать количественно. Как делают siRNA – химически, транскрипция in vivo, при помощи рибонуклеазы III или DICER, еще можно ввести плазмиду с которой прямо в клетке будет синтезироваться то что надо.

Для работы нужно 3' выступающие концы – dUdU или для устойчивости dTdT.

Химически синтезировать довольно дорого (тем более что РНК синтезировать сложно). Еще они не стабильны в клетке и время работы мало... Преимущества химического синтеза в том что модификациями РНК можно ее стабилизировать.

Транскрипция in vivo. Под T7 промоторы ставят нужные РНК (в обеих ориентациях) и дальше в бактериях все синтезируется. Так дешевле чем химический синтез, потом ее можно нарубить DACERом если надо в млекопитающих. Но это по прежнему плохо т.к. надо вводить РНК в клетку – эффективность медленная и короткая. Плюс про делении клеток РНК

(a) 'in' and 'out'



разводится. Если белок чью экспрессию подавляем стабилен то придется долго лить РНК чтобы его убрать. Хочется таки синтезировать siRNA прям в клетке. Кроме того эффективность трансфекции РНКой низкая для некоторых клеток

siRNA Expression Vector Design

Экспрессионные векторы для siRNA.

Шпилечный вариант:

промотор (специальный промотор для синтеза коротких рнк – например под третью полимеразу) __ прямая ориентация siRNA __ спейсер __ Обратная ориентация siRNA __ терминатор

Промоторы под 3-ю полимеразу еще хороши тем что с них не происходит полиаденилирования. Второй вариант когда обе ориентации синтезируются по отдельности с разных промоторов.

При шпилечном варианте шпилька потом процессируется клеточными белками которые отъедают шпильку – как правило на 3` чтонить остается – там ставят те самые UU которые зачем-то нужны.

Конкретные промоторы – H1, U6 и промоторы транспортных РНК.

Критерии выбора последовательности мишени (участка мРНК к которому берем комплементарный siRNA):

1. AA перед последовательностью мишенью (для этого как раз UU).
2. GC доля не более 30%
3. Не должно быть блоков из 4 (тем более 5) А или Т – это терминация транскрипции
4. Отсутствие внутренних повторов и палиндромов
5. Удаленность от инициаторных и терминальных кодонов (там белки связываются – могут мешать интерференции)
6. Отсутствие в этом месте сильной вторичной структуры РНК.
7. Термодинамическая лабильность 3` концевой участка siRNA.

Последнее нужно т.к. RISC выбирает в основном ту цепь чей 3` конец лабильнее. Т.е. RISC-то может выбрать любую из двух цепей, а нам нужна только одна – ее делаем так чтобы на ее 3` конце было поболее А-Т, а на 5` - поболее G-C.

Еще специальные требования – некоторые позиции (3,10,13,19) должны иметь не совсем любой нуклеотид (А,У,АТС,АТ). 10 например связанна с тем что именно тут режется мРНК.

По siRNA можно делать как транзитные системы так и стабильные клеточные линии.

Эффективность проверяют разными путями:

1. репортерные гены – подавление экспрессии GFP
2. Подавление экспрессии эндогенных белков
3. Northern blot
4. Иммуноблот и т.д.

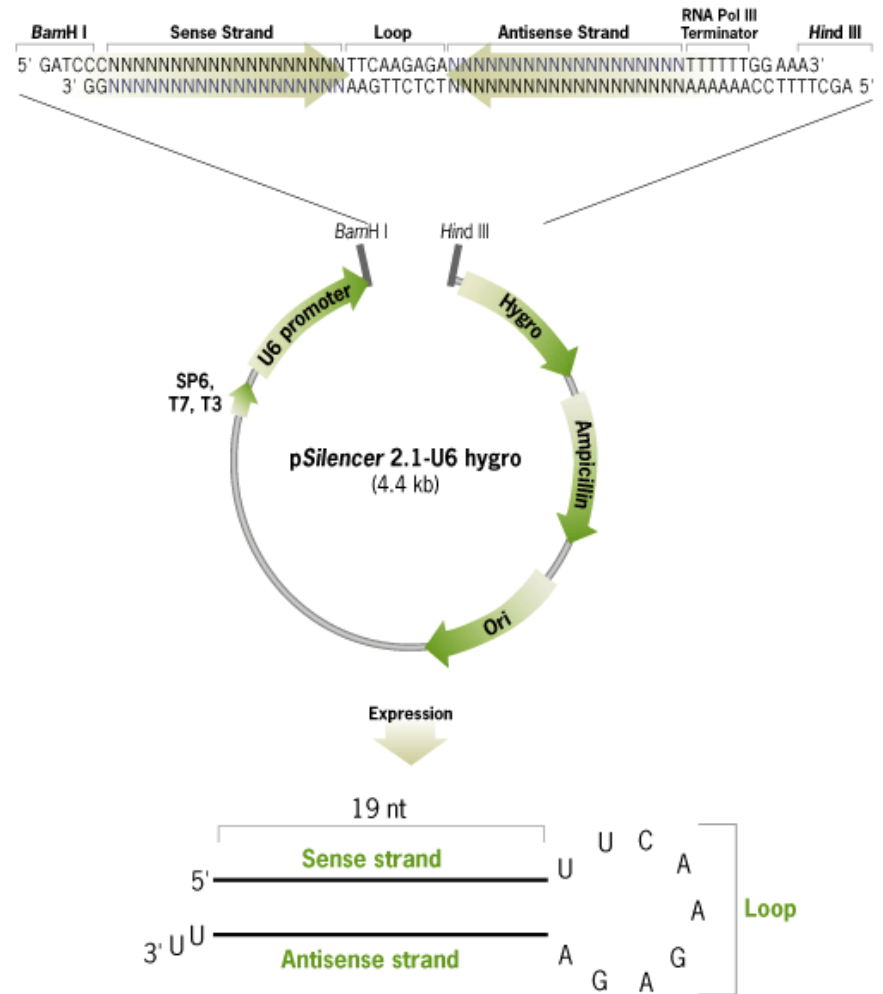
Итого механизмы подавления экспрессии:

1. Деградация мРНК siRNA
2. Ингибирование трансляции miRNA
3. Хроматиновый сайленсинг (видимо связан с метилированием)

Отличие miRNA от siRNA: в siRNA комплементарность строгая и мРНК расщепляется. miRNA может быть не строго комплементарен, при этом происходит арест трансляции. Процессинг и mi и siRNA делают одни и те же белки (DAICER).

При интерференции могут быть разные артефакты – связывание с мРНК с неполной комплементарностью – в итоге по мРНК результата не видно (хотя экспрессия подавлена) и еще неспецифический ответ клетки на двухцепочечную РНК.

Контроли:



1. Непохожая siRNA (со случайной последовательностью, или комплементарная к репортерному гену (GFP например).
2. siRNA к разным участкам мРНК – эффект должен быть одним и тем же
3. Мутация в siRNA
4. Экспрессия гена-мишени устойчивого к данной siRNA должно восстановить уровень белка мишени.

Генная инженерия растений 1

Методы записывания плазмид в клетки (тут проблема в клеточной стенке):

Particle bombardment – бомбардировка клеток – бомбардируют клетки кусочками металла с находящимися на них плазидами. Просто стреляют в лист. Как потом плазида попадает в ядро не ясно.

Protoplasts – можно специальным способом получить протопласты – клетки растений без клеточной стенки. Их можно получить из суспензионной культуры (они хороши тем что в отличие от животных живут почти вечно (держат по 30 лет). Потом протопласты можно уже обыкновенно электропорировать или PEG-трансформация (при помощи полиэтилен гликоля, как-то он помогает пролезть плазмиде через мембрану).

Далее можно осуществлять временную (транзиентную) экспрессию данных генов в суспензионной культуре. Для получения трансгенного растения надо регенерировать растение из протопласта или суспензионной культуры. Для этого просто надо просто надо налить гормонов.

Можно сливать протопласты с получением двуядерных клеток. Регенерировать растение можно до калуса (твердая шаровидная колония неспециализированных клеток) или до нормального растения, его можно посадить в землю. Можно получить калусы из двуядерных клеток – результата слияния дрожжи и растения. Таким образом можно вводить в растительные клетки дрожжевые плазмиды или хромосомы.

Agrobacterium – агробактериальный перенос ДНК. *Agrobacterium* – род почвенных бактерий образующих корончатые галлы икосматый корень на корнях растений (*fumefaciens* и *rhizogenes* – конкретные виды этого рода). Эти образования – что-то вроде раковых опухолей растений. У агробактерии есть специальная плазида Ti – плазида (*tumor inducing*) у *fumefaciens* и ее аналог Ri-плазида у *rhizogenes*.

У этой плазмиды есть специальный участок который переносится в геном растения – tDNA (transferred DNA).

Подробнее о Ti-плазмиде. От 200 до 800 кБ. tDNA – около 20-30 кБ. В tDNA кодируются ферменты метаболизма гормонов – аукина и цитокина – что приводит к более активному росту клеток.

tDNA фланкируют левый и правый бордеры (LB, RB) – они собственно и отвечают за перенос. LB и RB являются прямыми повторами почти строго консервативной последовательности *ggcaggatac/ga/ggt/gtctaa/tt/c* – всего там может быть около 25 по.

Не понятно каким образом (учитывая что повторы прямые) определяется полярность переноса (а перенос начинается с RB) – считается что там рядом есть специальные последовательности *overdrive* (но как они работают не понятно) который указывают что это RB.

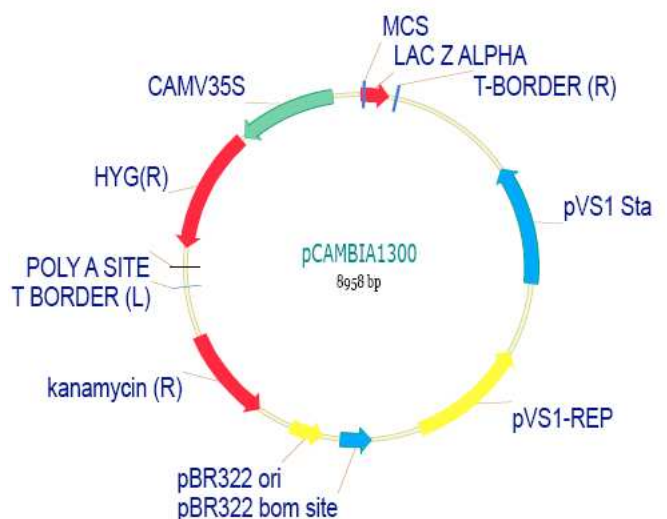
Перенос происходит так – между 3 и 4 нуклеотидом RB белок вирулентности VirD2 делает разрез и связывается ковалентно с 5-концом. VirD1 режет на левой границе. Далее перенос идет в одноцепочечной форме. VirE2 окружает одноцепочечную ДНК и отплетает ее. Плюс он помогает переносу по специальному каналу – T-пилю между бактерией и клеткой растения. Плюс к этому еще переносится белок VirF (всего переносится в клетку растения 3 белка). У этих белков есть сигнал NLS (во всяком случае он есть у VirD2).

Белки VirA и VirG – VirA экспонирована на поверхности клетки агробактерии, а VirG – внутренний меснджер. Эти белки обеспечивают связывание агробактерии на корневых последовательностях за счет рецепции на фенол сахара. При их связывании VirA фосфорилируется и фосфорилирует VirG.

VirB белки делают пили. Изучены хорошо VirD2 и VirD5. Пили считаются что сделанны из VirD2.

Интеграция в геном идет почти случайно. Для интеграции нужна небольшая консенсусная последовательность частично комплементарная левому и правому бордеру. Помогает наличие рядом полиТ и плохо идет встраивание в центромерные области. Происходит встраивание, лигирование и достраивание нити. Т.е. хромосомная ДНК плавится, потмо tDNA приделывается по комплиментарности, происходит односторонний разрез хромосомной ДНК и она достраивается комплиментарно по tDNA, во второй нити ничего не встраивается. После репликации одна клетка будет иметь вставку а другая нет.

Чтобы использовать это для производства трансгенных растений использовали бинарную систему – Ti плазида (где на месте tDNA некоторая плазида в линейной форме), далее вводили плазмиду с нужным геном который гомологически рекомбинировал с tDNA и менял ее. Потом вводили плазмиду несовместимую с плазмидой стоящей изначально вместо tDNA и с третьей устойчивостью – она вытесняла то что получилось после рекомбинации. Сейчас все



белки вирулентности перенесли на другую плазмиду – Vir-helper. Используют агробактерию с Vir-helperom, а другой вектор (в который собсно бум все встраивать изначально растим в esoli).

Структура этого вектора: правый Бордер_ген устойчивости к антибиотику для растений_потом ген устойчивости к антибиотику для растений_ори для esoli и агробактерии_LacZ_и где-то там левый.

Генная инженерия растений 2

Пластидная трансформация. – в хлоропласты

Делают это гомологичной рекомбинацией при помощи RecA. Т.е. то что хотим вставить фланкируем слева и справа последовательностями гомологичными ДНК в определенном месте хромосом хлоропласта. Это можно делать т.к. в хлоропластах (в отличие от ядра) есть RecA зависимая рекомбинация. Это к сожалению видоспецифично – сейчас хорошо умеют делать только на табаке. Правда потом могут делать гибриды – переносят хлоропласты табака в клетки другого растения.

Из хлоропластов хорошо выделять бели – можно отделить сперва хлоропласты а потом уже из них выделять.

Можно получить многокопийные системы – в каждом хлоропласте по вставке.

Можно делать полицистронные гены.

Точные тарджетинг вставки.

Нет умолкания экспрессии – за счет РНК интерференции – слишком экспрессируемые ядерные гены глушат.

Вирусные векторы.

+РНК вирусы. Живут в цитоплазме.

Вирусные промотор – промоторы на –цепи (вроде работают только в дупликсе) которые нужны для репликасы которая делает субгеномные (не полные) +цепи – для экспрессии определенных вирусных белков. С полной геномной +цепи экспрессируется только сама репликаза она же и все кэпирует). У табачной мозаики есть кэпы.

Вставляют вместо белка оболочки нужный наш белок (по соответствующий промотор). В вирусном геноме оставляют транспортный белок – для транспорта вирусной РНК по плазмодесмам.

Проблемы – нестабильность вирусного генома – при наличии прямых повторов при репликации РНК происходит РНК рекомбинация. Поэтому в частности нельзя использовать два идентичных промотора – берут промоторы из родственных вирусов. Есть специальная область на 5конец помогающая трансляции (с развитой вторичной структурой, псевдоузлами и тРНК подобной структурой, она участвует в циклизации субгеномной РНК для трансляции) – ее тоже можно поставить около нашего гена (но тоже из другого вируса). Обычно она около белка оболочки, его можно вбросить но тогда заражение будет хуже распространяться по всему растению. Поэтому белок оболочки оставляют а экспрессию нашего гена ставят под промотор белка оболочки из другого вируса и с 5-областью из другого же вируса (чтоб избежать повторов). Еще зачем-то и белок оболочки берут из другого вируса.

Есть еще вариант вставить наш ген в вирусный полипептид (потом нарезаемый вирусной протеазой) между сайтами протеолиза.

Еще можно взять весь геном вируса, отфланкировать промотором и терминатором для транскрипции в ядре. Вставляют его в ядро при помощи агробактерии. В итоге клетка сама будет экспрессировать вирусную ДНК. Это называется **агроинфильтрацией**.

При помощи рекомбинации белком Cre можно использовать 3 агрокультуры – с Cre, с частью вирусной кДНК доместу к которому надо приделать наш ген с сайтом для Cre, и третья агробактерия с нашим геном и сайтом для Cre. Прямо в растении все соберется. Еще аналогичную сборку нужного вирусного генома прямо в растении можно при помощи трансплайсинга.

Синтез пептидов эксонированных на поверхность на поверхность вирусной частицы для адской простоты очистки....

Апоптоз:

Протеазы каспазы – высокоспецифические цистеиновые протеазы. Расщепляют после аспарагина в определенном контексте. Например DEVD. Часто NLS может откусываться каспазой.

До 40 кД белки свободно диффундируют через ядерную пору, NLS – положительно заряженный обычно полипептид, способствует активному транспорту в ядро. Иногда и маленькие белки имеют NLS – чтоб накачиваться в ядро.

История: искали белки с NLS и сайтом щепления каспаз около NLS. Несколько штук нашли и подтвердили. Интересно что нашелся среди них один бактериальный белок.

Это был белок VirD2. То что у него есть NLS – это не удивительно, но вот странно зачем у него сайт под каспазу. А у растений как известно каспаз нет вовсе (т.е. нет гомологов животным каспазам, а апоптоз у растений вполне похож). Вероятно протеазы – аналоги каспаз – есть и у растений. Поэтому эти аналоги стали искать используя VirD2 как наживку.

Сперва проверили гидролизует ли VirD2 человеческой каспазой. Оказалось гидролизует по двум сайтам – GERD и TATD.

Сделали белок – GFP-СайтыДляКаспаз-NLS, и экспрессировали его в растениях (в вирусах). Пока клетка здорова белок должен быть чисто в ядре. Если есть «растительная каспаза» то при апоптозе ядерная локализация должна нарушиться. Что и наблюдали. Потом поставили контроль – попортили сайты для каспаз – вместо аспарагина поставили аланин (в обоих сайтах) в итоге при апоптозе белок из ядра не выходил. Т.е. похоже у растений каспазы есть.

Дальше стали искать белки. Экстракты апоптотических клеток делили на фракции и смотрели протеолитическую активность по отношению к VirD2. Долгими последовательными итерациями – деление на фракции, выбор нужной фракции получили конкретный белок. Потом масс-спектрометрия и в итоге обычно можно белок идентифицировать.

Им оказалась субтилизин-подобная протеаза. К этой группе относятся обычно не специфичные протеазы. А эта оказалась исключением. Это сериновые протеазы.

Потом сделали рекомбинантный белок и оказалось что он именно то что надо – специфическая протеаза и щепит VirD2. Потом проверили что это протеаза сериновая –точным мутагенезом – все сошлось.

В здоровых клетках эта протеаза неактивна и находится в виде белка предшественника (с про-доменом). Вопрос необходим ли этот белок для апоптоза? Каспазы обычно ингибируют при помощи пептида типа сайта который распознается этой каспазой с альдегидом на конце который вяжет цистеин. Сделали такой же ингибитор для той же субтилизин-подобной протеазы и показали что в его наличие апоптоз подавлен.

Потом сделали интерференцию РНК – апоптоз опять нарушился. Потом можно сделать гиперэкспрессию этой протеазы – апоптоза стало больше. Т.е. это точно аналог каспазы!

Осталась проблема: у VirD2 – было два сайта (в экстрактах он щепился по двум местам) а эта протеаза щепила только в одном месте. Кто же щепит во втором месте? Его нашли точно так же. Это оказалась поаин-подобная протеаза (цистеиновая)

Вот в чем еще вопрос, а зачем же сайт щепления каспазами в VirD2??

Мысль что каспазы просто рекрутируются для защиты от агробактерии. Сделали агробактерию без сайтов для протеаз (если это верно то такая агробактерия будет заражать гораздо круче). В качестве меры степени заражения использовали GFP встроенный в тДНК. Оказалось что у агробактерии с VirD2 без сайтов для каспаз GFP светится гораздо круче и следовательно активность трансформации выше. Проверили что у растений с гиперэкспрессией каспаз хорошая резистентность к агробактерии. Но на мутантный VirD2 (без сайтов) эта резистентность не действует.

Механизмы синтеза и регуляции синтеза белка у эукариот (млекоов)

У эукариот около 10-12 белков отвечают за инициацию трансляции.

Т.к. сплайсинг мРНК идет долго, то быстрая регуляция идет на уровне трансляции, при этом в основном на стадии инициации.

На 5' конце – кэп, на 3' – поли А (около 100 шт). На поли А сидит белок PABP (poly A binding protein) – в нескольких копиях. Перед ORF может быть место для белкового или РНКового регулятора. UTR = НТО – untranslated region. 5' UTR – до килобазы, 3' UTR – до десятков килобаз. UTR отвечают за регуляцию.

Механизм инициации трансляции:

1. На КЭП садится белковый комплекс, КЭП узнается белком 4E, висящим на белке 4G (этот белок основа комплекса – там еще 4A и 4B). 4A тратя АТФ плавит вторичную структуру РНК.
2. Потом сюда подходит малая субъединица рибосомы вместе с набором факторов (2 например несет инициаторную РНК) и садится на 4G. Во взаимодействии участвуют факторы инициации.
3. Начинается процесс сканирования. Рибосома ползет по РНК, хеликаза 4A плавит шпильки а рибосома ищет ANNAUGG. -3 – пурин, 4 – пиримидин. Почему такой контекст – неизвестно.
4. Только на стартовом кодоне приходит большая субъединица рибосомы, при этом факторы уходят.
5. Начинается синтез белка.

Удаление КЭПа убивает трансляцию на порядок.

Регуляция – ограничение доступа к КЭП. PABP (поли А связывающий) тоже связывается с 4G (все это вместе eIF4). За счет этого мРНК циклизуется. Поэтому поли А хвост участвует в инициации... Циклизация может быть нужна для того например чтобы рибосоме от стопа идти было ближе к старту, но вероятно основная роль – в стабилизации инициаторного комплекса. Один из путей направления мРНК на деградацию – отрезать поли А, после этого все немного разваливается, специальный белок отрезает КЭП, потом мРНК совсем съедаются. Наоборот активация белкового синтеза в зиготе после оплодотворения может происходить за счет навешивания полиА. Как там конкретно происходит не понятно – но факт – в цитоплазме до оплодотворения куча мРНК без поли А, а после оплодотворения на них появляются поли А.

Белок 4E может инактивироваться 4E-BP1 (4E binding protein). 4E-BP1 связывается с 4E так что у 4E закрыт участок связывания с 4G. Фосфорилирование (у него 4 сериновых сайта) 4E-BP1 понижает его сродство к 4E. А именно навешивание первых 2-х фосфатов открывает сайт для фосфорилирования еще одного серина, фосфорилирование его открывает 4 сайт, и только при наличии 4 фосфатов репрессор вовсе отпадает.

Это все регуляция не специфическая. Хотя у некоторых РНК зависимость трансляции от КЭПа разная. А 4E-BP ингибируют КЭП-зависимую трансляцию.

Второй фактор который существенно регулируется (приводя к глобальной регуляции) – eIF2 фактор инициации – тот что тащит инициаторную тРНК. Он состоит из 3-х субъединиц (альфа-бета-гамма), он идет в комплексе с тРНК и GTF, GTF нужен для ухода факторов после начала синтеза белка. Он уходит с GDF (к которому афинность у эукариотического eIF2 в 10 раз больше чем к GTF). Замену GDF на GTF делает специальный фактор – eIF2B. При фосфорилировании альфа- eIF2 она начинает очень сильно связывать eIF2B, а последнего гораздо меньше чем eIF2 и в итоге замена GDF на GTF ингибируется. Такое тотальное подавление трансляции используется при вирусной инфекции. Это идет по интерферон-зависимому пути. При тепловом шоке тоже так происходит. Вообще любой стресс приводит к подавлению трансляции и в основном по последнему пути.

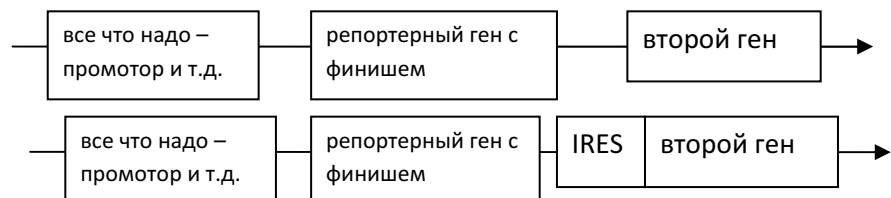
Всей этой системы кстати нет у бактерий.

Неканоническая инициация трансляции.

У некоторых мРНК нет КЭПа...а иногда и поли А нет. Это обычно у вирусов.

Например у полиовирусов на 5' конце висит ковалентно прикрепленный белок, плюс 5' нетранслируемая область – 700 п.о. с адской вторичной структурой.

Считается что IRES (internal ribosome entry site) – вторичноструктурная РНК пред AUG которая сажает рибосому рядом с AUG.



Сделали простой эксперимент:

в первом случае белка со второго гена почти нет, а во втором – есть.

У полиовируса – IRES около 400 п.о. – очень много.

Самый короткий IRES – у гепатита С – около 300.

Определение механизма работы IRES – выделили все факторы. Смотрели работает или нет по тому села рибосома на старт или нет. Это делают topprintingом – делаем праймер за рибосомой, с него запускаем ревертазу – если рибосома сидит то получаются короткие куски, если не сидит то ревертаза идет дальше. Длина полученных олигонуклеотидов (если рибосома сидит) одинаковая с точностью до 2-3 нуклеотидов (за 16-18 нуклеотидов до старта). Далее ищут

факторы необходимые для инициации трансляции по КЭП – не зависимому механизму – перебирая все комбинации факторов. Оказалось что нужны все факторы кроме 4E собственно узнающего КЭП.

Как IRES связывается с рибосомой.

Факторы, малую субъединицу рибосомы, тРНК – все выделили. мРНК можно синтезировать с ДНК прям в пробирке по рецепту – есть коммерческие киты.

Для Т7 полимеразы первый нуклеотид лучше пурин, и лучше G (в РНК) – лучше несколько. Для терминации Т7 полимеразы удобно использовать просто линейную мРНК – в пробирке всегда делают с линейной. Если полученную мРНК надо кэпировать то можно использовать кэпирующий фермент (есть киты) – это фермент бывает у вирусов. Раньше КЭПировали так – брали первый нуклеотид цепи уже кэпированный. Он может встроится только в начало цепи. Чтобы он точно вставал всегда в начало – его берут в 5 раз больше чем просто GTA (G – первый нуклеотид цепи). Но еще беда в том что такой КЭП может сесть наоборот и тогда будет черт знает что.... для этого ему метилируют 3'остатк. Поли А можно вводить прям в плазмиду – но слишком длинный поли А обычно деградирует в плаزمидлах. Поэтому иногда ДНК непосредственно для транскрипции готовят ПЦРом вводя на праймер поли А.

Вернемся к IRESам – матрицу синтезировали с IRESom.

Все факторы кроме КЭПсвязывающего оказались нужны. На IRES садится большая субъединица инициаторного комплекса 4G, хеликаза тоже есть, 4G привлекает малую рибосомную субъединицу, этому очень помогает один вспомогательный белок – РНК связывающий (пиримидин-тракт-связывающий). При этом у 4G есть КЭП связывающая часть (вернее 4E связывающая) и IRES связывающая. КЭПовую часть можно отрезать и IRESы будут чудесно работать. Равно как и циклизация мРНК особенно не нужна. У вируса есть специальная протеаза которая отрезает от 4G всю КЭПовую часть. Другие вирусы дефосфорилируют репрессор 4E – и 4E дохнет – т.е. вирусы подавляют КЭПзависимую трансляцию.

IRESы бывают очень разные, они наверно независимые.

Гепатитному IRESу вообще не нужны почти никакие факторы – кроме буквально пары – кажется тех что сидят на рибосоме (ташат инициаторную тРНК). Оказалось что малая субъединица связывается с IRESom без каких бы то ни было дополнительных белков. При этом IRES распознает именно рибосомные белки, и строго в определенном месте так что стартовый кодон оказывается ровно где надо!

Еще вирусы подавляют циклизацию мРНК. При апоптозе тоже подавляется трансляция.

У некоторых мРНК есть уникальные специфические механизмы регуляции.

Медь-связывающий белок церулоплазмин – убивает бактерий. Его экспрессия тонко регулируется на стадии трансляции – при этом мРНК не деградирует. Регуляторный участок у них в 3'конце. Там шпилька которая связывает один рибосомный белок (13A – от большой субъединицы) – 13A связывается только в фосфорилированном состоянии. Когда белок сидит трансляция не идет. На этот белок насаживается целая куча белков (в том числе аминоксил тРНК синтетаза – пролиновая и глутаминовая – это один белок с двумя половинами одна пролиновая другая глутаминовая а на мРНК эту она садится соединением между половинами). В общем они там набирают огромный комплекс совершенно разнообразных белков которые подавляют репрессию.

Стандартная схема – шпилька, на ней белок мешающий сканированию, при необходимости трансляции – белок уходит например появляется какой-нибудь реагент для реакции осуществляемой регулируемым белком).

микроРНК – ингибируют трансляцию. 1/3 мРНК регулируются микроРНК. микроРНК часто кодируются в интронах.

Похоже что белки (АРГОНАВТ... – вроде так называются) котый в комплексе с микроРНК садится на мРНК могут схватить КЭП (у него есть кусок похожий на 4E связывающий КЭП). Т.е. возможно что микроРНК косвенно закрывают КЭП для инициации (и ингибирование КЭП зависимое). Хотя есть люди считающие что дело в деградации мРНК. Но вроде показано что на мРНК с IRES микроРНК влияния не оказывают.

Selex (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 1

У НК бывают каталитические функции, или они могут давать антитела.

Идея в том что устраивают эволюцию НК по их способности связывать интересующее нас соединение.

Интересуют разумеется одноцепочечные НК. Делают так:

Начинают с набора случайных ДНК последовательностей фланкированных участками для связывания праймеров, и с одной стороны Т7 промотор для Т7 РНК полимеразы. С них синтезируют кучу одноцепочечных РНК (они уже без промотора) – их называют аптамерами. Потом проводят селекцию – используют колонку с иммобилизованным лигандом (на который хотим получить антитело), оставляют наиболее аффинную фракцию. Ее ревертируют, потом полученную ДНК ПЦРят вводя Т7 промотор. Далее цикл повторяют. Вообще говоря по умолчанию мутагенеза нет.

Получение рандомизированного участка – при помощи химического синтеза, одна стадия – присоединение одного нуклеотида:

1. Полностью рандомный синтез – химический синтез, на каждой стадии вводят А:С:G:Т = 3:3:2:2 – т.к. основания включаются с разной эффективностью
2. Случайный мутагенез имеющийся последовательности – при синтезе вместо чистого G (например) вводят G с небольшими добавками других оснований.
3. Можно рандомизировать конкретно данный участок если известно что белок связывается именно им.

Selex (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 2

Проблема в том что если рандомных остатков более 20-30 то исходная библиотека заведомо не содержит все варианты – иначе надо слишком много ДНК (просто по массе). Полную библиотеку можно иметь только при <15-20. Если рандомных остатков много то полнота библиотеки зависит от массы ДНК взятой для эксперимента. Поэтому делают много циклов ПЦР и в большом объеме на стадии амплификации.

SELEX можно делать и на РНК и на ДНК. У РНК есть существенное преимущество – ее можно экспрессировать *in vivo*. Для одноцепочечной ДНК это невозможно. Но РНК менее стабильна.

оцДНК можно получить ассиметричным ПЦР. Еще можно один из прамеров связать с биотином, потом в денатурирующих условиях на колонке разделить оцДНК с и без биотином. Еще можно ввести в ДНК праймер ближе к 3 концу один рибонуклеотид. Его можно погрызть щелочью а потом цепи разделить по длине.

Методы селекции:

1. Аффинная хроматография
2. Фильтрация через нитроцеллюлозу. Мешают аптамеры с нужным белком и фильтруют. Белки задерживаются, вместе с ними задерживаются аффинные РНК. Потом например денатурируют и выделяют НК.
3. Можно получать антитела прямо к клеткам – при помощи фугирования. То что не связалось с клетками остается в растворе, то что связалось – осело вместе с клетками – потом можно отмыть. Можно проводить селекцию и по связыванию с клетками и по несвязыванию. Можно получить специфические НК к определенному типу клеток.
4. Можно делать иммунопреципитацию. Антитела на белок к которому мы получаем НК для его связывания.
5. Электрофоретическое разделение – mobility shift – НК, белок, НК+белок – образуют разные полосы на форе, берем только НК+белок и амплифицируем.
6. Можно автоматизировать на планшете. Наш белок сорбируется на стенки планшета (неспецифически, можно наверно нашить и антитела). Та НК что не отмывается амплифицируется и запускается в следующий цикл.

Селекция ведется в какомто буфере/температуре. Буфер должен максимально имитировать условия в которых потом будем работать. Температуру выбирают в соответствии с следующим компромиссом – надо чтоб белок не денатурировал, с другой стороны при низкой температуре у НК структура слишком жесткая.

Какую брать жесткость селекции – ее надо постепенно поднимать – чтобы на первых циклах не потерять чтонибудь важное. Для поднятия жесткости можно уменьшать кол-во белка мишени и соответственно увеличивать отношение НК/мишень. Еще жесткость можно регулировать конкуриторами – неспецифическими заместителями НК – тРНК, гепарин. Можно даже добавлять специфические конкуритора – т.е. специфические лиганды для белка – можно отобрать аптамеры для другого сайта (не того к которому связывается конкуритор) и плюс для увеличения конкуритования. Время связывания тоже постепенно уменьшают.

Амплификация. Обязательно ставить контроли – на без матрицы. Надо оценивать заранее на аликоте оптимальное число циклов – чтобы не накопить артефактов. Иногда лаборатория (реактивы и инструменты) насыщаются данным репликоном – т.е. все грязное и данный репликон амплифицируется везде. Надо сменить праймеры, реактивы, инструменты, лабораторию.

Когда остановить селекцию? Когда остановился рост связывания.

Что делать с результатами – набором аптамеров? Секвенировать! Секвенировать надо несколько клонов, хотя бы 50 – т.к. обычно SELEX обогащает результат одним аптамером, а если нужна статистика (сравнение последовательностей) то хочется иметь хотя бы 2-3-4 разных последовательности аптамеров. Потом можно делить на семейства, искать мотивы. Делеционный анализом можно сделать минимальный аптамер. Определить структуру. Footprintingом можно найти собственно сайт связывания белка. Аналогично точечными модификациями можно найти основания важные для связывания.

Интересная структура – G кварталы – две пары G-G соединенные вместе, еще псевдоузлы – почему-то часто находятся в аптамерах.

Контрселекция – отбор не по связыванию а по несвязыванию – для отбора аптамеров только к раковым (но не к нормальным) клеткам.

Иногда чередуют селекцию к клеткам и к белкам – чтобы аптамер связывался именно с данным рецептором и именно в нативном состоянии – например к наружной его стороне (а не к внутримембранной например).

In vivo imaging – детекция нужных клеток. В аптамеры вводятся метка, они лучше антител тем что меньше и легче проникают в клетки. Если РНК модифицировать, конъюгировать с ПЭГи или включить в липосомы они долго циркулируют в крови и они мало иммуногены.

Blended SELEX – есть ингибитор к данному белку но слабый, привязывают к нему нашу библиотеку и проводят селекцию – мы получим аптамер к месту связывания ингибитора – рядом с активным центром.

Создание аптамера к двум родственным белкам – используют то один то другой белок для селекции по очереди.

Анти-идиотипический подход. Можно получить имитаторы данного белка получив антитело к антителу к данному белку. Если делать аптамер к антителу к белку – можно получить структурные имитаторы. Удалось сделать имитатор NES – аптамер связывался с рецептором на NES и ингибировал связывание рецептора с NES.

Удалось получить аптамеры на паразитических трипаносом.

Аптамеры можно применять в терапии: Ингибиторы роста опухоли – связывает фактор роста сосудов в опухолях – уже применяется.

Микрочипы (microarrays)

Иммобилизованные куски ДНК. Либо это кДНК либо олигонуклеотиды. Бывают одно и двухкрасочные. Бывают мембранные и гелевые. Задачи микрочипового эксперимента – исследование профиля экспрессии. Генотипирование.

кДНК микрочипы.

На чип закрепляют 2-х цепочечные кДНК длиной около 1000 п.н., число генов около 20000 – т.е. примерно весь геном. На каждой ячейке чипа – по данной кДНК.

Зонд – тотальная кДНК – берут тотальную РНК и в процессе обратной транскрипции кДНК метят Су3 или Су5 – один красный, другой зеленый – вместо СТР). Так как обычно сравнивают экспрессию в двух типах клеток (тестовой и контрольной) – одну красят красной, другой зеленой. Меряют разницу. Таким образом можно провести сравнение, но сложно определить уровень экспрессии – сравнить экспрессию одного гена с экспрессией другого.

Микрочипы Affymetrix

На чипе олиги по 25 нуклеотидов – проба. Их синтезируют химически.

На каждую мРНК которую хотим детектировать делается по 22 олигонуклеотидов к разным участкам. 11 из них – РМ (perfect match) – полностью комплементарны мРНК. Еще 11 – ММ (mismatch) 1 нуклеотид в центре неправильный. Это для того чтобы понять какой фон. Если липнет слабо но на ММ и РМ одинаково то по идее это шум.

Наносят олиги фотолитографией. Цикл химического синтеза олигов – прицепляем нуклеотид, снимаем защиту с его 3 –ОН, вешаем следующий. Делаю так – защиту снимают светом, там где не надо присоединять данный нуклеотид наносят светонепроницаемую краску. Т.е. краску не наносят туда, куда надо присоединить данный нуклеотид.

Подготовка мишени. Выделяют мРНК или суммарной РНК клетки, потом реверсия – с полиТ праймера вместе с Т7 промотором. Получают двухцепочечную кДНК с Т7 промотором. Потом все чистят и далее амплифицируют НК при помощи Т7 полимеразы. Итоговую гибридизацию проводят одноцепочечной антисмысловой кРНК. кРНК метят биотином, потом кРНК чистят, проводят гибридизацию, отмывку и окрашивание – тут красить можно стрептавидин-фикоэритрин – что-то одно из этого вяжет биотин, другое светится. Еще кРНК можно метить аминоаллил УТР – к ней потом химически присоединяют красители Су3 и Су5.

Микрочипы для генотипирования.

Детектируют SNP. Идея такая – ДНК которая не может быть амплифицирована переходит в форму которая может быть амплифицирована. Берем данный SNP и делаем зонд:



тут наш SNP. Далее при помощи ДНК полимеразы и лигазы можно доделать этот зонд до циклического. Если давать только один нуклеотид то можно потом убрать все незациклизовавшиеся (при помощи экзонуклеазы). В итоге мы получим циклические молекулы для тех SNP что содержат нуклеотид добавленный на стадии полимеризации. Далее можно порезать этот цикл рестриктазой (чтоб не получалось продуктов типа катящегося колеса) и его потом амплифицировать ПЦРом. Если амплифицировался – значит в данном SNP этот нуклеотид.

Как определить таким образом 10000 SNP? К тотальной ДНК добавляется 10000 зондов (на каждый SNP) потом это делят на 4 пробирки и в каждой проводят полимеризацию-лигирование с данным нуклеотидом и потом экзонуклеазное расщепление. Далее все это амплифицируют в каждой пробирке используя свой флуоресцентный маркер. Потом все гибридизуют на чипе ко всем SNP. В идеале каждая ячейка раскрашена одним только цветом. Или двумя (если гетерозигота).

Белковые микрочипы

Это совсем не так универсально. На подложку наносят антитела, или синтезируют пептиды фотолитографией. Идентифицируют связывание белков из сложных смесей. Сперва инкубируют смесь с чипом, потом используют вторичное антитело с меткой неспецифически вяжущее все белки. Например при детекции а фосфорилированные белки – вторичные антитела на фосфорилированные аминокислоты. Еще можно все белки биотинировать а вторичные тела на биотин.

Можно сделать чип со всеми белками данного организма – можно с тэгом (используют полные библиотеки кДНК) – тогда все белки связаны в одной ориентации, можно пришивать химически – тогда ориентация произвольная. Потом можно смотреть какие белки с какими связываются. Или какие НК. Т.е. это средство для поиска белок-белок и белок-ДНК взаимодействий. Такие чипы бывают для дрожжей.

ChIP-on-chip когда хочется понять насколько специфично связывается данный белок с данной последовательностью ДНК. Делают так – берут геномную ДНК, фиксируют все белки на ДНК при помощи формальдегида например (т.е. смотрят на связывание in vivo), потом режут ДНК ультразвуком и осаждают антителами и А-белком, оттуда забирают ДНК и гибридуют его на чипах. Можно узнать с каким участком ДНК связывается этот белок in vivo.

NAPPA (nucleic acid programmed protein array) – элемент чипа состоит из плазмидной ДНК (с Т7-ген-GST) и хватающего элемента (антитела к GST). Все это заливают бесклеточной системой транскрипции-трансляции. Белок синтезируется прямо на месте и тот же связывается с близлежащим антителом. Это способ быстро сделать белковый чип – вроде он эффективней. Т.е. на чипе везде есть антитела на GST а плазмиды иммобилизуют на подложку в определенные места – там где потом будет соответствующий белок, плазмиды иммобилизуют авидином. Удобно тем что система трансляции эукариотическая и не надо выделять белок – нет проблем с денатурацией.

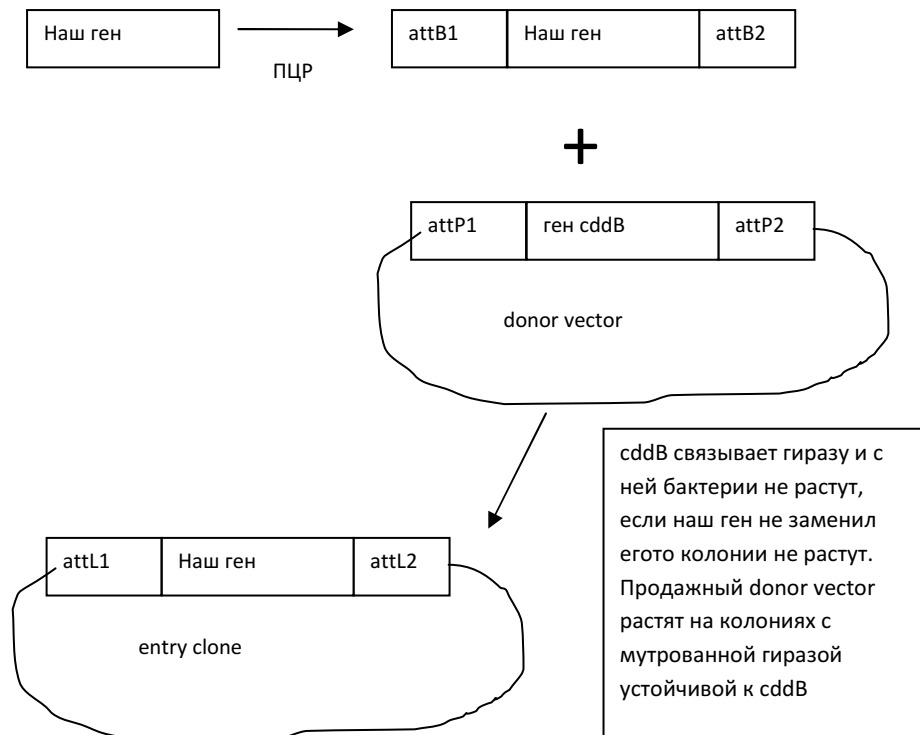
Микрочипами можно также определять делеции или амплификации ДНК – при помощи гибридизации на чипе тотально ДНК – там можно получать количественные характеристики.

Biosignature analysis – анализ всех белков при помощи масс-спектрометрии. Белки делают простецкой хроматографией (например ионообменной, или общей аффинной) а потом смотрят их спектры. Данный вид спектра ассоциируют с данной болезнью.

Gateway

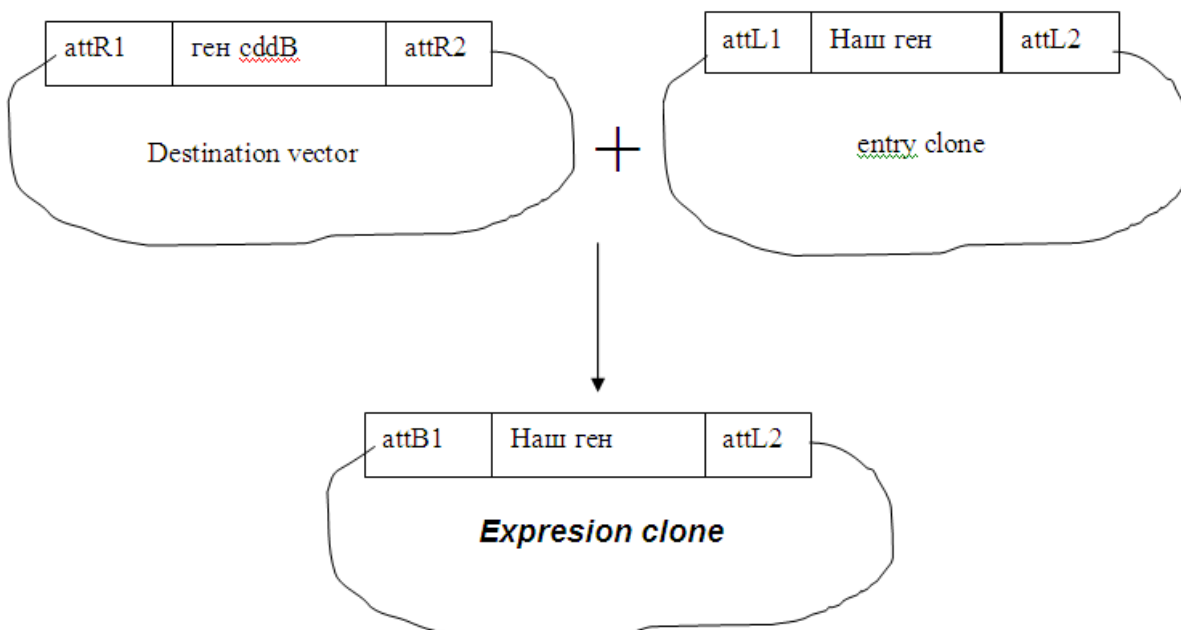
У фага лямбда лизогенная и литическая фазы. У фага кольцевая ДНК с участком (attP) идентичным куску бактериальной хромосомы (называется attB), по ним фаг может рекомбинировать в хромосому. За счет точно такой же реакции фаг может оттуда вырезаться. У фага эта последовательность 243, а у бактерии 25 п.о. Чтоб шла такая интеграция нужно два белка – интегразы (Int) и IHF (integration host factor – бактериальный белок), для обратной реакции (вырезания) еще нужен белок еще нужен Xis (вырезаза). При вставке вставленная фаговая ДНК оказывается фланкирована attL и attR. Эта рекомбинация хороша тем что она очень точная – ничего не теряется. На основе этого сделали систему для клонирования Gateway.

Делаем такую конструкцию:



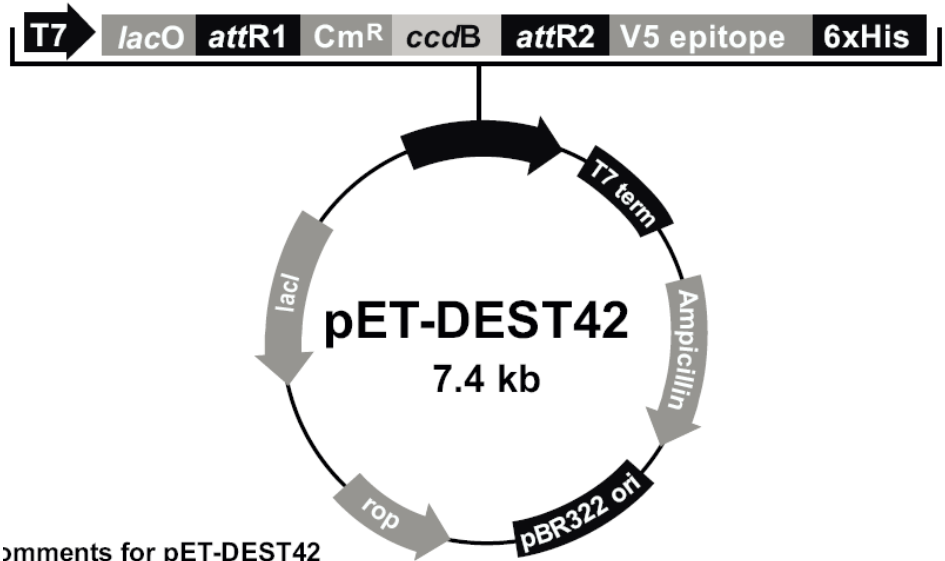
Еще entry clone можно получить стандартным способом при помощи рестриктаз, берем entry vector – как entry clone – у него стоит cddB, а между ним и attLами стоят сайты для рестрикции.

Destination vector – это вектор с данной системой для экспрессии (под теми или иными промоторами, для эукариот или прокариот и т.д.) в который легко перенести рекомбинацией наш ген из entry clone. Получив один entry clone можно потом наделать кучу плазмид на основе разных Destination vector.



Т.к. в Destination vector и в entry clone разные селективные маркеры можно отобрать то что надо. Т.к. интактный Destination vector и один из продуктов рекомбинации отберется по *cddB*, а при отборе по маркеру находящемуся в Destination vector то entry clone тоже издохнет. В зависимости от желания в Destination vector есть или нет *rbs*, *His(6)*, терминаторы транскрипции-трансляции, тэги на С и N концах.

Этой системой в последнее время все больше пользуются.



- T7lac promoter for high-level, IPTG-inducible expression of the gene of interest in *E. coli*
- Two recombination sites, *attR1* and *attR2*, downstream of the T7 promoter for recombinational cloning of the gene of interest from an entry clone
- Chloramphenicol resistance gene located between the two *attR* sites for counterselection
- The *ccdB* gene located between the two *attR* sites for negative selection
- V5 epitope and 6xHis tag for detection and purification
- Ampicillin resistance gene for selection in *E. coli*
- pBR322 origin for low-copy replication and maintenance of the plasmid in *E. coli*
- *lacI* gene encoding the lac repressor to reduce basal transcription from the T7lac promoter

Белок-белковое взаимодействие. Двугибридная система.

Двугибридная система плоха тем, что не дает точного ответа. Т.е. найденный белок может не связываться в родной клетке, или связывается через посредника.

Как доказать что найденный партнер правильный?

Белок X, его потенциальный партнер – Y. Берем антитела к X и осаждаем их через A-белок на гранулах сефарозы. Далее все флорезим и делаем иммуноблоттинг. Лучше всего это делать из лизатов клеток в которых собственно и интересует взаимодействие (в млекопитающих). Это называется копреципитация.

Здесь конечно есть проблема – это делают в лизатах, если например белки находятся в разных компартментах, то *in vivo* они не взаимодействуют.

Что еще можно сделать? Можно иммобилизовать X и пропустить лизат клеток через такую колодку. Если связывание есть то Y задержится. Потом его можно отмыть и вестернблотить.

Ну вообще взаимодействие допустим доказали, вопрос взаимодействие непосредственное или через посредника?

Получаем два очищенных рекомбинантных белка. X иммобилизуем на носителе через тэг. Благодаря тэгу знаем что X чистый. Y тоже чистим, потом их смешиваем, фугируем (иммобилизованный X падает в осадок, если есть связывание то Y тоже). Потом иммуноблоттинг. Контроль – все то же проделываем но вместо X сажаем только тэг. Чтоб не делать вестерна можно пометить Y радиоактивным фосфором по специально введенному сайту фосфорилирования и тогда можно просто мерить радиоактивность.

Можно X нанести на мембрану (форезом) потом поболтать мембрану в растворе с радиоактивным Y. У многих этих методов проблема – в ходе эксперимента один из белков (или оба) денатурируют. Остается только надеяться что потом он ренатурирует.

Для проверки специфичности взаимодействия обычно проводят точечный мутагенез. Если одной заменой можно убить взаимодействие то оно видимо специфично. Иначе на любой кислый белок мы можем поймать все основные.

Еще хорошо бы посмотреть ко-локализацию белков в клетке.

Но с этим тоже бывает весело. Например:

для Протеазины-альфа, двугибридной системой нашли *kear1* (ингибитор транскрипционного фактора, что-то там про оксидативный стресс). Все проверили как выше – все взаимодействует и при том специфично. Но на ко-локализации оказалось что белки живут в разных компартментах. Протеазины-альфа – в ядре, а *kear1* только в цитоплазме. *kear1* держит транскрипционный фактор в цитоплазме и так все и ингибирует. Как же это они партнеры?? Решили что *kear1* челнок – между ядром и цитоплазмой, но преимущественно выкачан из ядра. Ингибировали экспорт из ядра и все получилось - *kear1* собрался в ядре. Потом нашли сигнал экспорта и т.д.