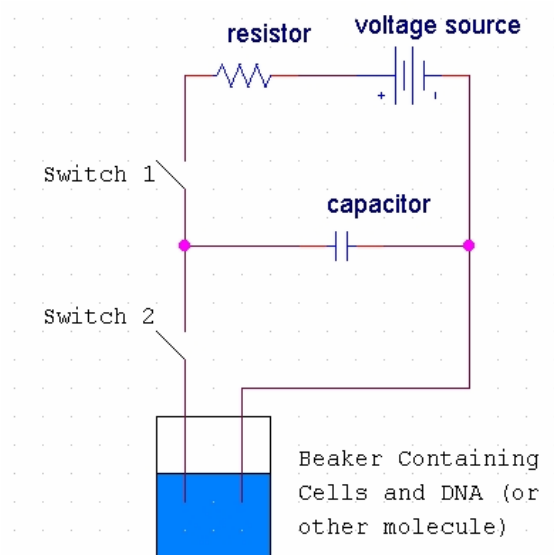


4. Přenos DNA a genetické modifikace živočišných buněk

Izolovanou DNA lze do eukaryotických buněk přenést transfekcí, což je obdoba bakteriální transformace. Existuje řada metod založených fyzikálních změnách struktury buněčných membrán, chemických interakcích na lipidové bázi nebo využití fagocytárních schopností některých buněčných typů, které lze pro transfekci použít.

Elektroporace

Elektroporace je fyzikální metoda, která umožňuje vnášet polární molekuly do cílových buněk přes buněčnou membránu. Během přenosu, jsou buňky vystaveny krátkému elektrickému pulsu, který naruší fosfolipidovou dvojvrstvu a umožní vstup nabitých molekul do buňky.



Obr. 41. Schéma elektroporátoru:

Po zapojení prvního spínače (1) dojde k nabití kondenzátoru, který se po zapojení spínače (2) vybíjí a generuje pulz vysokého napětí. Jeho hodnota se pohybuje mezi 10000-100000V/cm a trvá řádově mikrosekundy až milisekundy. Tento pulz naruší buněčnou membránu, vyvolá vznik pórů a změnu membránového potenciálu o hodnotu 0,5–1V, což umožní vnesení DNA ze suspenze do buňky na podobném principu, na jakém je založena elektroforéza.

→ <http://opbs.okstate.edu/%7Emelcher/MG/MGW4/MG431.html>.

Elektroporace buněk BM2

Postup:

1. Připravit 5×10^6 exponenciálně rostoucích buněk BM2, cfg 1500 rpm./5min.
2. Buněčný pelet rozsuspendovat v 400 μ l média obsahujícího DMSO (1,25%). Přidat transfekční DNA (10 μ g DNA, rozpuštěné v Tris-Cl pH 7,5, na 400 μ l média)
3. Transfekční směs převést do elektroporační kyvety a elektroporovat ($U=260V$, $C=1050\mu F$, $R=2340\Omega$, $T=2430\mu s$)
4. Po elektroporaci přidat 400 μ l média s DMSO a přenést buňky na 10ml misku
5. Inkubovat v 37°C/ON/10%CO₂
6. Druhý den buňky promýt a dále inkubovat nebo zpracovat

Nukleofekce

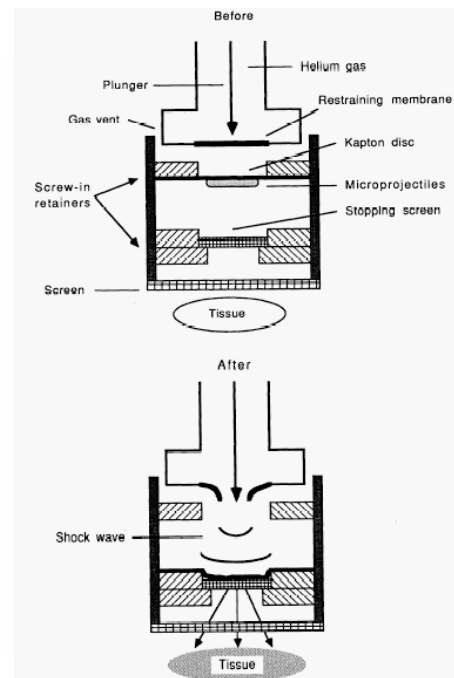
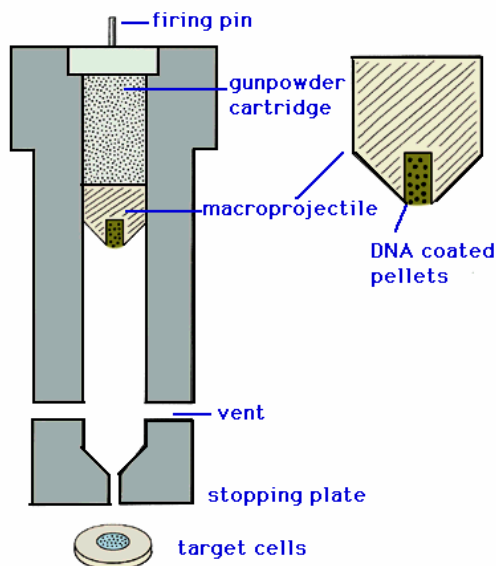
Představuje modifikaci klasické elektroporace, která vnáší cizorodou DNA přímo do buněčného jádra, což zvyšuje účinnost exprese exogenní DNA. Tato technologie vyžaduje elektroporátor/nukleofektor, což je opět zařízení generující specifický elektrický pulz v kombinaci s komerčními pufrů, jejichž složení bylo optimalizováno pro jednotlivé buněčné typy (→ Martinet W. et al. 2003. Biotechnology Letters 25: 1025–1029)



Obr. 42. Nukleofektor (Amaxa)

Gene gun

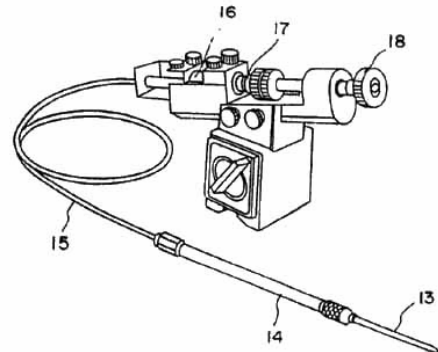
Gene gun byl popsán v roce 1987 jako mechanická metoda umožňující dopravit do buňky mikroprojektily obsahující DNA adsorbovanou na kovové (zlaté nebo wolframové) částice. Metoda je využívána zejména pro přípravu transgenních rostlin.



Obr. 43. Princip metody *gene-gun*.

Mikroinjekce

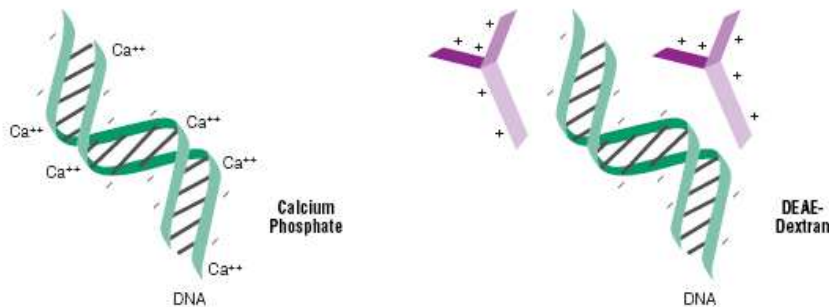
Roztok DNA je dopraven přímo do buněk pomocí mikromanipulátoru. Metoda je využívána jak pro přípravu transgenních buněk, zejména oocytů (a následně i celých transgenních organismů), tak i pro klonování metodou nukleotransferu.



Obr. 44. Mikroinjekce oocytu.

Precipitace krystalů fosforečnanu vápenatého

Patří mezi rozšířené metody díky své nenáročnosti i přijatelným cenám jednotlivých komponent. Nejprve se vytvoří ko-precipitát vnášené DNA a fosforečnanu vápenatého pomocí DNA, chloridu vápenatého a fosforečnanového pufru, následně se přidá suspenze krystalů k buňkám, které je pohlcují endocytózou nebo fagocytózou. Nevýhodou je možnost degradace DNA ve vzniklém endozomu. Obdobným způsobem je DNA pohlcována při použití DEAE dextranu, který tvoří s DNA pozitivně nabitě komplexy.



Obr. 45. Tvorba komplexů DNA s Ca₃(PO₄)₂ nebo DEAE.

→ www.promega.com

Transfekce buněk QT6

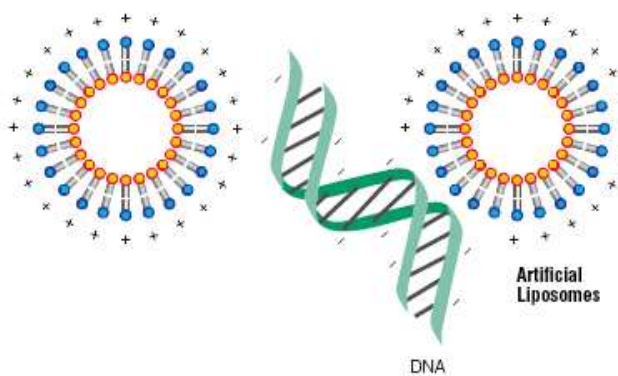
Postup:

1. Den před transfekcí pasážovat buňky QT6 z konfluentní kultury na 5 ml misku v poměru 1:10. Inkubovat přes noc v 37°C/10% CO₂. Další den vyměnit médium.
2. Připravit transfekční směs obsahující max. 2μg DNA, 25μl 2,5M CaCl₂ a vodu do celkového objemu 250μl. Přidat 250μl roztoku 2×BES (50mM BES pH 6,95, 250mM NaCl, 1,5mM Na₂PO₄) a inkubovat 15 min/RT
3. Přikapat transfekční směs k buňkám a inkubovat přes noc/37°C/3% CO₂
4. Odstranit precipitát dvojitým promytím buněk, přidat 5ml média a inkubovat přes noc v 10% CO₂

Lipofekce

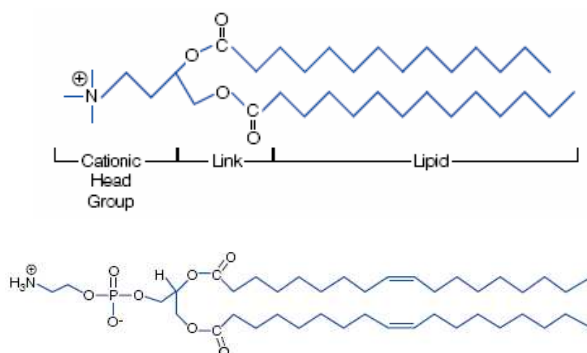
Metody založené na tvorbě umělých liposomů jako nosičů DNA nebo RNA mají řadu výhod – jsou schopné přenášet různě velké molekuly DNA – od krátkých oligonukleotidů po velké umělé kvasinkové chromosomy (YACs) nebo proteiny, mají relativně vysokou účinnost u různých buněčných typů a umožňují tvorbu stabilních transfektantů. Jsou také použitelné pro modifikace buněk *in vivo* a jsou tedy potenciálním nástrojem genové terapie.

Pro tvorbu liposomů se využívají lipidy nesoucí za fyziologického pH pozitivní náboj spolu s neutrálními lipidy (obvykle L-dioleoyl fosfatidyletanolamin – DOPE). Lipid nesoucí kationickou skupinu asociuje s negativně nabitou DNA za tvorby liposomálního komplexu, který interaguje s buněčnou membránou. Liposomy jsou obvykle endocytovány. Neutrální lipidy (DOPE) jsou tzv. fúzogenní a zajišťují fúzi liposomu s endosomem a uvolnění DNA z lipidového komplexu



Obr. 46. Tvorba liposomu.

→ www.promege.com



Obr. 47. Struktura obecného syntetického lipidu s pozitivně nabitou skupinou

Struktura DOPE

→ www.promege.com

Lipofekce buněk BM2 – stabilní transfekce

Postup:

1. Připravit 5×10^6 exponenciálně rostoucích buněk BM2, cfg 1500 rpm./5min.
2. Promýt médiem OPTI-MEM, rozsuspendovat pelet v 1,5ml OPTI-MEM. obsahujícího 30 μ l lipofekčního činidla (např. Lipofectamin).
3. Přenést směs buněk na 5ml obsahujícího 1,5ml OPTI.-MEM s max. 15 μ g transfekční DNA.(vektor obsahující cDNA studovaného genu + vektor nesoucí rezistenci k G418)
4. Inkubovat 1 hod/37°C/10% CO₂.
5. Zastavit reakci přidáním 3 ml média DMEM obsahujícího sérum (FCS/CHS) do výsledné koncentrace 10%.
6. Třetí den kultivace přidat selekční činidlo – antibiotikum G418.
7. Rezistentní buňky se objeví během asi dvou týdnů selekce.

Infekce/transdukce

Do řadu buněk různých typů lze DNA úspěšně přenést i pomocí metod, založených na infekci buněk některými viry. Ideální vektor splňuje následující předpoklady:

- Snadné získání vysokého titru (koncentrace) $>10^8$ částic/ml
- Jednoduchá a bezpečná manipulace
- Přesné a stabilní začlenění transgenu do virového genomu
- Funkční regulační oblasti transgenu
- Buněčná specifita
- Nevývolává imunitní odpověď příjemce

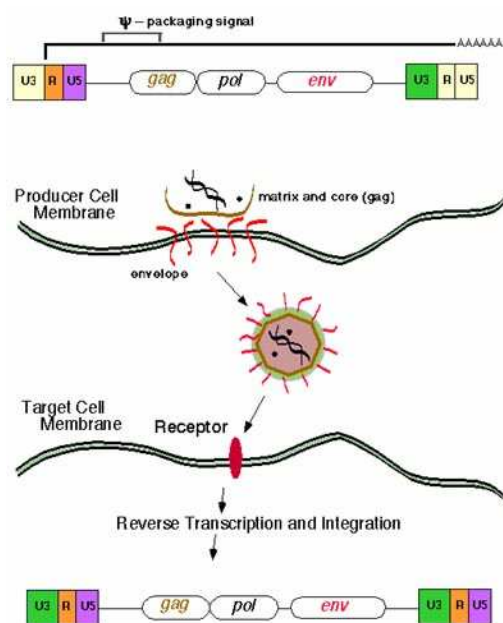
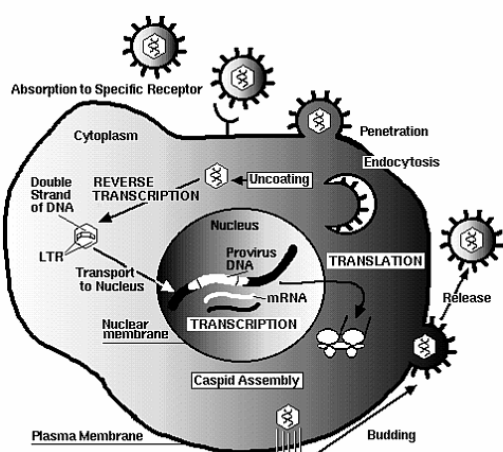
Stručný přehled virových vektorů

Retroviry

Retroviry jsou charakteristické reverzní transkripcí virionové RNA a možností začlenění vzniklé dsDNA do genomu hostitele. Vektory založené na retrovirech jsou spolehlivé a efektivní a využitelné i pro přenos DNA *in vivo*. Nevýhodou jejich použití je to, že DNA nesená většinou retrovirů (onkoretroviry) se začleňuje do genomu na náhodná místa a navíc pouze v okamžiku buněčného dělení, tedy když není vytvořena jaderná membrána. Druhou nevýhodu odstraňuje využití vektorů, založených na skupině retrovirů – lentivirech, které aktivně pronikají jadernými póry a nejsou závislé na buněčném cyklu hostitelské buňky. Příkladem lentiviru je např. lidský HIV, kočičí FIV nebo opičí SIV, způsobující těžké imunodeficiencie.

Kategorizace retrovirů:

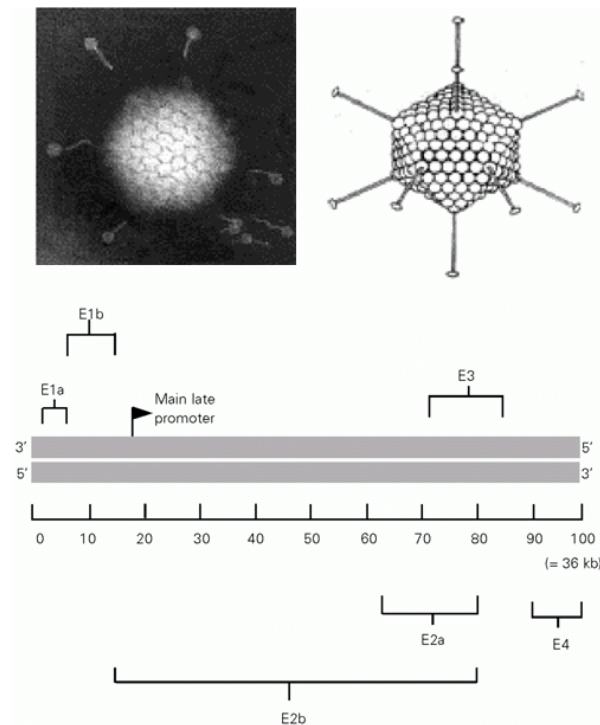
Retrovirus	Rod	Příklad
Jednoduché	1. Avian sarcoma and leukemia 2. Mammalian B-type 3. Murine leukemia 5. D-type	Rous sarcoma virus (RSV) Mouse mammary tumor virus (MMTV) Moloney murine leukemia virus (Mo-MLV) Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV)
Komplexní	4. Human T-cell leukemia Bovine leukemia 6. Lentivirus 7. Spumavirus	Human T-cell leukemia virus (HTLV) Bovine leukemia virus (BLV) HIV Human foamy virus (HFV)



Obr. 48. Životní cyklus obecného retroviru a struktura jeho genomu.

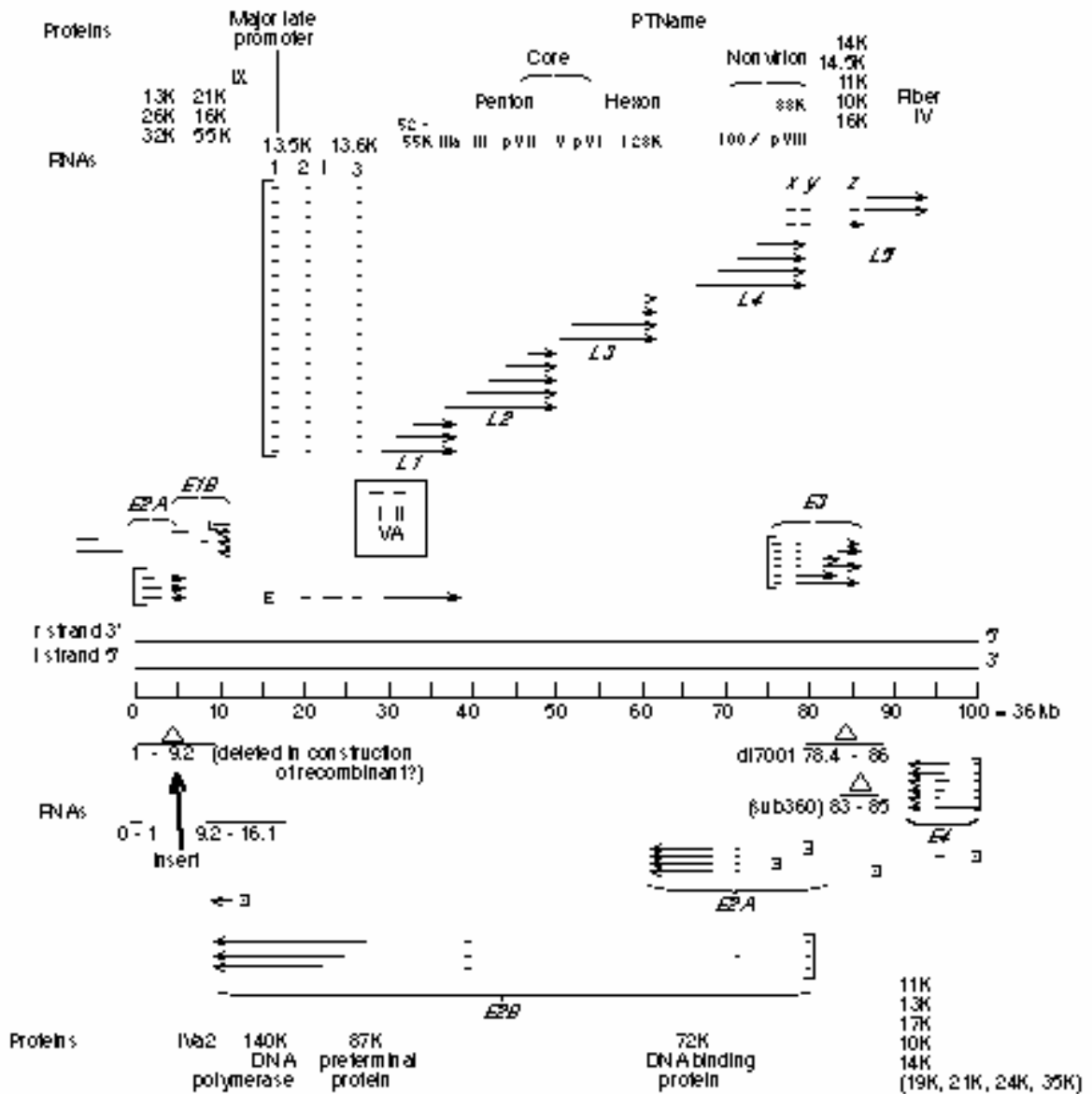
Adenoviry

Adenoviry na rozdíl od většiny retrovirů jsou schopné infikovat i klidové, nedělící se buňky. Virion se na povrchu buňky váže na receptor podobný integrinům a v komplexu s ním je transportován do nitra buňky a posléze jadernými póry i do jádra. Adenovirová DNA se většinou nezačleňuje do genomu hostitelské buňky a zůstává v tzv. epizomálním stavu. Nevýhodou při použití *in vivo* je silná imunitní reakce příjemce



Obr. 49. Struktura adenoviru a jeho genomu.

→ Dani S.U. 1999. The challenge of vector development in gene therapy. *Braz J Med Biol Res* 32(2): 133-45.

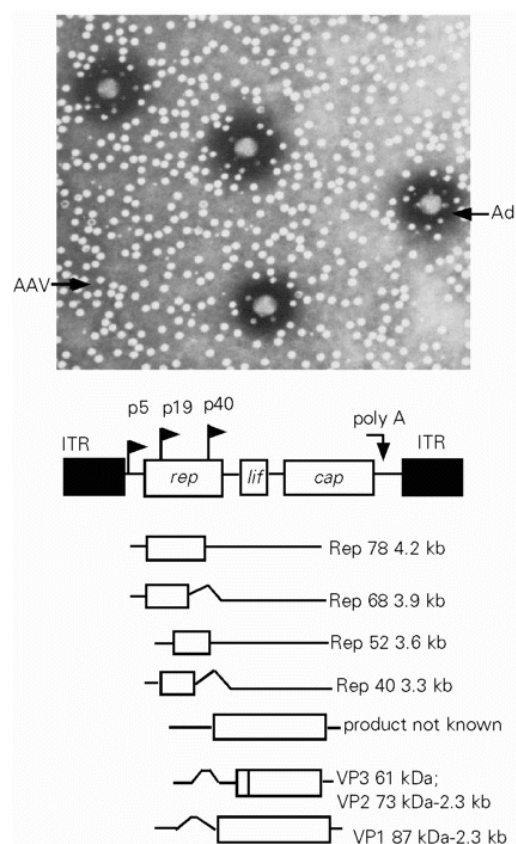


Obr. 50. Struktura adenovirového genomu a jeho transkripce.

→ Watson et al. 2003. Molecular Biology of the Gene. Addison Wesley, ISBN: 0321248643.

Adeno-asociované viry (AAV)

AAV jsou malá skupina virů (parvoviry), které v normálním životním cyklu vyžadují současnou infekci tzv. helper virem, obvykle herpesvirem nebo adenovirem. Pokud ke koinfekci nedojde, začleňuje se AAV do genomu hostitelské buňky, obvykle do velmi specifického místa – v případě lidského AAVS1 do 19q13.3-qter. Následná infekce adenovirem nebo herpesvirem může spící parvovirus aktivovat a umožnit produkci jeho virionů. AAV vektory lze účinně přenést do dělících se i klidových buněk, včetně mozkových, svalových nebo krevních CD34+ buněk.



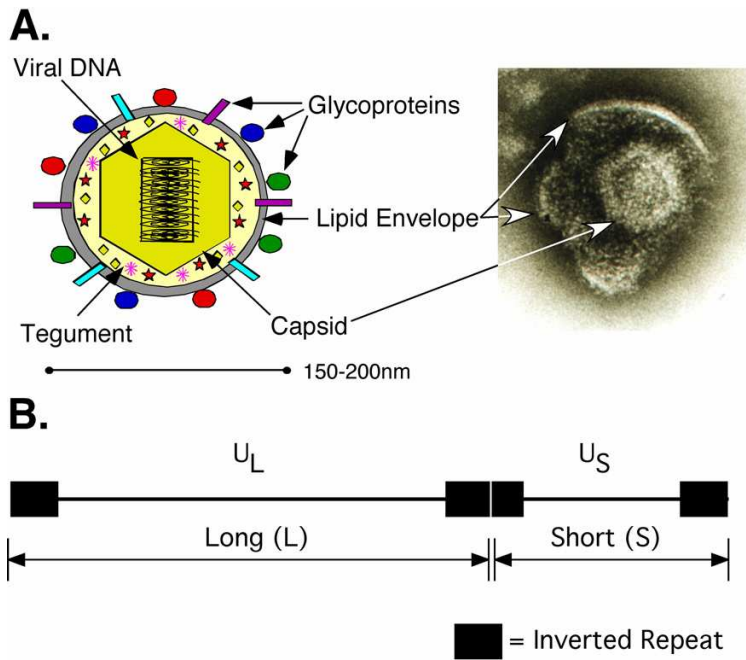
Obr. 51. Struktura AAV a jeho genomu.

→ Dani S.U. 1999. The challenge of vector development in gene therapy. Braz J Med Biol Res 32(2): 133-45.

Ostatní virové vektory

Herpesviry

HSV-1 způsobuje dlouhodobé latentní infekce senzoryckých neuronů a produktivní infekce epitelálních buněk. Schopnost herpesvirů přetrvávat v neuronech bez jejich výraznějšího poškození dělá z této skupiny virů atraktivní kandidáty pro genetické modifikace nervových buněk. Navíc mají kapacitu pro začlenění velkých úseků cizorodé DNA a manipulace s nimi je poměrně jednoduchá.

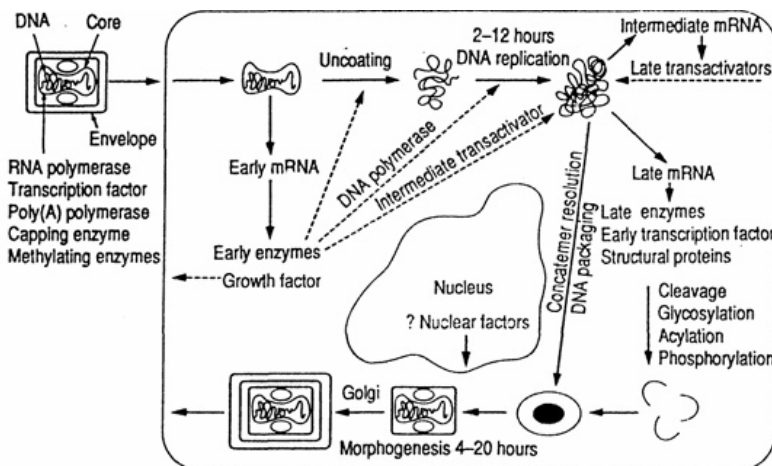


Obr. 52. Struktura HSV-1 a jeho genomu.

→ Taylor T. J. et al. 2002. Herpes simplex virus. *Frontiers in Bioscience* 7: d752-764.

Virus vakcinie (neštovic)

Charakteristickým znakem těchto virů (rod Orthopoxvirus) je schopnost replikace v cytoplasmě hostitelské buňky. Virus vakcinie je často využívaným expresním systémem v savčích buňkách – mezi jeho výhody patří např. snadnou manipulaci s virovými kulturami, nezávislost na replikačním aparátu hostitelské buňky a účinná exprese nezávislá na transportu a úpravě RNA.



Obr. 53. Životní cyklus viru vakcinie.

→ Moss B. 1991. Vaccinia Virus: A Tool for Research and Vaccine Development. *Science* 252: 1662-67.

Chimérické vektory

Protože žádný ze zmíněných virových vektorů není ideální, jsou snahy o vytvoření hybridního systému, který ponese pouze žádané znaky. Příkladem může být adeno-retrovirový chimérický systém, složený ze dvou funkčních komponent AD-Rcis a AD-Rtrans. AD-Rtrans je adenovirový vektor, kódující retrovirové funkce zodpovědné za tvorbu virionů (Gag-Pol-Env) začleněné do E1 oblasti adenovirového genomu. AD-Rcis je také adenovirový vektor nesoucí cis-regulační sekvence (LTR atd.) a transgenní expresní kazetu. Cílové buňky transfekované oběma vektory přechodně produkují retrovirové vektory, které infikují sousední buňky a indukují začlenění transgenů do genomu hostitelských buněk. Tyto vektory jsou výhodné i pro použití *in-vivo*.

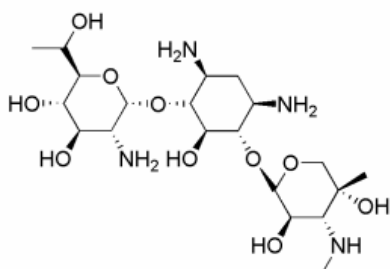
Shrnutí vybraných transfekčních metod

Metoda	Výhoda	Nevýhoda
Elektroporace	<ul style="list-style-type: none">• Univerzální metoda pro modifikaci většiny buněčných typů• Relativně vysoká účinnost• Malá nutná množství vnášené DNA• Použitelná i <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none">• Může dojít k poškození buněk a snížení viability• Může dojít k nespecifickému přenosu díky samotné podstatě elektropermeability
Nukleofekce	<ul style="list-style-type: none">• Vysoká účinnost i obtížně transfekovatelných buněčných linií nebo primárních buněk• Jednoduchá metoda• Rychlá exprese vnášených genů	<ul style="list-style-type: none">• Vysoká cena přístroje i komerčních kitů
Precipitace Ca ₂ (PO ₄) ₃	<ul style="list-style-type: none">• Levná a u některých buněčných typů spolehlivá metoda	<ul style="list-style-type: none">• Většinou nízká účinnost• Nepoužitelná <i>in-vivo</i>
DEAE dextran	<ul style="list-style-type: none">• Levná a u některých buněčných typů spolehlivá metoda	<ul style="list-style-type: none">• Nevhodná pro tvorbu stabilních transfektantů, omezená možnost integrace DNA do chromozomu• Většinou nízká účinnost• Nepoužitelná <i>in-vivo</i>
Lipofekce	<ul style="list-style-type: none">• Vysoká účinnost• Umožňuje transfekci většiny buněčných typů i <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none">• V některých případech jsou lipofekční směsi pro tkáňové kultury toxické
Mikroinjekce	<ul style="list-style-type: none">• Vysoká účinnost	<ul style="list-style-type: none">• Vysoká cena vybavení, kvalifikovaný personál

Selekční markery

G418

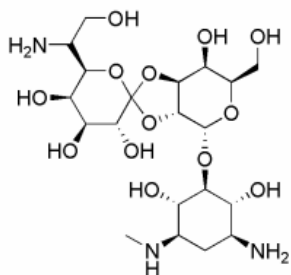
Antibiotikum G418 je nejčastěji využívaným selekčním činidlem pro eukaryotické buňky. Jedná se o aminoglykosilové antibiotikum podobné např. kanamycinu, neomycinu nebo gentamycinu, které zasahuje do průběhu translace a blokuje proteosyntézu. Jeho účinek ruší bakteriální enzym fosfotransferáza.



Obr. 54. Struktura G418.

Hygromycin B

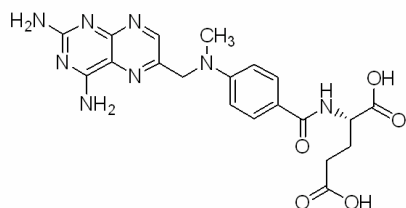
Antibiotikum blokující proteosyntézu prokaryotických i eukaryotických buněk. Jeho účinek také ruší bakteriální fosfotransferáza.



Obr. 55. Struktura Hygromycinu B.

Metotrexát

Chemická látka (dihydrofolát) inhibující enzym dihydrofolátreduktázu (DHFR), enzym nutný pro syntézu purinů.

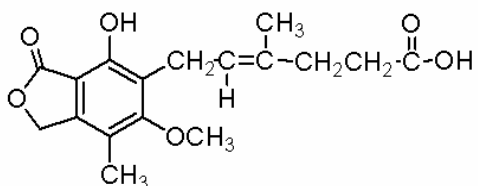


Obr. 56. Struktura metotrexátu .

Kyselina mykofenolová

Inhibuje enzym inosinátdehydrogenázu, katalyzující přeměnu inosinmonofosfátu (IMP) na xantinmonofosfát (XMP) a narušuje tak syntézu guanosinmonofosátu (GMP). Pokud je současně s aplikací kyseliny mykofenolové a xantinu exprimován bakteriální gen pro xantin-guanosin fosforibosyltransferázu, je možné tento blok obejít. Účinnost selekce lze zvýšit přidáním aminopterinu, který blokuje endogenní dráhu syntézy purinů.

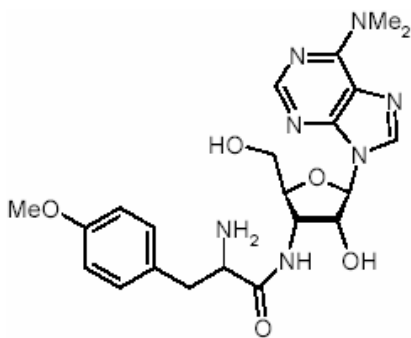
Obr. 57. Struktura mykofenolové kyseliny.



Puromycin/stylomycin

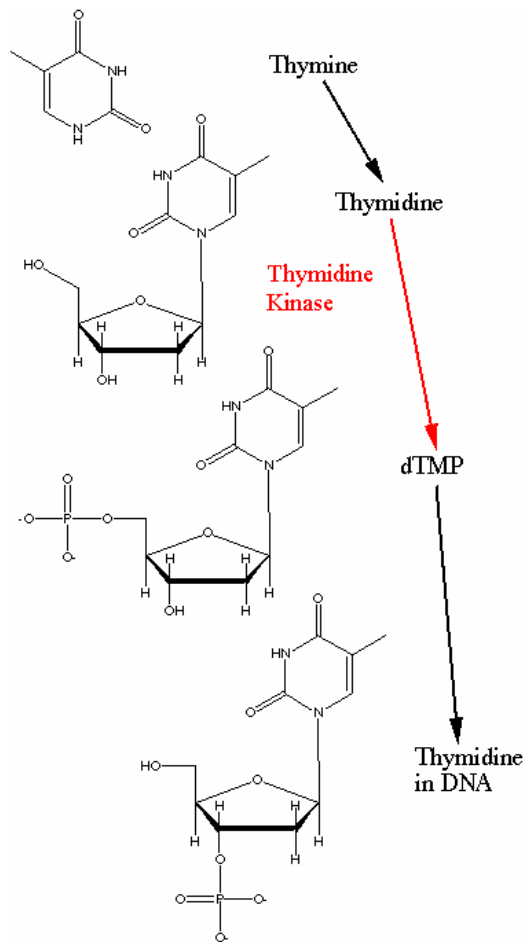
Analog aminoacyl RNA blokující proteosyntézu. Rezistence k puromycinu lze dosáhnout jeho acetylací (enzym puromycin – N-acetyl transferáza)

Obr. 58. Struktura puromycinu.



Tymidin kináza (TK)

Enzym TK katalyzuje alternativní přeměnu dTMP z tymidinu. Pokud je normální přeměna dTMP z dCMP blokována např. aminopterinu, jsou buňky závislé na expresi právě TK. Buňky deficientní pro TK mohou růst na médiu obsahujícím aminopterinu pouze tehdy, byl-li jim dodána cizorodý gen kódující TK.



Obr. 59. Funkce tymidin kinázy v syntéze dTMP.

Promotory v expresních systémech

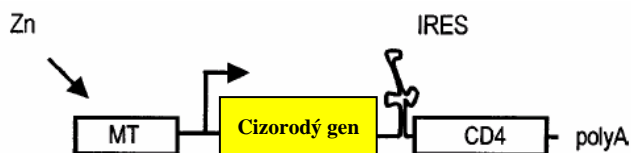
Inducibilní promotory

Umožňují řízenou expresi transgenu, obvykle v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti látky, která je schopná s daným promotorem interagovat. Tyto látky musí splňovat některé následující parametry:

- Absence pozadí - neměly by být přítomné v buňkách nebo organismu
- Nízká toxicita
- Specifita – měly by zasahovat do exprese pouze žádaného genu/promotoru
- Snadné odstranění – např. z živného média
- Lineární závislost mezi rychlostí transkripce z daného promotoru a množstvím induktoru

Příkladem mohou být promotory regulované alkoholem (alkohol-dehydrogenáza I), tetracyklinem, steroidy nebo těžkými kovy.

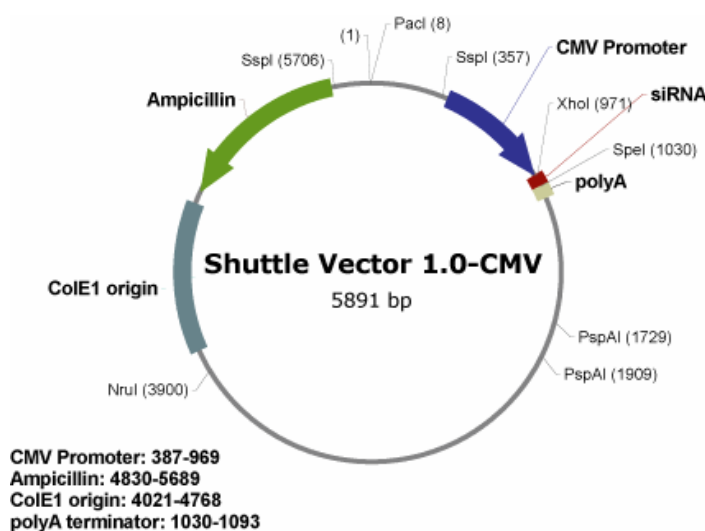
Obr. 60. Struktura tzv. **pMT promotoru**, využívaného v Laboratoři buněčné diference.



Ionty těžkých kovů, např. zinku, aktivují expresi vneseného genu (žlutě) z lidského metalothioneinového promotoru IIA. Současně s tímto genem je transkribován i gen kódující povrchový antigen CD4, který usnadňuje selekci buněk. Sekvence IRES včleněná mezi tyto geny zajišťuje jejich nezávislou translaci.

→ Smarda J., Lipsick J. S. 1993. Dicistronic selection for nuclear proteins in living animal cells. *Gene*. 137(1):145-9.

Mezi *konstitutivně* aktivní promotory patří např. CMV (cytomegalovirový). Zajišťuje stabilní expresi v nejrůznějších buněčných liniích nebo tkáních. Je často využíván např. pro expresi sekvencí siRNA nebo cizorodých genů.



Obr. 61. Vektor (Ambion) využívající CMV promotor pro expresi sekvence siRNA.

→ <http://www.ambion.com>