

Přenosy genů do živých buněk (transfekce)

Účel:

- studium funkce genů
- studium mechanismů řídících genovou expresi

Klasifikace transfekčních postupů

Podle stability transgenu:

- 1. transfekce přechodná*
 - přenášená DNA se dostává do buňky, ale zůstává v extrachromozomálním stavu, transgen se přepisuje několik dní
 - jedna transfekovaná buňka může obsahovat větší počet kopií transfekční DNA (vyšší exprese transgenu)
- 2. transfekce stabilní*
 - přenášená DNA se začleňuje do chromozomu hostitelské buňky (tento děj nastává z nízkou frekvencí 10^{-5} - 10^{-6})
 - nízká pravděpodobnost výskytu dvou nebo více kopií transgenu v jedné buňce

Podle způsobu penetrace membrány:

- 1. Postupy biochemické*
- 2. Postupy fyzikální*
- 3. Postupy biologické*

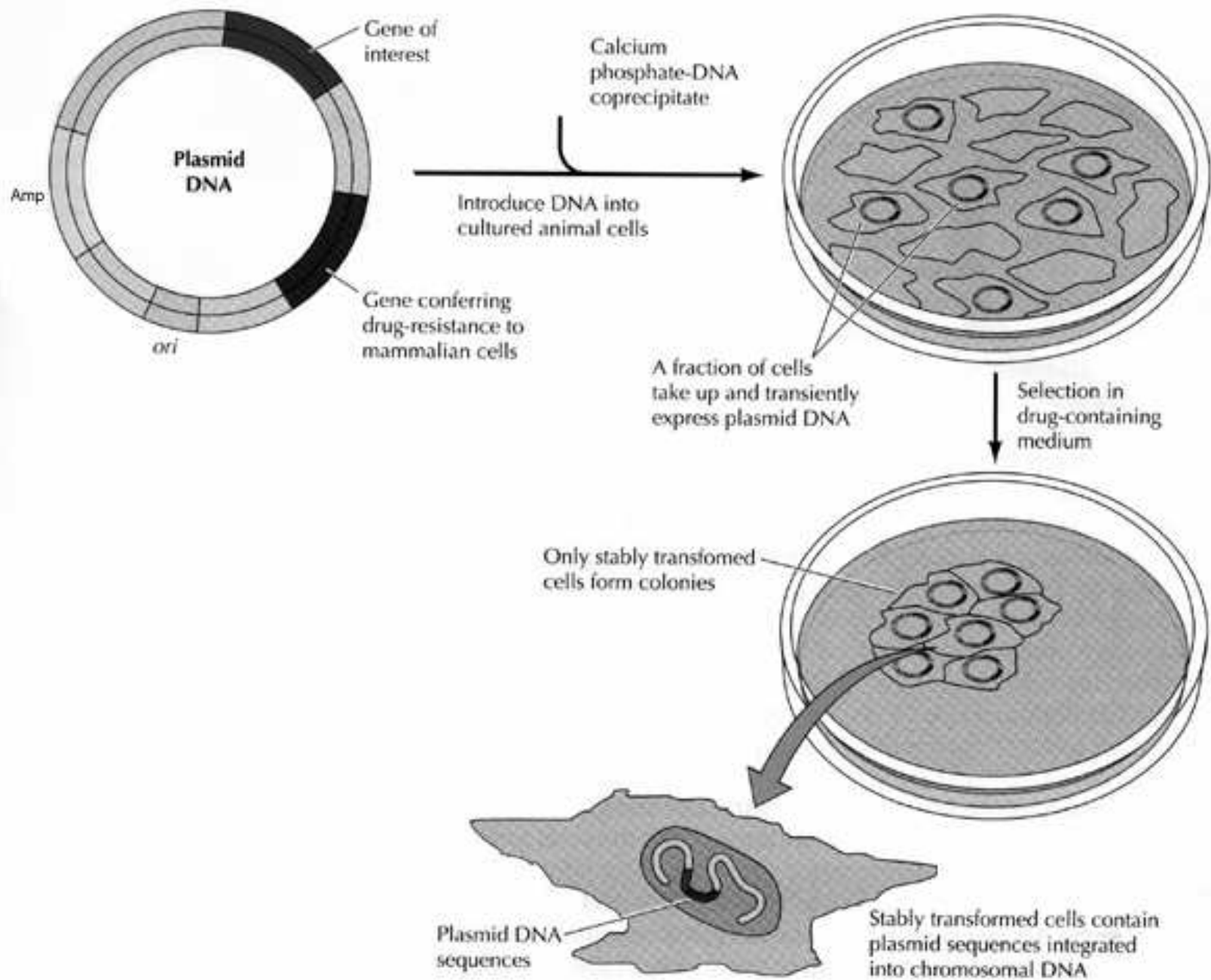
Biochemické transfekční postupy

1. Transfekce zprostředkovaná fosforečnanem vápenatým:

- DNA se smíchá s chloridem vápenatým ve fosfátovém pufru
- vytvoří se jemná sraženina DNA a fosforečnanu vápenatého
- precipitát je pohlcován buňkami endocytózou
- účinnost transfekce je relativně vysoká: až 50% buněk může cizorodou DNA přijmout
- „hrubostí“ sraženiny lze regulovat poměr cytotoxicity versus účinnosti transfekce

Použití:

- přechodná i stabilní transfekce fibroblastů a jiných adherujících i neadherujících buněk



Biochemické transfekční postupy

2. Transfekce zprostředkovaná DEAE-dextranem

Dietylaminoetyl-dextran:

- vysokomolekulární kladně nabitý polymer
- slouží jako most mezi negativně nabitou DNA a negativně nabitým povrchem buňky

Princip:

- negativně nabitá DNA se váže ke kationtům DEAE- dextranu
- rozpustný komplex se přidá k buňkám
- přenos komplexu do buněk endocytózou

Použití:

- adherující i neadherující buňky (značná variabilita účinnosti u různých typů buněk)
- nevhodné pro stabilní transfekci (toxicita)
- lze použít nižších koncentrací transfekční DNA ve srovnání s precipitací fosforečnanem vápenatým

Biochemické transfekční postupy

3. Transfekce lipofekcí

Princip:

- transfekčním činidlem je lipofilní molekula, která obklopí transfekční DNA
- transfekční činidlo má pozitivně nabitě skupiny - usnadnění vazby k negativně nabitě DNA
- lipidy s navázanou DNA fúzí s buněčnou membránou a zajistí tak přenos DNA do buňky

Použití:

- rozmanité buněčné typy, často velmi dobrá účinnost

Biochemické transfekční postupy

4. Transfekce zprostředkovaná polykationty (polybrenem a poly-L-ornitinem)

Princip:

- DNA vytváří s polykationty komplexy, jejichž přenos do buněk je usnadněn permeabilizací buněčné membrány a osmotickým šokem, které zajišťuje DMSO

Fyzikální transfekční postupy

2. Transfekce genovou puškou („gene gun“)

Princip:

- nastřelování buněk kovovými projektily pokrytými DNA

Použití:

- vhodná metoda pro transfekci rostlinných buněk
- je třeba optimalizovat řadu parametrů:
 - počet buněk vystavených transfekci (buněčnou hustotu, rychlost proliferace buněk)
 - typ média
 - stupeň vakua ve střelné komoře
 - míru tlaku hélia na mikroprojektily
 - vzdálenost mezi puškou a buňkami
 - velikost mikroprojektilů (obvykle částice zlata nebo wolframu o průměru 0,6-1,6 μm)

Fyzikální transfekční postupy

3. Mikroinjekce

Princip:

mechanický přenos DNA do buněk jemnou jehlou mikromanipulátoru

Použití:

Vhodnými objekty jsou velké buňky jako oocyty a vajíčka

Přenosy genů do zárodečných myších buněk mikroinjekcí

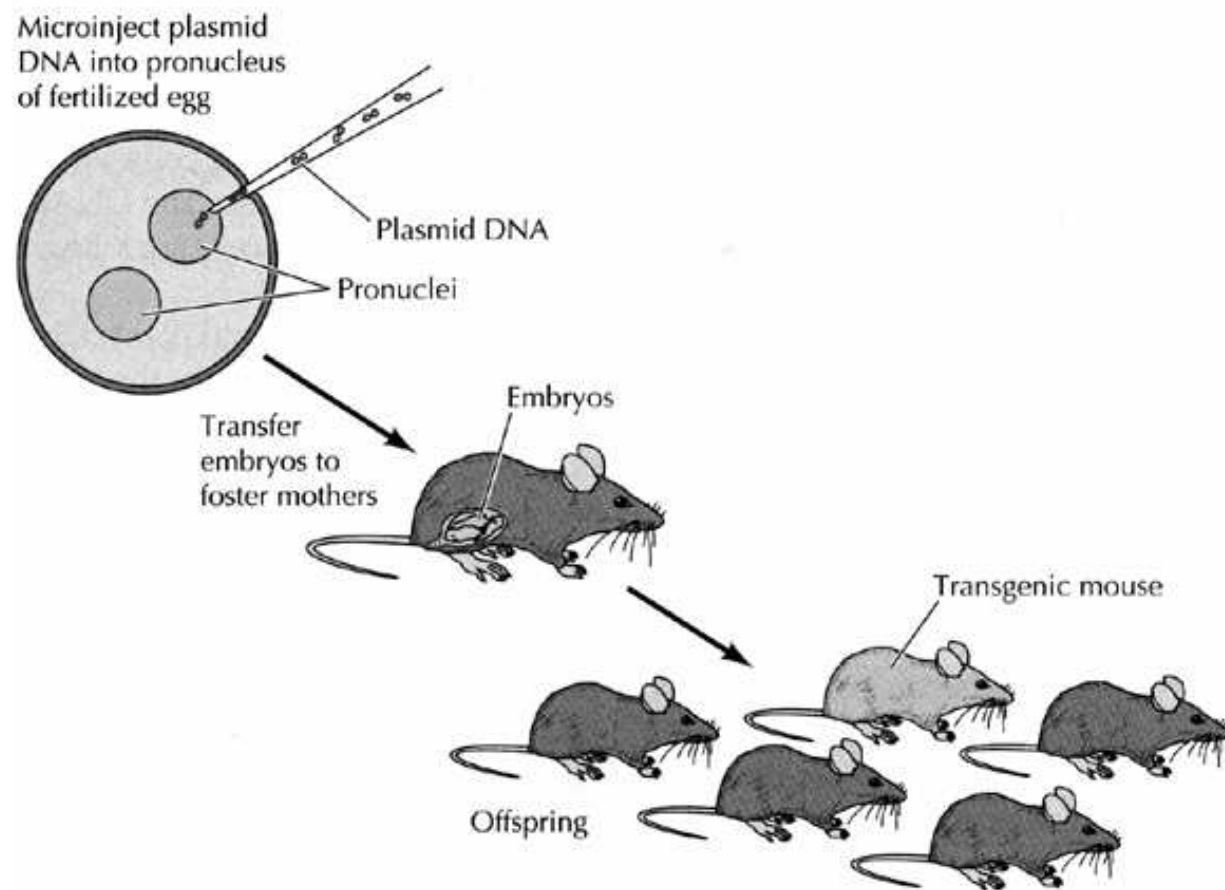
Význam:

- umožňují studium funkce genů v kontextu intaktního organismu
- myši, které tímto způsobem získaly cizí geny se nazývají transgenní myši

Princip:

- DNA se mikroinjekcí vpraví do prvojádra oplozeného myšního vajíčka
- po mikroinjekci se vajíčka přenesou do pseudobřezí myši, kde se dále vyvíjejí
- u přibližně 10% potomstva bude cizorodá DNA integrována do genomu všech buněk
- protože cizorodá DNA se v potomstvu vyskytuje v somatických i zárodečných buňkách, přenáší se křížením do dalšího potomstva stejně, jako kterýkoliv jiný gen

Vytvoření transgenní myši



Přenosy genů do myši prostřednictvím embryonálních kmenových (ES) buněk

ES buňky jsou uměle kultivované buňky odvozené z raných myších embryí, tzv. blastocyst, které mohou být kultivovány *in vitro* a později raným embryím opět předány a podílet se tak na vývoji všech tkání.

Princip:

- přenos DNA do ES buněk v kultuře
- selekce stabilně transfekovaných buněk
- přenos transfekovaných buněk do blastocysty mikroinjekcí
- přenos blastocysty do pseudobřezí myši

Přenosy genů do myši prostřednictvím embryonálních kmenových (ES) buněk

Výsledek:

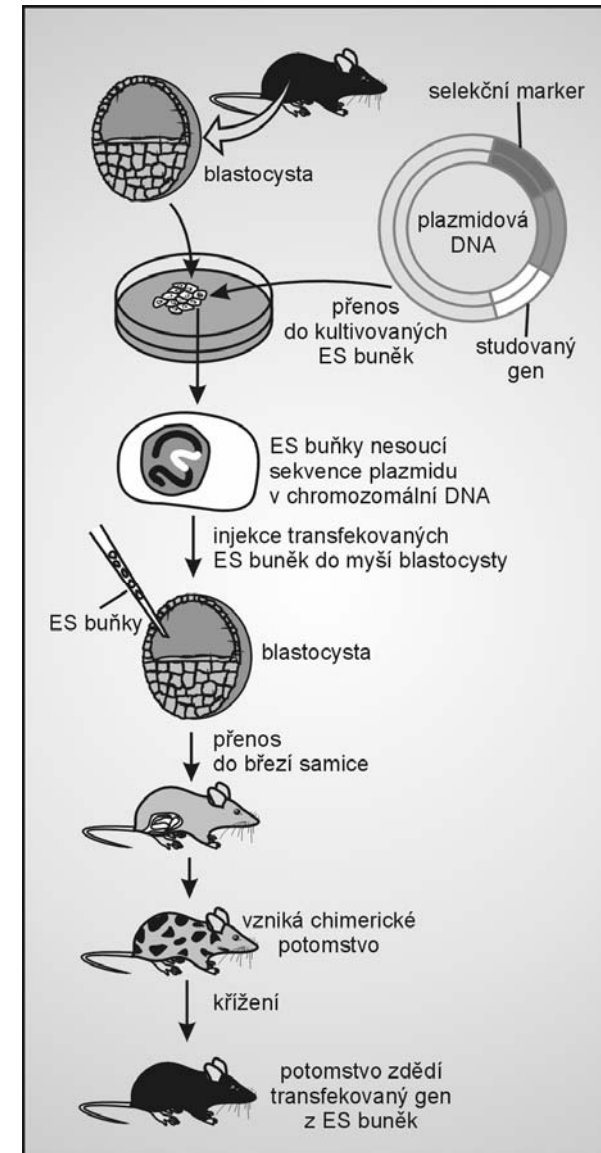
některá z mlád'at budou obsahovat jednak buňky odvozené z transfekovaných ES buněk a jednak normálních buněk.

Myši představující směs dvou různých buněčných typů - chimérické myši.

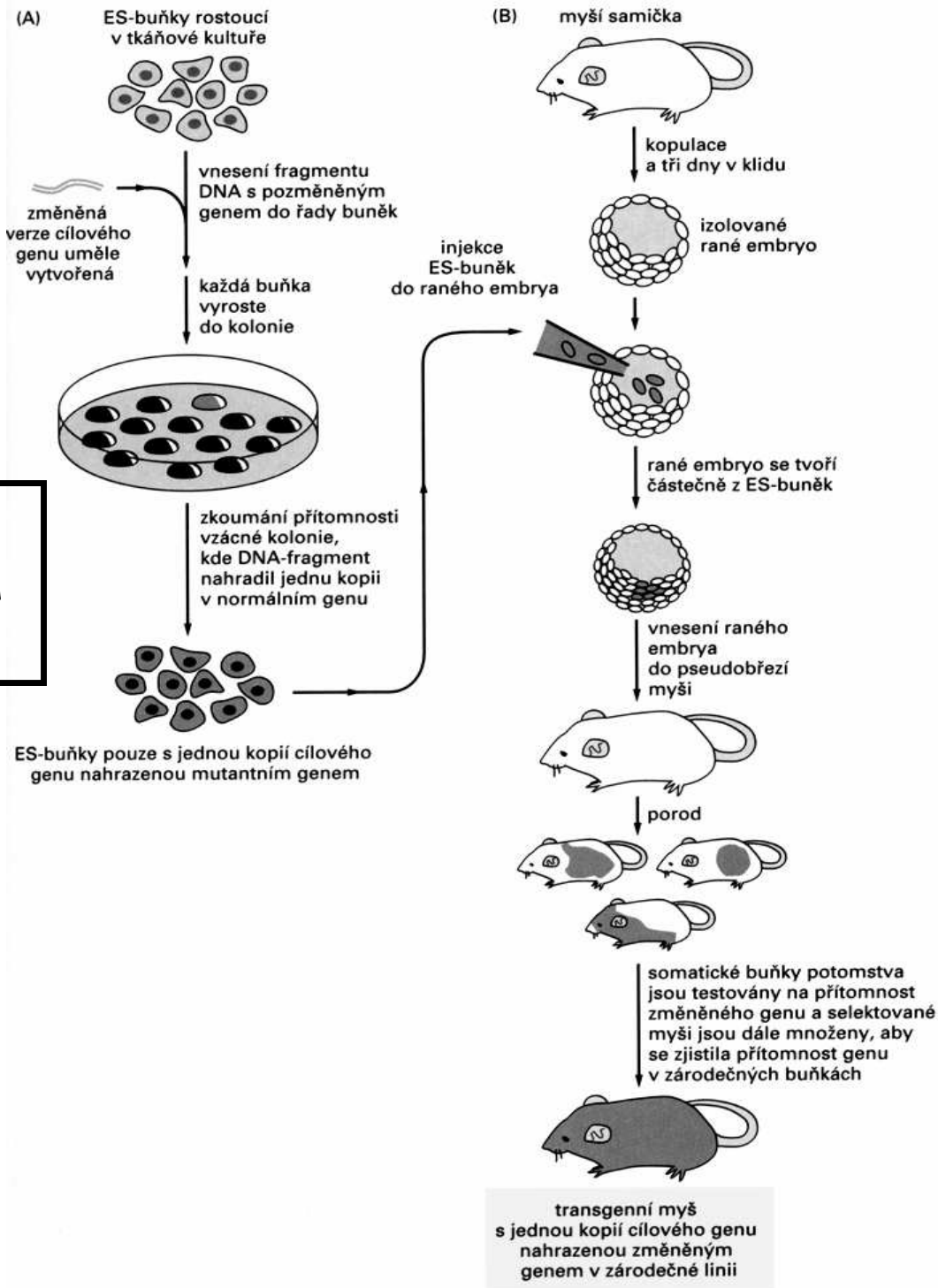
U některých mlád'at mohou být buňky odvozené z transfekovaných ES buněk v zárodečné linii:

- jejich křížením se transfekovaný gen bude přenášet na potomstvo jako stabilní znak (transgenní myši).

- pokud byl normální gen pozměněn ve smyslu úplné ztráty funkce, označují se tyto myši jako "knockout - myši".



Souhrn technik používaných při genetických manipulacích s myšimi ES buňkami



Biologické transfekční postupy

1. Transfekce virovými vektory

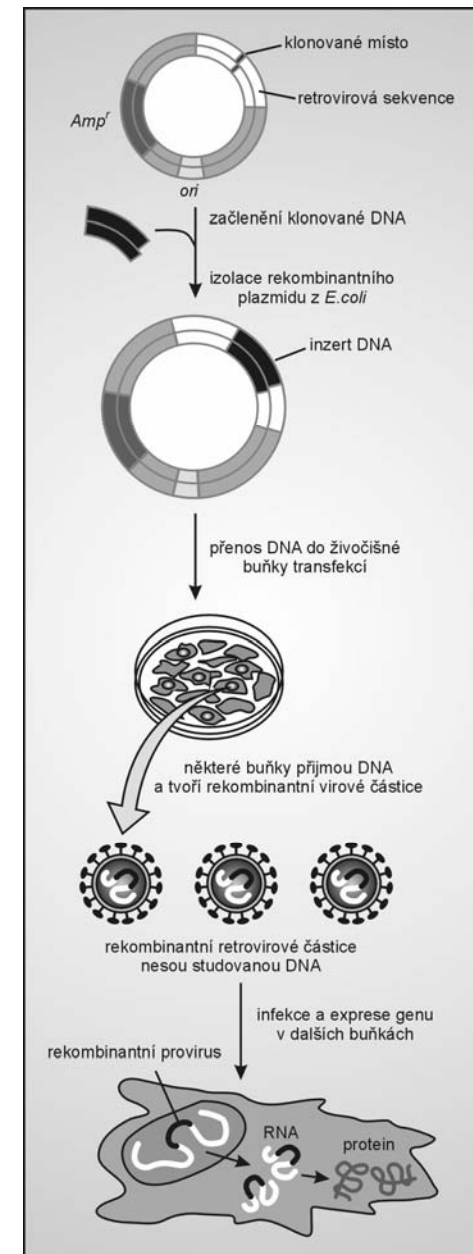
Vlastnosti retrovirových vektorů:

- velmi účinné, protože životní cyklus retrovirů zahrnuje zpětnou transkripci a integraci virové DNA do genomu infikované buňky
- mají charakter plazmidů, do kterých byly klonovány určité retrovirové sekvence
- studovaná DNA se začlení do virové sekvence daného plazmidu a rekombinantní plazmidová DNA se izoluje z bakterií

Biologické transfekční postupy

Transfekce virovými vektory - princip:

- živočišné buňky pěstované v kultuře jsou transfekovány retrovirovým vektorem obsahujícím žádanou DNA např. metodou precipitace fosforečnanem vápenatým
- v buňkách, které DNA přijaly, se tvoří rekombinantní retrovirové částice, které nesou cizorodou DNA a pučením buňky opouštějí
- tyto rekombinantní virové částice se použijí pro infekci žádaných buněk
- v infikovaných buňkách retroviry zajistí stabilní integraci dané DNA do chromozomu tvorbou provirů



Biologické transfekční postupy

2. Transfekce rostlinných buněk zprostředkovaná Ti plazmidy *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens:

- bakterie, která vyvolává tvorbu nádorů na tělech rostlin
- přenáší Ti („tumor-inducing“) plazmid do rostlinných buněk
- Ti plazmid se začleňuje do chromozomální DNA

Funkční elementy Ti plazmidu:

- **oblast T**, která se integruje do chromozomu rostlinné buňky
- **oblast vir**, která nese geny, jejichž produkty napomáhají přenosu T oblasti
- pokud se do T-DNA začlení žádaná nukleotidová sekvence, dojde k jejímu přenosu do rostlinných buněk

Transfekce rostlinných buněk Ti plazmidy *A. tumefaciens*

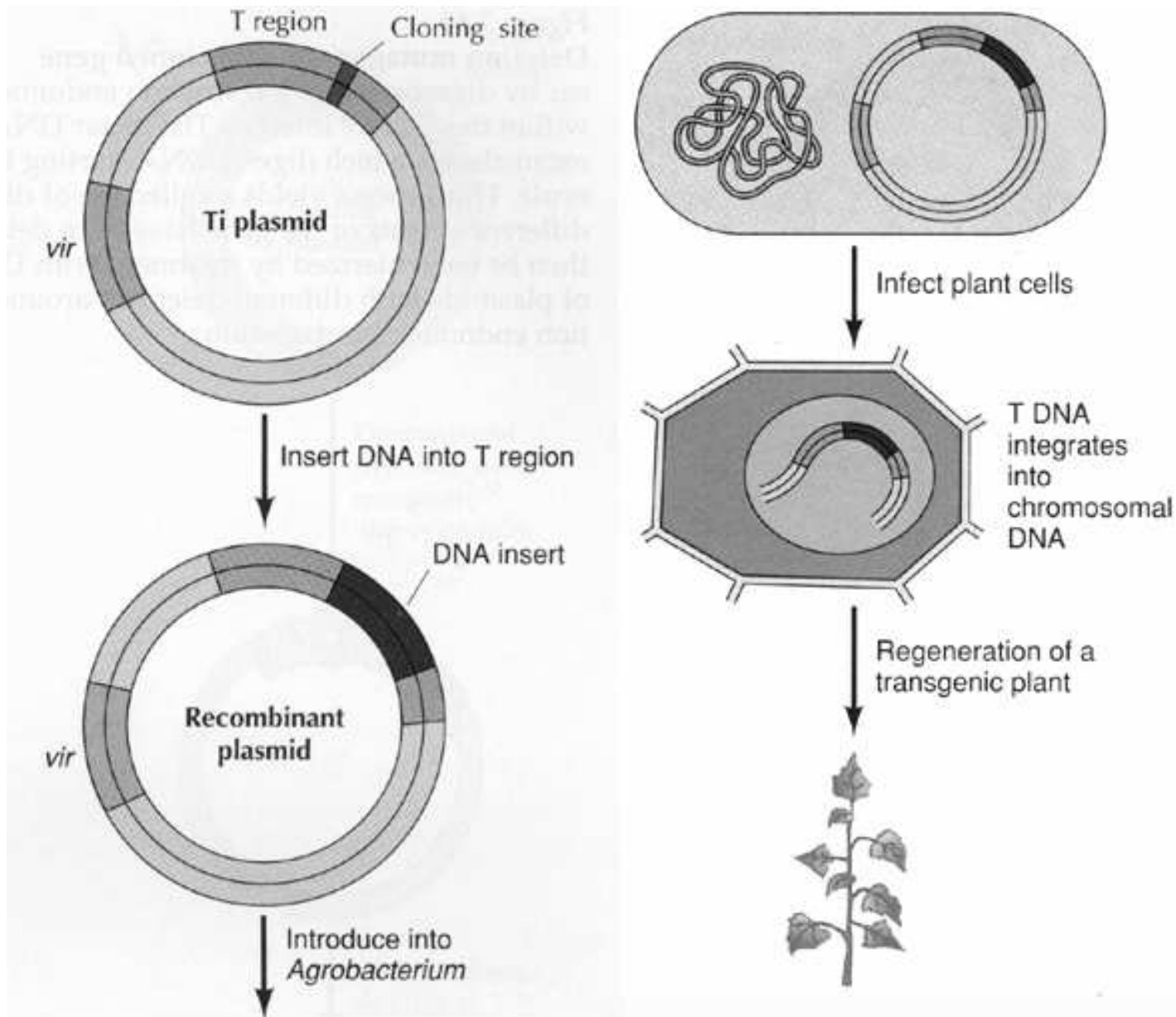
Postup:

- začlenění žádaného úseku DNA do oblasti T plazmidu Ti
- přenos rekombinantního plazmidu do *A. tumefaciens*
- infekce kultivovaných buněk touto bakterií

Výsledek:

- oblast T plazmidu včetně studované DNA se přenesou do rostlinných buněk, kde se začlení do chromozomální DNA
- z transgenních buněk lze regenerovat transgenní rostlinu

Přenos genů do rostlin



Výběr cílových buněk pro transfekci

- schopnost rozeznat a aktivovat promotor řídící expresi exogenního genu
- účinný růst
- primární buňky versus transformovaná (nesmrtelná) buněčná linie

Selekční systémy eukaryotických buněk

- podmínka izolace vzácných stabilních transfektantů
- původně založeny na obnovení porušených metabolických drah v buňce (70. léta)
- např. mutantní buňky s inaktivní thymidin kinázou byly transfekovány genem HSV-TK (herpes virus simplex TK) a získaly tak schopnost růstu na médiu obsahujícím aminopterin.
- následovala selekce transfektantů na médiu s aminopterinem, ve kterém je znemožněna syntéza thymidinu *de novo* - požadavek aktivní TK
- nevýhoda: nutnost inaktivace TK v cílových buňkách

Selekční systémy eukaryotických buněk

80. léta - objev dominantních selekčních markerů:

- není třeba používat mutantní buněčné linie, protože byly objeveny dominantní selekční markery
- izolovány z *E. coli*:

xantin-guanin-fosforibozyltransferáza (gpt)

aminoglykozid-fosfotransferáza (neo)

hygromycin B-fosfotransferáza

puromycin-N-acetyl transferáza

Xantin-guanin- fosforibozyl transferáza - GPT

- katalyzuje syntézu *GMP* z xantinu nouzovou drahou
- za přítomnosti aminopterinu a kyseliny mykofenolové, kdy je blokována syntéza *GMP de novo* savčími enzymy, je přežití buňky závislé na integraci a expresi *gpt*
- **kyselina mykofenolová** specificky inhibuje inosinát dehydrogenázu, tj. enzym, který katalyzuje přeměnu inosinmonofosfátu na xantinmonofosfát (ten je potřeba pro biosyntézu *GMP*)
- **aminopterin** inhibuje aktivitu dihydrofolát reduktázy, která je nutná pro biosyntézu purinů a pyrimidinů
- tento blok lze uvolnit xantinem, pokud mají buňky k dispozici funkční produkt genu *gpt E. coli*

Aminoglykozid-fosfotransferáza - Neo

- poskytuje hostitelským buňkám rezistenci na antibiotikum G418 (strukturně příbuzné neomycinu)
- pokud se do růstového média přidá G418 závisí přežití buněk na stabilní integraci a expresi genu *neo*
- G418 narušuje funkci ribozomů a tak blokuje proteosyntézu
- bakteriální enzym aminoglykosid fosfotransferáza pozměňuje G418 do netoxické formy

Další selekční markery

PAC (N-acetyl transferáza)

zdroj: *Streptomyces alboniger*

princip: poskytuje rezistenci na puromycin

HPH (hygromycin B aminoglykozid fosfotransferáza)

zdroj: *E. coli*

princip: poskytuje rezistenci na hygromycin B

DHFR (dihydrofolát reduktáza) - mutantní varianta

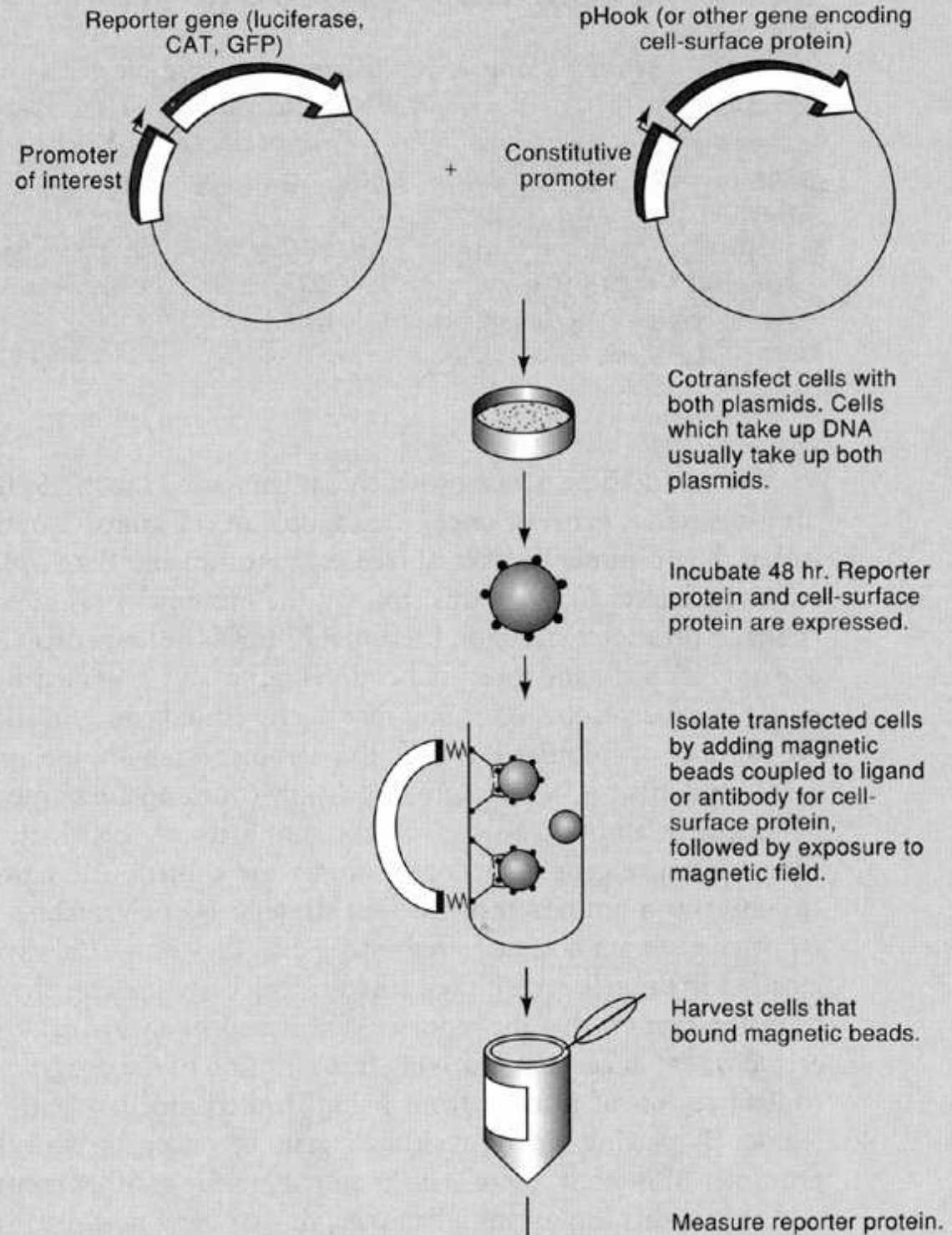
zdroj: myš

princip: kompetitivní inhibitor DHFRwt, poskytuje rezistenci na metotrexát

Izolace přechodně transfekovaných buněk

- současná transfekce buněk žádaným plazmidem (např. obsahujícím reportérský gen) a plazmidem kódujícím povrchový protein
- buňky obvykle přijmou oba plazmidy
- transfekované buňky lze oddělit od netransfekovaných např. magnetickými kuličkami potaženými příslušnou protilátkou nebo průtokovým cytometrem vybaveným rozdělovacím zařízením ("cell sorter")

Izolace transfektantů



Využití technologie přenosu DNA do buněk pro studium funkce genů

1. Utišování genů pomocí RNA interference („knock-down“)
2. Vypínání genů pomocí homologní rekombinace („knock-out“)
3. Určování funkce genů vnášením jejich mutovaných verzí („knock-in“)

Další přístupy ke studiu funkce genů

- zásahy do genové exprese

Genetické přístupy:

posílení nebo oslabení exprese genu **zásahem** do jeho primární struktury nebo do struktury jeho regulačních oblastí

- přenos genů
- cílené mutace

Epigenetické přístupy:

změna úrovně exprese genu **zásahem bez zásahu** do jeho primární struktury

- ovlivnění struktury chromatinu
- zásah do metylace DNA
- ovlivnění pozdějších fází genové exprese:
změna stability transkriptu,
ovlivnění translace,
ovlivnění funkce (aktivity) proteinu

Genetické přístupy

Změna struktury endogenů nebo regulačních oblastí:

- cílená mutageneze

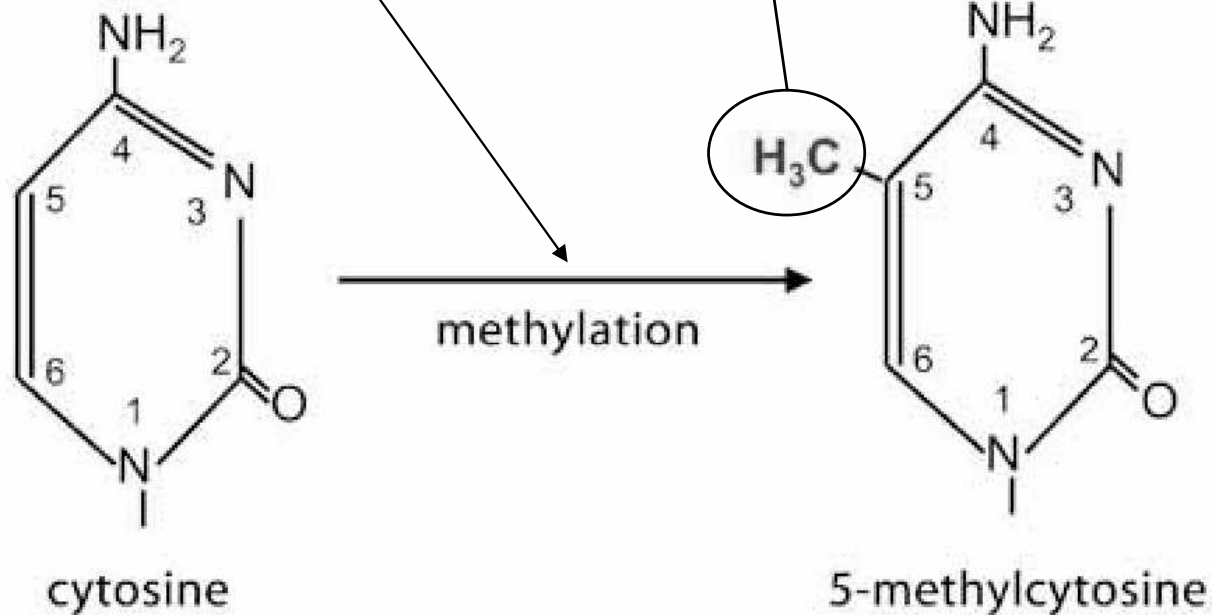
Přenos cizorodých genů do buněk:

- transfekce
- infekce
- příprava transgenních organismů
- technologie „knock-out“ a „knock-in“

Epigenetické přístupy: metylace DNA

Připojení metylové skupiny na C5 cytozinu: vznik **5-metylcytozinu**

Donorem metylové skupiny je **S-adenosyl-L-metionin**, reakci katalyzují **DNA metyltransferázy**



Metylace DNA

Frekvence výskytu a význam:

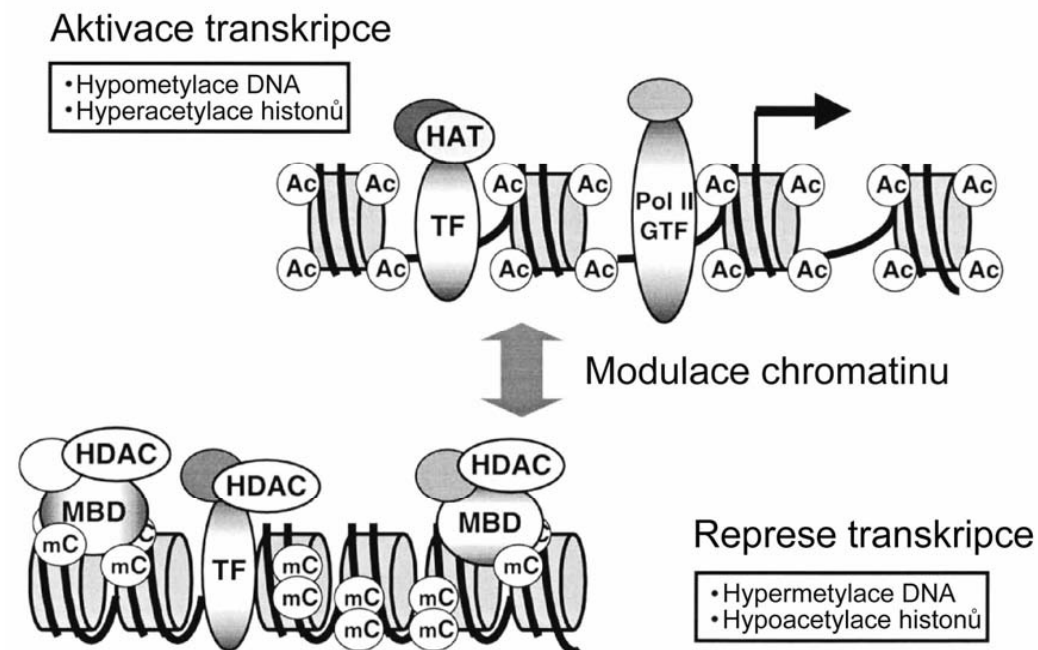
- 5-metylcytozin tvoří 1-6% bází DNA většiny eukaryot
- v genomu obratlovců se 5-metylcytozin objevuje především v dinukleotidech 5' -CpG-3'
- 60-90% dinukleotidů CpG je v genomu obratlovců metylovaných

- dinukleotidy CpG nejsou zastoupeny v genomu rovnoměrně, ale tvoří tzv. **CpG ostrovy**, které se objevují převážně v oblastech **promotorů**

- **hypermethylace DNA** v těchto oblastech způsobuje **zastavení transkripce** příslušných genů

Dva mechanismy zastavení transkripce metylací cytosinu

1. přímé znemožnění vazby transkripčních faktorů citlivých k metylaci na cílové místo DNA (např. E2F, CREB, c-Myb, NF κ B)
2. proteiny vážoucí metylované CpG sekvence znemožní transkripci transkripčními faktory, které nejsou citlivé k metylaci (MeCP1, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3)



Inhibitory metylace DNA

1. Nukleosidové analogy (5-azacytidin, zebularin): tvoří kovalentní vazbu s DNA metyltransferázou a tak ji inhibují
2. Látky působící na enzymy zapojené do metabolismu S-adenosylmetioninu (donor metylové skupiny):
 - kompetitivní inhibitory AdoMet-dependentních metyltransferáz
 - inhibitory syntézy AdoMet (metotrexát)
3. Deriváty kyseliny 4-aminobenzoové (prokainamid, prokain) se vážou na sekvence bohaté na GC a znemožňují tak vazbu metyltransferázy na DNA

Omezují metylaci DNA a umožňují reaktivaci exprese genů.

Demetylační činidla se používají při léčbě některých nádorových onemocnění - zvýšení exprese nádorových supresorů.

Hypermetylační činidla

S-adenosylmethionin

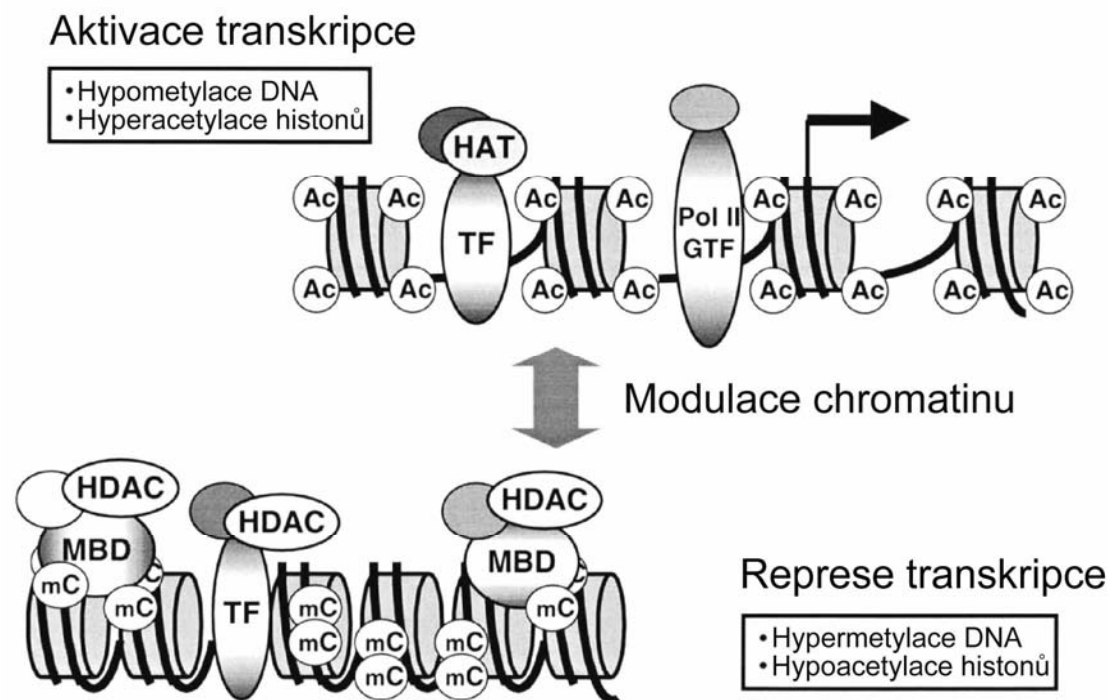
Zastavení nežádoucí genové exprese.

Acetylace histonů

- přenos acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na lysin (Lys5, Lys12 nebo Lys16) histonu
- úroveň acetylace histonu vyplývá ze směru vychýlení rovnováhy histonových acetyltransferáz (HAT) a histonových deacetyláz (HDAC)

Acetylace histonů má vliv na strukturu chromatinu

- **acetylované histony** usnadňují přístup transkripčních faktorů k DNA - spjatý s **transkripčně aktivním chromatinem**
- **odstraněním acetylové skupiny** získá lyzin pozitivní náboj - umožněna elektrostatická interakce mezi pozitivně nabitými histony a negativně nabitou DNA (kompaktní chromatin **neumožňuje transkripci**)



Regulace acetylace histonů

U nádorových onemocnění je častá nadměrná aktivita HDAC (umlčení nádorových supresorů)

Inhibitory HDAC (terapeutický potenciál):

- deriváty kyseliny hydroxamové (trichostatin A, pyroxamid, oxamftalin)
- mastné kyseliny (butyrát sodný, fenylbutyrát)
- cyklické peptidy (depsipeptid, apicidin)
- benzamidy (MS-275)

Mechanismus účinku trichostatinu A - přímá vazba na HDAC: inhibice HDAC)

U jiných inhibitorů HDAC není mechanismus účinku známý.

Regulace genové exprese protismyslovými nukleovými kyselinami

Princip:

sekvenčně specifická hybridizace s následkem eliminace určitého transkriptu a jeho translace

Různé varianty:

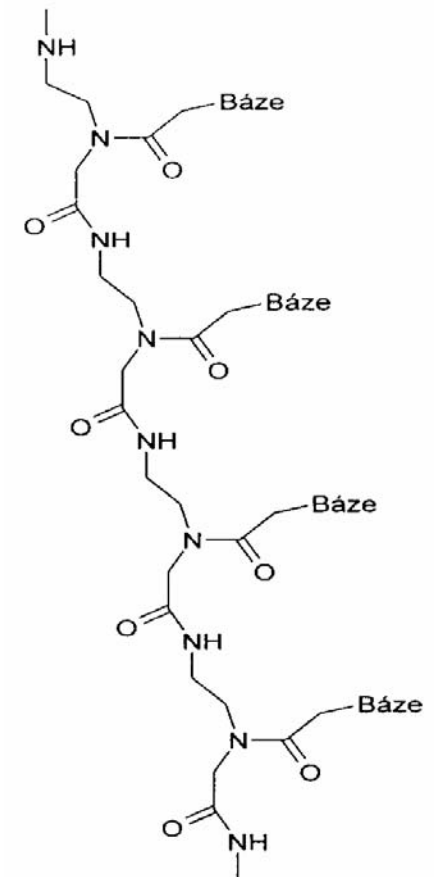
- protismyslové oligonukleotidy
- protismyslová RNA
- ribozymy
- DNAzomy
- návnadové („decoy“) oligonukleotidy
- RNA interference

Protismyslové oligonukleotidy

Sekvence DNA nebo peptidové nukleové kyseliny (PNA) dlouhé 6-30 nukleotidů, které do buněk pronikají endocytózou a vážou se na komplementární mRNA: **specifický inhibiční účinek na genovou expresi!**

PNA:

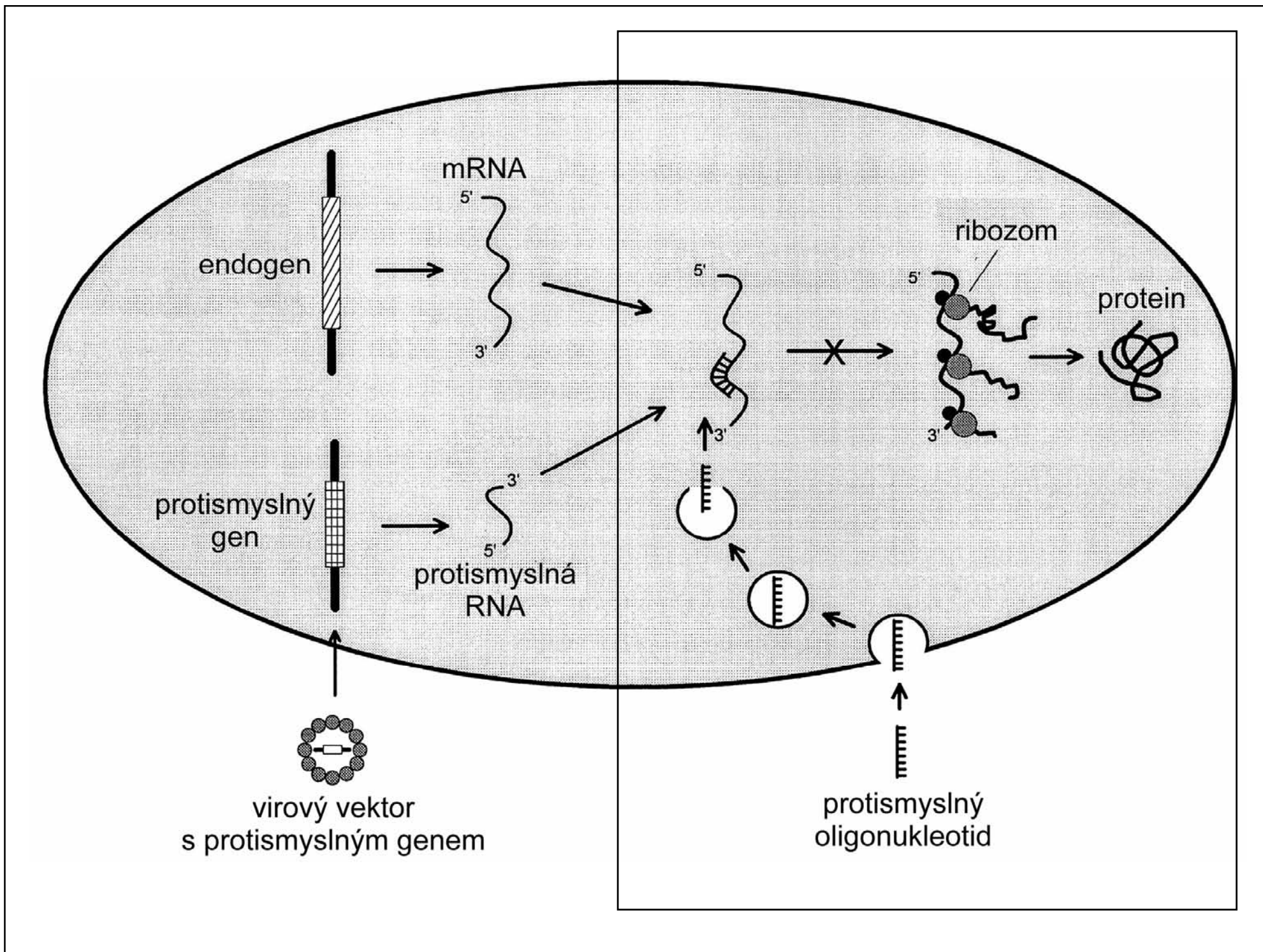
- syntetický analog DNA
- cukr-fosfátová kostra nahrazena pseudopeptidovou kostrou složenou z monomerů N-(2-aminoethyl) glycinu, ke kterým jsou připojeny dusíkaté báze
- odolnost k nukleázám a proteázám
- vysoká specifita vazby k RNA
- absence elektrického náboje:
 - vysoká afinita k RNA



Protismyslové oligonukleotidy

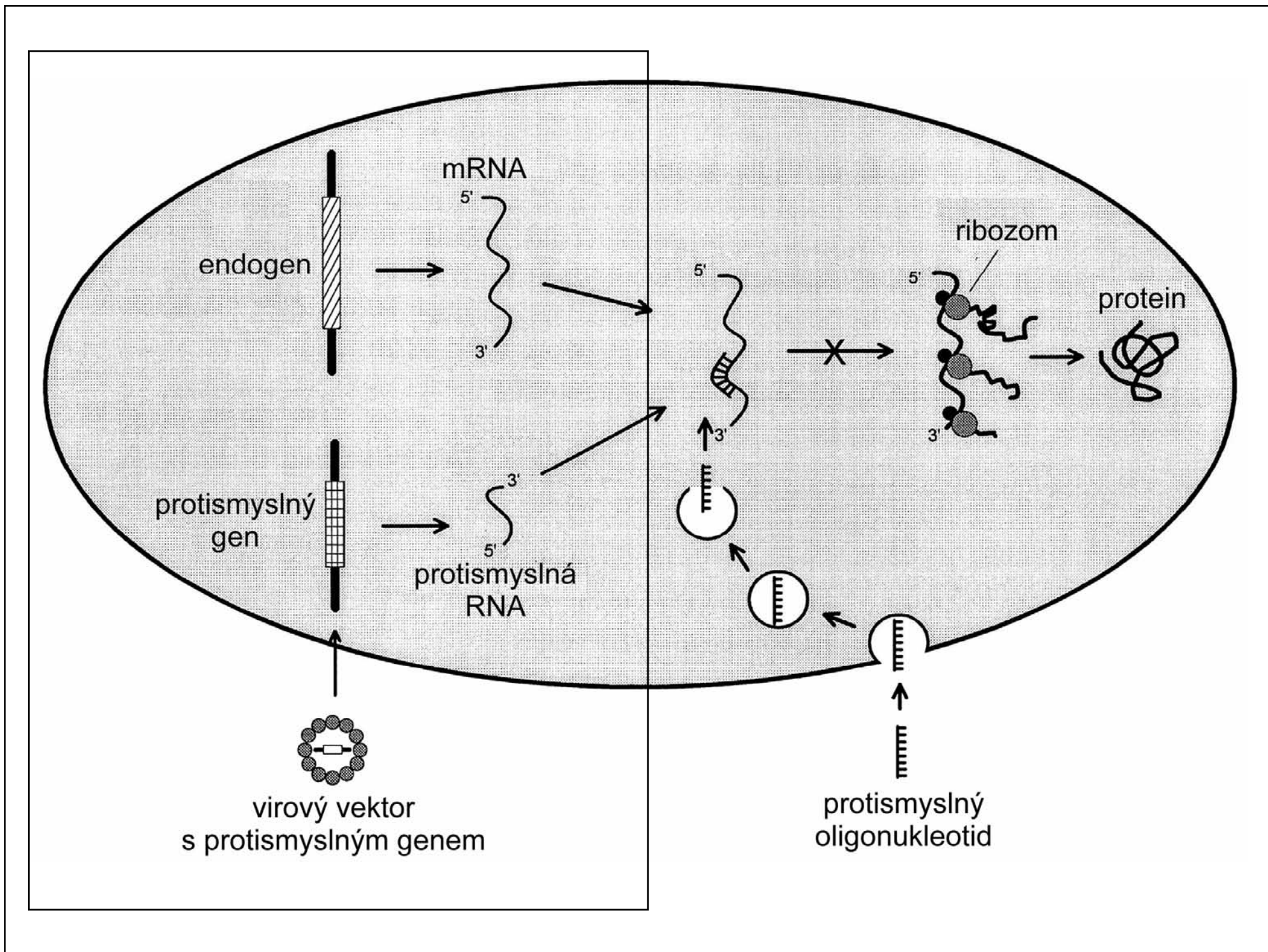
2 mechanismy účinků po vazbě oligonukleotidů na komplementární sekvenci mRNA:

1. Vazba na mRNA spouští její degradaci RNázou H
2. Zablokování translace: duplexy blokují sestavení iniciačního komplexu translace
- účinek je reverzibilní



Protismyslová RNA

- přepis opačně orientovaných genů, které jsou do buňky přeneseny expresními vektory transfekcí
- protismyslná RNA je komplementární přepisu cílového endogenu a vytvoří s ním duplex (vliv sekundární struktury)
- zablokování translace (trvalá a stabilní inhibice exprese cílových genů)



Katalytické nukleové kyseliny

- **Ribozymy a DNAzymy**
- malé molekuly RNA nebo DNA, které jsou schopny katalyzovat chemické reakce ovlivňující cukr-fosfátovou kostru nukleové kyseliny
- pro zásahy do genové exprese jsou důležité ty z nich, které mohou zajistit štěpení mRNA
- sekvenční specifita je dána sekvencemi, které sousedí s katalytickým jádrem

Ribozym - funkce

- katalytická RNA
- různé enzymové aktivity, typické pro proteiny: sestřih transkriptů, štěpení DNA, štěpení amidových a peptidových vazeb, polymerace, částečná replikace RNA, atd.
- metaloenzym, nutným kofaktorem je obvykle Mg^{2+}

Ribozym - struktura

- jednořetězcová RNA s dvouřetězcovými úseky
- zahrnuje část pro **rozeznání substrátu** v blízkosti 5' konce a
- **katalytické místo** zodpovědné za vlastní enzymovou aktivitu

Ribozym - mechanismus účinku

- rozeznání substrátu (párování bazí mezi sekvencemi ribozymu a mRNA)
- štěpení mRNA
- uvolnění RNAzemu pro obdobnou reakci s jinou kopií téže mRNA
- relativně nízké koncentrace RNAzemu postačují pro degradaci nadbytku mRNA v buňce
- u dlouhých substrátů je účinnost degradace nižší

Ribozym - výhody a nevýhody

Výhody ve srovnání s proteiny:

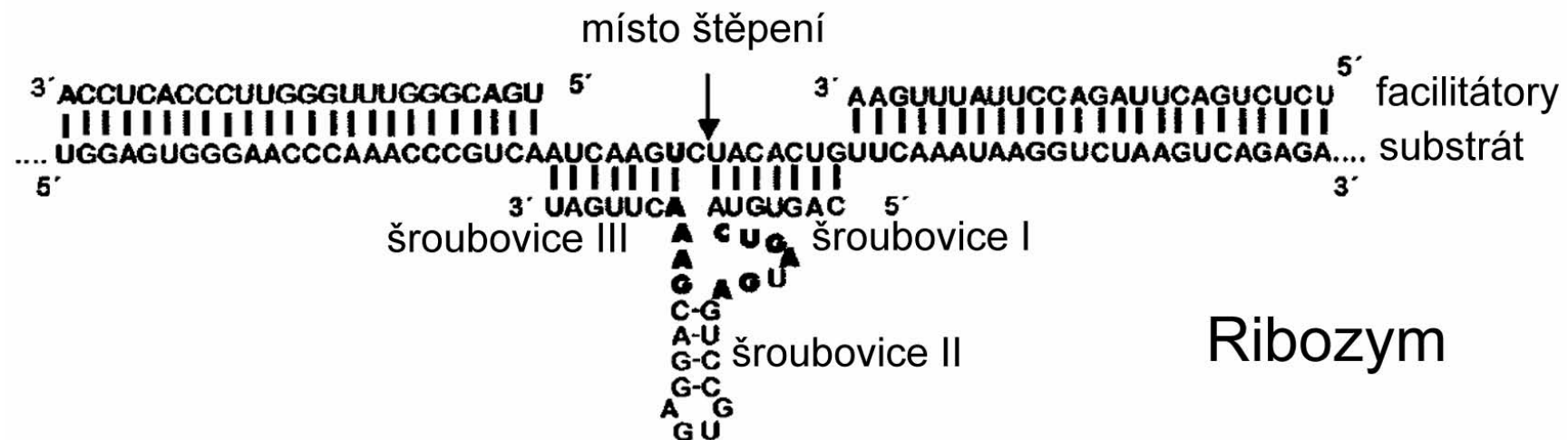
- nižší pravděpodobnost indukce imunitní reakce
- nižší velikost - snadnější přenos do buněk (obvykle prostřednictvím transformačních vektorů)

Nevýhody:

- nízká účinnost rozeznání substrátu
- nízká účinnost degradace dlouhých (terapeuticky významných) substrátů
- nestabilita

Facilitátory

- speciální oligonukleotidy, které se vážou na substrátové RNA, které sousedí s vazebným místem ribozymu (zabraňují tvorbě sekundární struktury RNA v místě štěpení, zpřístupňují jej ribozymu)



Ribozymy - využití

Nástroj genové terapie:

- perspektivní využití při léčbě nádorů (cílené ovlivnění aktivity transkripčních faktorů, proteinových kináz, adhezivních molekul, růstových faktorů, telomeráz, atd.)

DNAzym (DNA enzym, deoxyribozym)

- katalytická DNA
- připraven uměle v laboratoři (rozdíl ve srovnání s přirozenými ribozymy)

Struktura:

- jednořetězec DNA
- vazebná ramena dlouhá 7-8 nukleotidů
- katalytická doména složená z 15 nukleotidů

Enzymová aktivita:

- štěpí fosfodiesterové vazby mezi puriny a pyrimidiny v molekule RNA
- odolnější k nukleázám ve srovnání s ribozymy
- nižší aktivita

Využití:

- podobně jako u RNAzymů: cílená degradace mRNA

Návnadové („decoy“) oligonukleotidy

- krátké syntetické sekvence DNA nebo PNA
- odpovídají endogennímu *cis*-elementu v regulační oblasti genu, jehož expresi mají ovlivnit
- napodobením vazebné sekvence pro transkripční faktor vyvolávají kompetici mezi *cis*-elementem a návnadovým oligonukleotidem: snížení vazby transkripčního faktoru na DNA, inhibice jeho aktivity

Nevýhody:

- nežádoucí vedlejší účinky (interference s jinými proteiny)

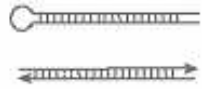
RNA interference

- mechanismus umlčování genů
- jednořetězcová nebo dvouřetězcová RNA přenesená do buněk nebo vytvořená v buňkách cíleně brání expresi cílové mRNA
- dvouřetězcová RNA je podstatně účinnější než jednořetězcová
- podstatou je enzymová (ATD-dependentní) degradace mRNA nebo potlačení genové exprese na úrovni transkripce nebo translace

RNA interference - mechanismus

- dvouřetězcové molekuly RNA jsou přeneseny do buněk a zde rozeznány iniciačním enzymem - ribonukleázou „Dicer“
- štěpením RNA vznikají krátké fragmenty o velikosti 19-23 nukleotidů siRNA („small interfering RNA“)
- siRNA se stávají součástí komplexu RISC („RNA-induced silencing complex“)
- RISC opatřený siRNA se zaměřuje na homologní mRNA a znemožní její translaci některým z těchto mechanismů:
 1. protein Argonaut komplexu RISC zajistí degradaci mRNA
 2. vychytáním *de novo* DNA metyltransferáz (DNMT), histonových deacetyláz (HDAC) a histonových metyltransferáz (HMT) komplexem RISC dojde k modifikaci chromatinu a zastavení transkripce daného genu
 3. Dosud neznámým mechanismem může siRNA navázaná na RISC zablokovat translaci

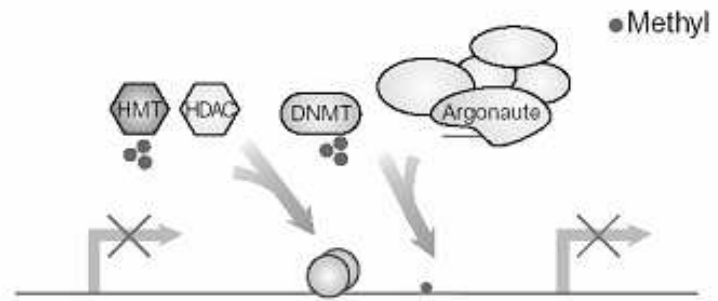
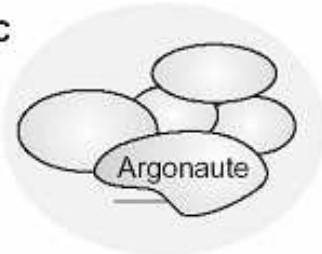
Double-stranded RNA



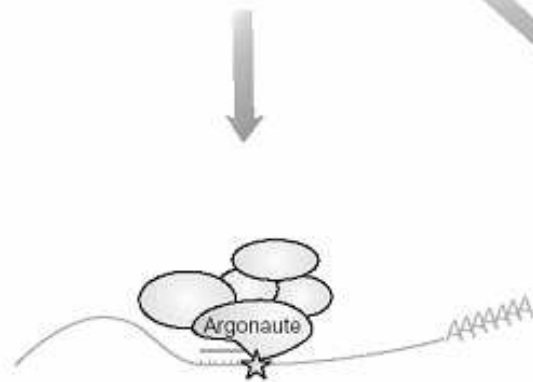
Small RNAs



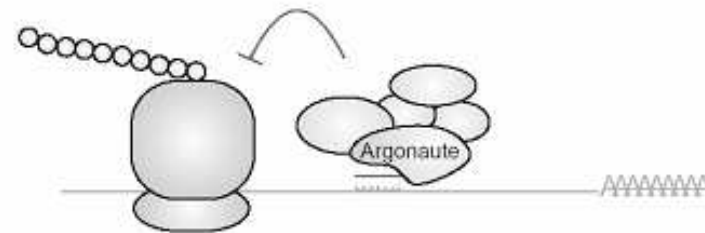
RISC



Transcriptional silencing



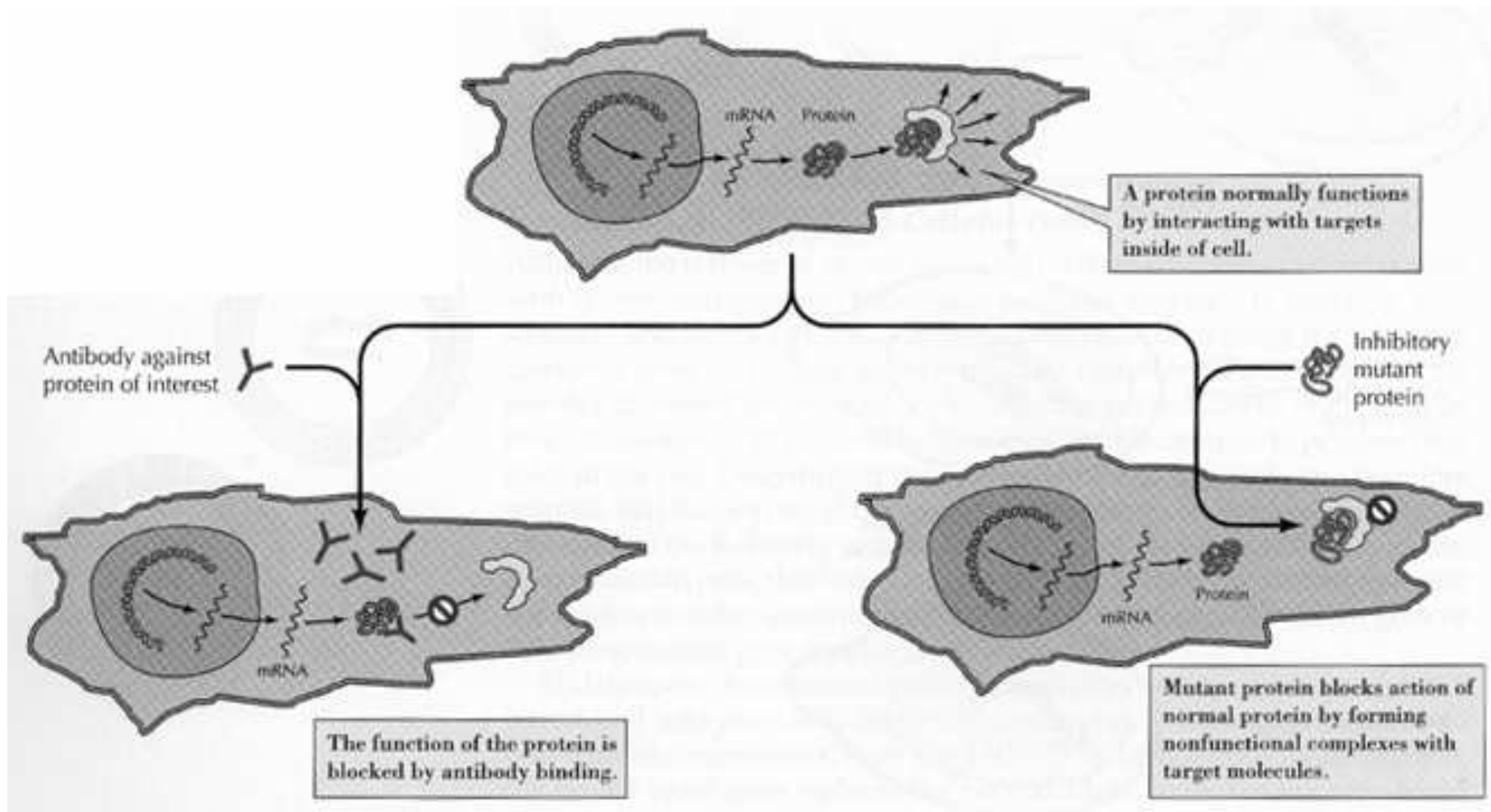
mRNA degradation



Block of mRNA translation

Ovlivnění genové exprese na úrovni regulace aktivity proteinů

- přenosem protilátek do buněk
- přenosem nebo expresí dominantně negativních mutantů



Ovlivnění genové exprese na úrovni regulace aktivity proteinů

Princip dominantní negativity:

Inhibice aktivity normálního funkčního proteinu přenosem jeho defektních podjednotek

Obvyklý postup:

1. Do buněk se transfekcí přenese zkrácená varianta genu, jehož funkci chceme eliminovat
2. Nadbytek mutantního proteinu způsobí inhibici jeho endogenní funkční formy i za její přítomnosti (proto dominantní negativita)

Příklad - inhibice transkripčních faktorů kontrolovaných hormony:

- proteiny disponují DNA-vazebnou doménou, transkripčně aktivační doménou a doménou pro vazbu hormonu
- fungují ve formě dimerů
- za přítomnosti nadbytku zkrácených variant tohoto proteinu lze dosáhnout účinné inhibice tvorby funkčních dimerů