

Szomatikus géntranszfer lentivirális vektorral

Kirizs Tekla oh.¹, Szilágyi Tibor², Sümegi Máté³, Nusser Zoltán³

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, ¹Általános Orvosi Kar, ²Élettani Tanszék,

³Magyar Tudományos Akadémia, Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI), Celluláris Idegéletani Kutatócsoport, Budapest

Transfer somatic de gene cu vectori lentivirali

Manipularea farmaco-genetică a sistemului nervos central combină cu succes acțiunea rapidă a aplicării selective a medicamentelor cu specificitate de regiune și tip celular a transferului somatic de gene. Dezvoltarea rapidă a efectelor induse de medicamente previne schimbarea expresiei compensatorii de gene acompaniată cu înlocuire de gene. În experimentele noastre vrem să schimbăm funcțional alela floxat și insensitiv la Zolpidem a subunității γ_2 a receptorului GABA_A în bulbul olfactiv al unui șoarece transgenic cu coexpresia subunității tipului sălbatic cu recombinaza Cre. În prezența benzodiazepinelor funcția celulelor țintă va fi alterat selectiv, asigurând o metodă nouă pentru testele comportamentale. Ca parte a acestui studiu am subclonat cu succes gena Cre într-un sistem lentiviral de expresie de gene și am injectat particulele expresând Cre în regiunea CA3 a hipocampusului la șoareci. Expresia de Cre a fost detectat prin imunohistochimie, indicând structura intactă a recombinazei Cre exprimate.

Cuvinte cheie: farmaco-genetică, Cre-recombinază, receptor GABA_A, rețea neuronală

Somatic gene transfer by lentiviral vectors

Pharmaco-genetic manipulations of the CNS successfully combine the rapid action of selective drug applications with the region- and cell type-specificity of somatic gene transfer. The fast onset of the drug-induced effects also circumvents the compensatory gene expression changes accompanied with gene replacements. In our experiments we aim to functionally replace the floxed zolpidem-insensitive allele of GABA_A receptor γ_2 subunit in the olfactory bulb of a transgenic mouse by co-expressing the wild type γ_2 subunit with Cre-recombinase. In the presence of benzodiazepines the functions of the targeted cells will be selectively altered, providing a plausible platform for behavioural tests. As part of this study I successfully subcloned the Cre gene into a lentiviral gene expression system and injected Cre expressing particles into the CA3 region of the mouse hippocampus. The Cre expression was detected by immunohistochemistry, indicating the intact structure of the expressed Cre-recombinase.

Keywords: pharmaco-genetics, Cre-recombinase, GABA_A receptor, neuronal network

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (2): 115-120

www.orvtudert.ro

Egy hálózat működésének megismeréséhez szükséges az alkotó elemeinek funkcionális elkülönítése, és az egyes elemek izolált szerepének tisztázása. Erre egy lehetséges mód, ha módosítjuk egy kérdéses elem működését, majd a megváltozott működés hatásaiból következtetünk eredeti funkciójára. A neuronális hálózati elemek működése többféle képpen is megváltoztatható, például genetikai vagy farmakológiai módszerekkel, vagy ezek kombinációjával.

A *genetikai módszerek* általánosan használhatók, hiszen bármely fehérje működése megváltoztatható valamilyen módon, kódoló génjének átrendezésével. A módszer azonban gyakran súlyos korlátokba ütközik. Egyszerűbb esetben a genetikai változástól eredő megváltozott funkció már a korai egyedfejlődéstől kifejti hatását, de még az indukálható rendszerek esetében is, az újonnan indukált fehérje teljes mértékű expressziójához szükséges idő elegendő lehet más gének kompenzációs jellegű génexpressziós változásainak beindulásához. Ez végső soron egynél több funkció egyidejű változását okozza, ami a kísérleti eredmények kiértékelését nehezkesé teszi.

Ezzel szemben, a *farmakológiai módszerek* specifikusan a célfehérje működését megváltoztató kémiai anyagokat alkalmaznak, melyek igen gyorsan és gyakran reverzibilisen hatnak, de mégsem alkalmazhatóak általánosan, mivel a specifikusan ható farmakonok száma korlátozott. Ezenkívül problémát jelenthet a farmakonok célzott, sejttípus-függő és anatómiailag lokalizált célbajuttatása is.

A *farmako-genetikai eljárások* ötvözik a farmakológiai

beavatkozások gyors kinetikáját a szomatikus genetikai módszerek időben és térben lokalizált alkalmazhatóságával, illetve sejttípus specificitásával. Egy lehetséges farmakogenetikai kísérleti elrendezés az, ha létrehozunk egy olyan lokalizált genetikai változást, amely fenotipikus szinten hatóanyag adása nélkül nem manifesztálódik, de farmakon adagolásával a célfehérje és azon keresztül az idegsejt működése megváltoztatható. A módszer alkalmazhatóságát sajnos szűkíti az a tény, hogy csak olyan fehérjék vizsgálhatók ilyen módon, amelyekre létezik specifikusan ható farmakonok.

Munkánk során az egéragy szaglógumójának neuronális hálózataiban a GABAerg gátlósejtek szerepét szeretnénk farmako-genetikai módszerekkel vizsgálni. Választásunk azért esett a szaglógumóra, mert viszonylagos szerkezeti és funkcionális egyszerűsége révén könnyebb a központi idegrendszer alapvető hálózati funkcióinak feltárása. A GABA (γ -amino-vajsav) az emlős központi idegrendszer fő gátló neurotranszmittere mely ionotróp GABA_A és metabotróp GABA_B receptorokon fejti ki a hatását. Az ionotróp GABA_A receptoroknak eddig összesen 19 alegységét írták le [7]. A funkcionális csatornák heteropentamer szerkezetűek, és általában három különböző alegységtípus építi fel őket. A leggyakoribb elrendezés az $[\alpha_{1-6}]_2[\beta_{1-3}]_2[\gamma_{1-3}]_1$ sztöchiometriai képlettel írható le, de egyes esetekben a γ alegységet a δ , ϵ , vagy π , míg a β alegységet az θ alegység helyettesítheti [14, 5, 3]. Munkánk során kihasználtuk, hogy a GABA_A receptorok nyitási frekvenciáját megnövelhetjük benzodiazepinek adagolásával, ami a megnövekedett Cl⁻ áramok hatására a célsejt hiperpolarizációjához vezet [11]. A benzodiazepinek az $\alpha_{1,2,3,5}$ és a γ_{1-3} alegységek által közösen létrehozott kötőhelyeken hatnak [15]. Az általunk használni kívánt zolpidem hatásához a GABA_A receptorban gyakran előforduló γ_2 alegység szükséges [20]. A fentiek alapján a

Kirizs Tekla,

525400 Kézdivásárhely – Târgu Secuiesc

str. Csernátoni 8/4/c/1

e-mail: tekla.kirizs@gmail.com

γ_2 alegység benzodiazepinnel történő farmako-genetikai manipulációjától, céljainknak megfelelően robusztus élet-tani hatás kiváltását várjuk.

Kísérleteinkhez azért választottuk az egér fajt, mert a patkánnyal ellentétben, ebben a fajban megoldott az őssejtekből történő egyed-klónozás, lehetőséget adva összetett genetikai elrendezések létrehozására. Az általunk használt egértörz-sben a GABA_A receptor γ_2 alegység, a vad típustól eltérően, benzodiazepin érzéketlen pontmutáns (77. aminósavat izo-leucinről fenil-alaninre cserélték) alléljának egy nélkülözhetetlen exonját, azonos állású *loxP* inszerciók veszik körül [4]. Mivel ez a két darab transzgénikus technikával bevitt rövid inszerció intron szekvenciákban helyezkedik el, fenotipikus változást nem okoz. Amennyiben ezen mutáns állat bizonyos sejtjei a *loxP* szekvenciákra specifikus Cre rekombinááz fehérjét expresszálják, akkor a benzodiazepin inszenzítív γ_2 alegység génjének funkcióvesztést okozó részleges deléciója következik be. Ha a Cre enzim termeltetése mellett azt is meg tudjuk oldani, hogy a genetikai manipuláció egy vad típusú (benzodiazepin érzékeny) γ_2 alegységet is bevigyen a megfertőzött sejtek genomjába, akkor a vad típusú allél átveszi a törölt mutáns allél szerepét, és így a genotípus változása permisszív körülmények között fenotipikusan nem jelenik meg, azaz az állat normális viselkedést mutat. Restriktív körülmények hatására, azaz benzodiazepin adásakor, az állat sejtjeinek többsége nem fog reagálni, de a megcélzott sejtek benzodiazepin érzékenyek lesznek.

Alapvető célunk, hogy az egér szaglógumó szomatikus géntranszferrel megcélzott sejtjeiben a benzodiazepin érzéketlen GABA_A receptorokat benzodiazepin érzékeny receptorokra cseréljük ki. Ebben az esetben benzodiazepin adása nélkül nem tapasztalhatunk élettani változást, és a megváltozott genotípusú sejtekben a homeosztázis fenntartására irányuló kompenzációs génexpressziós változások sem indulnak be. Benzodiazepin adagolására viszont, a megcélzott sejtekben, és kizárólag a megcélzott sejtekben, megnövekedett gátlást válthatunk ki, aminek a szaglás neuronális hálózataira gyakorolt hatását szagdiszkriminációs viselkedési tesztekkel, illetve retrospektív *in-vitro* elektrofiziológiai és anatómiai kísérletekkel értékelhetjük ki.

A kívánt genetikai változás kialakításához az *Escherichia coli* P1 bakteriofágjának Cre/*loxP* rekombinációs rendszerét használjuk, amely emlős sejtekben is képes helyspecifikus homológ rekombinációra [13]. A Cre rekombinááz enzim a DNS-en található két 34 bp hosszú felismerési helye (*loxP*) között hoz létre rekombinációt [17, 18]. A *loxP* szekvencia középső nyolc bázispárja nem palindromikus, így e rekombinációs szignálok irányultsággal rendelkeznek. Ha a két szignál a DNS szálon egymással szemben áll, akkor a Cre enzim a körbevett szekvencia reverzibilis inverzióját és reverzióját okozza, míg ha a szignálok azonos állásúak, akkor a közrefogott régió az enzim hatására egy gyűrű alakú DNS molekulát képezve kihurkolódik. A kihurkolódott darab idővel elvész, ami az így létrehozott deléciót irreverzibilissé teszi [9].

A Cre rekombinááz enzim és a vad típusú γ_2 alegység génjeinek random genomális inszercióját és e fehérjék

expresszióját a retrovírusok családjába tartozó lentivirusokon alapuló második generációs ön-inaktiváló [10] géntranszfer vektorokkal szeretnénk megoldani. Ezek képesek megfertőzni osztódó és nem osztódó, posztmitotikus sejteket [10, 19], illetve lehetővé teszik a szállított exogén hatásos genomi integrációját [6]. Ahhoz, hogy replikáció képtelen, de géntranszferre alkalmas lentivirális partikulum alakuljon ki, az alapul szolgáló humán immundeficiencia vírus (HIV-1) replikatív funkcióit kódoló genomi szekvenciáit törölték, és a géntranszferhez feltétlenül szükséges géneket két plazmidra osztották szét [10].

A pakoló vektornak nevezett plazmid a külső (kapszid-), belső (core-) proteineket és a géntranszferhez szükséges enzimeket kódoló nukleinsav-szekvenciákat (*gag*, *pol*, *rev*) tartalmazza [10].

A transzfer plazmid a megmaradt virális elemeken kívül a transzgén expressziós kazettáját (promóter, transzgén) és exogén eredetű cisz-aktíváló szekvenciákat tartalmaz. A virális szekvenciákat határoló HIV-1 LTR (long terminal repeat) szekvenciák három részből állnak (U3, R, U5) és többek között a provírus genomális integrációjában, illetve a virális replikációban van szerepük. Az 5' LTR U3 régió Tat fehérje felismerési szekvenciáját egy citomegalovírus (CMV) promóterre cserélték, amely a virális gének Tat független expresszióját teszi lehetővé [8]. Ezáltal a *tat* gén törölhető volt a HIV-1 genomból, ami a transzfervektor befogadóképességének növekedésével és virulenciájának csökkenésével járt. A továbbgyűrűző fertőzési ciklusok megakadályozására a 3'LTR U3 régióban egy 133 bázispáros deléciót hoztak létre, amely magába foglal egy TATA boxot és több transzkripció faktor kötőhelyét is [8, 23]. Ez a deléció a reverz transzkripció során az 5' LTR templátjaként szolgál, így a genomba beekelődő provírus már mindkét végén egy-egy deléciót hordoz. A két deléció lehetetlenné teszi a további retrovirális transzpozíciókat, illetve fertőzőképes partikulumok termelődését [19, 16]. A deléciók másik hatása, hogy eltűnnek a HIV-1 eredeti szabályozó szekvenciái, így a lentivirális konstrukció expressziós sajátosságai főként a hordozott expressziós kazetta promóterétől függenek [6]. Az előállítható vírustiter növeléséhez az 5'LTR és a transzgén promótere közé beiktatták a HIV-1 flap elemét, amely megnöveli a preintegrációs komplex magi transzlokációjának hatékonyságát [21]. A transzgén mRNS féléletidejének meghosszabbítására a HIV-1 poliadenilációs szignálját az SV-40 vírus large T antigénjének erősebb poliadenilációs szignáljára cserélték [6], illetve beiktatták a harkály hepatitis vírus poszttranszkripcionális szabályzó elemét (WPRE) az mRNS 3' át nem íródó régiójába. Ez utóbbi a virális RNS magi transzportját segítve transzgén-, promóter- és vektor-független módon, megnöveli a lentivirális vektor expressziós szintjét [22]. A vektorban szintén jelen van a HIV-1 psi enkapszidációs szignálja, amelyhez képes kötődni a virion nukleokapszid fehérjéje, lehetővé téve a virális partikulum összeépülését [2].

A lentivirális vektor tropizmusának kiterjesztése érdekében a peploméreket kódoló HIV-1 *env* gént szintén törölték [1], és egy különálló harmadik plazmidról szolgáltatják a

vezikuláris stomatitis vírus G proteinjének génjét (VSV-G), amely számos sejtípus megfertőzését teszi lehetővé. Az így kialakult három plazmidból álló lentivirális rendszer alkalmas a differenciált idegrendszer nem osztódó sejtjeit is transzformálni képes, de replikációra képtelen virális partikulumok létrehozására [10].

Ha humán embrionális vesesejteket (HEK) e három plazmid megfelelően módosított változatával egyszerre transzfektáljuk, olyan víruszerű partikulumokat kapunk, amelyek a megfertőzött sejt genomjába random helyre inszertálják a hordozott Cre rekombinááz és a vad típusú γ_2 alegység génjét, de további fertőzési ciklusra képtelenek. A fehérjék expressziójának lokalizációját a virális injekció helyének és a hordozott transzgén promóterének megválasztásával határozhatjuk meg. Így egy bizonyos agyterületre és azon belül is egy meghatározott sejtípusra tudjuk szűkíteni a genetikai manipuláció kiterjedését és hatását.

A farmako-genetikai beavatkozáshoz szükséges eszköztár létrehozásának első lépése a Cre gént expresszálató lentivirális vektor megépítése, és *in vivo* egér idegsejtben való tesztelése volt. Ennek részeként immunhisztokémiai jelöléssel ellenőrizzük a konstrukció integritását és a Cre gén expressziós szintjét.

Anyag és módszer

Plazmid klónozás és a klónozási eredmények ellenőrzése

A plazmidok klónozásához 100-300 ng plazmidot emésztettünk a használt restriktions enzimmel kompatibilis, egyszeres töménységű emésztő pufferben, 37°C-on, 4 órán keresztül. Kivételt a BstXI enzim jelentett, amit 55°C-on inkubáltunk. A defoszforilációhoz az emésztési elegyeket 1 U/pmol 5' szabad DNS vég - koncentrációjú shrimp alkalikus foszfatázzal (SAP) egészítettük ki az emésztés utolsó órájában. A foszfatáz enzimet és a restriktions enzimeket ligálás előtt 15 perces 65°C-os hőkezeléssel inaktívtuk. A ligáláshoz 10 μ l térfogatban 50 ng vektor DNS-t használtunk. Az inszertet a vektorhoz képest háromszoros moláris feleslegben adagoltuk. A ligálás egy molekuláris sűrítésnek nevezett eljárással, 5% PEG-4000 jelenlétében történt, 22°C-on, 1 órán át. A transzformáció előtt a nemkívánatos rekombinánsokat újabb restriktions emésztésnek vetettük alá. Ehhez a ligátumot kétszeresére hígítottuk a megfelelő egyszeres töménységű emésztési pufferben, és 2 órán át emésztettük 37°C-on. Az emésztett ligátum 5 μ l-ét transzformáltuk 100 μ l térfogatú DH5 α kompetens állapotú *E. Coli* sejtbe, majd a kolóniákat ampicillines agarlemezen 12-16 órán át növesztettük 37°C-on. A lemezekről független kolóniákat izoláltunk, majd ezekből 4 ml-es folyadékkultúrákat indítottunk, amelyeket erős rázatás mellett, 12-16 órán át, 37°C-on növesztettünk ampicillin jelenlétében. A kultúrából 50 μ l térfogatú plazmid DNS preparátumokat készítettünk szilika-gél alapú centrifugációs gyorskittel. A tesztelő emésztésekhez 2 μ l preparátumot emésztettünk 10 μ l végtérfogatban, majd az emésztési fragmentek számát 1% agaróz gélelektroforézissel teszteltük. A DNS sávokat a

gélhez adott 0,5 μ g/ml koncentrációjú etidium-bromiddal mutattuk ki, amit Kodak Gel Logic 2200 géldokumentációs rendszerrel fotóztunk. Az analitikai gélelektroforézishez 13 cm hosszúságú GTG minőségű 1,2% koncentrációjú agaróz gélét használtunk, széles spektrumú molekulásúly-marker futtatása mellett. A végső plazmid Cre gént tartalmazó régiójához 20-mer hosszúságú oligonukleotid primereket szintetizáltattunk, és a szekvenálást külső szolgáltató cégre bíztuk. A végső klónból a miniprepekkel azonos elven működő kittel μ g-os mennyiségű eukarióta transzformációs minőségű plazmidot preparáltunk.

Lentivirális partikulumok produkciója

A 80%-os konfluenciájú HEK sejtmonocultúrát kalcium-foszfát precipitációs módszerrel ko-transzfektáltuk a transzfer, a pakoló és a burok fehérjét kódoló plazmidok 1:1:1 arányú keverékével [3, 22]. 20 óra, 37°C, 5% CO₂ atmoszférán tartó inkubálás után a tenyésztő oldatot lecseréltük 5% forskolin tartalmú friss médiumra. Újabb 24 órás 37°C, 5% CO₂ atmoszférán történő inkubáció után a felülúszót összegyűjtöttük, és 800g relatív centrifugális erővel 5 percig centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót 0,45 μ m pórusátmérőjű PVDF membránon szűrtük át, majd a partikulumokat 2 órán át 20°C-on 89527g relatív centrifugális erővel üleptettük. A felülúszót eldobtuk és a pelletet újraszuszpendáltuk 500 μ l HANKS oldatban, majd 20%-os szukroz oldatra rétegeztük rá. Ismét két óra centrifugálás következett 92752g relatív centrifugális erővel, és a felülúszót ismét eldobtuk. A pelletet 100 μ l HANKS oldatban újra szuszpendáltuk, majd egy éjszakán át 4°C-on hagytuk szuszpendálódni. Az így kapott lentivirális preparátumot 4 μ l-enként szétosztottuk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

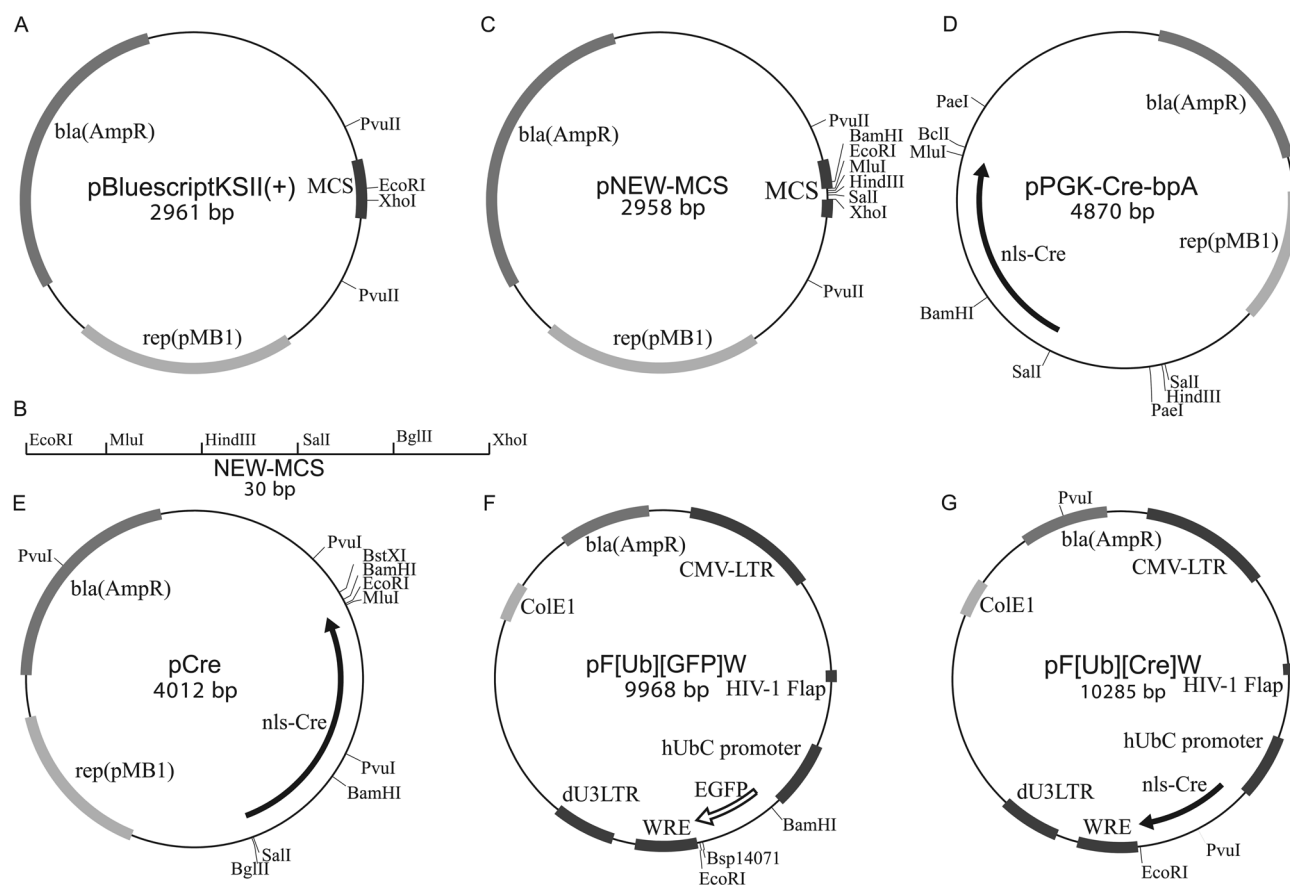
A lentivirális partikulum *in-vivo* injekciója hippocampus CA3 régiójába és a Cre expresszió ellenőrzése

CP-Ketamin-Xilazin-Piplophen mélyaltatásban lévő sztereotaxiás keretbe fogott egér koponyacsontján megközelítőleg 1,5 mm átmérőjű lyukat fúrtunk és 100 μ m hegyátmérőjű húzott üvegapillárral, mikromotor meghajtású hidraulikus fecskendő segítségével megközelítőleg 2 μ l lentivirális preparátumot injektáltunk a hippocampus CA3 régiójába. Két hét várakozás után az egereket a fenti módszerrel altattuk, majd 4% paraformaldehid, 15% pikrinsav tartalmú fixáló oldattal perfundáltuk és a fixált agyból 60 μ m vastagságú koronális szeleteket vágunk. Az agyszeleteket először egérben termeltetett anti-Cre monoklonális ellenanyaggal (1:500), majd Cy3 kapcsolt egér immunglobulin elleni másodlagos ellenanyaggal (1:500) immunhisztokémiai jelölést végeztünk. A jelölés kiértékelését Olympus BX62 epifluoreszcens mikroszkóppal végeztük.

Eredmények

A Cre gén szubklónozása a lentivirális rendszerbe

Az általunk elérhető forrásból a Cre gén nem volt köz-



1. ábra. A Cre gén szubklónozása második generációs ön-inaktiváló lentivirális transzfervektorba. **A,C-G:** A *cre* gén lentivirális transzfervektorba történő klónozásakor felhasznált, illetve a létrejött plazmidok átmérőre normalizált méretarányos térképe. **B:** Az új multiklónozó hely kialakítására használt részlegesen kettősszálú szintetikus oligonukleotid.

vetlenül átklónozható a lentivirális transzfervektorba, mivel nem a megfelelő restriktív enzimek hasítópontjai vettek körül. Ennek a problémának a kiküszöbölése végett először létrehoztunk egy alkalmas multiklónozó helyre rendező fogadóvektort, majd ebbe inszertáltuk be a Cre gént, amelyet így már a megfelelő hasítópontjai vettek körül és így tovább klónozhattuk a végső lentivirális vektorba (**1. ábra**).

A fogadóvektor létrehozásához a pBluescript KSII(+) plazmid multiklónozó helyét felnyitottuk EcoRI és XhoI restriktív endonukleázokkal, majd a kapott fragmenteket az eredeti plazmid visszaépülésének megakadályozása végett SAP-zal defoszforiláltuk. Az elegyhez hozzáadtuk egy 5' foszforilált, túlnyúló, EcoRI, illetve XhoI komplementer végekkel rendelkező, szintetikus, kettősszálú oligonukleotidot, amely az MluI, HindIII, SalI, BglII, hasítópontokat tartalmazta. Mivel a sikeres ligáláshoz az is elég, ha a ligálandó szálak közül csak az egyik foszforilált, így a ligáz enzim a szintetikus oligonukleotid beinszertálásával életképes, cirkuláris plazmidot hozhatott létre. Több független klónt izoláltunk, és ezeket PvuII, MluI kettős emésztéssel ellenőriztük. A tesztelő emésztés fragmentjeinek gélelektroforézis elválasztása után az általunk kiválasztott, három fragmentet adó klónt pNEW-MCS-nek neveztük el.

A következőkben a SV-40 vírus large T antigénjének

magi lokalizációs szignáljával fuzionált Cre rekombináza gént kivágtuk a rendelkezésünkre álló pPGK-Cre-bpA plazmidból az MluI, SalI hasítópontok mentén, majd ugyanezen enzimekkel felnyitottuk a pNEW-MCS plazmid multiklónozó helyét is. A kapott négy fragmentet a ligáz reakció során hagytuk szabadon rekombinálódni, majd a két szülői és a nemkívánatos rekombináza reakcióterméket még a bakteriális transzformáció előtt felnyitottuk BclI, HindIII és PaeI enzimek segítségével. Így csak a számunkra előnyös rekombináza maradt cirkuláris, és ezáltal képes *E. coli*-t transzformálni. A kapott rekombinázaokat BamHI enzimmel való emésztéssel teszteltük, amely eredményeként két fragmentet vártunk. Az agaróz gélelektroforézis alapján kiválasztott helyes rekombináza plazmidra pCre néven hivatkozunk.

Utolsó lépésként a szintén rendelkezésünkre álló pF[Ub][GFP]W lentivirális plazmidból EcoRI-BamHI kettős emésztéssel kimetsztettük a GFP transzgént és a pCre plazmid EcoRI-BglII emésztési elegyével ligáltuk. Kihasználtuk azt, hogy a Cre gént fragmentet határoló BglII vég kompatibilis a pF[Ub][GFP]W vektor szabaddá vált BamHI végével. A számunkra nem kívánatos átrendeződéseket BstXI és Bsp14071 enzimekkel linearizáltuk a bakteriális transzformáció előtt. A kapott klónokat PvuI-es emésztéssel

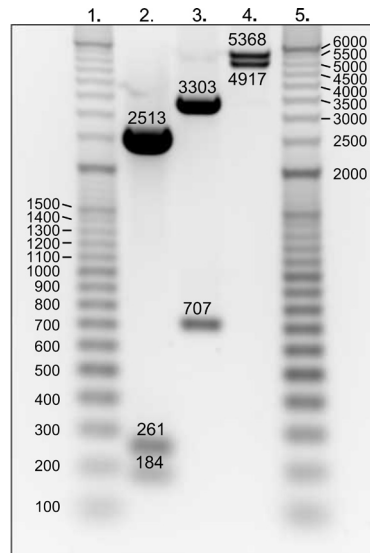
ellenőriztük, és a kiválasztott helyes rekombináns pF[Ub][Cre]W plazmidnak neveztük el.

A lentivirális transzfervektor ellenőrzése

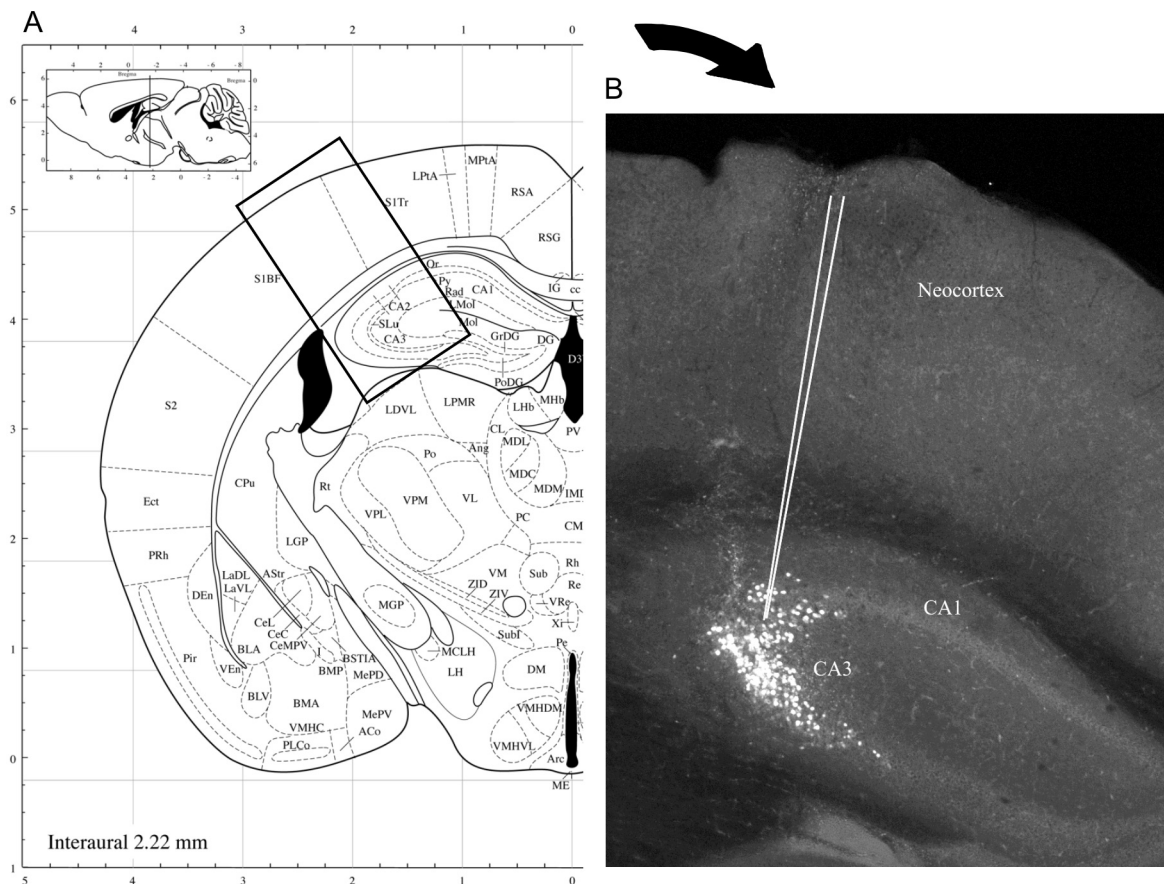
A klónozás egyes sikeres lépéseit jelentő plazmidokat ellenőrzésképpen újra tesztelő emésztésnek vetettük alá, és a kapott fragmentek méretét nagy felbontású analitikai gélelektroforézissel ellenőriztük le DNS molekulásúly-standard párhuzamos futtatása mellett (2. ábra). Mivel minden kapott fragment a gél fizikai feloldásának határán belül megfelelő méretűnek bizonyult, a pF[Ub][Cre]W konstrukciót DNS szekvenálatsnak vetettük alá. A plazmid az átszekvenált régióban az elvárt szekvenciát mutatta.

A Cre gén in vivo expressziója és immunológiai kimutatása egéragyban

Az általunk létrehozott lentivirális vektor a Cre gént a humán ubiquitin gén promóterének befolyása alatt hozta, ami lehetővé tette, hogy expresszióját bármely könnyen megközelíthető agyterületen tesztelhesük. Ezért, az általunk preparált partikulumokat az egér hippocampus CA3 régiójába injektáltuk be sztereotaxiás mikroinjekcióval. Az *in vivo* expressziót immunhisztokémiai jelöléssel bizonyítottunk (3. ábra).



2. ábra. A lentivirális transzfervektor ellenőrzése. A klónozás egyes fázisait ellenőrző 1,2%-os agaróz gél. DNS molekulásúly-marker (1., 5. sáv), pNEWMCS PvuII, MluI enzimekkel emésztve (2. sáv), pCRE BamHI enzimmel emésztve (3. sáv), pF[Ub][Cre]W és PvuII enzimekkel emésztve (4. sáv). A DNS fragment mellett feltüntetett számok a mólsúly-marker fragmentméreteit, illetve az emésztési fragmentek várt méreteit jelölik bázispár hosszban megadva.



3. ábra. A Cre rekombináns lokalizált lentivirális expressziójának immunhisztokémiai jelölése egér hippocampus CA3 régiójában. **A:** Egéragy koronális metszetének anatómiai térképe [12]. **B:** A bekeretezett régió Cre elleni ellenanyaggal végzett immunfluoreszcenciás jelölése, a fontosabb anatómiai régiók és az injektáló kapilláris helyének feltüntetésével.

Megbeszélés

Kísérleteinkben egy lentivirális eredetű szomatikus géntranszferre alkalmas vektorrendszer alkalmazásával szeretnénk azt elérni, hogy benzodiazepin érzéketlen genomi háttérű egerek szaglógumójában, génkicserélés hatására, meghatározott anatómiai régiókban, sejtípus specifikus módon, benzodiazepin érzékeny sejteket hozzunk létre. A teljes kísérlet sor kicsiny, de fontos eleme volt a Cre gén lentivirális expressziója és az expresszió immunológiai alapú ellenőrzése. Miután a Cre gént sikeresen expresszáztattuk, a következő szakaszban a meglévő konstrukciók módosításával olyan vektorok építésébe fogunk bele, amely a Cre gén és a GABA_A receptor γ_2 alegység szimultán expressziójára alkalmas. Egy másik feladat az említett transzgenek sejtípus specifikus termelése, amely a megfelelő promóter gondos kiválasztását, és a lentivirális rendszerben való működésének ellenőrzését kívánja meg. Ha mindezek a feltételek adottá válnak, akkor egy igen értékes kutatási eszköz birtokába kerülhetünk.

Következtetések

A Cre rekombinááz fehérje sikeres *in vivo* expressziója után feltételezhetjük, hogy a Cre gén integritása a lentivirális vektorban ép. Erre enged következtetni a termelődött fehérje immunreaktivitása, és nagy nagyításon látható, a fuzionált magi lokalizációs szignál miatt elvárt, magi lokalizáció. Ahhoz, hogy a termelt fehérje *in vivo* rekombinááz funkcióját is ellenőrizni tudjuk még további kísérletekre lesz szükség.

Irodalom

1. Aiken C. – *Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A*, J Virol, 1997, 71(8):5871-5877.
2. Berglund J. A., Charpentier B., Rosbash M. et al. – *A high affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein*, Nucleic Acids Res, 1997, 25(5):1042-1049.
3. Bonnert T. P., McKernan R. M., Farrar S. et al. – *Theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(17):9891-9896.
4. Cope D. W., Habsguth C., Karayannis T. et al. – *Loss of zolpidem efficacy in the hippocampus of mice with the GABA_A receptor γ_2 F77I point mutation*, Eur J Neurosci., 2005, 21(11):3002-3016.
5. Davies P. A., Hanna M. C., Hales T. G. et al. – *Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit*, Nature, 1997, 385(6619):820-823.
6. Delenda C. – *Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression*, J Gene Med, 2004, 6:s125-s138.
7. Korpi E. R., Gründer G., Lüddens H. – *Drug interactions at GABA(A) receptors*, Prog Neurobiol, 2002, 67(2):113-159.
8. Miyoshi H., Blömer U., Takahashi M. et al. – *Development of a self-inactivating lentivirus vector*, J Virol, 1998, 72(10):8150-8157.
9. Nagy A. – *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*, Genesis, 2000, 26:99-109.
10. Naldini L., Blömer U., Galloway P. et al. – *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*, Science, 1996, 272(5259):263-267.
11. Nutt D. J., Malizia A. L. – *New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder*, Br J Psychiatry, 2001, 179:390-396.
12. Paxinos G., Franklin K. B. J. – *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, 2001, 44.
13. Sauer B., Henderson N. – *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(14):5166-5170.
14. Shivers B. D., Killisch I., Sprengel R. et al. – *Two novel GABA_A receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations*, Neuron, 1989, 3(3):327-337.
15. Sigel E. – *Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors*, Curr Top Med Chem, 2002, 2(8):833-839.
16. Silva F. H., Dalberto T. P., Nardi N. B. – *Beyond retrovirus infection: HIV meets gene therapy*, Genet Mol Biol, 2006, 29(2):367-369.
17. Sternberg N., Hamilton D. – *Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites*, J Mol Biol, 1981, 150(4):467-486.
18. Sternberg N., Hamilton D., Hoess R. – *Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome*, J Mol Biol, 1981, 150(4):487-507.
19. Trono D. – *Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent*, Gene Ther, 2000, 7:20-23.
20. Wafford K. A., Macaulay A. J., Fradley R. et al. – *Differentiating the role of gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor subtypes*, Biochem Soc Trans, 2004, 32(Pt3):553-556.
21. Zennou V., Petit C., Guetard D. et al. – *HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap*, Cell, 2000, 101(2):173-185.
22. Zufferey R., Donello J.E., Trono D. et al. – *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors*, J Virol, 1999, 73(4):2886-2892.
23. Zufferey R., Dull T., Mandel R.J. et al. – *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*, J Virol, 1998, 72(12):9873-9880.