

# Cíle studia přenosu genů do živočišných buněk

## 1. Přenos genů do živočišných buněk

- vyhledávání genů, poznání jejich funkce a regulace,
- studium procesů diferenciací a jejich poruch
- heterologní exprese, tvorba cizorodých proteinů

## 2. Příprava transgenních živočichů

- studium fungování genů v rámci celého organismu
- příprava živočichů (savců, ptáci, ryby ...) s cíleně upravenými geny
  - modely pro studium genetických chorob
  - příprava zvířat s lepšími užitkovými vlastnostmi,
  - vytváření cizorodých proteinů (animal farming)
  - hledání možností pro genovou terapii

# Způsoby přenosu DNA do buněk živočichů

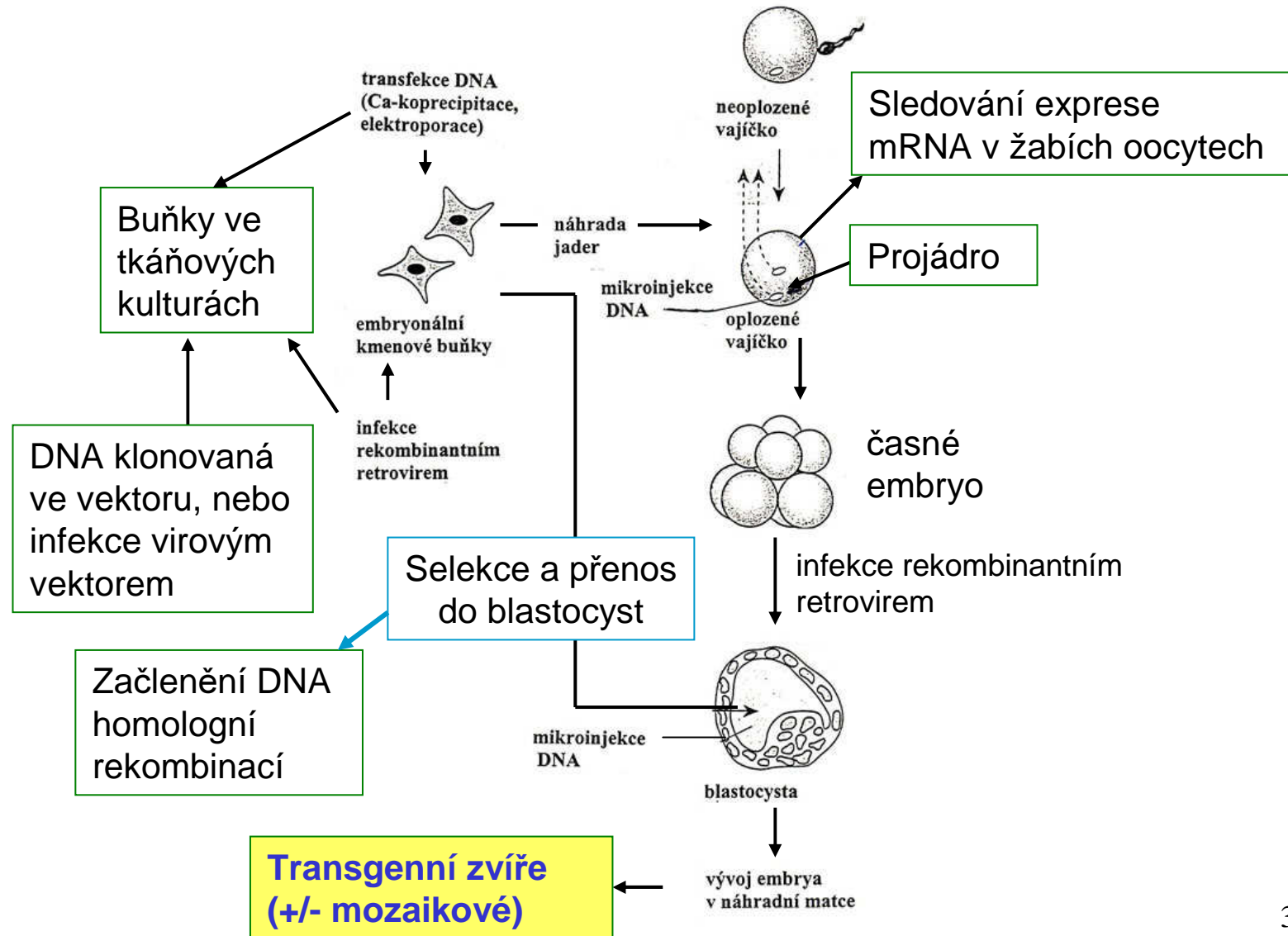
(volná DNA nebo DNA klonovaná ve vektorech)

- transfekce (Ca-precipitace, kotransfekce)
- elektroporace
- infekce (virové vektory)
- lipofekce
- mikroinjekce
- fúze buněk (savčích, bakteriálních protoplastů)

## Exprese transgenu:

- transientní (přechodná)
- stabilní

# Způsoby přenosu cizích genů do savčích buněk



# Selekční markery pro přenos genů do eukaryot

Enzym	Selekční látka	Mechanismus selekce
Aminoglykozidfosfotransferáza (APH) neo	G418 (inhibice syntézy proteinů) (kanamycin, neomycin)	APH inaktivuje G418
Dihydrofolátreduktáza (DHFR)	Metotrexát (Mtx) (inhibuje DHFR)	varianta DHFR rezistentní k Mtx, počet kopií
Hygromycin-B-fosfotransferáza (HPH) (Hyg)	Hygromycin-B (inhibuje syntézu proteinů)	HPH inaktivuje hygromycin B
Tymidinkináza (TK)	Aminopterin (inhibuje syntézu purinů de novo a syntézu tymidylátu)	TK syntetizuje tymidylát
Xantin-guanin-fosforibozyltransferáza (XGPRT) (Ecogpt)	Mykofenolová kyselina (inhibuje syntézu GMP de novo)	XGPRT syntetizuje GMP z xantinu
Chloramfenikoltransferáza (CAT) Reportérový gen	Chloramfenikol (Clm) (inhibice biosyntézy proteinů na ribozomu)	CAT inaktivuje Clm
Hypoxantinguaninfosforibozyltransferáza (HGPRT)	Aminopterin (inhibuje syntézu purinů de novo)	HGPRT syntetizuje puriny z hypoxantinu

Luciferáza  
GFP  
beta-glukozidáza



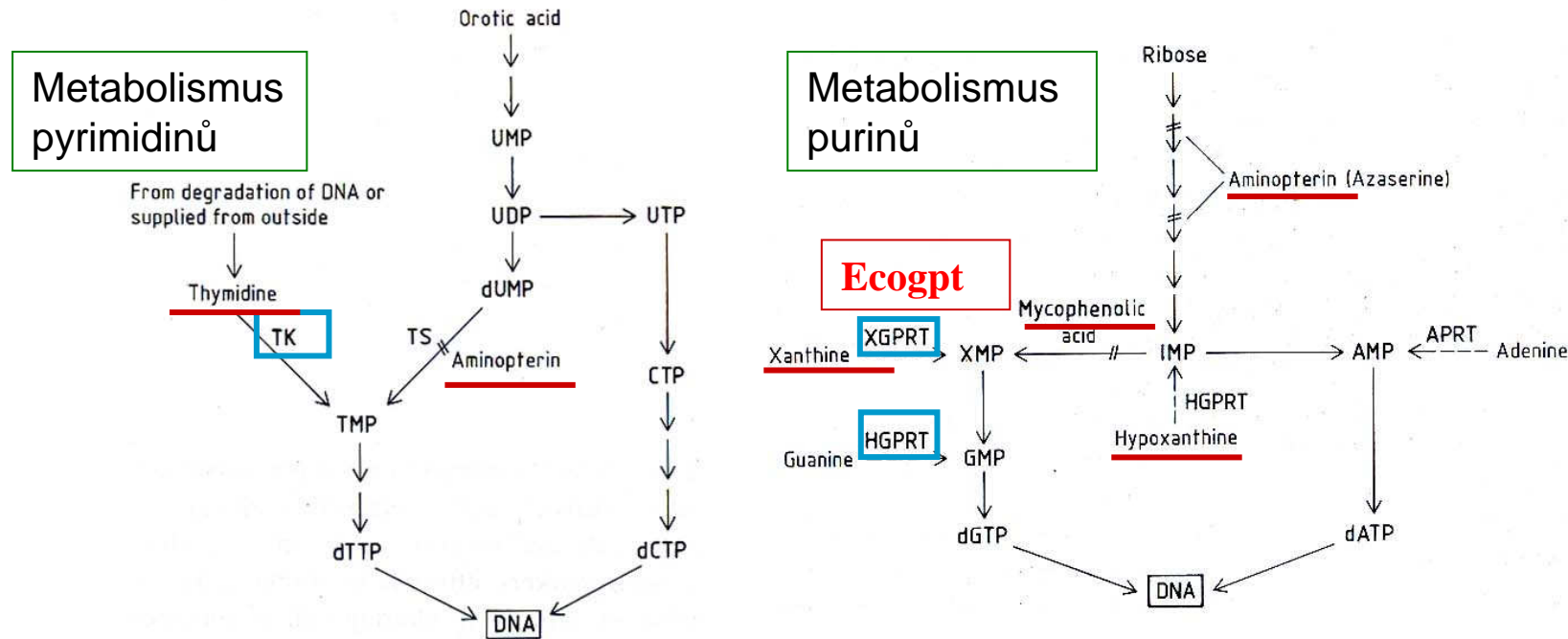
reportérové geny

# Selective marker gene systems for mammalian cells

Selective agent	Action of selective agent	Marker gene	Action of marker gene protein
<b>Xyl-A</b>	Damages DNA	Adenine deaminase ( <i>ada</i> )	Deaminates Xyl-A
<b>Blasticidin S</b>	Inhibits protein synthesis	Blasticidin S deaminases ( <i>Bsr, BSD</i> )	Deaminates blasticidin S
<b>Bleomycin</b>	Breaks DNA strands	Bleomycin-binding protein ( <i>Ble</i> )	Binds to bleomycin
<b>G-418 (Geneticin)</b>	Inhibits protein synthesis	Neomycin phosphotransferase ( <i>Neo</i> )	Phosphorylates G-418
<b>Histidinol</b>	Produces cytotoxic effects	Histidinol dehydrogenase ( <i>hisD</i> )	Oxidizes histidinol to histidine
<b>Hygromycin B</b>	Inhibits protein synthesis	Hygromycin B phosphotransferase ( <i>Hph</i> )	Phosphorylates hygromycin B
<b>MSX</b>	Inhibits glutamine synthesis	Glutamine synthetase ( <i>GS</i> )	Cells that produce excess glutamine synthetase survive
<b>MTX</b>	Inhibits DNA synthesis	Dihydrofolate reductase ( <i>dhfr</i> )	Cells that produce excess dihydrofolate reductase survive
<b>PALA</b>	Inhibits purine synthesis	Cytosine deaminase ( <i>codA</i> )	Lowers cytosine levels in the medium by converting cytosine to uracil
<b>Puromycin</b>	Inhibits protein synthesis	Puromycin <i>N</i> -acetyltransferase ( <i>Pac</i> )	Acetylates puromycin

MSX, methionine sulfoximine; MTX, methotrexate; PALA, N-(phosphoacetyl)-L-aspartate; Xyl-A, 9-β-D-xylofuranosyl adenine

# Selekční media pro enzymy Tk, HGPRT a XGPRT



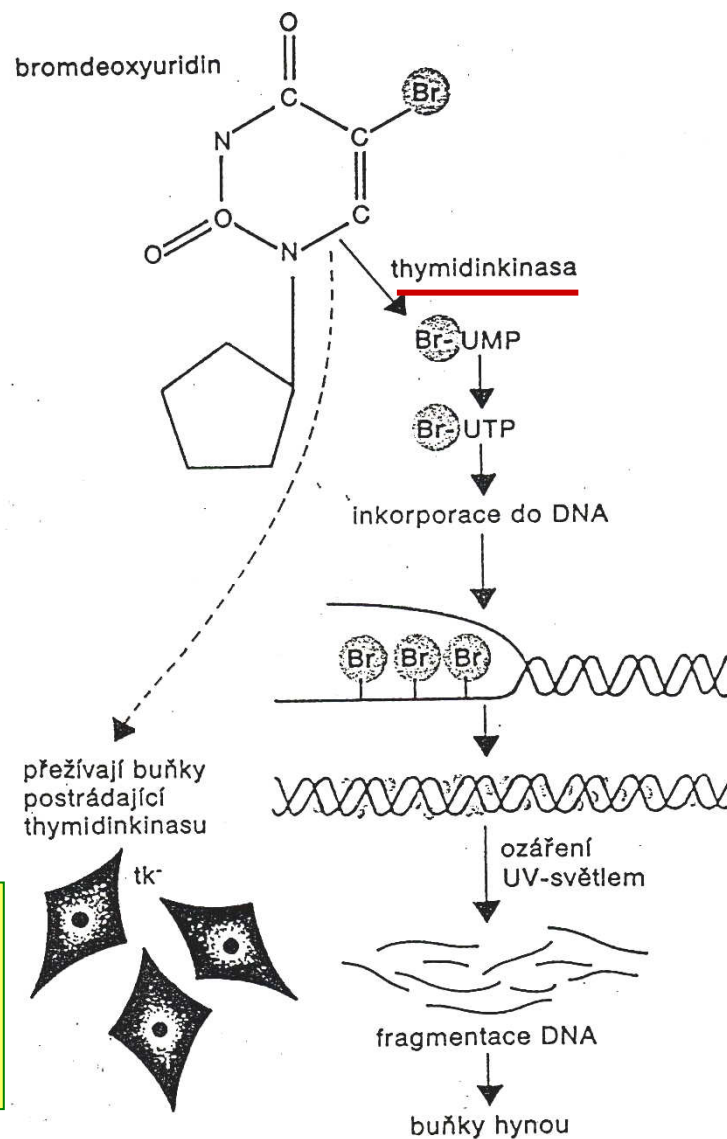
## Selekční systémy Tk, HGPRT, XGPRT

A	HAT	BrdU	
Tk <sup>+</sup>	+++	---	
Tk <sup>-</sup>	---	+++	
B	HAT	6-Thioguanine	XAT
8-Azaguanine			
HGPRT <sup>+</sup>	+++	---	---
HGPRT <sup>-</sup>	---	+++	---
HGPRT <sup>+</sup> (Ecogpt <sup>+</sup> )	+++	---	+++

**Medium HAT**  
 Hypoxantin = zdroj purinů,  
 Aminopterin = blokuje syntézu nukleotidů de novo  
 Tymidin = zdroj tyminu

**Medium XAT**  
**Xantin (+ kys. mykofenolová)**

(- - -) indicates that cells do not grow and do not survive under these conditions. (+++) indicates that cells either grow or only survive as in the case of Tk<sup>-</sup> cells in the presence of bromodeoxyuridine (BrdU). HAT stands for hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium, X for xanthine.

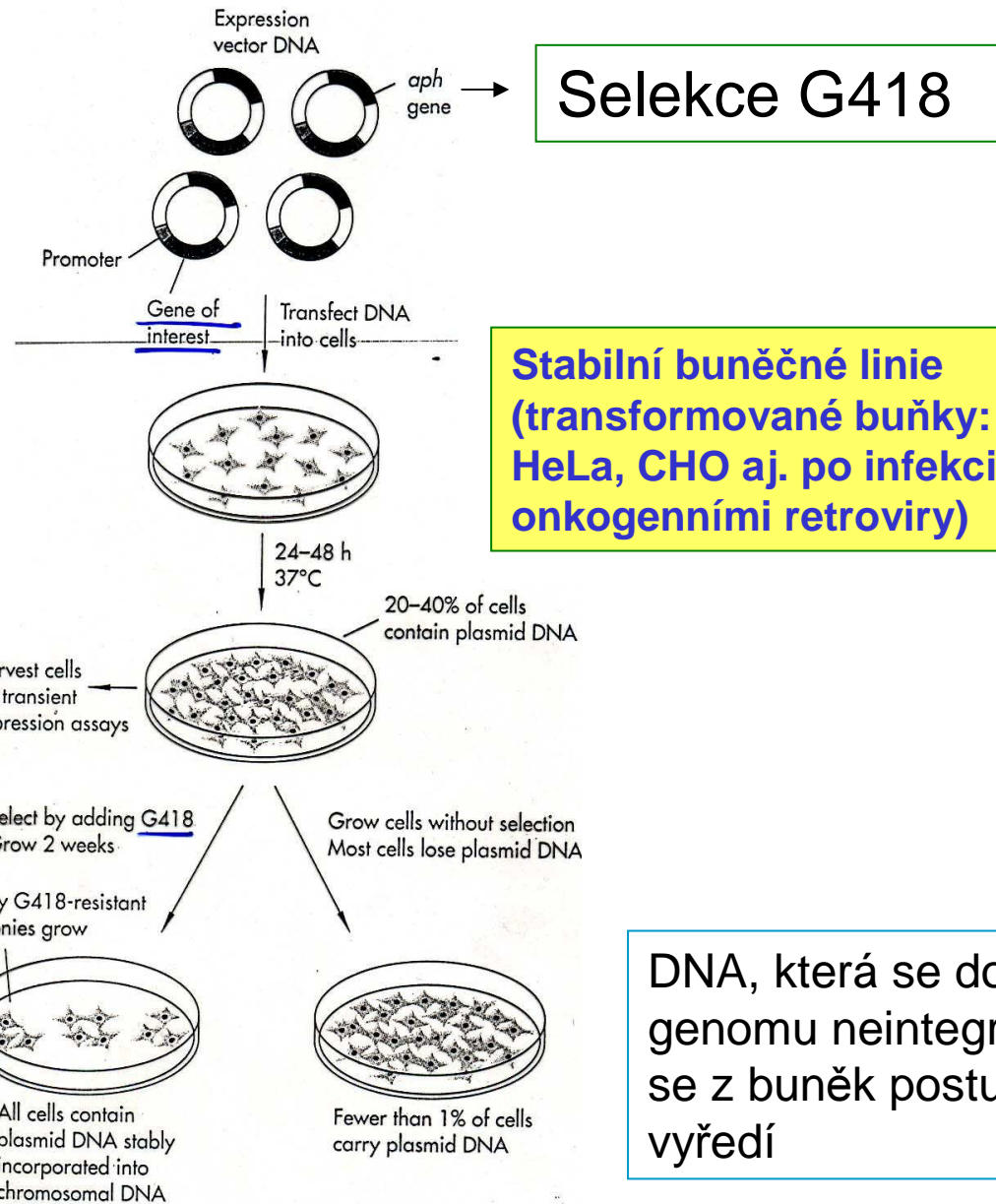


Připravena řada linií lidských a hlodavčích tk<sup>-</sup> buněk

### Postup při izolaci mutant tk<sup>-</sup>.

Buňky s funkčním enzymem thymidinkinasa fosforylují bromdeoxyuridin (BrU-dr) na BrUMP, který je potom inkorporován do buněčné DNA. Bromovaná DNA je extrémně citlivá na ozáření UV světlem, po kterém buňky hynou. **Vzácné mutanty tk<sup>-</sup> ozáření přežívají.**

# Transientní a stabilní exprese genů v živočišných buňkách



Selekce G418

Stabilní buněčné linie (transformované buňky: HeLa, CHO aj. po infekci onkogenními retroviry)

Analýza exprese genů. Studium regulačních oblastí, sestřihu; příprava velkých množství mRNA nebo proteinů

Selekce klonů s DNA stabilně integrovanou do genomu (vzácné)

DNA, která se do genomu neintegrovala, se z buněk postupně vyředí

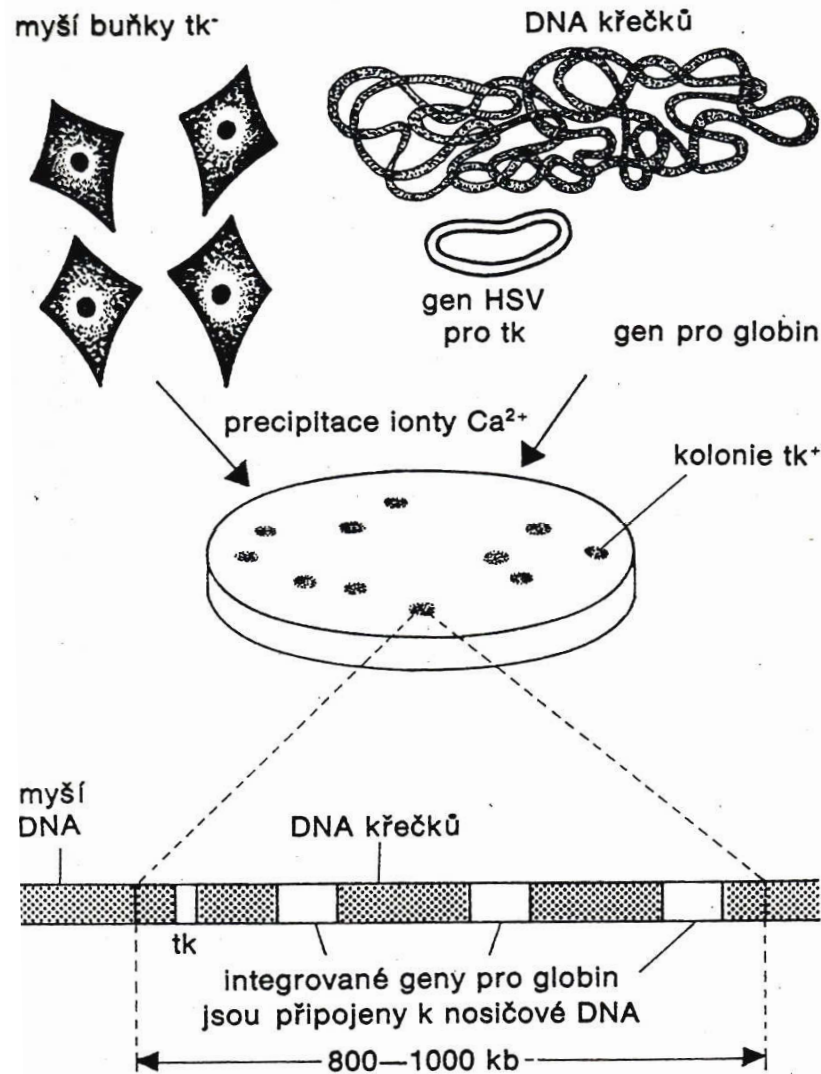


# Osud přenášené plazmidové DNA v recipientní buňce

1. Transfekce cizorodé + nosičové DNA = vytváření konkatemerů
  - transgenom (selektovatelný marker, neselektovaný gen-nosičová DNA) začleněný v jedné kopii v libovolném úseku genomu. Později často dochází k částečné nebo úplné delecii transgenomu
2. Transfekce (Ca-P) čisté plazmidové DNA bez nosičové DNA = plazmidy jsou stabilně integrovány do jednoho až pěti různých míst genomu, kde se nacházejí převážně v jedné kopii.
3. Elektroporace čisté plazmidové DNA = nízký počet integrovaných plazmidových molekul
4. Mikroinjekce plazmidu do buněčného jádra
  - a) při vysoké koncentraci DNA dochází k inkorporaci dlouhých konkatemerů (hlava-pata),
  - b) při malém množství DNA se začlení jednotlivě.

Po linearizaci plazmidu přibývá pravděpodobnost tvorby konkatemerů a začlenění do genomu, přičemž nehraje roli, kterou metodou byla DNA plazmidu vnesena.

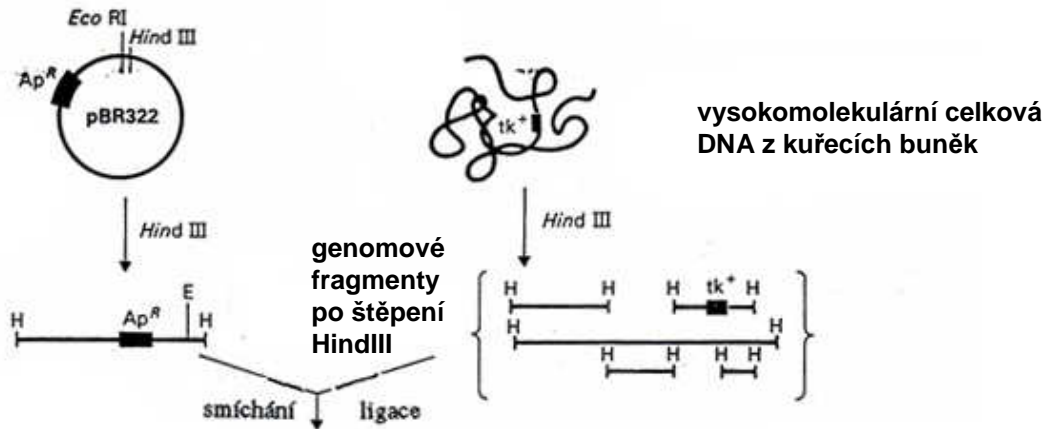
# Kotransfekce několika druhů molekul DNA



Kotransformace během přenosu genů. Při tranfekci tk do eukaryontních buněk pomocí precipitace  $\text{Ca}^{2+}$  je část nosičové DNA a jakákoliv další DNA přítomná v precipitátu spojena dohromady do velkých struktur (800 až 1000 kb) a včleněna do chromozómu.

**transgenom**

# Izolace genu pro tk z kuřecích buněk – „plasmid rescue“



možnost izolovat každý gen, který je v kultuře na základě svých fenotypových vlastností selektovatelný nebo nějak poznatelný.

transfekce tk<sup>-</sup> kuřecích buněk

Ca-koprecipitace

HAT-Selection

primární tk<sup>+</sup> transfektanti

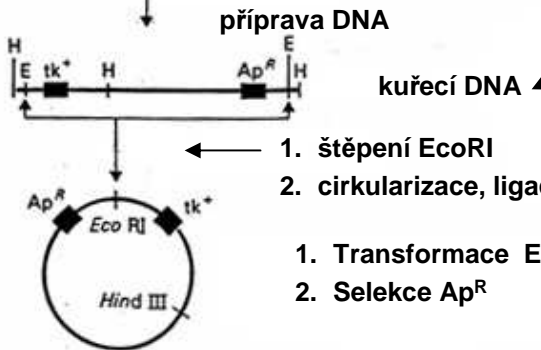
1. příprava DNA z tk<sup>+</sup> transfektantů
2. selekce v mediu HAT

sekundární tk<sup>+</sup> transfektanti

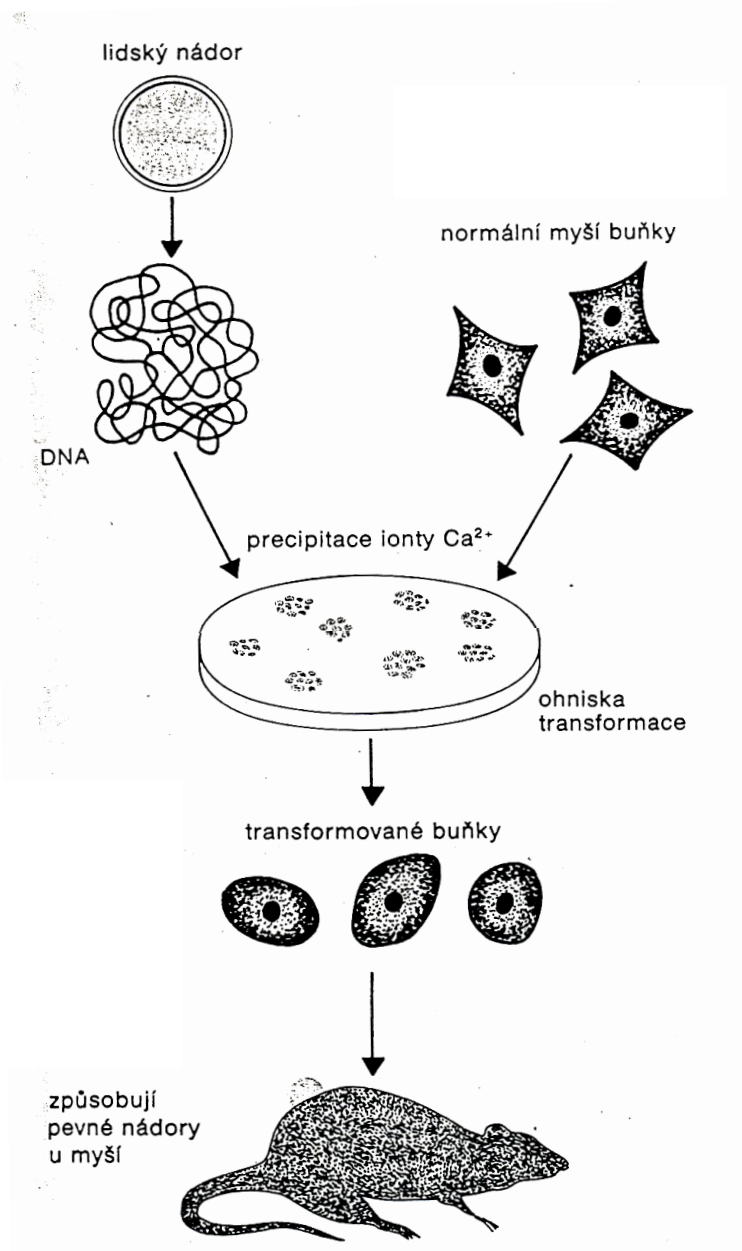
Vyřadí se plazmidy s neselektovanými znaky (tj. plazmidy nevázané s tk<sup>+</sup>)

Gen tk<sup>+</sup> je „označen“ genem Ap<sup>R</sup>

další možnosti značení: supF, pBR322, alu



na rekombinantním plazmidu se nachází gen tk<sup>+</sup> společně s Ap<sup>R</sup>



Selekce úspěšně transfektovaných buněk na základě změny jejich fenotypu

Přenos lidských onkogenů do myších buněk. Po transfekci myších buněk DNA získanou z lidských nádorů se za několik týdnů objeví malá ohniska transformovaných myších buněk. Výsledkem injikace takových buněk myším jsou pevné nádory.

# Vektory pro přenos genů do živočišných buněk

1. Plazmidové vektory („neživé“): plazmid se nereplikuje, vzácně se začleňuje do genomu buňky

- prokaryotický plazmid + eukaryotická transkripční jednotka + selekční marker

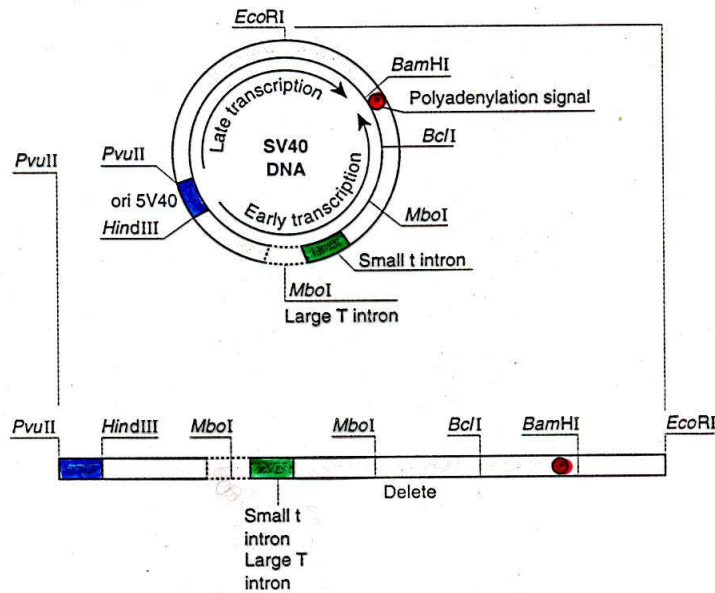
Využívají se k selekci transfektovaných buněk při kotransfekci a sledování transientní exprese genů

2. Virové vektory („živé“): kyvadlové vektory, replikující se v hostitelských buňkách

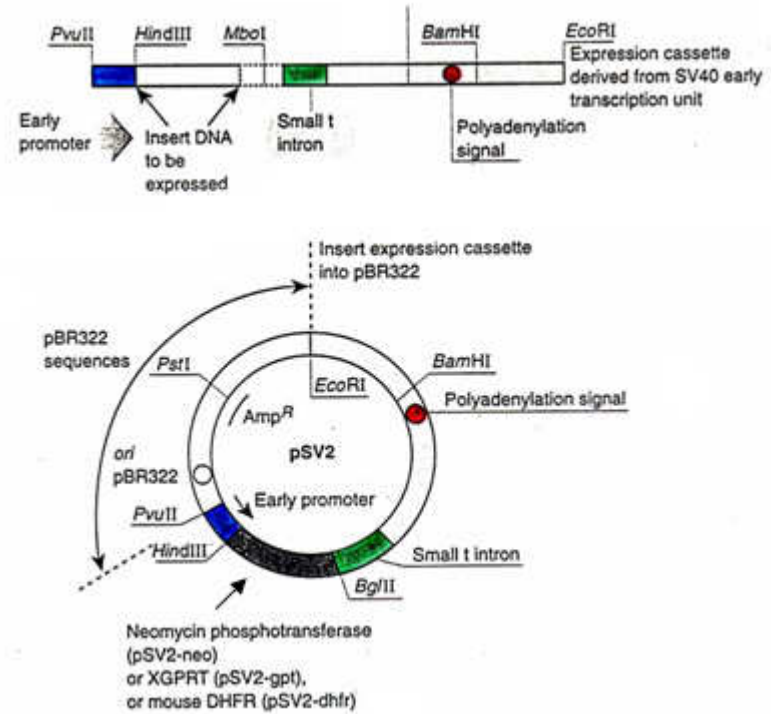
- část bakteriálního vektoru + sekvence eukaryotických virů + selekční marker
- vektory odvozené z SV40, bovinního papilomaviru, EBV, retrovirů, bakulovirů, viru vakcinie, adenovirů aj.

Využívají se ke sledování stabilní nebo transientní exprese genů a k získávání rekombinantních proteinů ve velkém množství

# Konstrukce pSV vektorů



Transkripční regulační sekvence z viru SV40

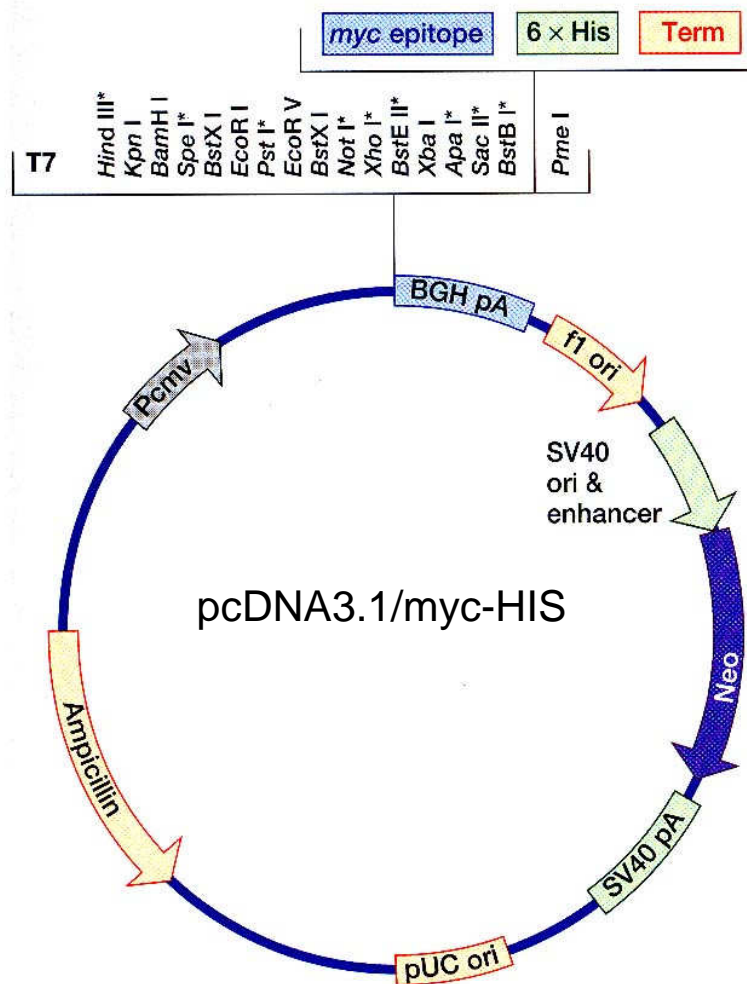


Kyvadlový vektor

„Plazmidy pSV“

Využití pSV: nesou dominantní selekční markery při kotransfekci, nebo pro docílení exprese cizích genů, protože v buňkách přetrvávají určitou dobu (i když se nereplikují)

# Expresní vektor pro savčí buňky



Pcmv – promotor cytomegaloviru

BGHpA = polyadenylační  
sekvence BGH

Neo = rezistence k G418

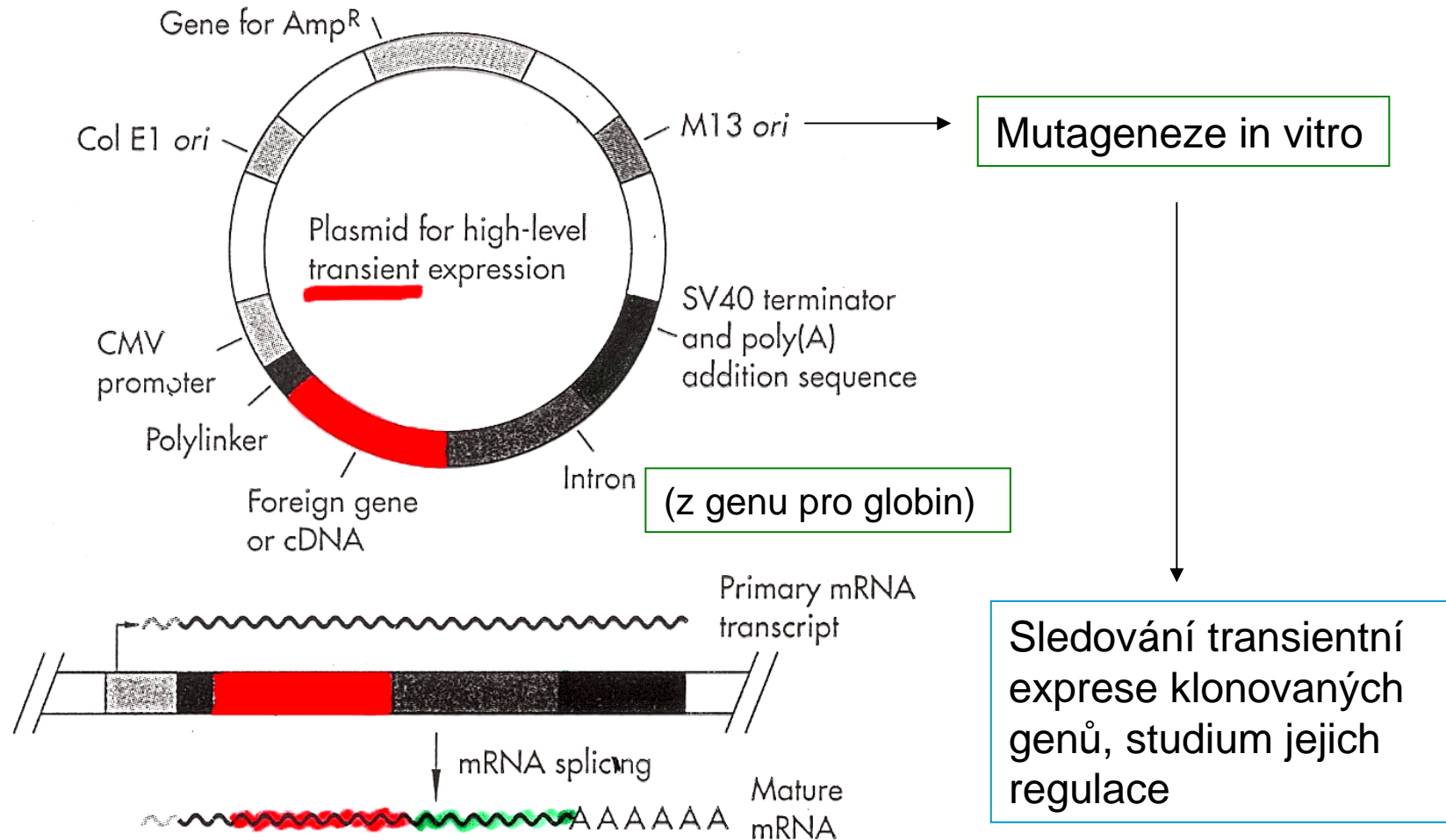
6 x HIS = purifikace proteinu (tag)

myc epitop = detekce proteinu  
protilátkou

T7 – sekvenování inzertu

Sekvence aktivní v *E. coli*:  
AmpR, pUC ori, f1 ori

# Expresní vektor pro savčí buňky



**Silné promotory:** CMV, RSV, SV40, LTR MoMULV, \* **Možnost inducibility expresního systému.** Bývá volen **metalothioneinový promotor**, kdy je transkripce docílena po přidání těžkých kovů (Cd, Zn). Až 200násobná indukce.  
promotory reagující na steroidní hormony. Dexametazon na glukokortikoidový receptor vede k indukci transkripce z MMTV LTR.



# Sekvence na vektoru zajišťující translaci



**K** = Kozak-sekvence; **S** = signální sekvence; **T** = tag – purifikace proteinu;  
**P** = místo štěpení proteinu – oddělení tag od zralého proteinu; **SC** = stop kodon

- Vznik sekundární struktury v 5´nepřekládané oblasti mRNA zabraňuje účinné translaci –
- pravidla Kozakové– sekvence v oblasti AUG: CC(A/U)CCAUGG
- Iniciační kodony uvnitř 5´nepřekládané oblasti snižují účinnost iniciace translace od správného iniciačního kodonu, zvláště pokud po „upstream“ AUG nenásleduje ve čtecím rámci stop kodon – často je žádoucí zkrátit 5´netranslatovanou oblast mRNA.
- Sekvence bohaté na AU v 3´netranslatované oblasti mRNA mohou snižovat její stabilitu
- **Kodony lze upravit pro daný hostitelský organismus**

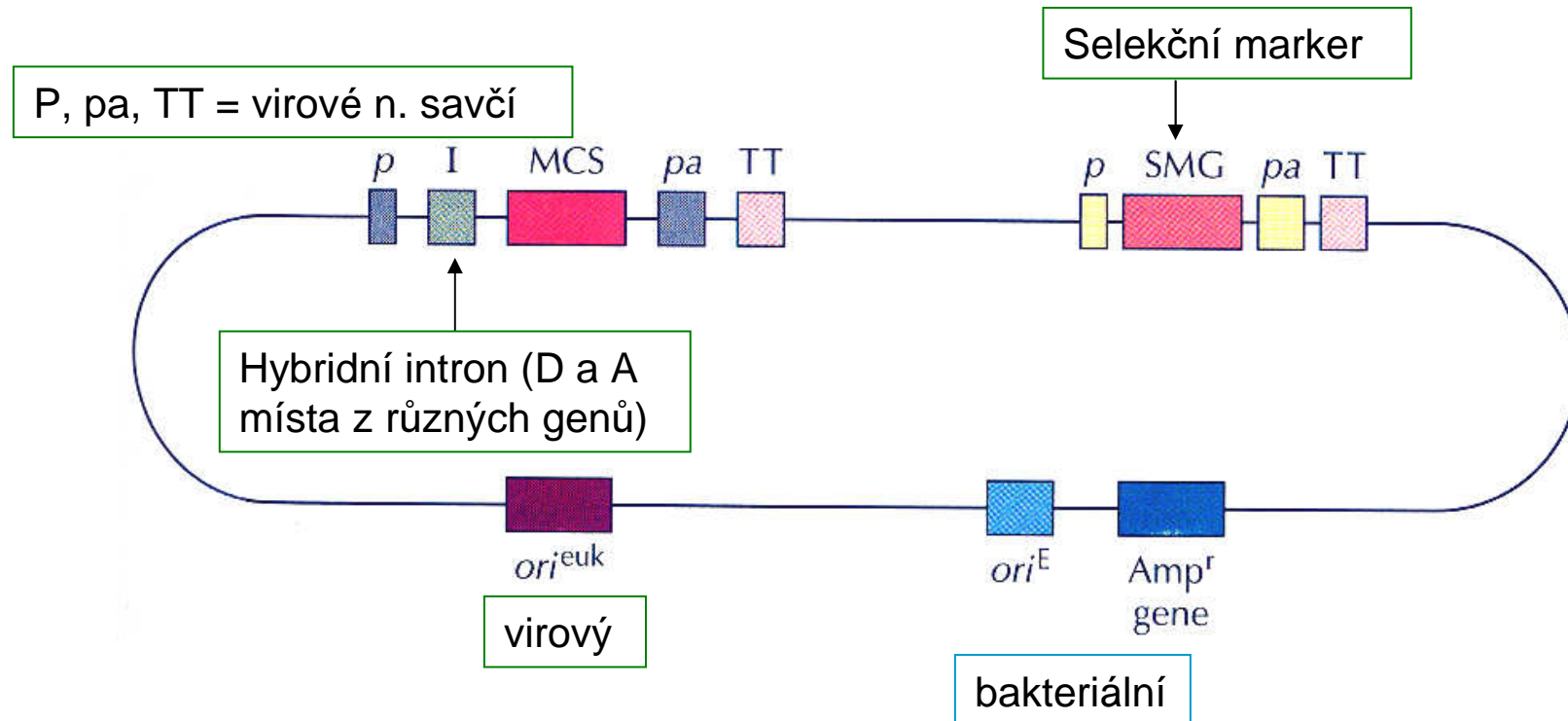
## **Kozak Sequence**

Most eukaryotic mRNAs contain a short recognition sequence that greatly facilitate the initial binding of mRNA to the small subunit of the ribosome. The consensus sequence for initiation of translation in vertebrates (also called Kozak sequence) is: ACCATGG

More general it is: (GCC)RCCATGG

where R is a purine (A or G). To improve expression levels, it may be advantageous to design the cloned insert according to Kozak's rules.

# Savčí expresní vektor – obecná struktura



## Hostitelské buňky:

- Pro transientní expresi: Cos, BHK (baby hamster kidney), HEK (human embryonic kidney)
- Pro stabilní expresi CHO (chinese hamster ovary)

# Řada komerčně významných proteinů je tvořena více podjednotkami:

heterodimery: human thyroid-stimulating hormone,

tetramery: hemoglobin, protilátky

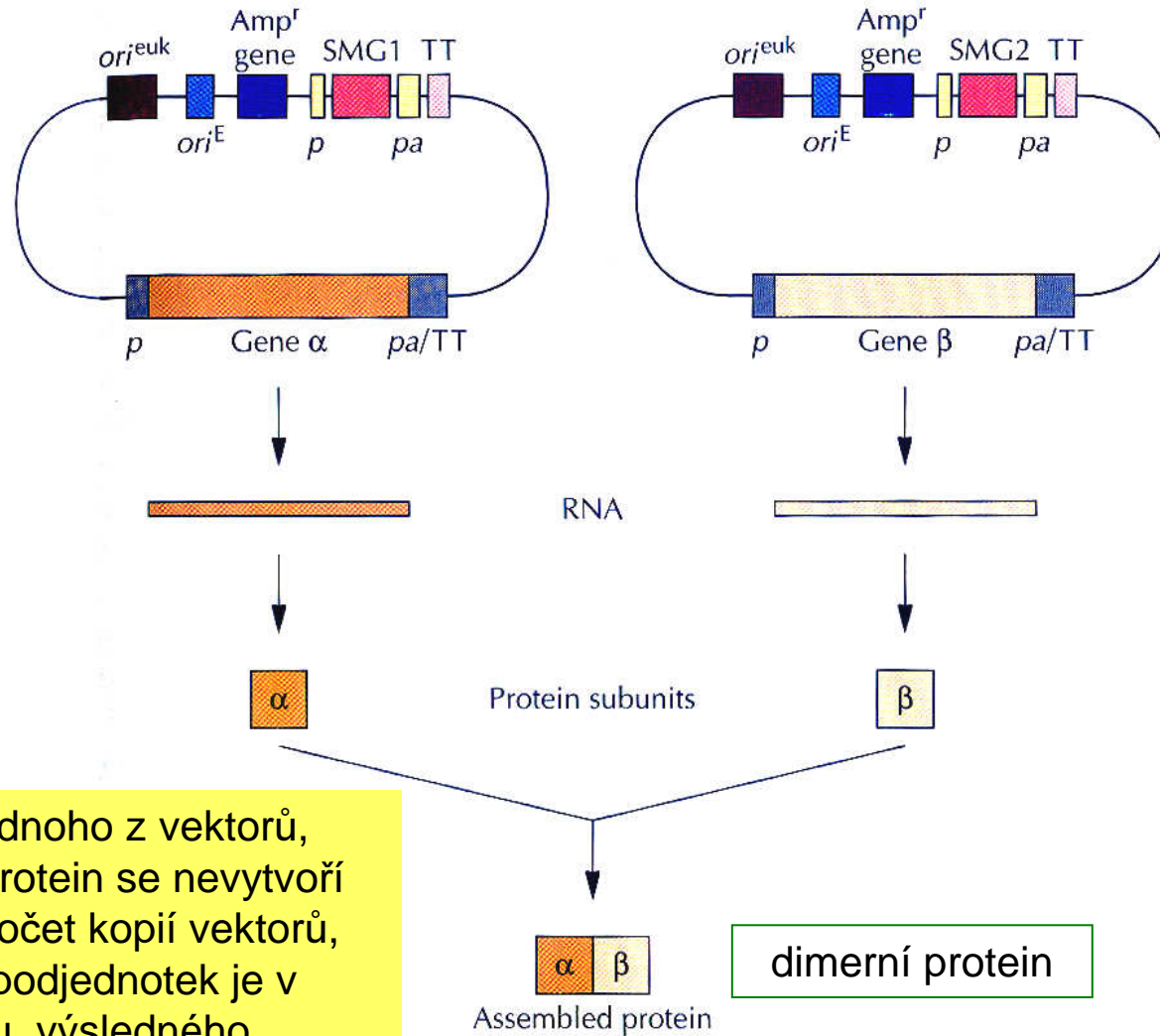
Příprava proteinů tvořených podjednotkami:

1. klonování genů pro podjednotky samostatně a pak jejich spojení *in vitro* – nízká účinnost
2. klonování genů ve dvou vektorech v jedné buňce – sestavení proteinu *in vivo* – vysoká účinnost

Možné komplikace:

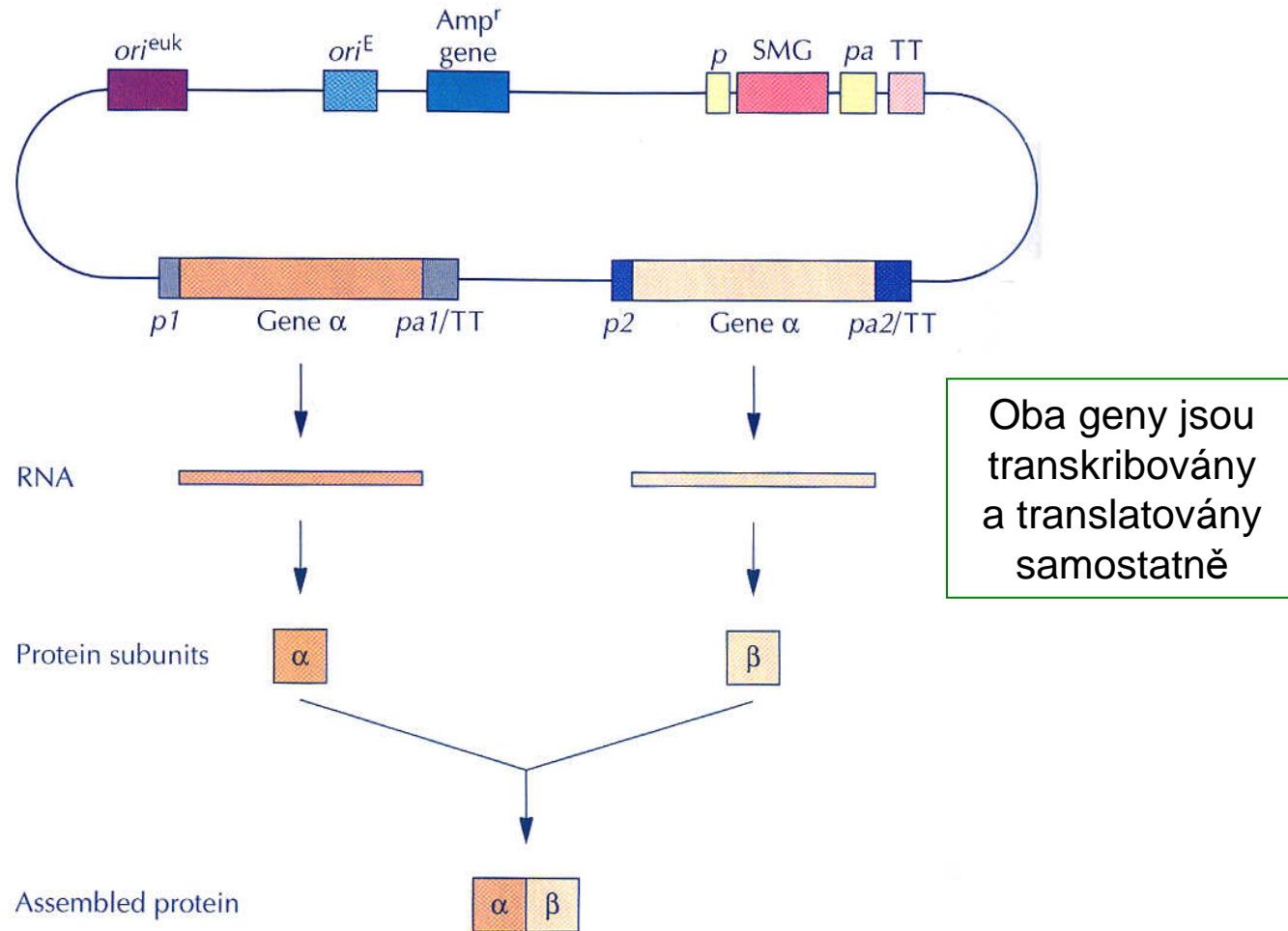
- Ztráta jednoho z vektorů, aktivní protein se nevytvoří
  - Různý počet kopií vektorů, jedna z podjednotek je v nadbytku, výsledného produktu je málo
3. **Řešení: Klonování genů v bicistronickém expresním vektoru**

# Dvouvektorový expresní systém – v jedné buňce

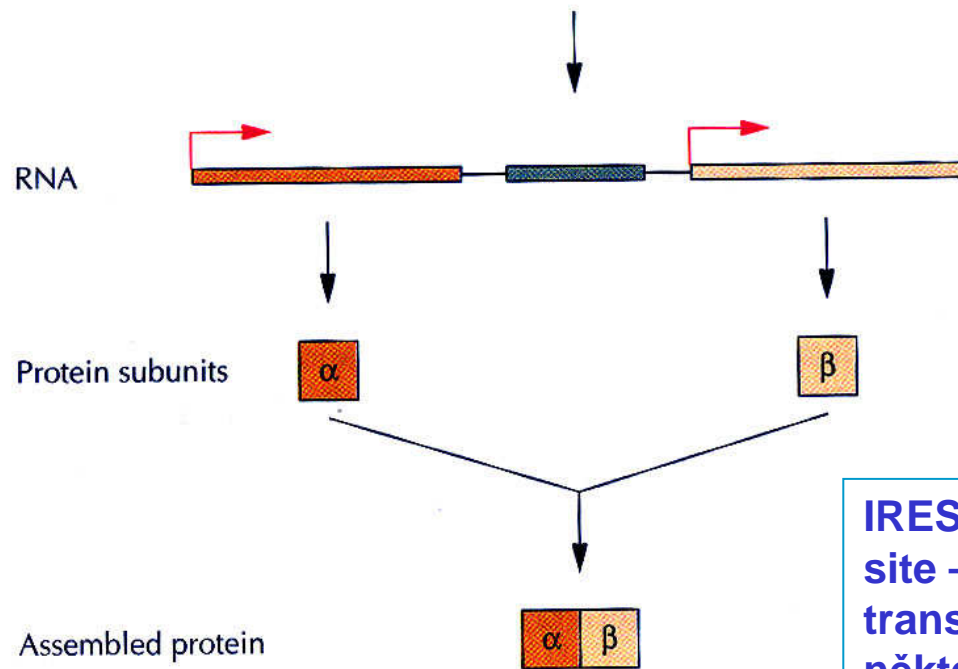
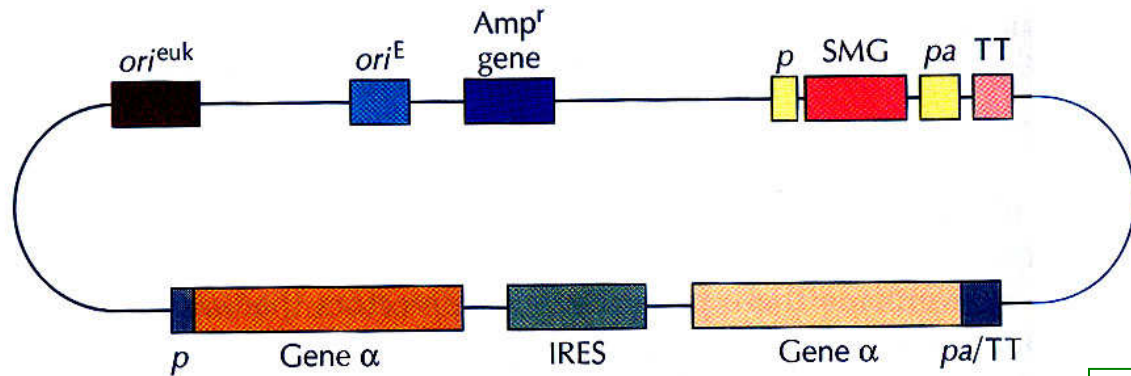


Ztráta jednoho z vektorů, aktivní protein se nevytvoří  
Různý počet kopií vektorů, jedna z podjednotek je v nadbytku, výsledného produktu je málo

# Expresní vektor se dvěma klonovanými geny kódujícími podjednotky heterodimeru



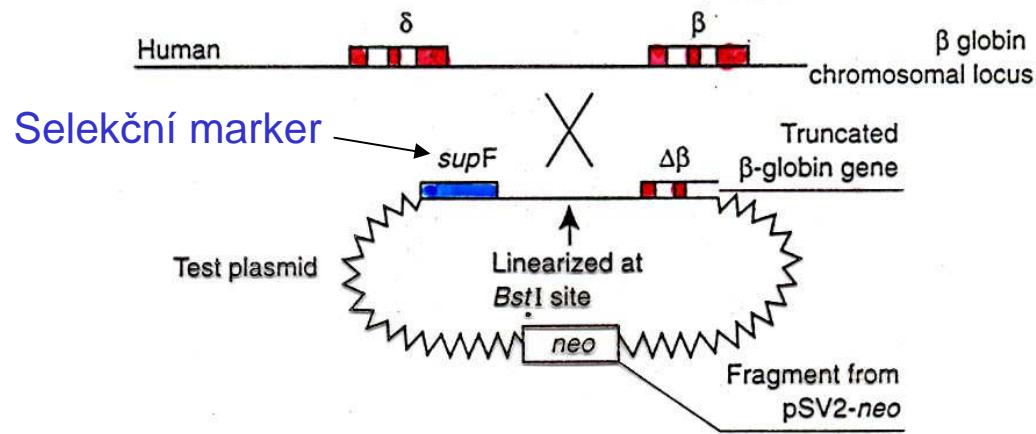
# Bicistronický expresní vektor pro klonování genů kódujících podjednotky heterodimeru



Jeden transkript (bicistronický), translatovaný do dvou proteinových podjednotek

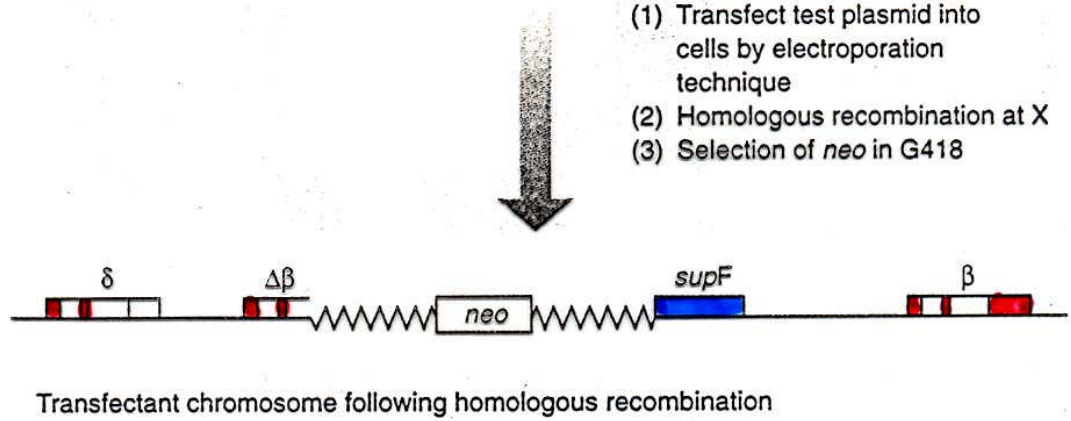
IRES = internal ribosomal entry site – umožňuje simultánní translaci polycistronické mRNA některých savčích virů

# Důkaz začlenění genu pro lidský B-globin homologní rekombinací – extenzivní postup



Přenos testovacího plazmidu do somatických buněk v tkáňové kultuře s cílem detekovat vzácné buňky, v nichž došlo k homologní rekombinaci (1xCO) – ta probíhá s frekvencí 100-1000x nižší než náhodné začlenění

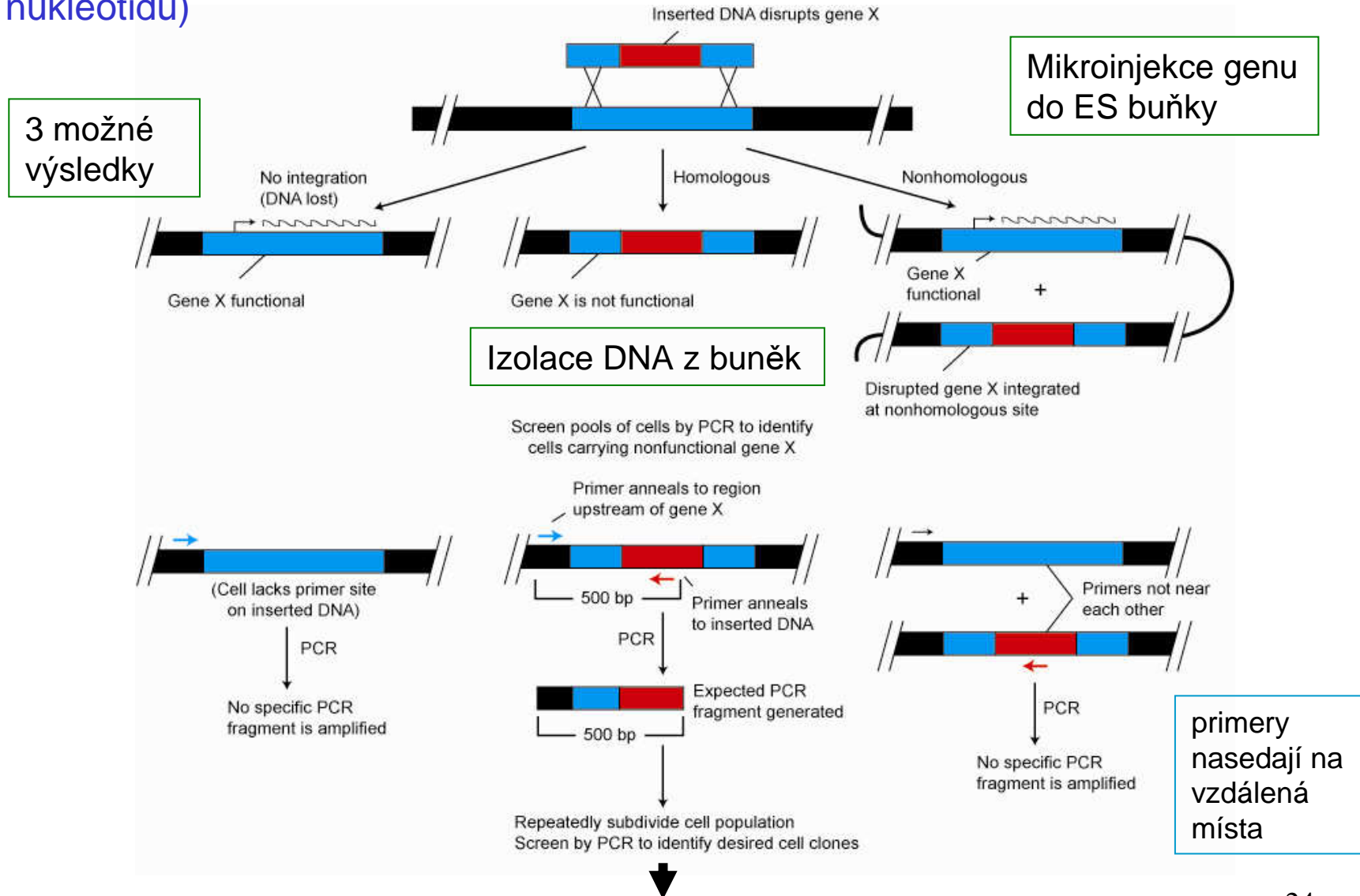
- (1) Transfect test plasmid into cells by electroporation technique
- (2) Homologous recombination at X
- (3) Selection of *neo* in G418



Dochází k duplikaci sekvencí, ne záměně alel

Examine structure by cloning DNA in phage  $\lambda$  vector with amber mutation(s) in essential gene(s)  
Rescues fragments containing *supF*

Sledování (skrínig) způsobu začlenění cizího genu pomocí PCR (bez použití selektovatelného markeru) (vnášený gen je přerušen inzercí – stačí několik nukleotidů)

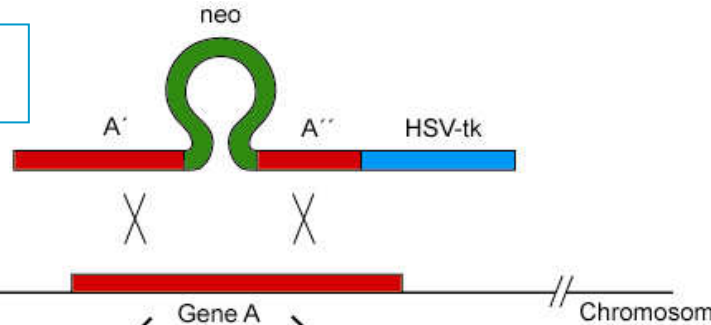


Vznik PCR-produktu dokazuje, že gen byl začleněn homologní rekombinací

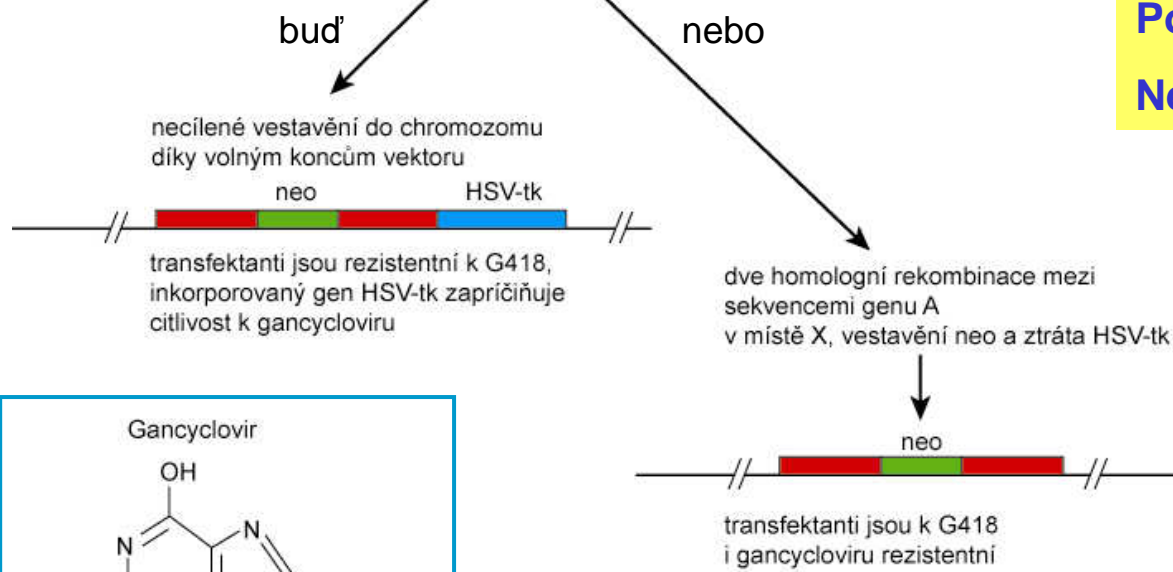


# Selekce transfektant (ES buněk), v nichž došlo k začlenění vneseného genu homologní rekombinací (gene knockout)

PNS vektor

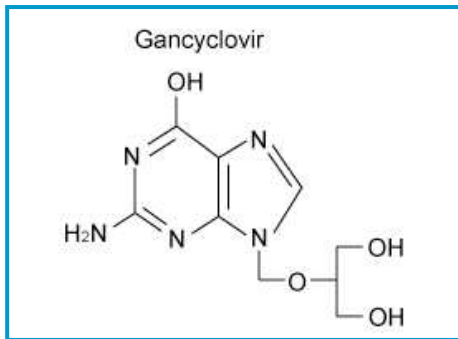


Substituční vektor pro gen A, který je přerušen genem neo a obsahuje HSV-tk



**Pozitivní selekce = G418**  
**Negativní selekce = HSV-tk**

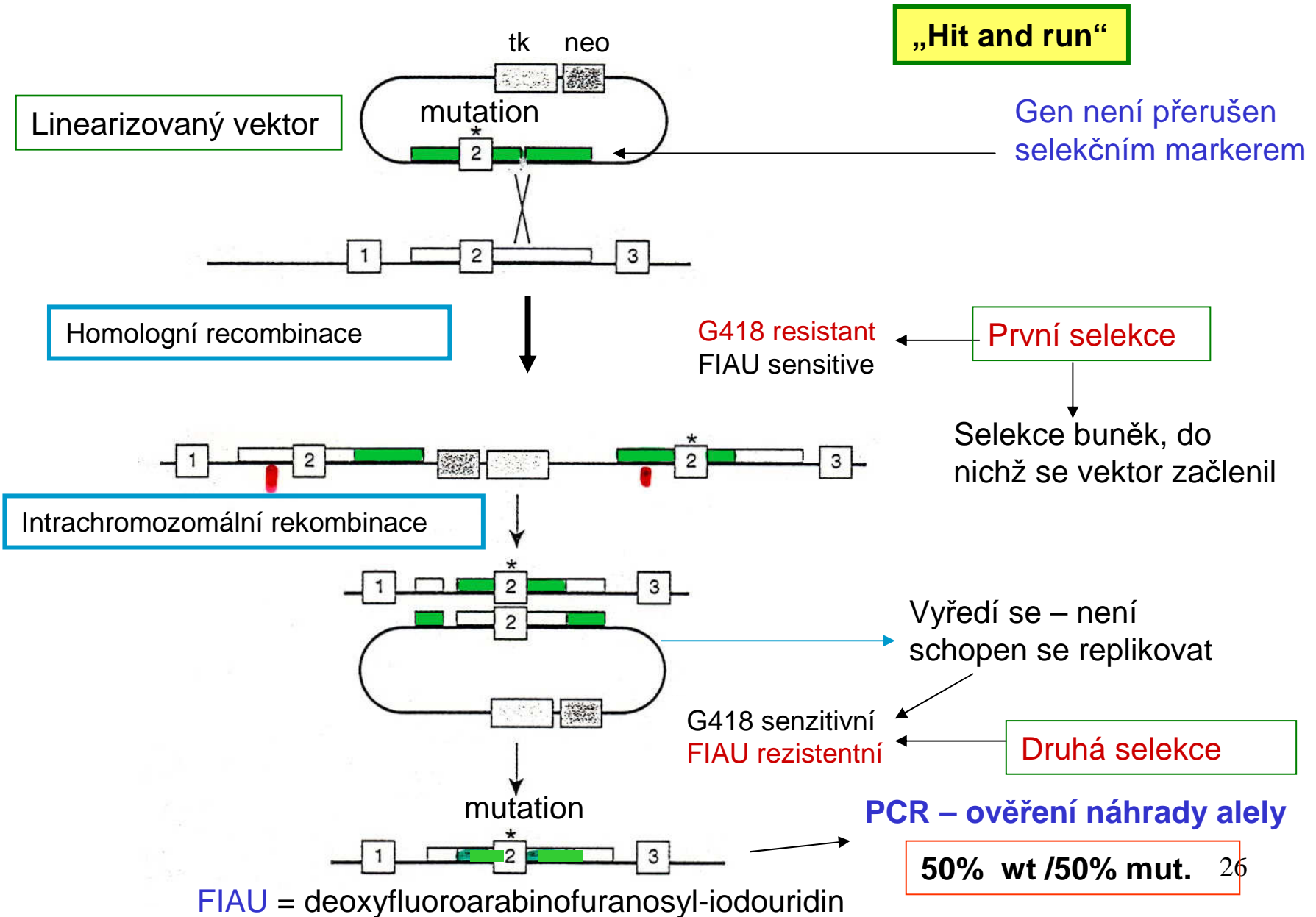
2000x obohacení o buňky obsahující přerušovaný gen A



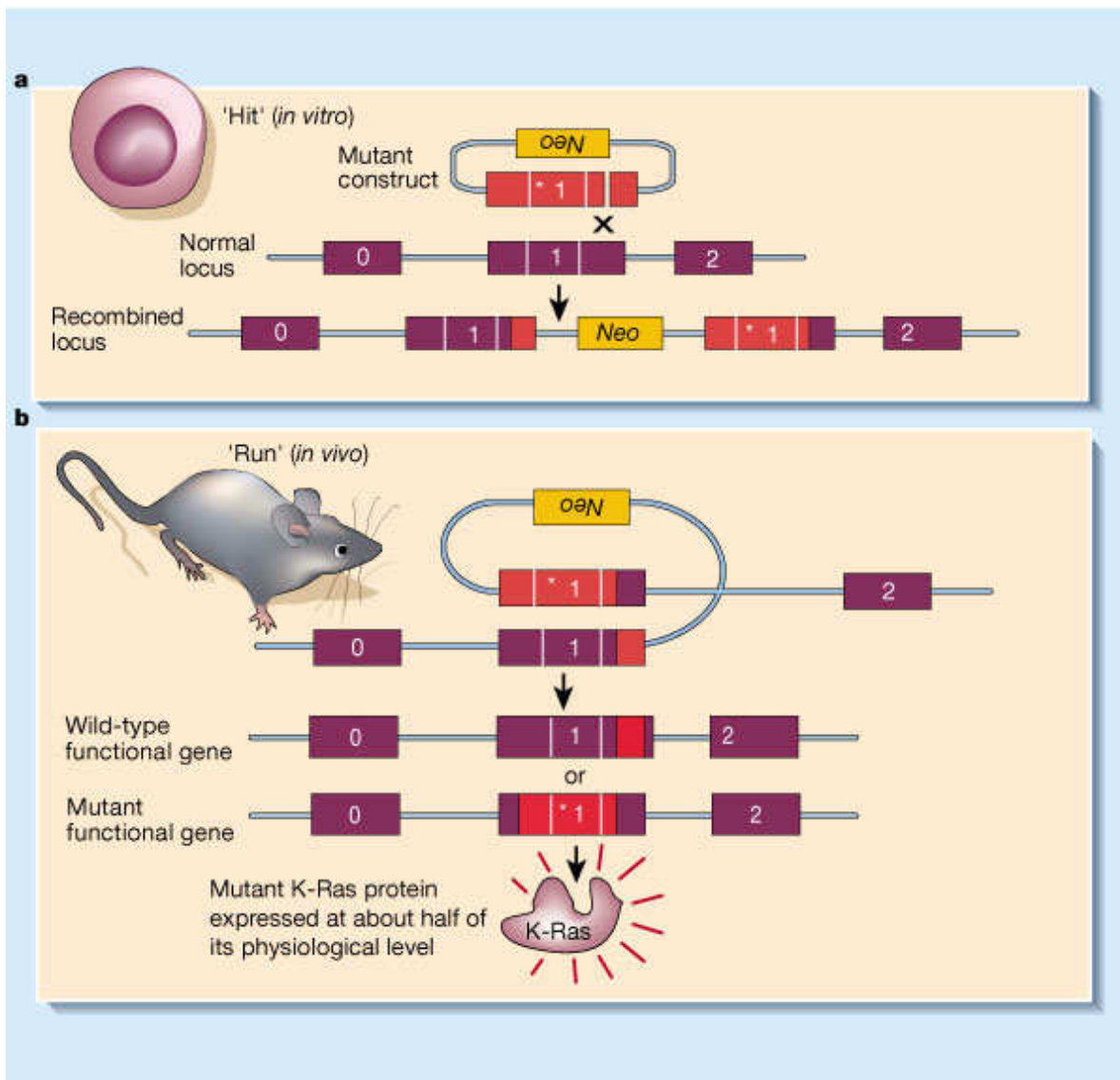
Gen A je inaktivní - vznik nulové mutace

HSV-tk = fosforyluje gancyclovir na monofosfát, který je pak buňkou přeměněn na trifosfát – ten inhibuje DNA-polymerázu a proliferující buňky jsou usmrcovány

# Náhrada alel v ES buňkách homologní rekombinací



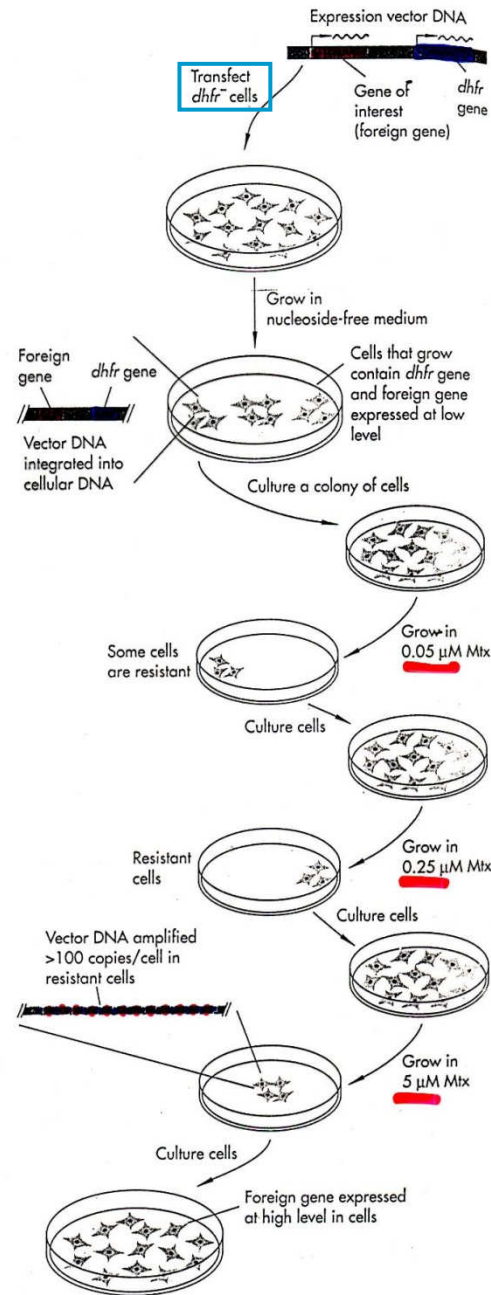
## Příklad využití metody „hit and run“ k záměně alel



Do ES myších buněk se do lokusu, kde se nachází normální gen **K-ras**, vloží mutantní forma **K-ras** (tj. onkogen). Selekcce se provádí na **neo**. ES buňky jsou pak použity k přípravě myši.

Spontánní rekombinace mezi alelami vede ke vzniku buď wt typu genu, nebo ke vzniku mutantního genu – onkogenu, což probíhá v různých tkáních a pokud vznikne onkogen **K-ras**, vyvinou se nádory.

Dosažení  
vysokého stupně  
exprese  
koamplifikací  
klonovaného genu  
spolu s genem  
DHFR



+ metotrexát

Zvyšování  
koncentrace

# SV40



genom = 5,2 kb kružnicová dsDNA

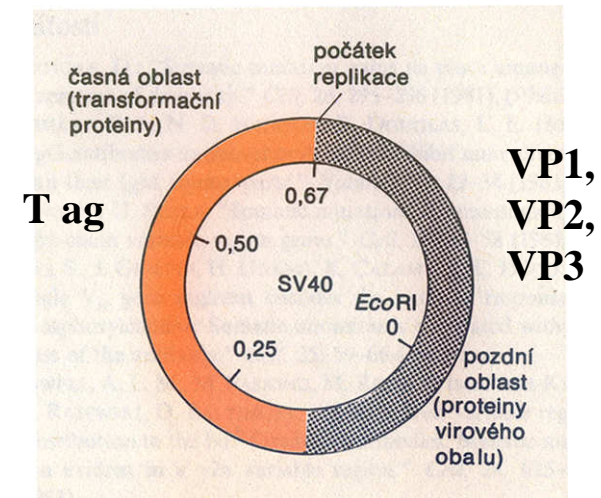
životní cyklus:

1. V permissivních buňkách (šimpanz) – lytický cyklus
2. V nepermissivních buňkách (myš, křeček) – integrace do genomu, přeskupení, transformace buněk

časná oblast = T antigen – replikace, transkripce

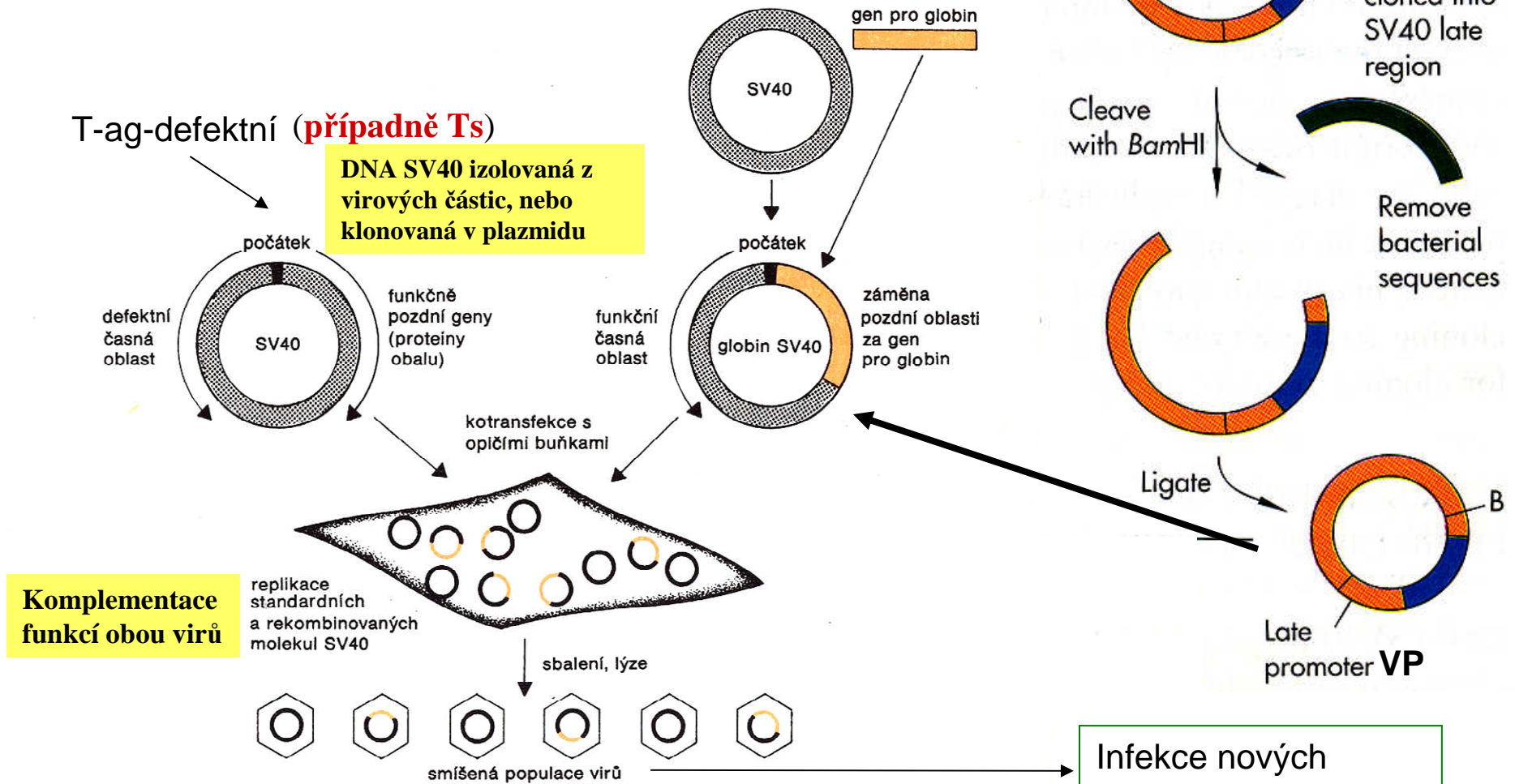
pozdní oblast = proteiny kapsidu (VP1-VP3)

**Konstrukce vektorů:** náhrada časně nebo pozdní oblasti cizími geny, komplementace chybějících funkcí pomocným virem nebo **pomocnými buňkami (COS)**



# Vektory s nahrazenou pozdní oblastí

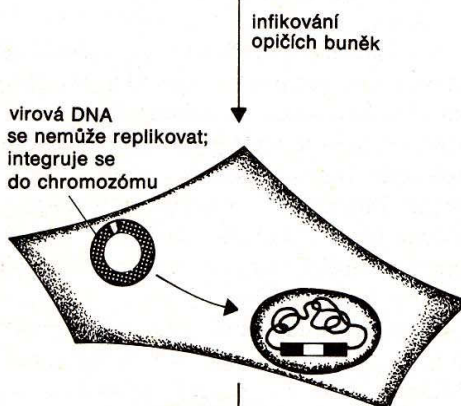
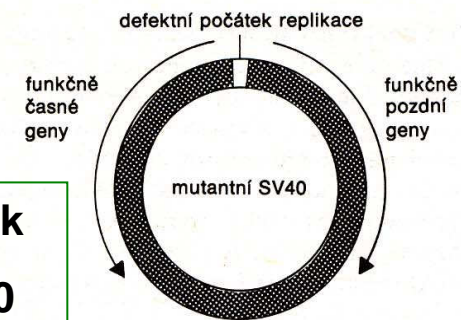
**Využití:** Studium genové exprese, regulace, posttranskripčních úprav atp, tvorba proteinů



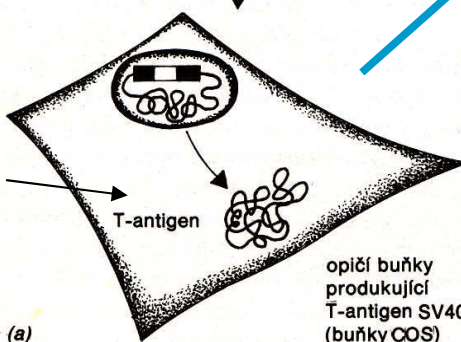
Obr. 15-1: Pozdní oblast SV40 je zaměněna klonovaným genem pro globin. Hybrid je pak použit k transformaci opičích buněk současně s SV40-DNA mutovanou v časné oblasti. Časné funkce SV40 poskytuje globin-SV40 hybridní molekula a spoluinfikující pomocný virus produkuje proteiny obalu viru. Výsledkem je pak smíšený soubor virů skládající se buď z virionů se sbalenou SV40-DNA defektní v časné oblasti, nebo hybridní globin-SV40 DNA.

Infekce nových buněk, vysoká produkce proteinu

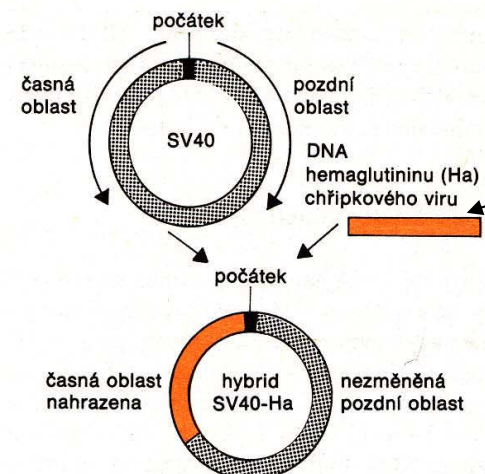
**Příprava COS buněk**  
**CV-1 Origin of SV40**



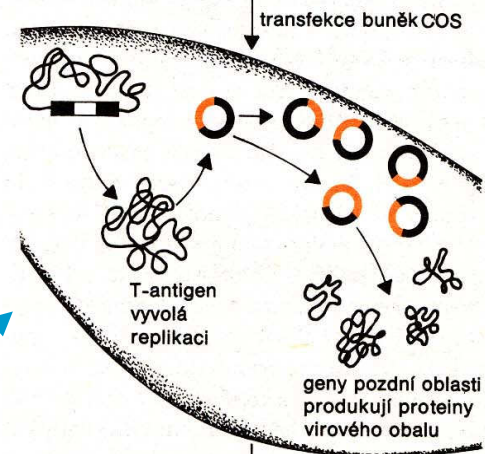
konstitutivní exprese



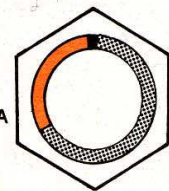
(a)



Náhrada časně oblasti SV40 genem Ha viru chřipky



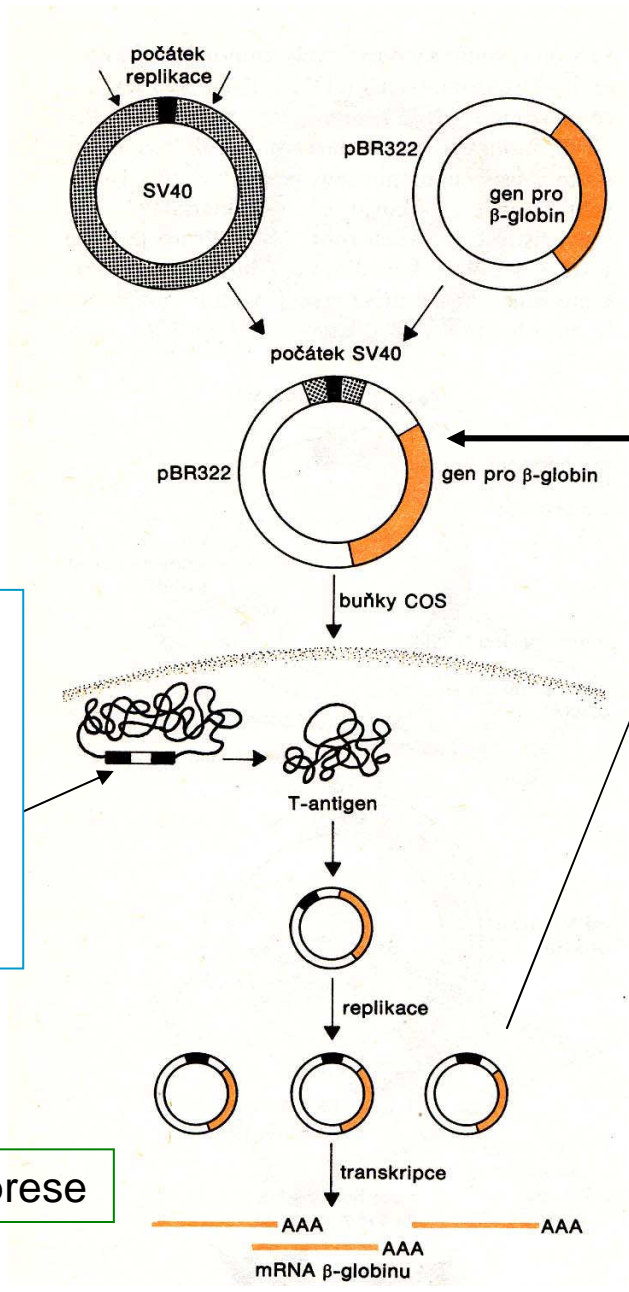
sbalení, lýze



**Rekombinantní virus**

**Rekombinantní molekuly se obalují – malá klonovací kapacita**

**Obr. 15-2: Záměna časně oblasti SV40.** (a) Opičí buňky jsou infikovány mutovaným SV40, bez funkčního počátku replikace, ale s funkčními časnými i pozdními geny. Protože se takové molekuly nemohou replikovat, integrují se do chromozómu opičích buněk, kde pokračují v tvorbě funkčního T-antigenu. Tyto buňky se nazývají COS. (b) Časná oblast SV40 je nahrazena klonovaným genem pro hemaglutinin (Ha) chřipkového viru. Při transfekci COS buněk takto vytvořeným hybridem se v buňkách tvoří T-antigen, který vyvolává replikaci Ha-SV40 DNA. Funkční pozdní oblast tvoří proteiny virového obalu. Molekuly Ha-SV40 jsou sbaleny do virionů.



Expresní kyvadlové vektory na bázi plazmidů **(obsahují oriSV40)**

Rekombinantní molekuly se neobalují – **velká klonovací kapacita**

Po transfekci COS buněk se cizí geny replikují ve velkém počtu kopií, pokud jsou klonovány v plazmidu s SV40 počátkem. Velký počet kopií dovoluje účinnou transkripci cizího genu.

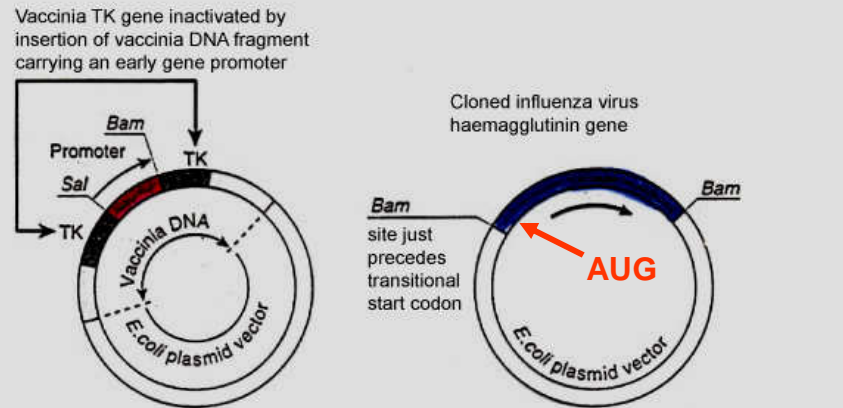
Indukce exprese (replikace) klonovaných genů regulací exprese genu pro T antigen (časný promotor):

- Tag (ts)
- Tag pod kontrolou jiného promotoru (metalothionein)

transientní exprese

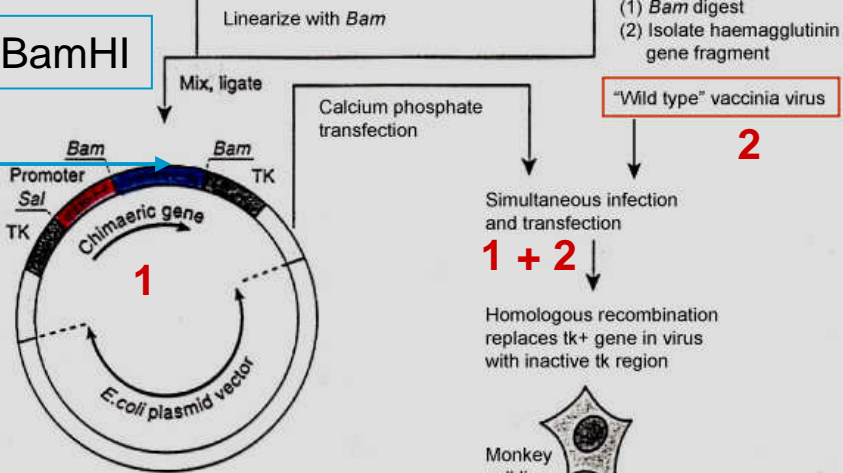


**Konstrukce infekčních rekombinantních virů vakcinie exprimujících HBsAg viru chřipky**

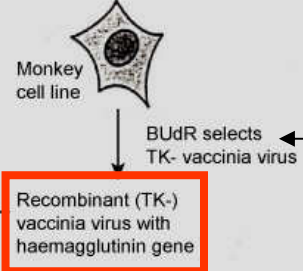


Klonování do BamHI

Klonovaný gen pro HBsAg určený k expresi (konstrukt připravený v E. coli)

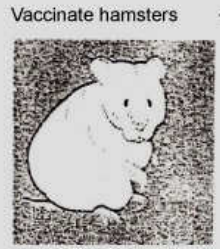


Simultaneous infection and transfection  
**1 + 2**  
Homologous recombination replaces tk+ gene in virus with inactive tk region



selekce

Recombinant (TK-) vaccinia virus with haemagglutinin gene



Vaccinate hamsters  
Animals immune to infection with influenza virus

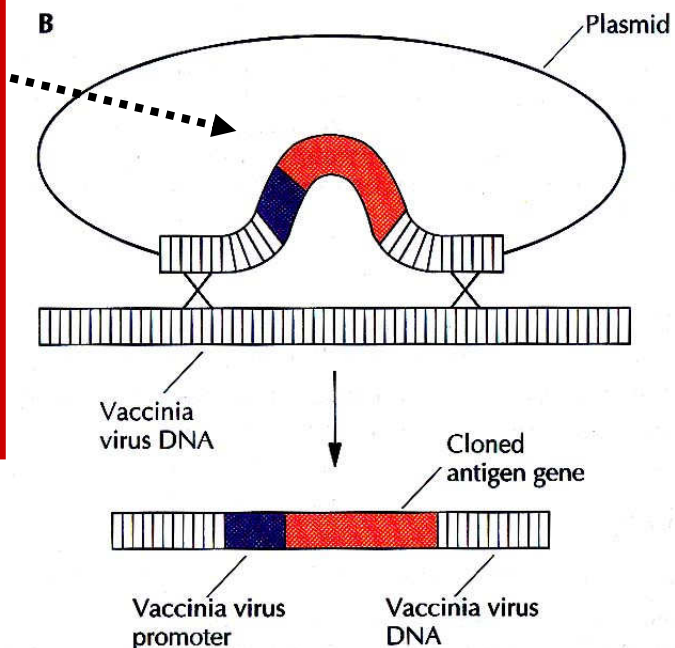
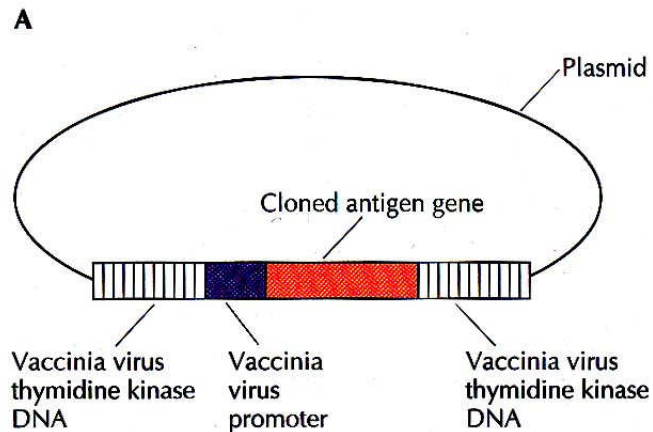
Živé vakcíny

Env viru HIV a HTLV-III  
Sag viru hepatitidy B  
Ag viru vztekliny

**Virus vakcinie**

- 187 – 300 kb
- izolovaná virová DNA je neinfekční – vlastní aparát
- replikace a transkripce DNA v cytoplasmě
- vnášení cizích genů homologní rekombinací *in vivo*

# Začleňování cizích genů do DNA viru vakcinie homologní rekombinací



+ selekční marker (neoR) navíc - vzhledem ke spontánním mutacím

Tk+ → Tk-

Gen kódující antigen je začleněn za promotor genu viru vakcinie a vložen do plazmidového vektoru tak, že přerušuje sekvenci neesenciálního genu viru vakcinie (např. gen pro Tk)

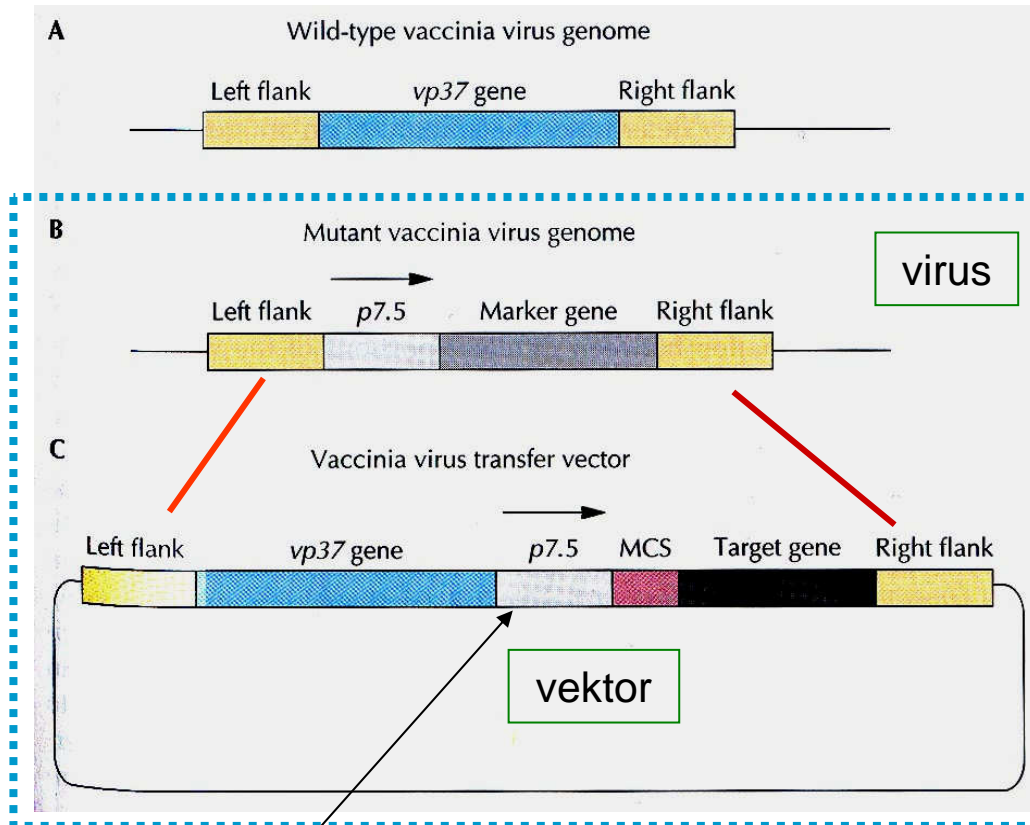
Tento plazmid se přenese transformací do živočišných buněk Tk- pěstovaných v kultuře (kuřecí embryonální fibroblasty), které byly předtím infikovány virem vakcinie standardního typu, který tvoří funkční Tk.

Homologní rekombinací dojde k začlenění genu pro antigen do genu Tk viru vakcinie. **V buňce pak není žádný funkční gen pro Tk a buňky lze selektovat v prostředí s BUdR.**

Konečná selekce (ověření) se provede hybridizací pomocí sondy specifické pro cizí gen.

# System pro snadnou selekci rekombinantních virů vakcinie

(**nevyžaduje selekční látku, není nutné přerušit žádný virový gen**)



Silný vakciniový promotor

virus, který tvoří plaky, nese cizí gen.

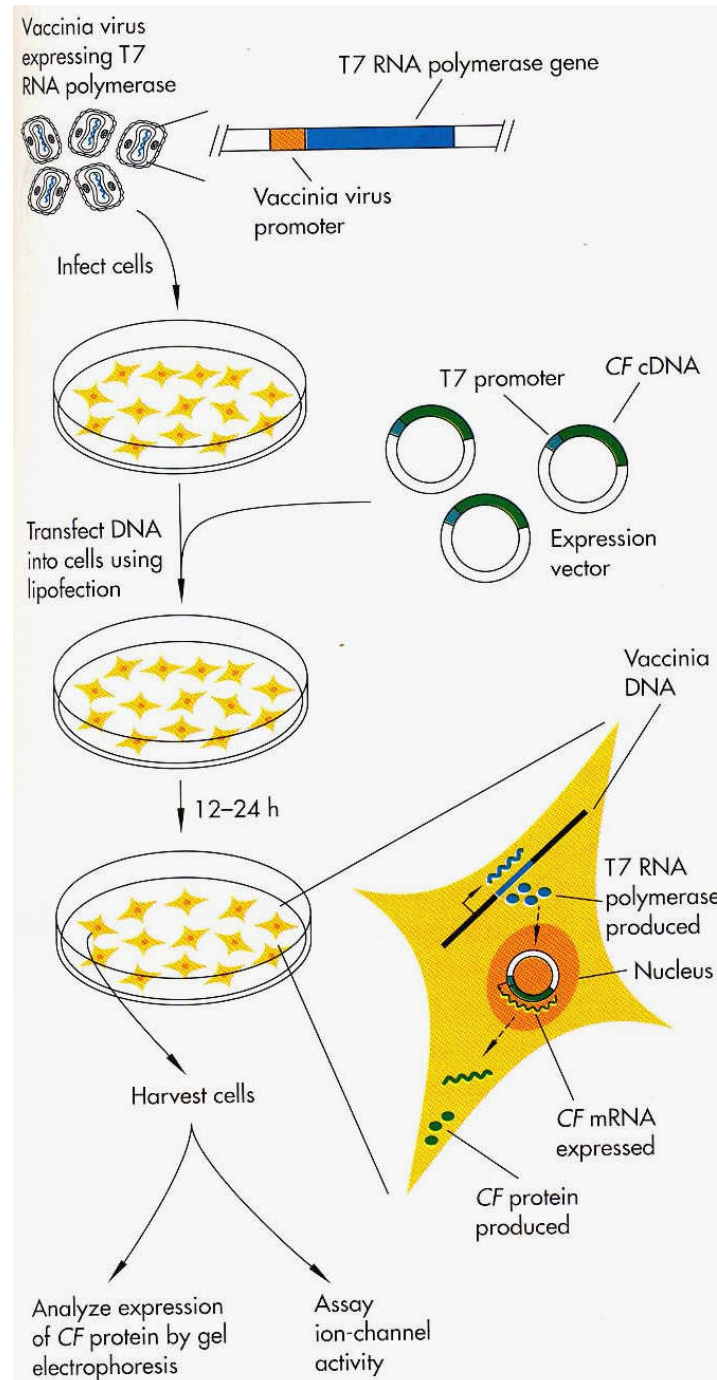
- A. Úsek genomu viru obsahující gen *vp37*, který je zodpovědný za tvorbu plak na monovrstvě buněk *in vitro*
- B. Úsek genomu mutantního viru, v němž byl gen *vp37* nahrazen markerovým genem z *E. coli* (*gpt*, *lacZ*...) pod kontrolou silného virového promotoru (*p7.5*). Tento virus netvoří plaky, neboť neobsahuje *vp37*
- C. Vektor obsahující MCS, do něhož se vloží gen zájmu. Homologní rekombinace mezi hraničními sekvencemi (flank) na vektoru a na genomové DNA mutantního viru vede k současnému začlenění genu *vp37* a genu zájmu. **Virus tvoří plaky ~ selekce**

## Vektorový systém odvozený od viru vakcinie

- široké rozmezí hostitelů

Buňky z pacienta s CF – defekt v transportu iontů

V buňkách se tvoří T7-RNA-polymeráza, která aktivuje T7 promotor a dochází k expresi klonovaného genu



1. Infekce buněk virem vakcinie produkujícím T7-RNA-polymerázu
2. Infekce vektorem s klonovaným genem (CF) pod kontrolou T7-promotoru

Virus zastavuje syntézu proteinů hostitelské buňky, až 30% mRNA v buňce tvoří CF-mRNA, která je preferenčně translatována

# Používání a výhody vakcinia viru

- je možné vakcinovat proti několika infekcím současně – do vektoru se umístí geny pro různé antigeny pod kontrolou různých vakciniových nebo jiných virových promotorů (aby nedocházelo k homologní rekombinaci a ztrátě genů), a výběrem promotorů lze časovat expresi genů (časné x pozdní – ovlivňuje míru exprese).

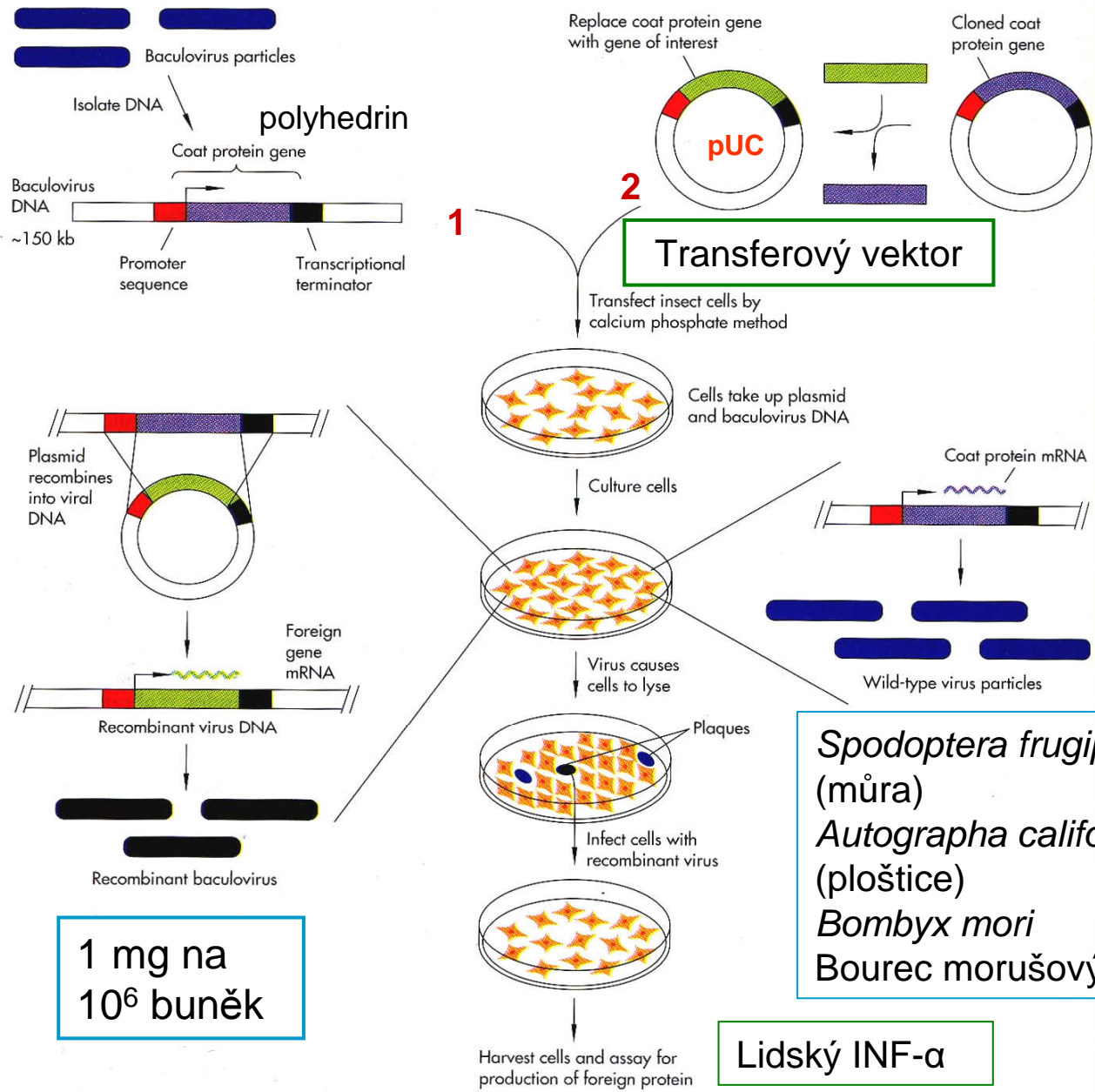
Živá vakcína má tyto výhody oproti usmrceným virům nebo podjednotkovým vakcínám:

- virus exprimuje autentický antigen způsobem, který se podobá přirozenému
- virus se replikuje, antigenu přibývá, aktivují se B a T buňky.

*Nevýhoda: u imunosuprimovaných pacientů může vakcinace navodit problémy, do viru lze ale přidat gen pro interleukin 2, který zesiluje činnost T-buněk a tak snižuje množení viru.*

Již klonované antigeny: vzteklna, hepatitida B, chřipka, HSV, virus stomatitidy.

# Klonování genů ve vektorech odvozených z bakulovirů



Virová DNA  
linearizovaná  
RE

Transferový vektor

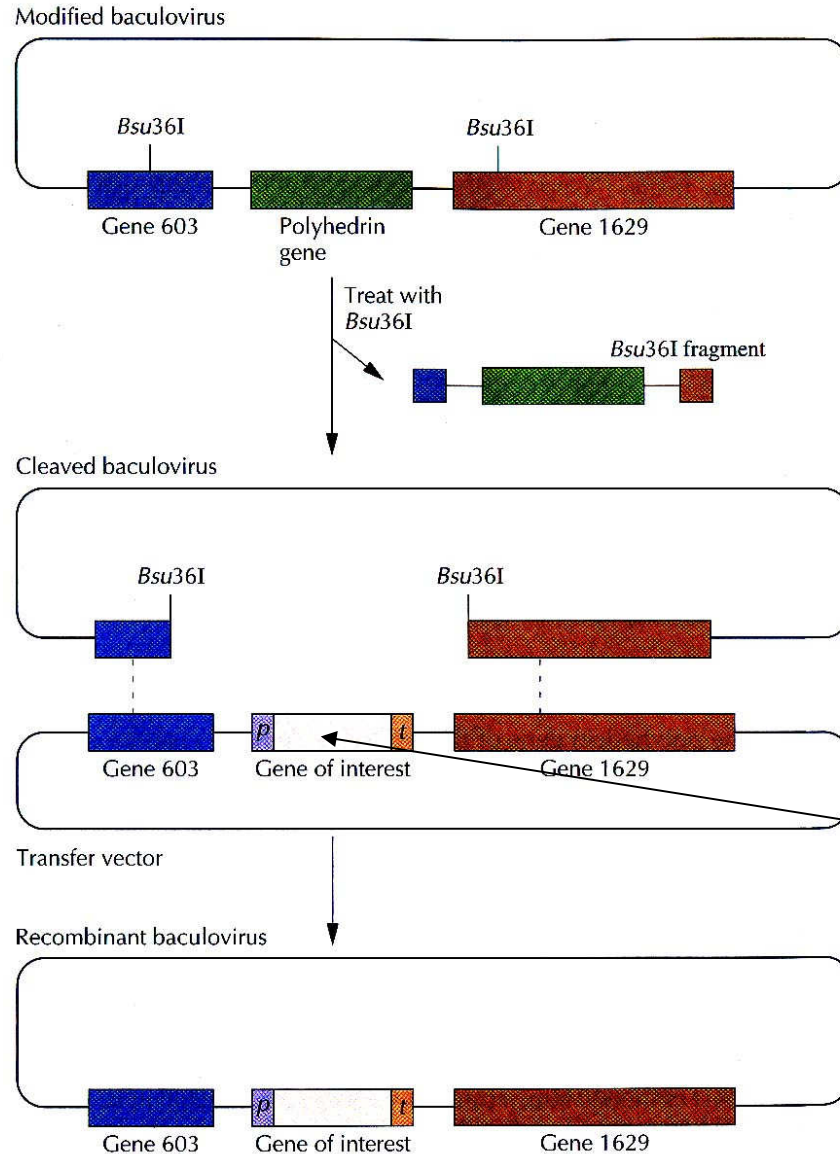
Fúzní nebo  
nefúzní proteiny

1 mg na  
10<sup>6</sup> buněk

*Spodoptera frugiperda*  
(můra)  
*Autographa californica*  
(ploštice)  
*Bombyx mori*  
Bourec morušový

Lidský INF-α

# Příprava rekombinantních bakulovirů



Do genů 603 a **1629** (který je nutný pro replikaci viru; geny ohraničují gen pro polyhedrin), se vnesou místa pro RE Bsu361. Působením Bsu361 se vyštěpí segment s genem pro polyhedrin a DNA bakuloviru se vnese spolu s transferovým vektorem do hmyzí buňky, **kde dojde k homologní rekombinaci za vzniku rekombinantního bakuloviru s funkčním genem 1629.**

*p a t z genu pro polyhedrin*

Většina potomstva bakulovirů je rekombinantní (až 99%).

**Selekce není nutná, rostou jen rekombinantní viry**

# Spodoptera frugiperda



Insecta: Lepidoptera: Noctuidae  
(Subfamily Amphipyrinae, Tribe Amphipyritini)



Příklady rekombinantních proteinů připravených v bakulovirových expresních systémech HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HSV, herpes simplex virus.

$\alpha$ -Interferon	G-protein-coupled receptors	Malaria proteins
Adenosine deaminase	HIV-1 envelope protein	Mouse monoclonal antibodies
Anthrax antigen	HSV capsid proteins	Multidrug transporter protein
$\beta$ -Amyloid precursor protein	Human alkaline phosphatase	Poliovirus proteins
$\beta$ -Interferon	Human DNA polymerase $\alpha$	Pseudorabies virus glycoprotein 50
Bovine rhodopsin	Human pancreatic lipase	Rabies virus glycoprotein
Bluetongue virus neutralization antigen	Influenza virus hemagglutinin	Respiratory syncytial virus antigen
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	Interleukin-2	Simian rotavirus capsid antigen
Dengue virus type 1 antigen	Lassa virus protein	Tissue plasminogen activator
Erythropoietin		

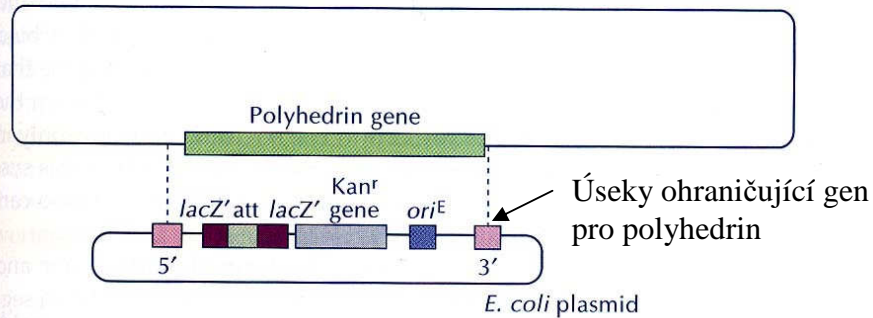
# Alternativní způsob přípravy rekombinantních bakulovirových vektorů - bacmidů

- Expresní kazeta se vloží místně-specifickou transpozicí do bakulovirového kyvadlového vektoru (bacmidu). Bacmid, který se replikuje v *E. coli* jako velký plazmid, obsahuje úplný genom bakuloviru (bez PH), nízkokopiový počátek replikace z F plazmidu a att místa pro transpozon T7.
- Rekombinantní bacmid se připraví transpozicí modifikovaného transpozonu T7 z donorového plazmidu, který obsahuje cílový gen určený k expresi, do att míst na bacmidu (je vyžadován pomocný plazmid kódující transponázu).
- Rekombinantní bacmid je pak izolován z *E. coli* a přenesen transfekcí do hmyzích buněk.

# Konstrukce rekombinantního bacmidu

## A *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus

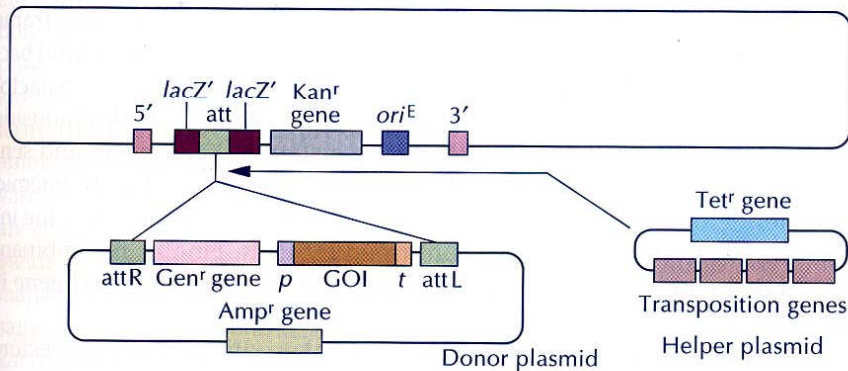
AcMNPV genome



Začleněním plazmidu do genomu bakuloviru (2xCO) vzniká kyvadlový vektor (E.coli+ hmyzí buňky)

## B

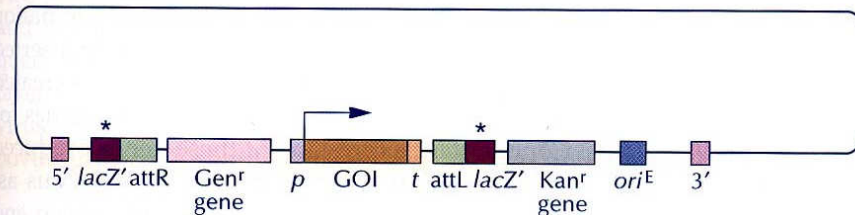
Bacmid



Transpoziční funkce pomocného plazmidu umožní transpozici úseku donorového plazmidu obsahujícího gen zájmu, který je pod kontrolou bakulovirového promotoru a terminátoru (**p** a **t**).

## C

Recombinant bacmid



Rekombinantní bacmid má přerušeny gen lacZ'. Buňky *E. coli* obsahující rekombinantní bacmid nejsou schopny tvořit funkční  $\beta$ -galaktozidázu (bílé kolonie).

# Retroviry a retrovirové vektory

1. Infikují široké spektrum buněk živočišných druhů a různé typy lidských buněk
2. Infekce vede k integraci virového genomu do genomu hostitelské buňky – místo integrace je libovolné (přednostně v transkripčně aktivním chromatinu)
3. Infekce retrovirem nemá za následek smrt buňky, často vede ke stálé produkci nových virionů
4. Retroviry nesoucí onkogeny lze využít k infekci buněk různých tkání, čímž lze získat permanentně transformované buněčné linie – **onkogenní retroviry = přirozené vektory**
5. Nevýhodou je schopnost retrovirových vektorů aktivovat transkripci genů sousedících s místy jejich začlenění

# Životní cyklus retrovirů

- Virová RNA vstupující do buňky je doprovázena RT a integrázou, zabalenou do virionu  
  
RT spolu s RNázaH aktivitou přepíše RNA do cDNA, pak do dsDNA. Tato kopie DNA, zvaná provirová DNA, je mírně delší než RNA díky duplikacím koncových sekvencí během procesu konverze RNA na DNA
- Provirová DNA se cirkularizuje a pomocí integrázy se inzertuje do genomu. Do genomu se obvykle integruje jen jedna nebo málo kopií, místa integrace jsou náhodná (preferenčně do transkribujících se oblastí)
- V LTR sekvenci je silný promotor pro RNA polymerázu II
- Provirový genom má tři geny: gag, pol, env, které jsou transkribovány a translatovány do prekurzorových proteinů, které jsou proteolyticky štěpeny za vzniku zralých proteinů.
- Transkripty plné délky se zabalují do částic viru. Důležité je místo psi – pro interakci virové RNA s proteiny, sestavení virionů probíhá v buněčné membráně, viry pučí z buněk, nedochází k lyzi buněk

# Vektory odvozené od retrovirů

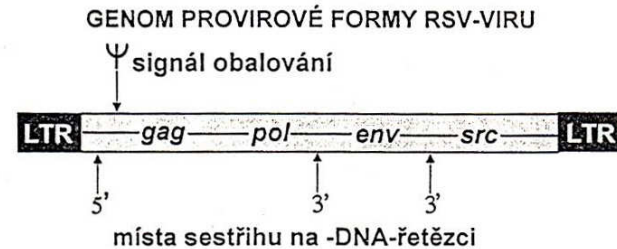
## Výhody:

- vysoká účinnost přenosu genů
- dobře prostudovaný systém
- klonovací kapacita až 8 kb (i více)
- integrace vektoru do genomu, stabilní začlenění genu a jeho permanentní exprese

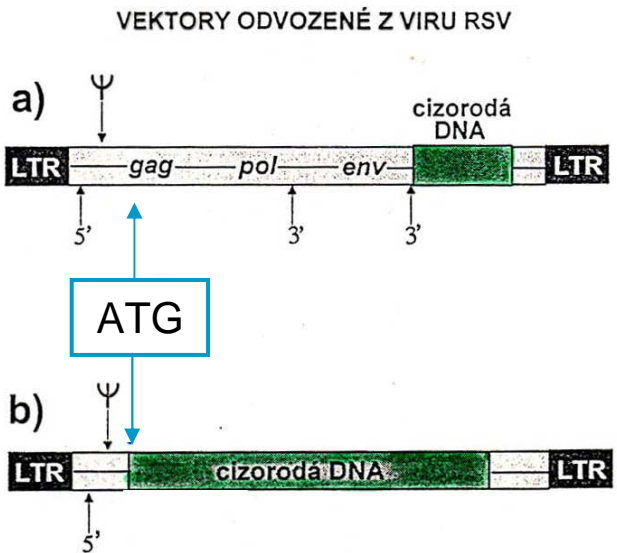
## Nevýhody:

- infikuje jen dělící se buňky (výhoda v GT) **x lentiviry: nedělící se b.**
- nízké titry rekombinantního vektoru
- náhodná integrace do genomu – inaktivace genů n. aktivace endogenu

# Příklady konstrukce retrovirálních vektorů

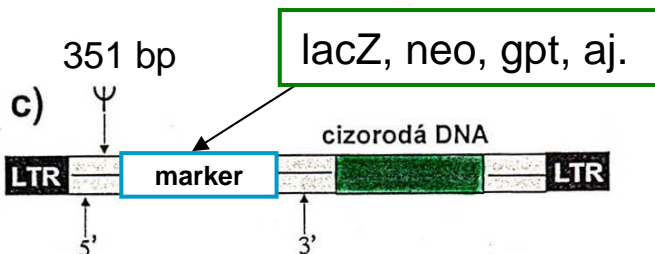


Replikace, transkripce



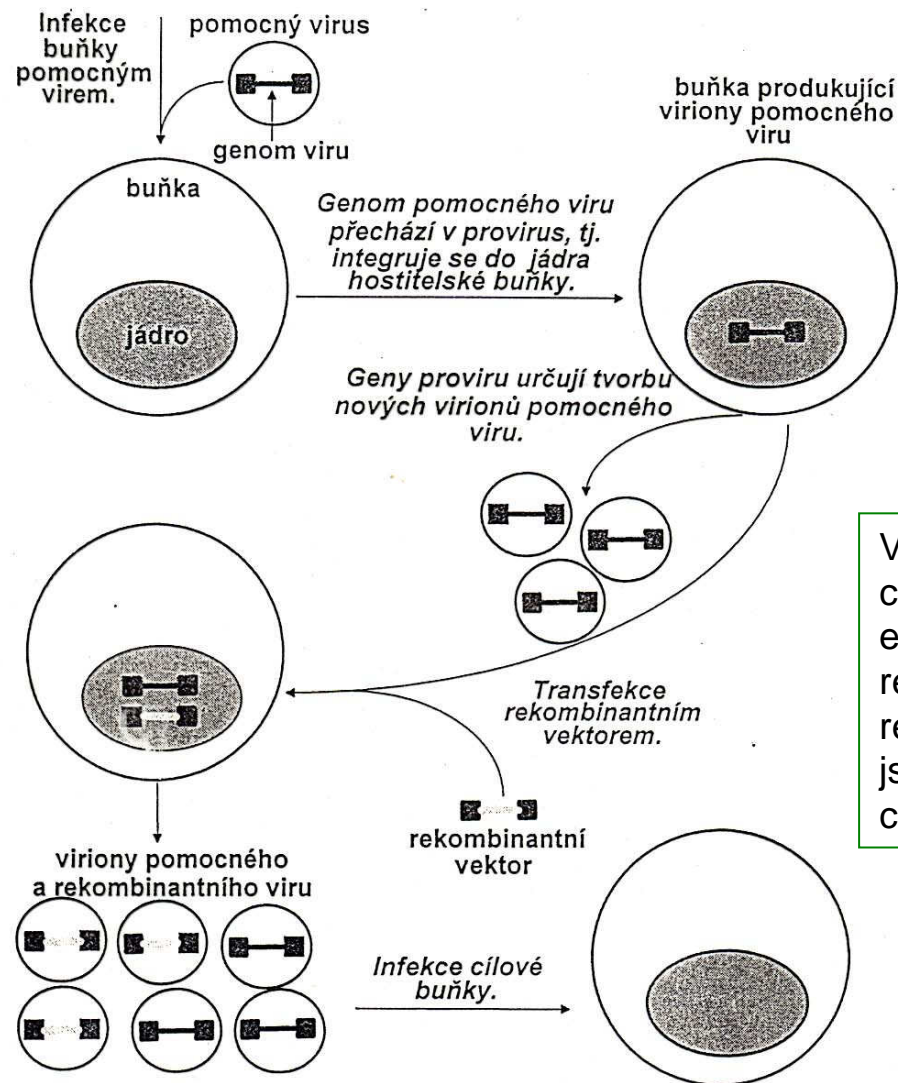
Sekvence *in cis* nezbytné pro transkripci, replikaci a obalování:

- LTR: integrace DNA do genomu, transkripce
- PBS: reverzní transkripce,
- ψ (psi) místo: obalování RNA



Defektní virový genom = nová transkripční jednotka v genomu hostitelské buňky

# Transfekce rekombinantním retrovirovým vektorem do buněk produkujících viriony pomocného viru



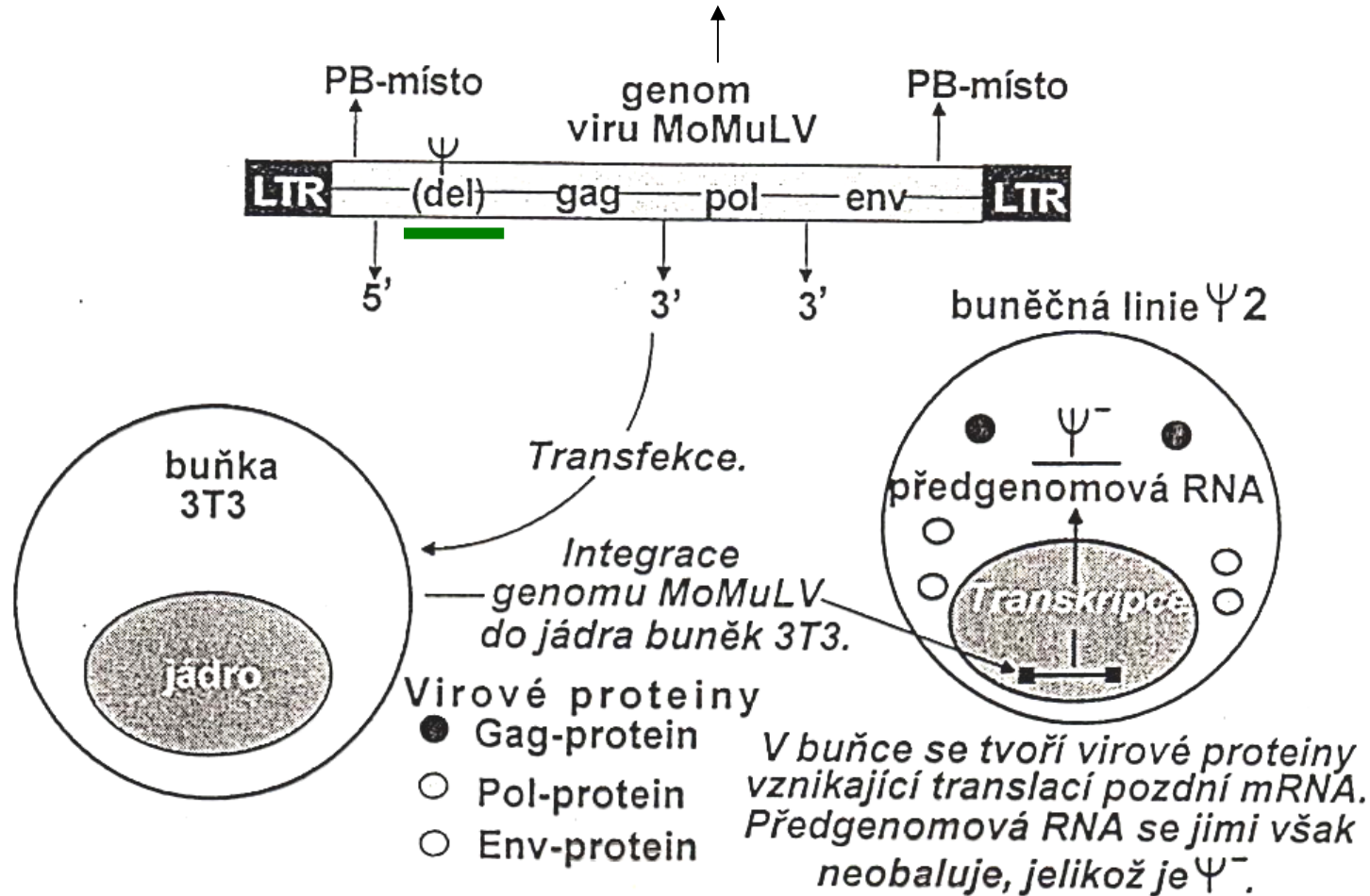
Molekuly RNA vzniklé transkripcí DNA integrovaného rekombinantního vektoru a proviru pomocného viru se obalí proteiny, které jsou kódovány tímto provirem. Tvoří se viriony pomocného a rekombinantního viru.

V úspěšně infikovaných cílových buňkách se exprimují geny rekombinantního retroviru. Oba typy virů jsou produkovány cílovými buňkami.

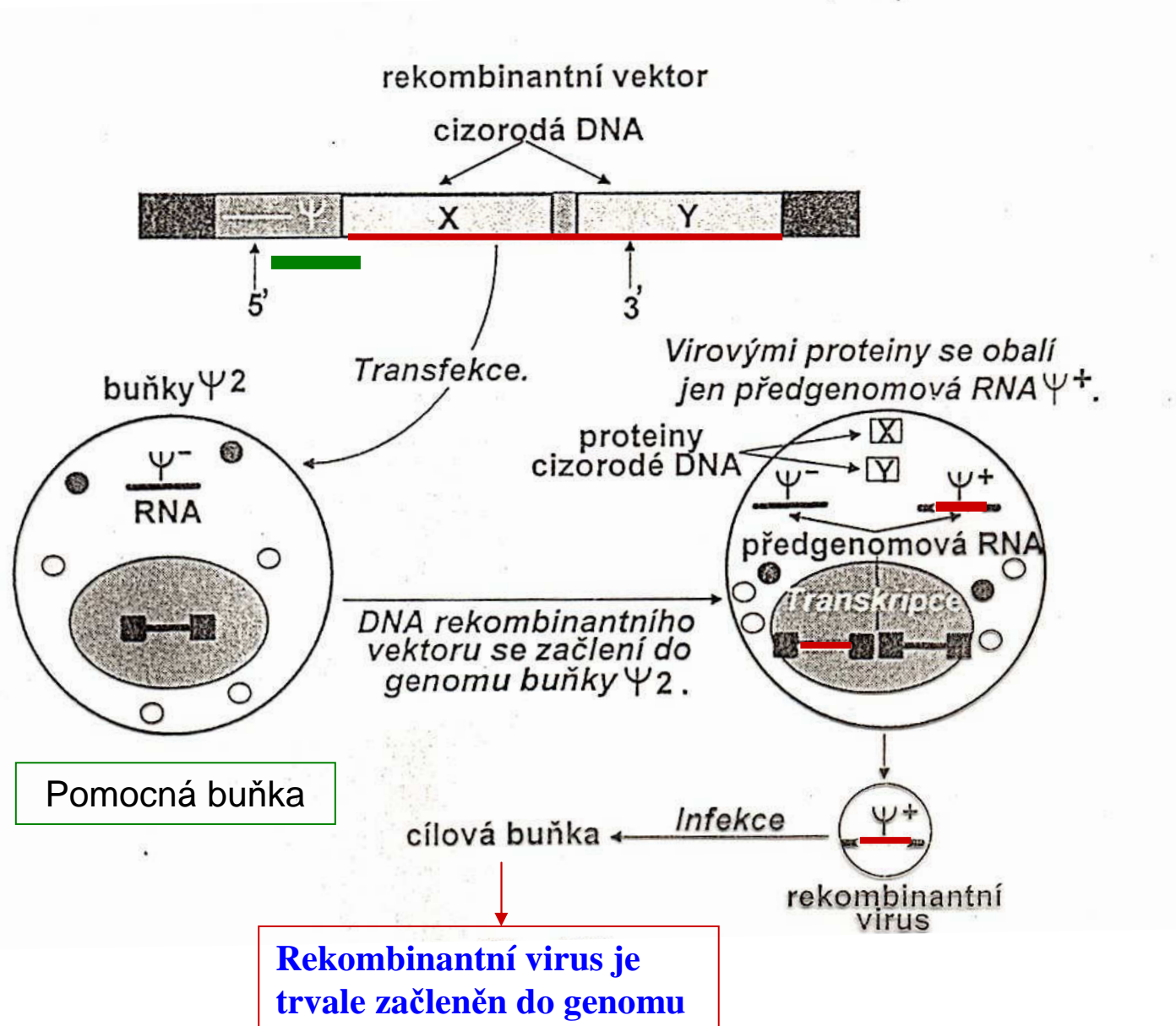


# Schéma přípravy linie pomocných buněk $\Psi$ 2

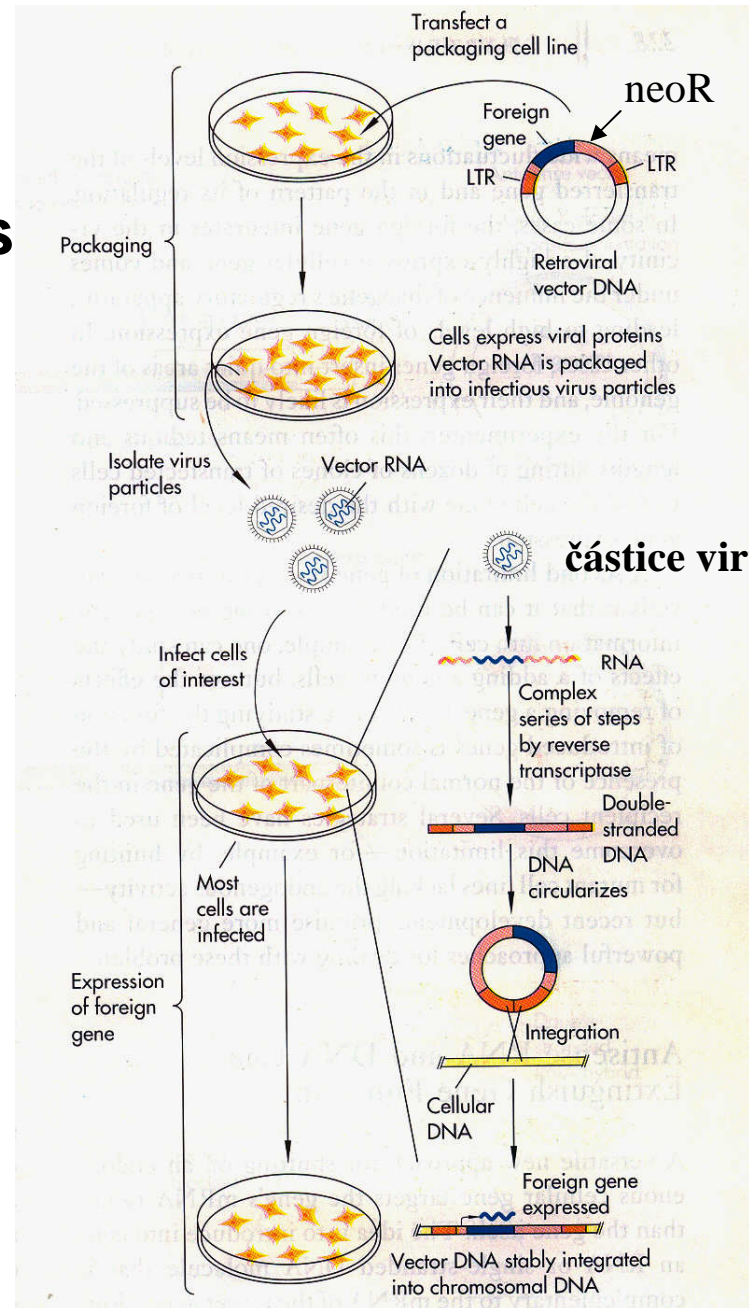
MoMuLV = Moloney Murine Leukemia Virus



# Příprava čisté linie rekombinantních retrovirů

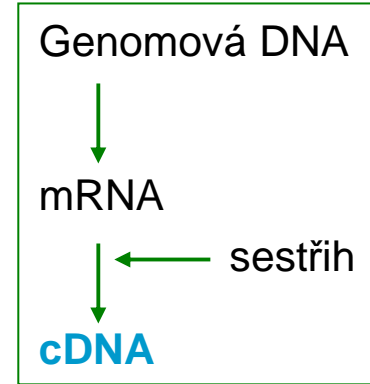


# Využití retrovirových vektorů pro stabilní expres cizorodých genů



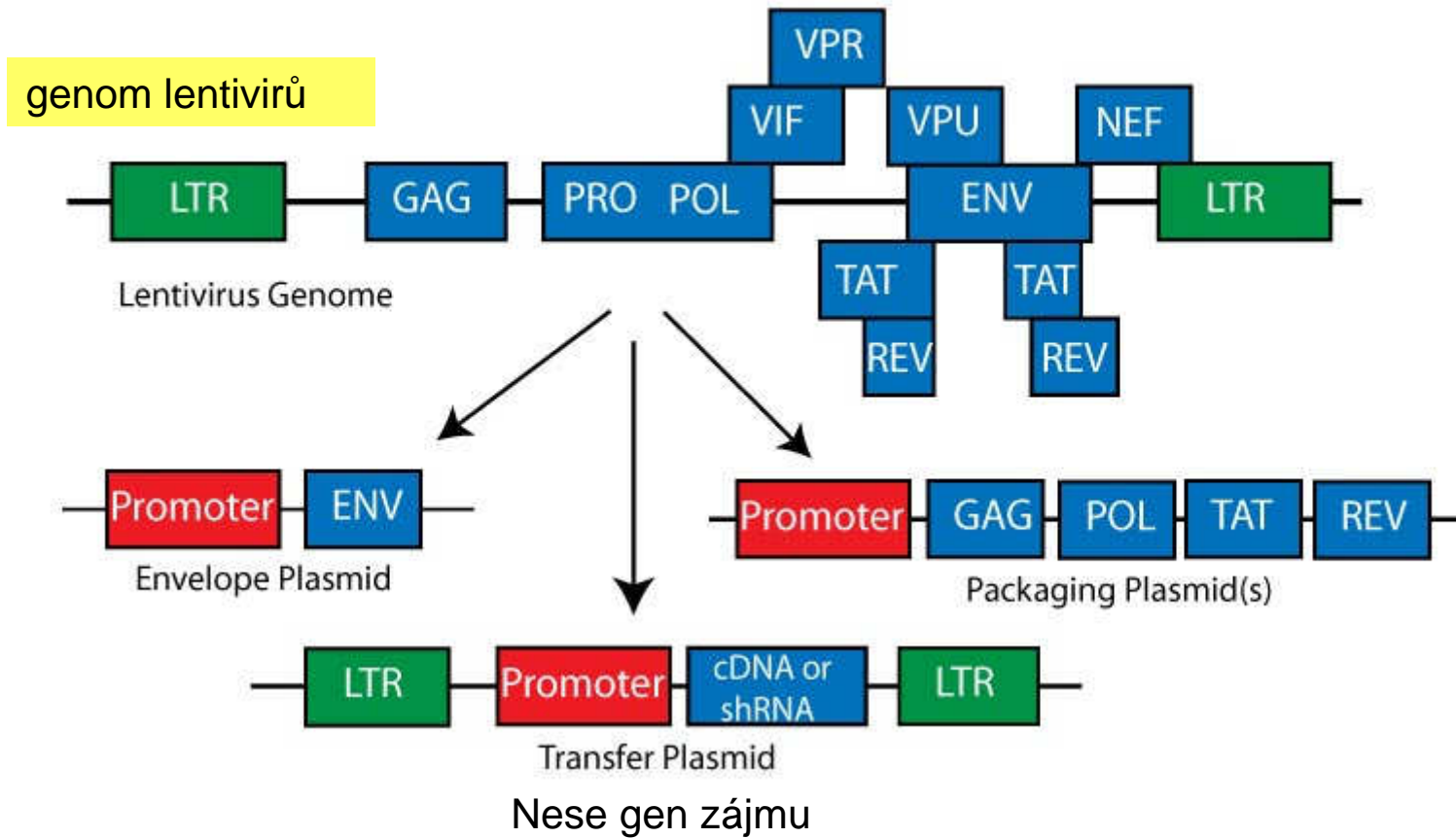
Klonování retrovirových sekvencí do plazmidu, vytvoření kyvadlového vektoru, klonování v E. coli

Rozmezí hostitele – pseudotyp viru  
amfotropní MuLV – široké rozmezí hostitele, včetně lidských buněk

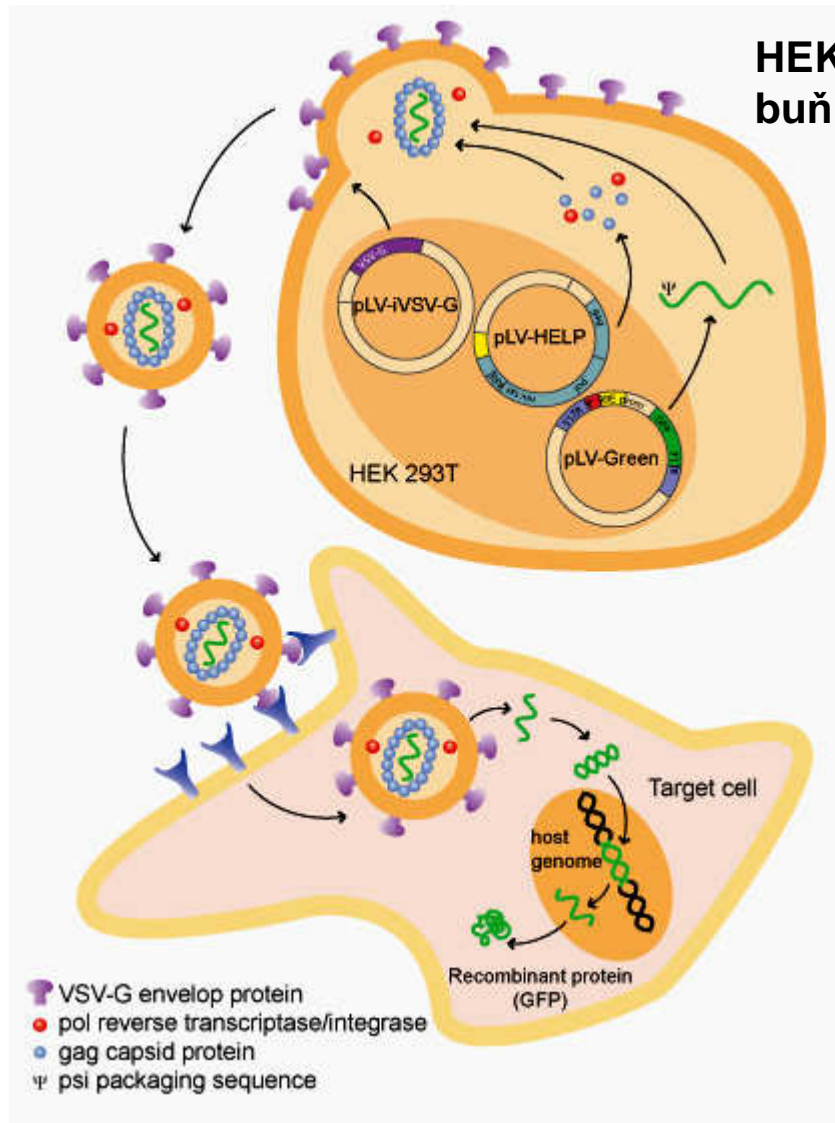


# Lentivirové vektory – přenos genů do nedělicích se buněk

Odvozeny od HIV, BIV, EIAV, FIV, SIV



## Přenos genů lentivirovým vektorem (systém obsahující 3 plazmidy)



Systém založen na třech plazmidových konstruktech:

1. Klonovací (přenosový)
2. Obalovací (vytváří env)
3. Zabalovací

To act as a suitable vehicle for delivery, the coding regions of the lentivirus are removed. The vector consists of the Long-Terminal Repeats (LTR) and the packaging signal psi that permits packaging

Helper plasmids, transfected together with pLKO.1, provide the viral genes (gag, pol and env) needed for the production of the viral particles. **The use of different env-genes enables modification of the viral tropism depending on the target cells to be infected.**

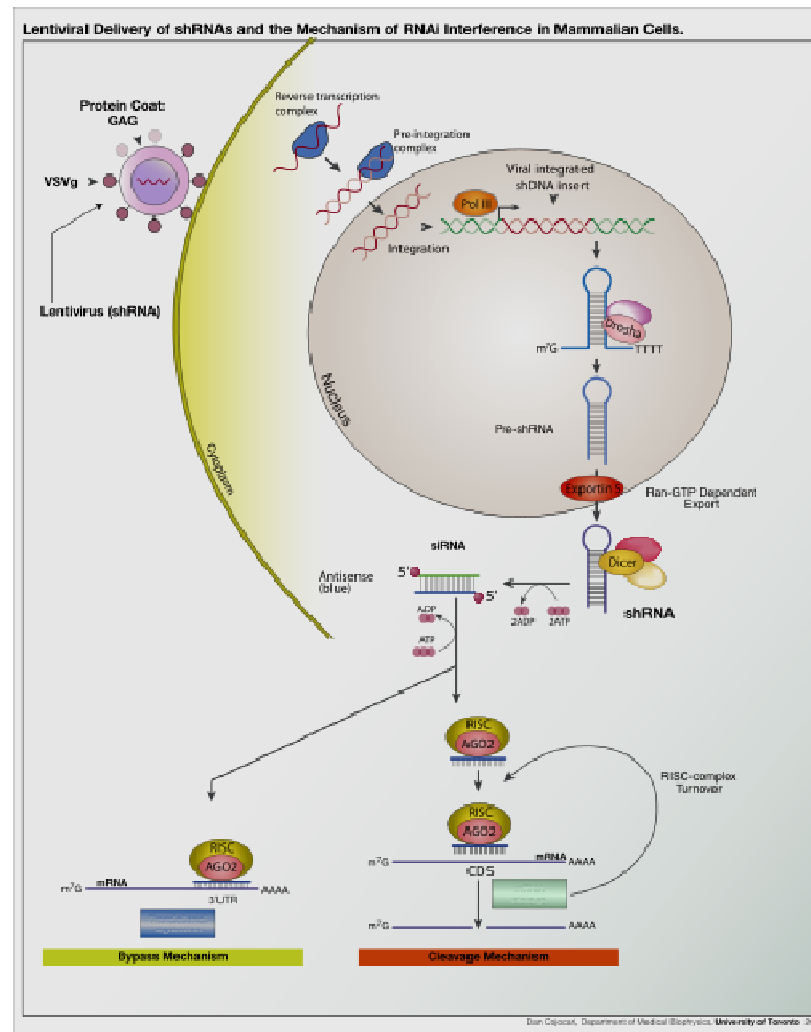


Table 15.2 High-level expression systems in animal cells

Host cell	Mode of transfer	Applications
Monkey COS cell	DEAE dextran or electroporation. Transient	Rapid characterization of constructs and expressed products. Cloning by expression
Chinese hamster ovary cell lines	Stable transfectants. DHFR/Mtx amplification	Constitutive expression, favoured for therapeutic proteins
Various mammalian	Recombinant vaccinia virus	Transient expression in wide range of cells
Various mammalian	Infection by vaccinia expressing T7 RNA pol*	Very high transient expression
Various mammalian and avian	Recombinant retrovirus	Long-term expression, variety of species
Insect cells	Recombinant baculovirus	Very high transient expression

\*The recombinant vaccinia virus expresses T7 RNA polymerase in the host cell. Target genes are constructed by linking to T7 promoter and terminator regions. When cells are infected by the recombinant vaccinia virus, and transfected with plasmid containing the target gene, the target gene is expressed at a very high level





# Možnosti přípravy geneticky modifikovaných myší

