

# Přenosy genů do živých buněk (transfekce)

## Účel:

- studium funkce genů
- studium mechanismů řídicích genovou expresi
- biotechnologie
- genové terapie

# 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**

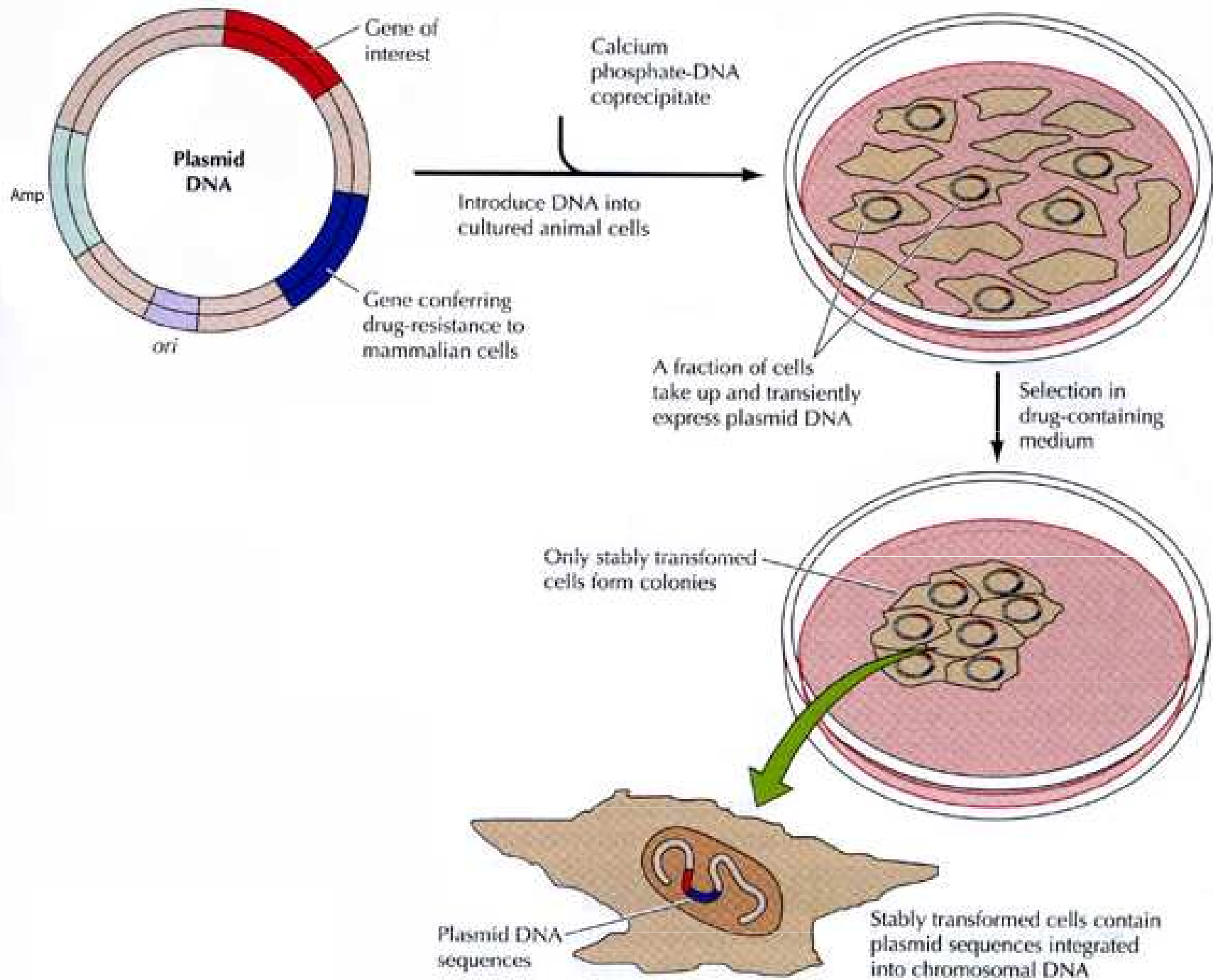
# Biochemické transfekční postupy

## 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  $\mu\text{m}$ )



# Fyzikální transfekční postupy

## 2. Elektroporace

### Princip:

- DNA a buňky se smísí v empiricky definovaném pufru
- směs se vystaví krátkému elektrickému pulzu o vysokém napětí
- následkem elektrického šoku dojde k přechodnému otevření pórů v plazmatické membráně
- póry proniká do buňky DNA

### Použití:

- metoda je rychlá a použitelná pro mnoho typů adherujících i neadherujících buněk

# Fyzikální transfekční postupy

## 3. Mikroinjekce

### Princip:

mechanický přenos DNA do buněk jemnou jehlou mikromanipulátoru

### Použití:

Vhodnými objekty jsou velké buňky jako oocyty a vajíčka

# Biologické transfekční postupy

Využívají především virových a fágových vektorů  
(viz přednáška věnovaná klonovacím vektorům)

# 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*, 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

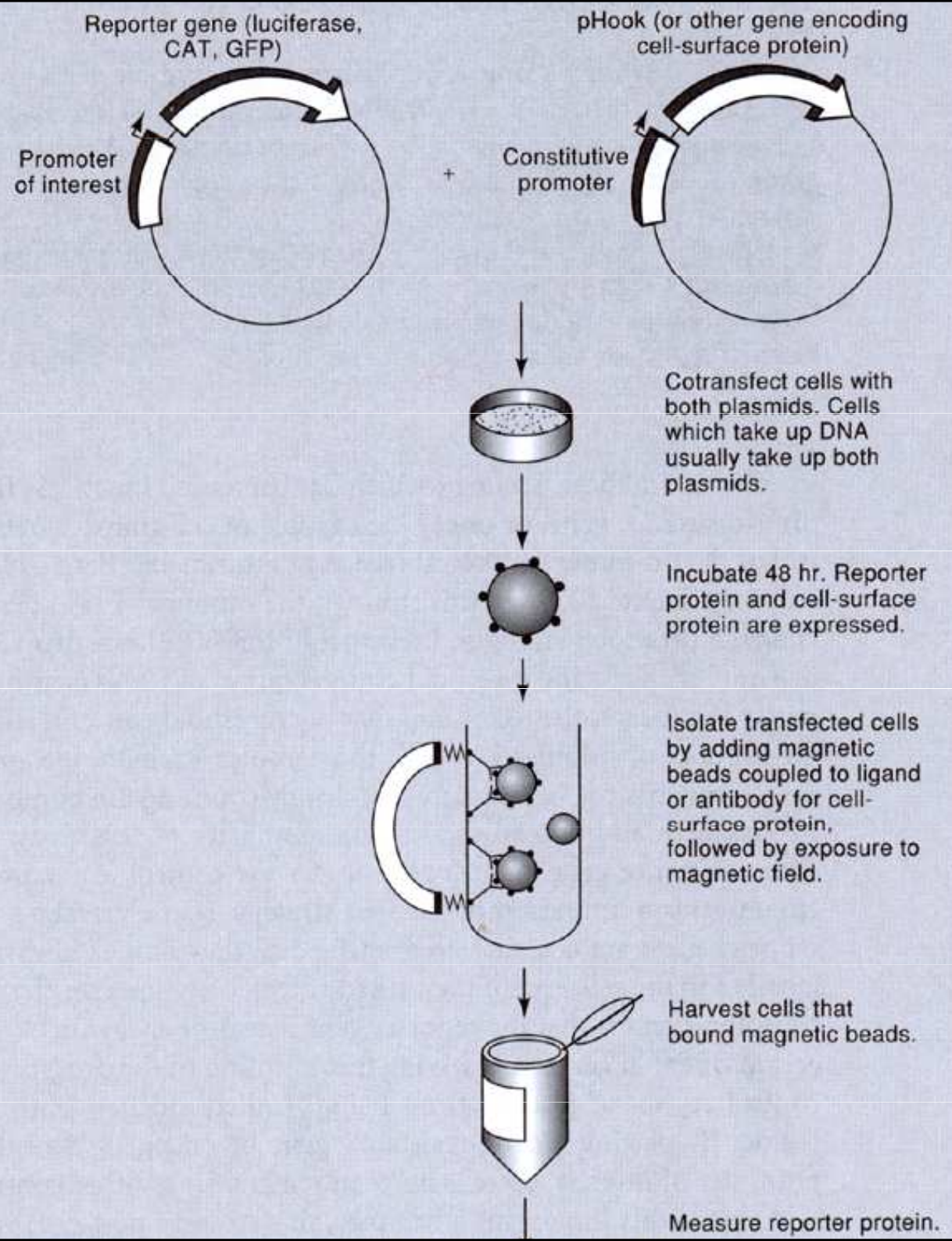
zdroj: myš

princip: kompetitivní inhibitor DHFR<sub>wt</sub>, poskytuje rezistenci na **metotrexát**

# Izolace přechodně transfekovaných buněk

- současná transfekce buněk žadáným 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 mutagenese

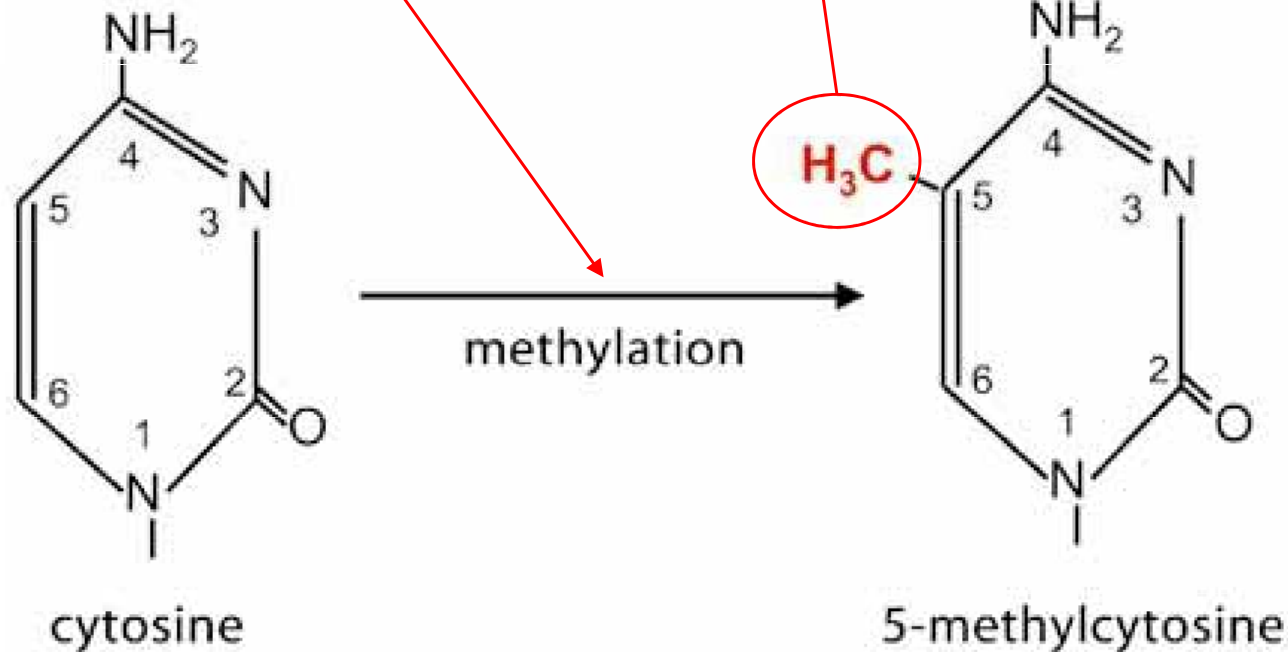
## Přenos cizorodých genů do buněk:

- 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

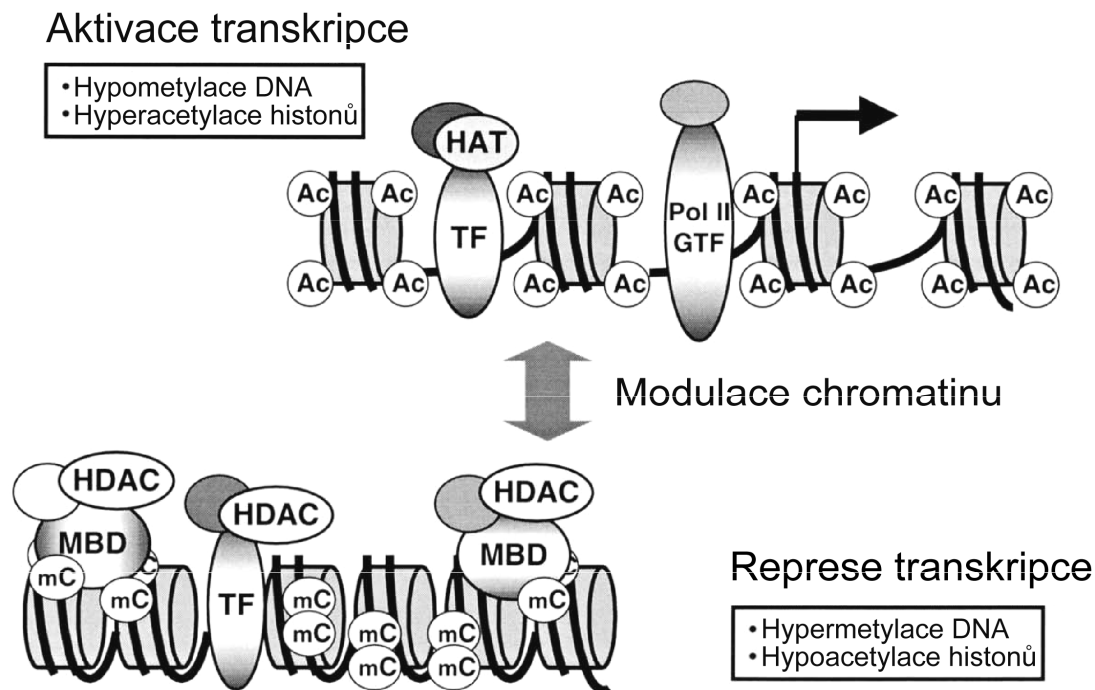
## Frekvence výskytu a význam:

- 5-metylcytozin tvoří 1-6% bazí 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 $\kappa$ 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-adenosylmetionin

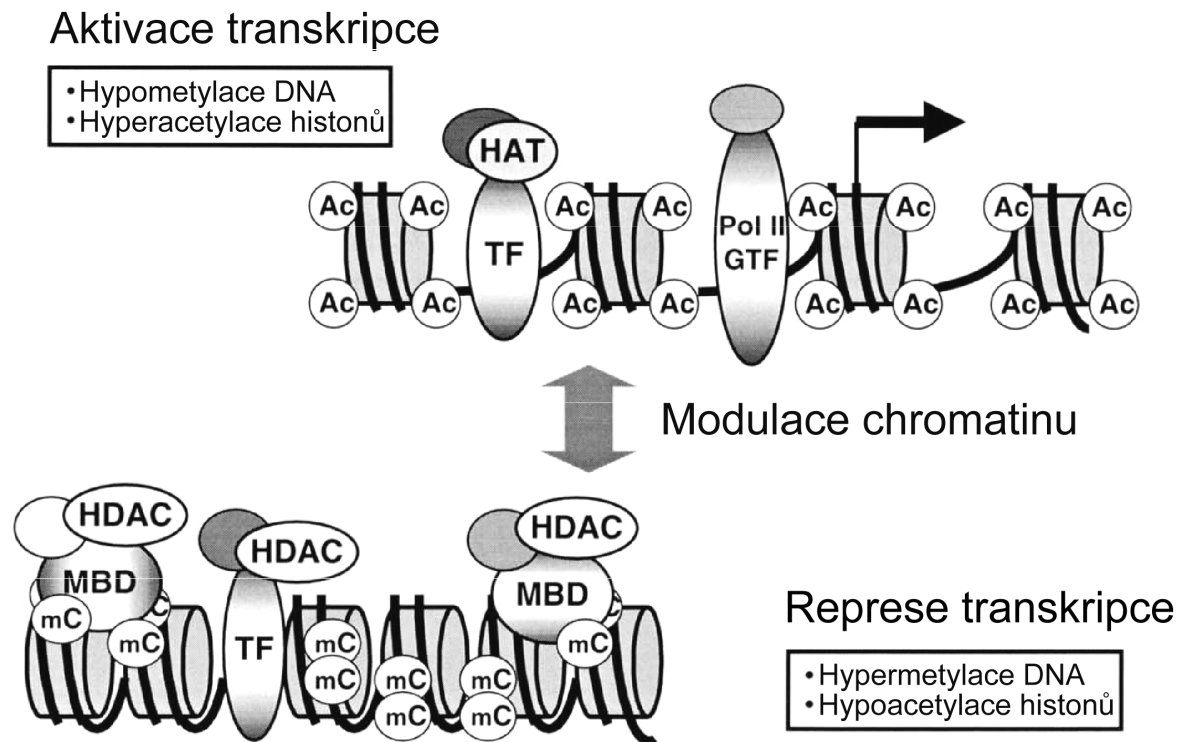
**Zastavení nežádoucí genové exprese.**

## 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 trichostatatinu 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:

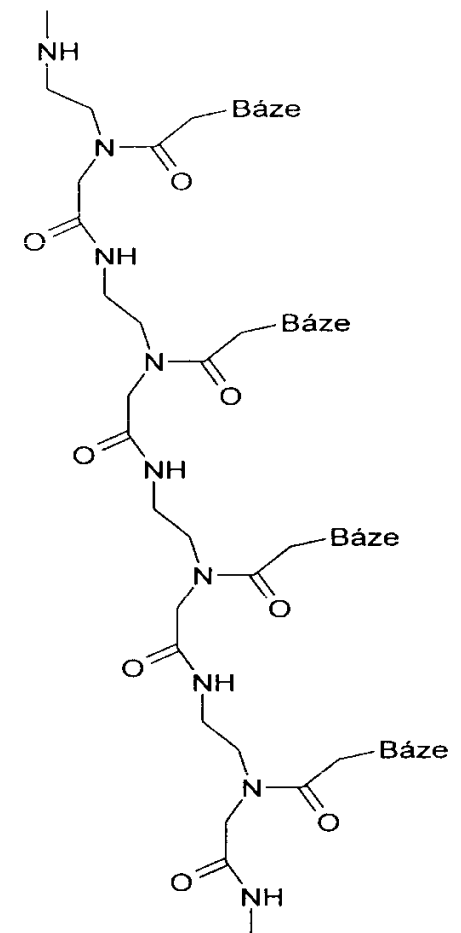
- protismyslové oligonukleotidy
- protismyslová RNA
- ribozymy
- DNAzymy
- návnadové („decoy“) oligonukleotidy
- RNA interference

# 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

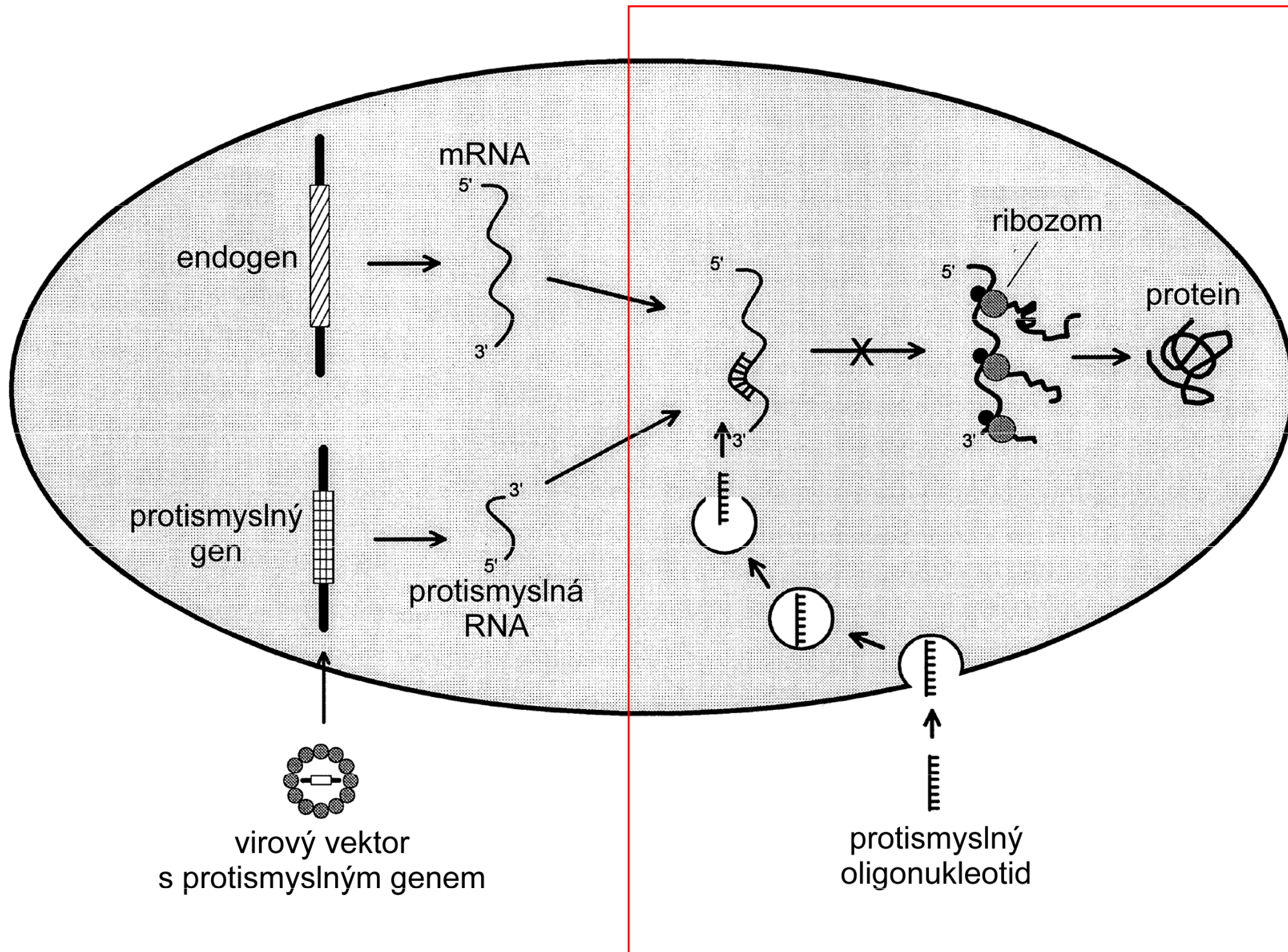




## Protismyslové oligonukleotidy

2 mechanismy účinků po vazbě oligonukleotidů na komplementární sekvenci mRNA:

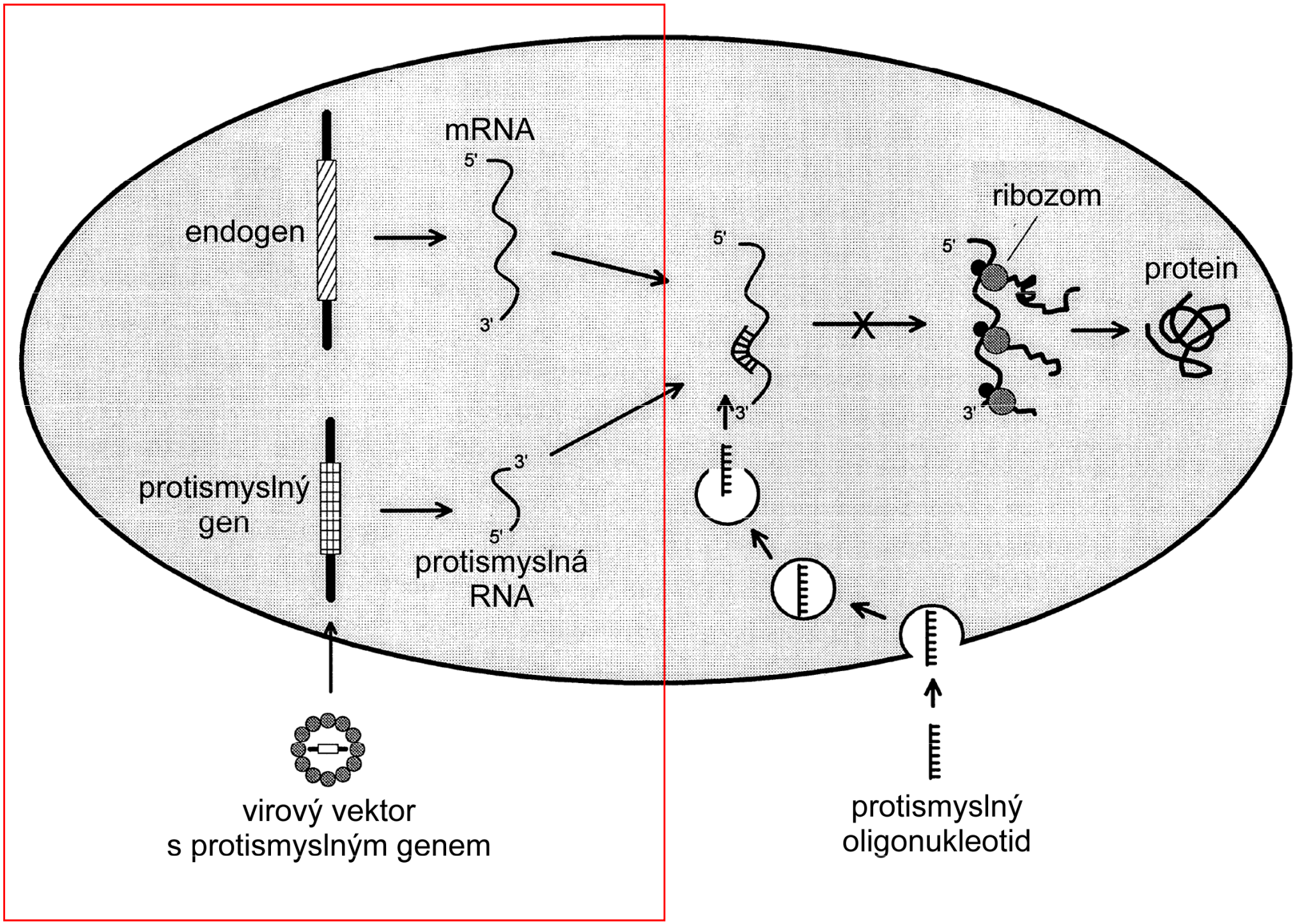
1. Vazba na mRNA spouští její degradaci RNázou H
2. Zablokování translace: duplexy blokují sestavení iniciačního komplexu translace  
- účinek je reverzibilní



## Protismyslová RNA

- přepis opačně orientovaných genů, které jsou do buňky přeneseny expresními vektory transfekcí
- protismyslová 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 RNAzymu pro obdobnou reakci s jinou kopií téže mRNA
- relativně nízké koncentrace RNAzymu postačují pro degradaci nadbytku mRNA v buňce
- u dlouhých substrátů je účinnost degradace nižší



# Ribozym - výhody a nevýhody

## Výhody ve srovnání s proteiny:

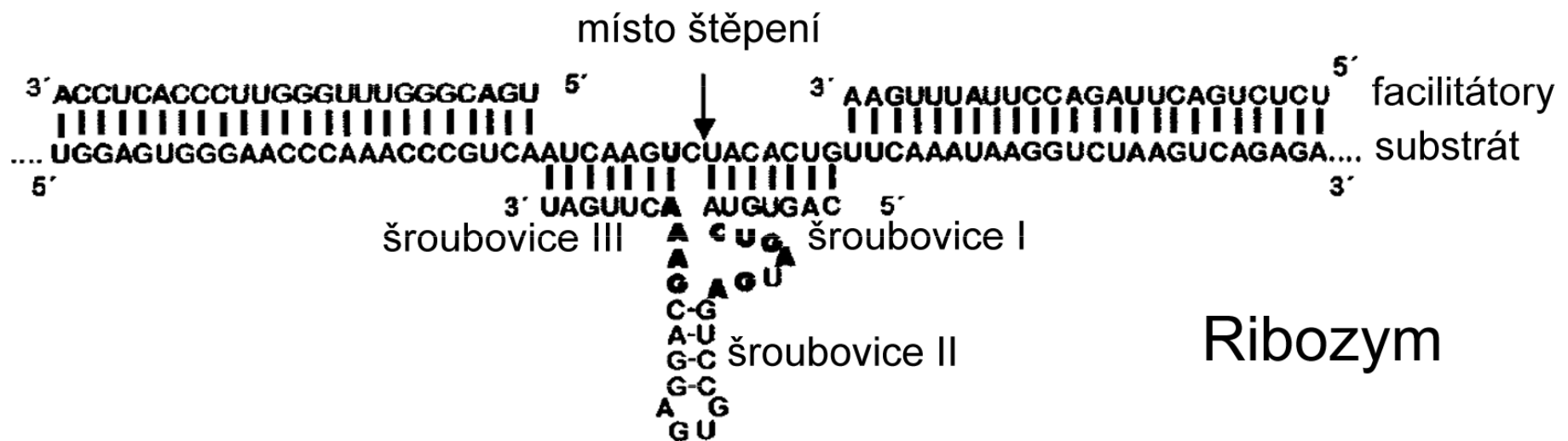
- nižší pravděpodobnost indukce imunitní reakce
- nižší velikost - snadnější přenos do buněk (obvykle prostřednictvím transformačních vektorů)

## 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 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

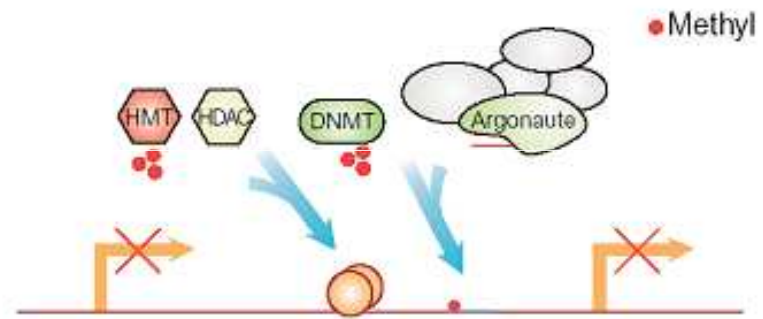
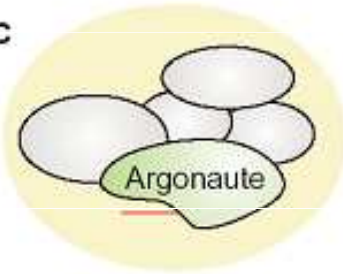
Double-stranded RNA



Small RNAs



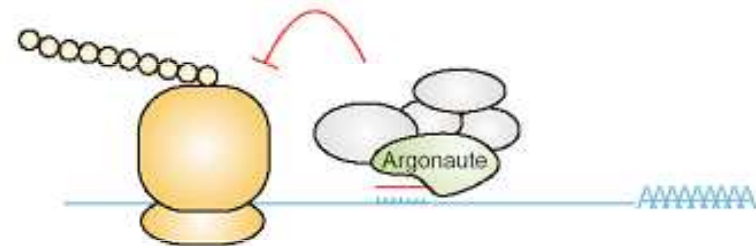
RISC



Transcriptional silencing



mRNA degradation

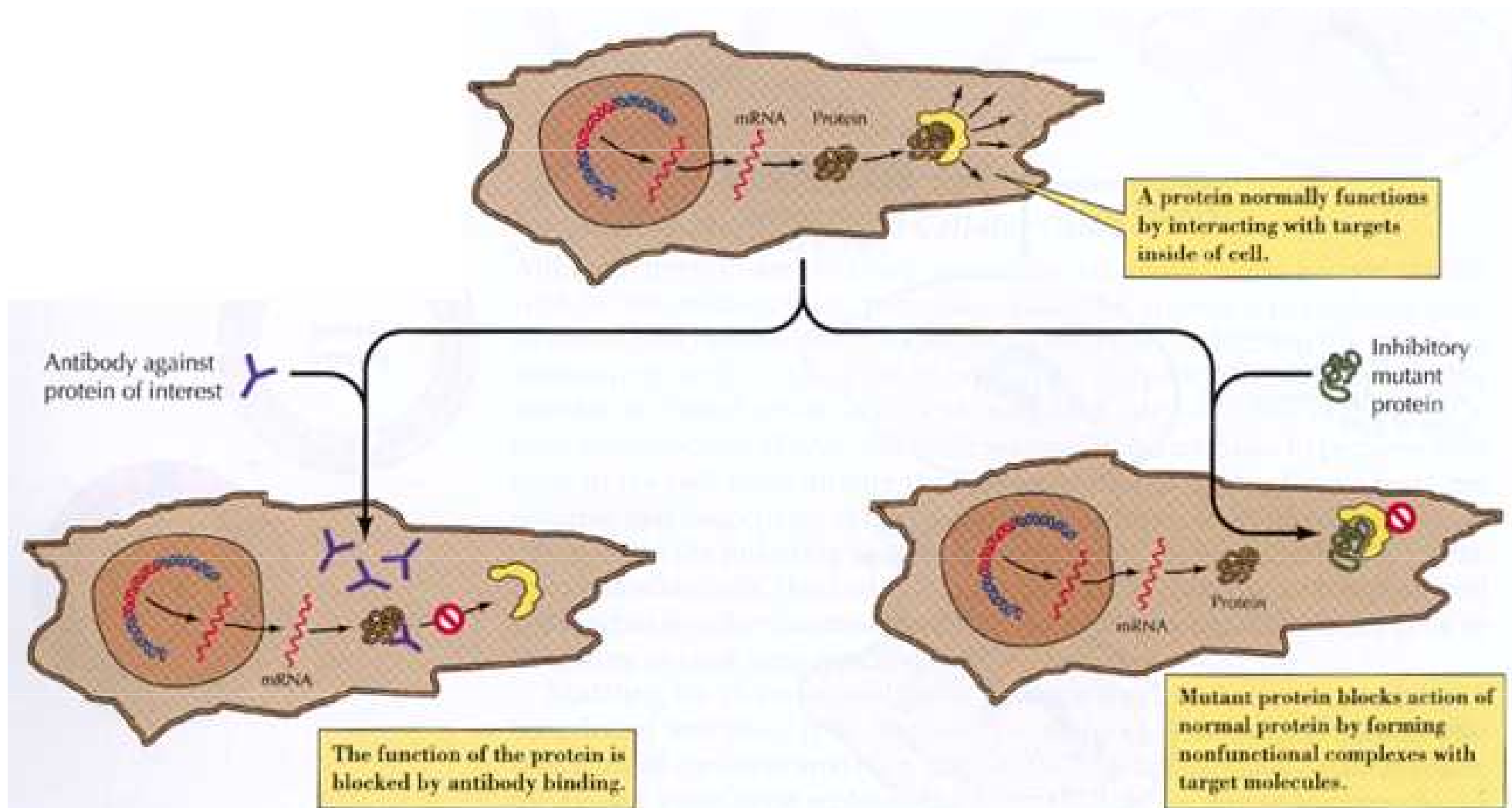


Block of mRNA translation



# 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 např. účinné inhibice tvorby funkčních dimerů nebo obsadit vazebná místa na DNA