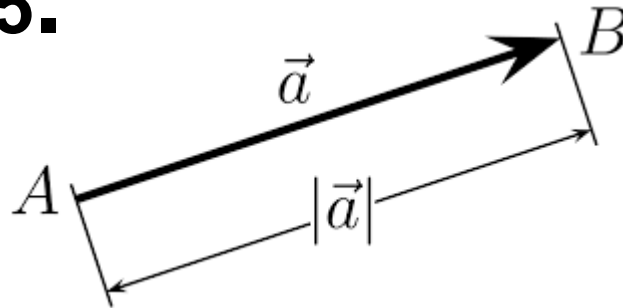
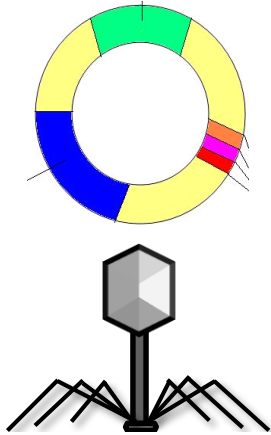


7. Óra Génátvitel vektorokkal

2019. március 25.



**Vektorok: idegen genetikai információ
sejtbe juttatására alkalmas biológiai információ
hordozó rendszerek.**

- Eddig egy élőlényben már meglévő gének megváltoztatásáról beszéltünk.
- Az indukált mutáció korábban tárgyalt formája és a protoplaszt fúzió azonban nem irányítható genetikai változtatások. Csak az eredmény alapján szelektálni van módunk.
- A vektorokkal való génmódosítás irányítható abból a szempontból, hogy legalábbis tudjuk, hogy milyen tulajdonságot kódoló gént viszünk be az élőlénybe.
- Esetenként azt is lehet tudni – vagy legalábbis utólag a DNS-t vizsgálva meg lehet határozni – hogy a kívülről bevitt genetikai információ hová épült be.

De miért van szükség vektorokra - tehát hordozó rendszerekre - az idegen DNS bejuttatásához?

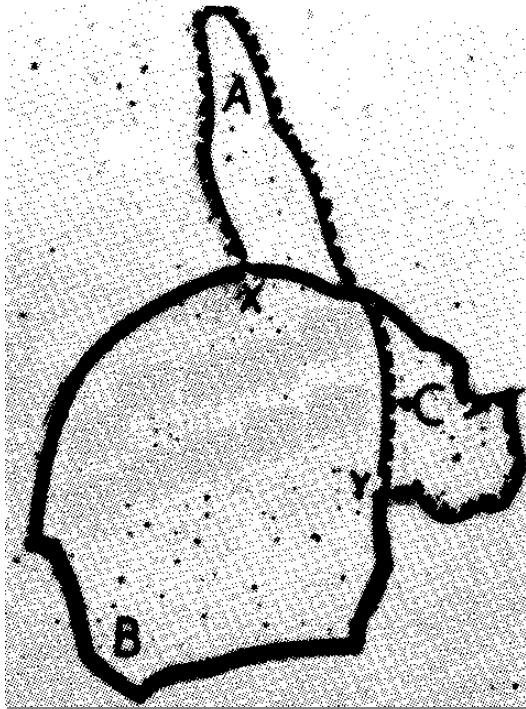
Miért van szükség vektorokra az idegen DNS bejuttatásához?

- A DNS és a sejtmembrán felszíne egyaránt negatívan töltött. Ezért taszítják egymást.
- A sejtmembrán pórusain csak egy bizonyos mérettartomány alatti molekulák tudnak passzívan átjutni.
- Ha sikerül is legyőzni ezt a taszító hatást és a bejuttatni kívánt DNS méretének megfelelő pórusokat nyitni a membránon (kémiai vagy elektros kezeléssel), akkor is számolni kell még a sejt saját “immunrendszerével”.
- Léteznek pl. az idegen DNS-t felismerő és feldaraboló enzimek, pl. baktériumokban a **restrikciós endonukleázok**. A bejuttatni kívánt DNS-t ezektől meg kell védeni.
- A baktériumok metil csoporttal látják el a saját DNS-üket (metilezés vagy metilálás a szakirodalomban), az őket támadó vírusok DNS-e viszont nem metilezett. Ez alapján tudnak a restrikciós endonukleázok a saját és az idegen DNS között különbséget tenni.
- A metilezett DNS-t a legtöbb r. endonukleáz nem hasítja el (de vannak kivételek).



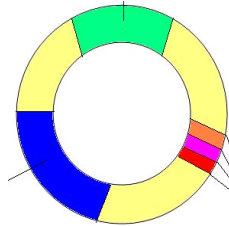
Hogy néznek ki a gének, amiket módosítani akarunk?

Prokarióta genomi DNS
(másolás közben)

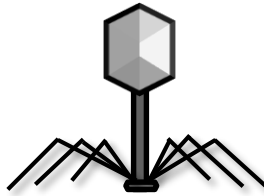


1 db kromoszóma
egyszeres = haploid DNS készlet
aszexuális szaporodás (osztódás)

Genomon
kívüli DNS
Például:



plazmid DNS



vírusból származó
DNS

Eukarióta genomi DNS



Embernél 46 db kromoszóma (23 pár)
Többszörös = diploid DNS készlet
Kivéve: ivarsejtek (1x-es = haploid génekészlet)

Az élő sejtek nem genomi DNS-t is tartalmaz(hat)nak

Plazmidok (nem minden sejt)

Mitokondriumok (~prokarióta-szerű DNS)

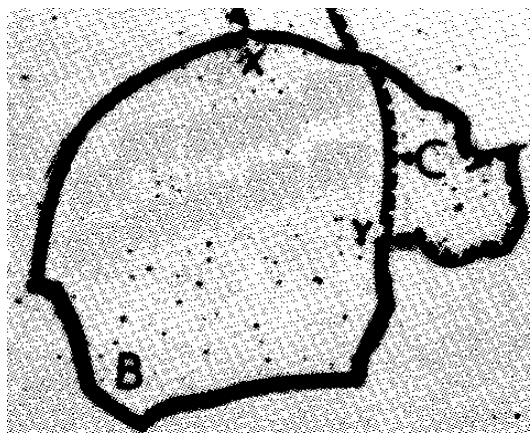


Milyen céllal végezhetünk génmódosításokat?

1. Ipari célú, ezen belül gyógyászati célú DNS módosítás (fehérje termelési vagy éppen DNS hibajavítási céllal → GÉN TERÁPIA (gene therapy)

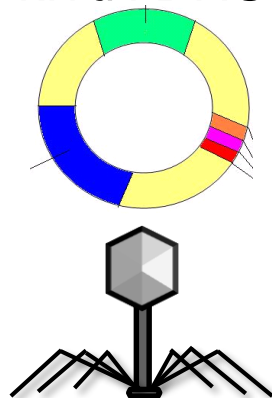
2. Kutatási célú

Prokarióta genomi DNS
(másolás közben)



1 db kromoszóma
baktériumok

Genomon
kívüli DNS



Eukarióta genomi DNS



Több db kromoszóma
(embernél 23 pár)
növények, gombák,
állati (akár emlős) sejt kultúrák

Ha ipari hasznosítás a cél, akkor a lehetséges legegyszerűbb (leggyorsabb, legolcsóbb, de jó minőségű terméket adó) megoldást kell választanunk.

Néha elég csak egy plazmidot bevinni a sejtbe, aminek az információ tartalma nem is feltétlenül kell, hogy beépüljön a sejt saját genomi DNS-ébe.

A DNS módosítások a maradandóság szempontjából

- **átmenetiek** (tranzienst) vagy **stabilak** lehetnek.
- **Átmeneti**: a bevitt géneket a sejtek átírják és kifejezik (expresszálják), de a kívülről bevitt információ nem épül be a genomi DNS-ükbe. Emiatt a DNS módosítást – vagyis az új tulajdonságot - sejtosztódáskor nem örökítik tovább.
- **Stabil**: az idegen gén beépül a módosítani kívánt sejt genomi DNS-ébe. Emiatt a bevitt információ a sejtosztódások során tovább is örökítődik. Stabil módosítás a genomi DNS-t érő mutáció is.
- *Néhány DNS módosítással kapcsolatos fogalom (szakzsargon):*
 - Transzformálás: idegen, nem vírus eredetű DNS bejuttatása prokariótákba és nem állati eukarióta sejtekbe.*
 - Transzfektálás: idegen, nem vírus eredetű DNS bejuttatása eukariótákba.*
 - Transzdukció: vírus eredetű DNS bevitele a sejtbe.*

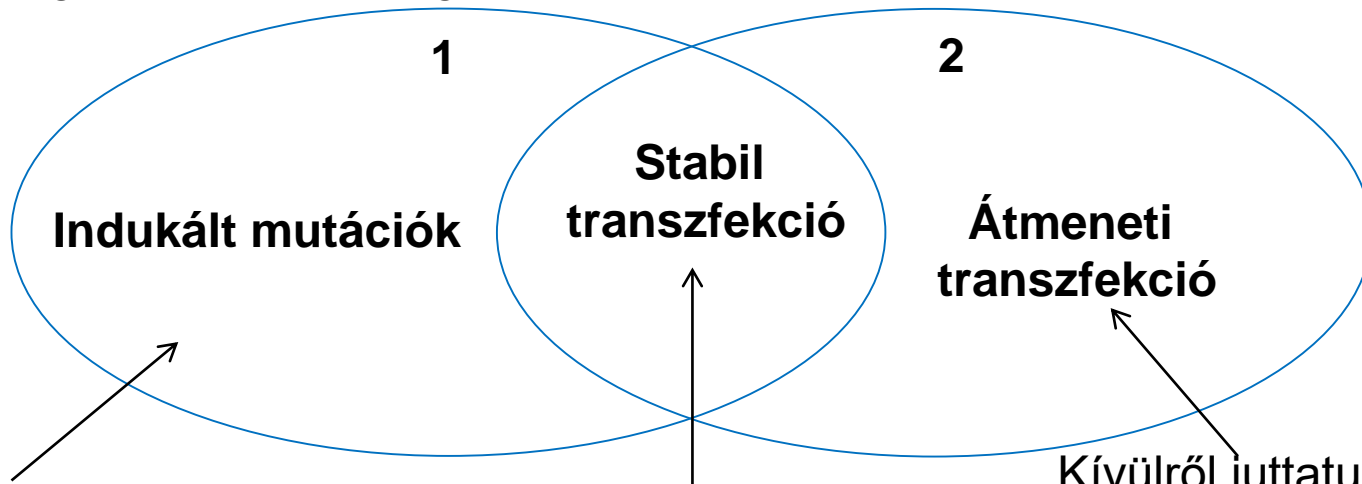


Mennyire maradandó a génmódosítás?

1. a sejt genomi DNS-ének módosítása = mutáció

- Indukált mutációk: sokszor véletlenszerűek, „statisztikusak”
- Irányított mutagenesis: olyan indukált mutáció, amelyet irányítani tudnak.
Pl. kémcsőben PCR és vektorba klónozás segítségével vagy „in vivo” CRISPR módszerrel.

2. Kívülről bejuttatott információ (sejtidegen DNS) felhasználása
Ennek megvalósítására szolgálnak a **vektorok**.



Nem viszünk be kívülről genetikai információt, de módosítjuk a genomi DNS-t.

kívülről juttatunk be genetikai információt, és ezzel módosítjuk a genomi DNS-t → osztódáskor továbböröklődik!

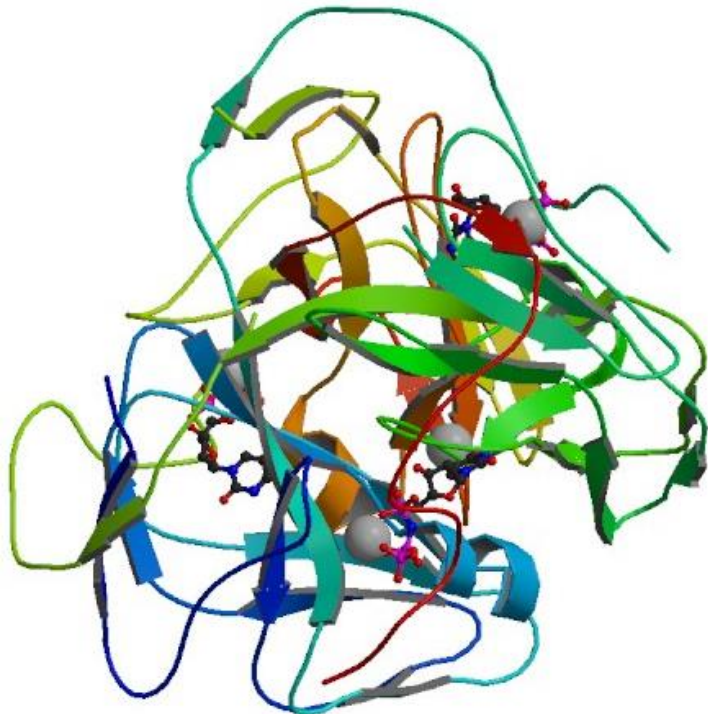
Kívülről juttatunk be genetikai információt, de ez nem épül be a genomi DNS-be.



Alkalmas lehet-e egy baktérium emberi fehérje termelésére?

Mi értelme van egyáltalán egy emberi fehérjét baktériummal megtermeltetni?

- A baktériumok prokarióták, így a legegyszerűbb, legkönnyebben módosítható anyagcserével rendelkeznek. → a legolcsóbb és leggyorsabb termelés lehetőségét nyújtják.
- Nem állnak fel állatvédelmi aggályok (vö. immunfehérje termeltetése állatokban).
- Nem hordoznak emberre veszélyes vírusokat (vö. vérfehérjék, vérkészítmények).
- Attól függ, hogy a fehérje **tartalmaz-e intront** és az emberben átesik-e a felépítését követő, **poszttranszlációs módosításon**.
- Pl. intronok kivágása (csak eukariótákban), glikoziláció, metilezés, foszforiláció, stb.



Balra: egy kutatási célra *Escherichia coli* BL21 baktérium törzsben előállított emberi fehérje, a **dUTPáz**.

Az emberi dUTPáz nem esik át poszttranszlációs módosításon, így baktériumokkal is megtermeltethető.

Emberi inzulin: tartalmaz intront, de sikerült *E. coli*-val is megoldani a termelését.

Mire való a sejtben a dUTPáz?

Miért kell ipari méretekben inzulint termelni?

Mit használhatunk vektorként?

Plazmidokat. A plazmidok **nem élőlények**, még a vírusoknál (a vírusok sem tekinthetők élőlénynek) is egyszerűbbek, mert tokjuk sincsen, csak DNS-ük. Kis gyűrűs DNS darabok, melyek a kromoszómától függetlenül másolódnak a sejtekben. Anyagcseréjük nincs, semmi mást nem tudnak csak duplikálódni. (bevihető: 1-10 kb)

Vírusokat. Ezen belül megkülönböztethetjük a →

Bakteriofágokat: Ezek is tulajdonképpen vírusok, de a baktériumok vírusai, és sokkal egyszerűbben működnek, mint pl. az emlős vírusok. (bevihető: 10-23 kb)

És más vírusokat: Ez alatt azt értjük, hogy minden élőlénynek, az élesztőknek, a növényeknek, az emlősöknek mind megvannak a maguk vírusai, amelyek a megtámadott sejtek tulajdonságaihoz alkalmazkodtak.

Mesterséges kromoszómát. Alkalmazhatunk mesterségesen létrehozott baktérium kromoszómát is (~300 kb).

kb: kilobázispár = 1000 bázispár, a DNS hosszúságának mérőszáma.

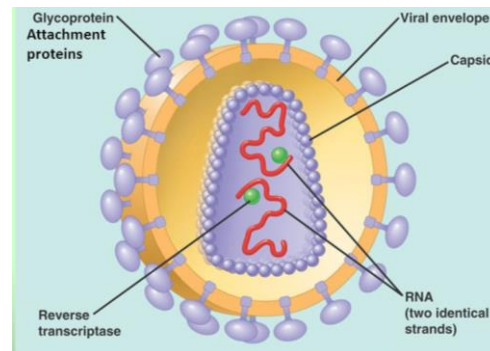


Embertől független génmódosítás vírusfertőzéssel

Retrovírusok: genetikai információjuk **stabilan beépül** a megfertőzött sejt genomi DNS-ébe (pl. HIV)

Adenovírusok: DNS-ük a sejtmagon belül a kromoszómák mellett szabadon helyezkedik el, lemásolódik és a vírusfehérjéket kódoló gének átíródnak,
DE nem épül be a genomba → **átmeneti (tranzien) transzfeekció**,
Sejtosztódás esetén az utódsejtek nem öröklék a vírus DNS-t.

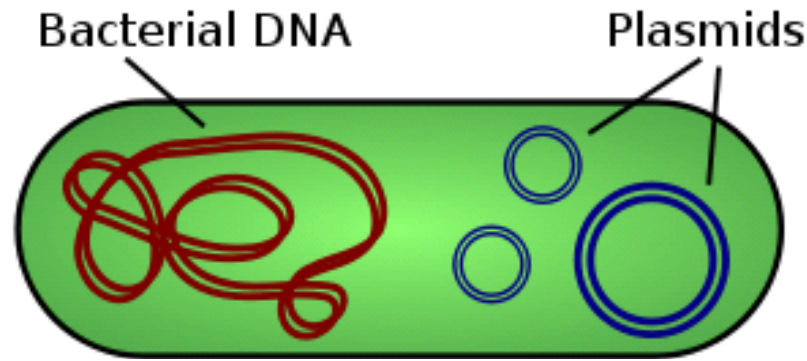
Megj.: az adenovírusok többnyire légzőszervi megbetegedéseket okoznak (pl. megfázás → légcsőhurut → tüdőgyulladás).



A HIV vírus keresztmetszeti ábrázolása



Embertől független génmódosítás horizontális génátvitellel → plazmid átadásával

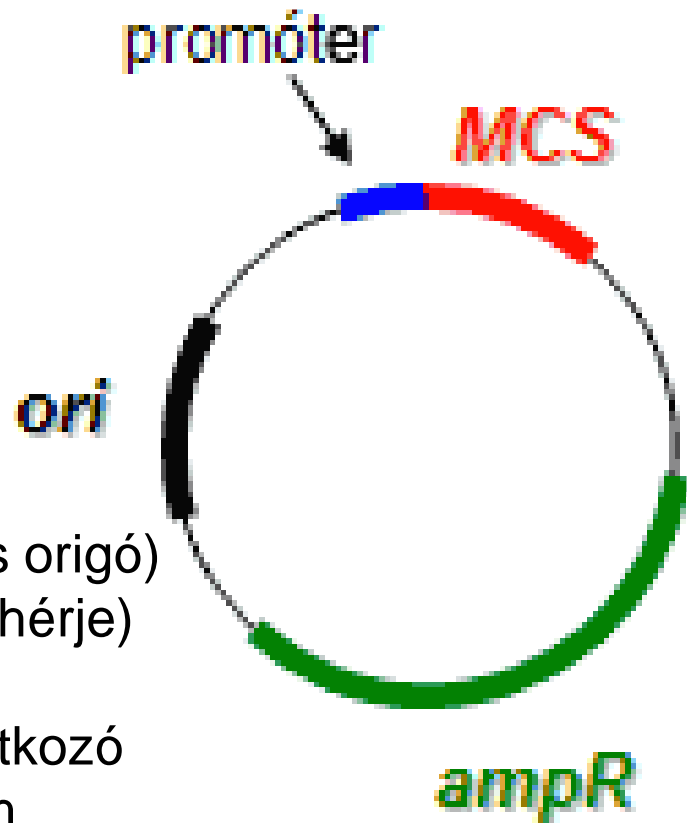


- Plazmidok: a genomi DNS-től (kromoszómától) függetlenül létező (replikálódó), “kör alakú” (cirkuláris) DNS darabok.
- Nem feltétlenül szükségesek a sejt életben maradásához, de bizonyos környezeti hatások kivédésében előnyt jelenthetnek.
- Kódolhatnak pl. antibiotikum rezisztencia géneket, toxinokat, anyagcserében fontos extra fehérjéket.
- **Horizontális génátadás: nem szaporodás útján (szülő → utód), hanem két független sejt között történő génátadás.**



Hogy néznek ki “közelebbről” a plazmidok?

- Plazmidoknak nevezzük a baktériumokban, egyes élesztőkben, algákban és növényfajokban található, a **kromozómáktól független DNS darabokat**.
- A plazmidok általában gyűrű alakú és kettősszálú DNS-molekulák.
- A plazmidokban található gének a kromozómáktól eltérő tulajdonságokat hordoznak.
- Génmanipulációnál ezt használják ki: **Egyszerűbb egy kis plazmid génjeit „átszabni”, mint a teljes kromozómát.**



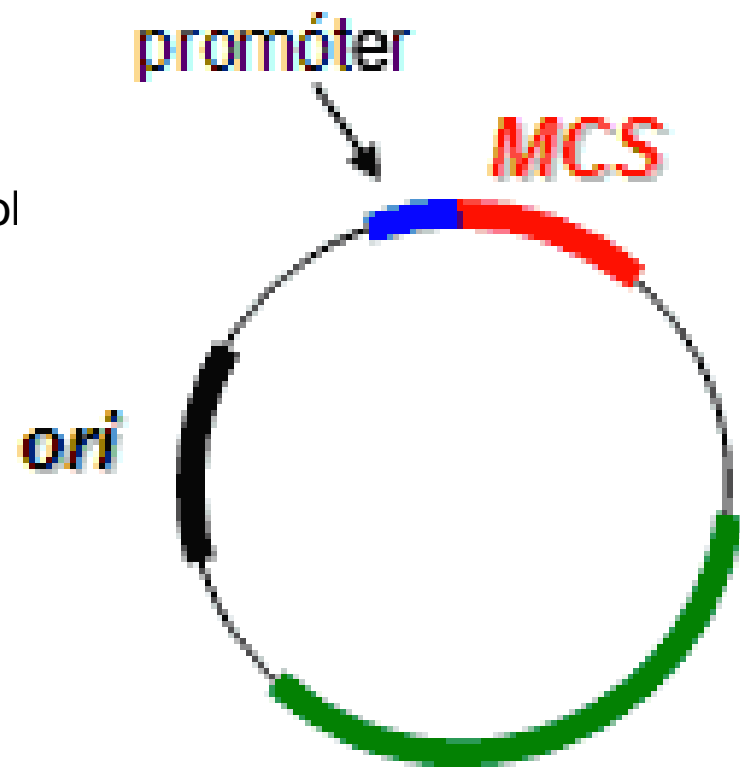
Egy plazmidnak tartalmaznia kell:

- A saját lemásolásának kijelölt helyét (replikációs origó)
- A rajta kódolt információ átírásának (mRNS → fehérje) kezdő- és végpontját.
- A plazmidon belül több, fehérje felépítésre vonatkozó információt kódoló szakasz is lehet. Pl. antibiotikum rezisztenciát kódoló génszakasz vagy szakaszok.

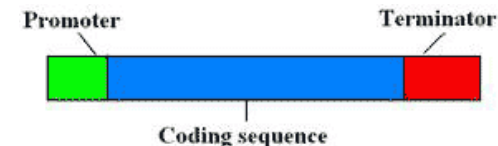


Hogyan működnek a plazmid vektorok?

- ori = replikációs origó, ez a DNS másol kezdőpontjának helye.
- ampR = ampicillin rezisztencia gén.
- A rezisztenciát a plazmidot felvett sejtek szelektálására használjuk ki.
- MCS = multiple cutting/cloning site = (többféleképpen) felvágható szakasz = itt lehet felnyitni a gyűrűt, és beilleszteni, amit akarunk.



ampR



A plazmid vektorok jellemző részei:

- Replikációs origó – a plazmid DNS duplikációjának kezdőpontja, enélkül nem tud sokszorozódni a plazmid
- Promóter szakasz - itt indul a kiírás mRNS-re (ld. operon)
- Célgén(ek) – ezek által kódolt fehérjét akarjuk előállítani a sejttel
- Terminátor szakasz – ez zárja le a kiírandó gének sorát.
- Marker gén(ek) – a sikeresen bevitt és működő géneket tartalmazó sejtek szelektációját segítik, pl. antibiotikum rezisztencia → antibiotikumot tartalmazó tápoldaton csak a plazmidos sejtek növekednek, a többi elpusztul.

Mesterséges génátvitel vektorokkal

Használjuk fel a természet megoldásait!

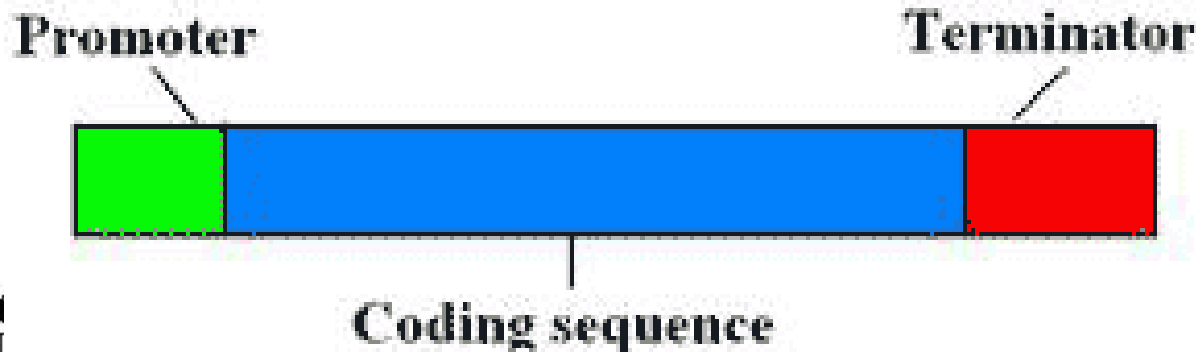
Klónozó vektorok: csak a gén(ek) bevitelére és sokszorosítására alkalmasak, a rajtuk kódolt információ kiírását nem segítik elő. Használhatóak **genetikai könyvtárnak** is.

Expressziós vektorok: a bevinni kívánt gén(ek) mellett azok szabályozott kiírásához szükséges DNS szakaszokat is tartalmaznak → A célgén és a szabályozó szakaszok együttesét hívják expressziós kazettának vagy keretnek.

Az **expressziós keret** részei:

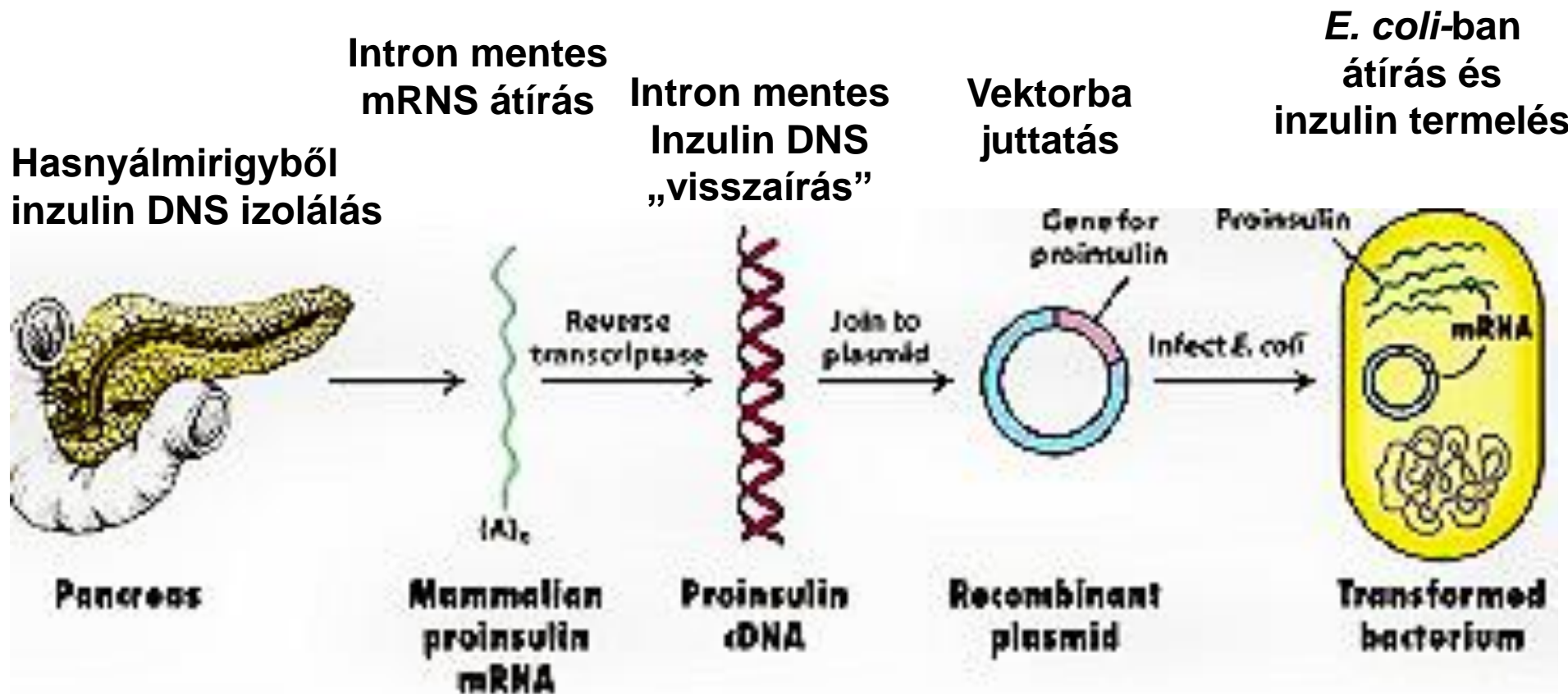
1. a célgén előtti **promóter szakasz**,
2. a **célgén**,
3. a célgén utáni **terminátor szakasz**.

*Mi a szerepe a promóter és a terminator szakasznak?
A DNS szakasz átírására vonatkozó információt tartalmaznak.*



Mire jók a vektorok? – Az inzulin előállításának példája

- Az inzulin tartalmaz intronokat és átesik poszttranszlációs módosításon is. Ezért csak közvetve lehet megtermeltetni baktériumokban.



A humán inzulin (proinzulin) előállítása *E. coliban*. Genentech, 1978, Humulin



Hogyan ültethetőek be egy vektorba a tetszésünk szerinti fehérjét kódoló gének? Restriktációs enzimek segítségével.

- A DNS-t speciális felismerési helyeknél elhasítani képes enzimek.
- Baktériumok és archea baktériumok „immunrendszerének” részét képezik.
- Vírusfertőzés esetén a számukra specifikus szekvenciánál elhasítják a vírus DNS-t.
- A sejt metil csoportokkal jelöli meg a saját DNS-ét, ezt nem hasítják. A „metilezett” DNS-t a legtöbb restriktációs enzim nem képes elhasítani.



EcoRI hasítóhely

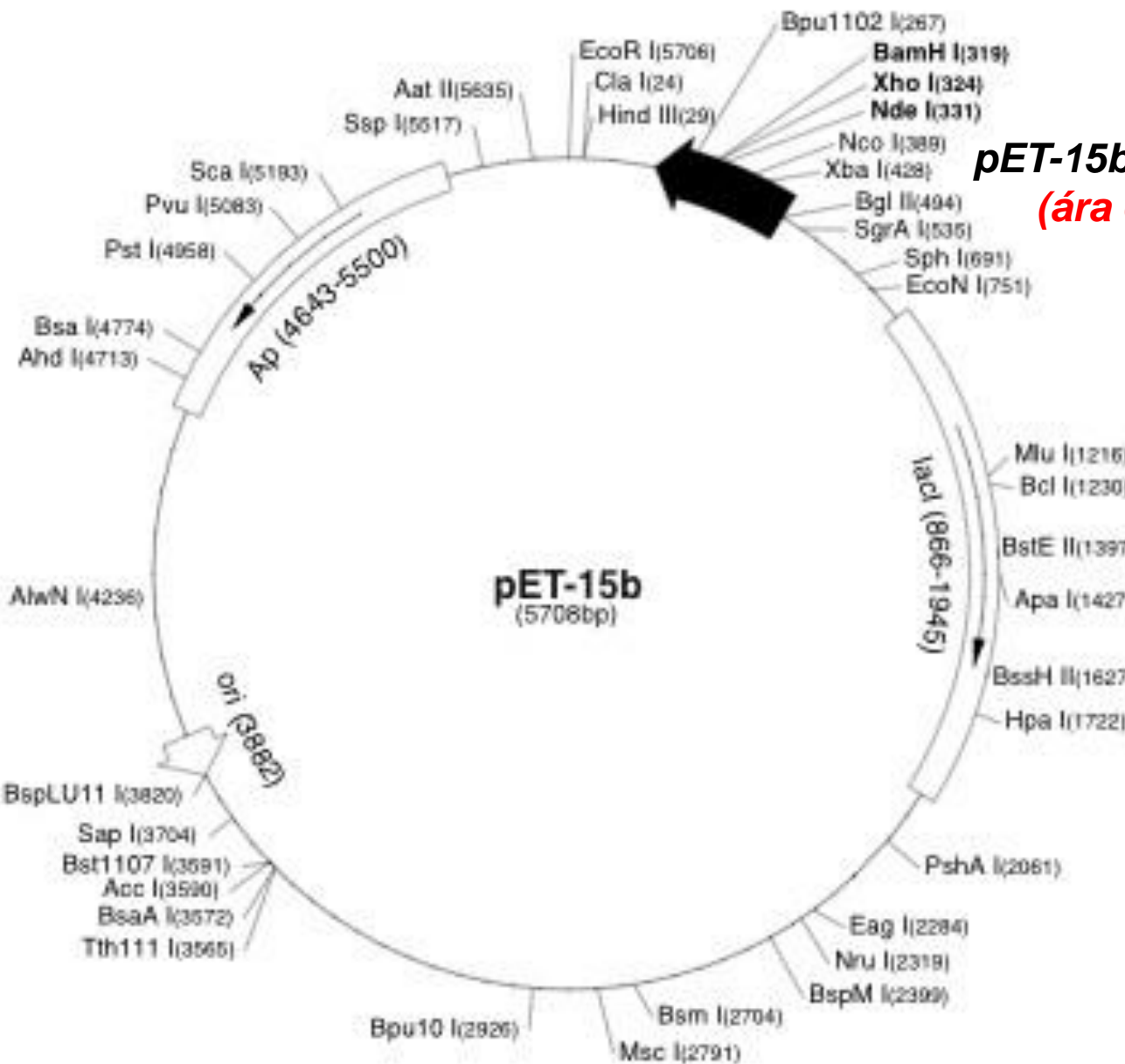


SmaI hasítóhely

- A hasítóhelyek tükörképi = palindrom szekvenciák.



Restriktíós enzim hasítóhelyek egy kereskedelemben kapható plazmidon

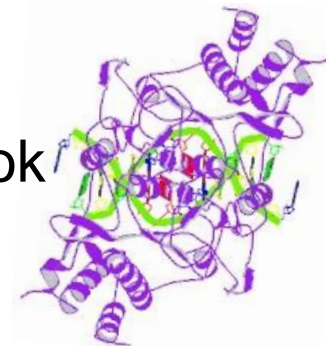


pET-15b, egy mesterséges plazmid
(ára egyéni árképzés szerint alakul...)

Restriktációs enzimek

Számunkra molekuláris ollók, a bakteriofágok számára molekuláris piranha-k.

Nevezéktan és specificitás...

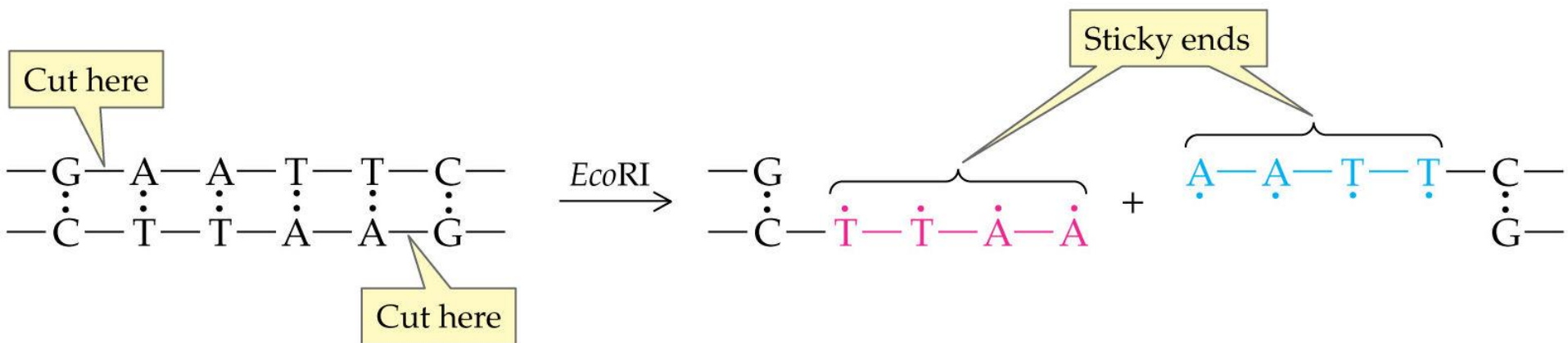


Mikroorganizmus	Enzim	szekvencia 5' → 3'	Bontási helyek száma			
			λ	Aα 2	SV40	φx17
<i>Arthobacter luteus</i>	AluI	AG CT	>50	>50	35	24
<i>Brevibact. albidum</i>	Ball	TGG CAA	15	17	0	0
<i>H. aegypticus</i>	HaeIII	GG C'C	>50	>50	19	11
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaI	GTT AAC	13	6	4	3
<i>Serr. marcescens Sb</i>	SmaI	CCC GGG	3	12	0	0
<i>B. amyloliquefaciens H</i>	BamHI	G GATC'C	5	3	1	0
<i>E. coli RY13</i>	EcoRI	G AA'TTC	5	5	1	0
<i>H. influenzae Rd</i>	HindIII	A' AGCTT	6	11	6	0
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaII	C C'GG	>50	>50	1	5
<i>K. pneumoniae OK8</i>	KpnI	GGTAC C	2	8	1	0
<i>X. holcicola</i>	XhoI	C TCGAG	1	6	0	1

Hogyan vihetők át gének plazmidokkal?

1. Az átvenni kívánt gén izolálása: a hordozó sejt DNS-ének feldarabolása, a keresett gén izolálása
2. Beépítés a plazmid DNS-be. „Szabás-varrás” Kell hozzá olló és ragasztó. „Olló:” enzimek, restrikciós endonukleázok. A kettős szálú DNS-t hasítják, de csak bizonyos helyeken. Tükörképi DNS szakaszoknál (palindrom szekvenciák) „ragadós véget” hoznak létre.

A célgén két végét ugyanazzal az egy vagy két restrikciós enzimmel kell megvágni, mint amivel/amikkel az “üres”, lezárt plazmidot felnyitjuk, hogy a célgén és a plazmid végei egymásba illeszthetők legyenek (“ragadós végek” keletkezzenek).



Hogyan vihetők át gének plazmidokkal?

3. Bevitel a gazdasejtbe:

- kémiai és/vagy
- elektromos hatásokkal (vö. a *protoplaszt fúzióval*)

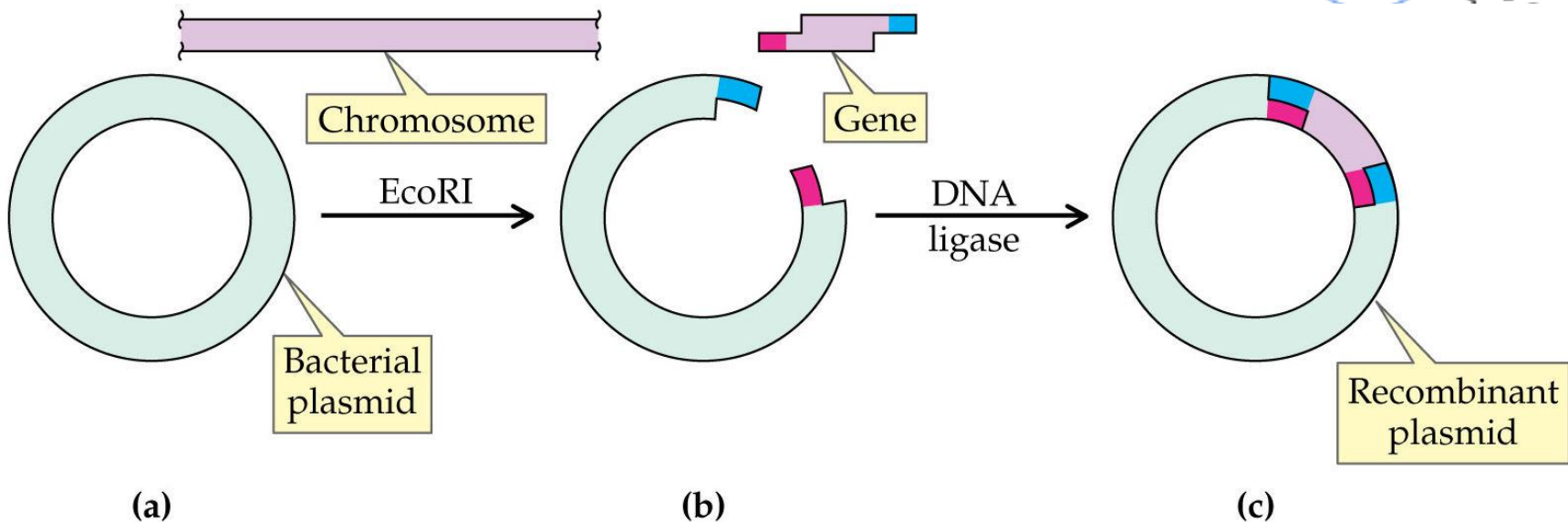
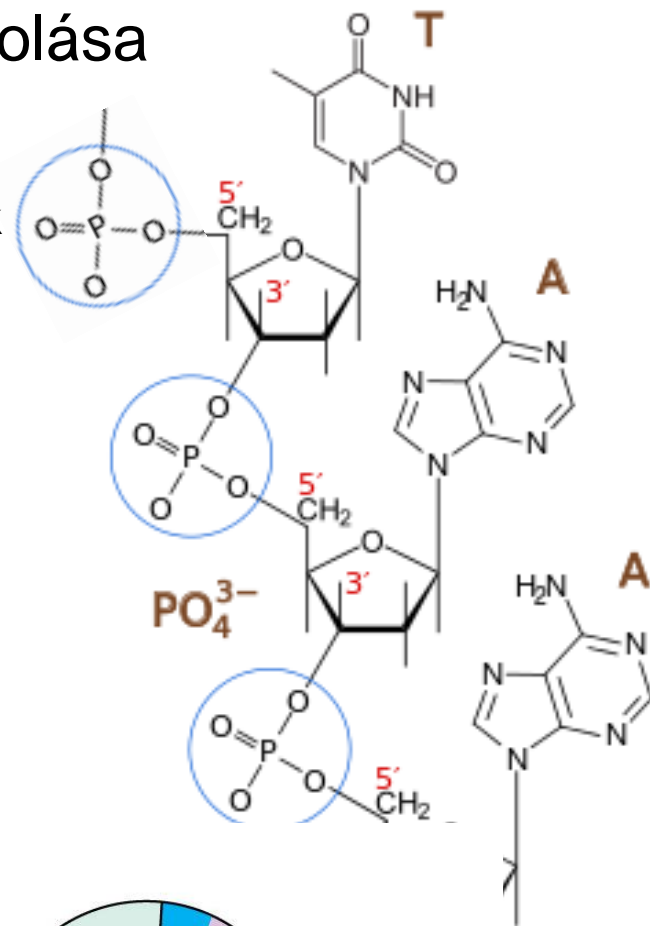
4. Manifesztáció + szelekció: a kívánt gén mellé egy marker (nyomjelző) gént is beépítenek (pl. antibiotikum-rezisztencia), ami segít kiválasztani azokat a sejteket, ahol megtörtént a beépülés, és „működik” a plazmid. Az adott antibiotikumot tartalmazó táptalajon csak a rezisztenciagént (azaz a plazmidot) tartalmazó sejtek indulnak növekedésnek.

Ez a jelző (marker) gén – például antibiotikum rezisztencia – már benne szokott lenni a kereskedelemben kapható “üres” plazmidban.



Ragadós végek készítése és összekapcsolása

- A ragadós végek maguktól is összetapadnak.
- Ez az egymással szembe kerülő komplementer bázisok (A-T és C-G) közötti hidrogén-kötések spontán kialakulását jelenti.
- De a DNS cukor-foszfát alapláncának összekapcsolásához még **kell egy enzim (T4 DNS-ligáz, "ragasztó")**.
- A plazmidba beültetni kívánt DNS szakasz két szélére **PCR reakcióval is készíthetünk restriktions enzim hasító helyeket**. Ez akkor használatos, ha az expressziós kazetta csak a plazmidba illesztéskor áll össze.

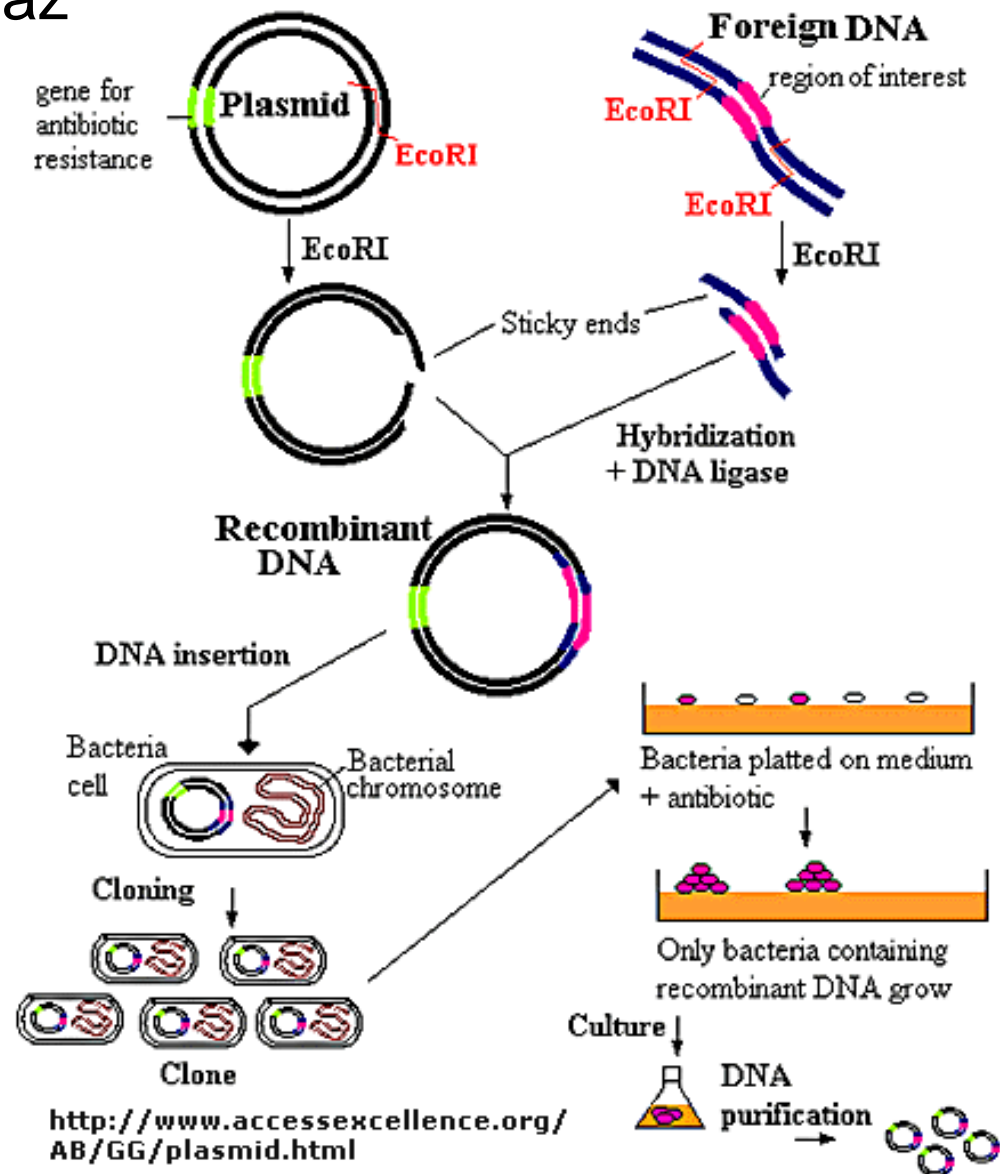


Idegen DNS sejtbe juttatása – az előbb ismertetett lépések folyamatábrája

Ezzel az eljárással a prokariótákba és eukariótákba is szinte bármilyen gént be lehet vinni.

Cél: fehérjetermelés

- hormonok
- vakcinák
- enzimek
- immunfehérjék
- vérfehérjék



Cloning into a plasmid



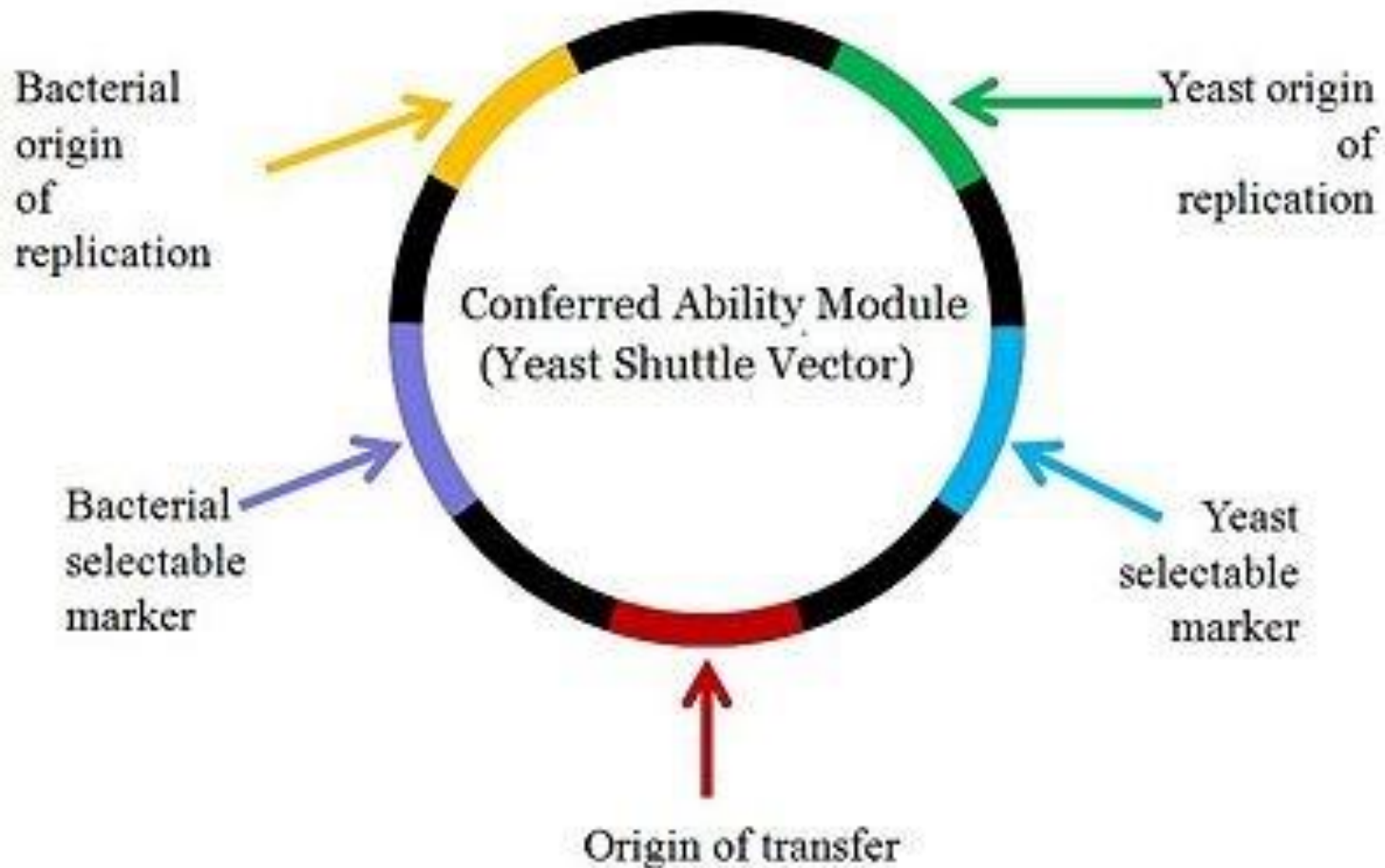
Ingázó (shuttle) vektorok

Az eukarióták plazmidjai és vírusai másképpen szaporodnak mint a prokariótáké, másfajta replikációs origójuk van. Az eukarióta sejtek génmanipulációjához tehát más vektorokra van szükség. Sokszor viszont baktériumokból kell átvenni géneket eukariótákba – és vissza. Ehhez olyan vektorokra van szükség, amelyek mindkét sejtípusban szaporodni tudnak. Ezekben kétféle replikációs origó található, egy a prokarióta és egy az eukarióta sejtekhez.

Emellett a rezisztencia markerek is különbözők, másfajta antibiotikumok hatékonyak a prokarióták és eukarióták ellen → kétféle rezisztencia gént kell beépíteni.



Ingázó (shuttle) vektorok



Génátvitel *Agrobacterium* plazmidokkal

Az *Agrobacterium*ok 4 faja ismert:

1. *Agrobacterium tumefaciens*: gyökérgolyva, koronagubacs. A sérülések helyén alakul ki fertőzés.

A Ti plazmid nem differenciált szövetburjánzást idéz elő. A sejtek olyan anyagokat termelnek amelyeket a baktérium felhasznál.



2. *Agrobacterium rhizogenes*: RI (root inducing) plazmidja vattaszerű hajsálgökér burjánzást okoz.
3. *Agrobacterium rubi*: gyümölcsfánál, málnánál gyökérgolyva, vesszőgolyva
4. *Agrobacterium radiobacter*: plazmidja nem okoz betegséget, de antibiotikumot (agrocint) termelő gént hordoz. Ugyanezen a plazmidon található az agrocin elleni rezisztenciát biztosító gén is – megvédi saját magát.



Az *A. tumefaciens* fertőzés

Az *Agrobacterium tumefaciens* egy Gram-negatív növénypatogén talajbaktérium, amely a kétszikű növényeket a sebzési helyeken megfertőzi és tumorokat okoz rajtuk.

A baktériumok patogenitása összefügg a tumorindukáló (Ti) plazmid jelenlétével. A Ti plazmid egy része (transzfer DNS = T-DNS) a kórfolyamat során átkerül a növényi sejtbe és a sejtmag DNS-állományába integrálódik (A T-DNS régióban helyezkednek el a tumorok kialakulásáért felelős gének.)

V.ö.: a HPV (Human papillomavirus) fertőzés emberben szintén kóros sejtosztódást, méhnyakrákot okozhat.

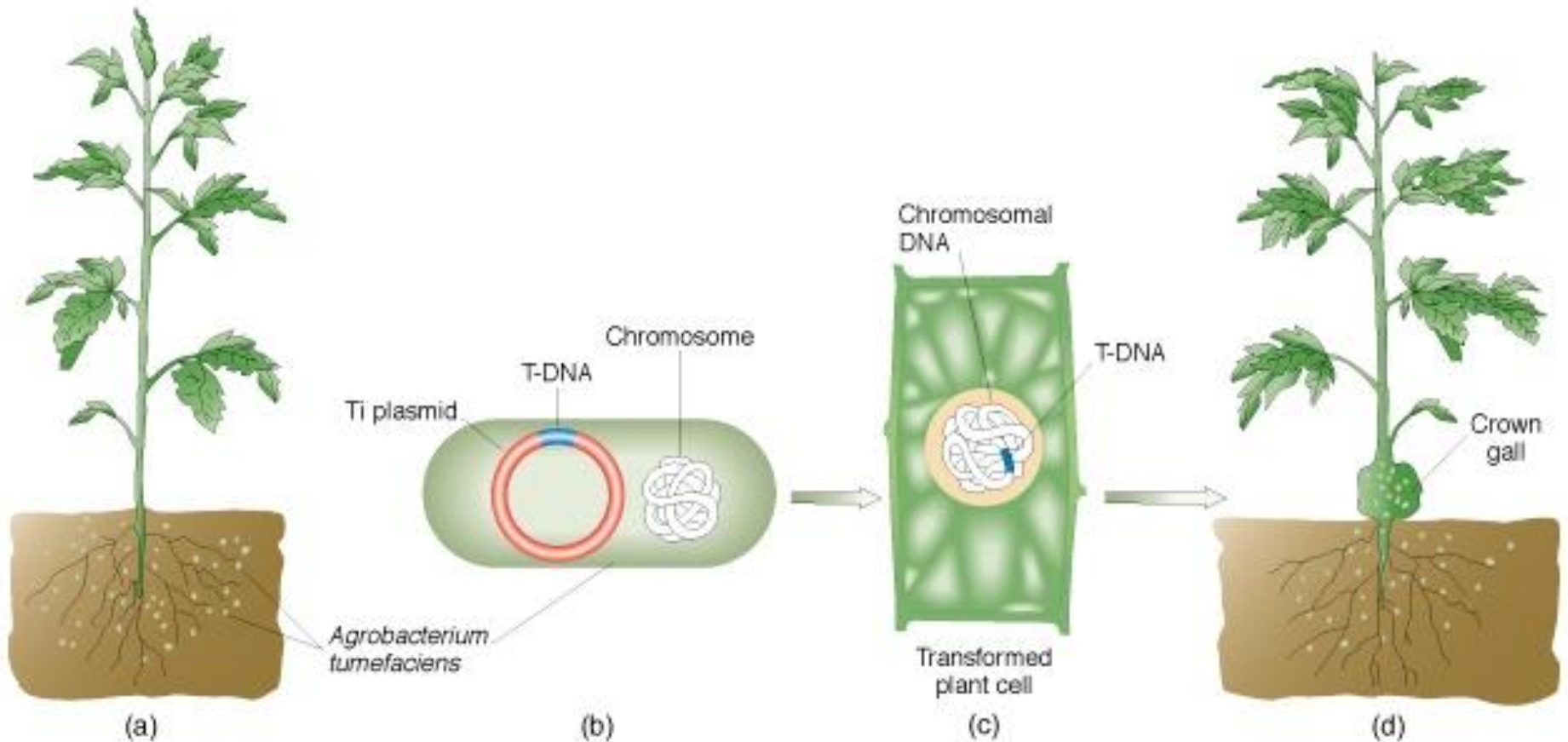


Az *A. tumefaciens* fertőzés

Kétszikűeknél: Az *Agrobacterium tumefaciens* növény-patogén törzs Ti (tumor indukáló) plazmidja a T-DNS szakaszt beépíti a megfertőzött növény kromoszómájába.

Maga a baktérium sejt nem hatol be a növényi sejtbe, csak a növény sejtközi folyadékával érintkezik.

A növény életben marad, de életműködései, anyagcseréje megváltoznak.



A Ti plazmid

- $1,2 \times 10^8$ molekulatömegű, gyűrű alakú DNS molekula. A baktériumban önállóan replikálódó genetikai egység.
- A plazmid DNS-nek van egy transzformáló (T-) DNS szakasza. Ennek nagysága 20 000 bázispár, ez jut be a gaz-dasejtbe a fertőzést követően, majd stabilan beépül a növényi kromoszómába.
- A sejtburjánzás mellett olyan aminosav származékokat termeltet a növényen, amelyeket az *Agrobacterium* tápanyagként hasznosít, emellett olyan növényi hormonanalógok képződnek, amelyek a gyökér- és szárnövekedést leállítják, ezzel is előnyt adva a tumorsejtek növekedésének.



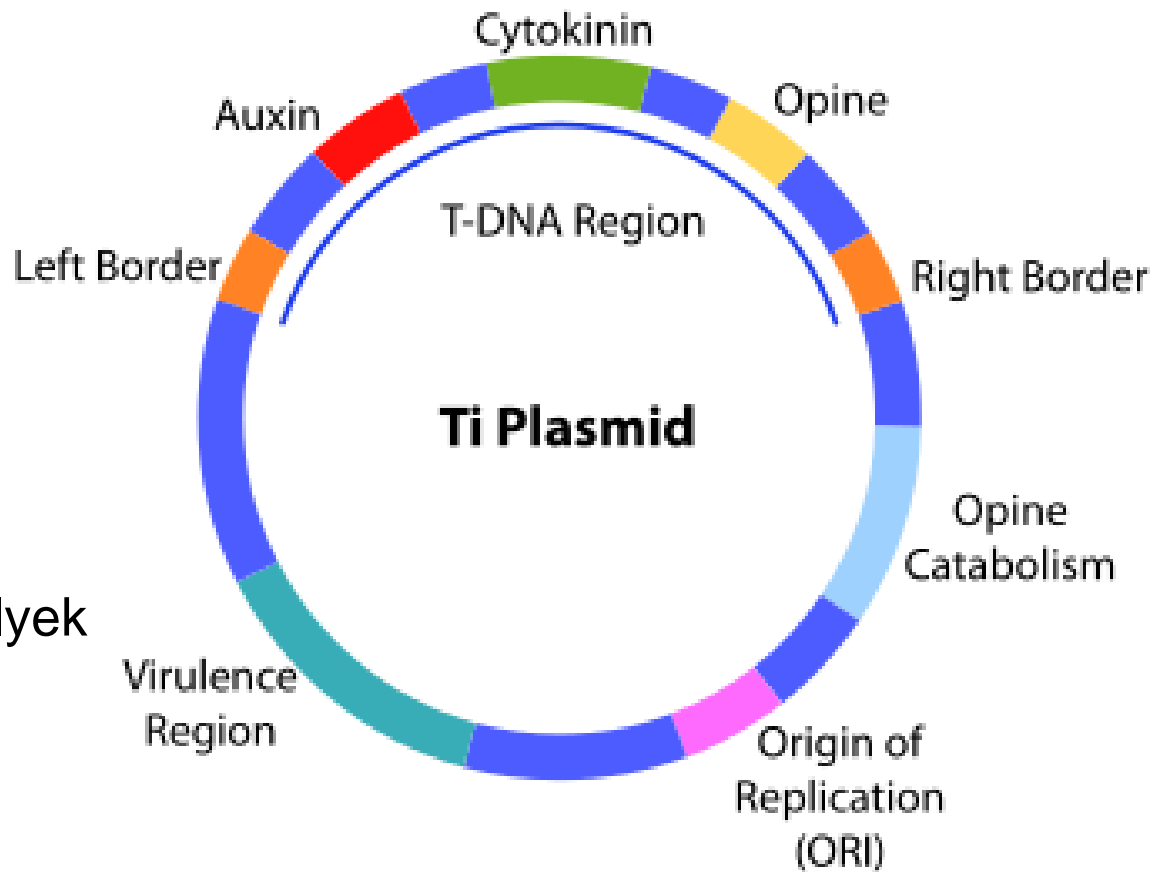
Génátvitel a Ti plazmiddal

- A Ti plazmidok alkalmasak arra, hogy vektorként szolgáljanak „idegen” DNS szakaszoknak a gazdanövények kromoszómáiba történő beviteléhez.
- Ha a T-DNS szakaszba a tumorindukáló gének helyére más géneket építenek be, azok éppúgy integrálódnak a növényi genomba. E rendszer felhasználásával a növények gyakorlatilag bármely génnel transzformálhatók.
- A genomba juttatandó T-DNS szakaszokba általában rezisztencia géneket is elhelyeznek, ami lehetővé teszi a transzformáns növények egyszerű szelektálását.
- Növényeknél értelemszerűen az antibiotikum rezisztencia helyett herbicid rezisztencia géneket alkalmaznak.



A T-DNS felépítése

By MouagipThis W3C-unspecified vector image was created with Adobe Illustrator. - Own work, CC0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18274425>



Határoló régiók: ezek a T-DNS „jobb és bal oldali” végei, amelyek a kromoszómába való integrálódáshoz nélkülözhetetlenek.

- Ezen belül: expressziós kazetta, az elején promóter, a végén terminátor régióval, melyek a gén működését, expresszióját (kifejeződését) teszik lehetővé.
 - Ezen belül:
 - szelekciós marker gén (antibiotikum- vagy herbicid-rezisztencia gén), és a
 - hasznos gén (egy hasznos növényi tulajdonság génje, amit be akarunk vinni a növénybe)

Növényregenerálás

A Ti plazmidokkal be lehet vinni géneket a növényi sejtekbe, de ezek a gének nem jelennek meg az egész növényben, csak a tumorsejtekben, és nem öröklődnek. Ahhoz, hogy minden sejtben megjelenő, öröklődő tulajdonságot kapjunk, ki kell emelni egy tumorsejtet, és abból regenerálni a teljes növényt.

(A protoplaszt-fúziónál már említettük, hogy ez kivitelezhető.)



Növényregenerálás

A növényeknél egy sejtől vissza lehet nevelni az egész növényt, a tumorsejtből kiindulva is regenerálható szaporodóképes növény.

