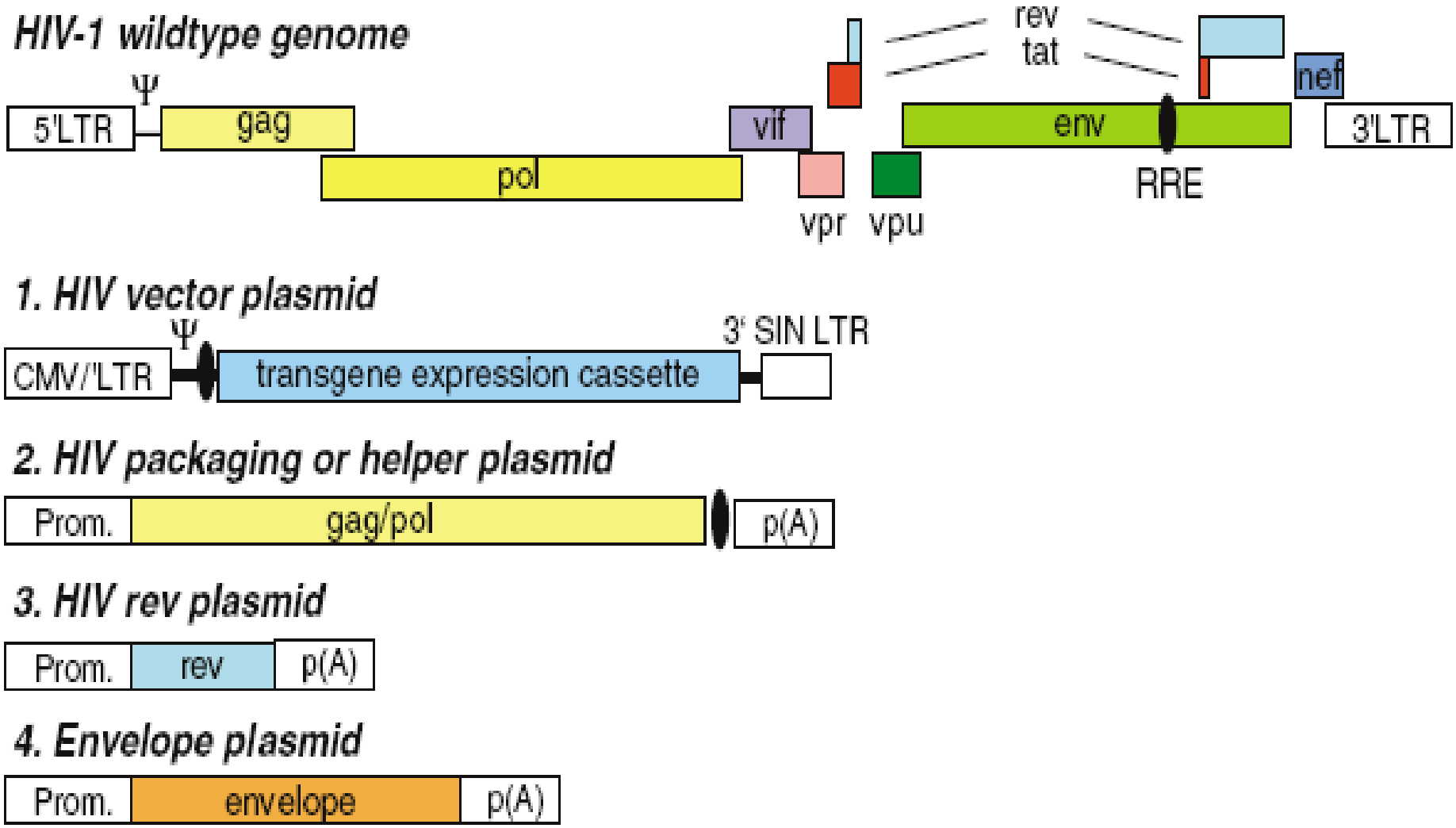
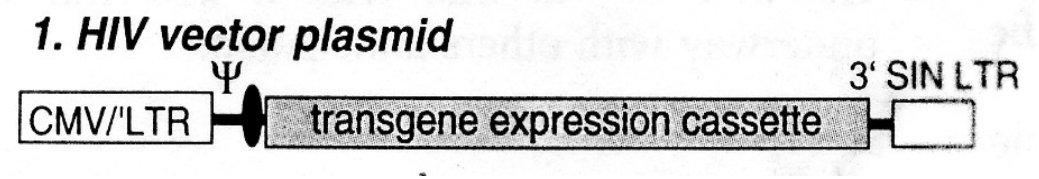
Экспрессия генов в клетках млекопитающих

- лекция 2

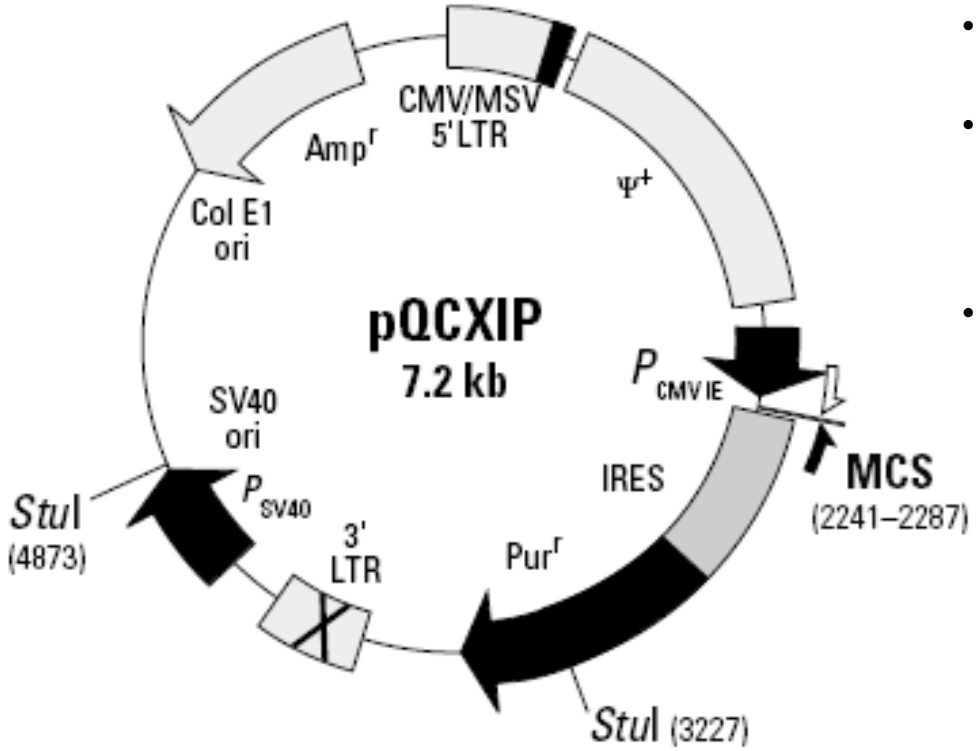
Лентивирусная система



Самоинактивирующийся **(SIN)** вектор

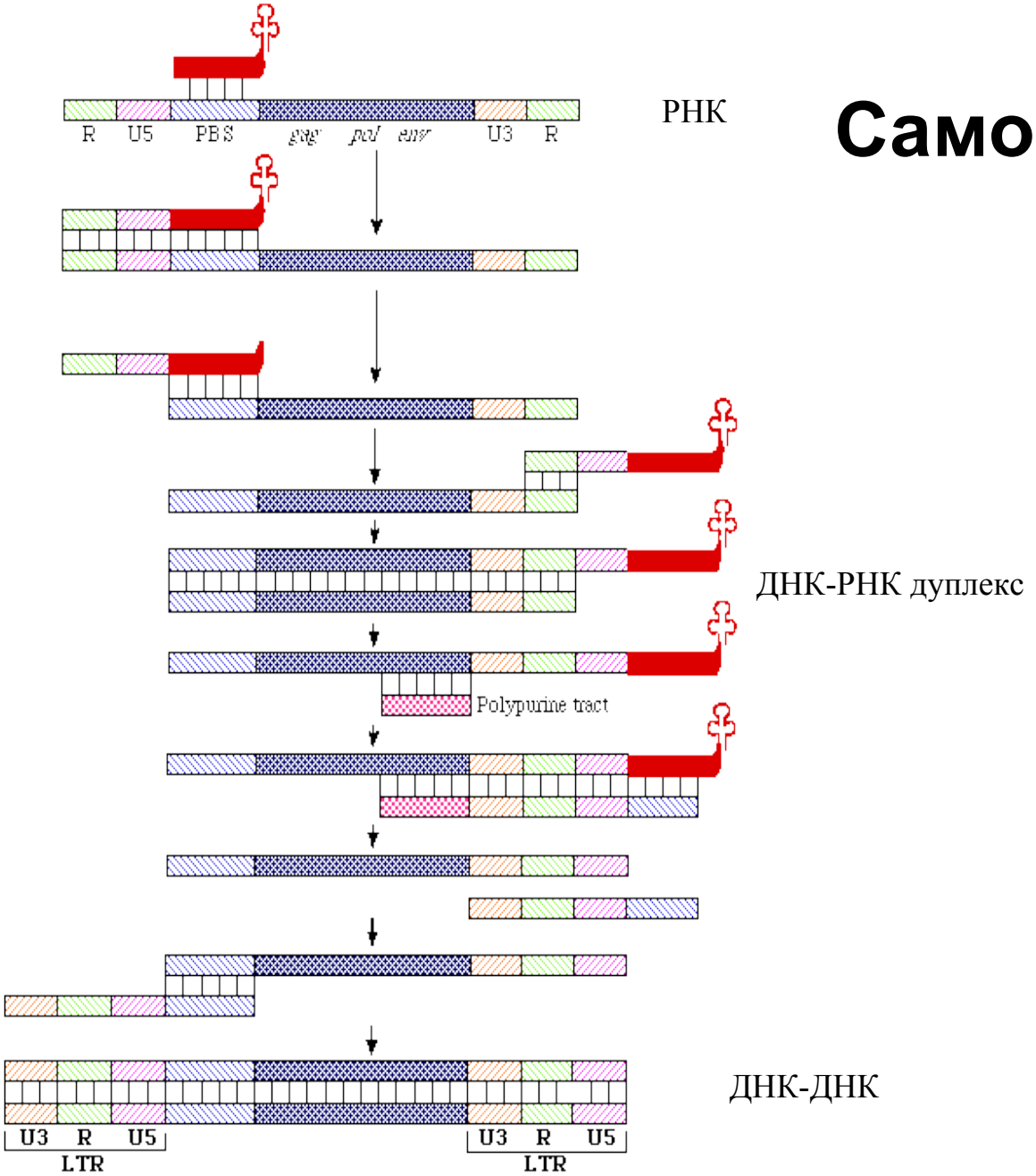


Гибридный 5' LTR состоит из CMV энхансера транскрипции и промотора MSV (мышиного вируса саркомы). Это обеспечивает высокий уровень транскрипции в упаковочной линии.



- **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.

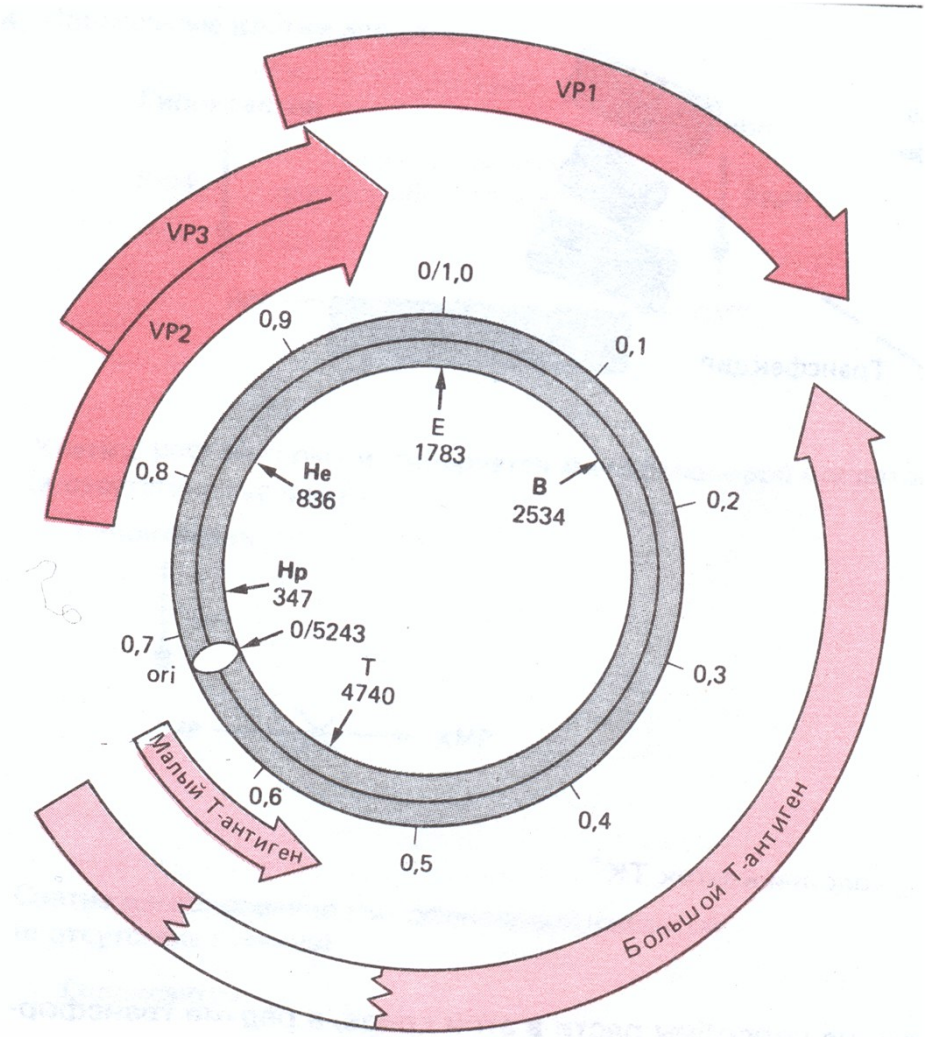
Самоинактивация



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

Вирус SV40 (литическая инфекция)

Вирус содержит **кольцевую дцДНК** 5243 н.п.;
ранние гены - **Т антиген** и **t антиген;**
поздние гены - **капсидные белки VP1, VP2, VP3;**
Регуляторный участок (**ori,** сайты связывания Т-антигена, промоторы и энхансеры транскрпции).



В результате инфекции **пермиссивных** клеток вирусом SV40 происходит лизис клетки и выход вирусных частиц.

Вирус реплицируется много раз за клеточный цикл (100000 копий).

- В **непермиссивных** клетках ДНК вируса интегрирует в геном.

Векторы на основе вируса SV40

- **I. Литические (трансдуцирующие) векторы**: репликация + упаковка в вирионы.
- - размер ДНК до 5300 н.п. (емкость до 2.5 kb);
- - необходим **ori;**
- - вирус-помошник кодирует **Т- антиген** и/или структурные гены **VP1, VP2, VP3**.

- Можно использовать клетки **COS** – клетки зеленой африканской мартышки, в геном которых интегрирован ген **Т–антигена**.

- **Недостатки**: малая емкость; лизис.

- **II. Плазмидные** SV40-векторы – репликация без упаковки в пермиссивных клетках.
- **ori** + большой **Т-антиген**
- (используют **COS** – клетки, до 100000 копий вектора на клетку).
- Нет ограничений на размер ДНК;
- Нет лизиса клеток.

- **III. Трансформирующие векторы** – интеграция в хромосому непермиссивных клеток.

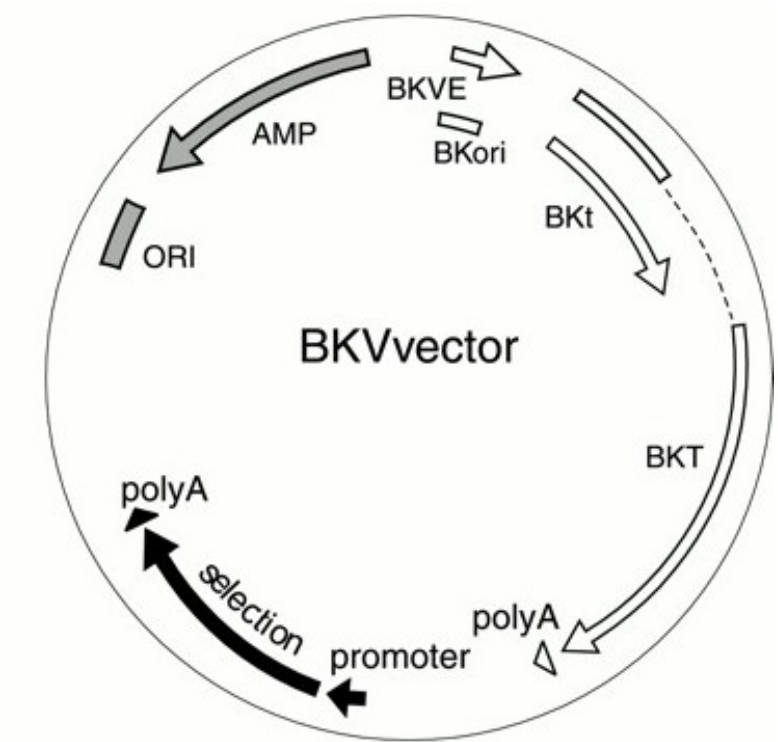
Стабильно реплицирующиеся внехромосомные ДНК (эписомы)

- **Преимущества эписомных векторов:**
- 1. Трансген не может быть поврежден в процессе интеграции и не подвержен регуляции соседними участками ДНК;
- 2. Отсутствие инсерционного мутагенеза;
- 3. Многокопийность и ядерная локализация;
- 4. Более высокая эффективность получения стабильных клеточных линий по сравнению с интегрирующими в геном плазмидами.

	размер	селективный маркер	копийность
Вирус полиомы BKV	5 kb	neo	20-120 копий
Бычий вирус папилломы BPV	16 kb	neo	20-300 копий
Вирус Эпштейна-Барр EBV	172 kb	neo	5-100 копий

Вектор на основе BKV

- Вирус содержит **кольцевую дцДНК** 5153 н.п.
- ранние гены кодируют **T и t антигены;**
- поздние гены кодируют **капсидные белки VP1, VP2 и VP3;**
- между ними расположен **регуляторный участок** (содержит сайты связывания Т-антигена, **ori,** промотор и энхансер транскрпции).



- BKV эписомы реплицируются один раз за клеточный цикл.
- Стабильная репликация требует наличия **ori,** большого **T антигена** и ряда клеточных белков репликации.
-
- Участки поздней вирусной ДНК делетируют и вставляют на это место экспрессионную кассету трансгена.

BKVE, ранний промотор;
BKt, малый t антиген;
BKT, большой T антиген.

Bovine papilloma virus 1

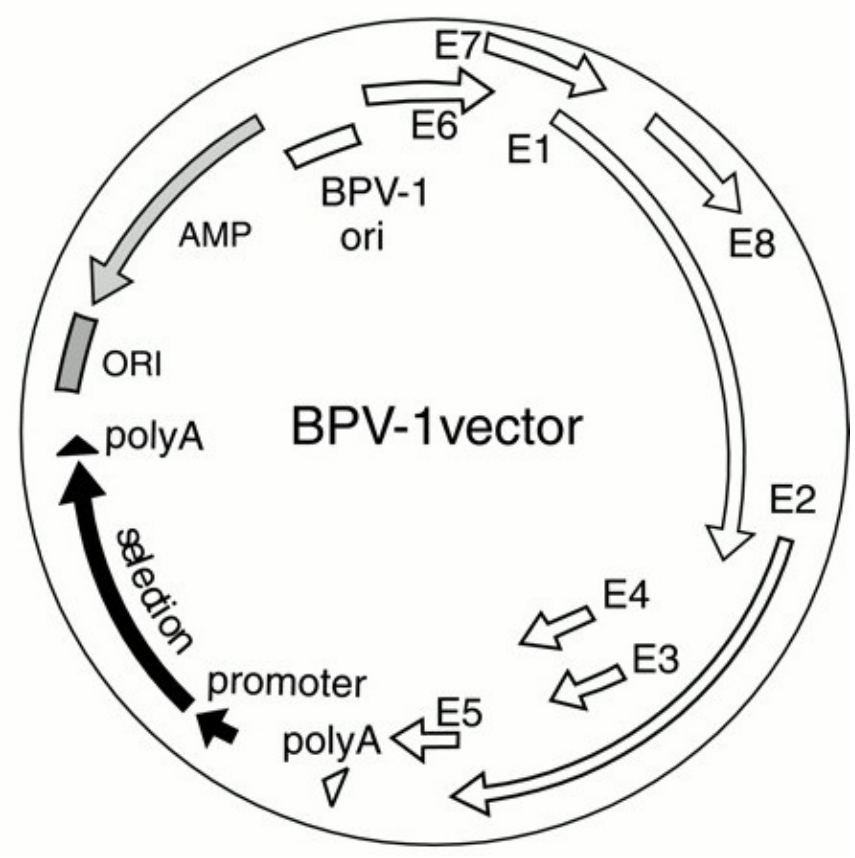


Схема экспрессионного вектора на основе BPV-1 (69%)

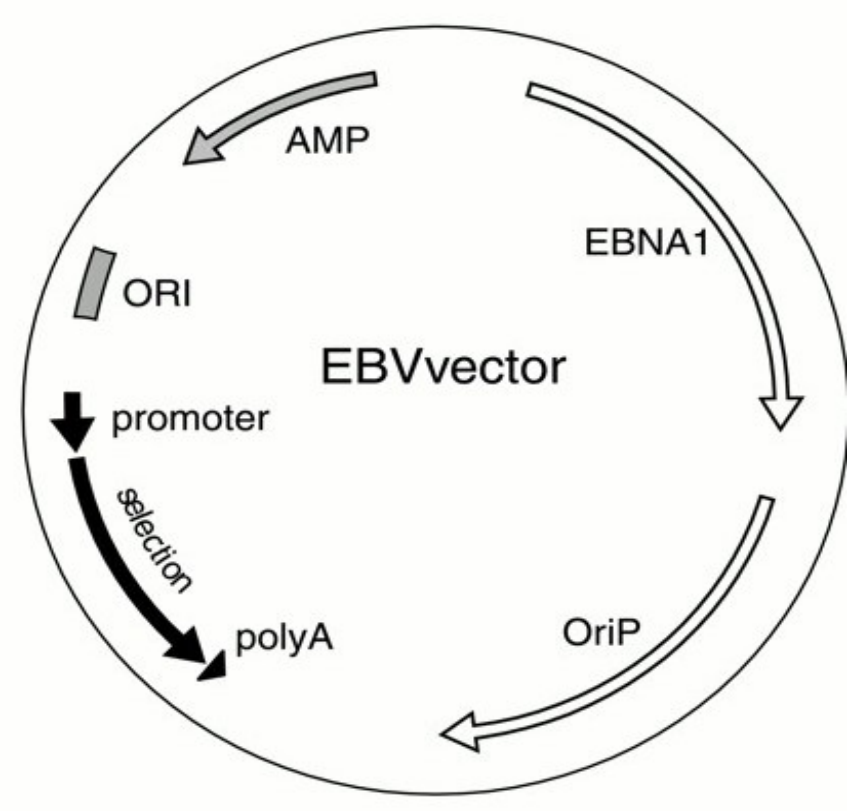
- Кольцевая дцДНК.
- E (ранний район) содержит 8 ORF (E1-E8), кодирует белки репликации, регуляции транскрипции и трансформации.
- L (поздний район) кодирует структурные белки вириона L1 и L2.
- Для стабильной репликации плазмид на основе BPV-1 нужны:
- **ori и MME** (minichromosome maintenance element) in *cis;*
- белки **E1 and E2** in *trans;*
- клеточные белки репликации.

Улучшение вектора:

оставили гены **E1, E2** и **регуляторный район** BPV-1 для предотвращения интеграции в хромосому и избавления от трансформирующей активности (делетировали E5, E6 и E7).

Векторы на основе EBV

- Стандартный EBV-вектор содержит **oriP** и ген **EBNA1** и стабильно реплицируется в виде эписомы (один раз за клеточный цикл).
- Емкость 172 kb. Искусственные человеческие минихромосомы могут быть полезны для скрининга библиотек генов.
- Без селекции эписомные EBV векторы охраняются продолжительное время, но не бесконечно.
- Векторы, несущие только oriP, можно использовать, чтобы быстро убить опухолевые клетки, экспрессирующие EBNA-1 (Burkitt's lymphoma).



Трудности использования эписомных векторов для генной терапии

- Необходима экспрессия вирусных транс-факторов, которые могут вызывать раковую трансформацию.

- **Большой Т антиген** вирусов **BKV** и **SV40** взаимодействует с опухолевым супрессором p53 (влияние на генную экспрессию, хромосомные аберрации, трансформация).
- Хотя белки E5, E6 и E7 являются основными трнсформирющими факторами **BPV-1**, некоторые трансформирующие свойства приписывают и **E2**.
-
- **EBV oriP** сходен с энхансером вблизи гена c-*myc. Поэтому* **EBNA1** может де-регулировать протоонкоген c-*myc* (экспрессия EBNA1 повышает вероятность В-клеточных лимфом у мышей).

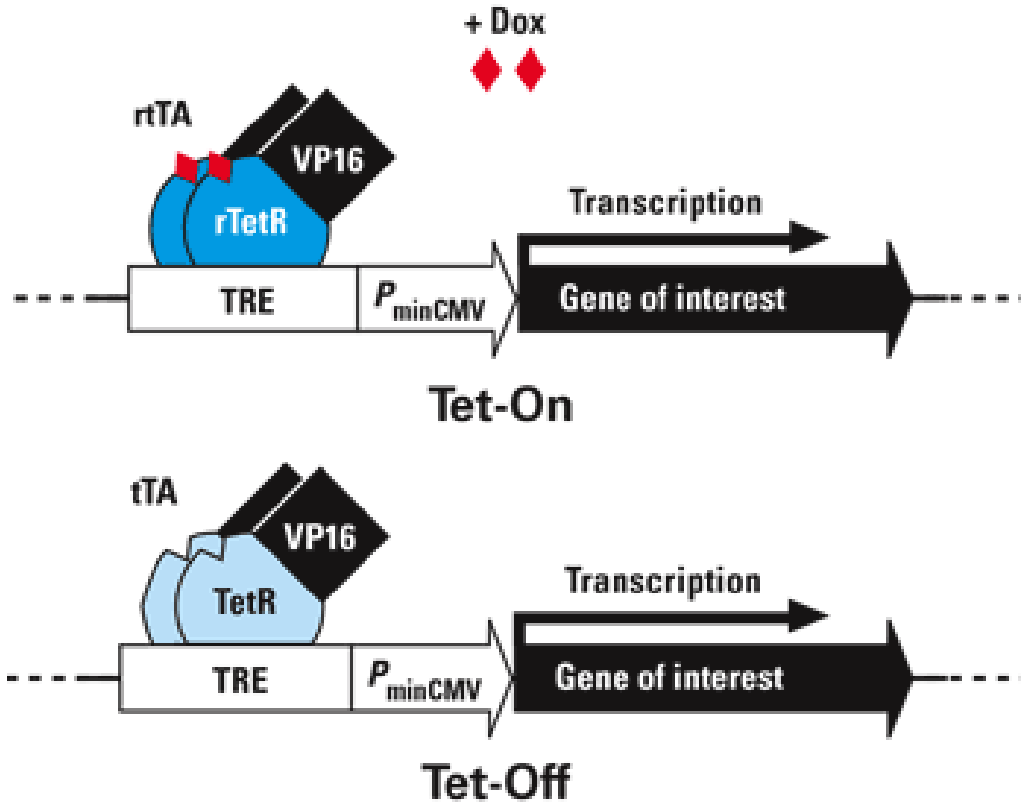
Оптимизация экспрессии генов в клетках млекопитающих

- **Промоторы:**
- – конститутивные: SV40 early < RSV < CMV;

- - индуцибельные:
- **1. Тетрациклиновая система**
- **2. Экдизоновая система**

- Оптимизация трансляции:
- удаление протяженных нетранслируемых областей;
- хороший контекст инициаторного кодона <u>A</u>CC <u>ATG</u> <u>G</u>;
- оптимизация кодонов.

Тетрациклиновая система



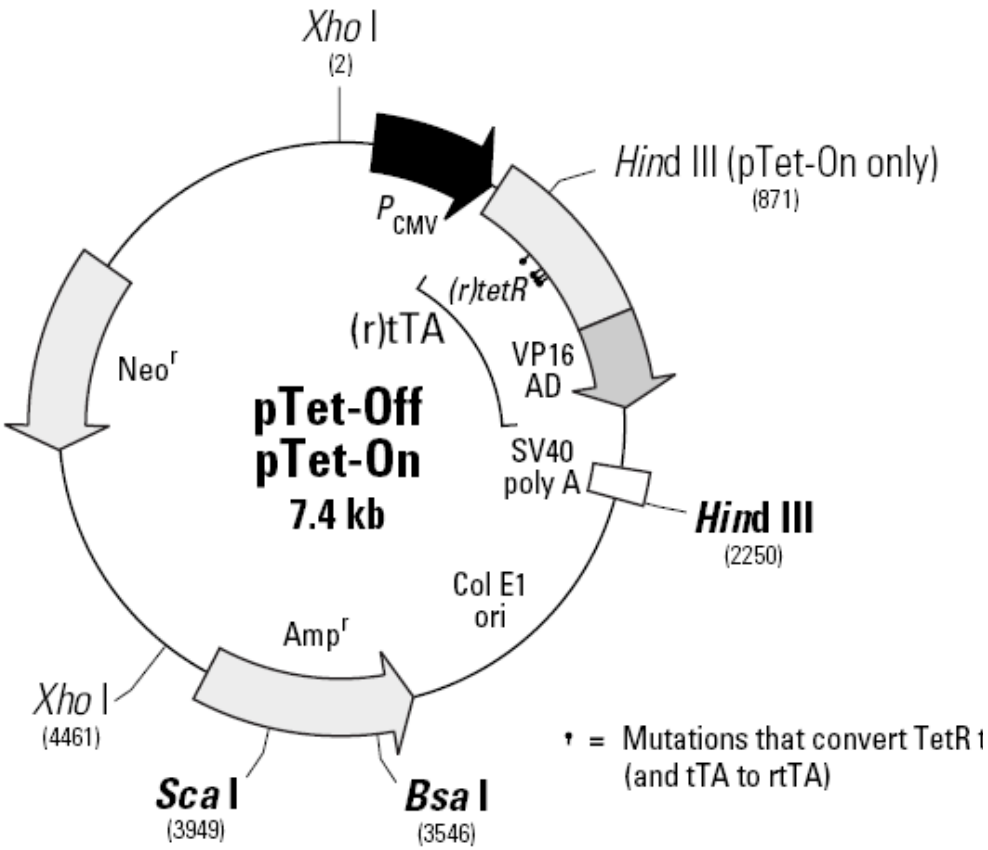
- (T10 транспозон *E.coli,* tetracycline-resistance оперон).

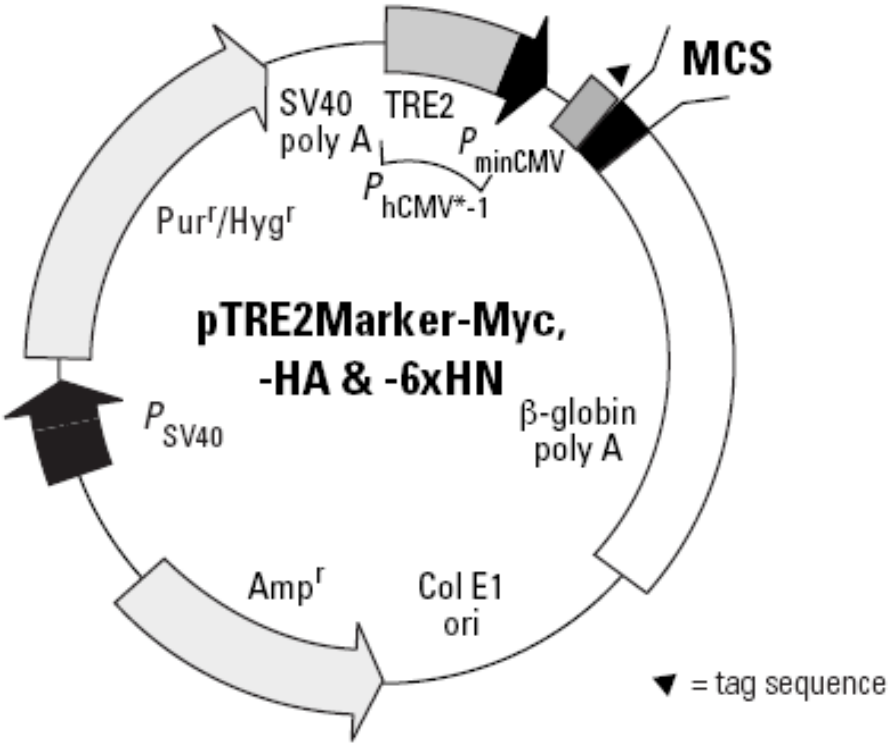
pTRE: **7 x (Tet O) - P_{CMV}- ген- pA**

pTet-off: кодирует TetR – AD VP16 (HSV) - связывается с TetO в отсутствие Tc, активирует транскрипцию гена, при добавлении Tc транскрипция выключается.

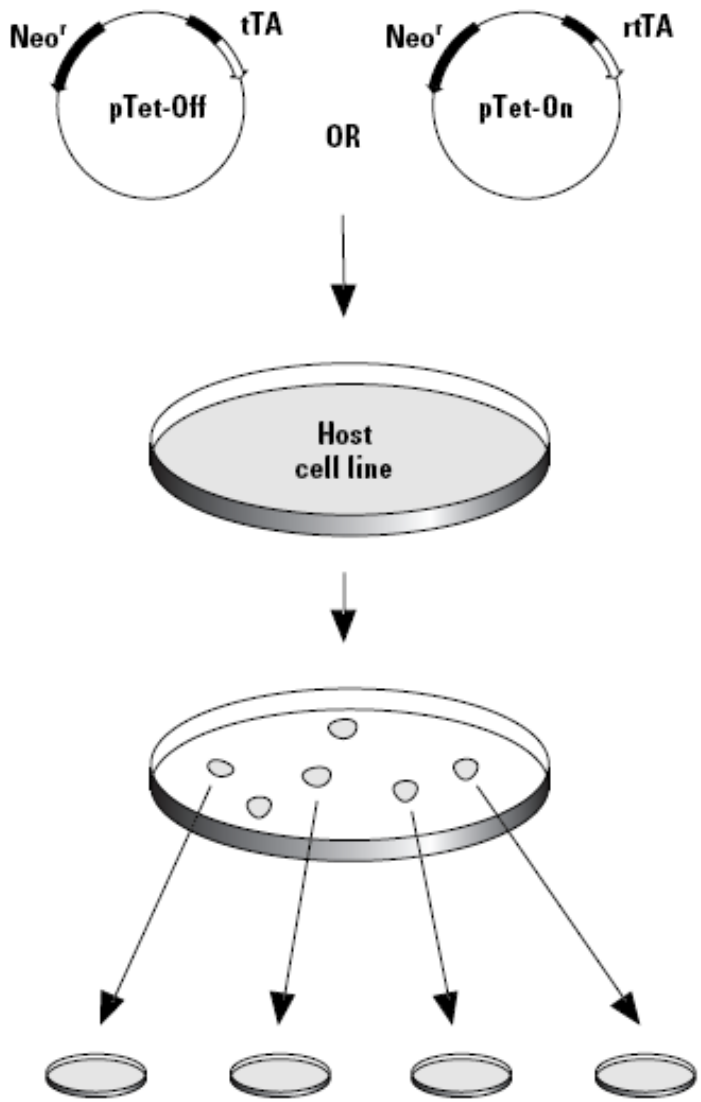
pTet-on: кодирует rTetR – AD VP16; связывается с Tet O в присутствии Tc и активирует транскрипцию.

Плазмиды для тетрациклиновой системы





Конструирование клеточных линий Tet-On/Off



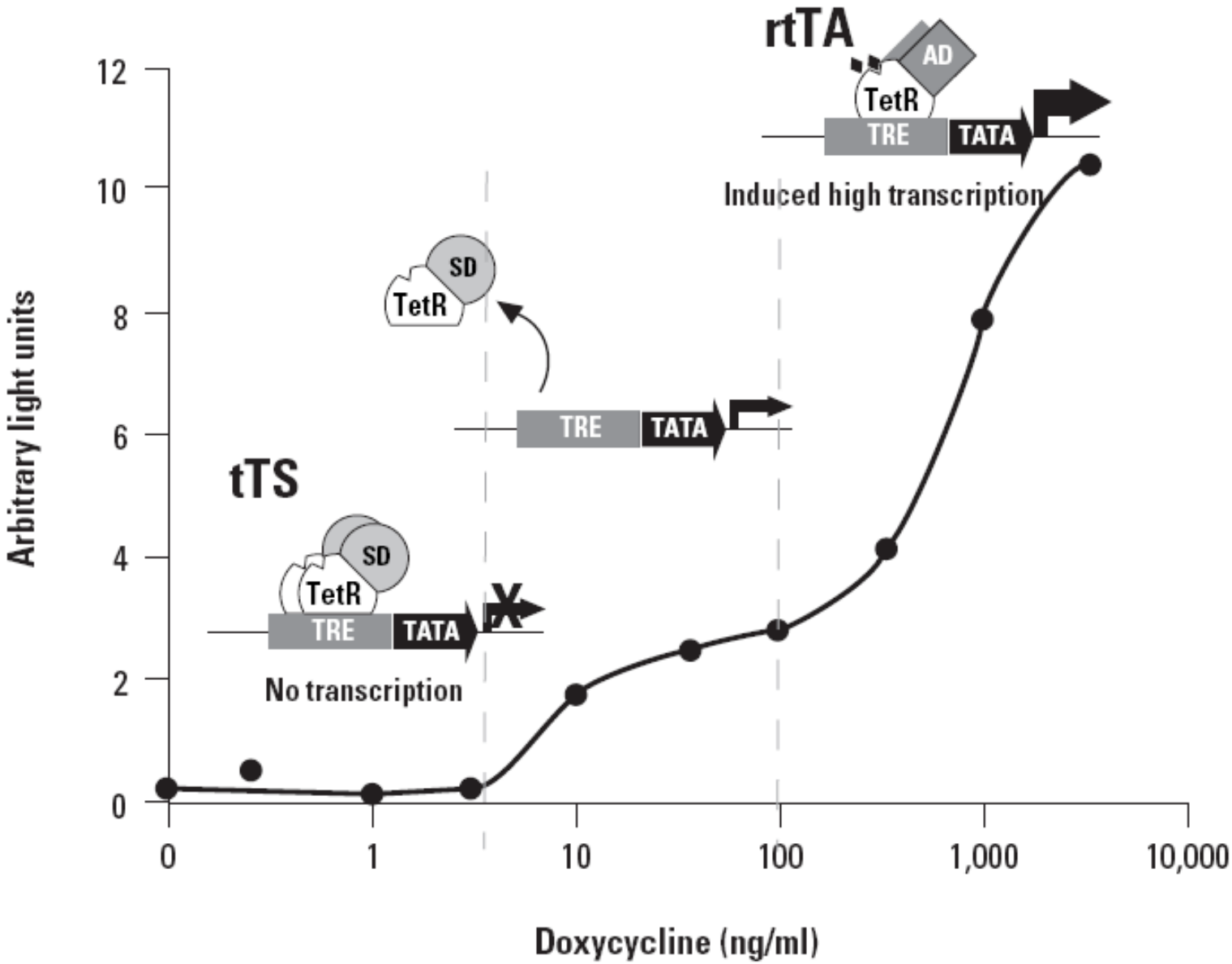
Трансфицировать клетки регуляторными плазмидами pTet-Off или pTet-On;

Селекция с помощью G-418;

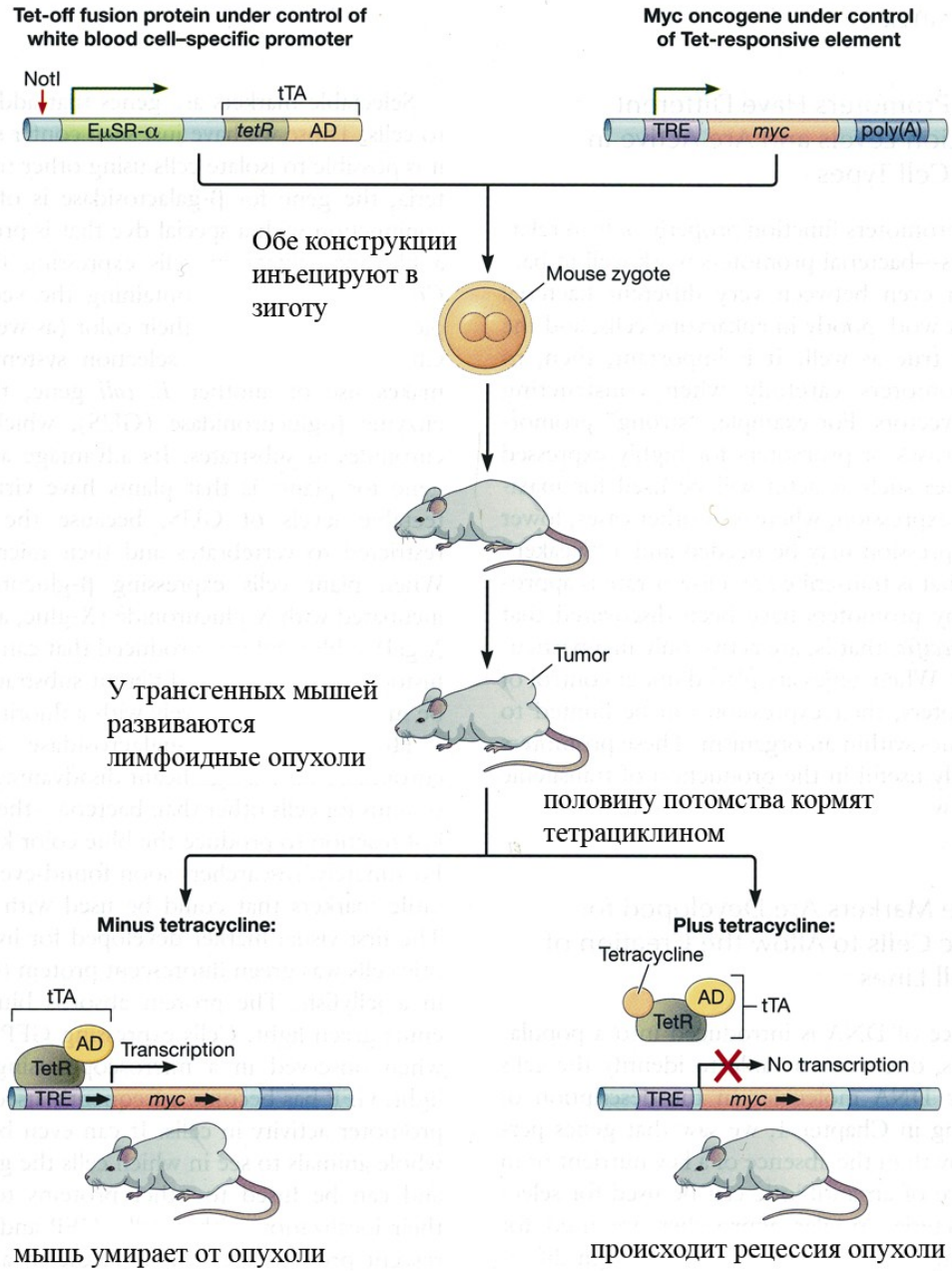
Выделить ряд клонов, устойчивых к G-418;

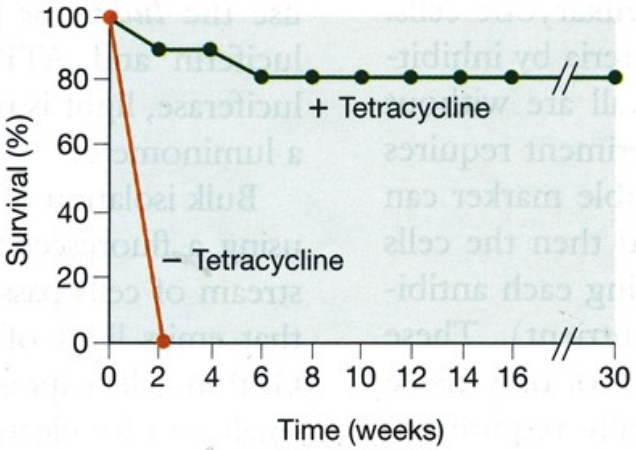
Трансфицировать клоны репортерной плазмидой pTRE2hyg-Luc и скринировать на низкий фоновый уровень и высокую степень индукции люциферазной активности в ответ на тетрациклин.

The pTet-tTS Vector



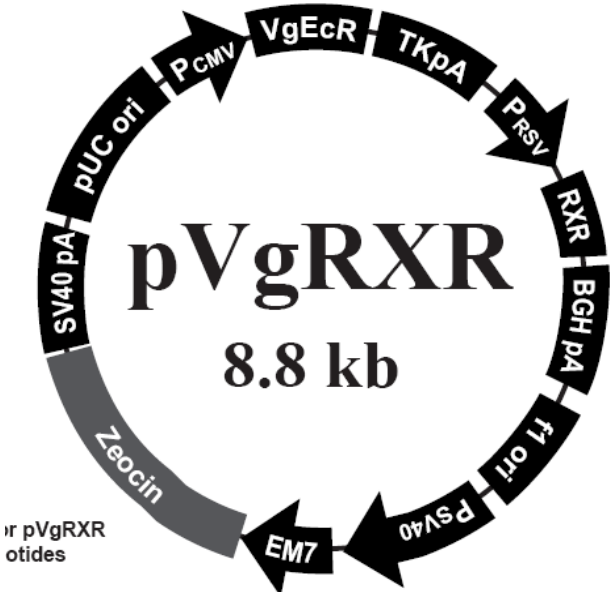
Пример использования тетрациклиновой системы





Экдизоновая система

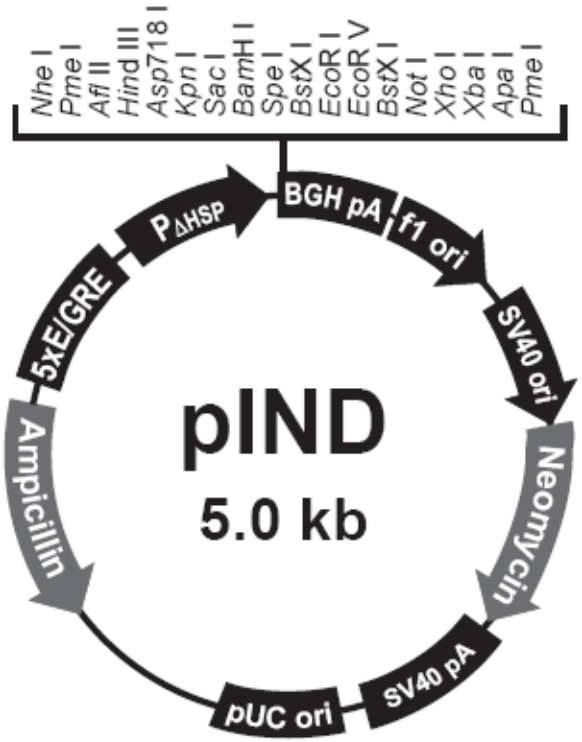
1-ая плазмида **pVgRXR** – конститутивная экспрессия двух субъединиц экдизонового рецептора RXR и VgEcR.



- 2-ая плазмида **pIND** – индуцибельный экспрессионный вектор;
- **5 x E/GRE – P_{HSP} – ген -- pA**

Гибридный ecdyzon-response element — минимальный промотор — терминатор транскрипции

- Индукция аналогами экдизона.

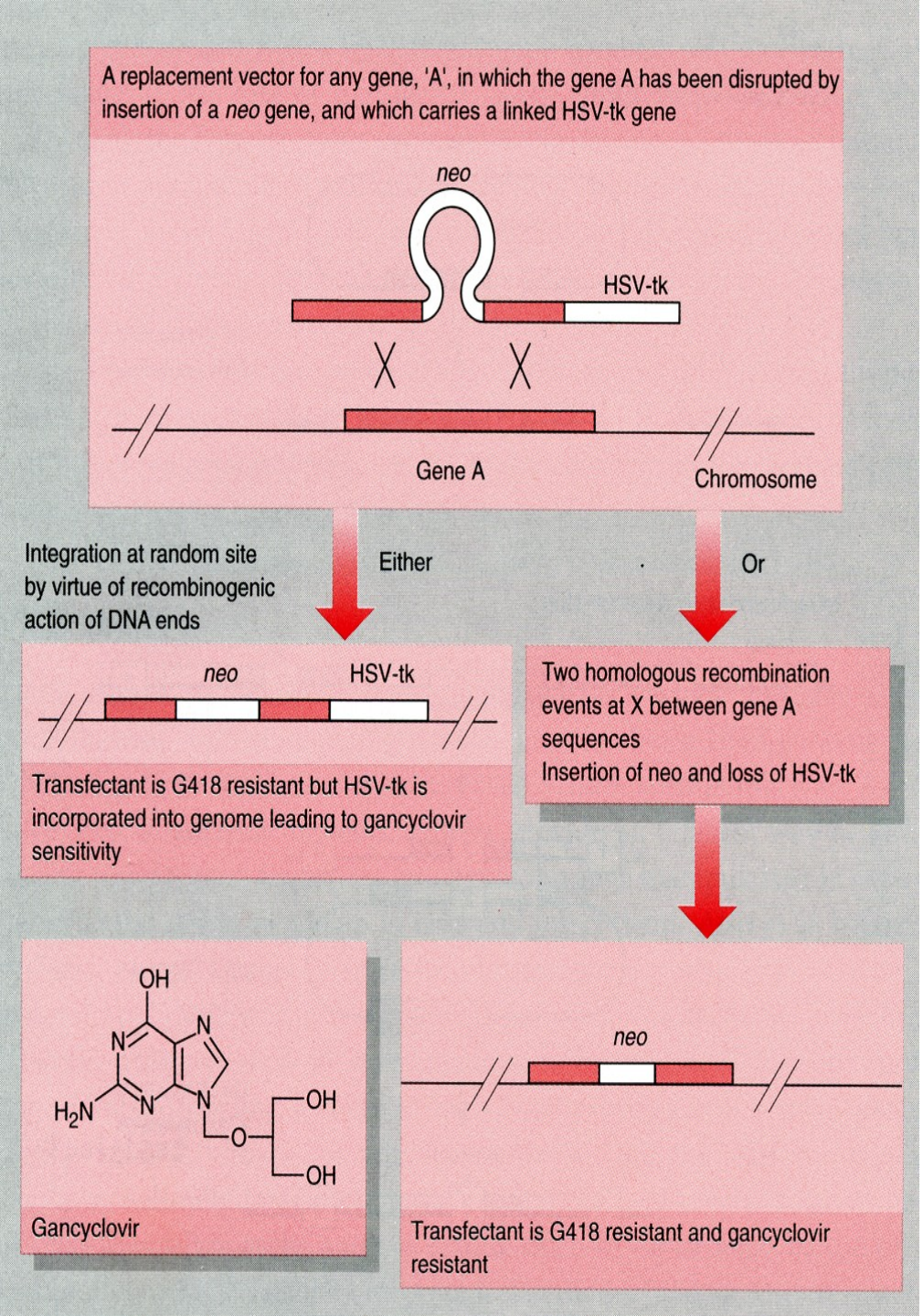


Системы, основанные на гомологичной рекомбинации (gene targeting, knock-out)

- **Селективные маркеры**

- ***Neo*** - (аминогликозид фосфотрансфераза) – УСТОЙЧИВОСТЬ к G-418;
- ***Hygro* -** устойчивость к гигромицину;
- ***Zeocin* –** устойчивость к зеоцину;
- ***DHFR*** – (дигидрофолатредуктаза), устойчивость к метатрексату;
- ***GPT*** - (ксантин гуанин фосфорибозилтрансфераза), устойчивость к микофеноловой кислоте.

- Негативная селекция: ***HSV-tk*;**
- Gancyclovir (FIAU) – нуклеотидный аналог, который селективно убивает клетки, несущие **tk**.
- **DIPA** - ген дифтерийного токсина.



Нокаут в ES клетках

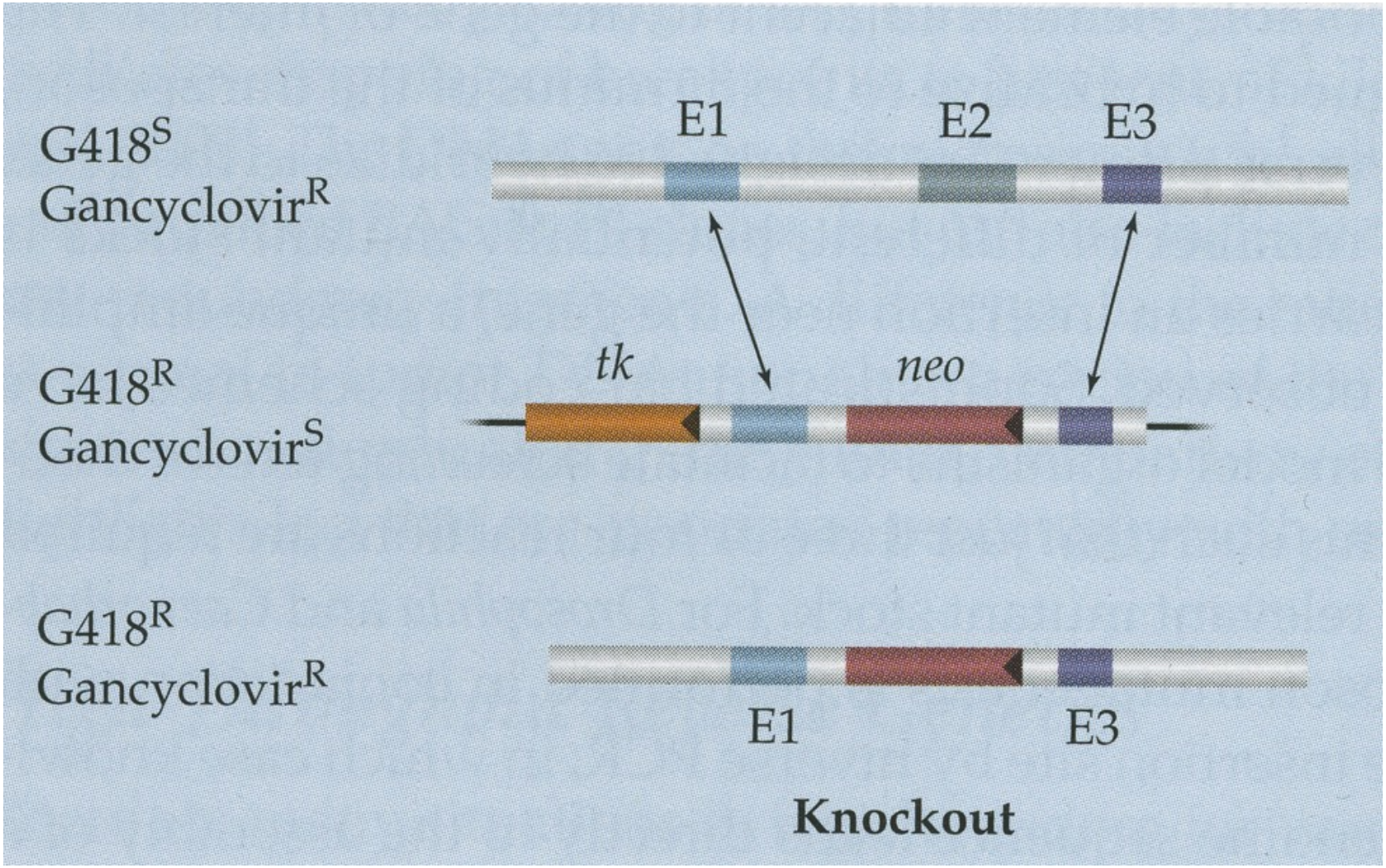
Гомологичная рекомбинация стимулируется свободными концами ДНК.

Случайная интеграция -
(G-418 устойчивость, gancyclovir чувствительность);

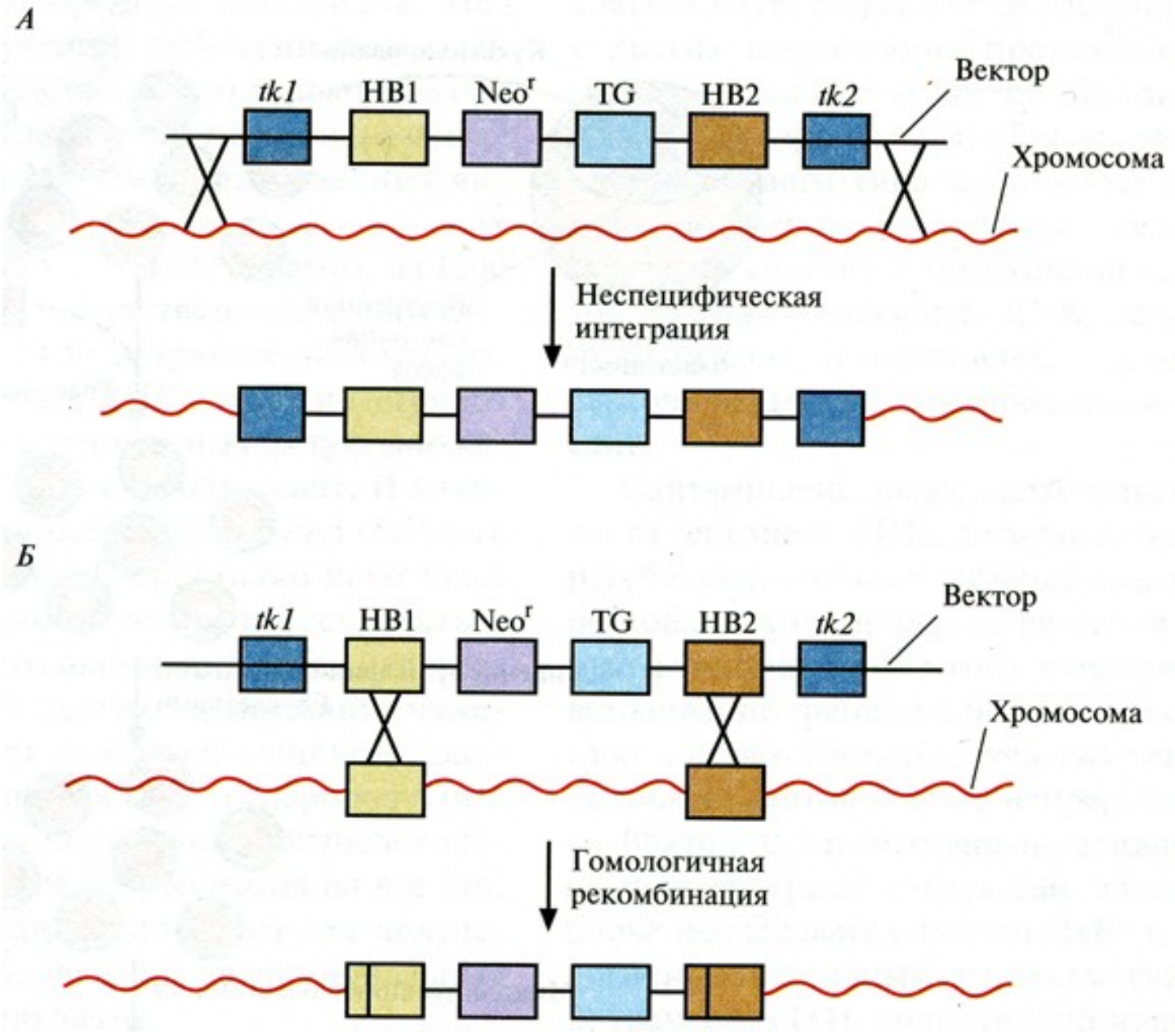
Гомологичная рекомбинация (замещение аллеля) (G-418 и gancyclovir устойчивость).

Нужно провести селекцию на два акта ГР (негативно – позитивная).

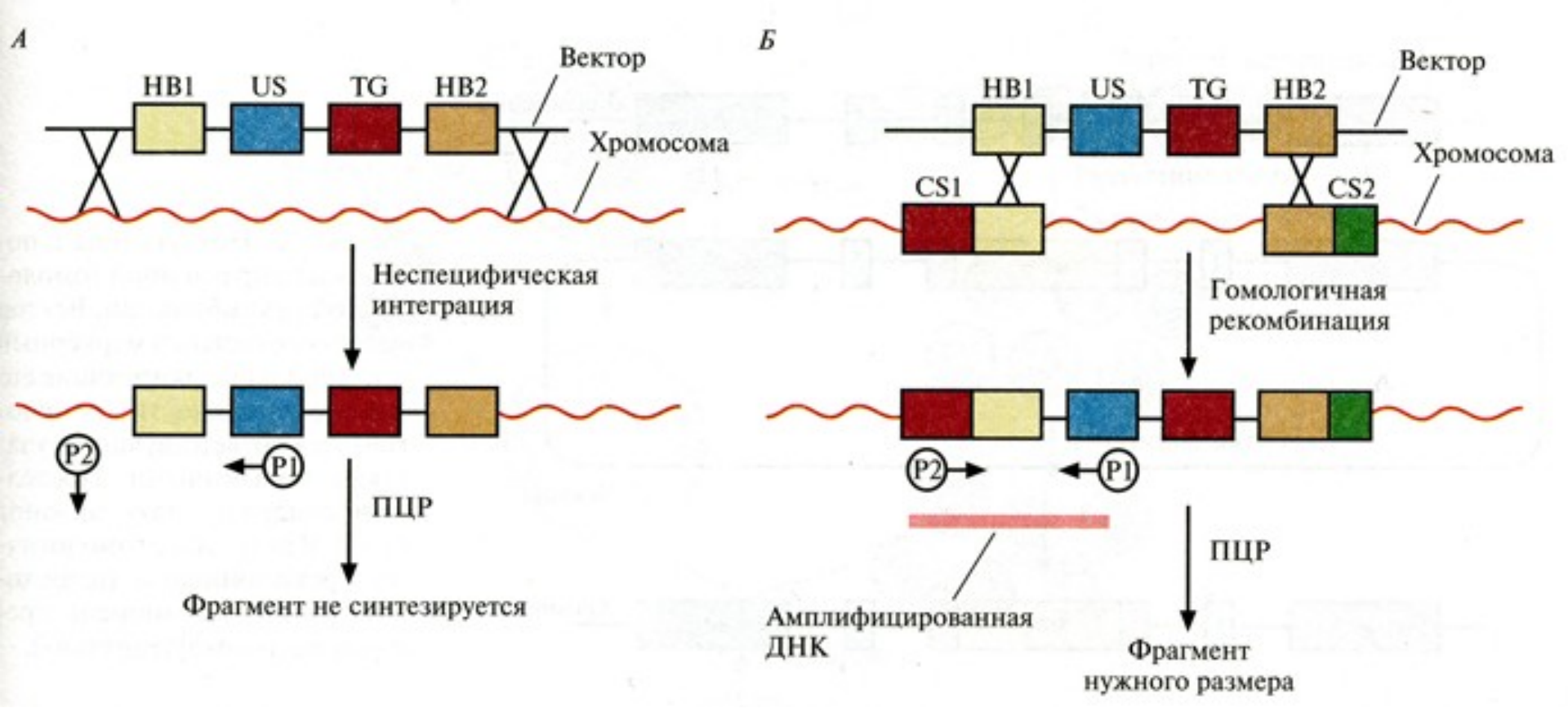
Нокаут

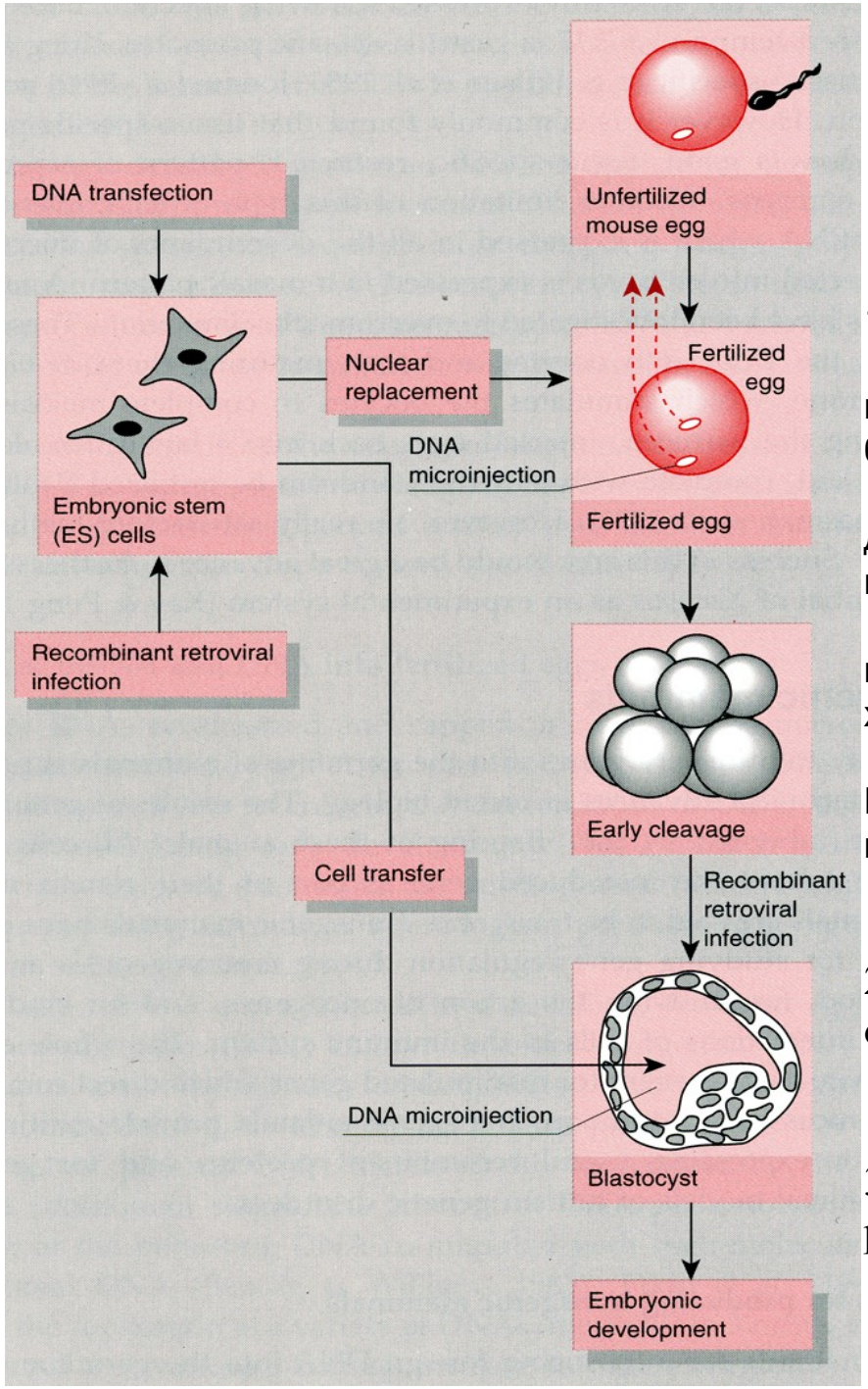

G418S
Gancyclovir R
E1
E2
E3
G418R
Gancyclovir S
tk
neo
G418R
Gancyclovir R
E1
E3
Knockout

Gene targeting



Идентификация клеток, несущих трансген в специфическом сайте, с помощью ПЦР





Трансгенная мышь

1. ES культура

переносят в эмбрионы мыши на стадии бластоцисты;

дифференцировка ES клеток, часть половых клеток несет введенную мутацию (мозаичные мыши);

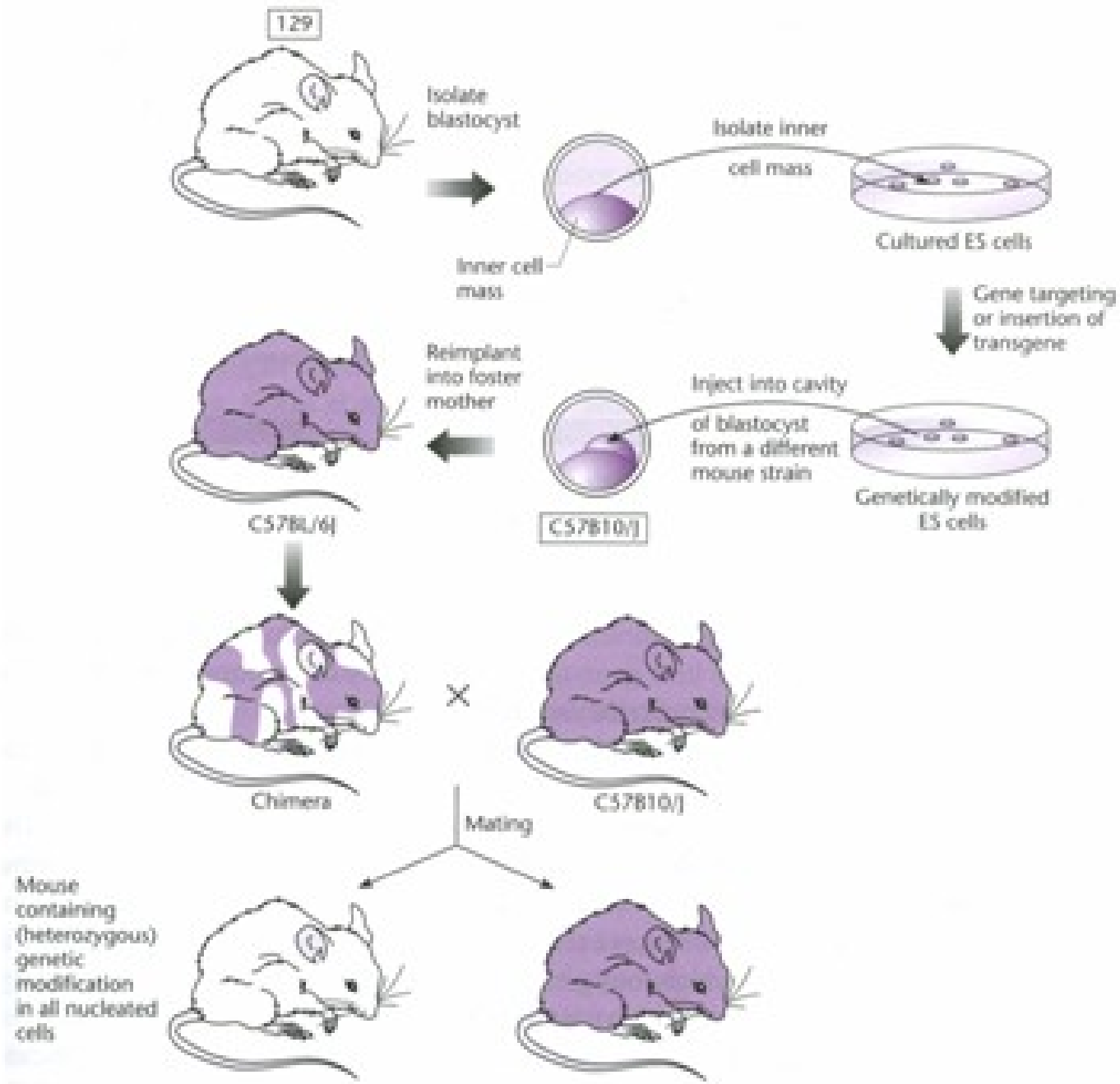
их потомство гетерозиготно по трансгену (ПЦР ДНК хвоста).

При скрещивании гетерозиготных мышей получают гомозиготные по данной мутации мыши.

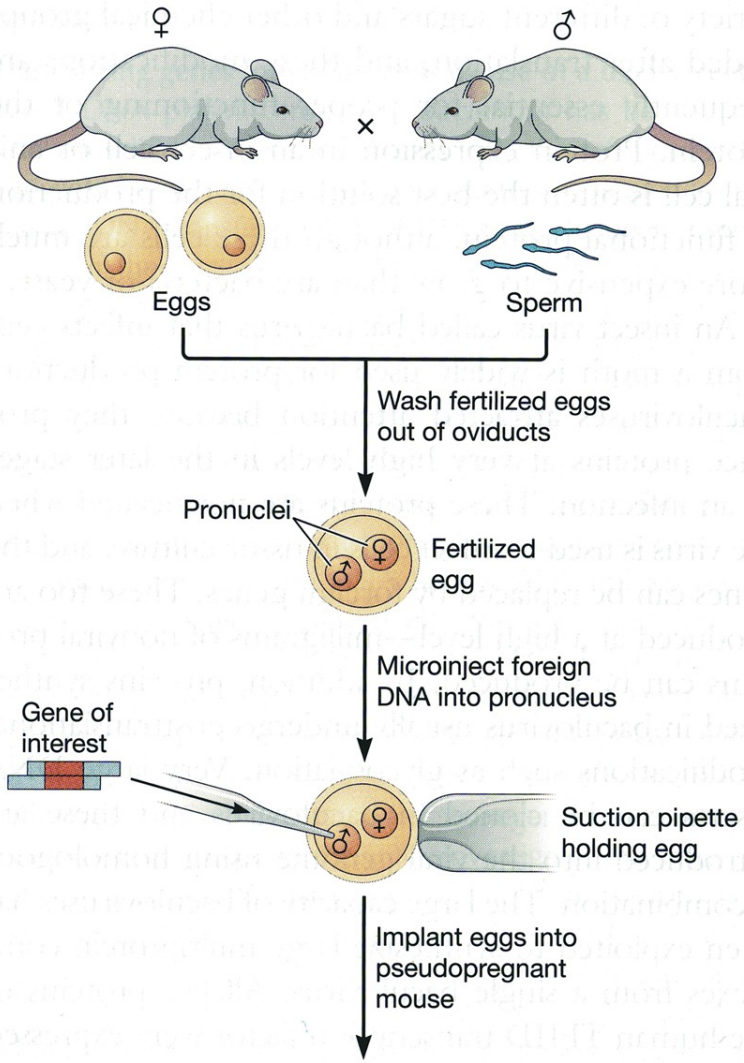
2. Микроинъекция ДНК в оплодотворенное одноклеточное яйцо;

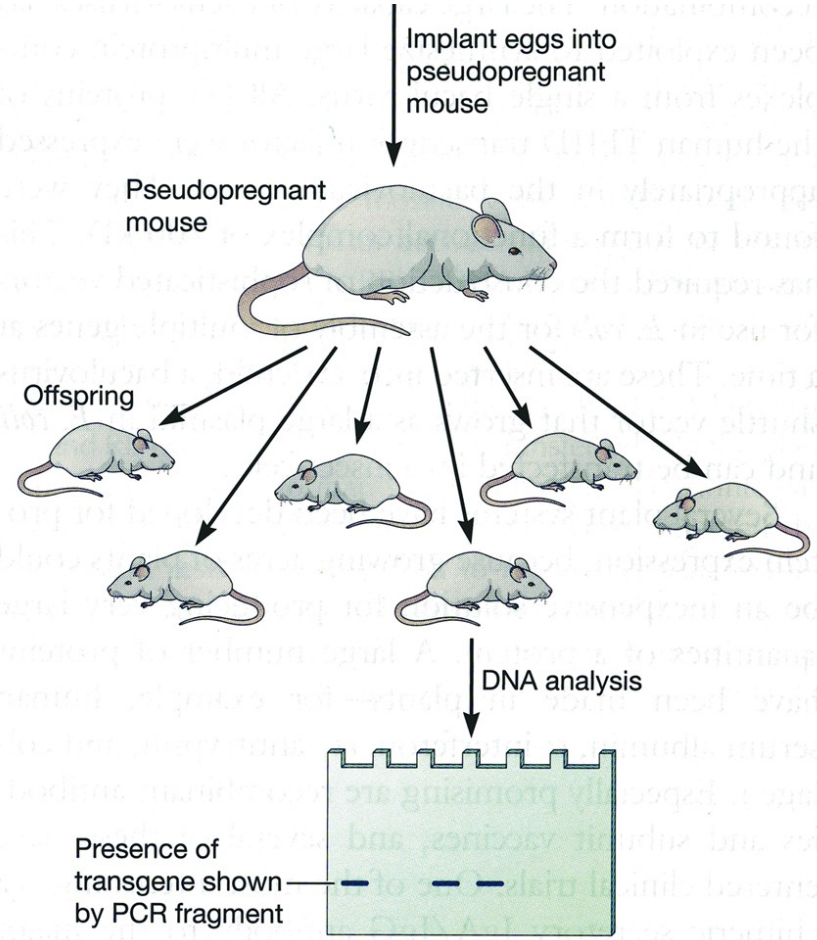
3. Инфицирование эмбрионов рекомбинантными ретровирусами, затем имплантация.

Трансгенная мышь

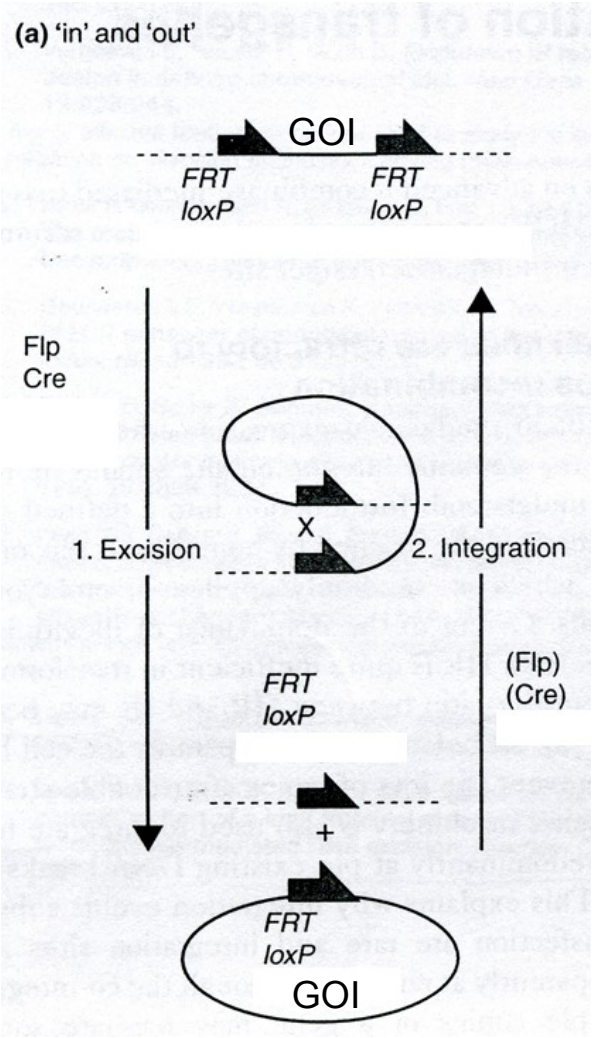


Инъекция ДНК в ядро





Системы специфической рекомбинации: Cre-lox, Flp-frt.

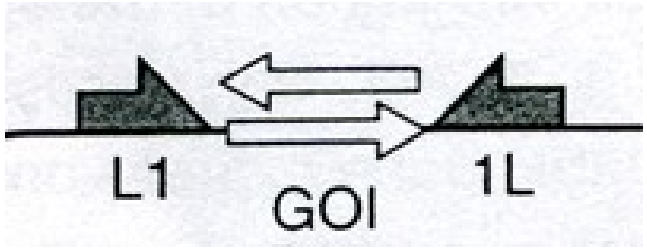


Фаг P1: **Cre** (causes of crossing over) – рекомбиназа,
loxP - инвертированный повтор (13 bp инвертированные повторы и 8 bp центральная область).

Дрожжи**:** **FLP** – рекомбиназа,
FRT – инвертированные повторы.

Условный нокаут (conditional gene inactivation):
Скрещивание с трансгенной мышью (**Cre/FLP** под контролем индуцибельного промотора).
Индукция приводит к делеции гена GOI.

Инверсия



Условный нокаут

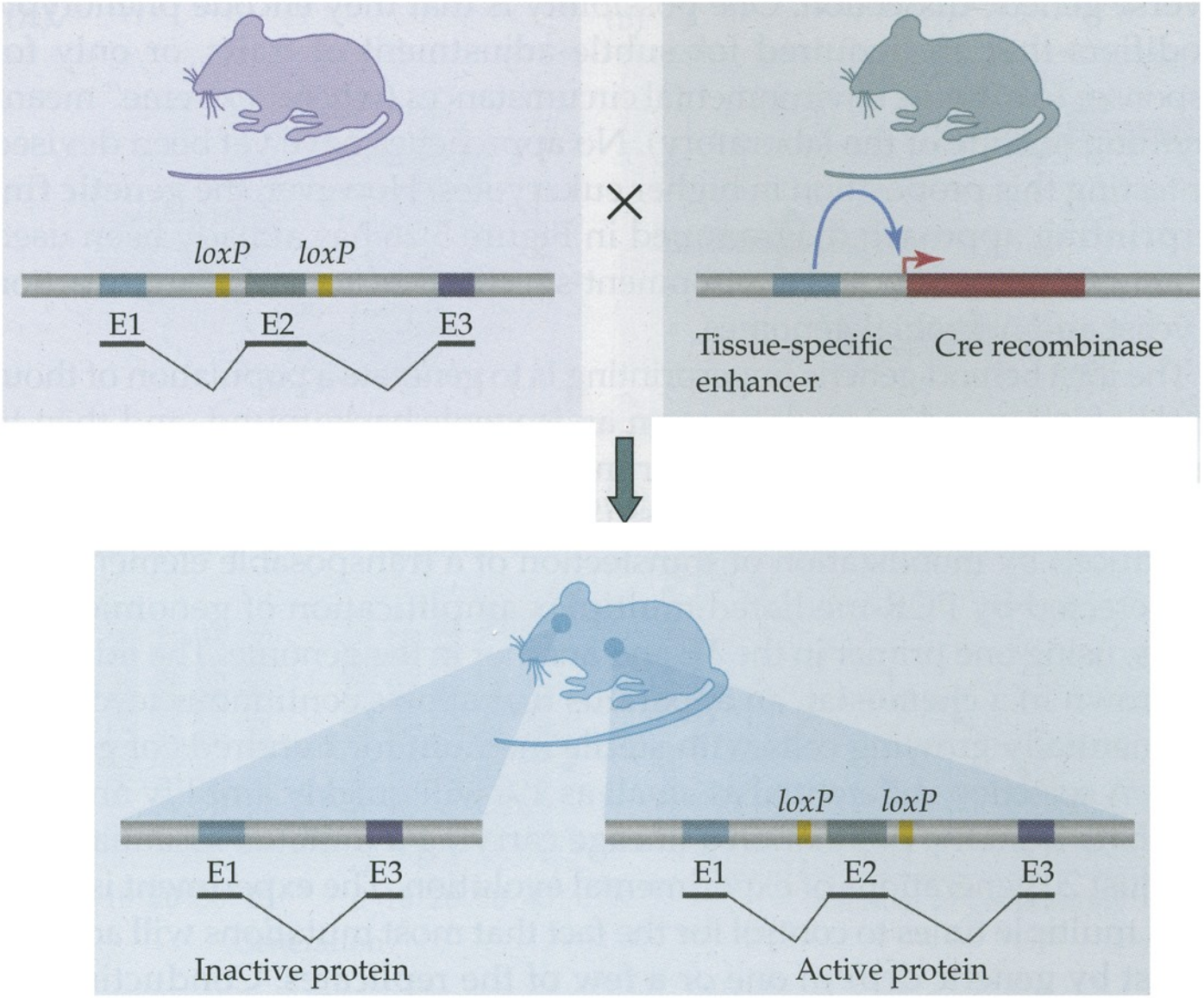
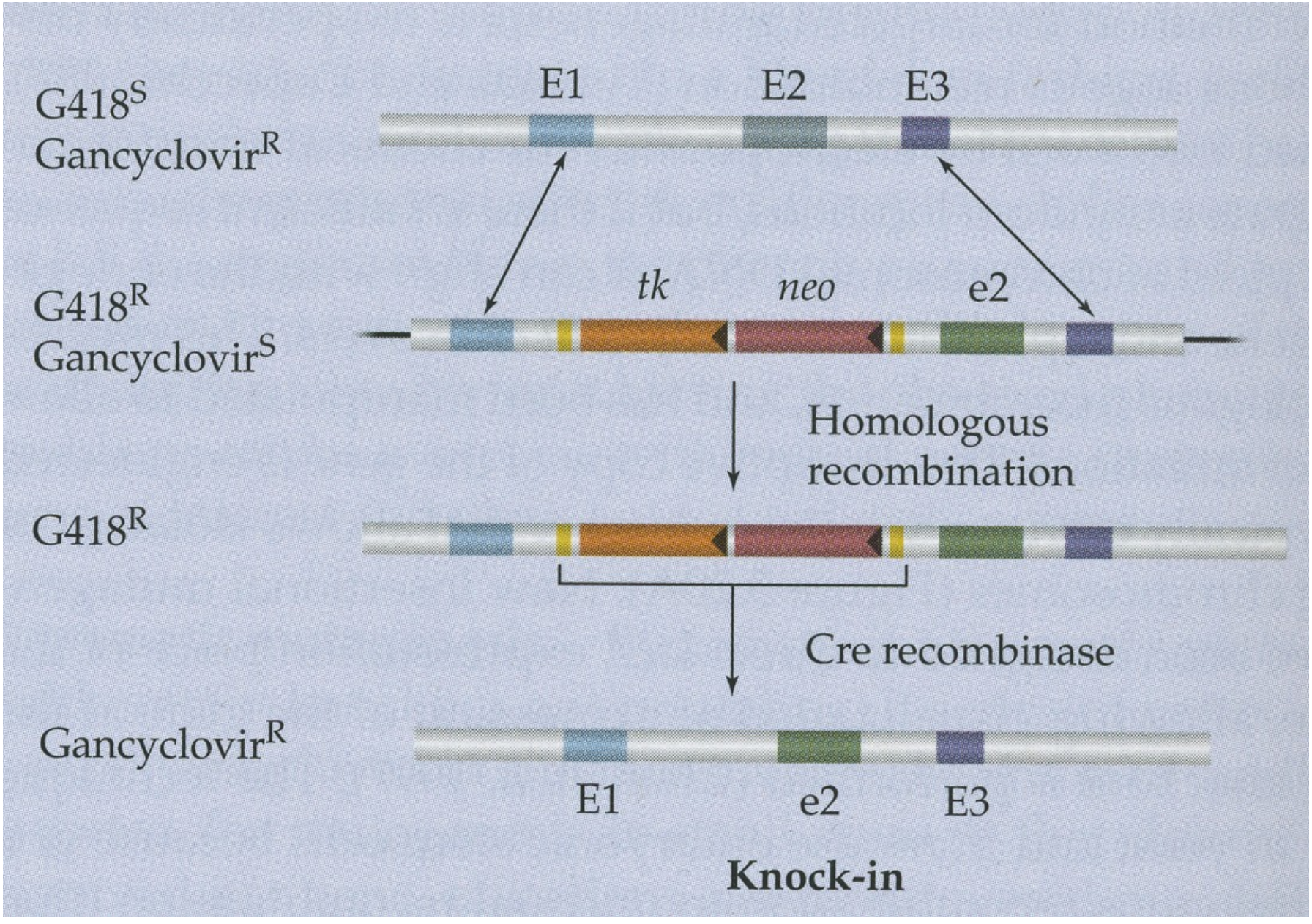
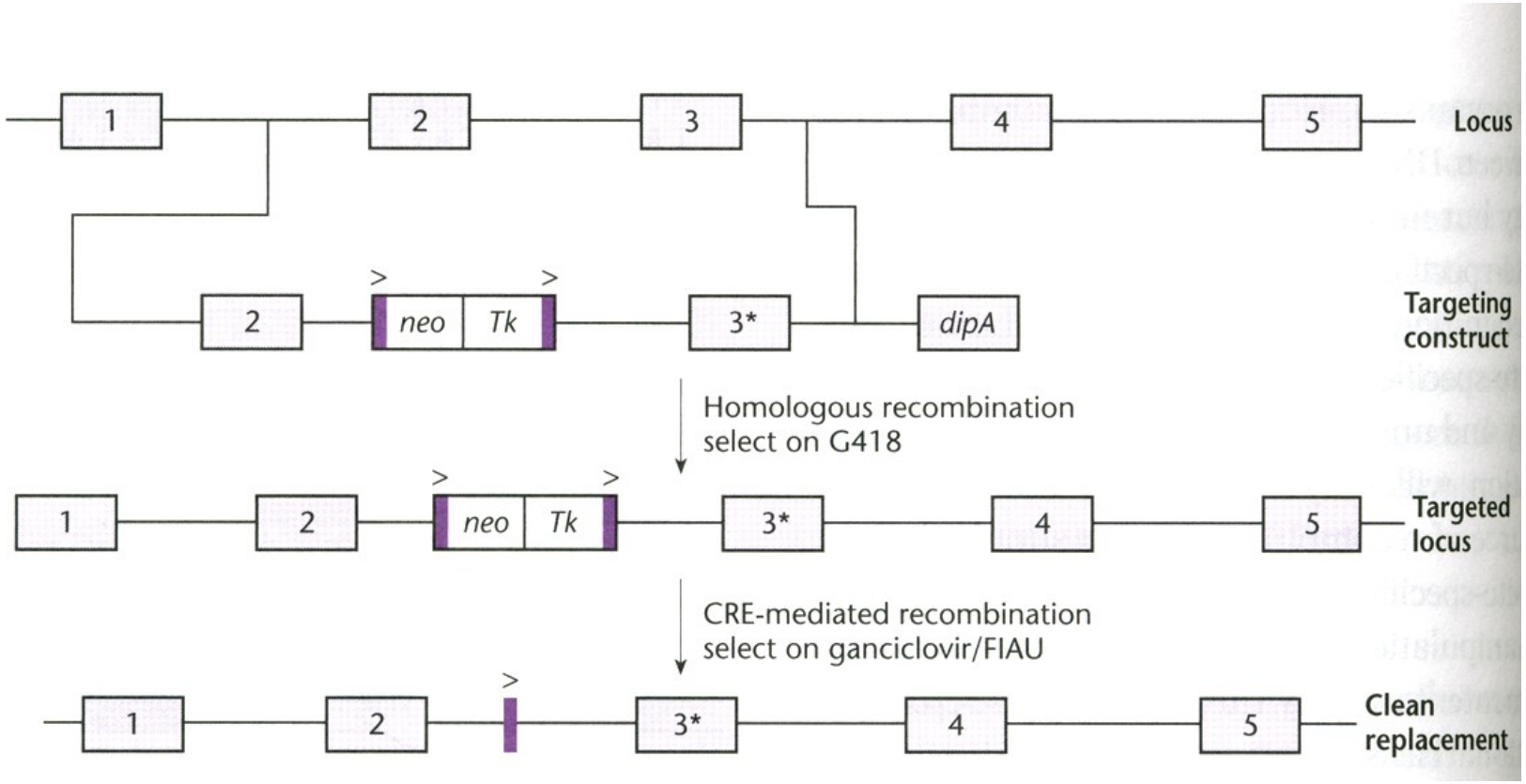


Figure 5.25 Floxing mice.

Knock - in


G418S
Gancyclovir R
E1
E2
E3
G418R
Gancyclovir S
tk
neo
e2
Homologous
recombination
G418R
Cre recombinase
Gancyclovir R
E1
e2
E3
Knock-in

Gene targeting followed by marker excision

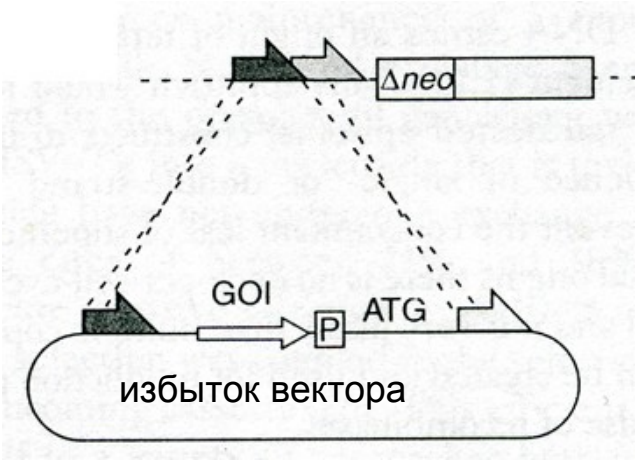
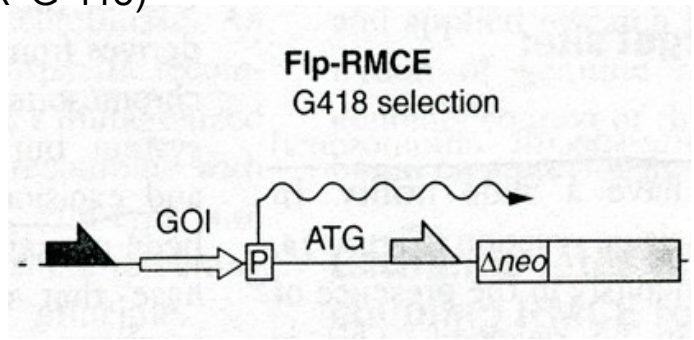


> - loxP сайты;

Удаление маркеров идентифицируют с помощью негативной селекции (Tk)

Интеграция в уникальный сайт (RMCE, recombinase-mediated cassette exchange)

Негативная селекция (устойчивость к gancyclovir)



“Promoter trap”
Позитивная селекция (устойчивость к G-418)