

Экспрессия генов в клетках млекопитающих

лекция 1

1. **Транзитная (временная) экспрессия**
2. **Стабильные клеточные линии**
3. **Системы, основанные на гомологичной рекомбинации** (gene targeting, knock-out)

Методы введения генов в клетки:

1. Трансфекция
2. Инфекция (вирусные векторы)

Методы трансфекции:

I. Химическая трансфекция:

ДНК в составе положительно заряженного комплекса, который взаимодействует с отрицательно заряженной клеточной мембраной и промотирует эндоцитоз (Са-фосфатный метод; DEAE-декстран; полиэтиленимин);

ДНК в составе липосом, которые сливаются с клеточной мембраной (липофектин, липофектамин, унифектин);

II. Физическая трансфекция:

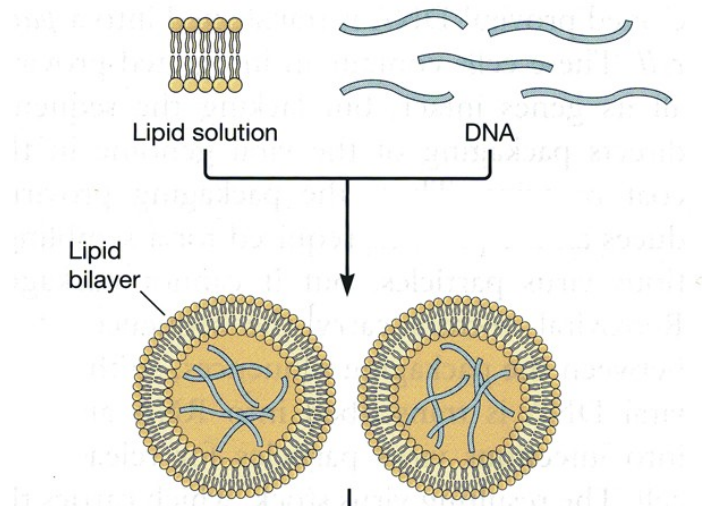
Электропорация;

Ультразвук;

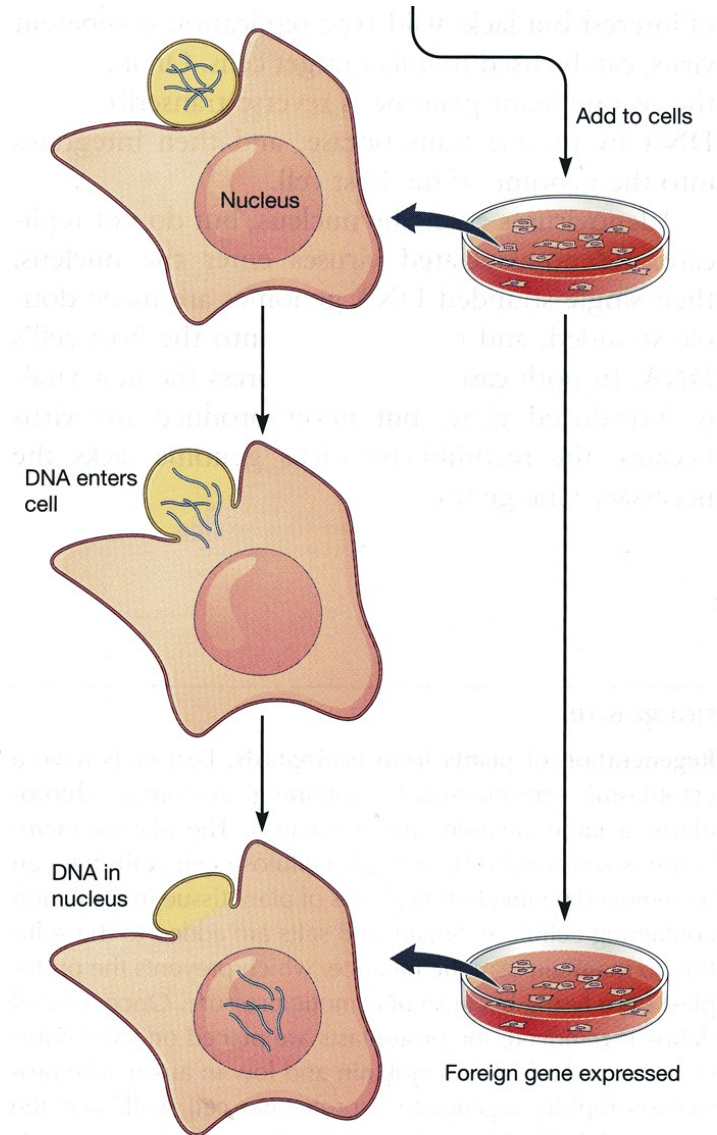
Бомбардировка ДНК-содержащими металлическими частицами;

Микроинъекции ДНК в ядро.

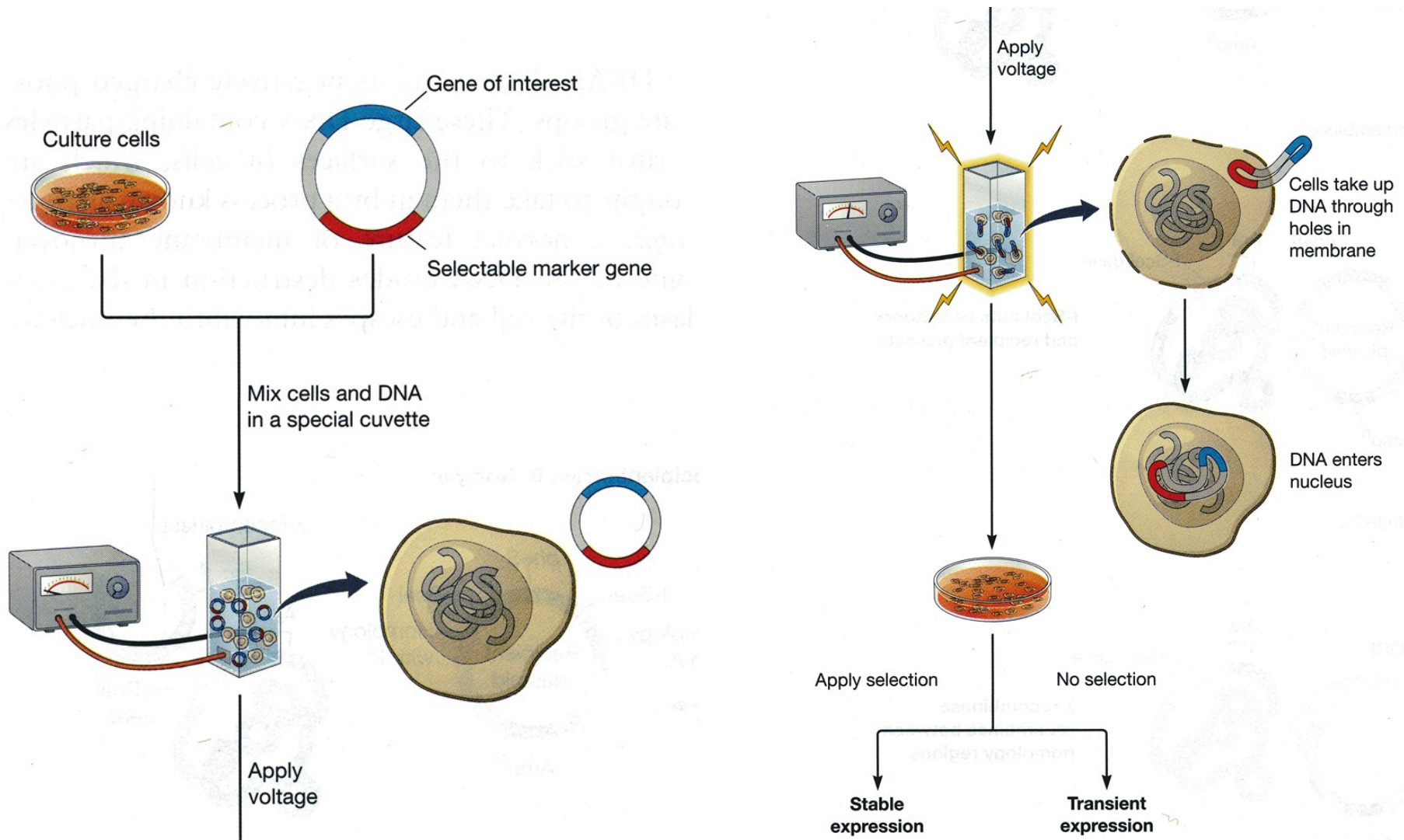
Трансфекция с помощью липосом



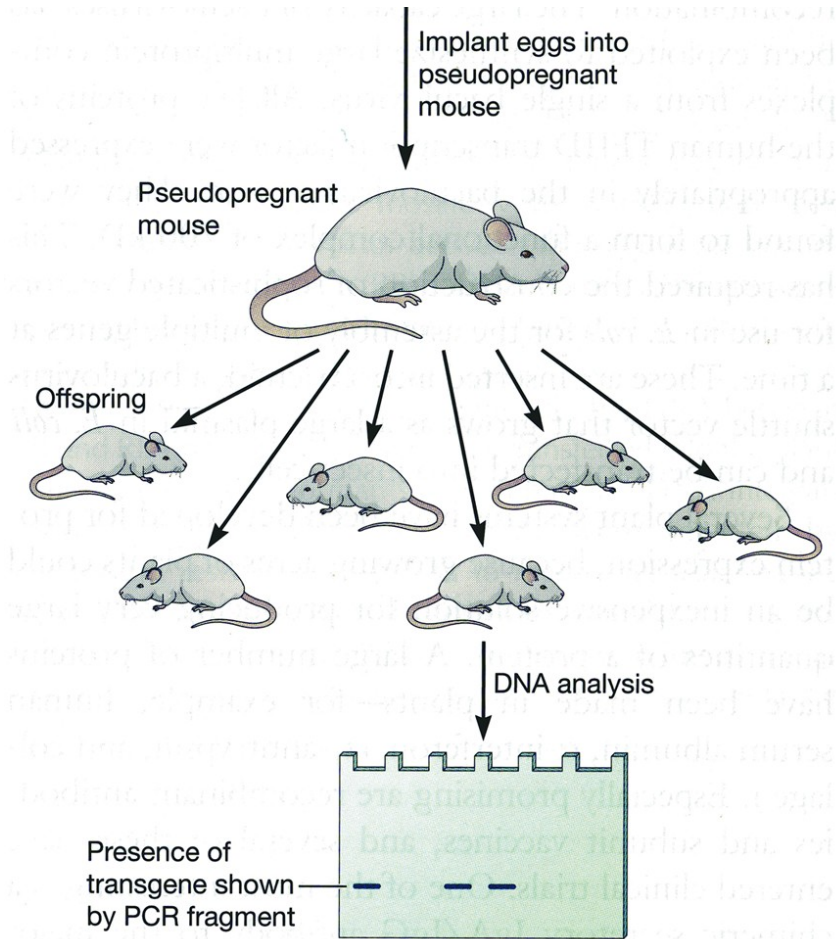
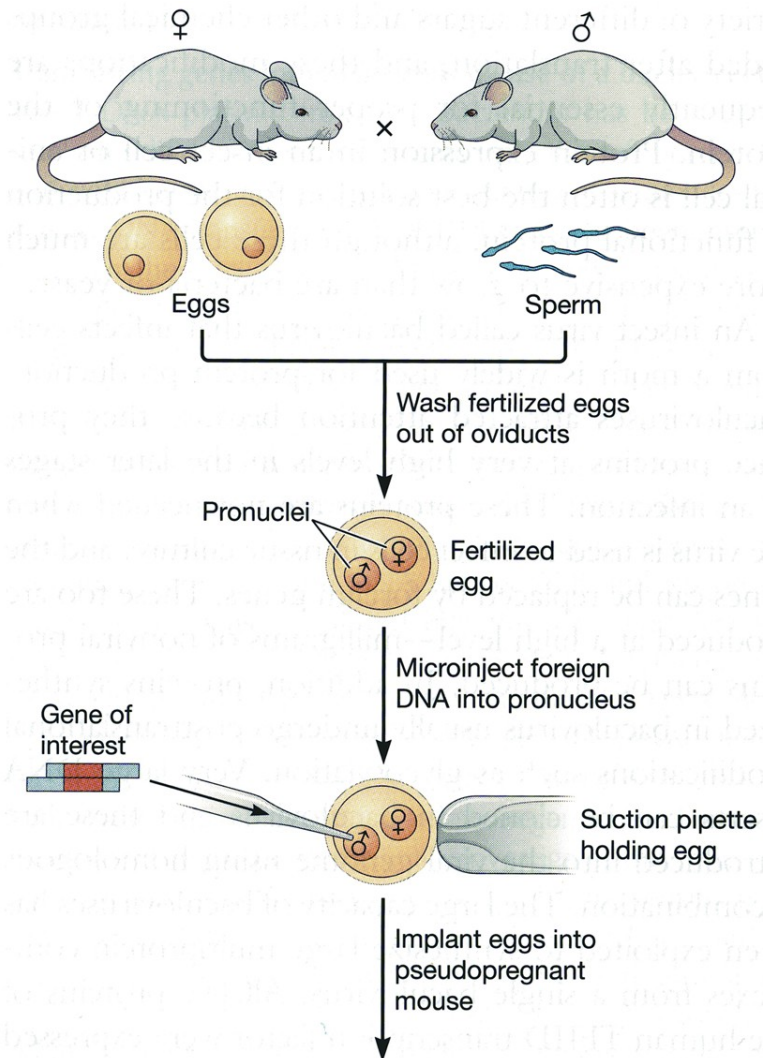
- Отрицательно заряженная ДНК и положительно заряженные липидные молекулы образуют липосомы.
- Липосомы сливаются с клеточной мембраной, часть ДНК попадает в ядро.



Электroporation



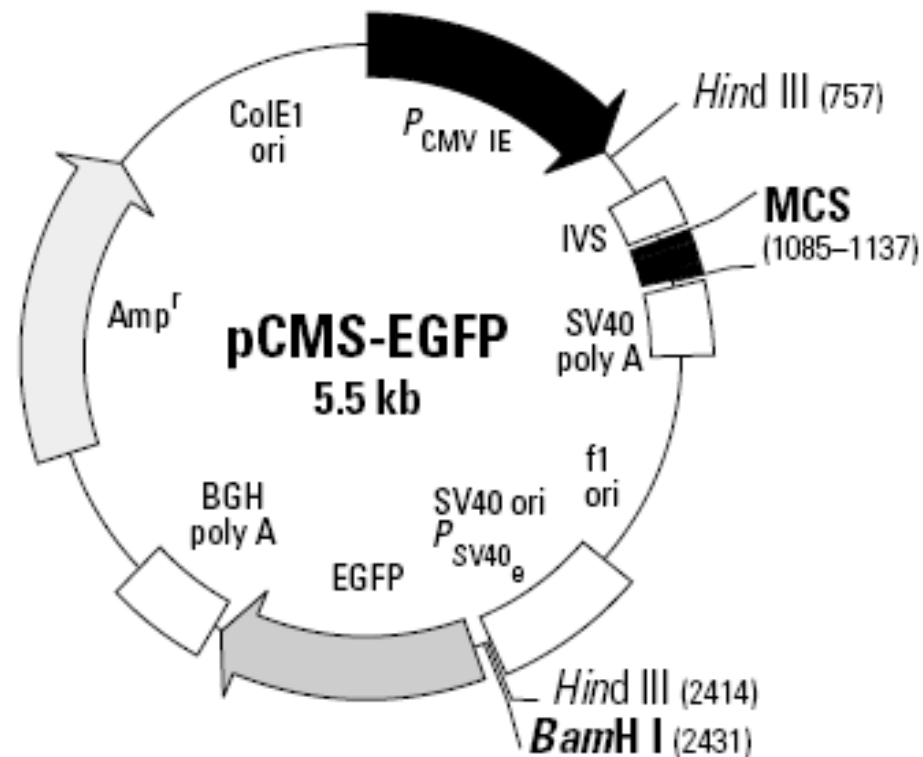
Инъекция ДНК в ядро



Транзитная (временная) экспрессия

- 1. Нет необходимости в *ori*, селективном маркере;
- 2. Высокая копияность;
- 3. Использование репортерных генов.

- **Промоторы:**
- SV40 early < RSV < CMV;
-
- **Терминаторы:**
- SV40 poly A, BGH poly A;
-
- **Полилинкер:** MCS;
-
- **(Интрон: IVS)**
-

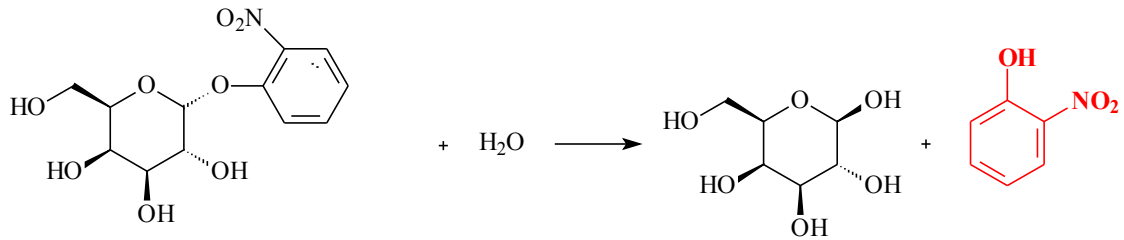


Репортерные гены

1. *lacZ* - β -галактозидаза

хромогенные субстраты: X-GAL (5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид)

ONPG (о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид)



2. *GUS* - β -глюконидаза

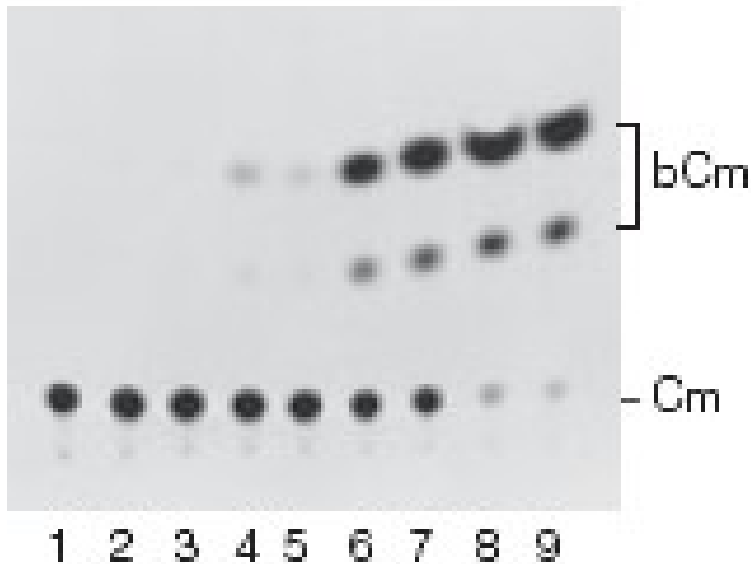
3. *CAT* - хлорамфеникол ацетил трансфераза

4. *Luc* - люцифераза

5. *GFP* – зеленый флуоресцирующий белок

CAT – хлорамфеникол ацетил трансфераза

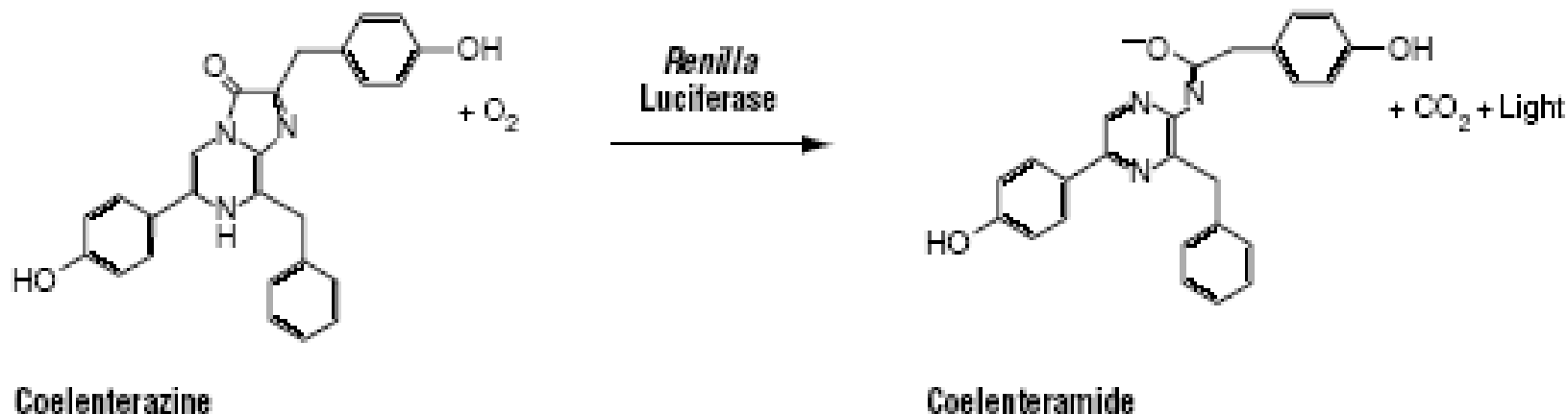
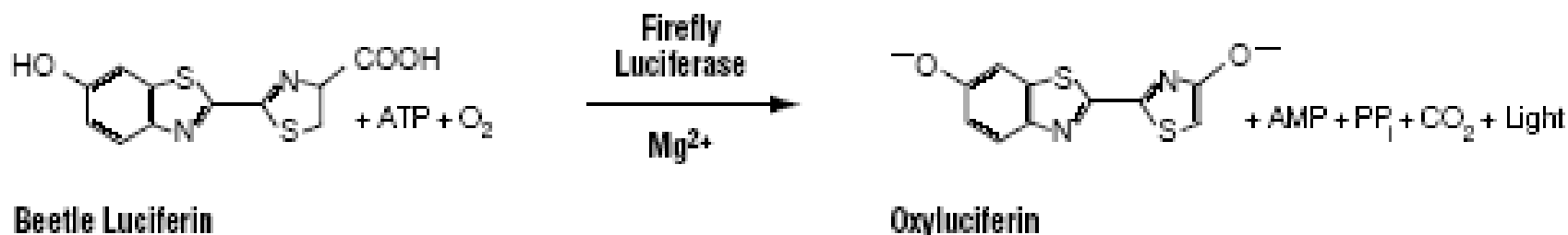
Panel B



- **CAT** – продукт бактериального гена, инактивирует хлорамфеникол путем переноса на него ацетильной группы с ацетил-коэнзима А.
- Ген CAT отсутствует у эукариот, поэтому нет фоновой активности.
- **Методы детекции:**
 - Измерение радиоактивности продуктов реакции меченого ^{14}C или ^3H хлорамфеникола с ацетил-CoA (или n-Butyryl CoA).
 - Тонкослойная хроматография (TLC).

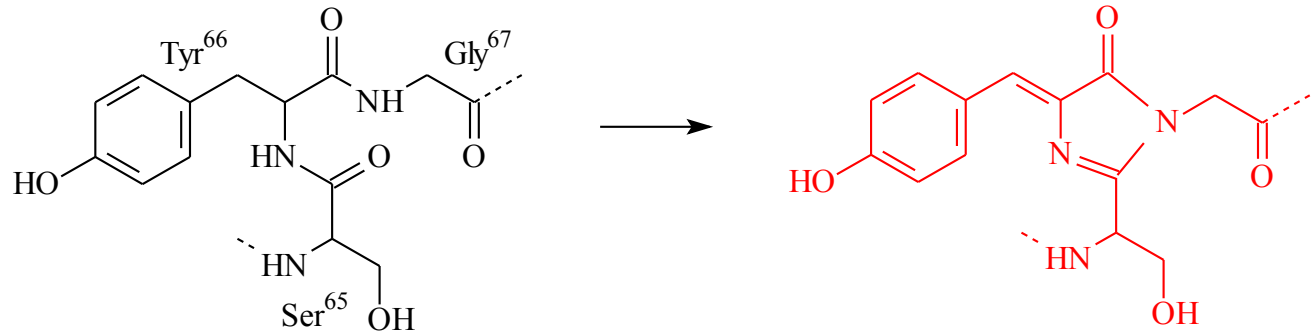
Luc - люцифераза

- 1. Люцифераза светлячков (firefly) - субстрат **люциферин**, необходимы также кислород, АТФ и ионы магния.
- В ходе реакции окисления люциферина испускается квант света характерной длины волны.
- 2. Люцифераза (renilla) – ее активность может быть измерена независимо в том же образце.

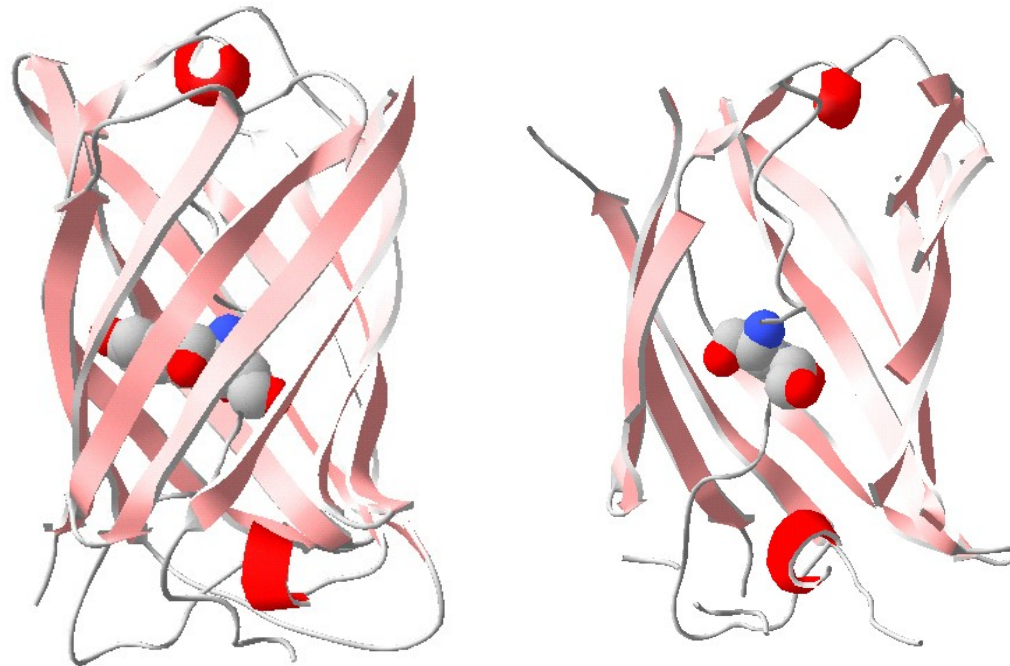


Репортерный ген GFP

Хромофор GFP состоит из циклизованного трипептида Ser-Tyr-Gly (ак 65–67) и флуоресцирует только в составе нативного белка.



Третичная структура GFP и срез белка: в центре молекулы расположен хромофор.

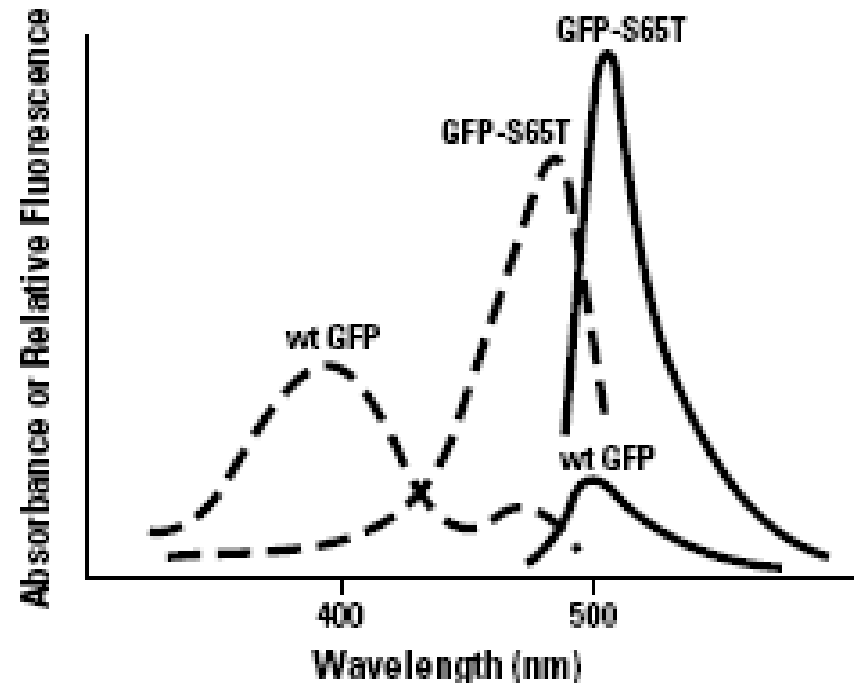


Репортерные гены на основе GFP

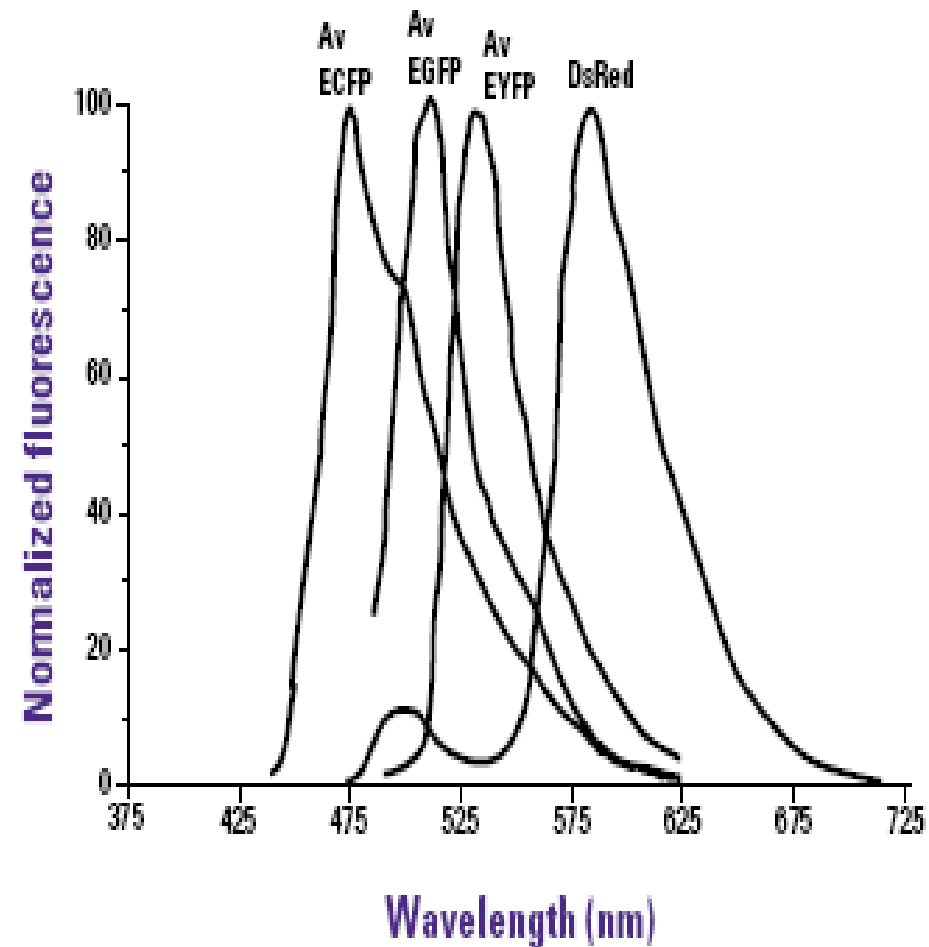
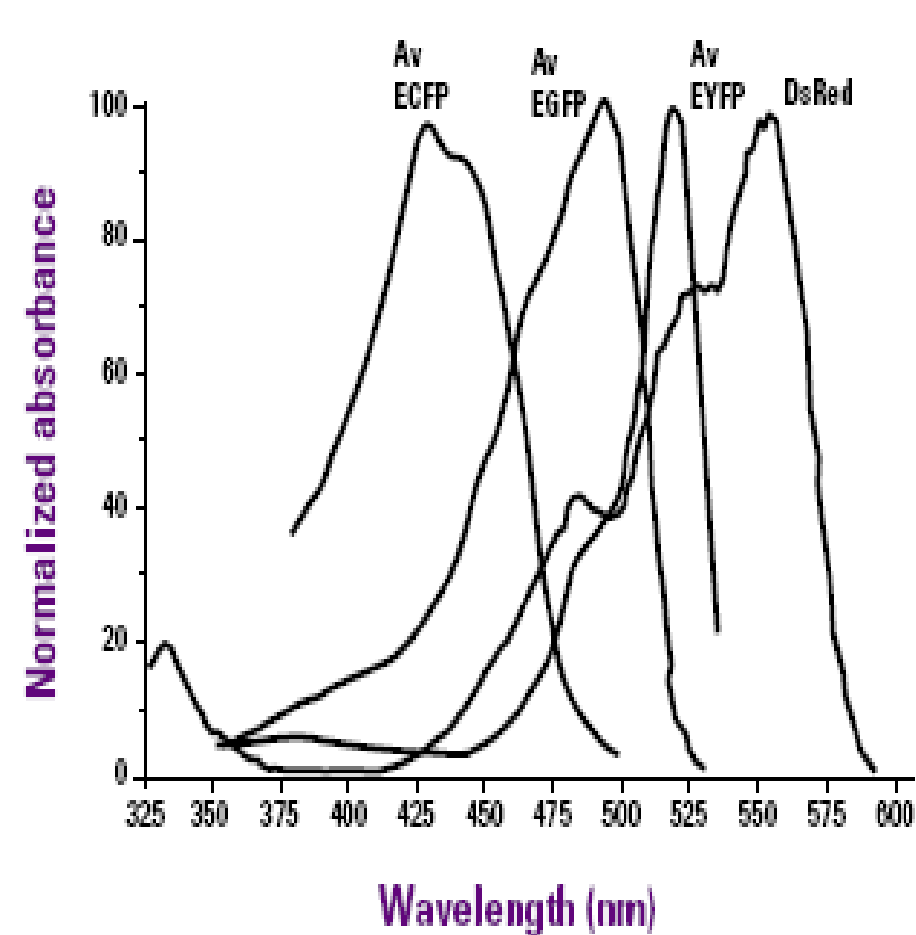
wt GFP: Phe64 Ser Tyr Gly Val Gln 69 ... Ser72 ... Tyr 145 Asn146 ... Met153 ... Val163 ... Thr203
EGFP: Leu 64 Thr Tyr Gly Val Gln 69
EYFP: Phe64 Gly Tyr Gly Leu Gln69 ... Ala72 ... Tyr203
ECFP: Leu 64 Thr Trp Gly Val Gln 69 ... Ile146 ... Thr153 ... Ala163

EGFP (enhanced green fluorescent protein)
ECFP (cyan)
EYFP (yellow)

Protein	Excitation Maxima (nm)	Emission Maxima (nm)
wt GFP	395 (470)	509 (540)
EGFP ^d	488	507

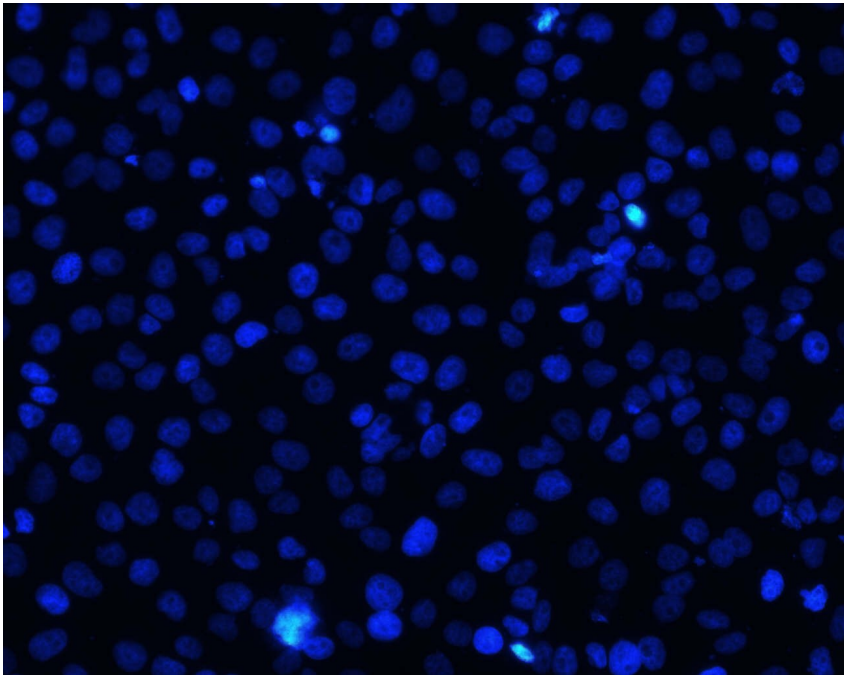


Спектры возбуждения и флуоресценции производных GFP

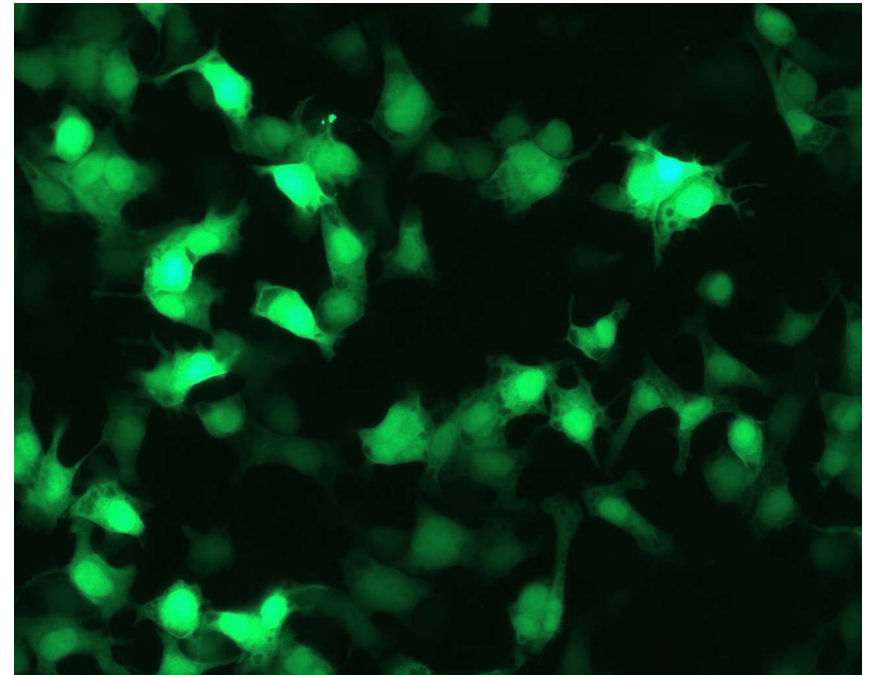


DsRed – красный флуоресцирующий белок из коралла *Discosoma* sp.

Репортерный ген GFP (определение эффективности трансфекции)

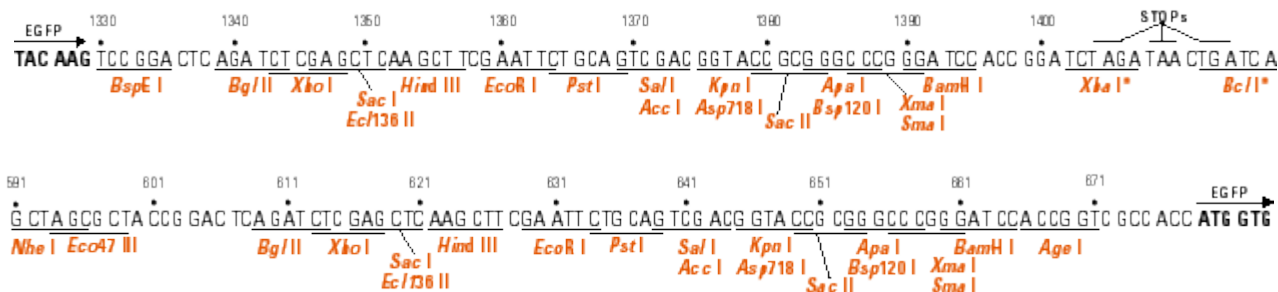
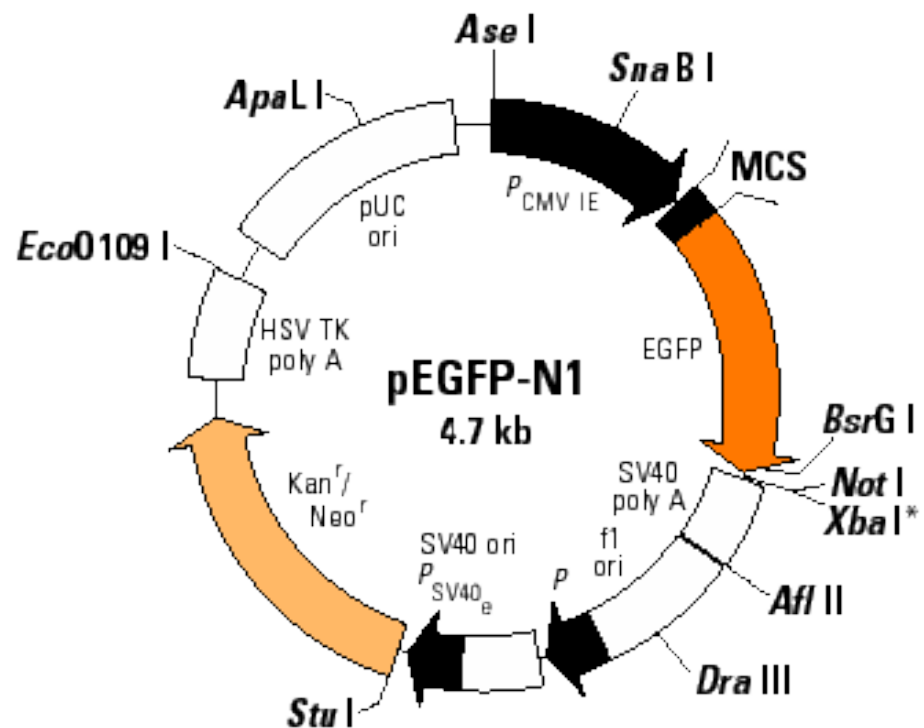
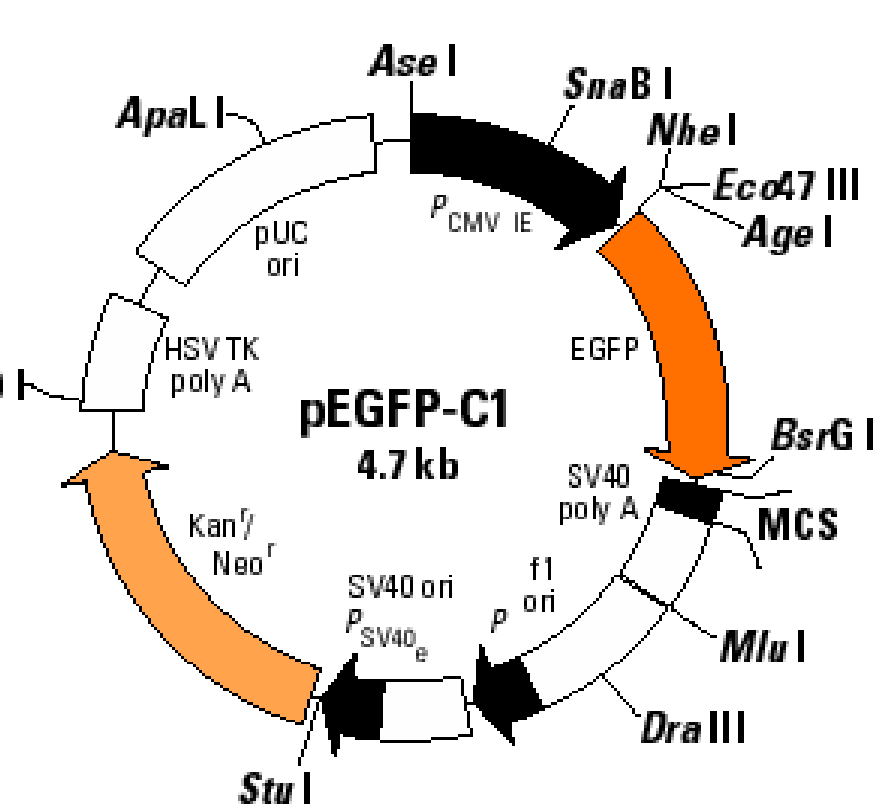


Ядра, покрашенные специфичным к ДНК красителем Hoechst 33342, по ним определяется число клеток



Клетки, экспрессирующие EGFP

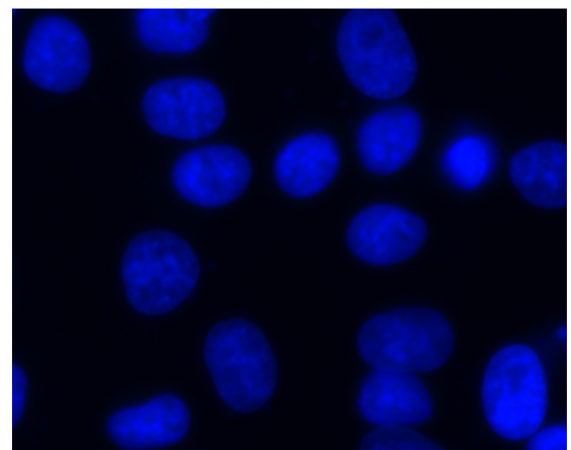
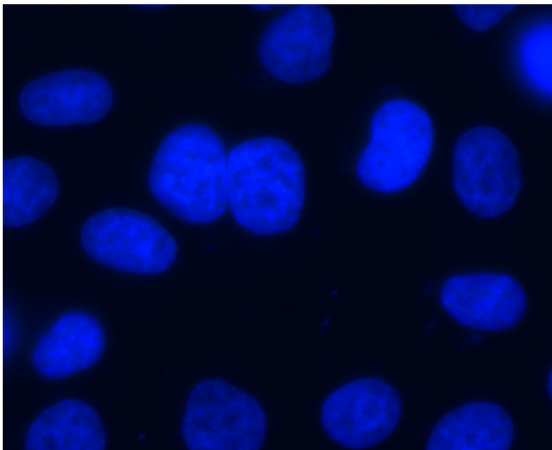
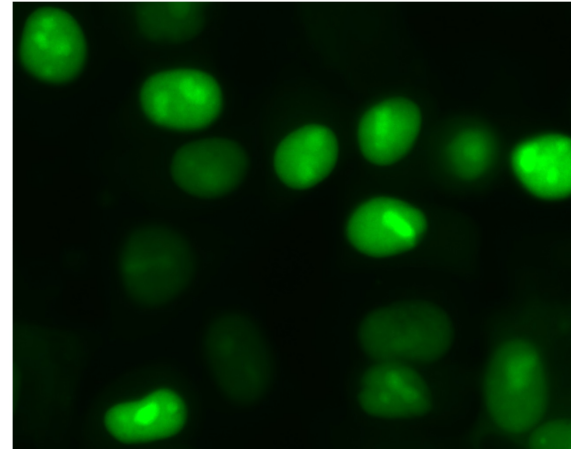
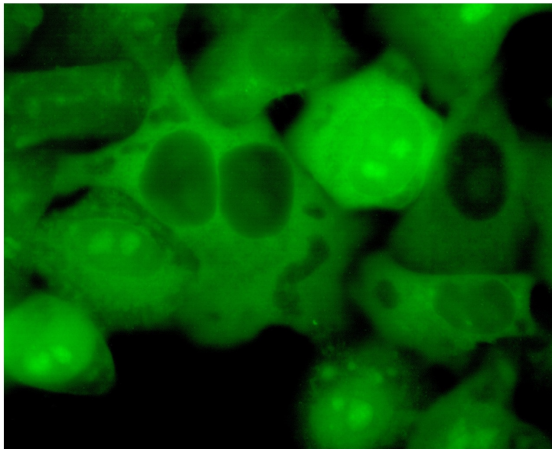
Векторы для экспрессии слитных белков с EGFP



Белок X

Белок X

Репортерный ген GFP (определение внутриклеточной локализации белка)



Стабильные клеточные линии

- **I. Интеграция в случайные участки генома:**

-
- челночные векторы (**селекционный маркер**, нет **ori**);
- ретровирусные векторы
-
- (Недостатки: инсерционный мутагенез, сайленсинг)

- **II. Стабильно реплицирующиеся внехромосомные ДНК (эписомы)**

- **Селективные маркеры:**

- **Neo** - (аминогликозид фосфотрансфераза) – устойчивость к ингибитору трансляции G-418 ;

-
- **Puro** (пурамицин-N-ацетил трансфераза) - ацетирует ингибитор трансляции **пурамицин**;

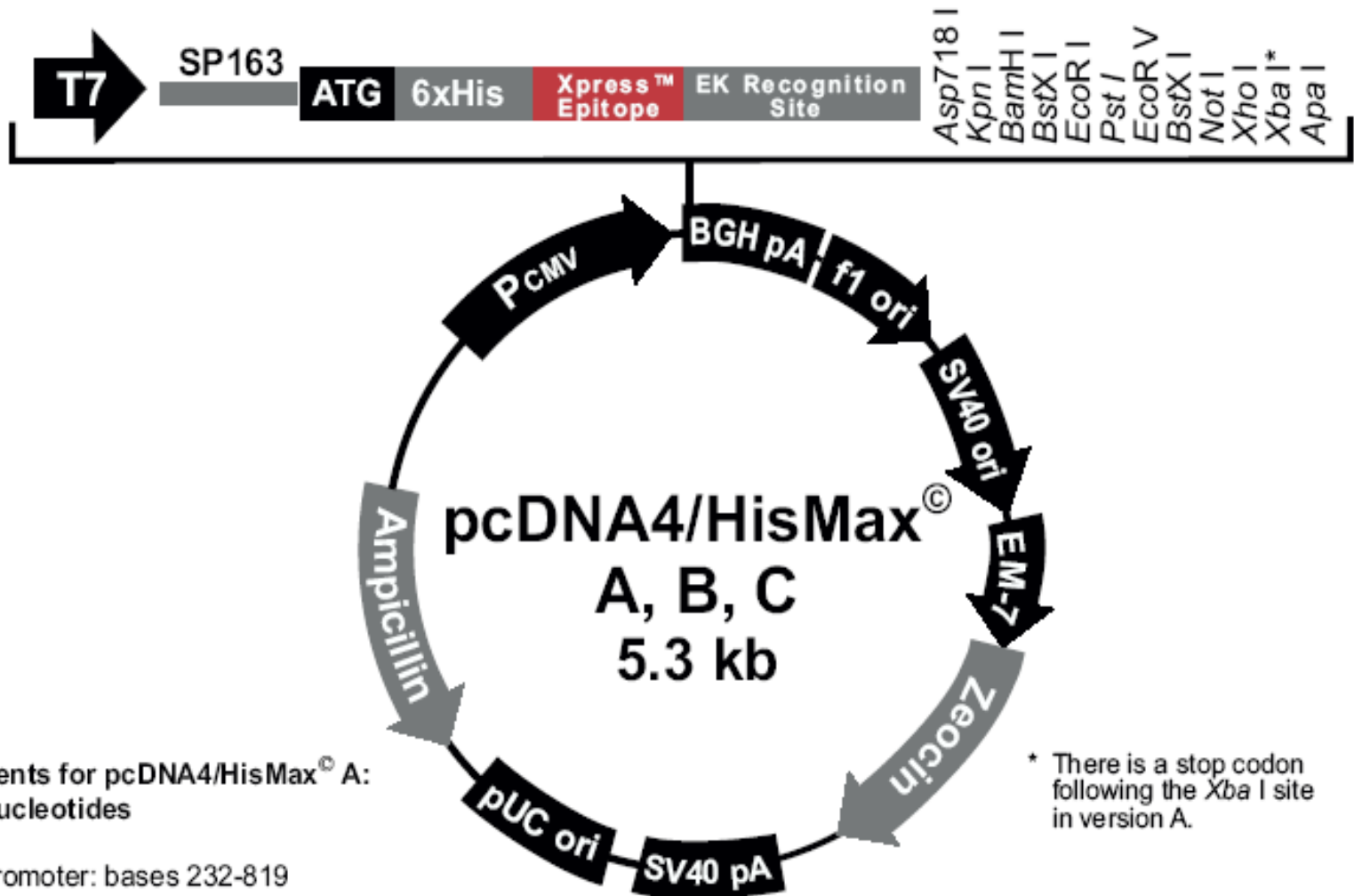
- **Hygro** - устойчивость к гигромицину. **Гигромицин В** – антибиотик, ингибитор белкового синтеза (влияет на рибосомный А-сайт и на транслокацию). Ген устойчивости – **Hph** (гигромицин фосфотрансфераза), фосфорилирование гигромицина приводит к его инактивации.

- **Zeocin** – антибиотик широкого спектра, медь-содержащий гликопептид, выделенный из *Streptomyces*. Механизм действия – интеркаляция в ДНК и ее деградация.

- Ген устойчивости - *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus bleomycin*), кодирует белок 13.7 kDa, который связывает Zeocin и ингибирует его активность.

Для получения **стабильной клеточной линии** вектор линейризуют (это не делает трансфекцию более эффективной, но увеличивает шансы интеграции без повреждения экспрессионной кассеты).

После трансфекции проводят селекцию.



Comments for pcDNA4/HisMax® A:
5258 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819

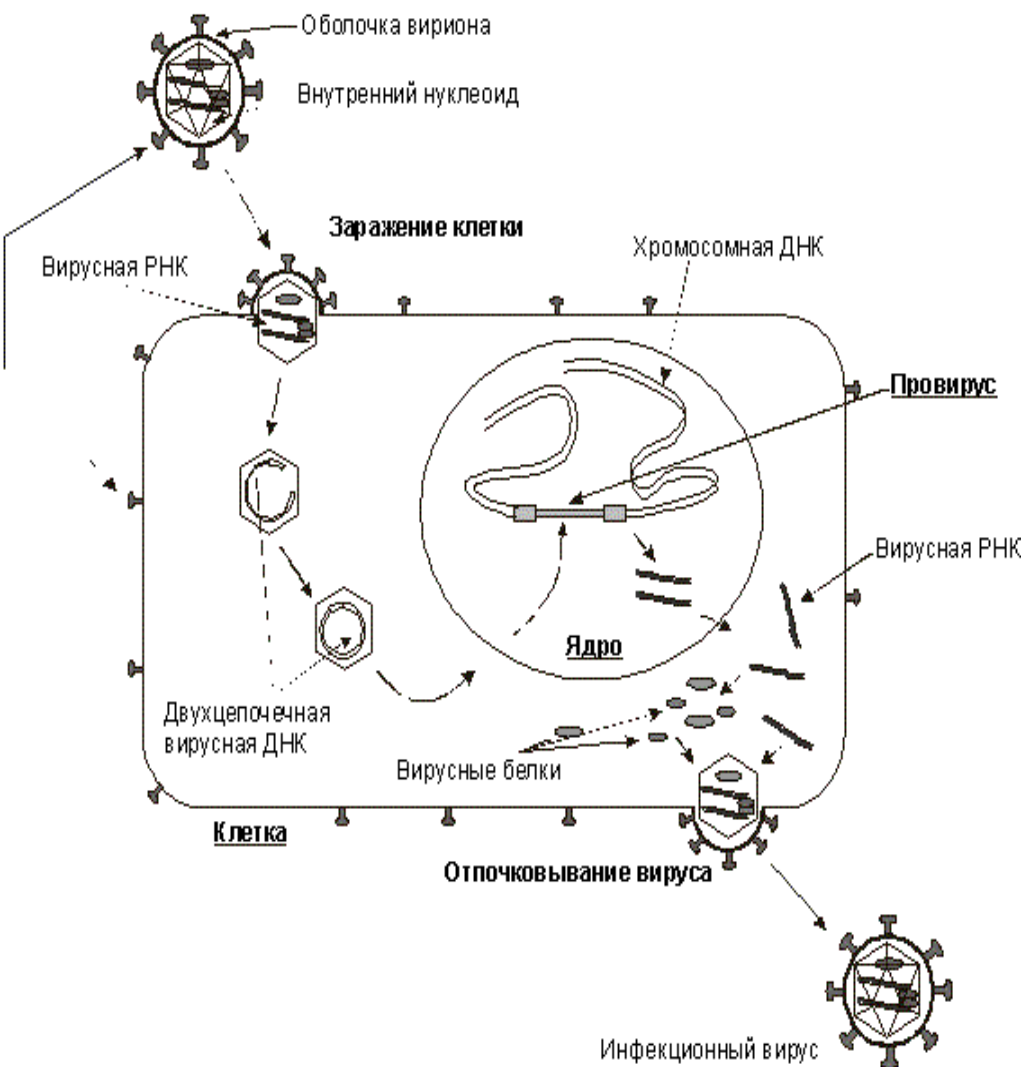
T7 promoter/priming site: bases 863-882

QBI SP163 translational enhancer: bases 917-1079

* There is a stop codon following the Xba I site in version A.

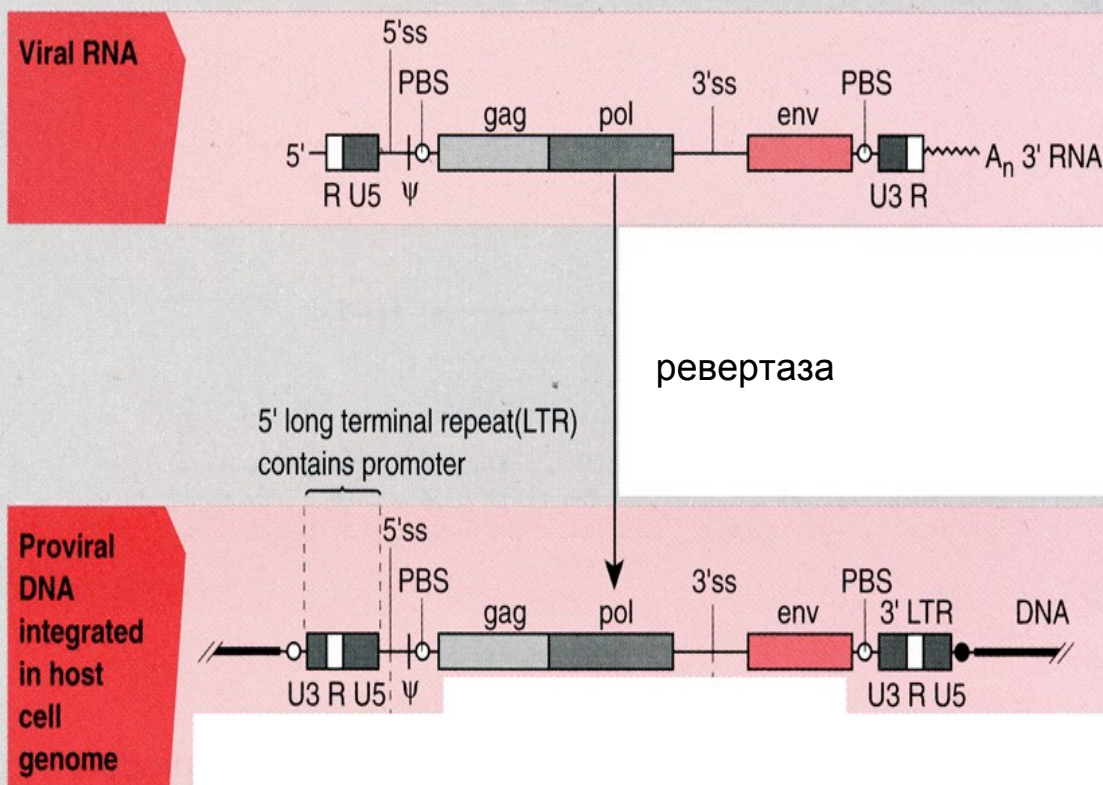
Ретровирусные векторы.

1. Схема жизненного цикла ретровируса



- Проникновение ретровирусной частицы в клетку зависит от клеточного рецептора;
- Синтез провирусной ДНК (ревертаза);
- Интеграция провируса в геном делящихся клеток;
- Транскрипция провирусной ДНК;
- трансляция с образованием вирусных белков;
- Вирусная РНК упаковывается в белки капсида;
- Оболочка вириона формируется из мембраны клетки при выходе вирусных частиц из клетки путем отпочковывания.

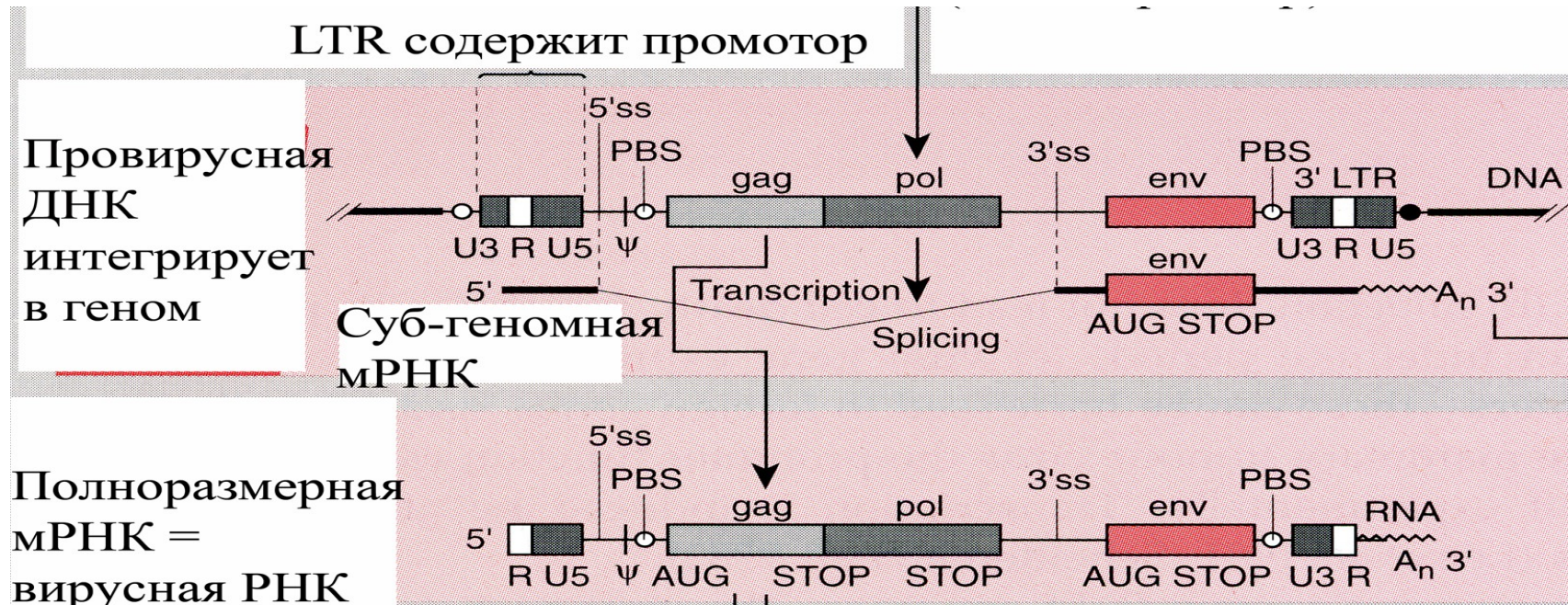
2. Геном ретровируса



- Элементы с транс-функциями - гены, кодирующие следующие белки:
- **gag** - MA (матриксный), p12, CA (капсидный), NC (белок нуклеокапсида);
- **pol** - PR (протеаза), RT (обратная транскриптаза/РНКазы), IN (интеграза);
- **env** - SU (поверхностный gp70), TM - трансмембранный белок;
-
- Элементы с цис-функциями:
- ▽ **Ψ** - последовательность - сигнал упаковки/димеризации вирусной РНК,
- **PBS** - primer binding site,
- **3' и 5' SS** - акцепторный и донорный сайты сплайсинга,
- **LTR** – длинные концевые повторы (содержат энхансер, промотор, а также последовательности, по которым идет интеграция в геном)

att -

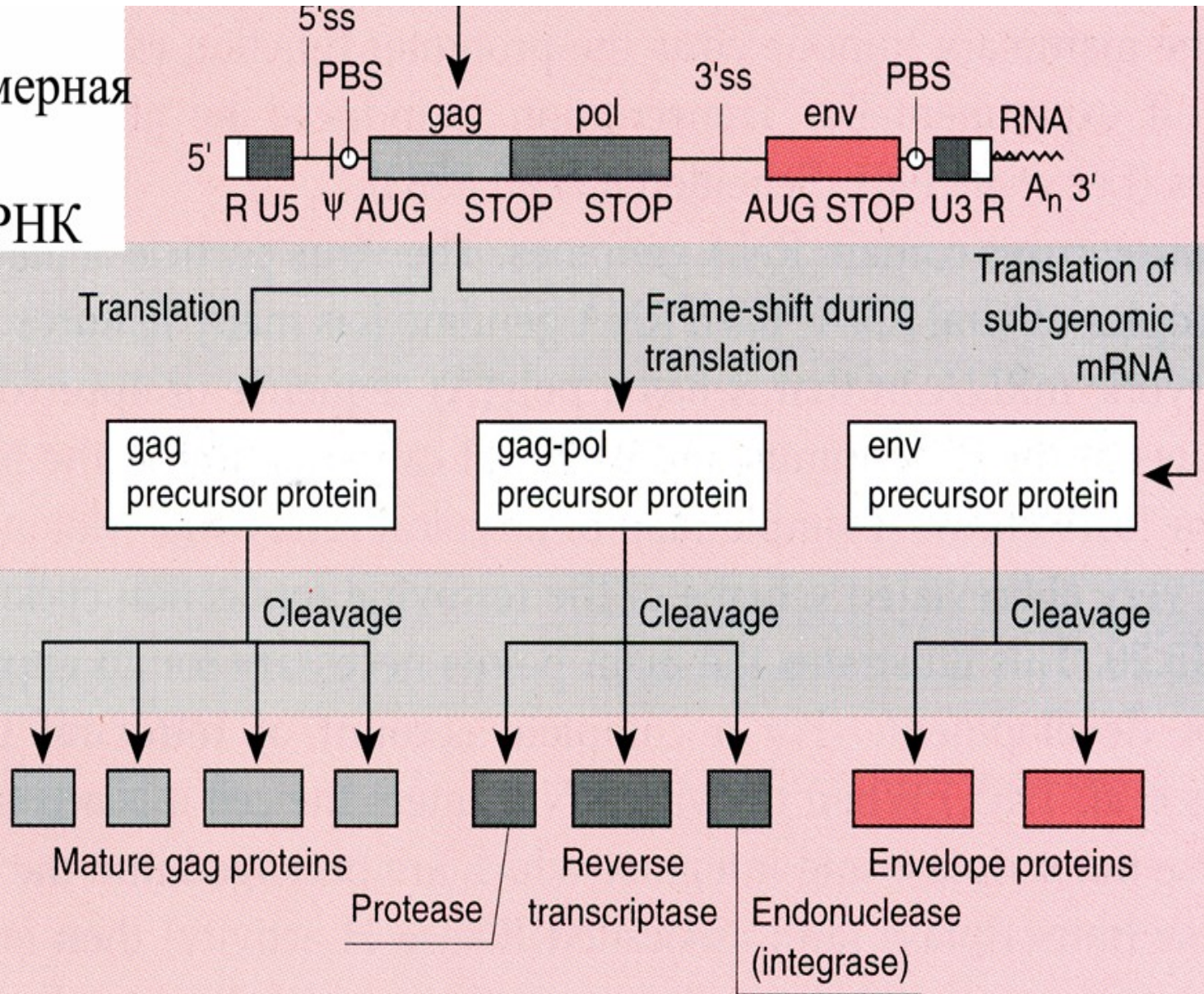
3. Транскрипция и сплайсинг



- В результате **альтернативного сплайсинга** образуется **полноразмерная РНК**, направляющая синтез продуктов генов **gag** и **pol**, так и сплайсированная **субгеномная РНК**, являющаяся матрицей при синтезе белков оболочки (продукты гена **env**).

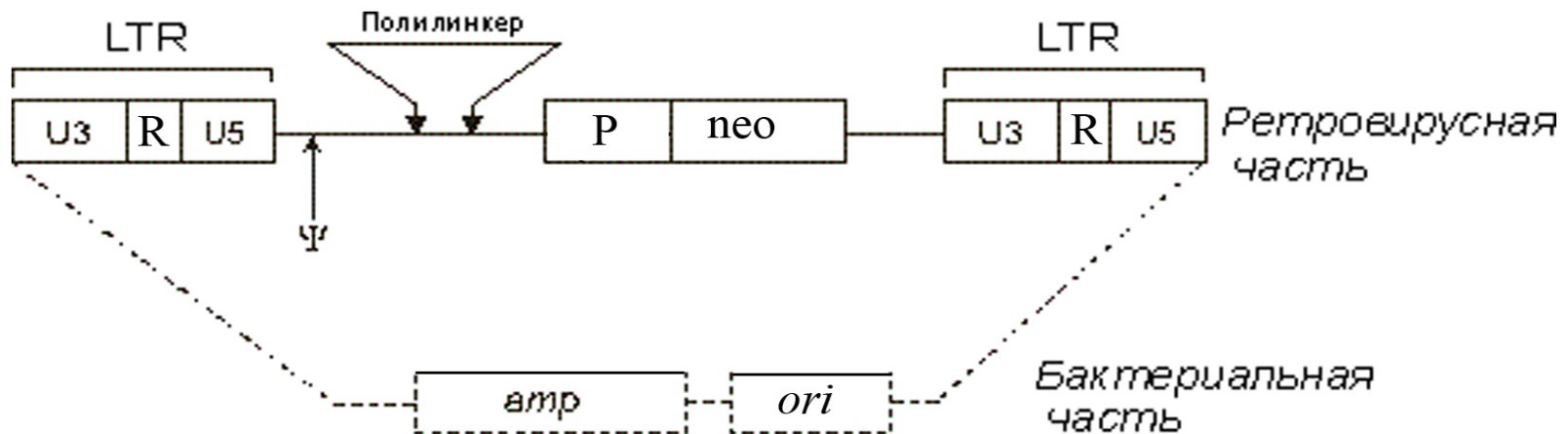
4. Трансляция

Полноразмерная
мРНК =
вирусная РНК



Конструирование ретровирусного вектора

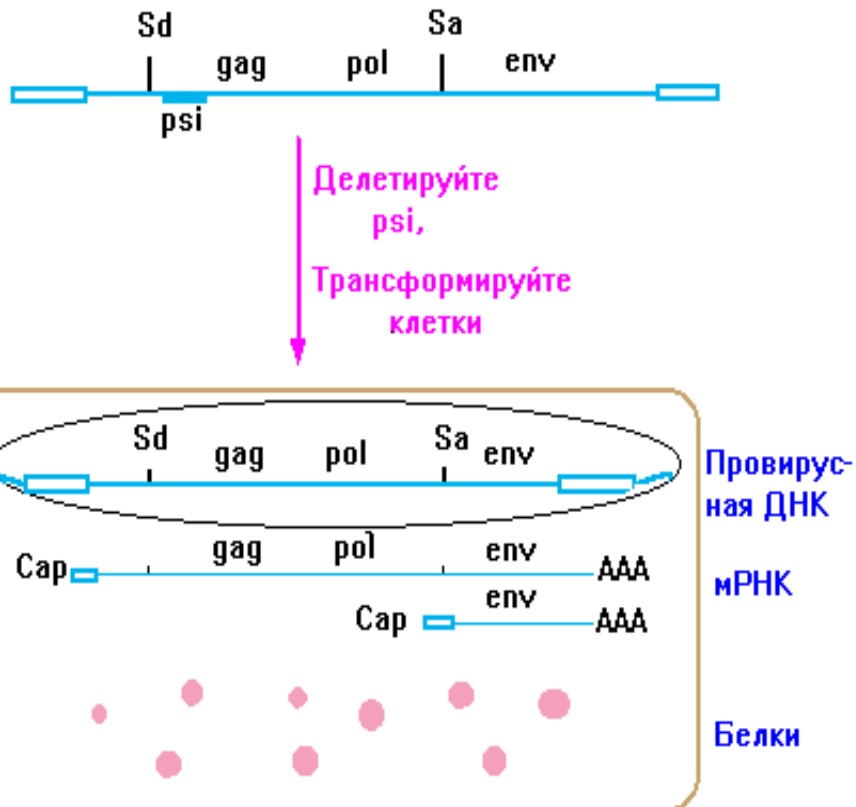
- Возьмем провирусную ДНК и выкинем из нее гены ***gag***, ***pol***, ***env***, оставив 3'- и 5' **LTR** и **psi** - сайт.
- А вместо выкинутых генов вставим интересующий нас ген (до 8 kb).



Ретровирусный вектор наряду с цис-элементами генома (LTR и сигнал упаковки) содержит:

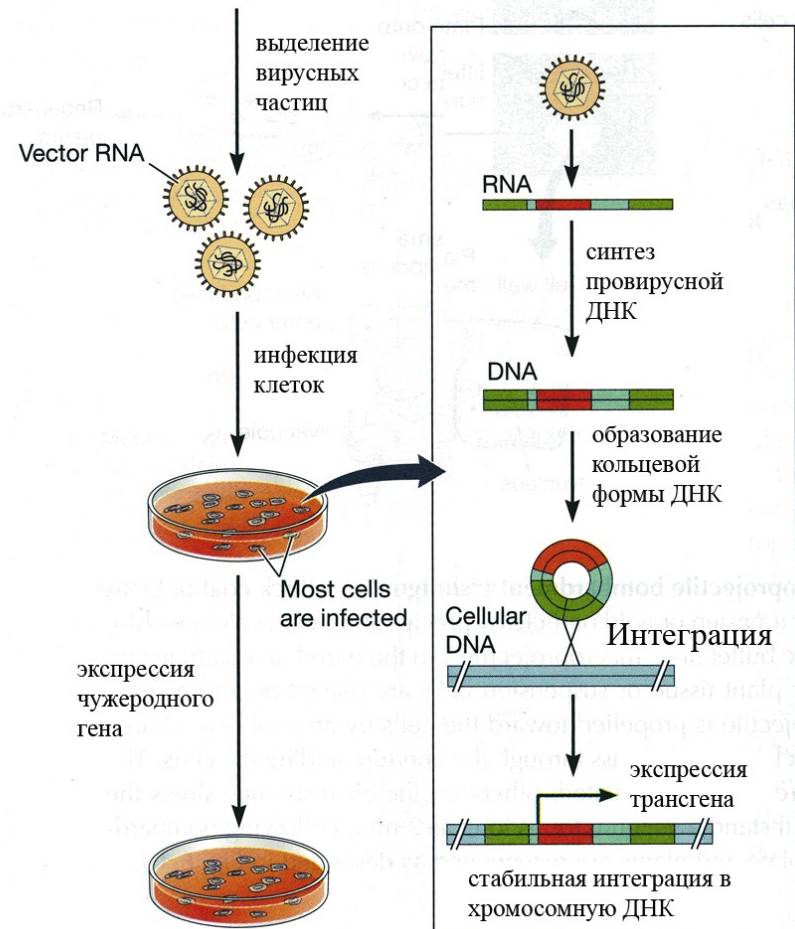
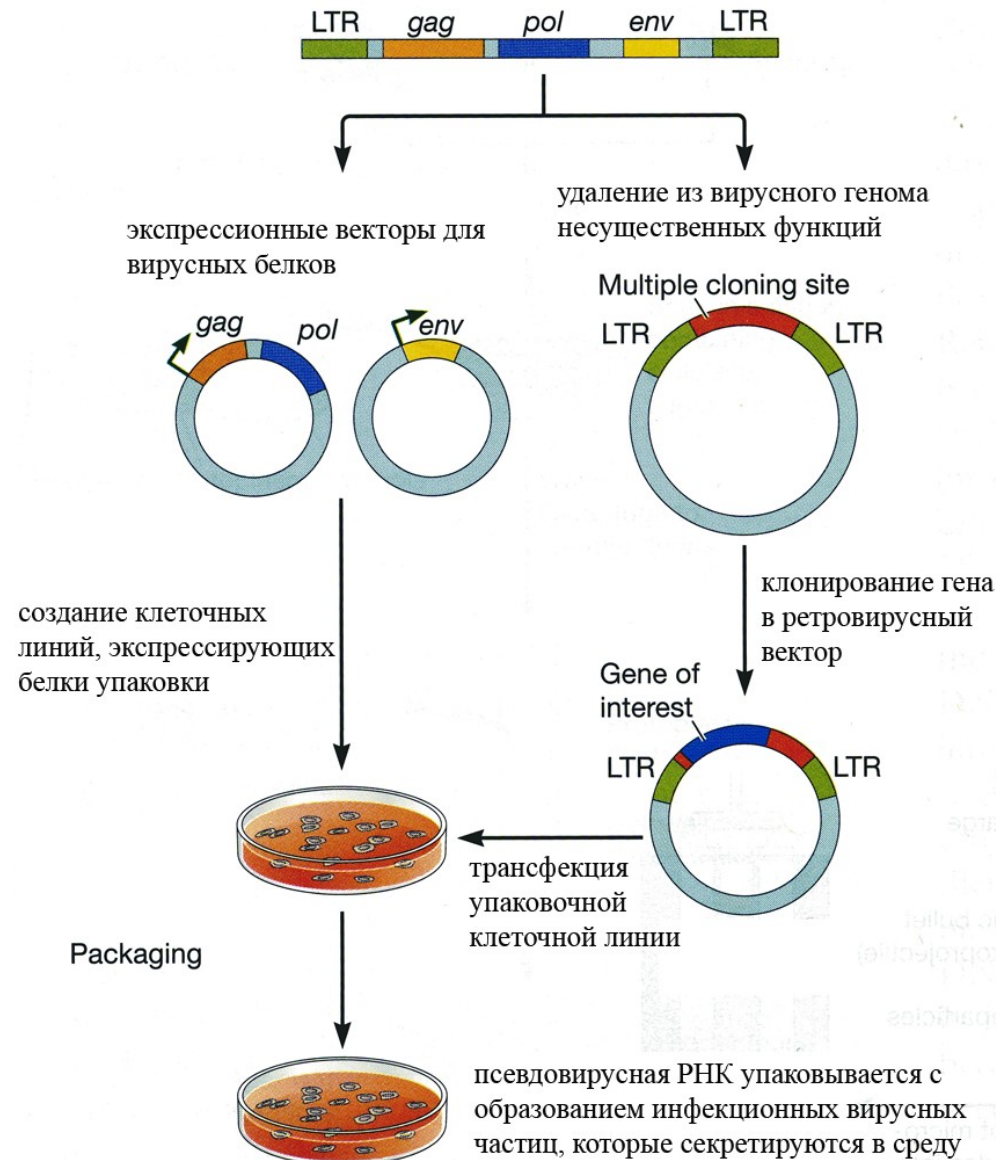
- 1) селективный маркер со своим промотором (позволяющий проводить отбор клеток с интегрированным вектором на селективной среде);
- 2) полилинкер;
- 3) бактериальной селективный маркер и ориджин репликации.

6. Конструирование упаковочных клеточных линий

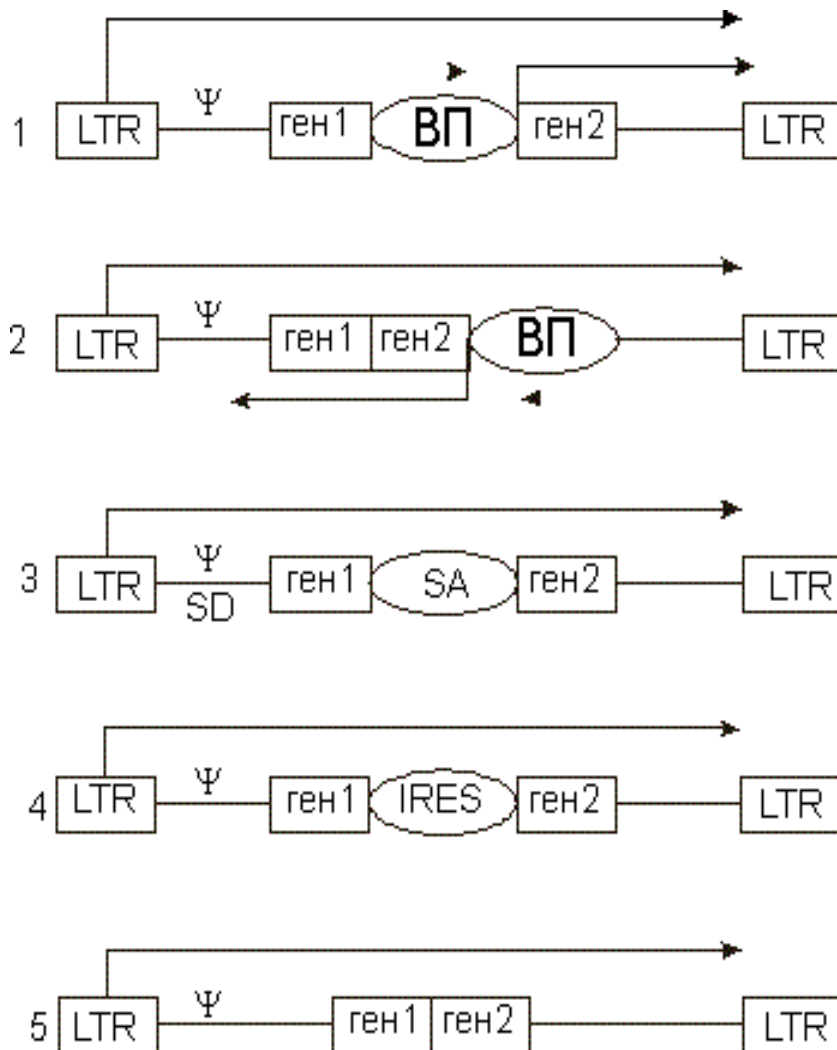


- Из ретровирусной ДНК удаляют последовательность сигнала упаковки **psi** и трансформируют клетки.
- Провирусная ДНК встроится в клеточный геном.
- Она будет направлять синтез вирусных РНК и вирусных белков.
- Но сам ретровирус не будет продуцироваться (т.к. РНК неспособна упаковаться с образованием вирусных частиц).

Работа с ретровирусными векторами

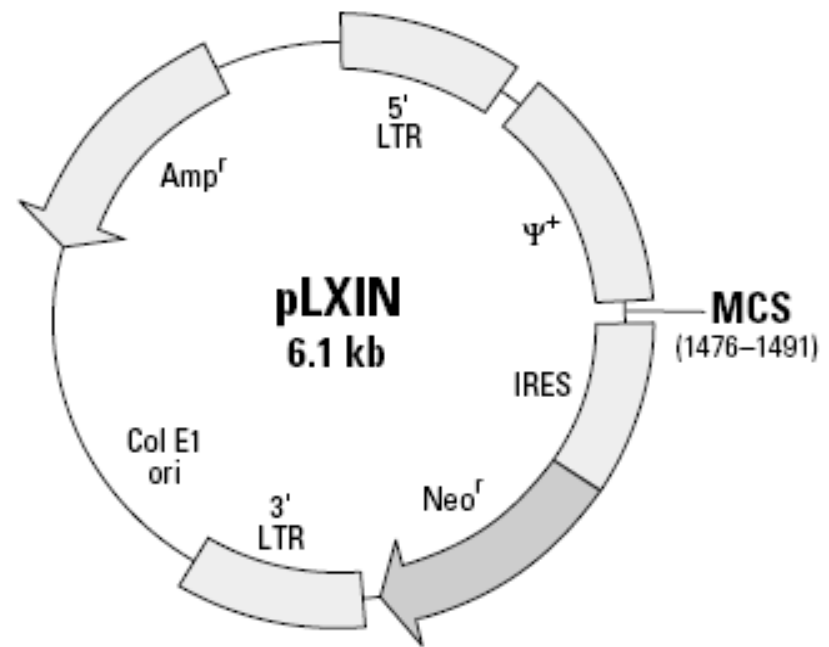
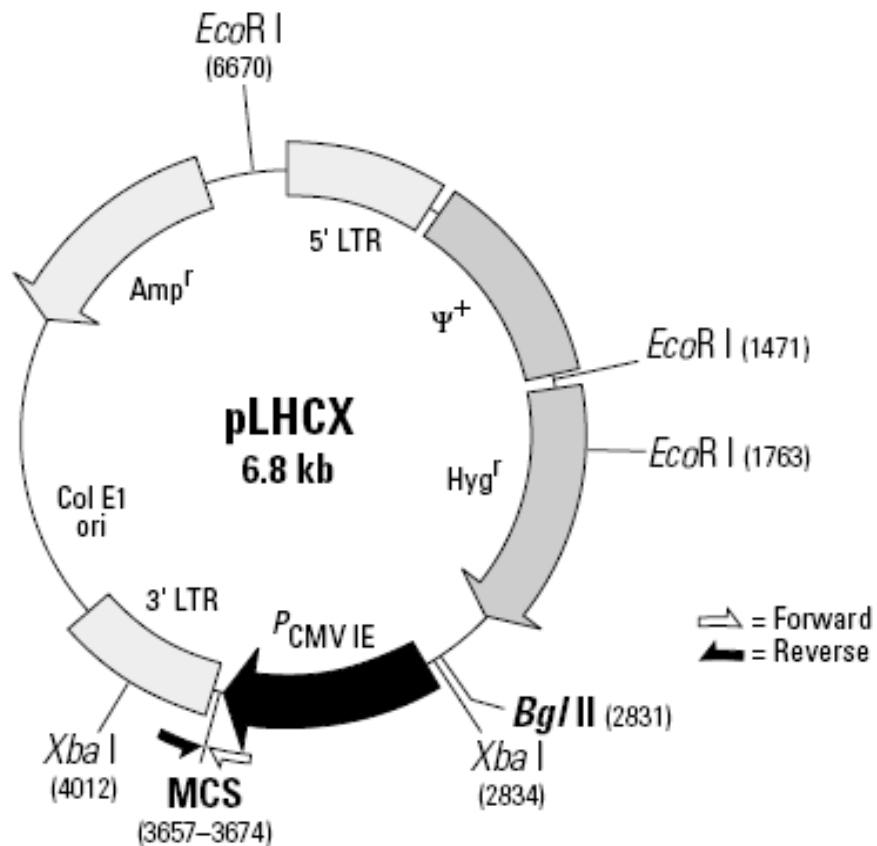


8. Экспрессия нескольких генов в одном векторе



- 1, 2 - использование двух разных промоторов для экспрессии генов;
 - 3 - использование для экспрессии двух генов ретровирусной системы **сплайсинга**;
 - 4 - использование **IRES** (internal ribosome entry site) элемента для трансляции полицистронных мРНК;
 - 5 - вектор, кодирующий "fusion"-белок.
- ∇ Ψ - сигнал упаковки;
- **ВП** - внутренний промотор;
 - **SD, SA** - донорный и акцепторный сайты сплайсинга.

Примеры ретровирусных векторов

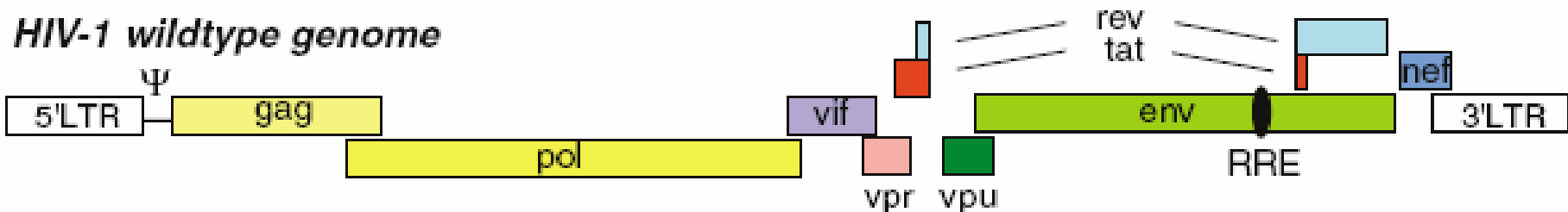


Полезные свойства ретровирусов

- Ограниченное число копий интегрированных провирусов (от 1 до 5);
- Не происходит перегруппировок встроенного материала;
- Предпочтительная интеграция в активно-транскрибируемые участки генома;
- Легкость доставки (преимплантационный эмбрион обрабатывают концентрированным вирусным стоком);
- Отсутствие цитопатического действия;
- Широкий спектр как видовой, так и тканевой специфичности.
В случае ретровирусных векторов способность заражать клетки того или иного вида (**тропизм**) определяется белками оболочки вируса-помощника (ген **env**).
Можно направленно изменять тропизм (**псевдотипирование**). Для этого часто используют гликопротеид вируса везикулярного стоматита **VSV-G**.

Трудности и опасности в использовании ретровирусных векторов для целей генной терапии

- 1. Ретровирусы заражают только **делящиеся** клетки
- (это связано с неспособностью провируса в комплексе с белками проникать в ядро. В ходе митоза ядерная мембрана разрушается и провирус получает возможность встроиться в геном).
- **Лентивирус** - сложно устроенный ретровирус, для которого характерна способность инфицировать неделящиеся клетки.
- Содержит **сРРТ** (центральный полипуриновый тракт), отвечающий за ядерный транспорт пре-интеграционного комплекса.



Преодоление трудностей

- 2. Уровень экспрессии интегрированного трансгена зависит от **эффекта положения**.
- **Транскрипционный сайленсинг** – метилирование цитозина (CpG) de novo индуцирует деацетилирование гистонов и конденсацию хроматина.
- В **лентивирусном** векторе меньше CpG динуклеотидов, чем в ретровирусном векторе.
- Лентивирусы обычно интегрируют в транскрипционно-активные участки генома
- (MuLV интегрирует вблизи стартов транскрипции и CpG островков).
- Борьба с **сайленсингом** (цис-элементы):
 - 1) LCRs (locus control regions, гиперчувствительность к ДНКазе I);
 - 2) chromatin insulators (защита от соседних энхансеров и сайленсеров);
 - 3) S/MARs (scaffold/matrix attachment regions).

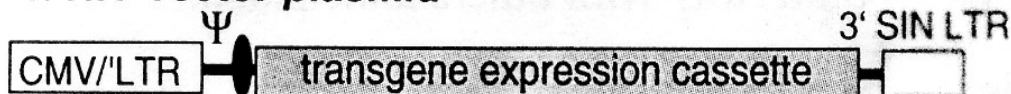
Преодоление трудностей

3. Возможна **рекомбинация** между дефектным ретровирусом, и эндогенным ретровирусным элементом в упаковочной линии клеток. В результате рекомбинации может возникнуть репликативно-компетентный **инфекционный** ретровирус.

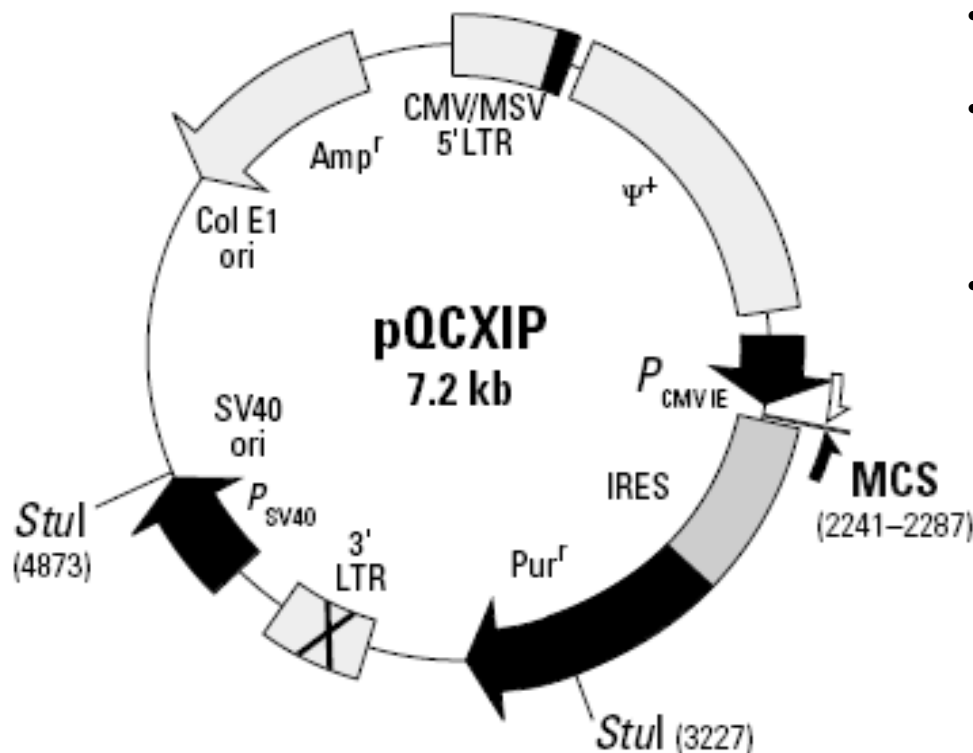
- Векторы с мутированным **PBS** для предотвращения обратной транскрипции были получены с использованием искусственной тРНК для продукции псевдовирусных частиц.
- 4. **Инсерционный мутагенез.** Интеграция ретровируса может инактивировать ген-супрессор опухолеобразования или активировать онкоген.
-
- Было бы хорошо осуществлять **таргетинг векторов** к определенному положению в геноме (встроить в интегразу специфический ДНК-связывающий домен, направляющий пре-интеграционный комплекс в безопасные участки генома).
- **SIN** векторы (самоинактивирующиеся):
- U3 участок LTR делетируют – исчезает активность энхансера и промотора.

Самоинактивирующийся (SIN) вектор

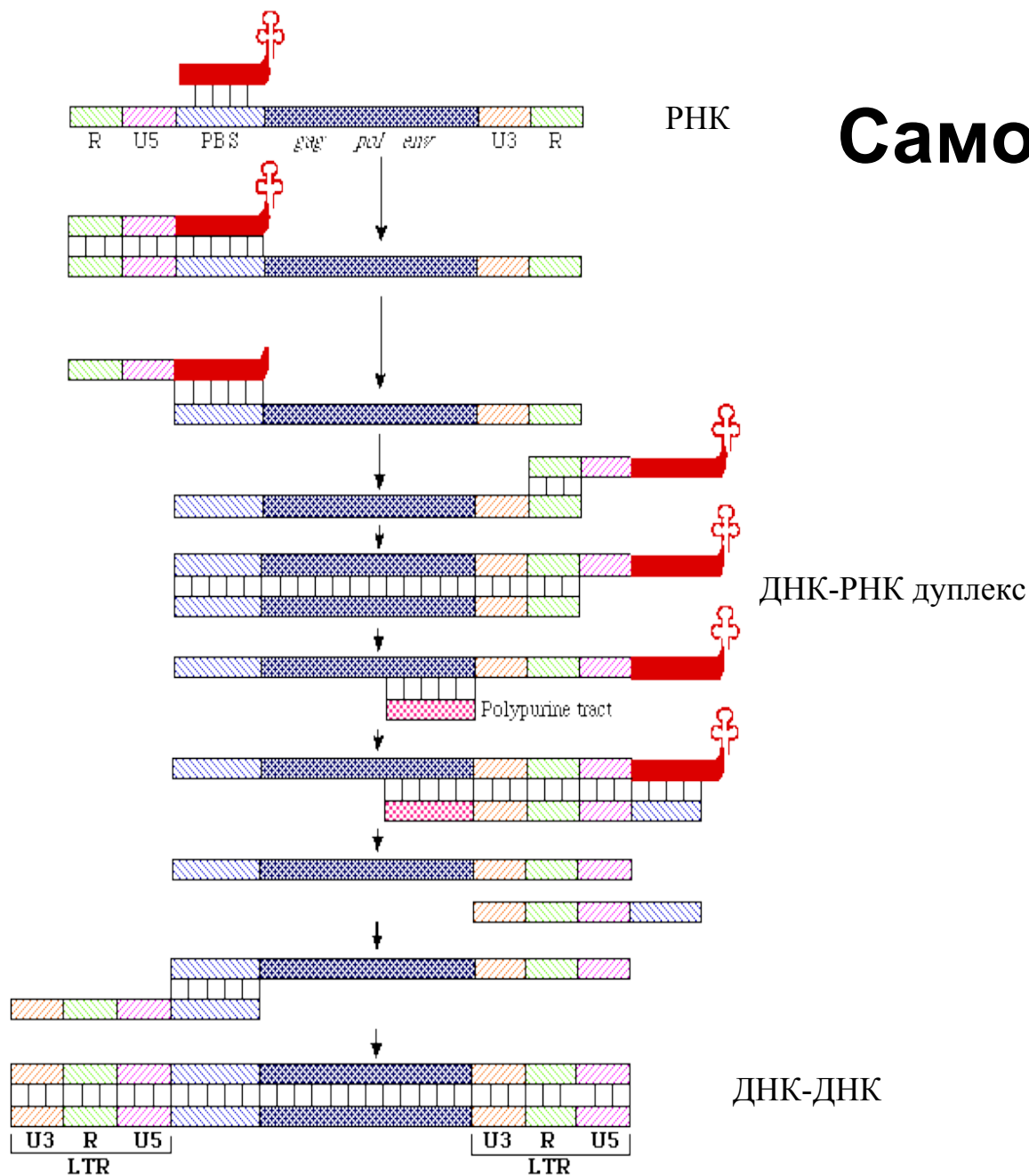
1. HIV vector plasmid



Гибридный 5' LTR состоит из CMV энхансера транскрипции и промотора MSV (мышинного вируса саркомы). Это обеспечивает высокий уровень транскрипции в упаковочной линии.



- **Самоинактивирующие** свойства вектора – делеция энхансерного участка U3 в 3' LTR.
- При обратной транскрипции ретровирусной РНК инактивированный 3' LTR копируется и заменяет 5' LTR, что приводит к инактивации энхансера в 5' LTR.
- Это предотвращает промоторную интерференцию и способствует более эффективной экспрессии трансгена с внутреннего промотора.

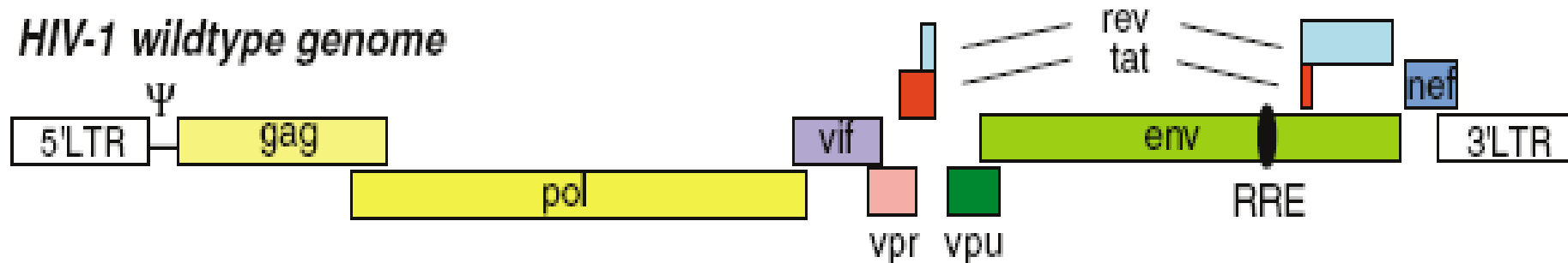


Самоинаktivация

- При обратной транскрипции ретровирусной РНК инактивированный 3' LTR копируется и заменяет 5' LTR, что приводит к инаktivации энхансера в 5' LTR.

Лентивирусная система

HIV-1 wildtype genome



1. HIV vector plasmid



2. HIV packaging or helper plasmid



3. HIV rev plasmid



4. Envelope plasmid

