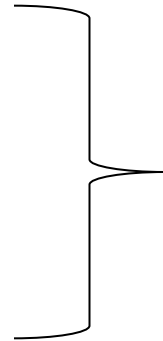


Vettori Cromosomali

the features of an ideal vector for gene delivery

- **low invasiveness**
- **target selectivity**
- **low immunogenicity**
- **high cargo capacity**
- **high stability**
- **proper ploidy**
- **feasible DNA technology**
- **low size**



artificial chromosomes may fulfil this requirements

high cloning capacity vectors



genomic library construction



genomic DNA, partially digested with restriction enzymes, or cut with rare cutting enzymes, is cloned.



the clones may be used for sequencing and genome assembly or for functional studies

artificial chromosomes with therapeutic loci



assembly of human/mammalian artificial chromosomes



gene/cell therapy application

vectors

Plasmids

Cosmids

PAC (P1 artificial chromosome)

BAC (bacterial artificial chromosome)

YAC (yeast artificial chromosome)

M/HAC (mammalian/human artificial chromosome)

insert size

0-10 Kb

30-45 Kb

130-150 Kb

50-300 Kb

0,2-2 Mb

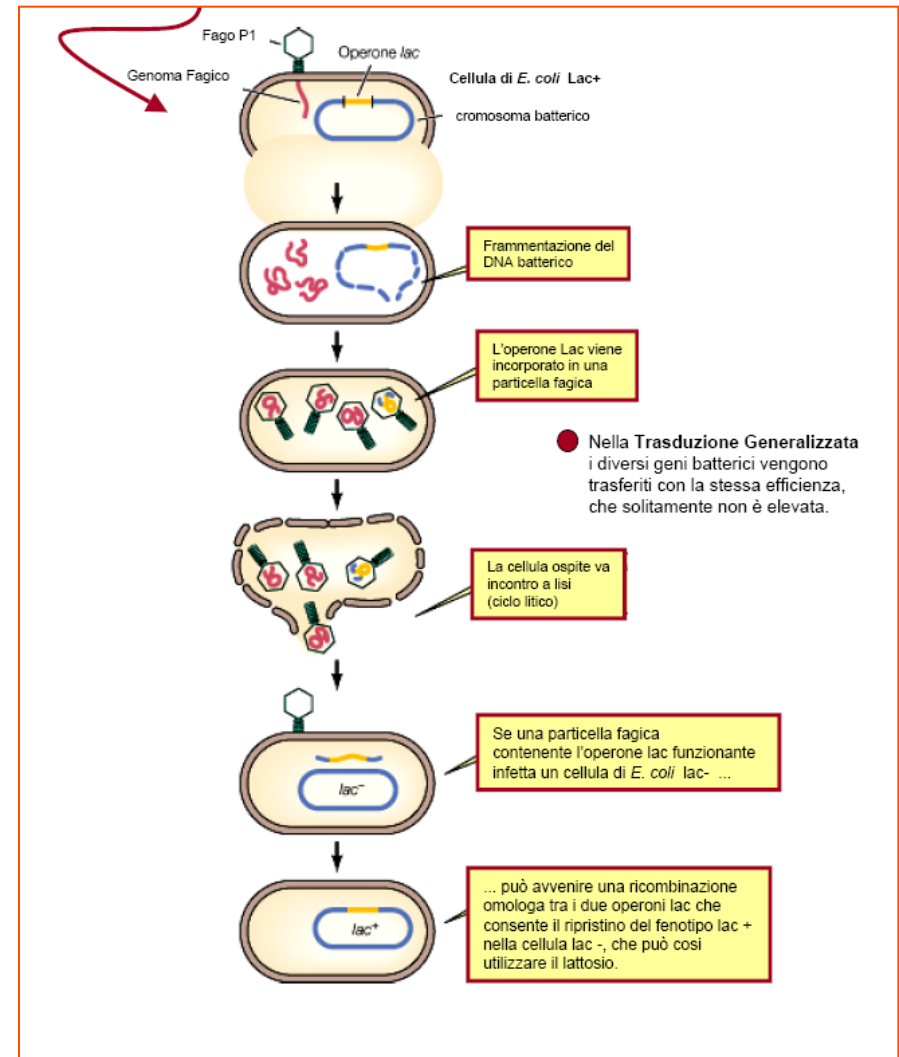
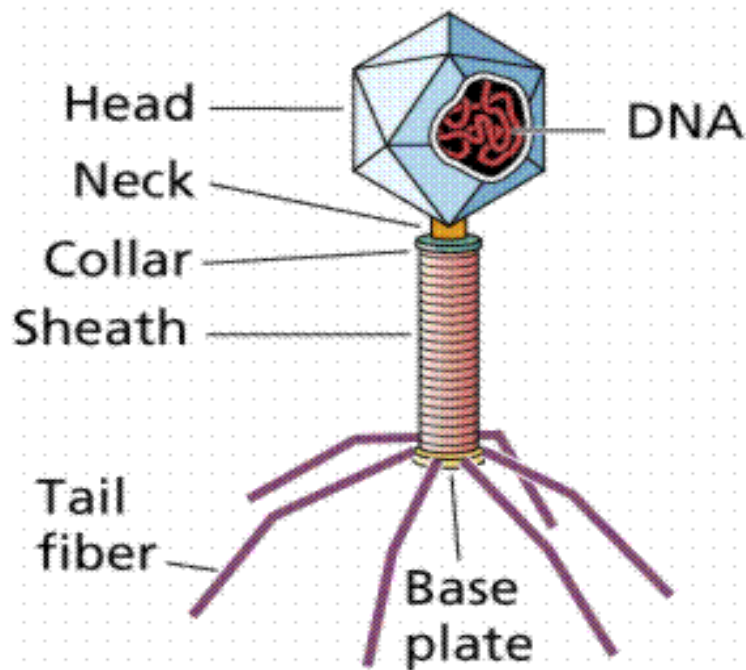
>1 Mb



**GCV vectors
(Genomic Context
Vector)**

PAC (P1-DERIVED ARTIFICIAL CHROMOSOME)

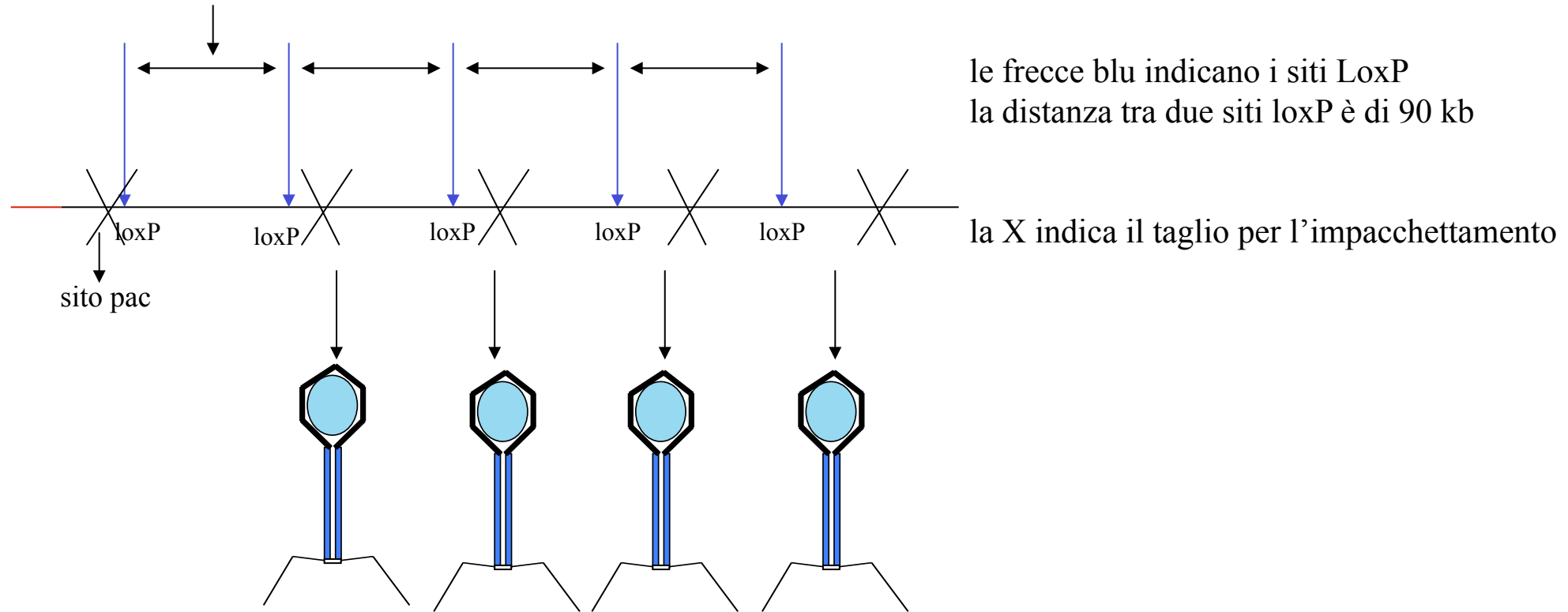
Struttura del batteriofago P1 (fago temperato)



P1 è un batteriofago temperato che è stato utilizzato per l'analisi genetica di *E. coli* grazie alla sua capacità di effettuare la trasduzione generalizzata

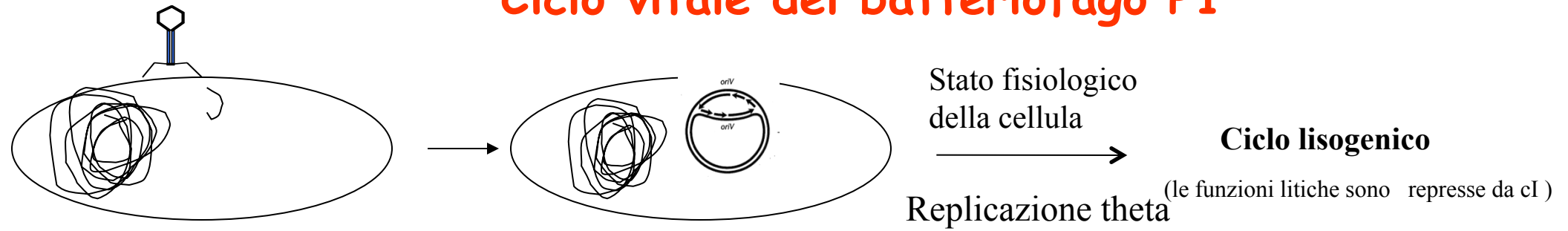
“PACKAGING” DI P1 (meccanismo a testa piena)

l'impacchettamento avviene a partire da concatenametri ed inizia da un sito pac
successivamente si impacchettano N particelle (< 10) con il meccanismo a testa piena

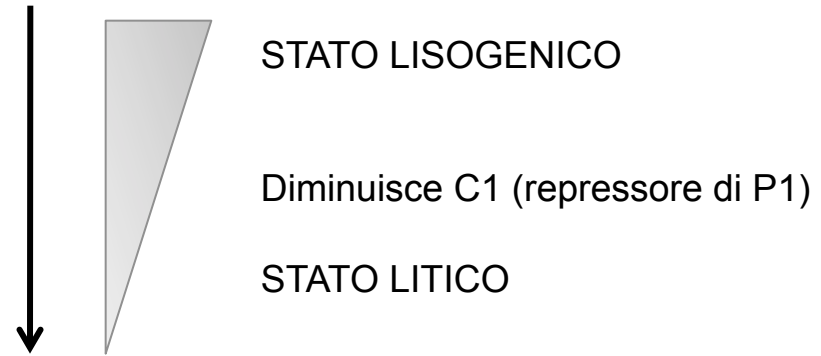


- poichè la dimensione del genoma di P1 è di circa 90 kb, mentre la capacità della testa è di circa 100kb, il DNA all'interno di ciascuna particella è **terminalmente ridondante**.
- poiché il sito di taglio si muove progressivamente lungo il genoma virale, la popolazione di molecole incapsidate è **circolarmente permutata e può contenere due siti loxP**.
- quando il fago infetta la cellula, il DNA iniettato circolarizza mediante: 1) ricombinazione omologa tra le estremità ripetute; Cre/LoxP nei genomi che contengono due siti loxP.

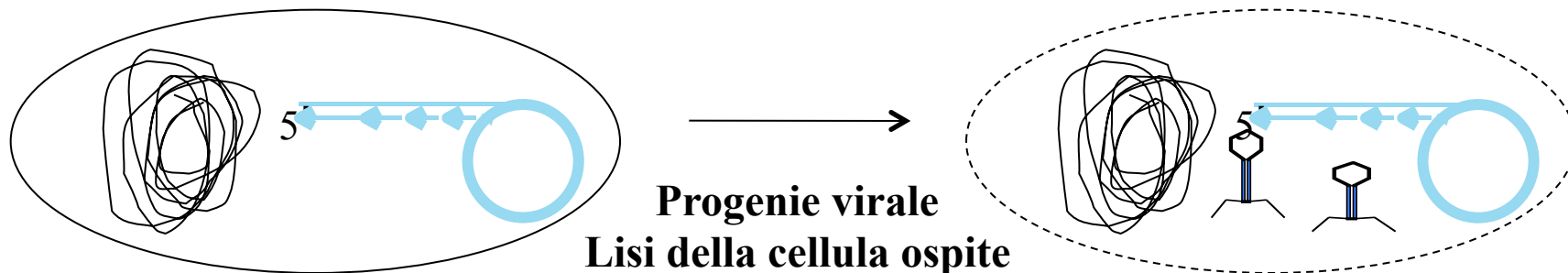
Ciclo vitale del batteriofago P1



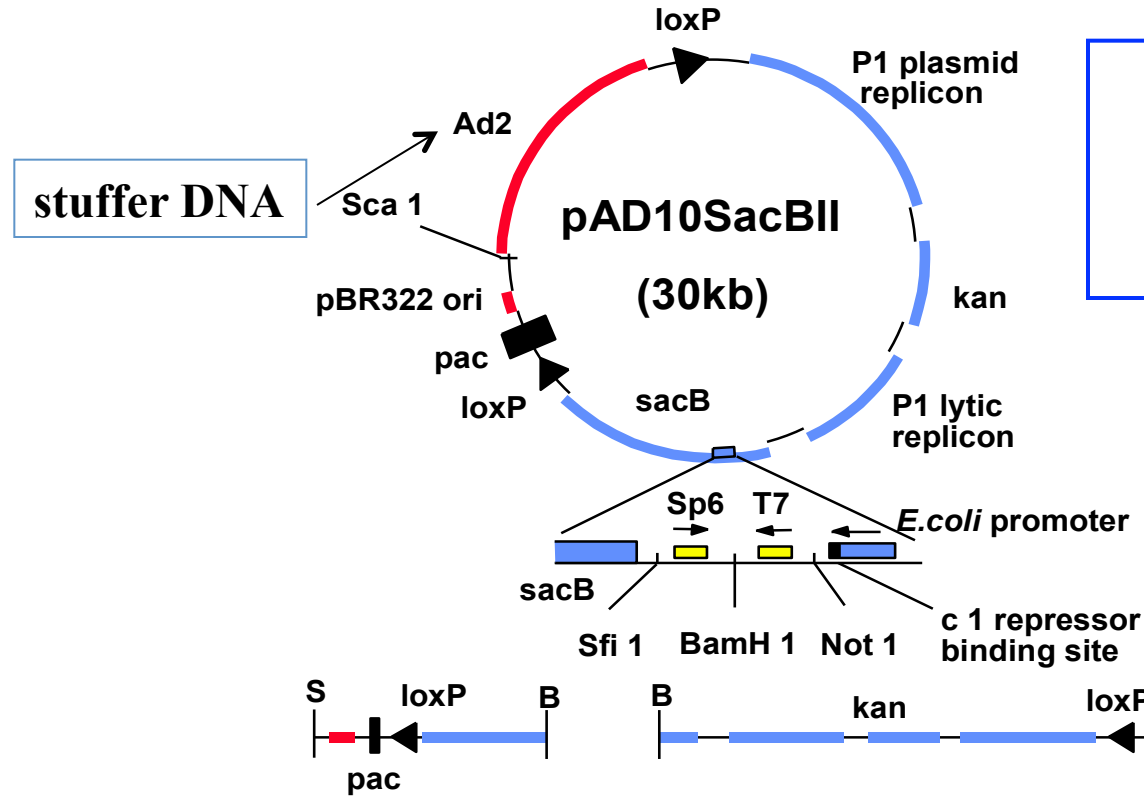
P1 lisogenico: si replica come plasmide a singola copia attraverso il replicone R (oriR, RepA, regione di controllo e geni par)



P1 litico: replicazione del DNA guidata da replicone L (oriL); replicazione rolling circle



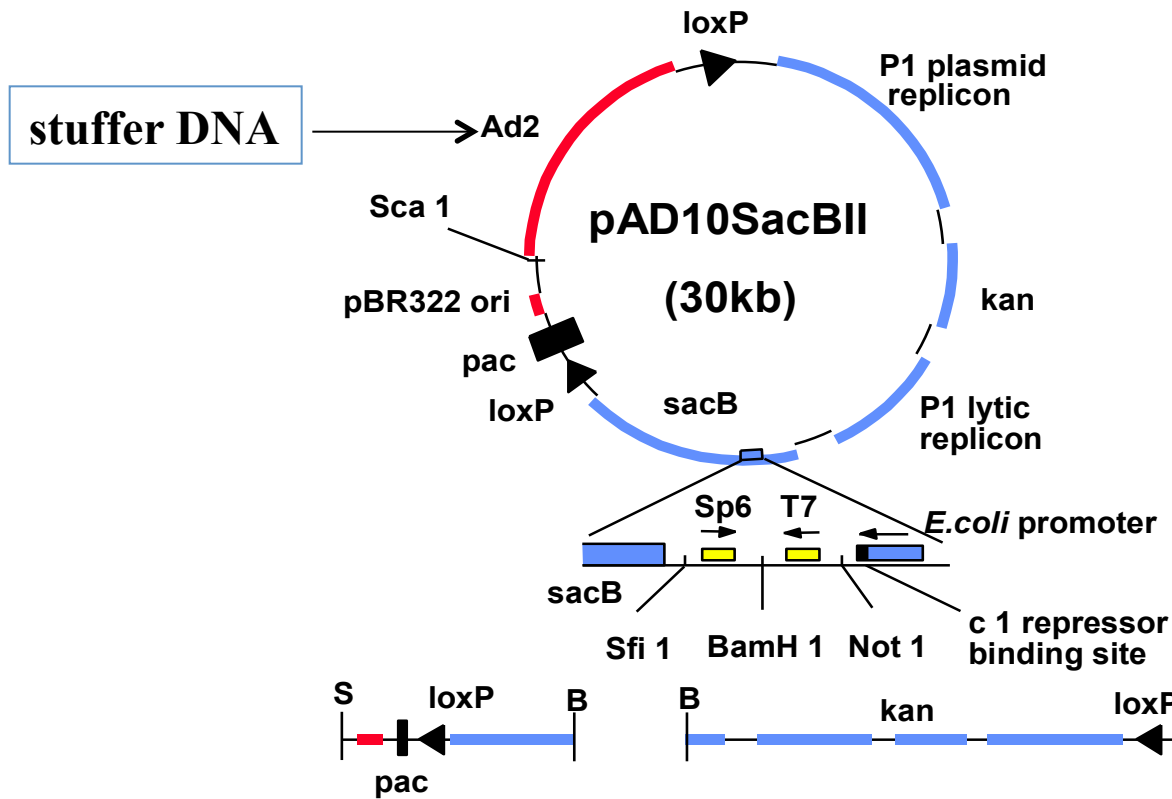
il vettore PAC pAD10SacBII



Vettore utilizzato principalmente per la costruzione di librerie genomiche

Pierce et al, Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. (1992) 89, 2056-2060

- 2 siti di ricombinazione **loxP** riconosciuti dalla ricombinasi Cre
- sito **pac** (162 bp) necessario per l'impaccamento delle molecole ricombinanti nelle particelle virali
- frammento "stuffer" di 11 kb di DNA di adenovirus (per riempire la testa fagica)
- gene **Kan** →
- **replicone P1 plasmidico** → basso numero di copie
- **replicone P1 litico** → elevato numero di copie (sotto il promotore *lac*)
- **sacB** che codifica per la levan sucraasi, enzima che catalizza l'idrolisi del saccarosio. Quando espresso in *E. coli*, l'enzima SacB genera levano, che si accumula nello spazio periplasmatico, con effetti letali per la cellula

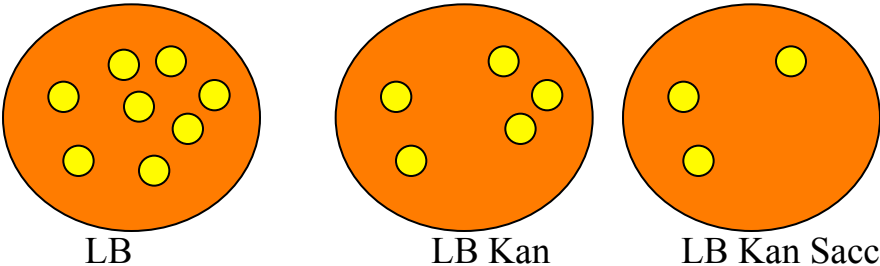


Vettore utilizzato principalmente per la costruzione di librerie genomiche

Pierce et al, Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. (1992) 89, 2056-2060

Il clonaggio di un frammento all'interno di SacB ne elimina la funzione e rende le cellule vitali in terreno contenete saccarosio.

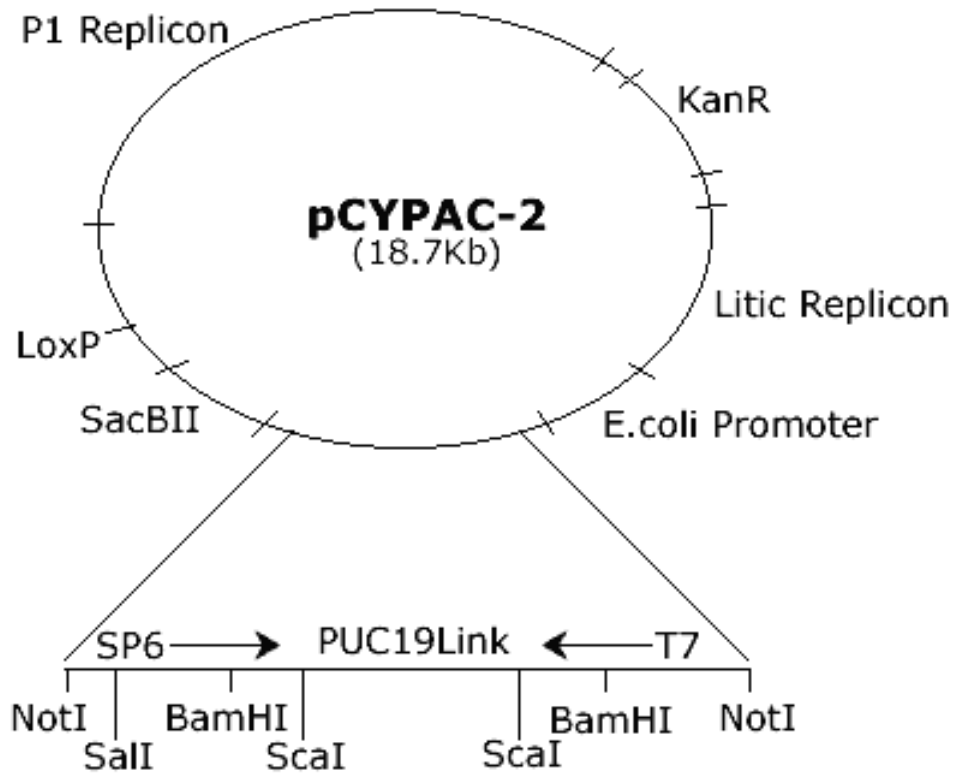
replica plating



le colonie che crescono in questo terreno avranno l'inserto

PAC vectors as big plasmids

P1 Derived Artificial Chromosome (PACs)



pCYPAC-2 deriva da pAD10SacBII per eliminazione del frammento stuffer ed inserzione di un frammento pUC

130-150 kb di inserto

PAC circolari ricombinanti generati mediante ligasi *in vitro* sono introdotti in *E.coli* mediante elettroporazione e sono mantenuti stabilmente come plasmidi a singola copia (Replicone R)

qualora lo si desidera, ad esempio della preparazione del vettore PAC, è possibile aumentare il numero di copie mediante attivazione dell'ori litica che è sotto il promotore Gal e può essere indotta utilizzando l'induttore gratuito IPTG

PAC: main application

cloning vectors for genomic libraries

BAC (BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOME)

Vettori sintetici basati sul fattore F della fertilità di *E.coli*

Plasmide F caratteristiche principali:

- Coniugazione batterica
- Dimensioni di 100Kb (60 proteine per la replicazione, ripartizione e coniugazione)
- DNA circolare (1 copia per cellula)
- Si può integrare in almeno 30 siti del cromosoma di *E.coli*
- Elevata capacità di clonaggio

PRIMO VETTORE BAC SVILUPPATO NEL 1992 DA SIMON ET AL. (PNAS)

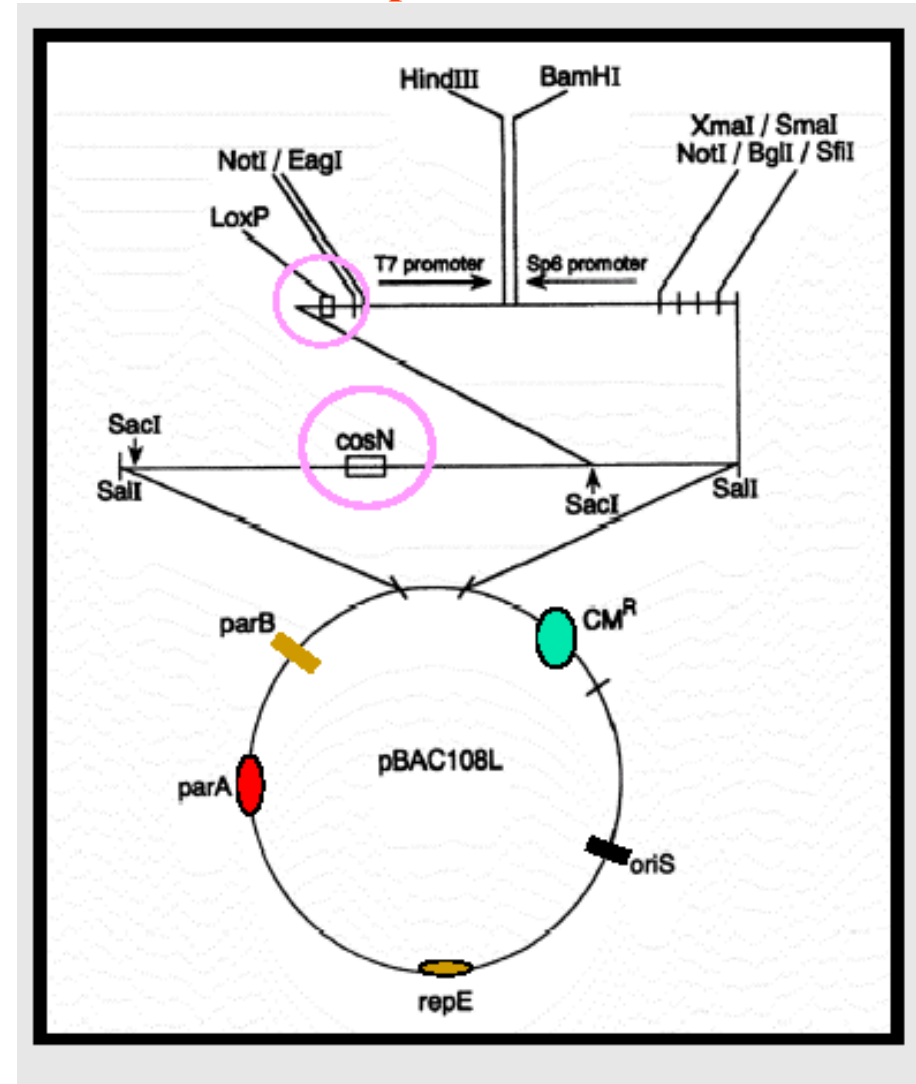
Elementi strutturali

- Geni regolatori derivati dal fattore F di *E.coli*
 - oriS, repE: consentono replicazione unidirezionale
 - parA, parB: mantenimento ad una copia per cellula
- CM: resistenza al cloramfenicolo
- CosN: sito di restrizione, tagliato dalla terminasi del fagoλ
- LoxP: sito di ricombinazione riconosciuto dalla ricombinasi Cre

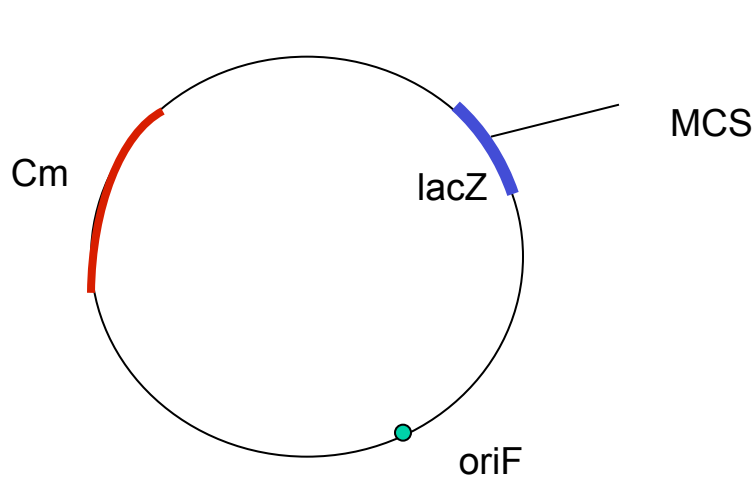
Proprietà

- elevata capacità di clonaggio (fino a 300 kb)
- elevata stabilità
- basso numero di copie (1-2 per cellula)
- facilmente manipolabili
- possono essere introdotti nelle cellule batteriche mediante elettroporazione, evitando così il ricorso a procedure di impaccamento in vitro
- vettori di base per il sequenziamento dei genomi

pBAC108L



pBeloBac11: BAC con marcatore di selezione gene *lacZ*



L'inserto interrompe il gene *lacZ*: selezione su X-gal
Colonie bianche e colonie blu

pBeloBAC11 è stato ottenuto rimpiazzando il frammento contenente il sito di clonaggio con il gene *lacZ* (Kim et al., 1996).

Una ulteriore modificazione proposta è stata la sostituzione di *lacZ* con il gene *sacB* (selezione positiva dei cloni con inserto) (Hamilton et al., 1996)



I BAC possono essere introdotti nelle cellule superiori mediante lipofezione

Bac contig: an example of chr 22 BAC contig map

Chromosome 22 (part)

Anonymous markers and known genes mapped:



BAC contig, ends sequenced

Mapped BACs are broken into small pieces, which are shot-gun sequenced and assembled.

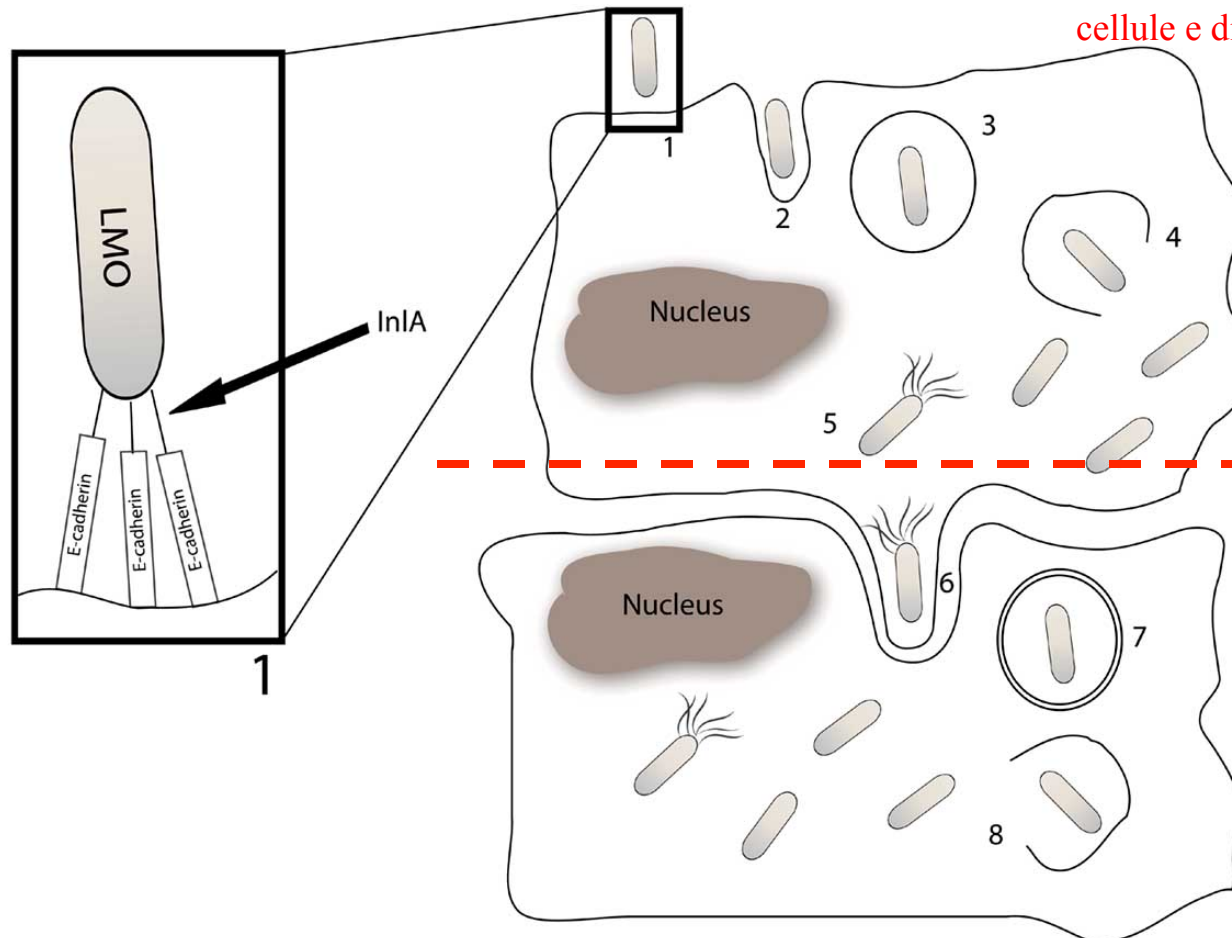


Gaps must be filled by alternate approaches, e.g. directed PCR.

Bactofection

Stages in the intracellular life cycle of *L. monocytogenes*

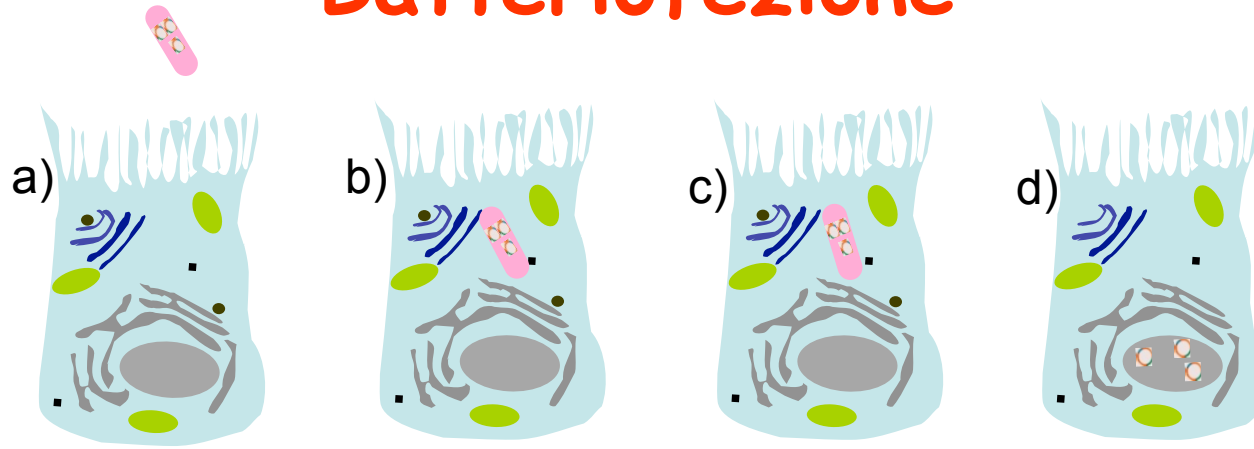
utilizzare la capacità dei batteri di entrare all'interno delle cellule e di fuoriuscire dal fagolisosoma



4. Lysis of the phagosome through bacterial production of LLO and PlcA releases *L. monocytogenes* into the host cell cytoplasm

1. In epithelial cells *L. monocytogenes* internalin A protein interacts with host cell E-cadherin. 2. This promotes internalisation of the pathogen into the target cell. 3. The bacterium is then found within the host cell phagosome. 4. **Lysis of the phagosome through bacterial production of LLO and PlcA releases *L. monocytogenes* into the host cell cytoplasm.** 5. Growth occurs through metabolism of host cell hexose phosphates. Production of ActA at a single pole of the bacterial cell results in polymerization of host actin filaments which facilitate bacterial movement through the cytoplasm. 6. The pathogen can promote protrusions in the host cell surface which are engulfed by neighbouring cells. 7. *L. monocytogenes* can invade adjacent cells and is found engulfed within a double-membrane-bound phagosome. 8. Lysis of the phagosome through production of bacterial PlcB.

Batteriofezione



***E. coli* DH10B può essere ingegnerizzato per trasferire DNA in cellule di mammifero:**

- delezione del gene *asd* (aspartato β -semialdeide) converte *E. coli* DH10B in un ceppo DAP (diaminopimelato) auxotrofo, che lisa in seguito all'ingresso nelle cellule di mammifero a causa della sintesi alterata della parete cellulare
- Trasformazione del ceppo *E. coli asd⁻* con plasmide che contiene il gene dell'invasina di *Yersinia pseudotuberculosis*, pGB2 Ω *inv*, (conferisce a *E. coli* la capacità di invadere cellule non fagocitiche grazie al legame con i recettori integrinici β 1)
- Trasformazione del ceppo *E. coli asd⁻* con il locus *hly* di *Listeria monocytogenes* (produce la listeriolisina O che conferisce al batterio la capacità di lisare il fagolisosoma e di liberarsi nel citoplasma).



Trasferimento di DNA ad alto peso molecolare (BAC) in cellule di mammifero

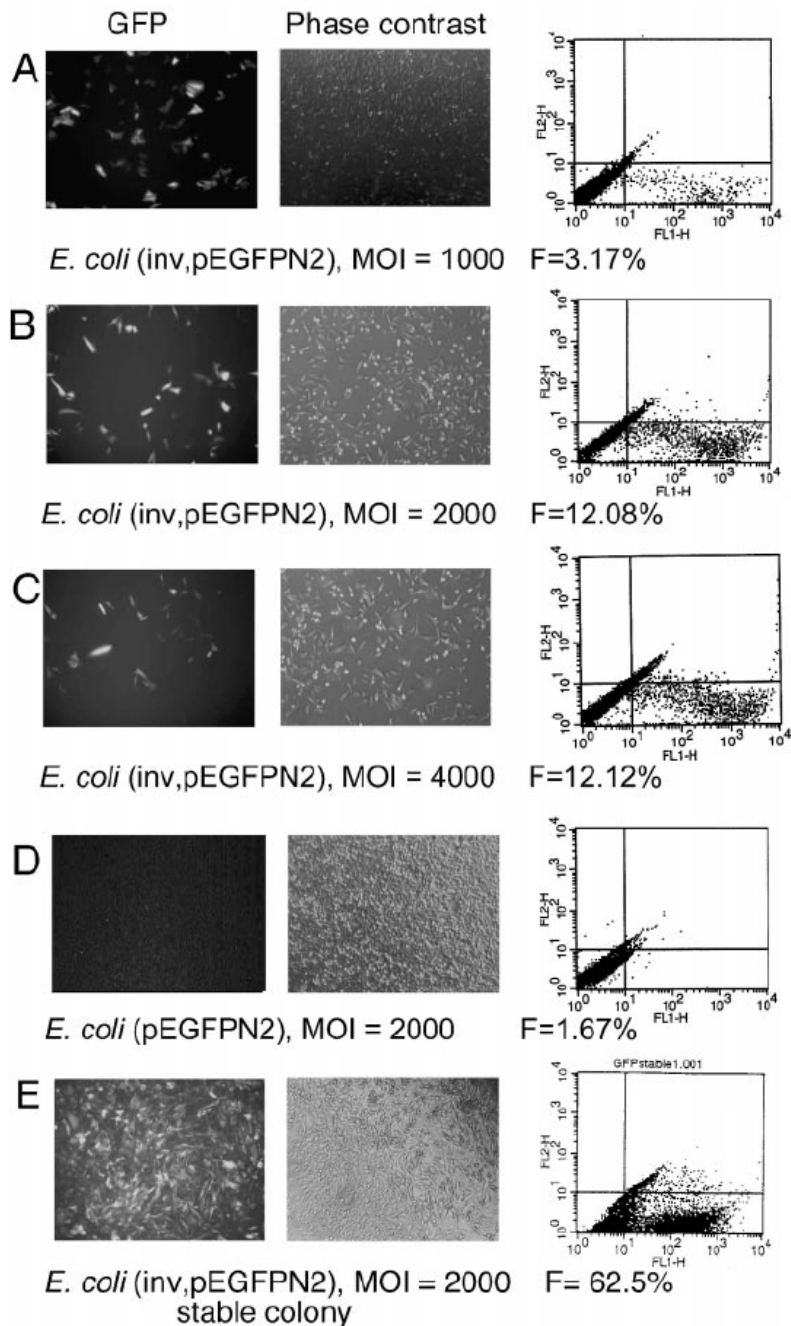
DNA modification and functional delivery into human cells using *Escherichia coli* DH10B

Kumaran Narayanan^{1,2} and Peter E. Warburton^{1,*}

¹Department of Human Genetics, Box 1498, Mount Sinai School of Medicine, 1425 Madison Avenue, East Building 14-52A, New York, NY 10029, USA and ²Faculty of Resource Sciences and Technology, Universiti Malaysia Sarawak, Malaysia



È stato utilizzato un ceppo di *E. coli* DH10B *asd*⁻, reso invasivo mediante trasformazione con il plasmide pGB2 Ω *inv*, per mediare il trasferimento in cellule Hela di un BAC di 200 kb contenente l'intero gene umano dell'uroporfirinogeno III sintetasi (BAC hgUroS-1-GFPneo), come dimostrato dall'espressione della EGFP dopo 48 h dalla trasfezione.



FACS

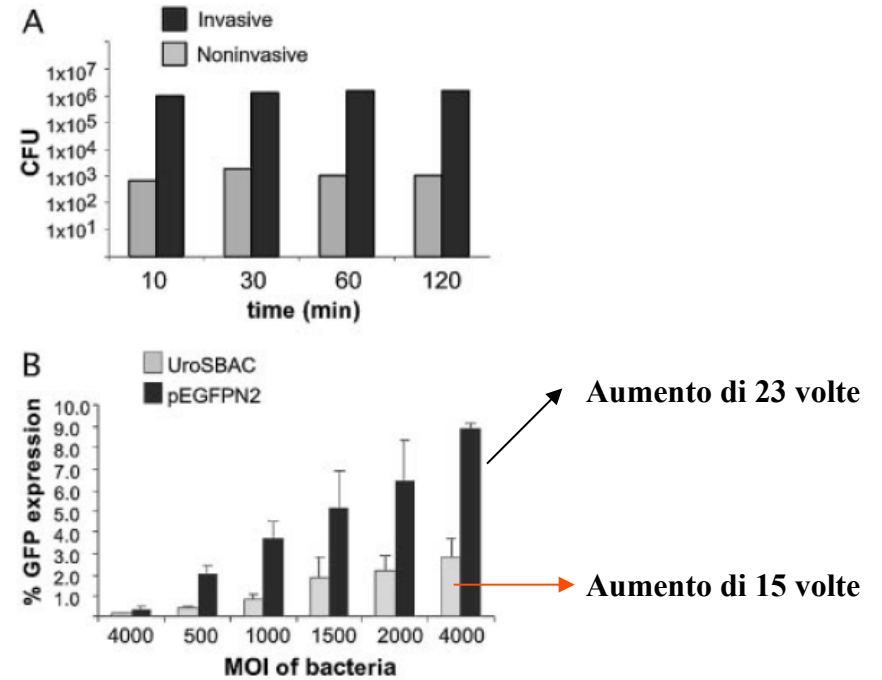


Figure 3. Invasive *E. coli* is internalized and delivers plasmid and a 200 kb BAC clone into HeLa cells. (A) Internalization of the *E. coli* DH10B *asd*⁻ upon exposure to HeLa cells for various time points. Mean values are calculated from two independent experiments. (B) Percentage of GFP expression in HeLa cells by invading *E. coli* harboring either pEGFP-N2 or hgUroS-1 BAC. Mean values are calculated from three independent experiments. An MOI of 4000 using uninvading bacteria is shown in leftmost histograms.

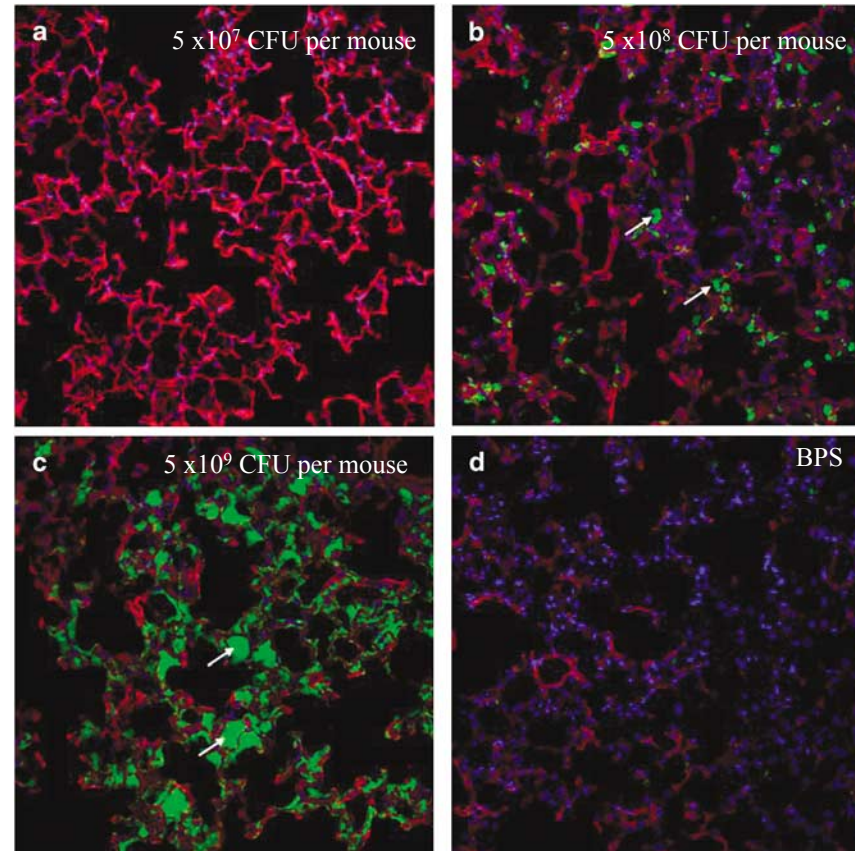
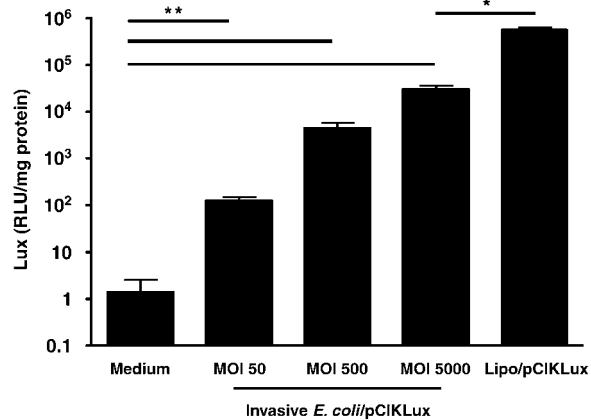
Bactofection of lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo* using a genetically modified *Escherichia coli*

MDB Larsen^{1,2}, U Griesenbach^{1,2}, S Goussard³, DC Gruenert^{4,5}, DM Geddes¹, RK Scheule⁶, SH Cheng⁶, P Courvalin³, C Grillot-Courvalin³ and EFW ALton^{1,2}

Gene Therapy (2008) 15, 434–442

in vivo bactofection to the murine lung

in vitro bactofection



Green fluorescent protein (GFP)-expressing invasive *E. coli* in the mouse lung. Lungs of mice were infected with invasive *E. coli* BM4570 carrying the prokaryotic expression plasmid pAT505 (GFP expressed under the control of the prokaryotic Plac promoter). The lungs were harvested 1 h post-infection. Invasive *E. coli* were associated with the alveoli in a dose-related manner ((a) 5 x 10⁷ CFU per mouse, (b) 5 x 10⁸ CFU per mouse, (c) 5 X 10⁹ CFU per mouse, (d) PBS (phosphate buffered saline) control).

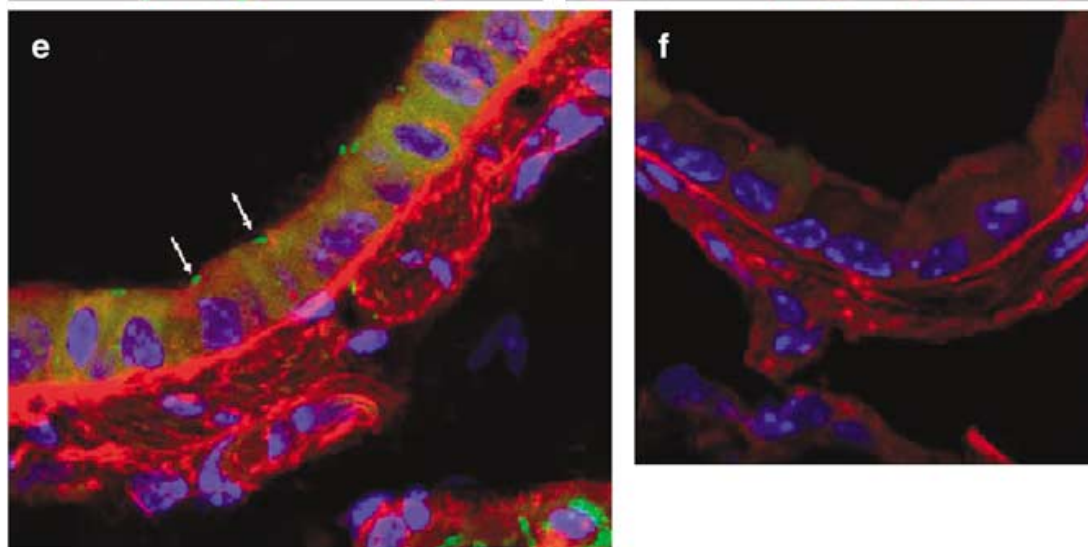
Luciferase (lux) expression after bactofection of cystic fibrosis tracheal epithelial (CFTE29o) cells with invasive *E. coli*. CFTE29o cells were transfected with invasive *E. coli* BM4570 carrying the eukaryotic expression plasmid pCIKLux at MOI 50–5000. After 48h of infection cells were harvested and lux activity assayed. Bacteria-mediated expression was compared to cells transfected with pCIKLux complexed to Lipofectamine 2000 (Lipo/pCIKLux) or untransfected cells. Data are expressed as mean±s.e.m. (n 1/4 5 per group, **Po0.01 when compared to untransfected, *Po0.05 when compared to Lipofectamine).

Bactofection of lung epithelial cells in vitro and in vivo using a genetically modified Escherichia coli

MDB Larsen^{1,2}, U Griesenbach^{1,2}, S Goussard³, DC Gruenert^{4,5}, DM Geddes¹, RK Scheule⁶, SH Cheng⁶, P Courvalin³, C Grillot-Courvalin³ and EFW Alton^{1,2}

Gene Therapy (2008) 15, 434–442

Bacteria (green spots) are mainly localized in the alveoli
in vivo bactofection



Bacteria associated with airway epithelial cells were also detected ((e) mouse transfected with 5×10^9 CFU, (f) PBS control). Original magnification 63X. GFP-expressing bacteria appear in green, alveoli in red and 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained nuclei are shown in blue. Arrows indicate *E. coli* associated with alveoli and airway epithelial cells, respectively. Images are representative of 10 fields of views per section.

consultare

Bactofection of lung epithelial cells in vitro and in vivo using a genetically modified Escherichia coli

MDB Larsen^{1,2}, U Griesenbach^{1,2}, S Goussard³, DC Gruenert^{4,5}, DM Geddes¹, RK Scheule⁶, SH Cheng⁶, P Courvalin³, C Grillot-Courvalin³ and EFWF Alton^{1,2}

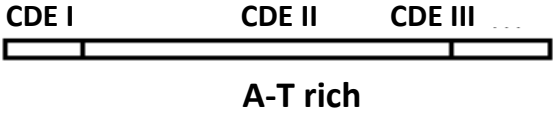
Gene Therapy (2008) 15, 434–442

CROMOSOMI ARTIFICIALI DI LIEVITO (YAC)

Gli YAC sono vettori lineari dotati di quegli elementi strutturali (telomeri, centromero e ARS) che conferiscono loro le stesse caratteristiche dei cromosomi di lievito, quali:

- dimensioni che possono raggiungere le 2 Mb di DNA**
- elevata stabilità dovuta alla presenza di telomeri funzionali ed alla corretta segregazione mediata dal centromero**
- efficiente replicazione**

Il cromosoma di lievito

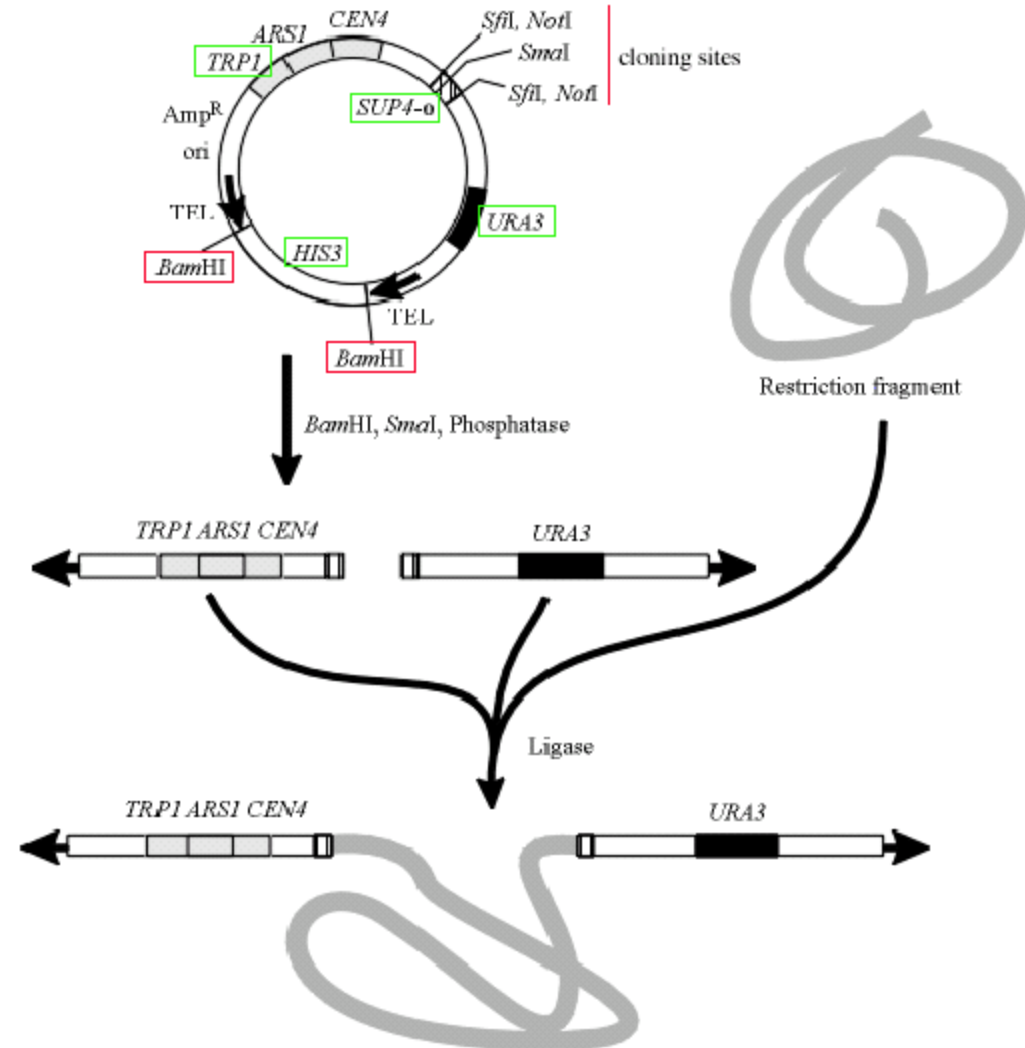
- Centromero → circa 120 bp 

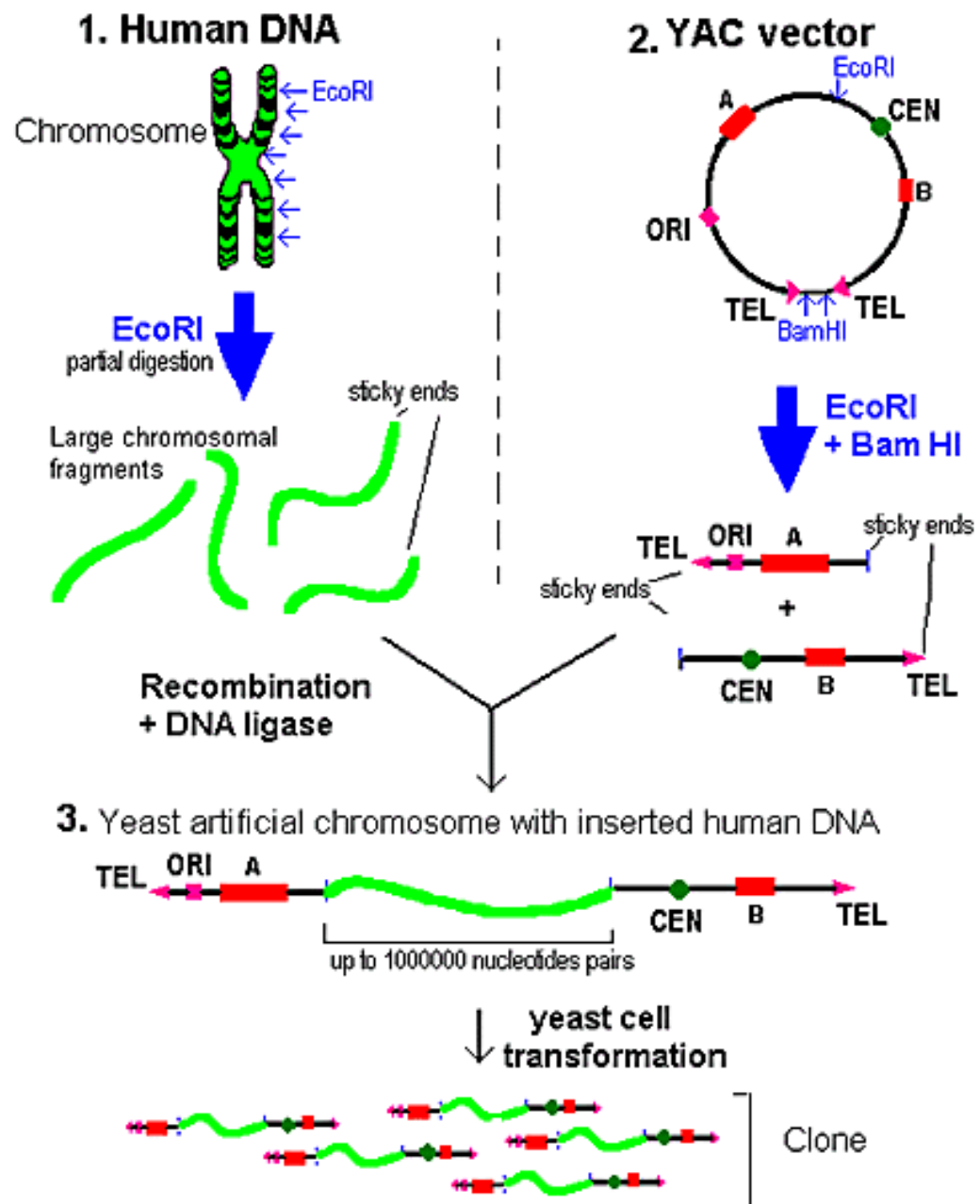
The diagram shows a horizontal line representing a chromosome segment. Above the line, from left to right, are labels 'CDE I', 'CDE II', and 'CDE III' followed by an ellipsis '...'. Below the line, centered under 'CDE II', is the label 'A-T rich'.
- Telomeri → sequenza $(TG_{1-3})_n$ di circa 300-500 bp
- ARS (Autonomously Replicating Sequences) → 100-500 bp
- Elementi genetici extracromosomali: plasmide 2μ

Maintenance & Construction of YACs

Important features of YAC vectors

- Circular form, ori, and Amp gene allows propagation of plasmid in *E. coli*.
- Digestion with BamHI linearizes plasmid w/ terminal telomeres.
- Digestion w/ SfiI, NotI, or SmaI allows insertion of 200-800 kb of DNA by 3-way ligation.
- Selection w/ *TRP1* and *URA3* allow positive selection of both arms of linear YAC.
- *ARS1*, *CEN4* sequences allow propagation in yeast.
- Counterscreening for loss of *SUP4-o* allows identification of clones with foreign DNA inserted by colony color.

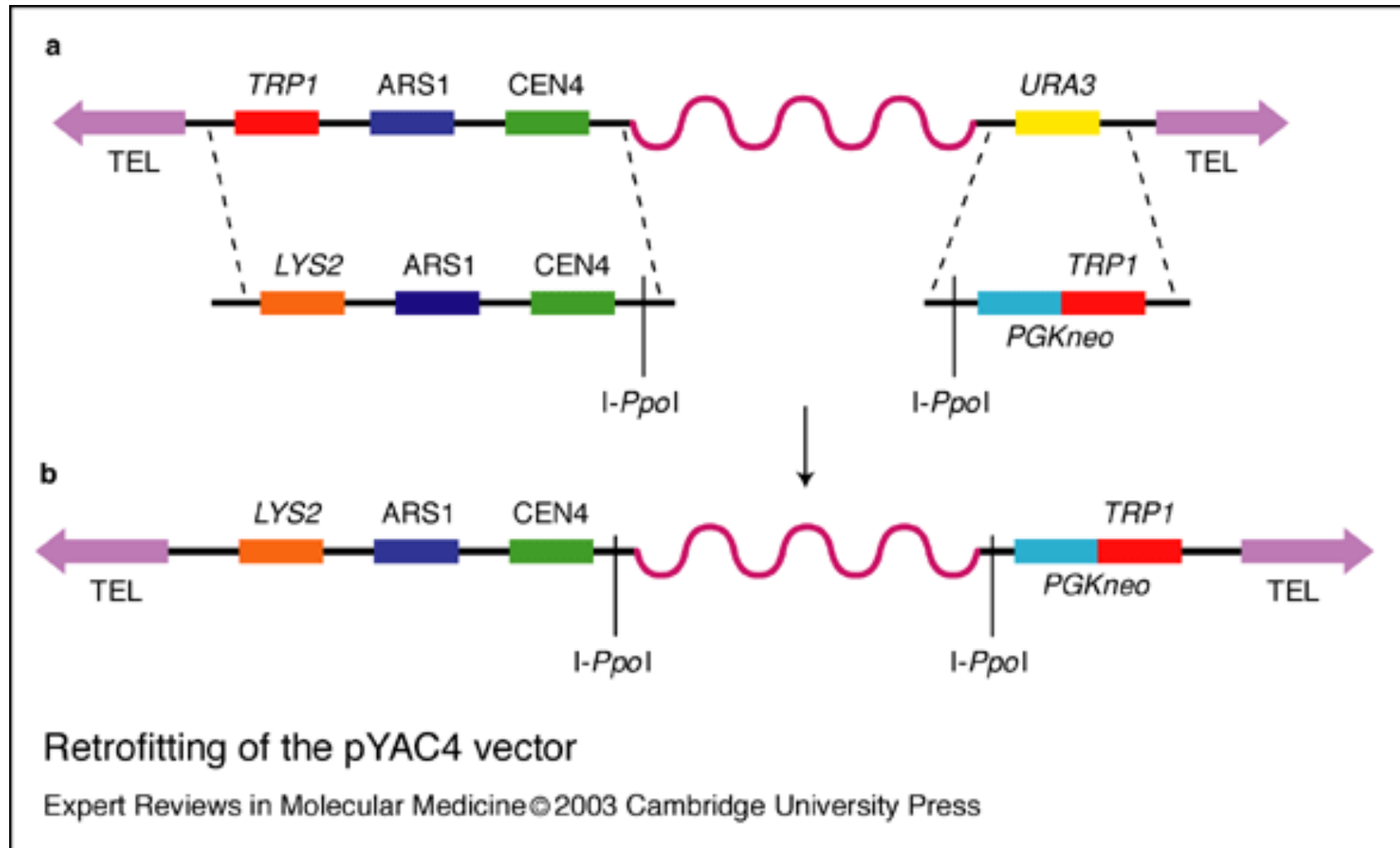




Cloning into a Yeast Artificial Chromosome (YAC)

YAC retrofitting: changing the YAC elements by homologous recombination.

For this a fragment having homologous tags at both ends and the sequence that it is intended to insert (i.e. PGKneo-TRP), is introduced into yeast cells containing the YAC. the transformants are selected using a marker of the inserting fragment (i.e. TRP).



YAC possono essere trasferiti in cellule di mammifero mediante:

- **fusione cellule di mammifero con sferoplasti di lievito**
- **elettroporazione**
- **lipofezione**
- **microiniezione**

**DNA totale di lievito o
YAC purificato mediante PFGE**



**una volta inseriti nelle cellule destinarie si integrano casualmente e stabilmente
nel genoma dell'ospite**



**con l'aggiunta di specifiche sequenze del virus di Epstein-Barr si possono mantenere in
forma episomale**

YACs versus BACs

YAC

- gli YAC possono ospitare fino a 2 Mb di inserto di DNA
- la trasformazione con gli sferoplasti di lievito è piuttosto inefficiente, e grandi quantità di DNA sono richieste per la costruzione di librerie
- gli YAC sono lineari e quindi difficili da isolare intatti a causa della loro suscettibilità a rompersi
- gli YAC sono piuttosto instabili e soggetti a riarrangiamenti
- gli YAC devono essere generalmente trasferiti in E. coli per successive manipolazioni e

modifiche

BAC

- i BAC possono ospitare fino a 300 kb di inserto di DNA
- i BAC possono essere trasferiti in E.coli mediante elettroporazione con una efficienza 100 volte superiore alla trasformazione di lievito
- il DNA dei BAC esiste in una forma circolare superavvolta che ne permette un facile isolamento e preparazione con minime rotture
- i BAC sono mantenuti stabilmente nelle cellule batteriche (RecA deficienti) a basso numero di copie
- i BAC possono essere modificati direttamente in E.coli
- i BAC possono essere trasferiti nelle cellule di mammifero mediante lipofezione e batteriofezione

GCV VECTORS

Vantaggi

- maggiore capacità di ospitare il gene terapeutico nella sua forma naturale
- prolungata espressione del transgene (Baker and Cotten, 1997)

Limiti

- integrazione random nei cromosomi dell'ospite
- bassa efficienza di trasferimento

Da consultare

Bactofection of lung epithelial cells in vitro and in vivo using a genetically modified Escherichia coli

MDB Larsen^{1,2}, U Griesenbach^{1,2}, S Goussard³, DC Gruenert^{4,5}, DM Geddes¹, RK Scheule⁶, SH Cheng⁶, P Courvalin³, C Grillot-Courvalin³ and EFW Alton^{1,2}

Gene Therapy (2008) 15, 434–442

M. Conese^{1,2*}, A.C. Boyd³, S. Di Gioia^{1,3}, C. Auriche⁴ and F. Ascenzioni
Genomic Context Vectors and Artificial Chromosomes for Cystic Fibrosis
Gene Therapy Current Gene Therapy, 2007, 7:175-87

Basu and Willard 2005. Artificial and engineered chromosomes: non-integrating vectors for gene therapy