

BTH stari izpiti

1. Kaj so posttranslacijske modifikacije? Naštej jih.

So vsakršne kemijske modifikacije proteina po translaciji na ribosomih. Spremenijo strukturo in funkcijo proteina; praviloma so encimsko katalizirane. Glikozilacija, fosforilacija, acilacija, konjugacija z lipidi, karboksilacija, sulfatacija, amidacija, hidroksilacija proteina.

2. Kakšne so strukturne lastnosti vektorjev?

Navedi razlike med ekspresijskim (EV) in klonirnim (KV) vektorjem.

Vsak vektor mora imeti ORI mesto (origin of replication), ki mu daje sposobnost podvojevanja (vsakič, ko se celica deli, omogoči prenos gena, ki smo ga vstavili). Selekcijski označevalci omogočajo razlikovanje med celicami, ki so vektor sprejele in tistimi, ki ga niso. Prav tako omogoči razlikovanje med celicami, ki so prejele vektor z insertom in tistimi, ki so prejele prazen vektor. MCS oz. poliklonsko mesto je restrikcijsko mesto, v katerega se vključi fragment tuje DNA. Promotorska zaporedja in zaključevalna zaporedja omogočajo sintezo rekombinantnih proteinov (v primeru ekspresijskih vektorjev).

Razlike:

- namen:

KV je namenjen pomnoževanju inserta v gostiteljskem bakterijskem sevu, EV pa izražanju rekombinantnih proteinov v gostiteljskem sevu.

- struktura:

KV je bolj enostaven po strukturi (ima vse osnovne strukturne lastnosti), EV pa ima poleg vstavljenega gena prisotne še dodatne informacije (zaporedja, zanke ...), da bo lahko celica izražala vstavljen gen. Najosnovnejša struktura, ki jo EV potrebuje, je promotor, brez njega se gen ne more izraziti. Sestavljen je še iz RBS (ribosome binding site), oznak na N-koncu, cepitvenih mest za proteaze, MCS, oznak na C-koncu, terminatorja in represorja.

3. Kakšno je tveganje pri nanašanju KI z rastnimi dejavniki (GF)?

Nenadzorovana aktivnost GF sproži rast maligno transformiranih celic.

Problematična je tudi stabilnost pripravkov pri sobni T°, ekscipienti lahko sprožijo denaturacijo proteina (izničenje funkcije ali celo povečanje toksičnosti (?)). Potrebni so nizki odmerki in nanos na nepoškodovano kožo. Uporabljajo se v Ki proti staranju.

4. Kateri dejavniki vplivajo na imunogenost proteinske učinkovine?

- formulacija (snovi, ki jih dodamo, npr. krioprotektanti)
- izbira ekspresijskega sistema
- profil nečistot (proces izolacije in čiščenja vpliva na pojav nečistot)
- način aplikacije (če apliciramo v podkožje (subkutano), potem se učinkovina tam dlje zadržuje in tako poveča možnost imunogenosti)
- odmerek (večji kot je odmerek, večja je možnost imunogenega odziva)
- trajanje zdravljenja, terapevtski režim (daljše kot je trajanje zdravljenja, bolj bo imunogen odziv)

- pogoji shranjevanja (spremenjena struktura proteinov lahko povzroči imunogenost)
- lastnosti pacienta

5. Kakšne so prednosti in slabosti prokariotskih ekspresijskih sistemov (ES)? Naštej 2, ki se najpogosteje uporabljata.

Bakterije

Escherichia coli, G -

+ : kratek generacijski čas, visoka gostota celic, poceni in enostavna gojišča, visok delež rekombinantnega produkta, dobro okarakterizirana genetika, uveljavljenost.

- : ni posttranslacijskih modifikacij, prisotnost endotoksinov, razlike v rabi kodonov, tvorba inkluzijskih teles, razgradnja s proteazami, neučinkovito izločanje produkta v periplazno in v gojišče

Bacillus subtilis, G +

+ : primernejši sistemi za izločanje rekombinantnih proteinov v gojišče, odsotnost endotoksinov

- : razgradnja s proteazami, slabše poznavanje genetike in fiziologije, potencialni pomisleki regulatornih inštitucij

□ G - bakterije: E.coli, Pseudomonas fluorescens, Caulobacter crescentus

□ G + bakterije: Bacillus subtilis, Bacillus brevis, Bacillus megaterium, Staphylococcus carnosus

6. Naštej vsaj 3 načine za transformacijo celic:

- neposreden način (vnos gole DNA): elektroporacija, biolistika, mikroinjiciranje ...
- posreden način (vnos s pomočjo vektorjev): plazmidi, bakteriofagi, fagmidi ...

7. Kaj so DNA ligaze, restriksijske endonukleaze (ER), biopharming (za obkrožit):

- **RE:** so encimi, ki na točno določenih mestih cepijo enoverižno in dvoverižno DNA; katalizirajo hidrolizo fosfoestrskih vezi v sladkorno-fosfatnem ogrodju verige DNA. Dobimo bodisi lepljive ali tope konce

- **Ligaze:** so od ATP odvisni encimi, ki sodelujejo pri procesih podvojevanja in popravljanja napak DNA; katalizirajo tvorbo kovalentne fosfodiesterne vezi med 5-fosfatom ene verige in 3-hidroksilno skupino druge verige (zlepijo to vez). Uporabljamo jih za povezovanje kompatibilnih koncev fragmentov DNA in za ligacijo insertov v vektorje

- **Biopharming/molecular pharming:** proizvodnja terapevtskih (gliko)proteinov v rastlinah (GMO); z genskim inženiringom vnesemo v rastlino/žival gen, ki kodira naš želen (terapevtski) protein □ dobimo gensko spremenjen organizem oz. transgeno žival/rastlino

Gene pharming = proizvodnja terapevtskih (gliko)proteinov v živalih (uporabimo celo žival, GMO)

8. Načini delovanja učinkovin proti psoriazii, vsaj 1 primer pri vsakem.

- vpliv na limfocite T (zmanjšajo aktivacijo, migracijo, št. limfocitov T): ALEFACEPT, EFALIZUMAB

- zaviralci TNF- α (blokirajo topno obliko TNF/izzovejo apoptozo limfocitov in monocitov):

ADALIMUMAB, INFLIKSIMAB, ETANERCEPT, CERTOLIZUMAB, GOLIMUMAB

- zaviralci IL-12, IL-23 (vežejo se na podenoto pd40, zavrejo izločanje obeh citokinov hkrati):

USTEKINUMAB, BRIANKINUMAB

9. Kaj so matrikini?

So peptidni fragmenti, ki nastanejo pri razgradnji makromolekul zunajceličnega ogrodja.

10. Načini vnosa DNA v sesalsko celico:

- **FIZIKALNE METODE:** elektroporacija (celico izpostavimo izmenjujočim električnim impulzom \square depolarizacija membran in tvorba por skozi katere vstopa DNA), mikrodermabrazija (DNA vnesemo v celico s pomočjo majhnih delcev zlata/wolframa), mikroinjiciranje (neposreden vnos v jedro celice)

- **KEMIJSKE METODE:** transfekcija s pozitivno nabitimi ioni (DNA obdelamo s polimeri npr. DEAE dekstran), transfekcija s kationskimi lipidi (DNA se združi z liposomom = lipopleks, ki prehaja celično membrano z endocitozo; DNA dostopa do celice po fuziji z membrano ali preko endocitoznih poti), transfekcija s $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ioni tvorijo precipitat z rekombinantno DNA, ki s fagocitozo vstopa v sesalske celice)

11. Katera metoda je najboljša za razbitje celične stene pri transgenih rastlinah?

Uporabljajo se fizikalne in kemijske metode.

Za industrijski nivo so najbolj primerne mehanske (fizikalne) metode. Najbolj primerna metoda je kroglični mlin, kjer celice stresamo z majhnimi abrazivnimi delci. Strižne sile, mletje in udarci vodijo do poškodb oz. razbitja in razpada celične membrane, ves znotrajcelični material pa se sprosti iz celice. Nato z obarjanjem in nukleazami odstranimo sproščene nukleinske kisline. Kroglični mlin je primeren za celice s trdno celično seno (kvasovke, spore, glive, enocelične alge). Med samim procesom moramo aparaturo ohlajati, saj se tekočina zelo segreje in bi zato lahko poškodovali proteine.

V to skupino mehanskih metod spadajo še: homogenizatorji (velike strižne sile in padec tlaka \square razbitje celic), Frencheva stiskalnica (visok pritisk in strižne sile \square liza celic, sproščanje proteinov), koloidni mlini (velike strižne sile in turbulenca \square razpad celic), sonifikacija

Nemehanske metode: osmozni šok (poškodba membran), zamrzovanje/odtajanje (membrana počne zaradi šoka), toplotni šok, sušenje, kemijske metode

Kemijske (nemehanske metode): organska topila (DMSO, metanol \square nastanek odprtin v celični membrani), PAS (SDS; Tween – poškodba membran), kelatorji (EDTA – poškodba membran), kaotropne spojine (urea, gvanidin \square odvzamejo vodo, poruši 3D strukturo proteina, membrana postane prepustna). Encimi (lizocim, hitinaza).

12. Predstavniki prokariontov:

- E.coli
- Pseudomonas fluorescens
- Caulobacter crescentus
- Staphylococcus carnosus
- Bacillus brevis
- Bacillus megaterium
- Bacillus subtilis

13. Slabosti topikalnega nanosa rastnih dejavnikov:

Večina rastnih dejavnikov so hidrofilne molekule večje od 200kDa, zato je malo verjetno, da skozi epidermis pridejo v merljivih količinah, ki bi sprožile farmakološki učinek. Problematična je tudi stabilnost teh pripravkov pri sobni T°. Lahko pride do denaturacije. Nenadzorovana aktivnost lahko sproži rast malignih transformiranih celic.