

Cíle studia přenosu genů do živočišných buněk

1. Přenos genů do živočišných buněk

- vyhledávání genů, poznání jejich funkce a regulace
- studium fenotypu (př. procesů diferenciace a jejich poruch)
- homologní vs. heterologní exprese
- studium proteinových interakcí
- tvorba a purifikace 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 – chemické, fyzikální, virové

- precipitace fosforečnanem vápenatým, lipofekce (liposomy)
- dendrimery (větvené org. látky), kationické polymery (PEI)
- elektroporace, mikroinjekce, sonoporace (ultrazvuk)
- cell squeezing (deformace tlakem), magnetofekce (nanočástice)
- infekce (virové vektory)

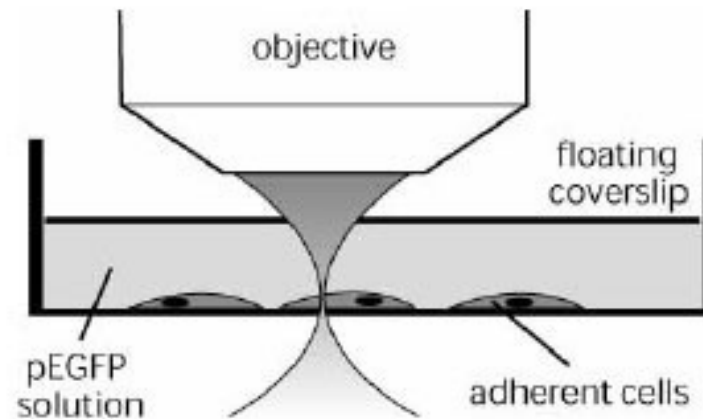
Fúze buněk (savčích, bakteriálních protoplastů), náhrada jader ...

Exprese transgenu:

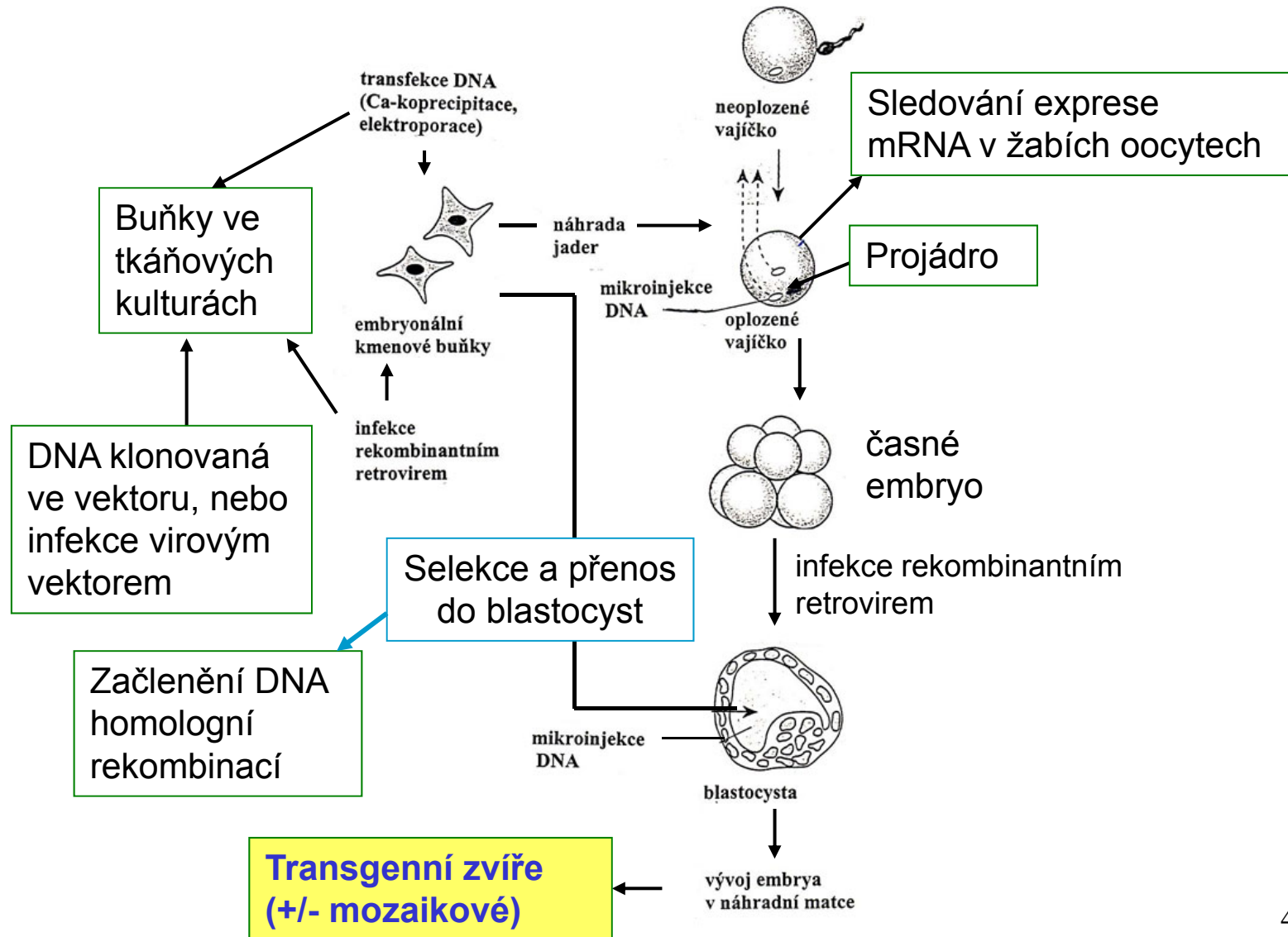
- transientní (přechodná)
- stabilní – začlenění – náhodné, cílené

Single cell transfection (i in vivo)

- mikroinjekce
- elektroporace mikropipetou naplněnou DNA
- fototransfekce (optická tranfekce) – multi-photon laser – zvýšení permeability cytoplazmatické membrány



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) – analog dihydrofolátu (inhibuje DHFR, syntéza purinů)	varianta DHFR rezistentní k Mtx, počet kopií
Hygromycin-B-fosfotransferáza (HPH) (Hyg)	Hygromycin-B (inhibuje syntézu proteinů)	HPH inaktivuje hygromycin B
Tymidinkináza (TK)	Aminopterin (analog dihydrofolátu, inhibuje syntézu dTTP z dCDP)	TK syntetizuje tymidylát (altern. dráha synt. dTTP)
Xantin-guanin-fosforibozyltransferáza (XGPRT) (Ecogpt)	Mykofenolová kyselina (inhibuje syntézu GMP de novo)	XGPRT syntetizuje GMP z xantinu (altern. dráha)
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



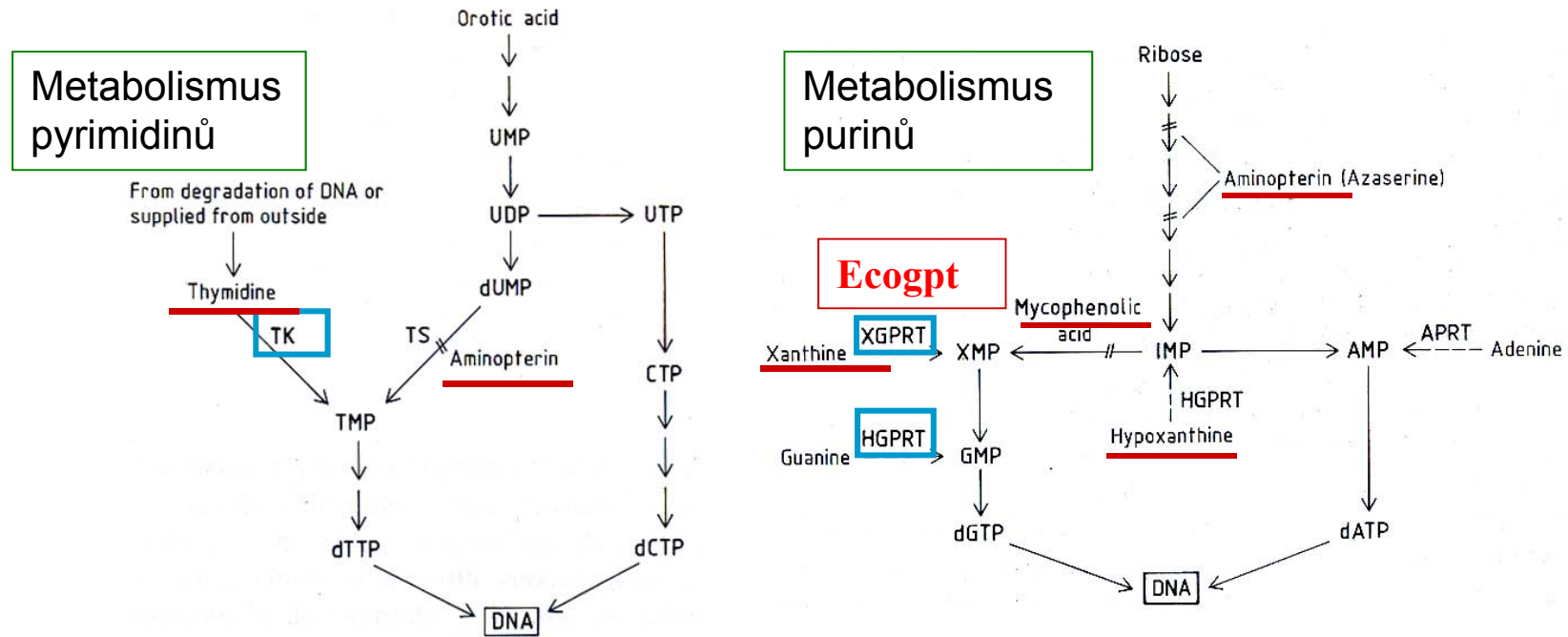
reportérové geny

Selective marker gene systems for mammalian cells

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



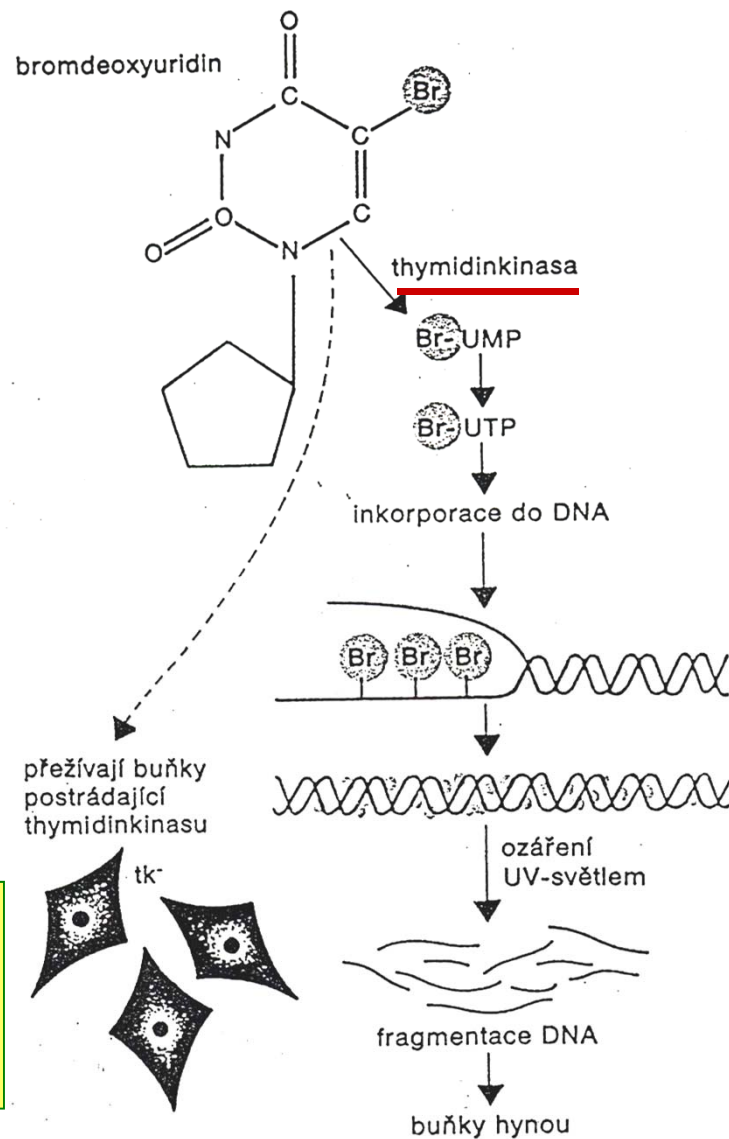
Selekční systémy Tk, HGPRT, XGPRT

A	HAT	BrdU		
Tk ⁺	+++	---		
Tk ⁻	---	+++		
B	HAT	6-Thioguanine	XAT	8-Azaguanine
HGPRT ⁺	+++	---	---	---
HGPRT ⁻	---	+++	---	---
HGPRT ⁺ (Ecogpt ⁺)	+++	---	+++	---

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

Medium XAT
 Xantin (+ kys. mykofenolová)

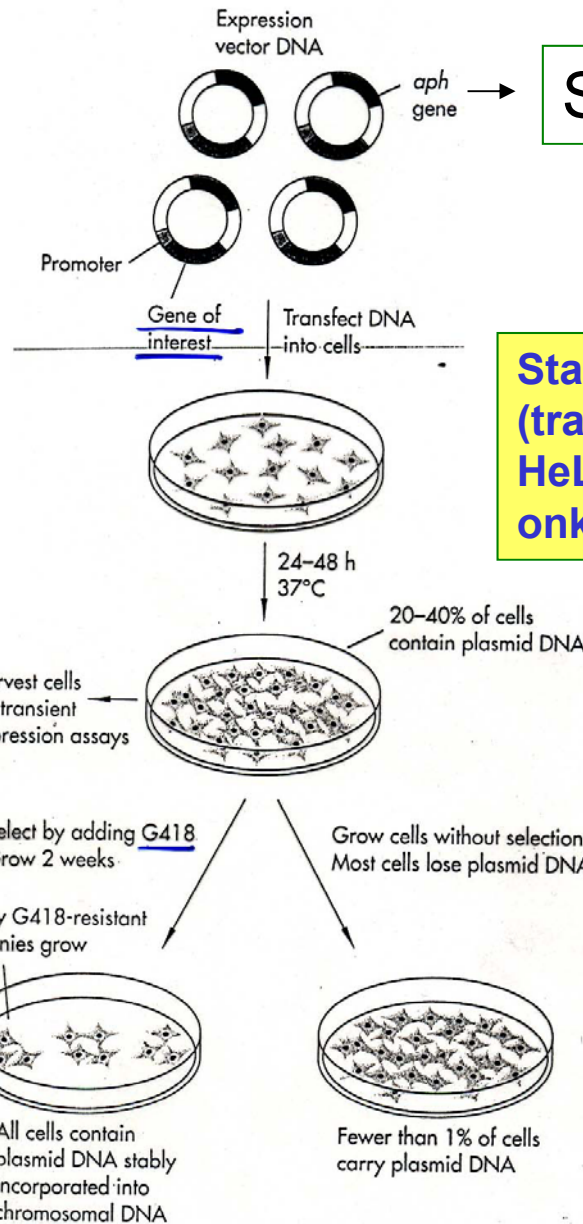
(---) indicates that cells do not grow and do not survive under these conditions. (+++) indicates that cells either grow or only survive as in the case of Tk⁻ cells in the presence of bromodeoxyuridine (BrdU). HAT stands for hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium, X for xanthine.



Připravena řada linií lidských a hlodavčích tk⁻ buněk

Postup při izolaci mutant tk⁻.
 Buňky s funkčním enzymem thymidinkinasou fosforylují bromdeoxyuridin (BrU-dr) na BrU-MP, který je potom inkorporován do buněčné DNA. Bromovaná DNA je extrémně citlivá na ozáření UV světlem, po kterém buňky hynou. **Vzácné mutanty tk⁻ ozáření přežívají.**

Transientní a stabilní exprese genů v živočišných buňkách



Selekce G418

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

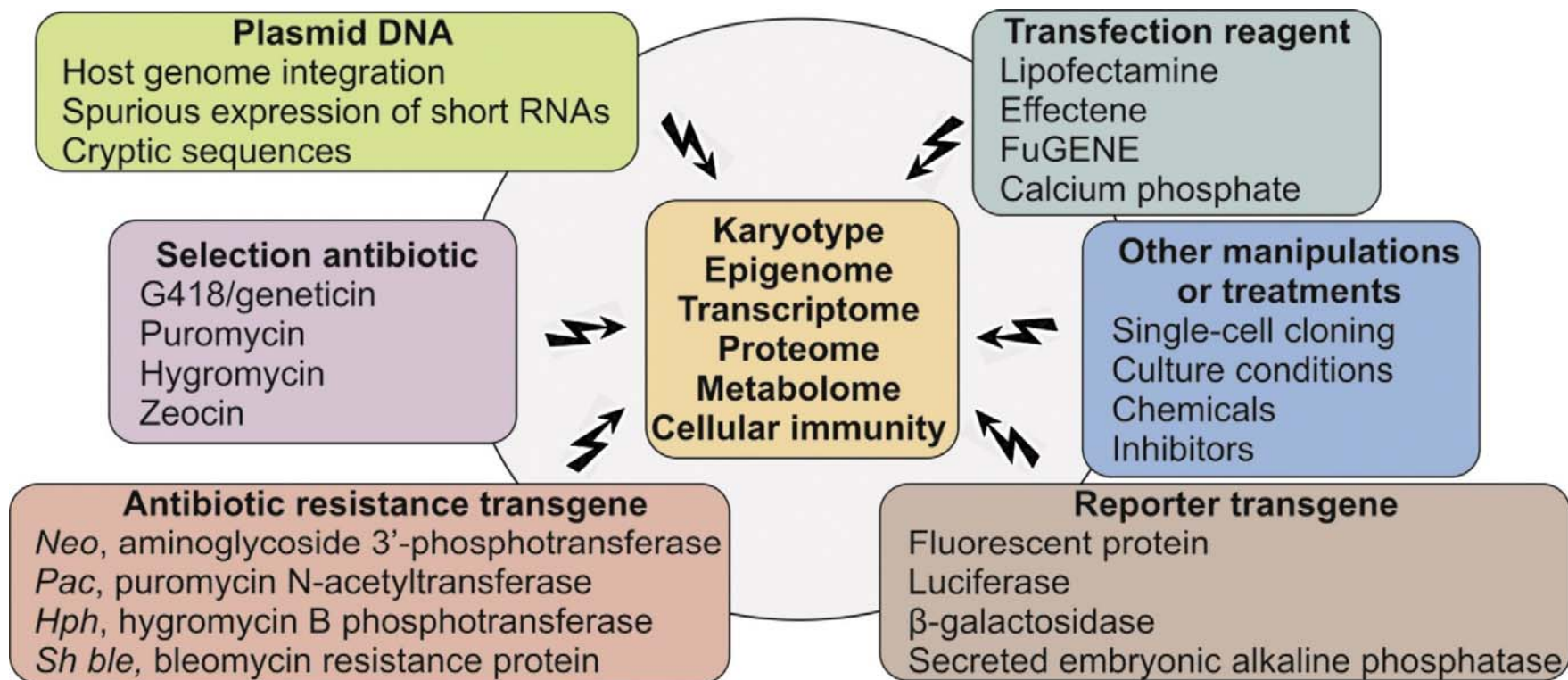
Analýza exprese genů. Studium regulačních oblastí, sestřihu; příprava velkých množství mRNA nebo proteinů

Selekce klonů s DNA stabilně integrovanou do genomu (vzácné)

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

Ideální vlastnosti vektorů (in vivo)

- vysoká účinnost přenosu
- přenos genů do embryí i do dospělých živočichů
- zprostředkovávají dlouhodobou a vysokou expresi
- nízká cytotoxicita
- nízká imunogenicita in vivo
- vysoká kapacita
- regulovatelná exprese



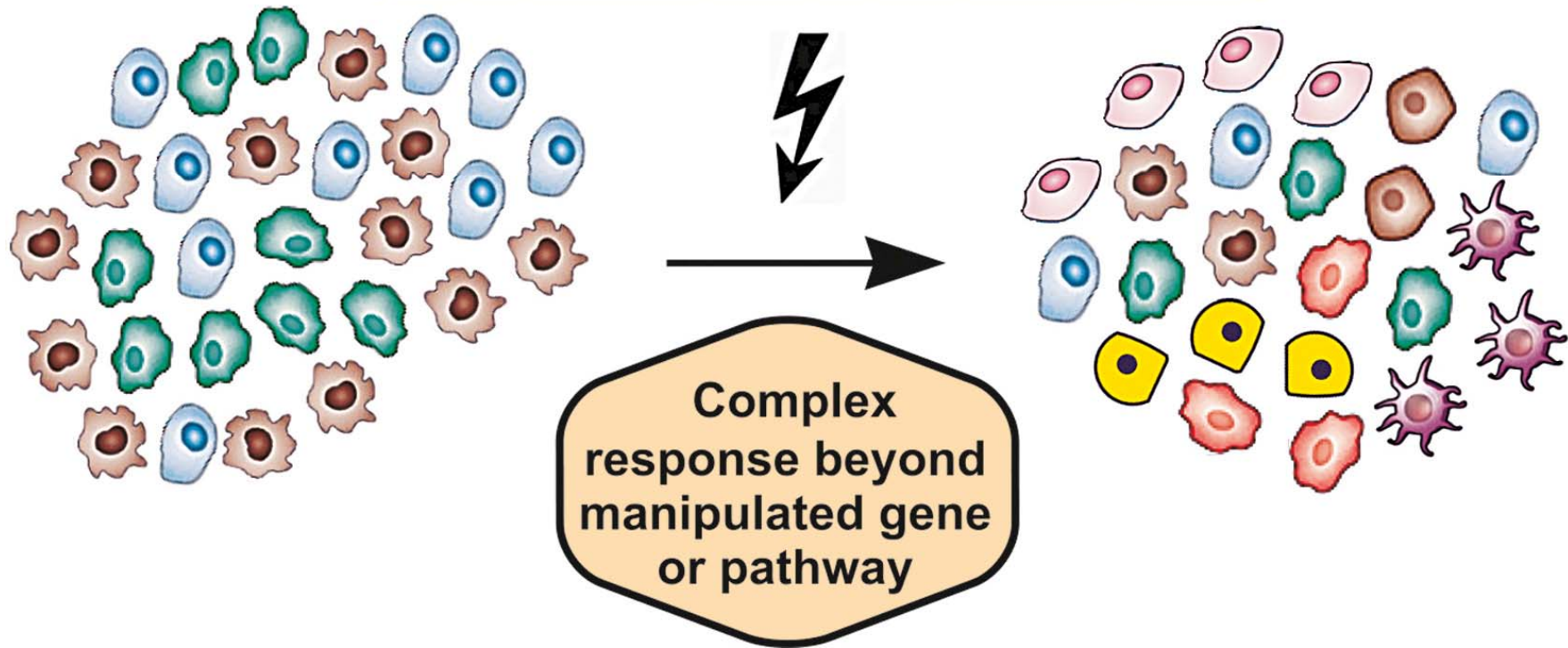
High intensity experimental stresses

Transgene overexpression

Gene knock out/down

Chemical treatments

Acute changes in culture conditions



Lipofectamine2000, Lipofectamine LTX, Fugene, Effectene

- deregulace exprese genů a proteinů (společné i specifické)
- metabolismus lipidů
- aktivace signálních drah (STAT3, ...)
- imunitní odpověď (deregulace exprese chemokinů a cytokinů)
- efekty často buněčně specifické

Antibiotika pro selekci

- G418 – vliv na syntézu selenoproteinů (thiredoxin reduktáza, glutation peroxidáza)
 - stop kodón supresor
 - ovlivňuje expresi hsp proteinů

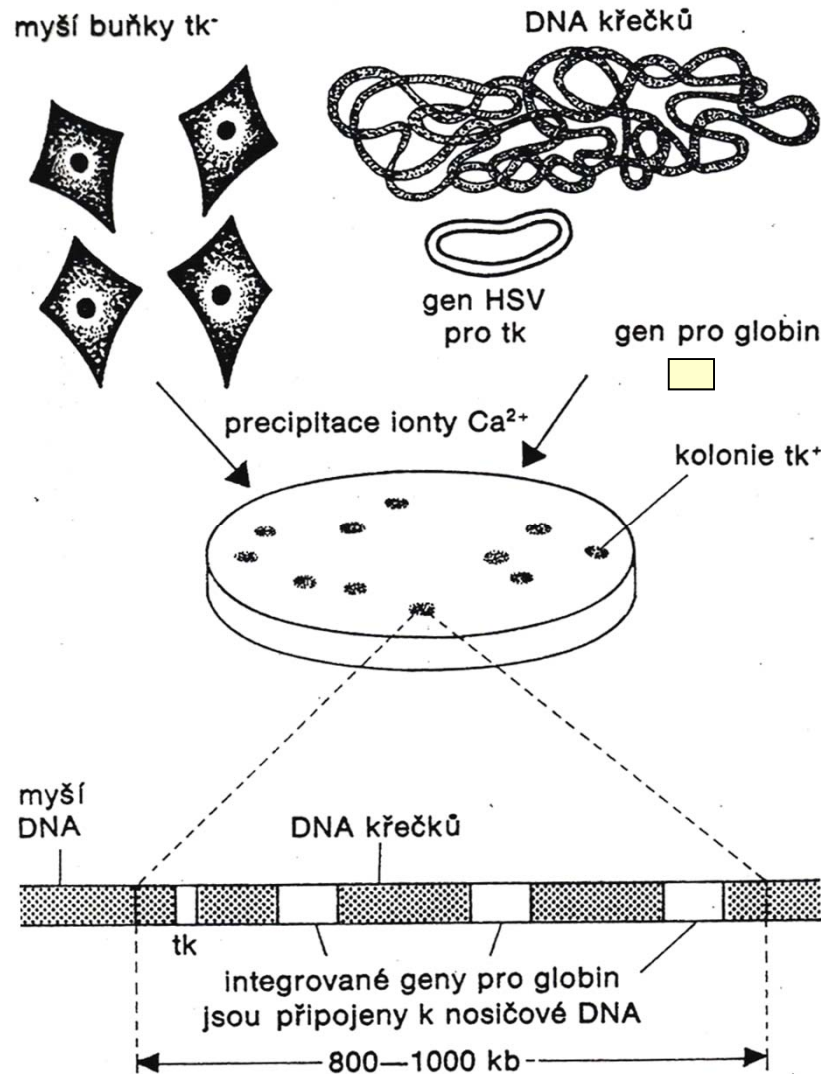
Gene dosage artefacts

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 ve více kopiích.
3. Elektroporace plazmidové DNA – obvykle nižší 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. Superhelikální plazmidová DNA, ale vyšší účinnost transfekce.

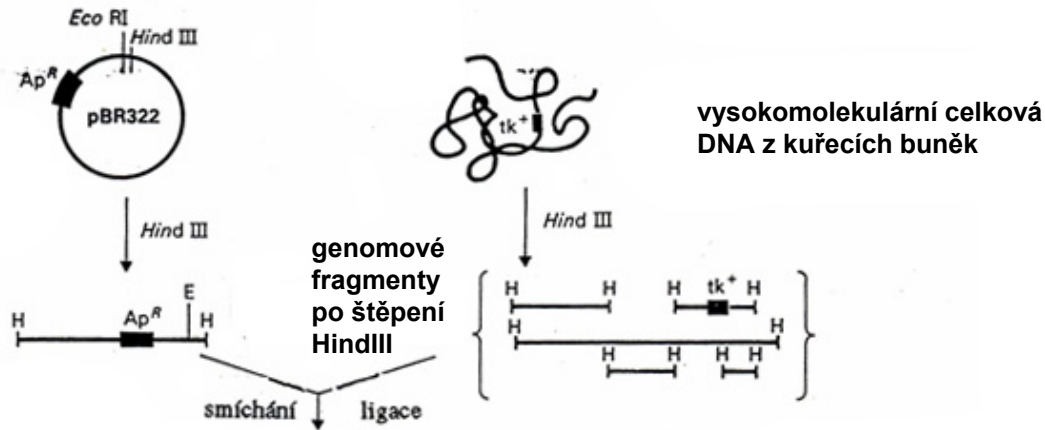
Kotransfekce několika druhů molekul DNA



Kotransformace během přenosu genů. Při tranfekci tk do eukaryontních buněk pomocí precipitace 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⁻ kuřecích buněk

Ca-koprecipitace

HAT-Selection

Vyřadí se plazmidy s neselektovanými znaky (tj. plazmidy nevázané s tk⁺)

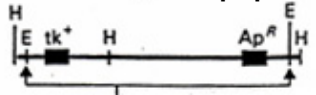
primární tk⁺ transfektanti

1. příprava DNA z tk⁺ transfektantů
2. selekce v mediu HAT

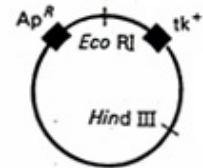
sekundární tk⁺ transfektanti

Gen tk⁺ je „označen“ genem Ap^R

příprava DNA



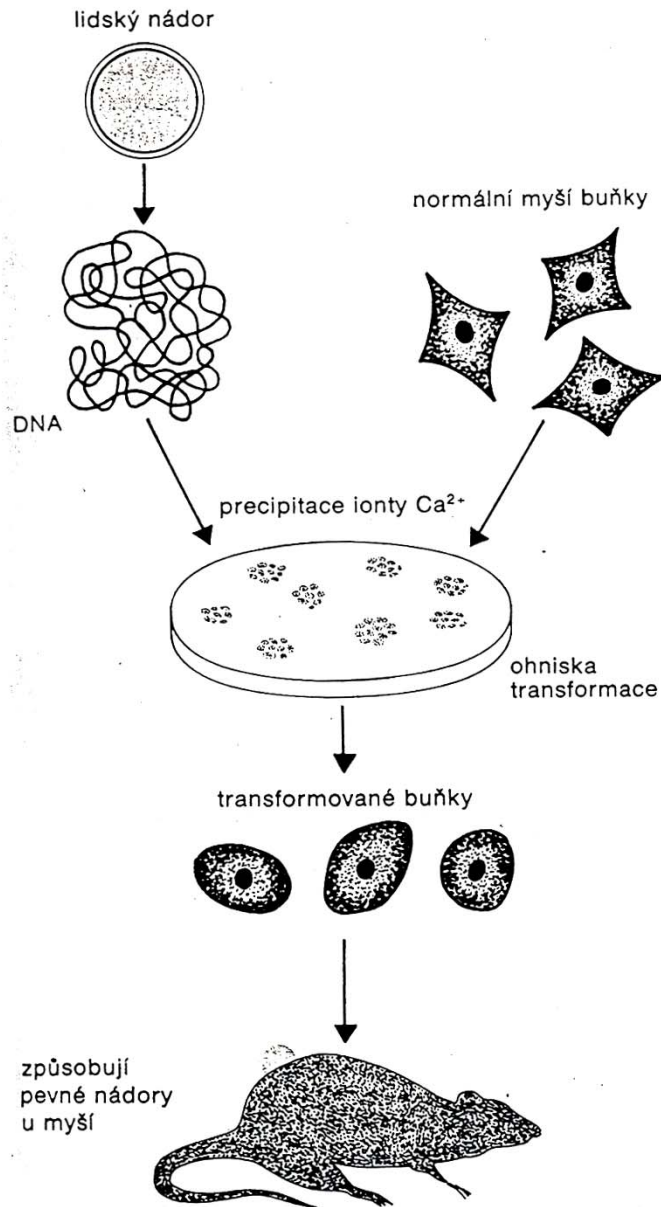
1. štěpení EcoRI
2. cirkularizace, ligace



1. Transformace E.coli
2. Selekcce Ap^R

další možnosti značení: supF, pBR322, alu

na rekombinantním plazmidu se nachází gen tk⁺ společně s Ap^R



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 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

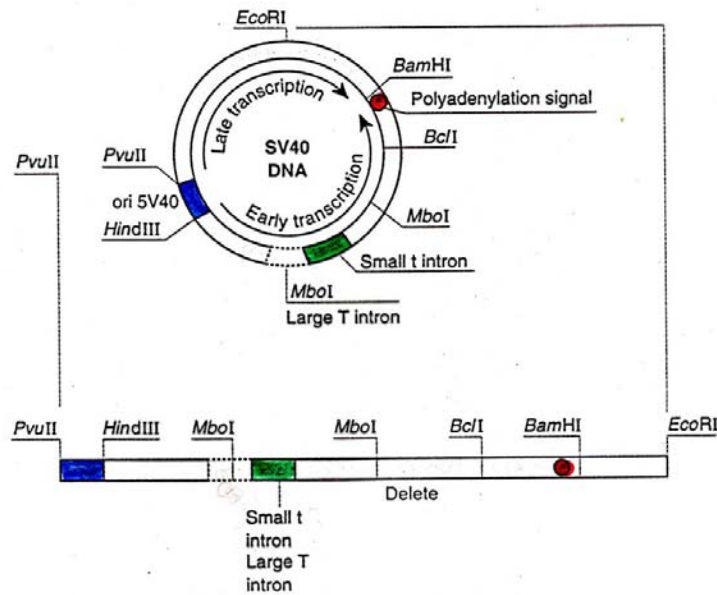
Využívají se k selekci transfektovaných buněk při kotransfekci a sledování transientní exprese genů

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

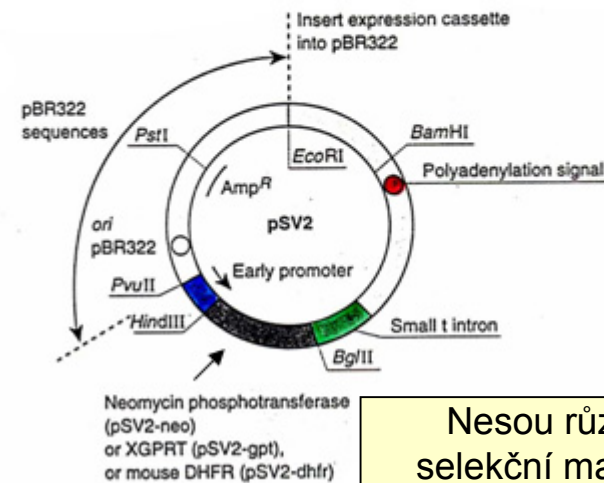
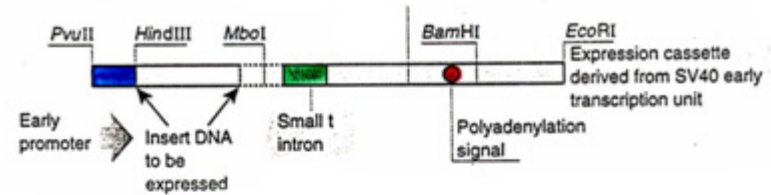
- část bakteriálního vektoru + sekvence eukaryotických virů + selekční marker
- vektory odvozené z SV40, bovinního papilomaviru, EBV, retrovirů, bakulovirů, viru vakcinie, adenovirů aj.

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



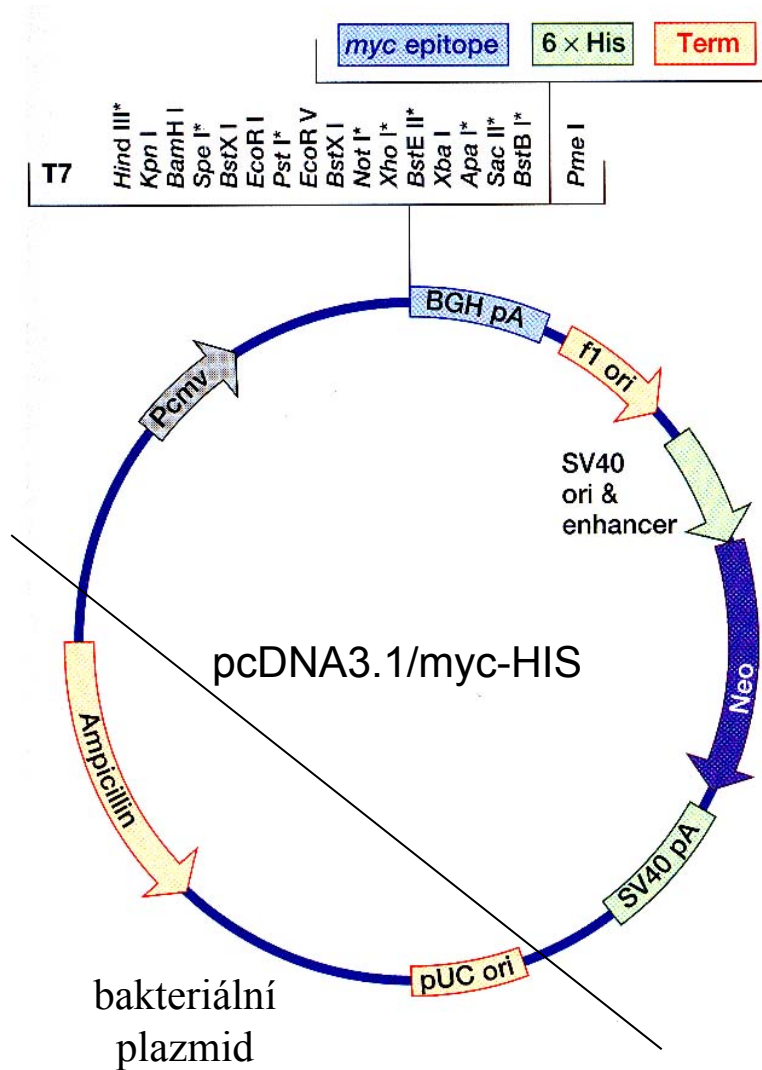
Nesou různé selekční markery

Kyvadlový vektor

„Plazmidy pSV“

Využití pSV: nesou dominantní selekční markery při kotransfekci, (nereplikují se)

Expresní vektor pro savčí buňky



Pcmv – promotor cytomegaloviru

BGHpA = polyadenylační
sekvence BGH

Neo = rezistence k G418

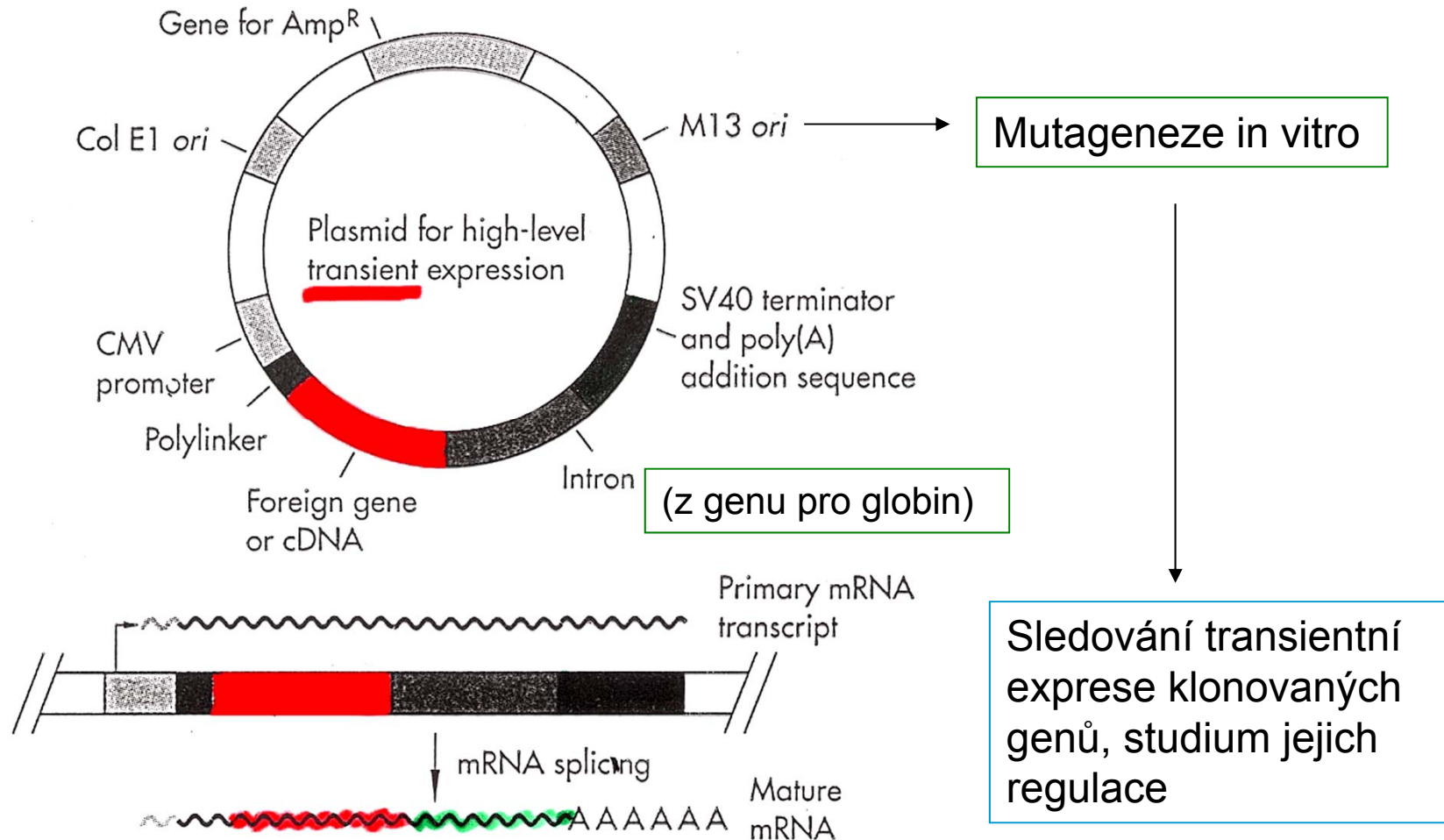
6 x HIS = purifikace proteinu (tag)

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 – virové – vysoká exprese v širokém spektru buněk

... ale – umělé vysoká exprese (neodpovídá (pato)fyzilogické situaci) – proto se používají i promotory genů s živočišných buněk (EF-1, beta-actin, ...) nebo i tkáňově specifické promotory a inducibilní promotory

Inducibilní promotory

metalothioneinový promotor – indukce transkripce přidáním těžkých kovů (Cd, Zn). Až 200násobná indukce.

promotory indukované steroidními hormony- dexametazon na glukokortikoidový receptor vede k indukci transkripce z MMTV LTR

hmyzí hormony - Ecdysone

Tetracyklin – tet-off, tet-on

Teplota – HSP-70 promotor

FK506/rapamycin

RU486/mifepristone

Hypoxia-inducible gene expression systems – HRE (hypoxia-responsible) elementy

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.

Pierce™ HRV 3C Protease Solution Kit (2 units/μL) (Thermo Scientific™)

Thermo Scientific Pierce Human Rhinovirus (HRV) 3C Protease is a recombinant cysteine protease used to remove fusion tags from proteins with the HRV 3C cleavage sequence and is dual tagged for easy removal from the sample after cleavage.

EKMax™ Enterokinase (Invitrogen™)

EKMax™ is a recombinant preparation of the catalytic subunit of bovine enterokinase (1). EKMax™ recognizes the sequence Asp-Asp-Asp-Asp-Lys and cleaves the peptide bond after the lysine residue. The enzyme can be used to cleave any fusion protein that carries this peptide sequence (Figure 1).

AcTEV™ Protease (Invitrogen™)

AcTEV™ Protease specifically recognizes a seven amino acid sequence (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, cleaving between Gln and Gly), making it useful for removing affinity tags from fusion proteins. AcTEV™ Protease is an improved version of Tobacco Etch Virus (TEV) protease that is highly site-

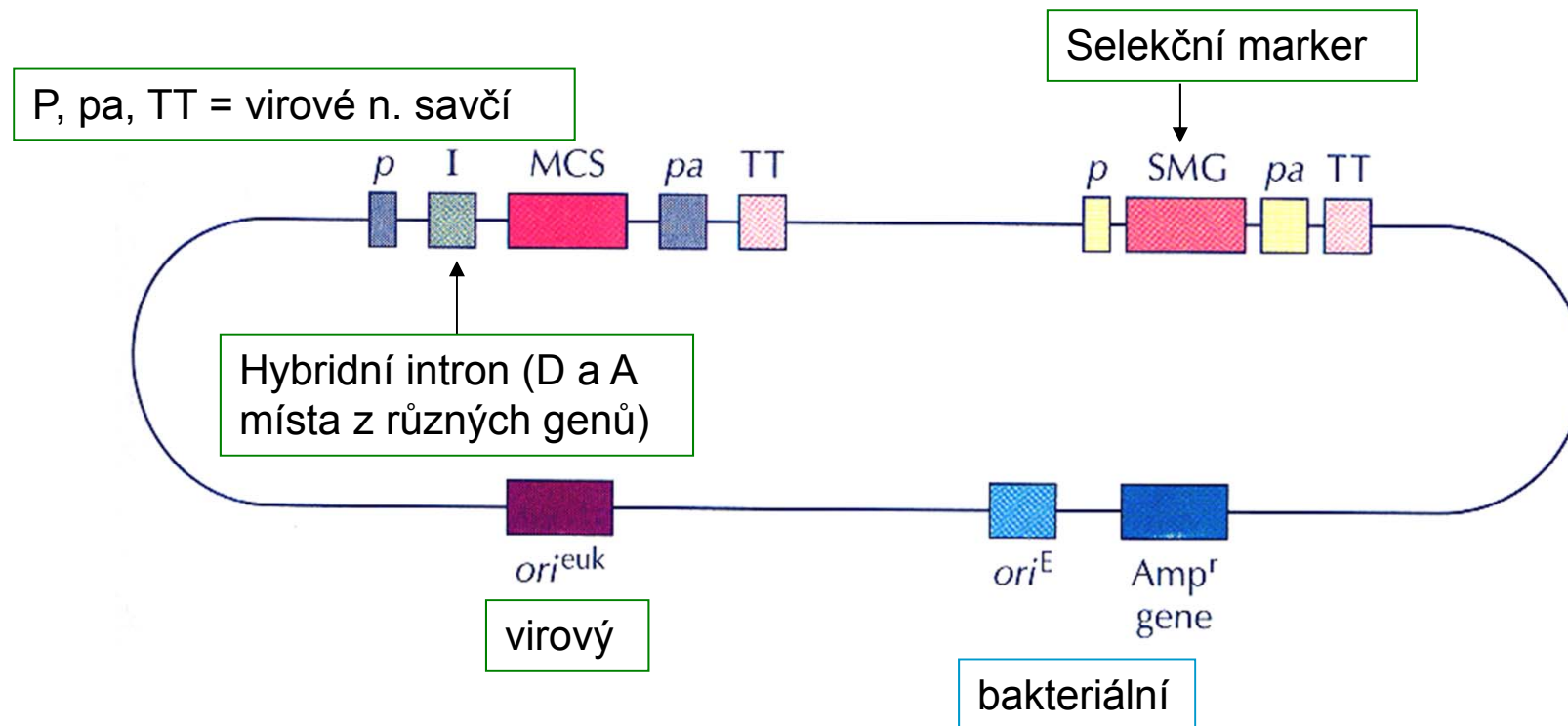
Factor Xa (Bovine) Solution (≥ 1 mg/mL) (Thermo Scientific™)

Thermo Scientific Pierce Factor Xa is a serine endopeptidase composed of two disulfide-linked subunits, whose specificity makes it particularly useful in cleaving 6xHis tags from engineered His-tagged fusion proteins.

WELQut Protease (5 U/μL) (Thermo Scientific™)

Thermo Scientific WELQut Protease is highly specific, recombinant serine protease of *Staphylococcus aureus*. It recognizes and precisely cleaves recombinant proteins containing an engineered recognition sequence† W- E- L- Q↓X (Trp, Glu, Leu, Gln, X can be any amino acid). The protease cleaves outside

Savčí expresní vektor – obecná struktura



Hostitelské buňky:

- Pro transientní expresi: COS (opičí fibroblasty immortalizované SV40 T-antigenem), 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

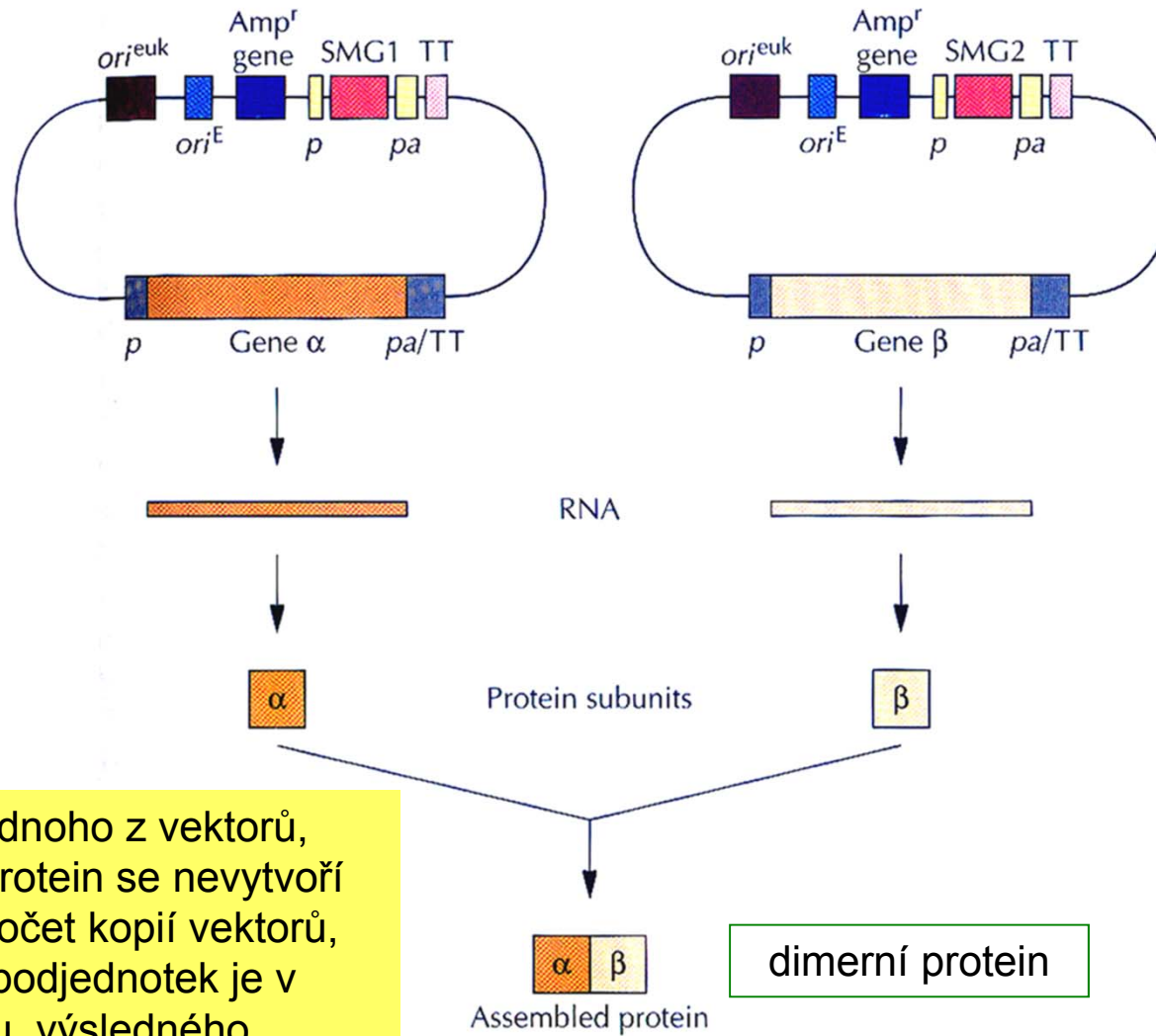
Možnosti přípravy proteinů tvořených podjednotkami:

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:

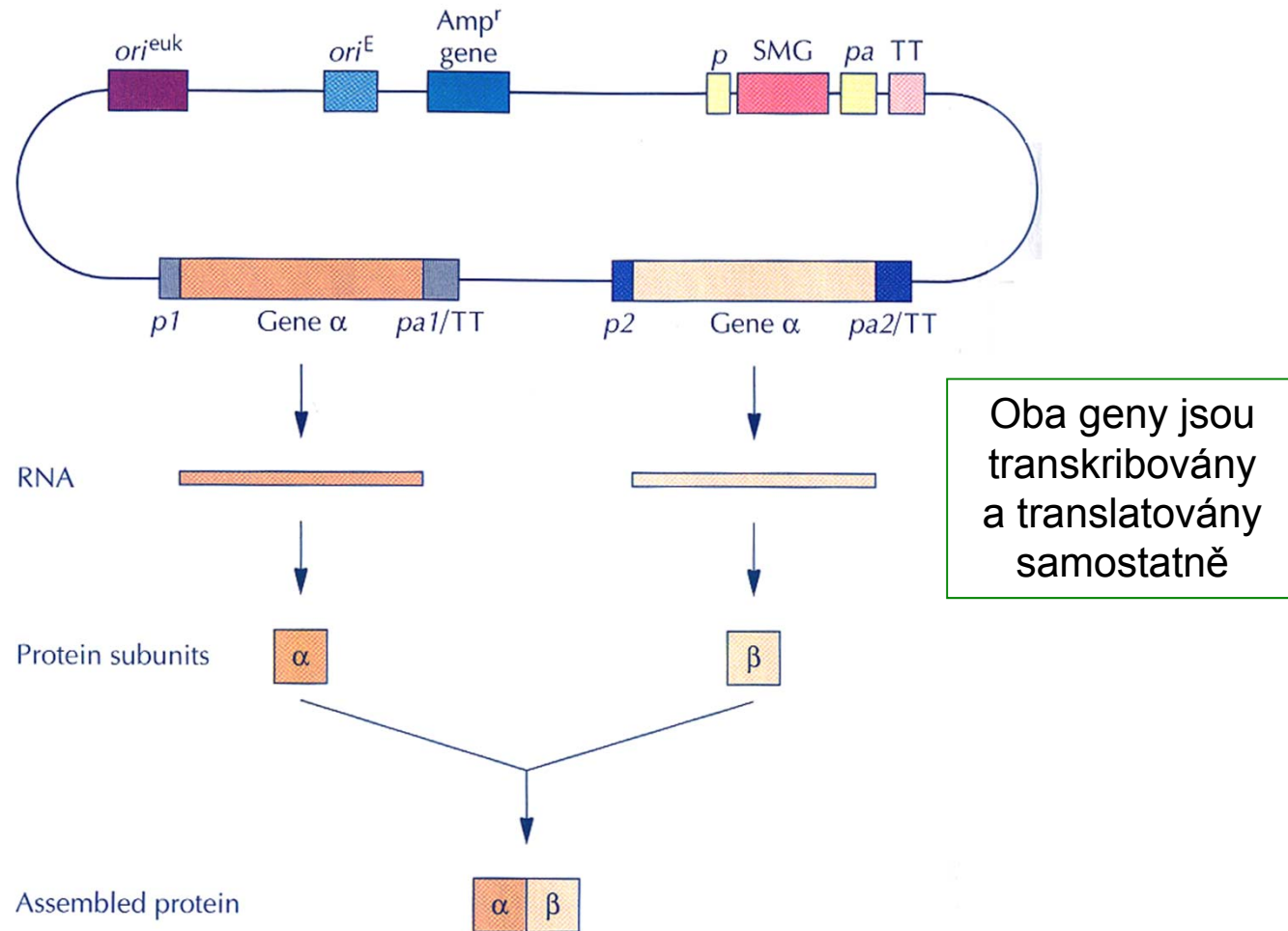
- Ztráta jednoho z vektorů, aktivní protein se nevytvoří
 - Různý počet kopií vektorů, jedna z podjednotek je v nadbytku, výsledného produktu je málo
3. **Řešení: Klonování genů v bicistronickém expresním vektoru**

Dvouvektorový expresní systém – v jedné buňce

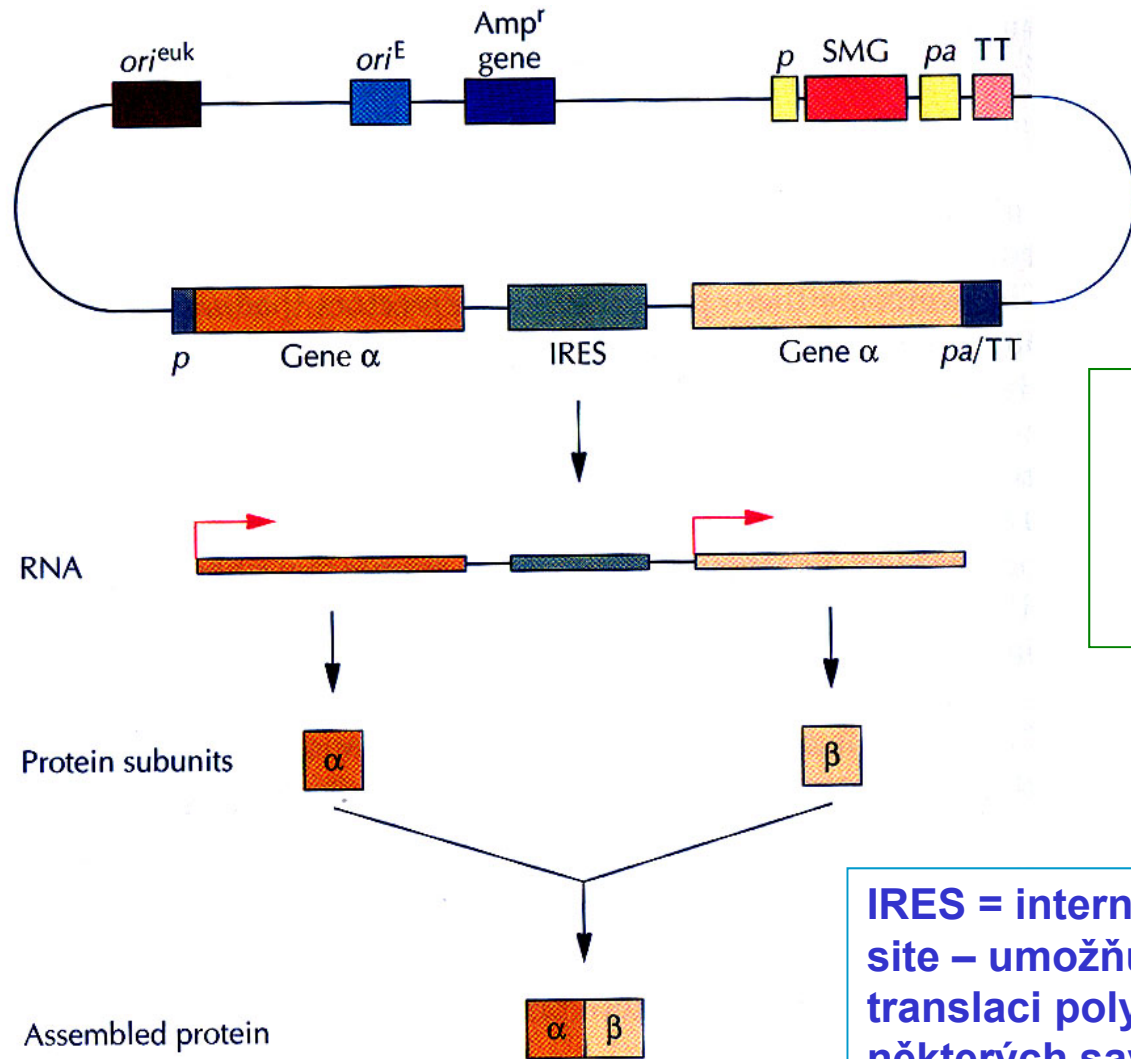


Ztráta jednoho z vektorů, aktivní protein se nevytvoří
Různý počet kopií vektorů, jedna z podjednotek je v nadbytku, výsledného produktu je málo

Expresní vektor se dvěma klonovanými geny kódujícími podjednotky heterodimeru



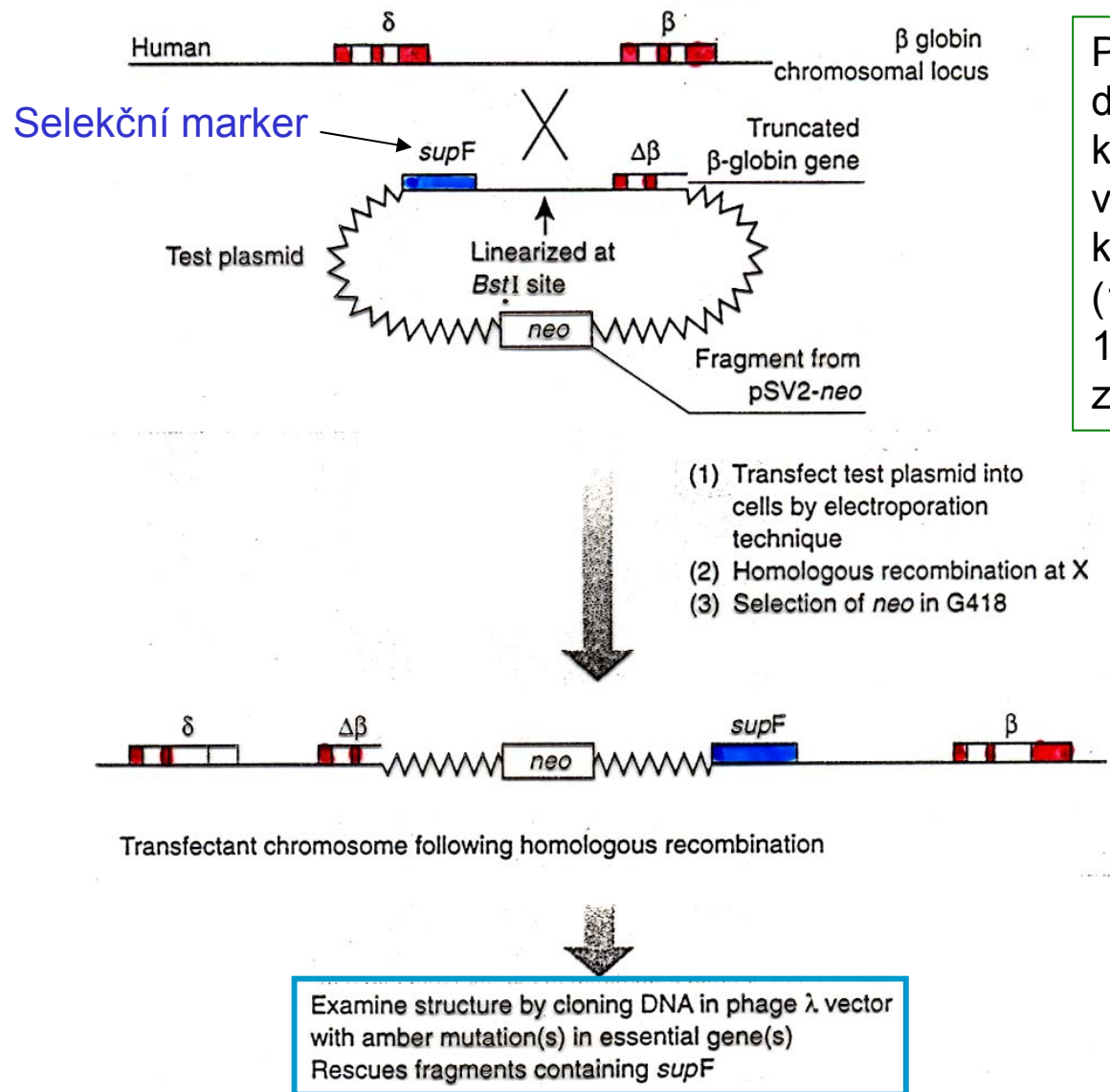
Bicistronický expresní vektor pro klonování genů kódujících podjednotky heterodimeru



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

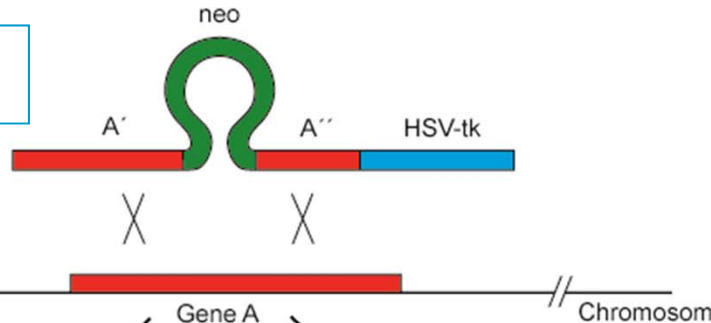


Přenos testovacího plazmidu do somatických buněk v tkáňové kultuře s cílem detekovat vzácné buňky, v nichž došlo k homologní rekombinaci (1xCO) – ta probíhá s frekvencí 100-1000x nižší než náhodné začlenění

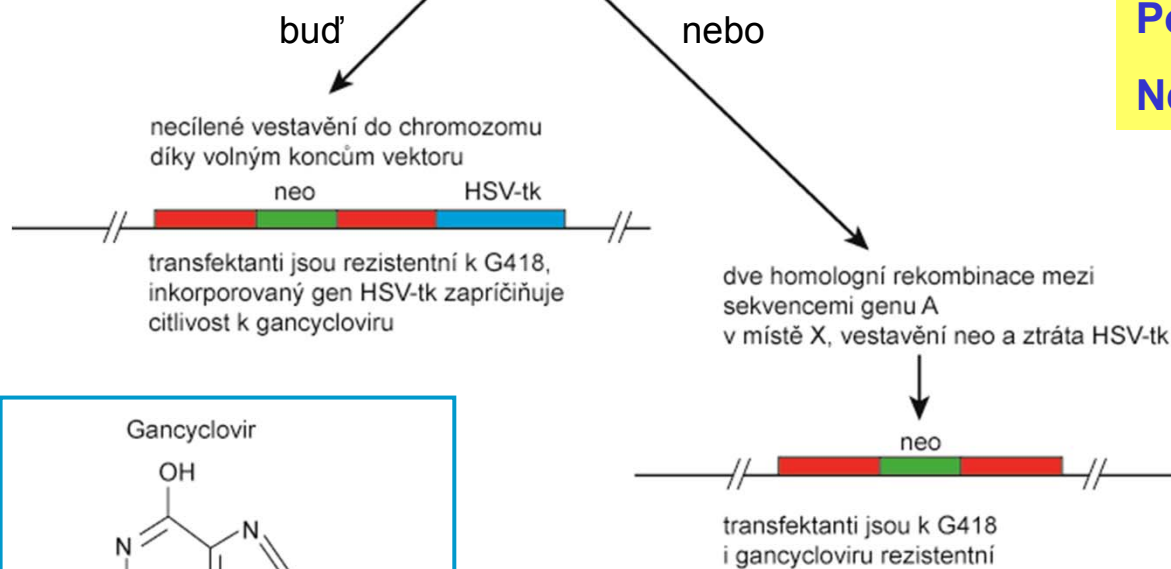
Dochází k duplikaci sekvencí, ne záměně alel

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

PNS vektor

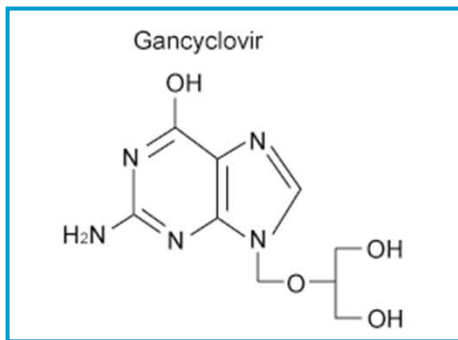


Substituční vektor pro gen A, který je přerušen genem neo a obsahuje HSV-tk



Pozitivní selekce = G418
Negativní selekce = HSV-tk

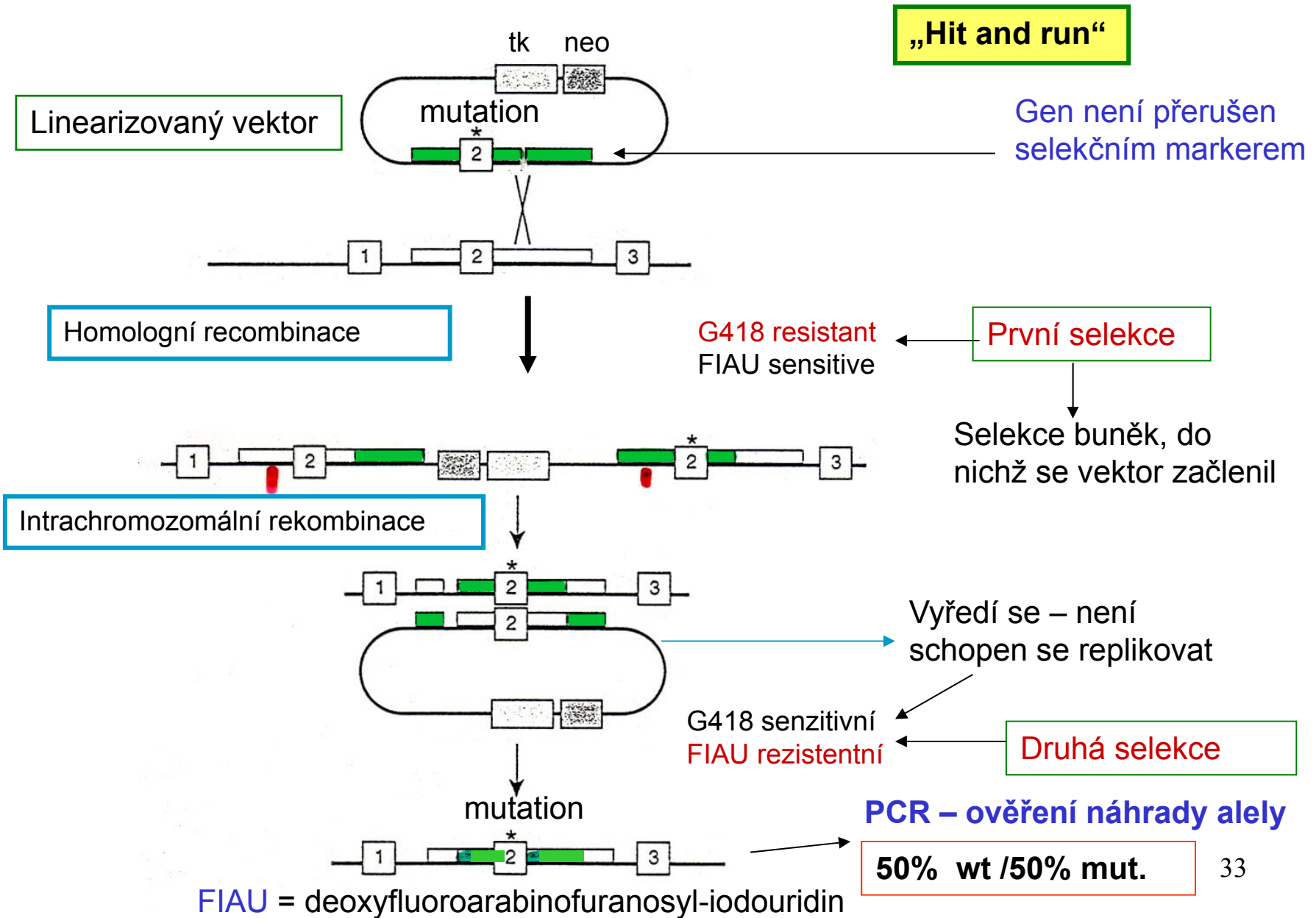
2000x obohacení o buňky obsahující přerušný gen A



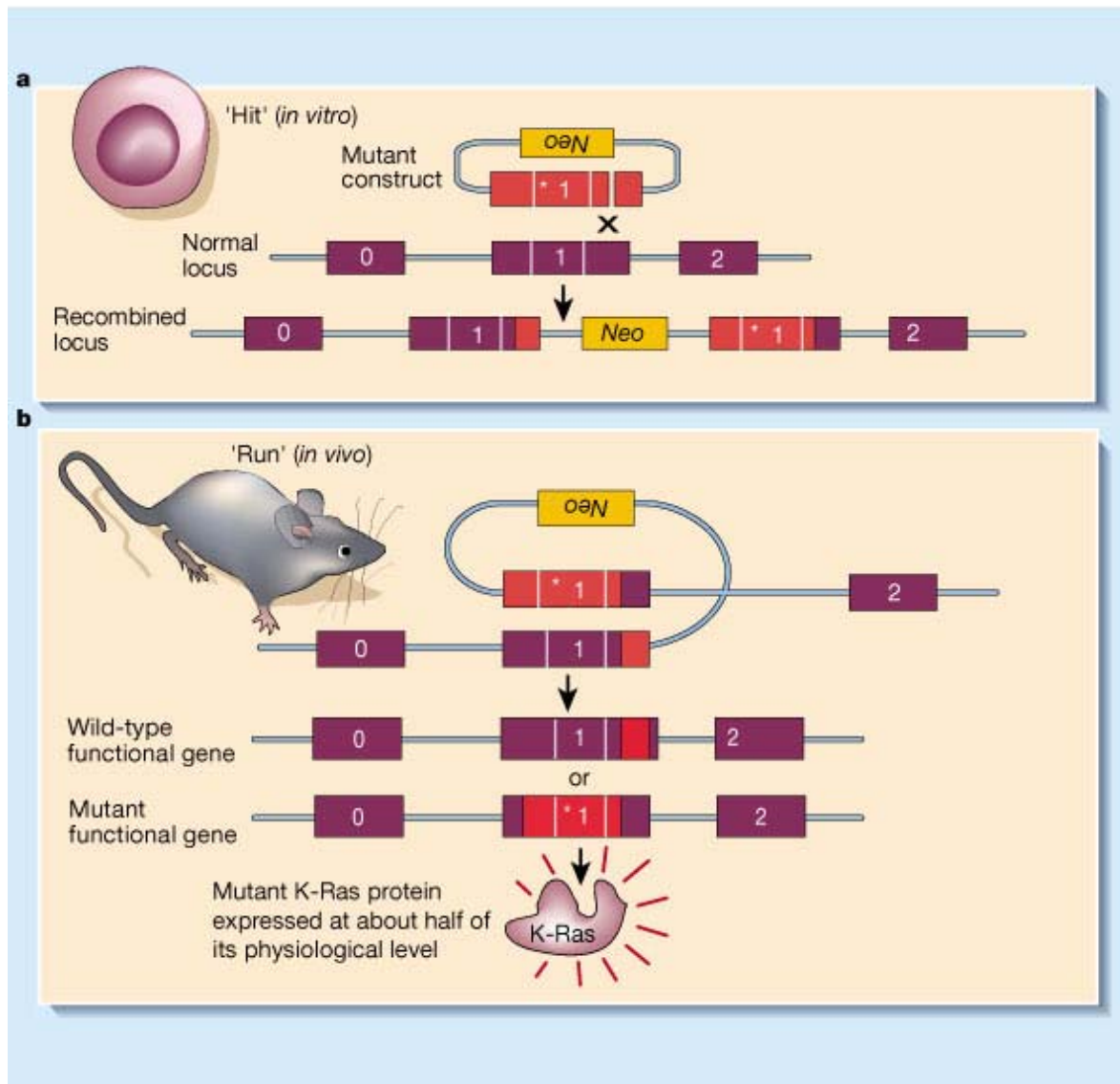
Gen A je inaktivní - vznik nulové mutace

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



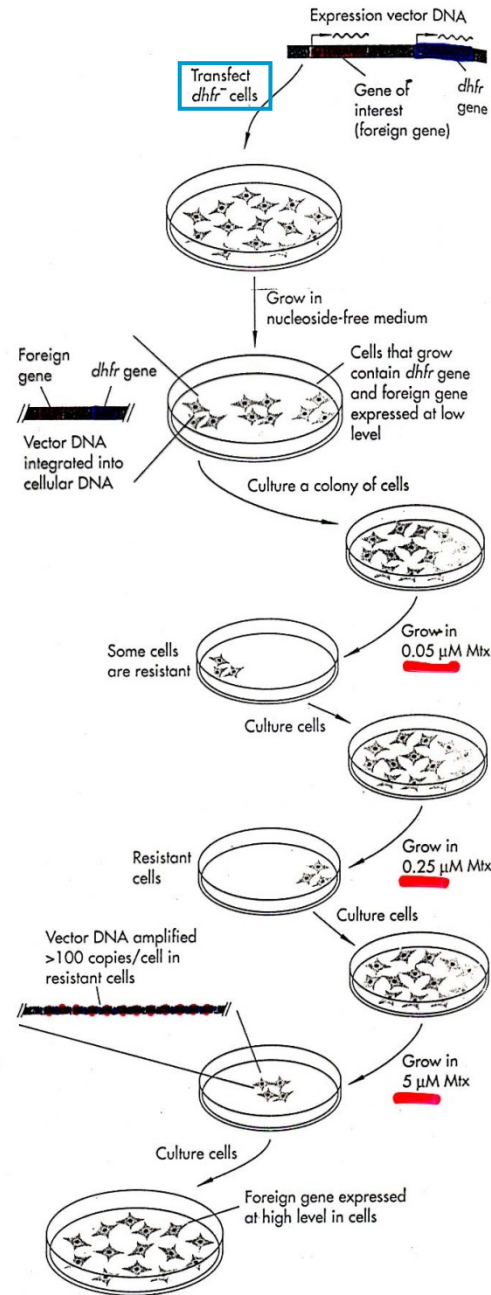
Příklad využití metody „hit and run“ k záměně alel



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.

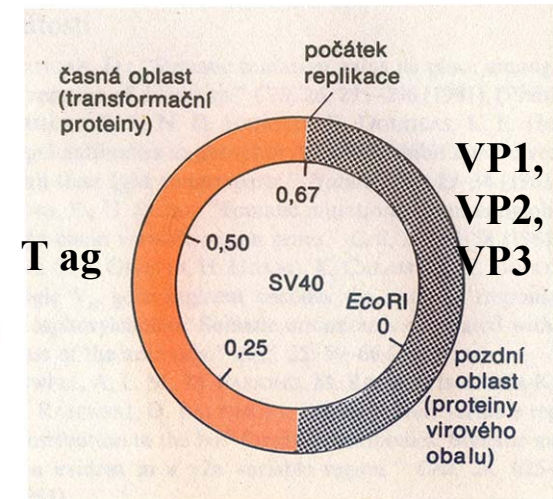
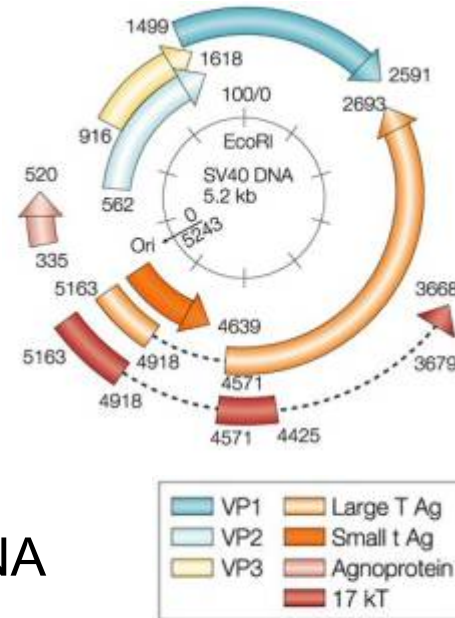
Dosažení vysokého stupně exprese koamplifikací klonovaného genu spolu s genem DHFR



+ 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

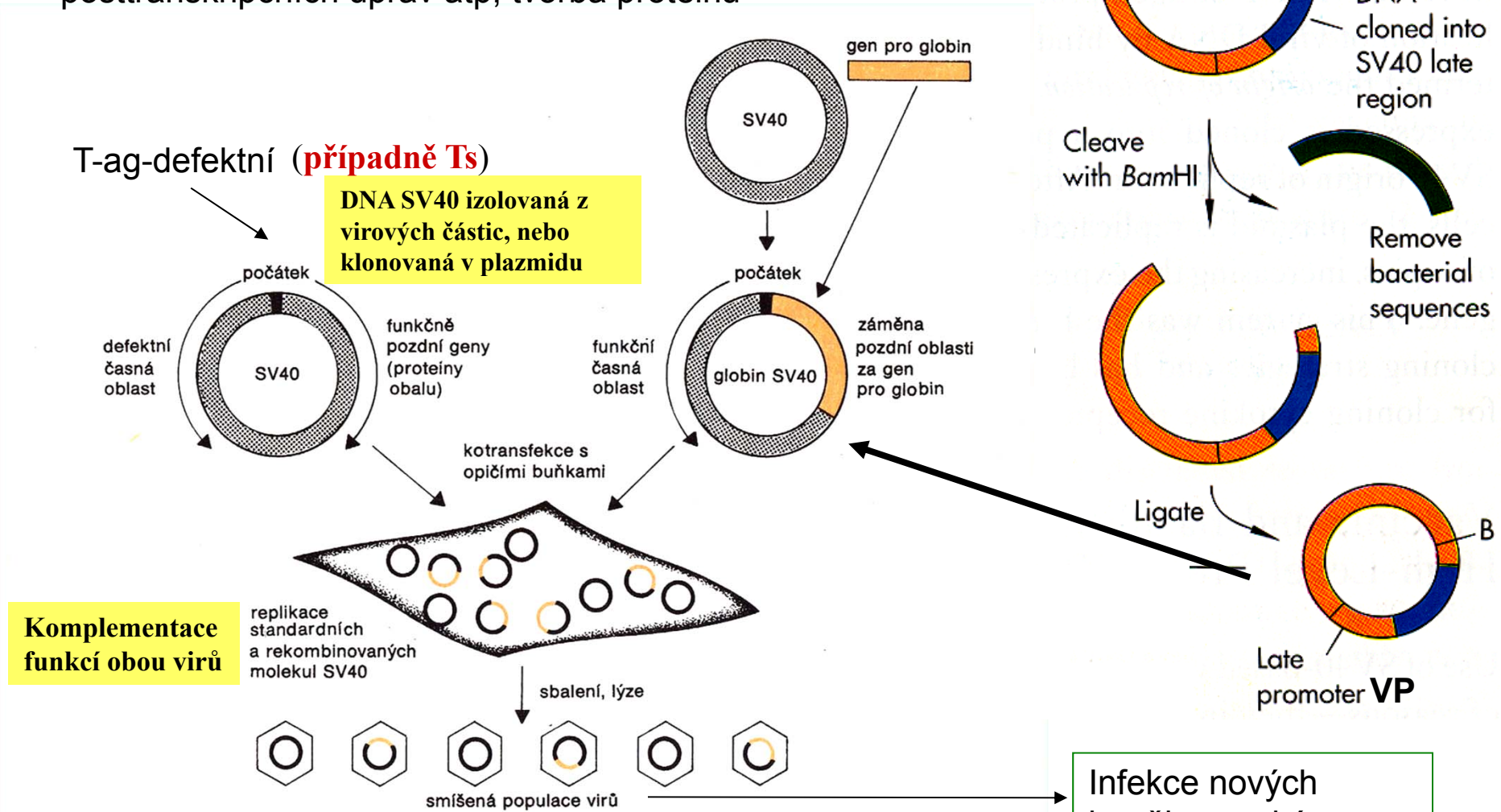
časná oblast = T antigen – replikace, transkripce

pozdní oblast = proteiny kapsidu (VP1-VP3)

Konstrukce vektorů: náhrada časné 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



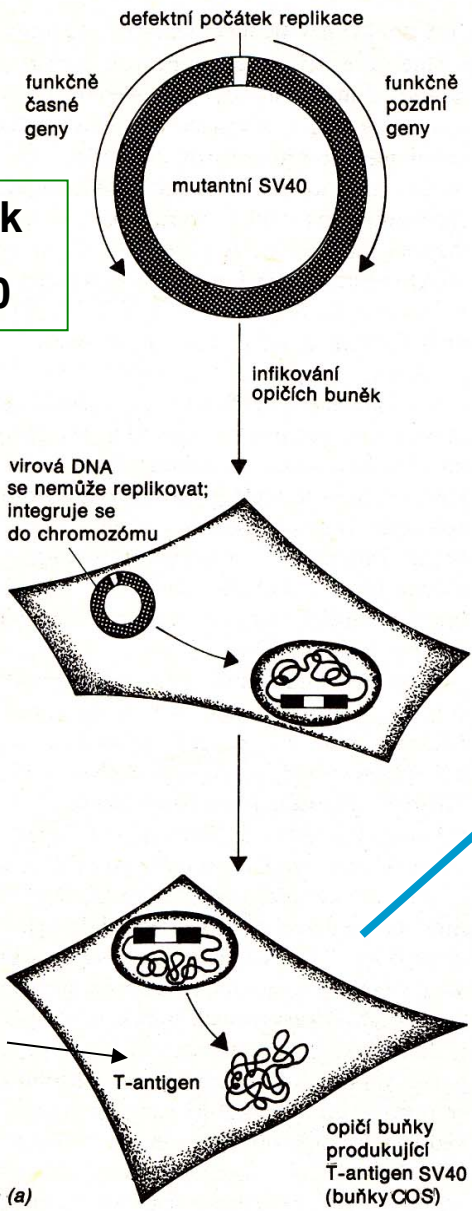
Komplementace funkcí obou virů

DNA SV40 izolovaná z virových částic, nebo klonovaná v plazmidu

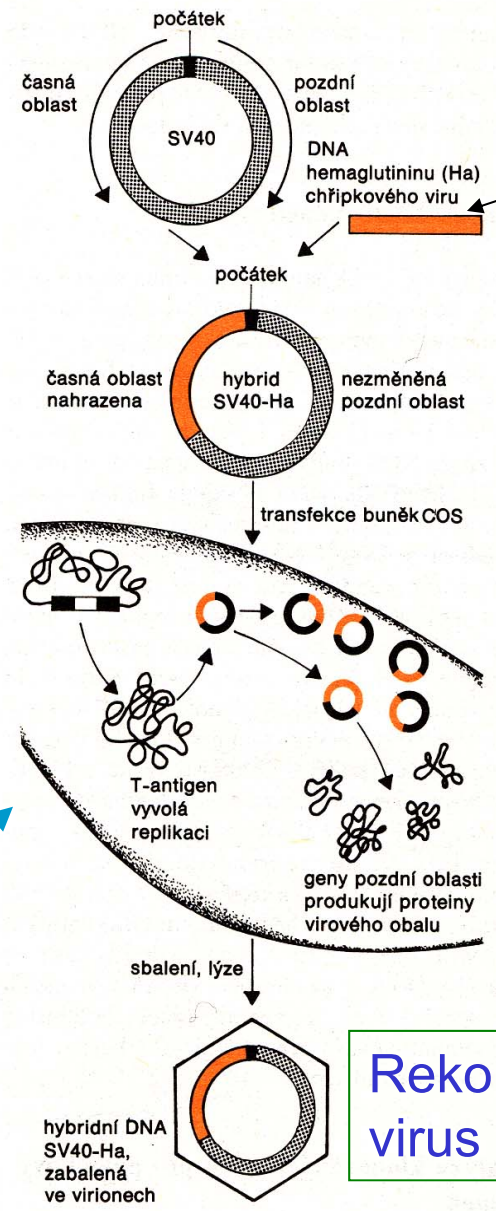
Infekce nových buněk, vysoká produkce proteinu

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.

Příprava COS buněk
CV-1 Origin of SV40



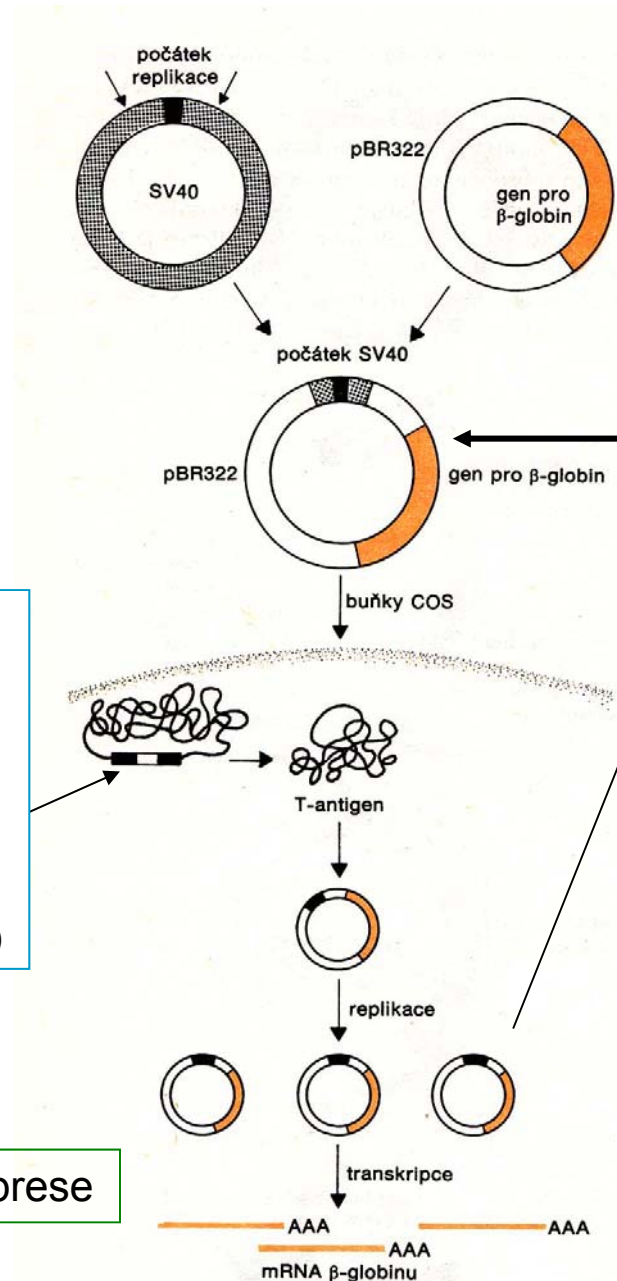
Náhrada časně oblasti SV40 genem Ha viru chřipky



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**

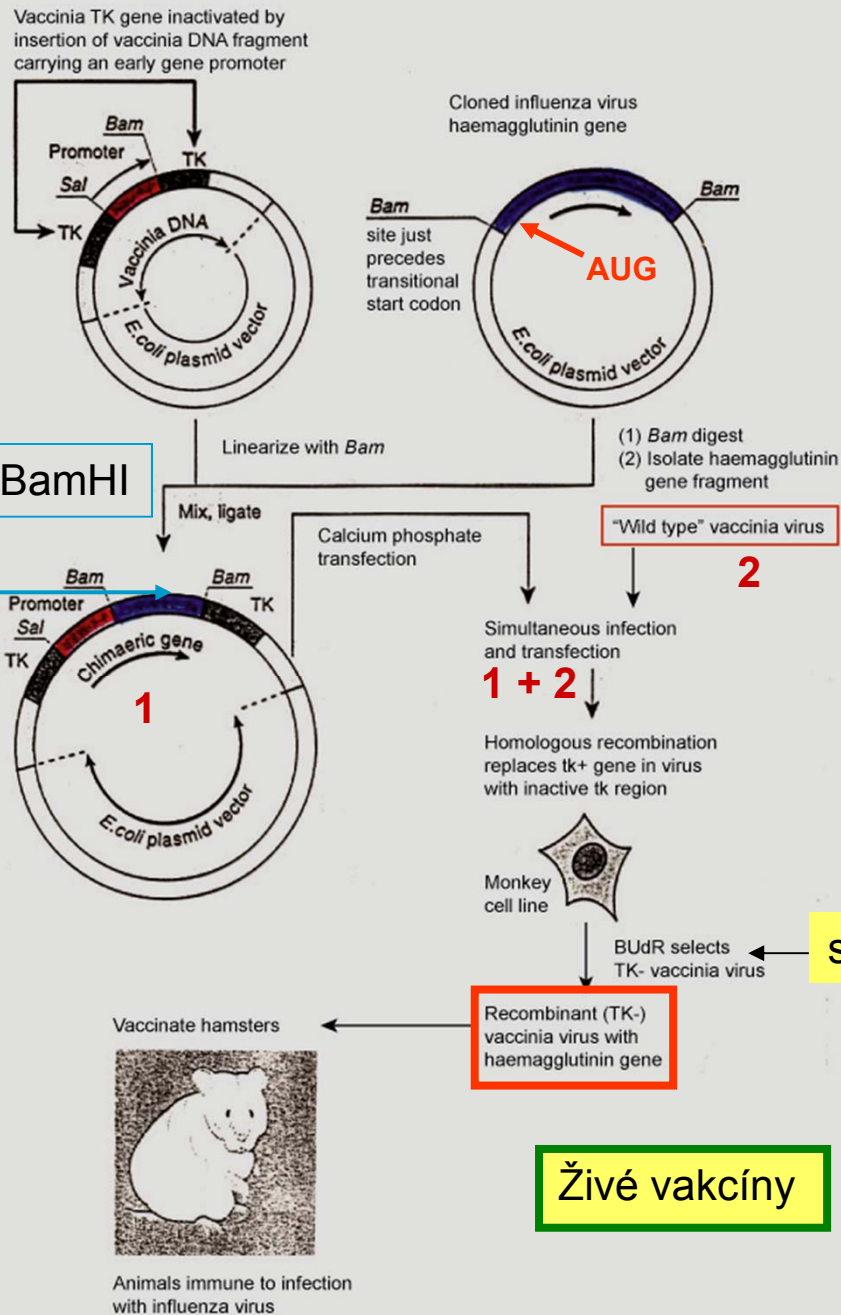
Po transfekci COS buněk se cizí geny replikují ve velkém počtu kopií, pokud jsou klonovány v plazmidu s SV40 počátkem. Velký počet kopií dovoluje účinnou transkripci cizího genu.

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)

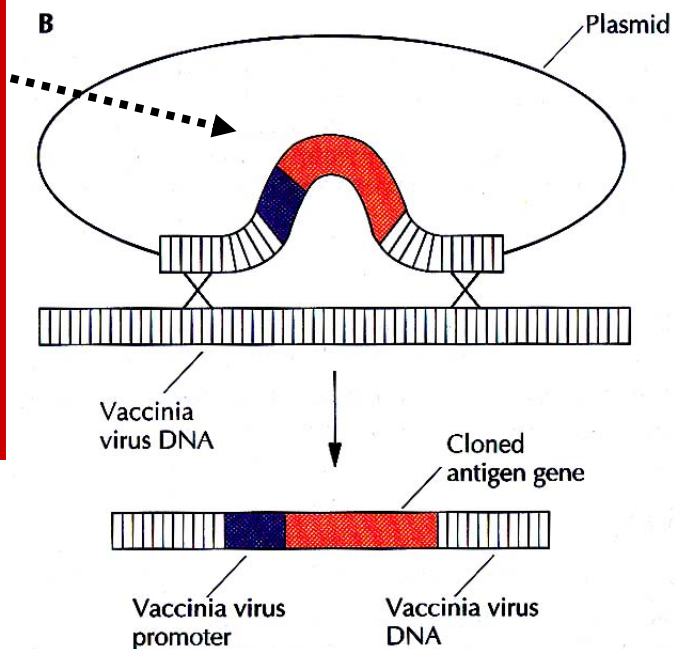
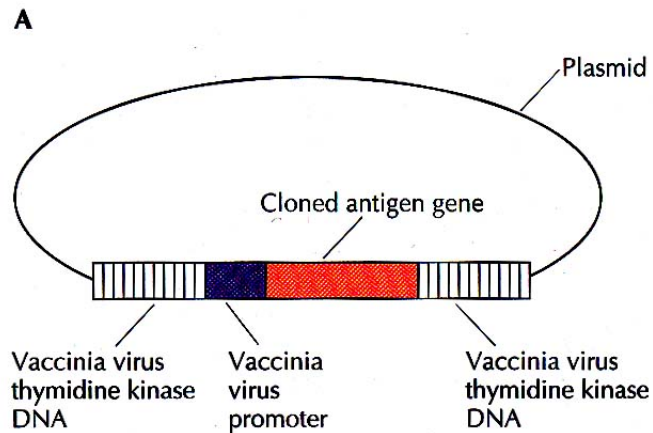
Virus vakcinie

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

Živé vakcíny

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

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)

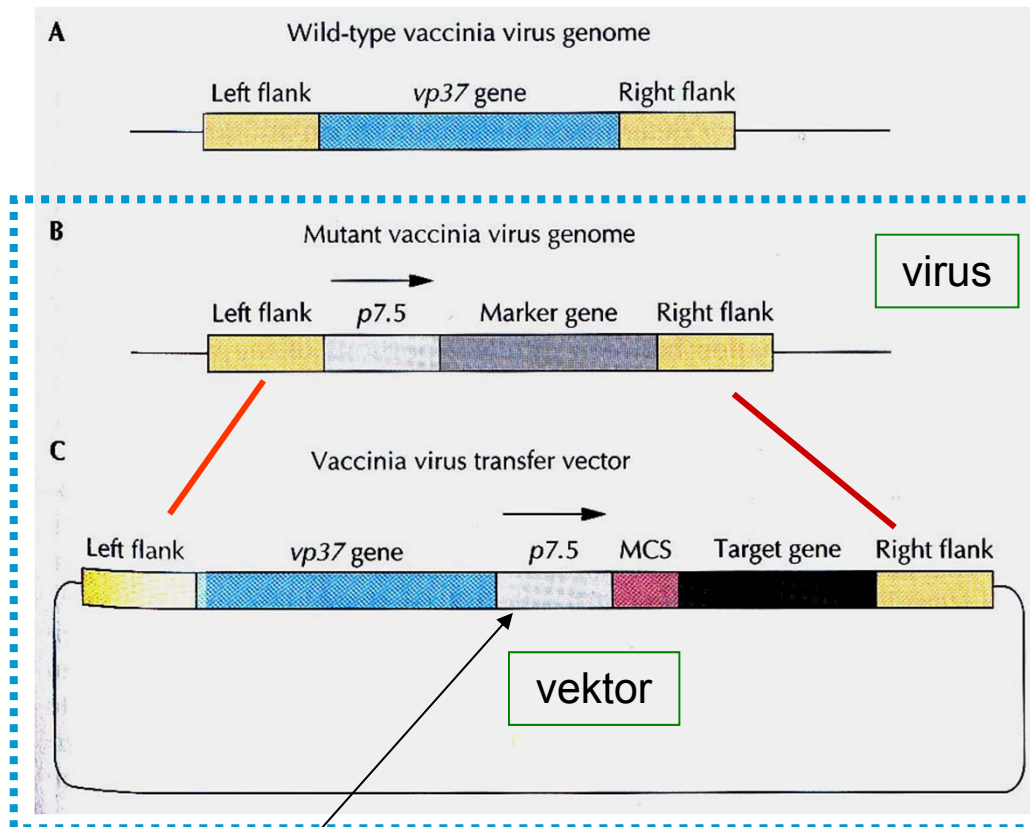
Tento plazmid se přenese transformací do živočišných buněk Tk- pěstovaných v kultuře (kuřecí embryonální fibroblasty), které byly předtím infikovány virem vakcinie standardního typu, který tvoří funkční Tk.

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.

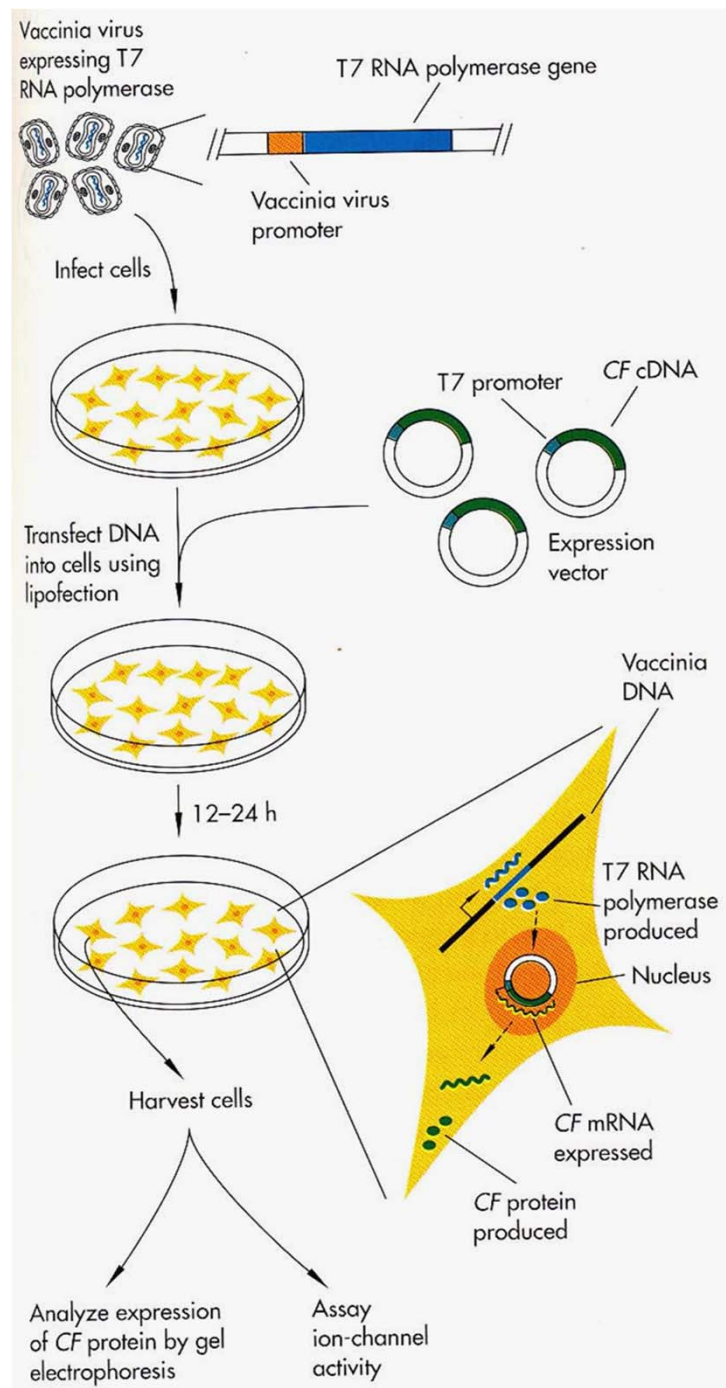
- A. Úsek genomu viru obsahující gen *vp37*, který je zodpovědný za tvorbu plak na monovrstvě buněk *in vitro*
- B. Úsek genomu mutantního viru, v němž byl gen *vp37* nahrazen markerovým genem z *E. coli* (*gpt*, *lacZ*...) pod kontrolou silného virového promotoru (*p7.5*). Tento virus netvoří plaky, 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).

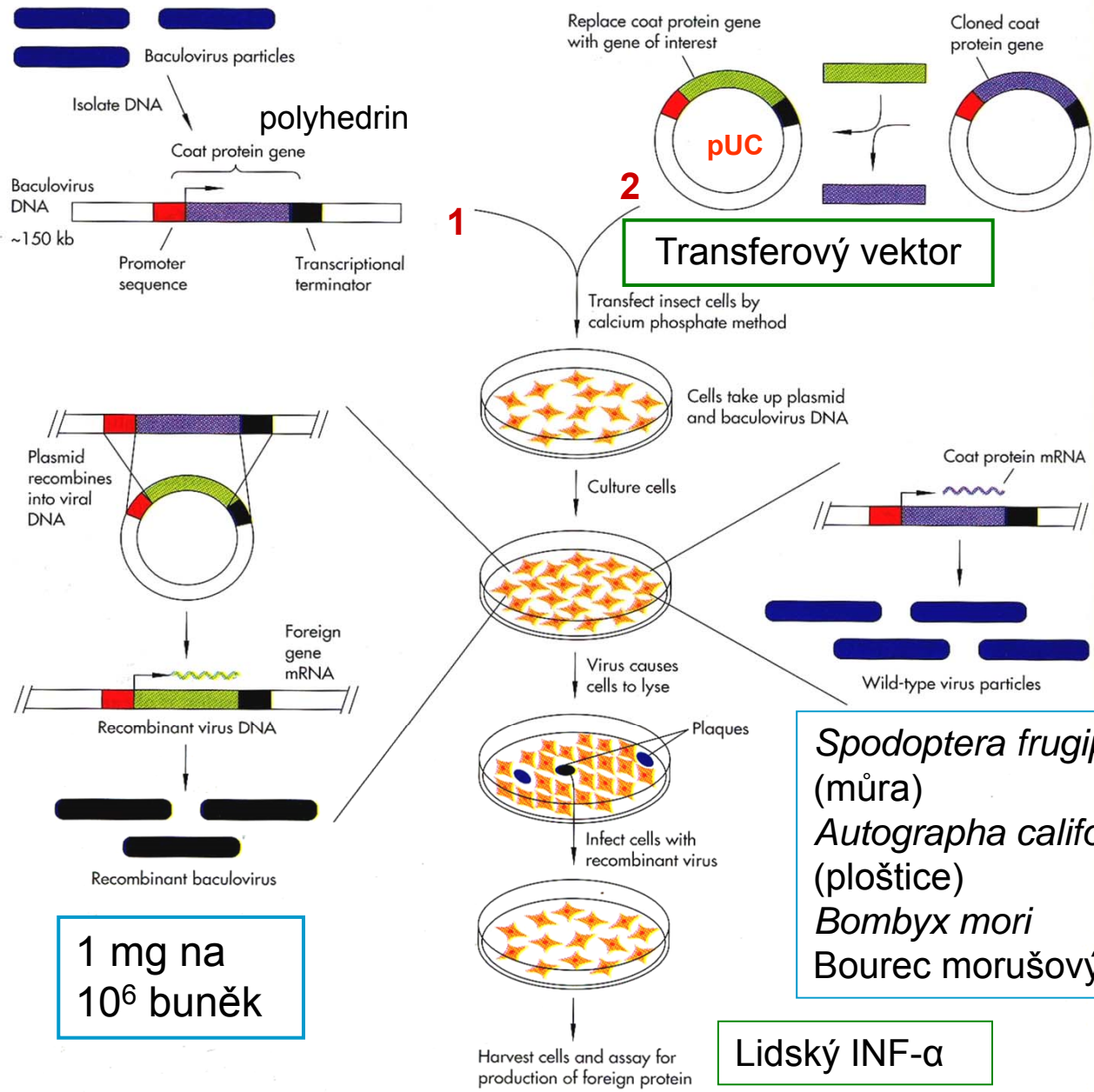
Živá vakcína má tyto výhody oproti usmrceným virům nebo podjednotkovým vakcínám:

- 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

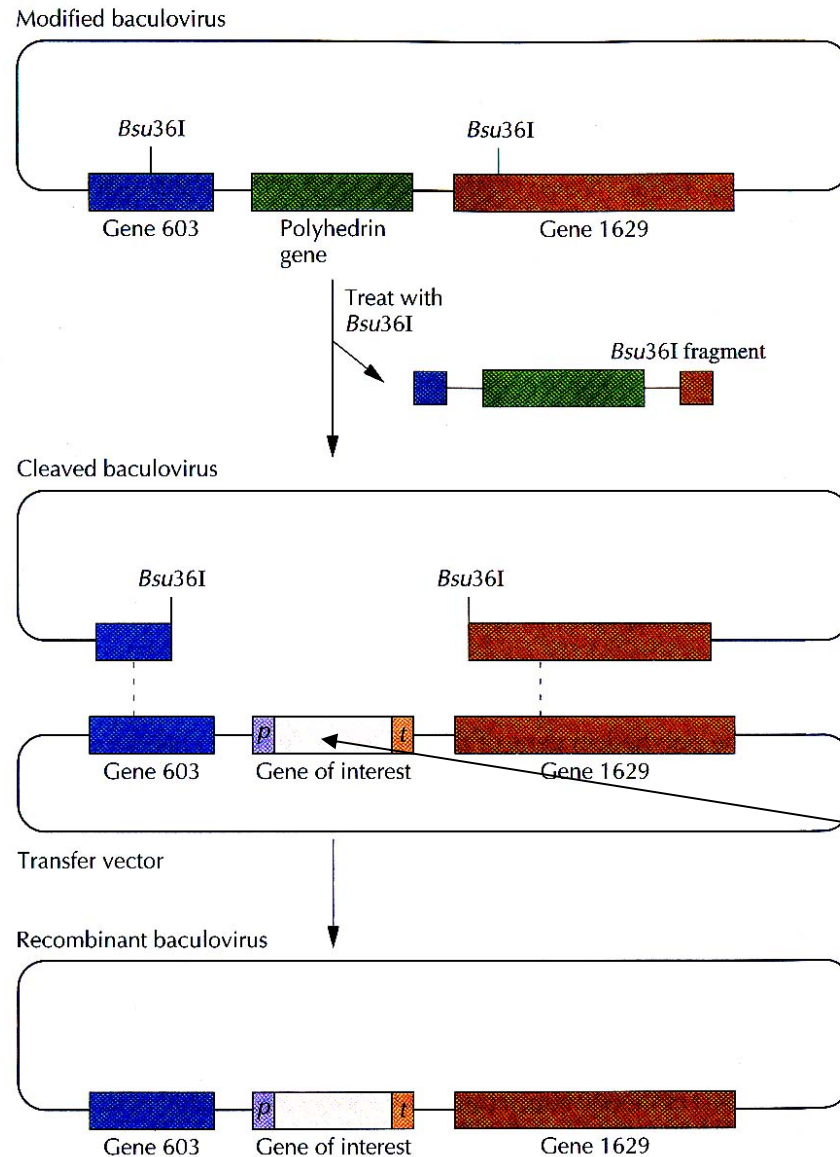
Fúzní nebo nefúzní proteiny

1 mg na 10⁶ 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 *Bsu36I*. Působením *Bsu36I* se vyšťepí 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.

α-Interferon	G-protein-coupled receptors	Malaria proteins
Adenosine deaminase	HIV-1 envelope protein	Mouse monoclonal antibodies
Anthrax antigen	HSV capsid proteins	Multidrug transporter protein
β-Amyloid precursor protein	Human alkaline phosphatase	Poliovirus proteins
β-Interferon	Human DNA polymerase α	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		

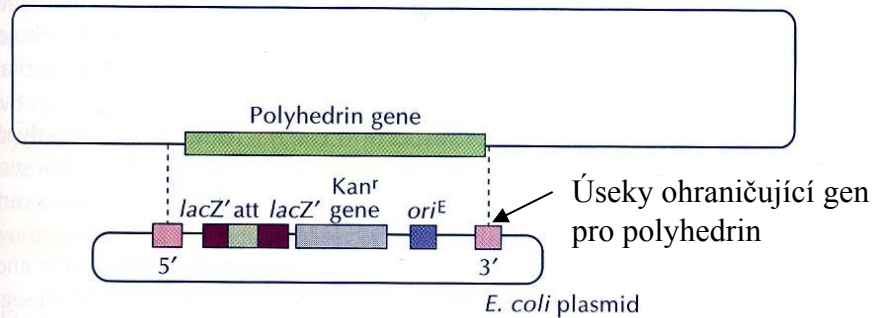
Alternativní způsob přípravy rekombinantních bakulovirových vektorů - bacmidů

- 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

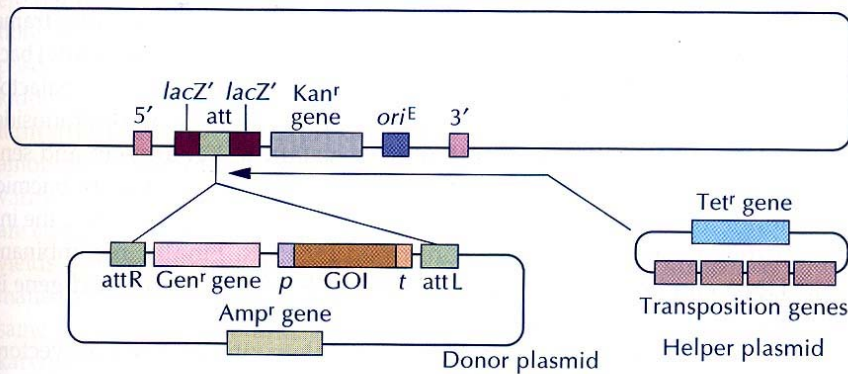
AcMNPV genome



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

B

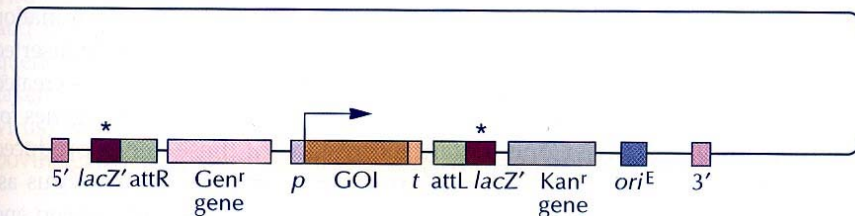
Bacmid



Transpoziční funkce pomocného plazmidu umožní transpozici úseku donorového plazmidu obsahujícího gen zájmu (GOI), 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 β -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

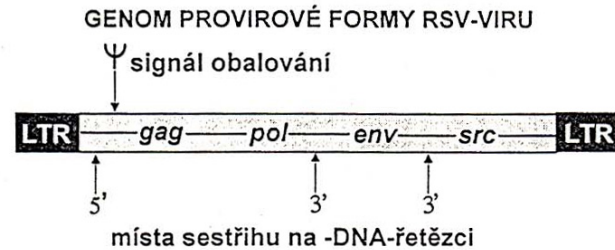
Výhody:

- 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

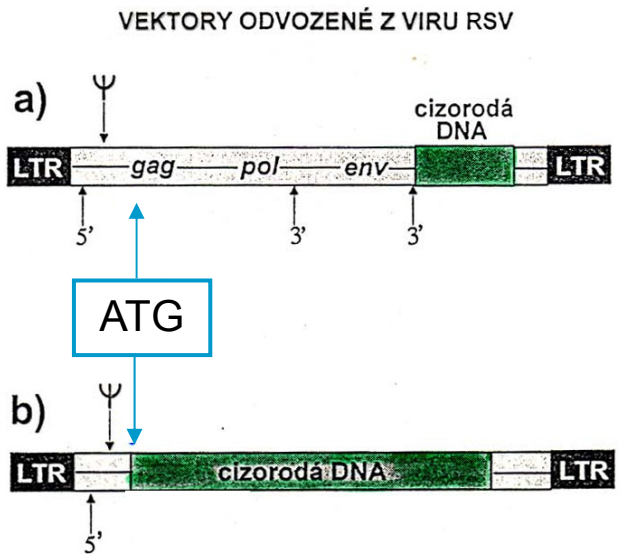
Nevýhody:

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

Příklady konstrukce retrovirálních vektorů

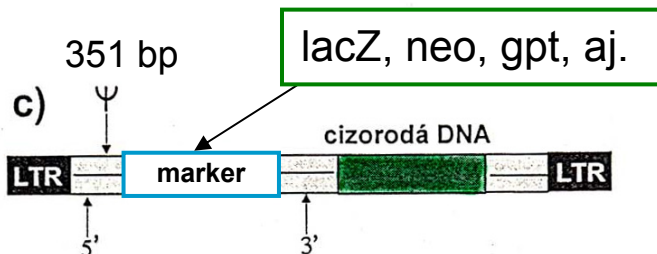


Replikace, transkripce



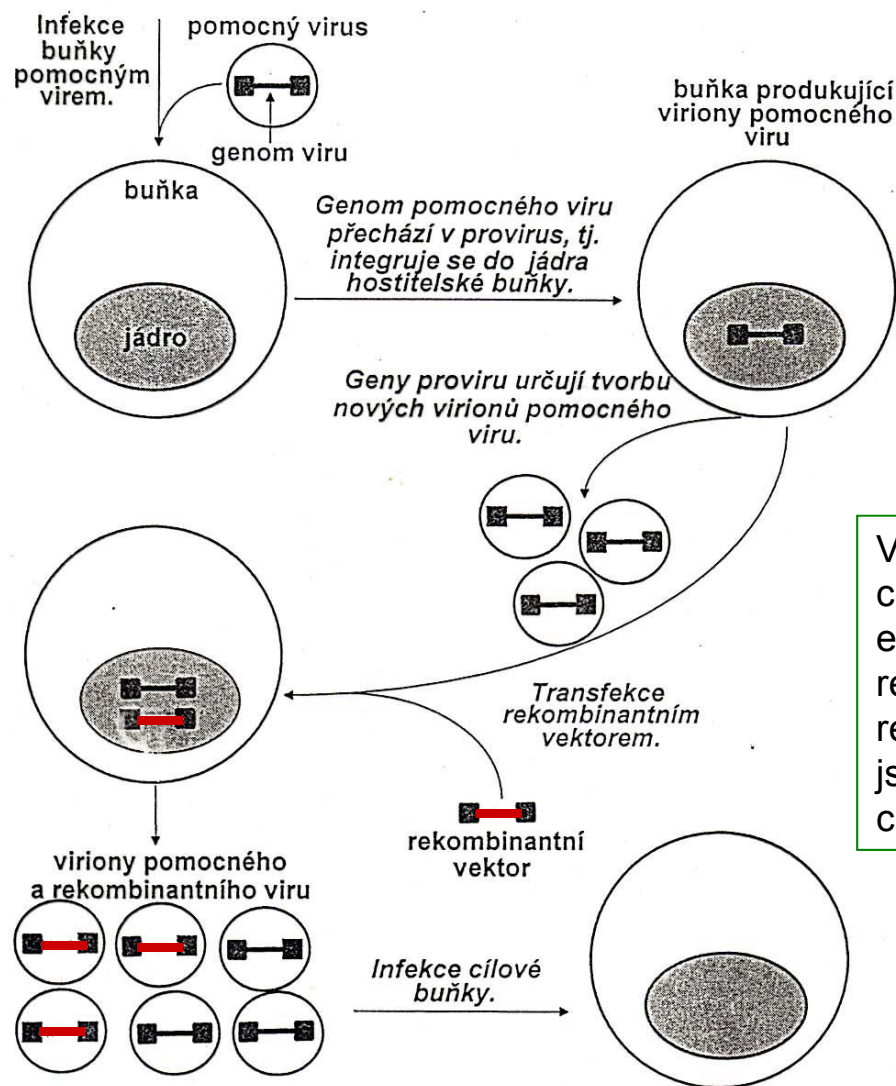
Sekvence *in cis* nezbytné pro transkripci, replikaci a obalování:

- LTR: integrace DNA do genomu, transkripce
- PBS (primer binding site): 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

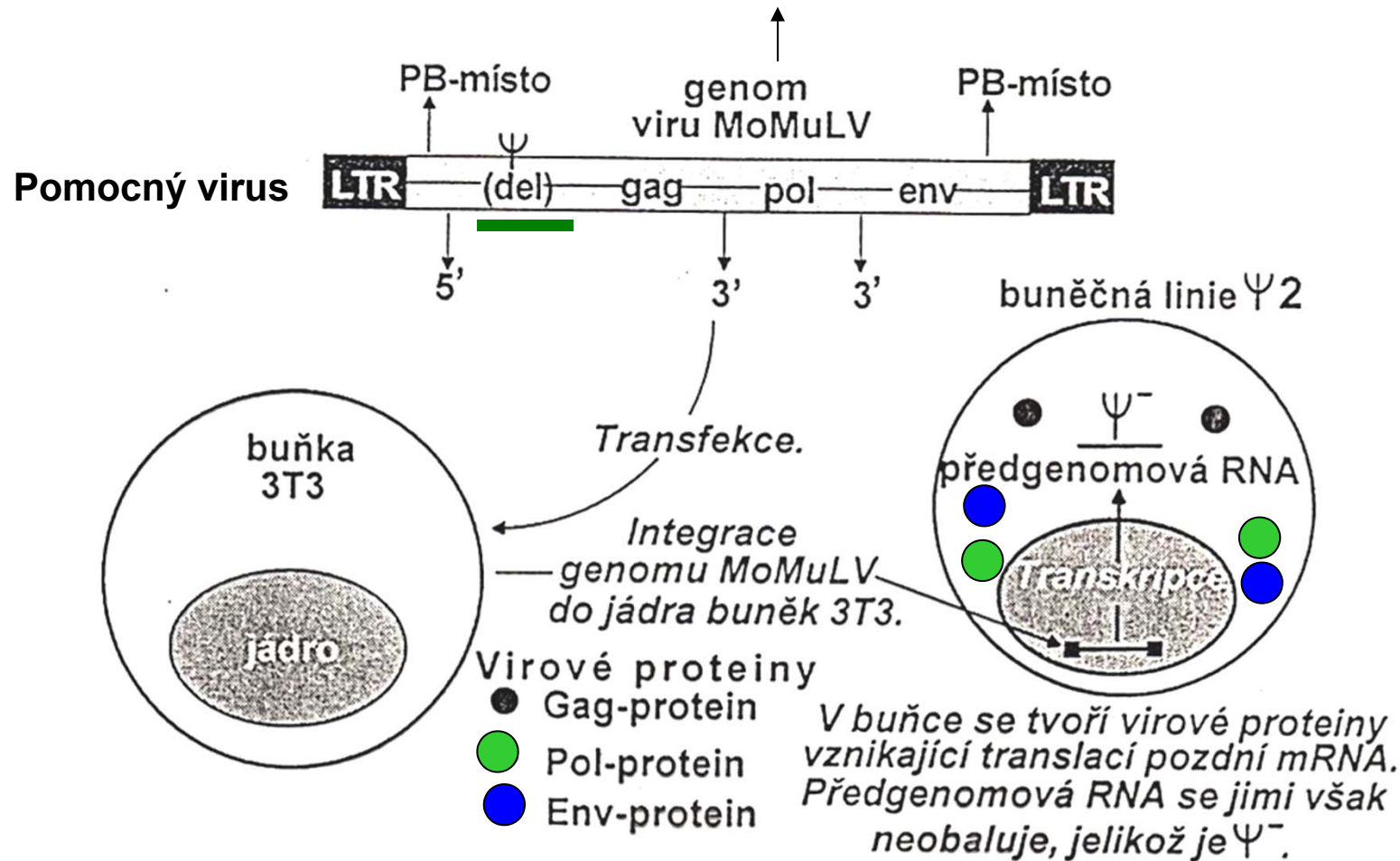


Molekuly RNA vzniklé transkpcí DNA integrovaného rekombinantního vektoru a proviru pomocného viru se obalí proteiny, které jsou kódovány tímto provirem. Tvoří se viriony pomocného a rekombinantního viru.

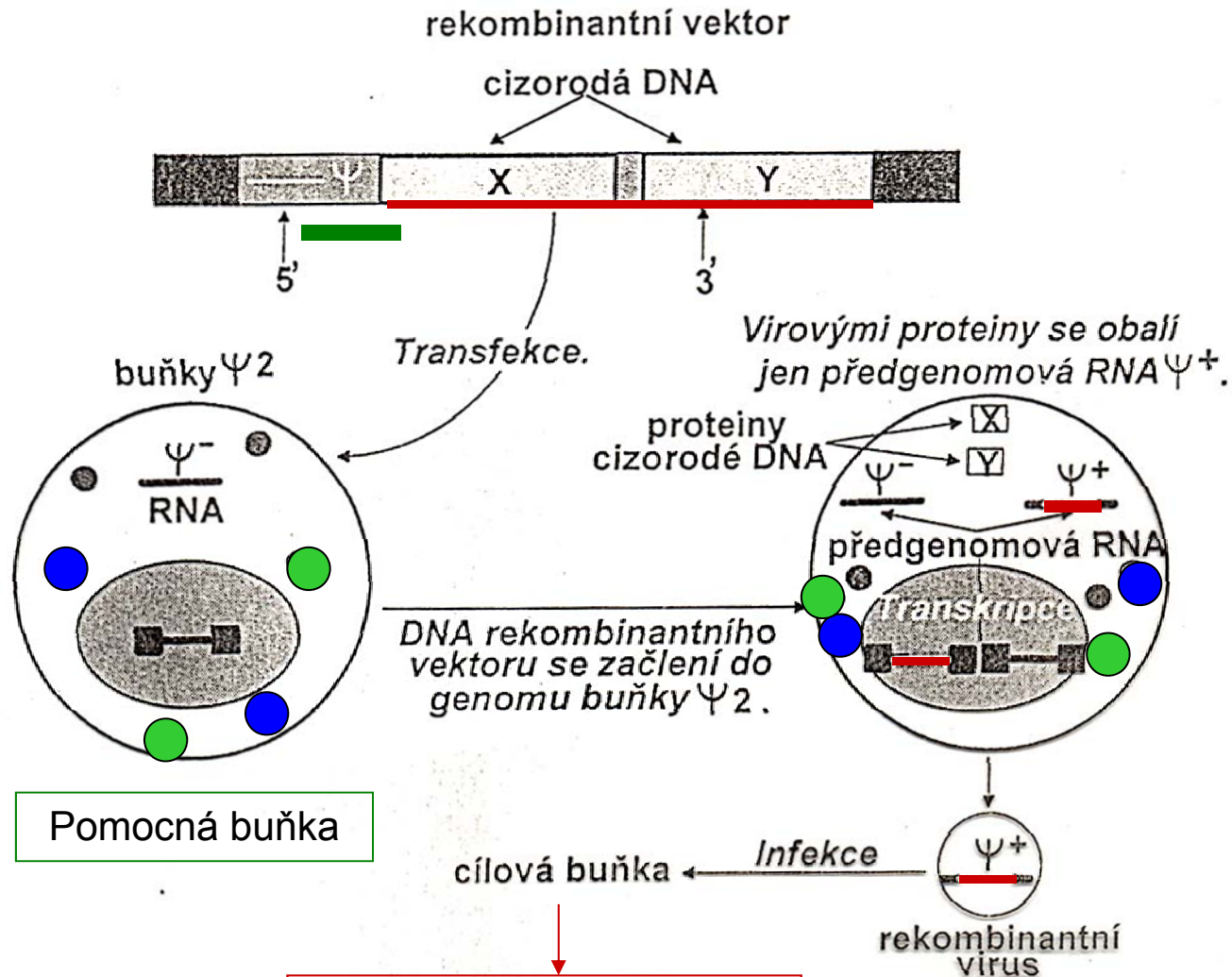
V úspěšně infikovaných cílových buňkách se exprimují geny rekombinantního retroviru. Oba typy virů jsou produkovány cílovými buňkami.

Schéma přípravy linie pomocných buněk Ψ 2

MoMuLV = Moloney Murine Leukemia Virus



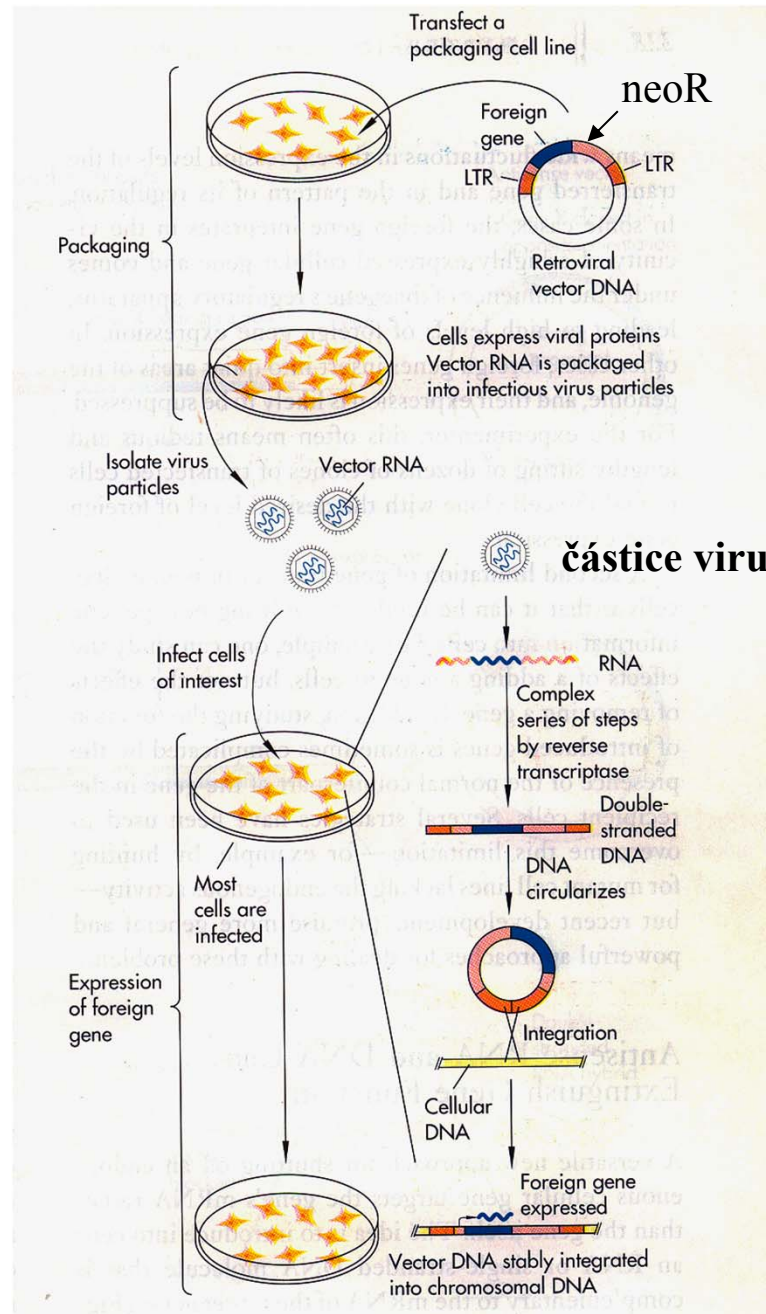
Příprava čisté linie rekombinantních retrovirů



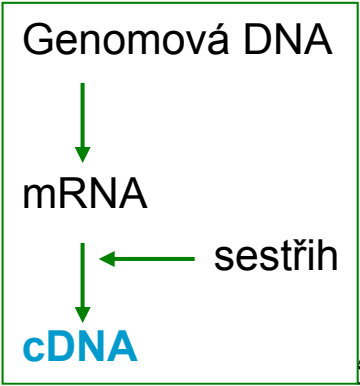
Rekombinantní virus je trvale začleněn do genomu

Využití retrovirových vektorů pro stabilní expresi cizorodých genů

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

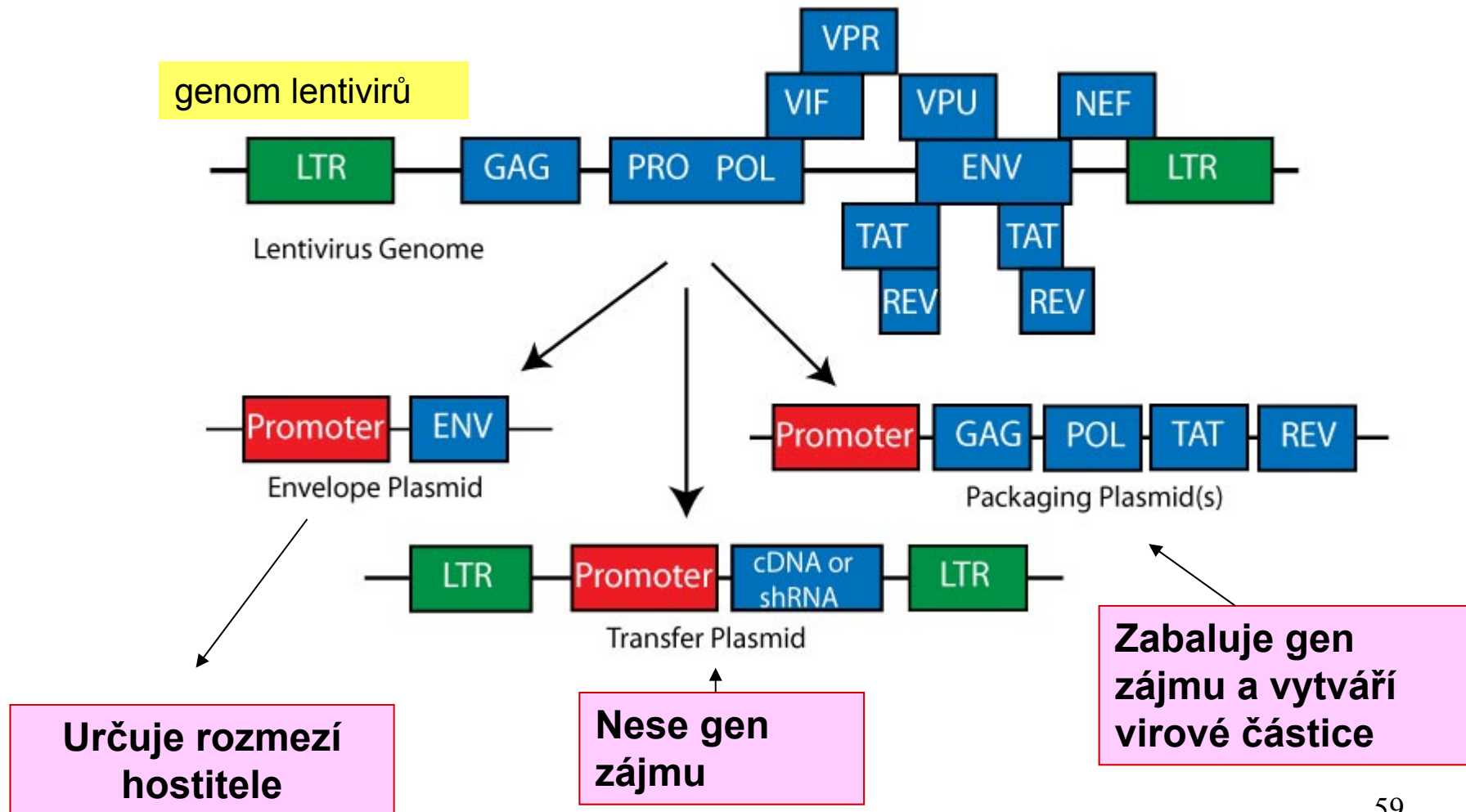


Klonování retrovirových sekvencí do plazmidu, vytvoření kyvadlového vektoru, klonování v E. coli

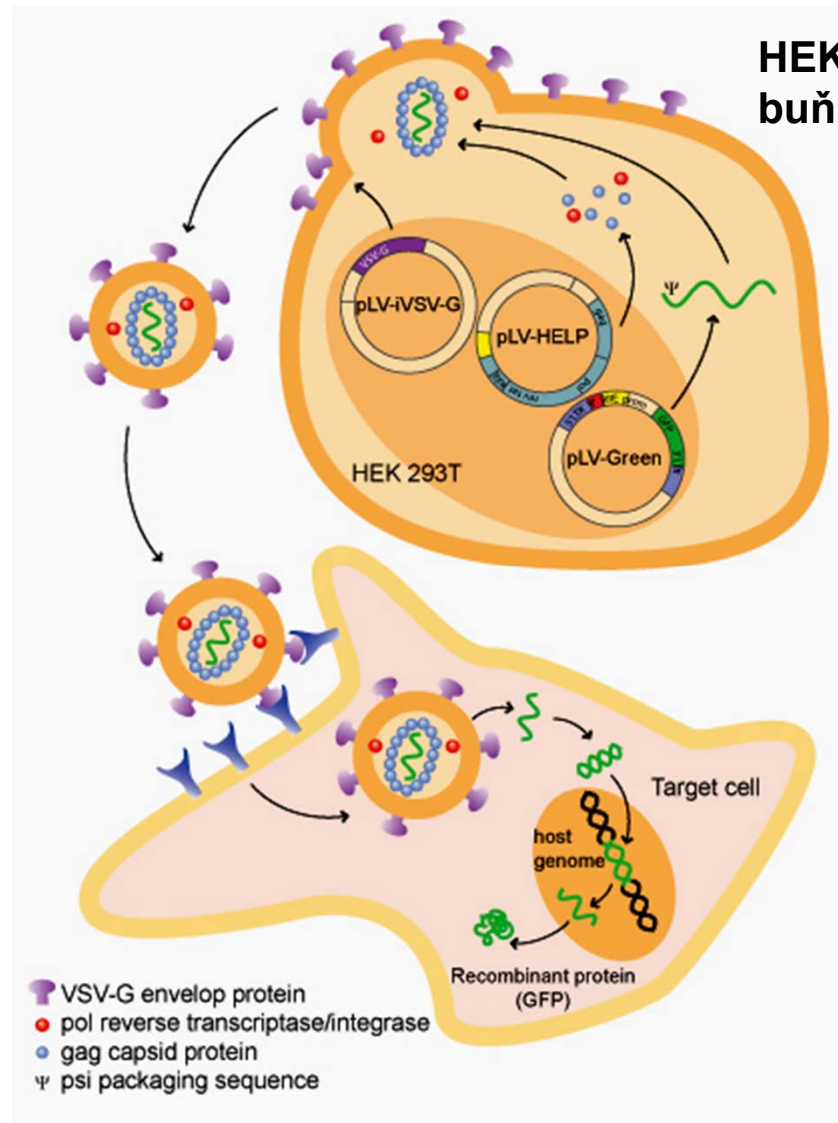


Lentivirové vektory – přenos genů do nedělicích se buněk

Odvozeny od HIV, BIV, EIAV, FIV, SIV



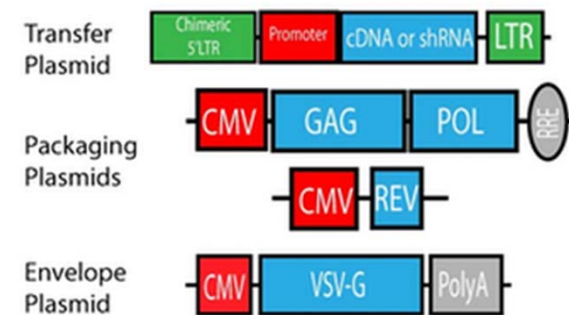
Přenos genů lentivirovým vektorem (systém obsahující 3 plazmidy)



Druhá generace
Systém založen na třech plazmidových konstruktech:

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

Třetí generace



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.**

shRNA = short hairpin RNA –
funkčně analogická miRNA, navození RNAi

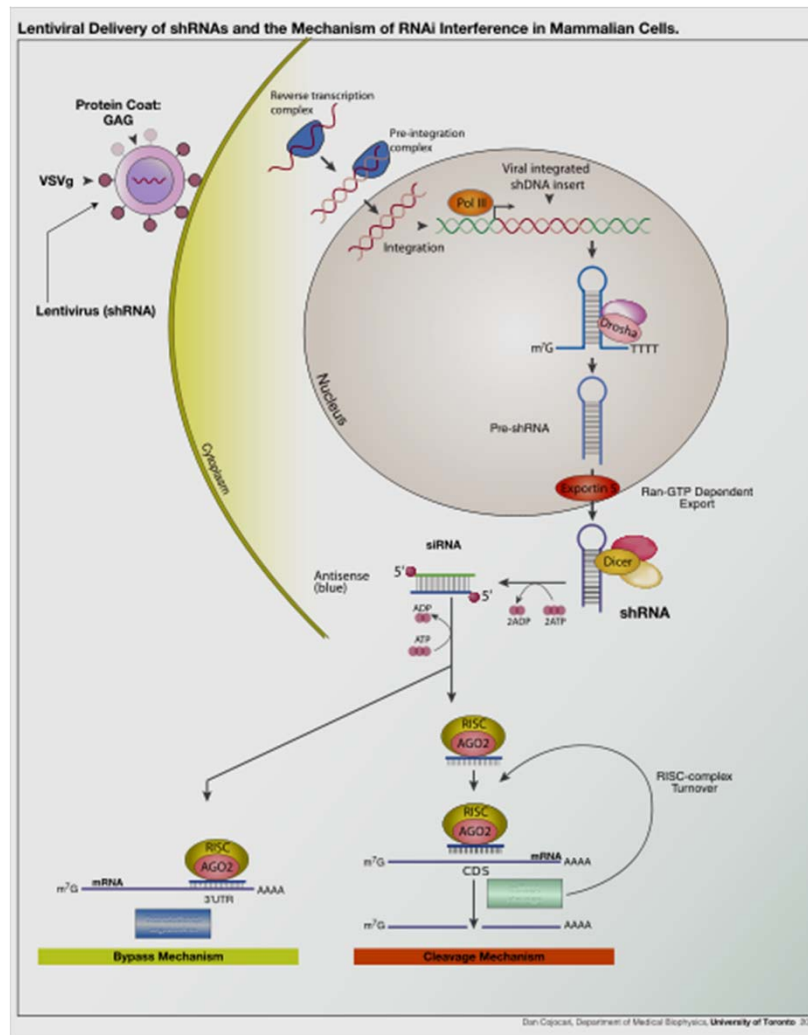


Table 15.2 High-level expression systems in animal cells

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