

Géntechnika jegyzet

2. rész

Dr. Gruiz Katalin

Vektorok

A vektor a *rekombináns DNS technikákban* olyan DNS-t vagy DNS-t tartalmazó rendszert jelent, amely biztosítja a *klónozendó* DNS védelmét, bejutását és osztódását a *gazdasejtben*. A vektorok cél szerint tervezett, mesterségesen kialakított DNS molekulák, melyek gyakran természetes, élő rendszerekkel kombinálva lehetővé teszik

- a klónozendó DNS-sel való összekapcsolódást, melynek eredménye a rekombináns plazmid
- a gazdasejtbe való bejutást,
- a gazdasejtben való osztódást, replikációt, valamint
- a vektor és a rekombináns vektor sejtben való jelenlétének kimutathatóságát.

A vektorok használatának célja szerint megkülönböztethetünk *klonozó- és expressziós vektorokat*. Klónozó vektorokkal szembeni követelmény a fentiek szerint a gazdasejtben való replikáció, expressziós vektornak a gén fehérjévé való átíródását is biztosítani kell.

A vektorok általában olyan genetikai elemek, melyek a gazdasejt kromoszómájától függetlenül is képesek replikálódni.

A klónozó vektorok egy sor olyan genetikai elemet tartalmaznak, melyek elősegítik a *génklónozást*, vagyis a bevitt gén replikációját és a sejtrel együtt történő szaporodását. A klónozó vektorok elengedhetetlen alkotórészei

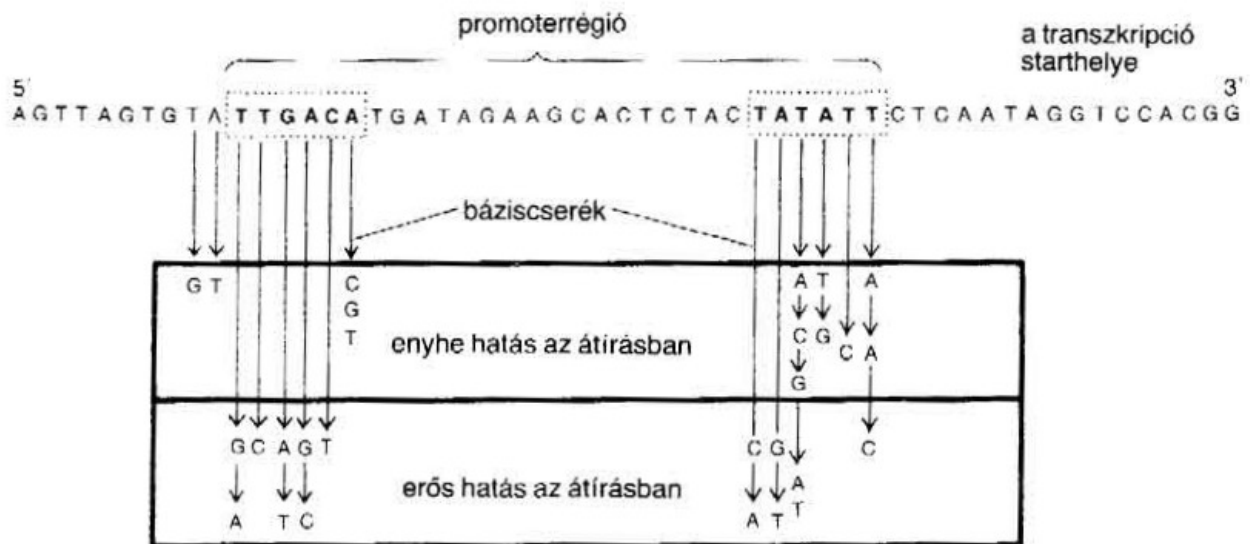
- a vektor átírásához szükséges gazdaspecifikus kezdőszekvencia (origó)
- a restrikciós endonukleázos hasítási helyek, illetve a polilinker,
- a szelekcióra alkalmas marker gének.

Az expressziós vektorok a fenti követelményeken kívül olyan genetikai egységeket is tartalmaznak, melyek biztosítják

- a célgén kifejeződését,
- a génműködés ki- és bekapcsolását biztosító induktor-rendszert,
- a vektor amplifikálhatóságát.
- a termék szekrécióját.

A célgén kifejeződését a gazdasejtbe illeszkedő és működőképes szabályozószakasz biztosítja, a m-RNS szintéziséhez szükséges m-RNS polimeráz kötőhellyel, vagyis promóterrel. A promóter

bázisszekvenciája komplementer térszerkezetet kell adjon a sejtben működő m-RNS polimeráz enzim térszerkezetével. A tökéletesen komplementer szerkezetű promótert „erős promóter”-nek nevezzük. Ez nagy sebességű m-RNS szintézist, ezáltal hatékony fehérjetermelést biztosít.



1. ábra: TATA box, promoterrégió

Ahhoz, hogy az RNS-polimeráz hatékonyan írja át az *E. coli* génjeit, fontosak a specifikus DNS szekvenciák. Az összes *E. coli* promóterben erősen konzerválódott régiók találhatóak a 35-ös és a 10-es nukleotidok körül (az ábrán a bekeretezett szekvenciák). A pontmutációk ezeken a szakaszokon jelentősen megváltoztatják a transzkripció hatékonyságát.

A maximális sebességű termékképzés nagy terhet ró a sejtekre, ilyenkor minden más funkció háttérbe szorul. Erős promóter esetében biztosítani kell a promóter ki- és bekapcsolhatóságát, hogy a sejtek felszaporításának fázisában kikapcsolt termékképzés mellett a sejtek saját anyagainak szintézisére koncentrálhassanak, azonban, amikor a gazda-mikroorganizmus szaporodása elérte az exponenciális szakasz második felét, akkor kellő időben bekapcsolható legyen. A *lac* gén, vagy a triptofán gén szabályozó szakasza alkalmas az induktor illetve a géntermék koncentrációja segítségével történő szabályozásra. (ld. még inzulin klónozás)

A vektor amplifikációja azt jelenti, hogy a vektor egy sejtben több kópiában van jelen. Ha egy gén több példányban van jelen, akkor az általuk kódolt fehérje expressziója is megnövekszik. Egyes plazmidok amplifikálhatóak kloramfenikol adagolással, mely leállítja a sejt kromozómális DNS szintézisét, de megengedi a plazmid replikációját. Egy másik amplifikációs lehetőség annak az

egységnek a kikapcsolása, pl. hőfokemeléssel, amely a plazmid szintézist kontrollálja, vagyis megadja, hogy mennyi plazmid szintetizálódhat a sejtben.

A vektornak a rekombináns DNS technika célját és megoldását kielégítő gazdarendszerhez kell illeszkednie.

A rekombináns DNS technika célja lehet gének klónozása, klóntárak létesítése, fehérjetermék expresszáltatása, vagy olyan immanens célok, mint a DNS szekvenálása, stb.

A vektor-gazda rendszerek közül az alábbiakat tárgyaljuk részletesebben:

baktérium - plazmid, egyszerű, ingázó,

baktérium - fág: lambda, M13, T4, T7, stb.

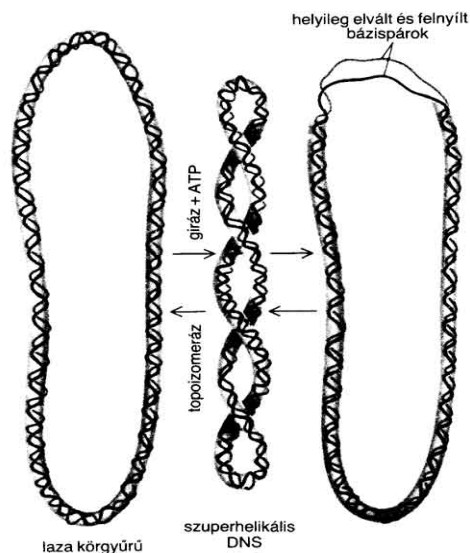
kozmidok: minimum 40 000 bázis, pakolás, talán egy recept is

élesztővektorok: plazmid: 2 mikron vektorok, YAC,

növényi r-DNS vektorok

állati, emlősvektorok

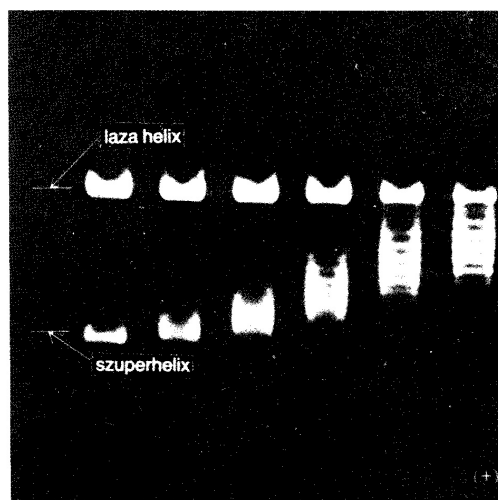
Baktériumok plazmidjai



2. ábra: A plazmid két formájának egyensúlya

A cirkuláris, laza szerkezetű DNS-molekulát negatívan föltekeredett szuperspirállá alakítja a DNS-giráz. A fordított reakciót a topoizomeráz katalizálja (nyitó-záró enzim). A negatív szuperspirálban a kettős hélix helyi felbomlásával egyfonalas részek keletkezhetnek.

A baktérium-plazmidok a természetben is igen elterjedtek. A baktériumok túlélését, alkalmazkodását biztosító mobilis genetikai egységek ezek, melyek egyik sejtől a másikba képesek átjutni, a kromoszómális DNS-től függetlenül osztódni és a rajta lévő géneken hordozott információt megnyilvánítani. Kettős szálú, gyűrű alakú DNS molekulák, melyek a nyitott gyűrűvel egyensúlyt tartó szuperhelikális formát is felvehetnek.



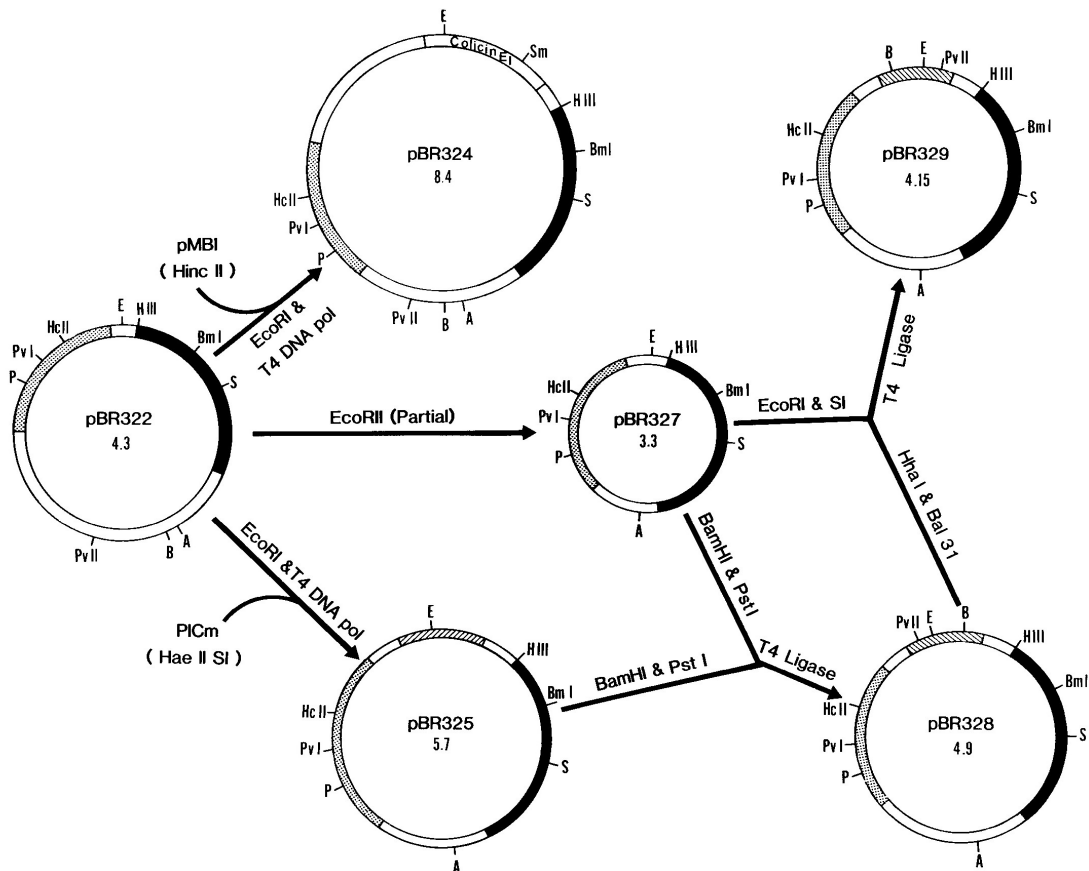
3. ábra: Gélelektroforetikus kép

A különböző mennyiségű szuperspirált tartalmazó DNS-molekulákat agarózgél-elektroforézissel választják el egymástól. A legföltekeredettebb DNS mutatja a legnagyobb mobilitást a gélben, a kevesebb szuperspirált tartalmazó molekulák lassabban vándorolnak (James C. Wang).

A baktériumok természetes plazmidjainak nagysága 3-20 kB, az *E. coli* kromoszómájának 3 millió bázisához (kiterítve 1 mm lenne) képest annak MINDÖSSZE ezredrésze.

A géntechnikákban használt plazmid-vektorokat is a természetes plazmidokból kiindulva állították elő, módosították, hogy azok eleget tegyenek a klónozás követelményeinek, azaz, hogy kis méretűek legyenek, mechanikus behatások ellen védett térszerkezetűek, önreplikációra képesek (origó jelenléte), egyáltalán „szabhatóak és varrhatóak” legyenek, azaz tetszőleges módon és helyen felnyithatóak legyenek, idegen DNS-ek beleépíthetőek legyenek. A plazmid jelenlétét, követhetőségét biztosító marker gének legyenek rajta, valamint a plazmid tartalmú sejtek és a rekombináns plazmidot tartalmazó sejtek megkülönböztethetőségét és szelekcióját ugyancsak marker gének biztosítják.

A plazmidokba nem építhető be akármilyen nagy DNS darab. Ha a DNS túl nagy a rekombináns plazmid instabil lesz, a beépített darab eltörhet vagy kihasadhat.



4. ábra: A pBR322 továbbfejlesztése, végeredmény a pBR329

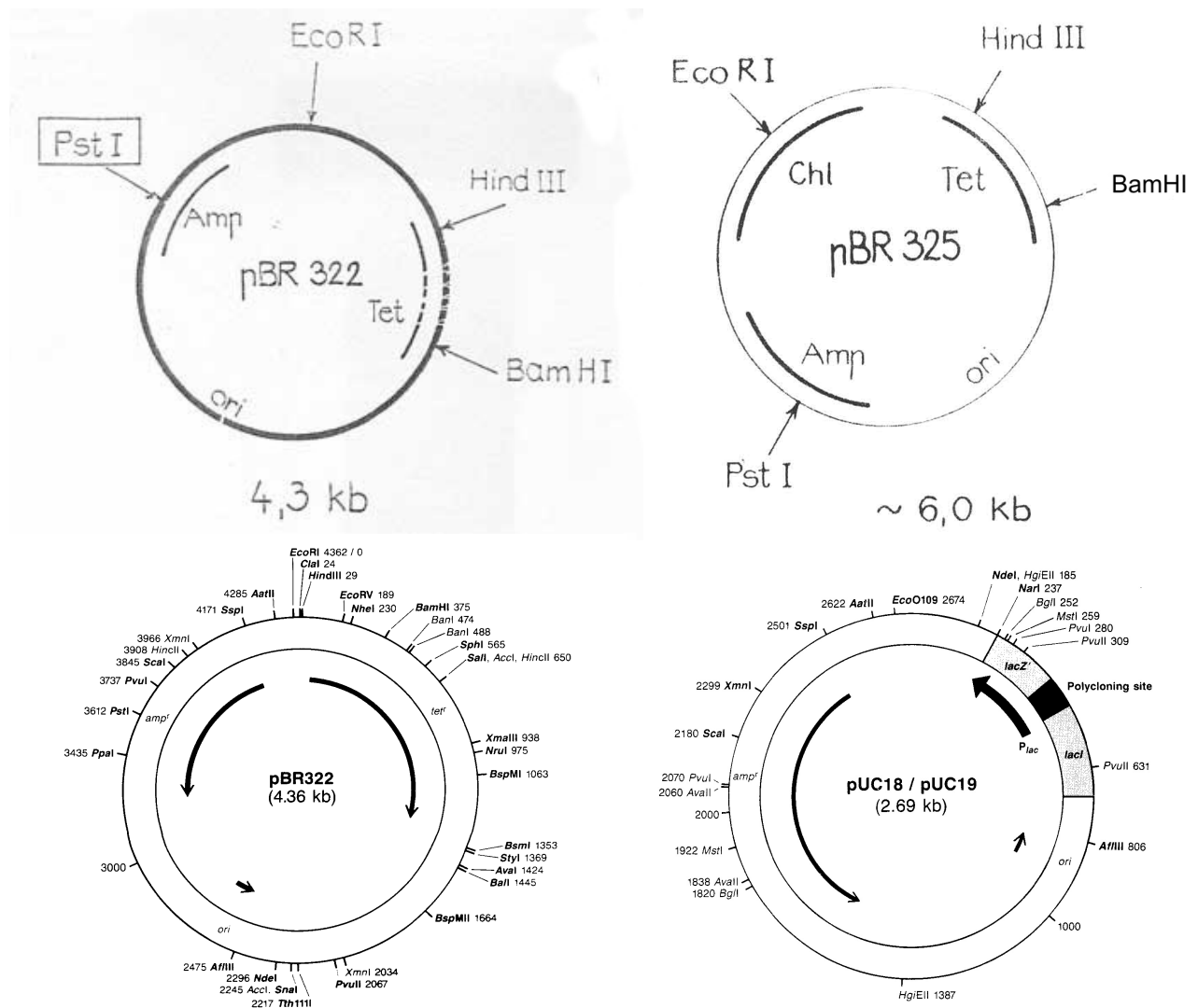
Sötét sáv: Tc^r gén, pontozott sáv: Ap^r gén, vonalkázott sáv: Cm^r gén.

(Life Sciences vol. 25, F. Bolivar, „Molecular Cloning Vectors”, 1979, Pergamon Press, Ltd.)

A plazmidok térképe

A plazmid-térkép részletessége a klónozáshoz szükséges részletek vázlatos jelölésétől a konkrét bázissorrendeket is feltüntető részletességig terjedhet.

Az egyszerűsített térkép jelöli az origót, a marker géneket, és a marker génekbe hasító restrikciós endonukleázok felismerési helyeit. A plazmid nevét, mely mindig kis „p” betű után további, általában nagy betűket és számokat tartalmaz, a plazmid közepébe szokták beírni. A név képzése tetszőleges, a kis „p” a *plazmid* rövidítése (megkülönböztetésül például a kozmidtól), azután a plazmidot fejlesztő kutató intézet, vagy kutató személy kezdőbetűit jelentheti, a szám pedig legtöbbször a módosításokat is jelölő felmenő számozás.



5. ábra: Különböző részletességű plazmid térképek – pBR322, pBR325, pUC18/pUC19

A plazmidok térképén mindig szerepelnie kell a replikációs origónak, a marker géneknek, a restriktós endonukleázos hasítási helyeknek, a plazmid nevének és méretének.

A jó plazmid-vektor

A klónozás céljára alkalmas, jól használható plazmid-vektor az alábbi jellemzőkkel bír:

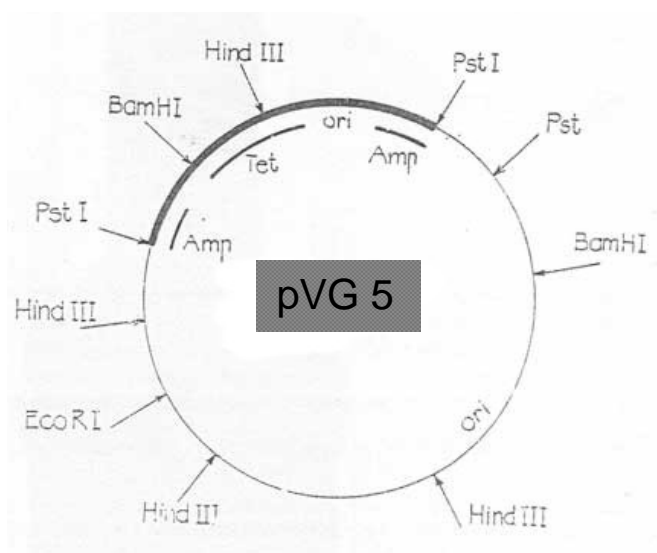
- kicsi,
- önreplikációra képes,
- marker gének vannak rajta, melyek a plazmid jelenlétét és a klónozott sejtek szelekcióját biztosítják
- minél több restriktós endonukleázos hasítási hely van rajta, de mindegyikből csak egy (csak felnyitás, nem feldarabolás a cél)
- amplifikálható (egy példány helyett sok példány sejtenként).

Plazmid-vektorok mérete:

A baktériumok plazmid-vektorjainak ideális mérete 4-6 kB (kilobázis). Az ilyen méretű gyűrű alakú DNS molekulákkal könnyen lehet dolgozni, nem sérülékenyek, könnyen kivonhatóak a sejtből és tisztíthatóak. A különböző *in vitro* manipulációk során sem sérülnek, tömek el.

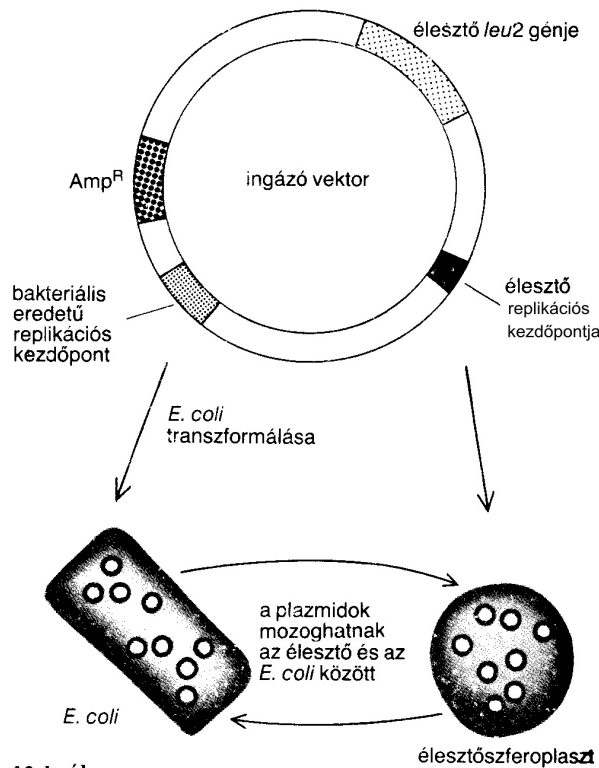
Önreplikáció

A replikációs origó jelenlétének köszönhetően baktérium-plazmidok a kromozómától függetlenül, saját hatáskörben képesek a gazdasejt enzimrendszerének irányításával megkettőzni magukat. A plazmid replikációját baktériumok esetében ugyanaz az enzimrendszer végzi, mint a kromozómját. Az origó egy olyan szekvencia, ahova a plazmid átírásához szükséges DNS polimeráz enzim kapcsolódik. Ezek a DNS polimerázok specifikusak, egy adott plazmid csak abban a gazdasejtben, vagy közeli rokonaiban képes replikálódni, amelyben felismerhető origót tartalmaz. Egyes plazmidok példányszáma a sejtben egy, vagy egynéhány, más plazmidok (un. relaxált) 10-200 példányban is jelen lehetnek egyetlen sejtben. Ez a szám amplifikációval akár több ezerre is növelhető. A plazmid átírása az origóból kiindulva a gyűrű alakú szálon mindkét irányban folyik. Azok a vektorok, amelyek több specifikus origót tartalmaznak, kettő vagy több különböző baktériumban, vagy baktériumban és élesztőgombában is képesek replikálódni. Ezeket ingázó (shuttle) vektoroknak nevezzük.



6. ábra: A pVG 5, félkész ingázó vektor

E. coli és *Streptomyces* között ingázó plazmid egy *E. coli* és egy *Streptomyces* plazmidból lett összeépítve és két replikációs origóval működik: egy *E. coli* és egy *Streptomyces* origóval.



7. ábra: Baktérium – élesztő ingázó vektor.

Az ingázó vektorokban olyan DNS-szekvenciák találhatóak, amelyek lehetővé teszik *E. coliban* a replikációt, és olyan szekvenciák is, amelyek ugyanezt élesztőben biztosítják. Ezért az ilyen plazmidok ide-oda ugrálhatnak a két szervezet között. Például kóliban történő lónozást követően élesztőbe végezhetjük az expressziót.

Amplifikáció

Kloramfenikollal amplifikálhatóak az *Escherichia coli* azon plazmidjai, melyek ColE1 replikont tartalmaznak. Az amplifikáció lényege, hogy az antibiotikum leállítja a sejtek szaporodását, vagyis a kromoszómális DNS átíródását, és a fehérjeszintézist, de a plazmid folyamatos átíródását nem gátolja. A kópiaszám ilyenkor 1000-re is nőhet.

Az amplifikáció egy másik példája a hő hatásra bekövetkező „runaway” mechanizmus, melynek lényege, hogy a plazmidok gát nélküli replikációját egy hőérzékeny szabályozórendszer gátolja. Hőkezelés hatására ez a gátló rendszer inaktíválódik, így a plazmidok gát nélkül elkezdnek felszaporodni, megtelítik a sejtet. Ez a folyamat gyakran a sejtek pusztulásához vezet, de a termék megnövekedett mennyiségét is el lehet érni a sejt anyagcseréjének ismeretében.

Plazmidok felszaporítása, kinyerése

A plazmidokkal történő *in vitro* manipulációhoz, nem elég a sejtben felszaporítani, de onnan ki is kell nyerni a plazmidokat. Baktériumok plazmidjainak kinyerésére igen egyszerűen kivitelezhető eljárások alakultak ki. A plazmidot meg kell tisztítani a sejttörmeléktől, a kromoszómális DNS-től, az RNS-ektől és a fehérjéktől.

Plazmid amplifikáció, kinyerés és tisztítás receptje a laborgyakorlatok mappában található meg.

<ftp://intranet.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/amplifikacio>

<ftp://intranet.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/izolalas>

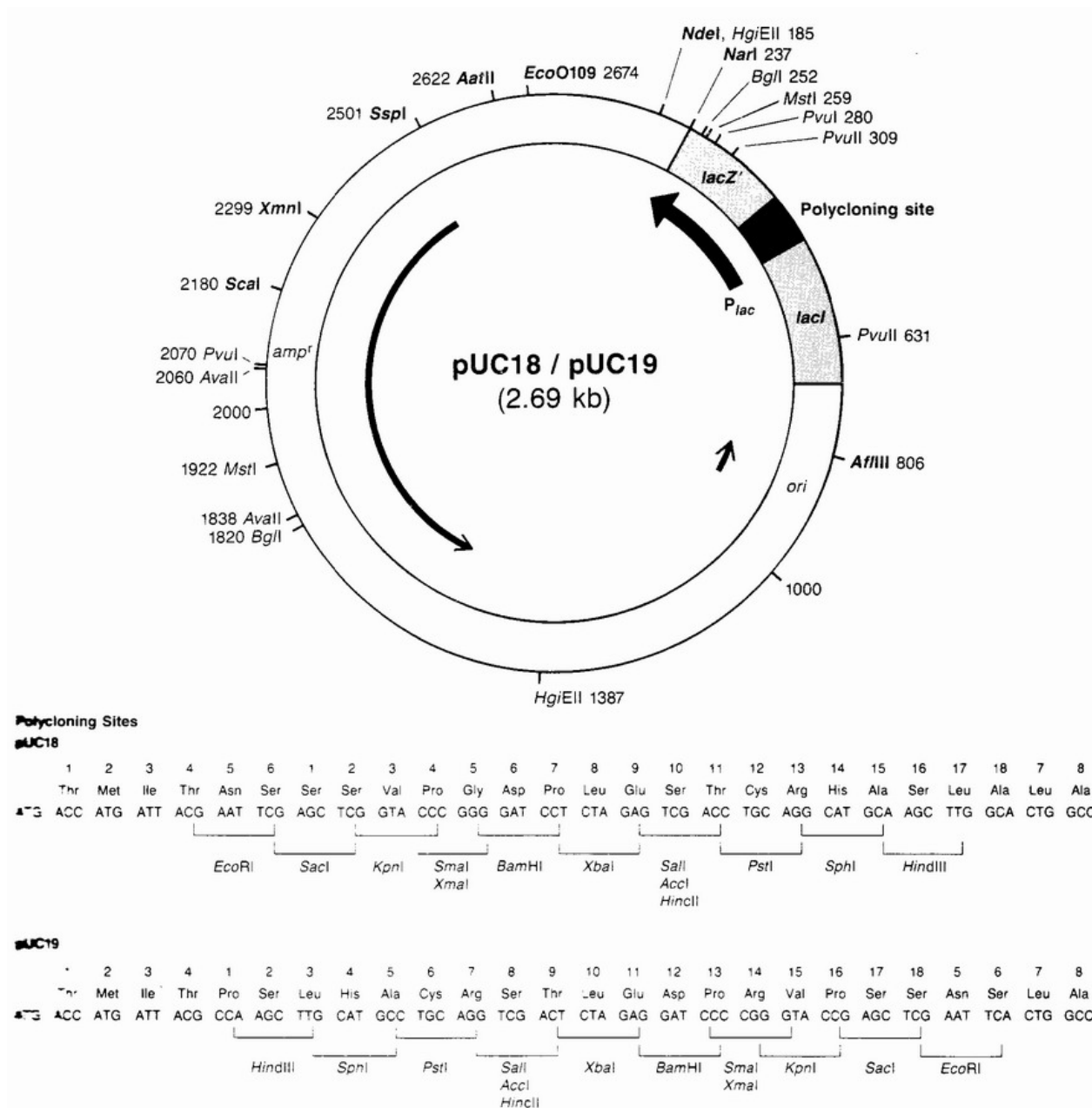
A klónozáshoz használt restriktációs endonukleáz enzimek felismerési helye 6 bázis hosszúságúak és általában tapadós végeket eredményeznek (**ld. restriktációs endonukleázok = REN**)

A plazmidon mindegyik enzim felismerési helyéből csak egy lehet, hogy a plazmid szétnyílása, linearizálása biztosítva legyen az enzimes kezeléssel, de ne darabolódjon szét.

Ha egy vektor kifejlesztéséhez alapul vett természetes plazmidban több azonos hasítási hely van, egy kivételével meg kell őket szüntetni. Például, ha kettő van, akkor ezt úgy lehet elérni, hogy azzal a restriktációs endonukleázzal, amelynek a hasítási helyét meg akarjuk szüntetni, részleges emésztést végzünk, hogy statisztikusan csak egy hely nyíljon fel. A tapadós végeket lehasítjuk S1 nukleázzal, majd tompavégű (blunt end) ligálással ismét bezárjuk a plazmidot. Ekkor a felismerési hely megszûnik, hiszen négy bázist kivágtunk. Több felismerési hely megszüntetése több lépésben történik.

A hasítási hely szekvenciáját a klónozendó gén igényeihez kell illeszteni (ld. még vektor-célgén összekapcsolása). Mivel a klónozendó darabon is elő kell állítani a tapadós végeket, nem mindegy, hogy ez milyen enzim felhasználásával történik, hiszen nem sérülhet a nehéz munkával előállított gén. Például egy kémiai szintézissel előállított DNS esetében csak olyan restriktációs enzimet alkalmazhatunk, amely nem hasítja el a célgént. Ezért a jó plazmid-vektornak minél többfajta REN felismerési hellyel kell rendelkeznie, hogy az alkalmazó tetszés szerint választhasson restriktációs endonukleázt.

A sokféle REN felismerési helyet egybeépítve egy ún. poliklónozó helyet vagy polilinkert alakítanak ki a plazmidon, ott, ahova a cél-DNS-t be szeretnék építeni.



8. ábra: pUC a poliklónozó helyyel és a poliklónozó hely szekvenciája

Legalább két marker gén jelenléte szükséges a plazmid-vektoron.

A szelekciót lehetővé tevő marker gének közül legelterjedtebbek az antibiotikum rezisztencia gének, melyek jelenlétükkel bizonyítják a plazmid sejtben jutását. Szelekciójuk antibiotikumot tartalmazó táptalajon való szaporítással lehetséges, hiszen ezen a táptalajon plazmidot nem tartalmazó társaik nem fognak nőni.

Az antibiotikum rezisztencia gének a rekombináns plazmid, azaz a beépült célgén jelenlétét is képesek mutatni akkor, ha a célgén egy marker génbe lett beépítve, ezzel inaktíválta a marker gént. Ez a marker a génaktivitás megszűnésével valószínűsíti a cél-DNS jelenlétét a sejtben. (**ld. még inszerciós inaktíválás**). Ez negatív szelekciót jelent, vagyis valaminek a megszűnését kell kimutatni, ami egy többletlépést jelent a szelekció során. Ilyenkor két antibiotikum rezisztencia marker gén jelenléte szükséges, az egyik aktivitásával plazmid jelenlétét jelzi, a másik aktivitásának megszűnésével a cél-DNS-ét.

A DNS hasítását restriktív endonukleázzal és a ligálását ligáz enzimmel végezzük, a technikák receptje a laborgyakorlatok mappában található.

<ftp://intranet.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/hasitas>

<ftp://intranet.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/lig>

Expressziós vektorok

A klónozás tulajdonképpen a klónozó vektorba épített DNS megkettőződését, a sejt szaporodásával történő fennmaradását jelenti, ezt tűzte ki célul. Úgy is mondhatnánk, hogy nincs kontextusban a sejt saját genetikai funkcióival.

Az expresszió, vagyis a klónozott gén „megszólalása”, fehérjévé íródása, aktív génfunkciót feltételez, vagyis valódi kontextust a sejt és az idegen molekula között, ti. azt, hogy az idegen DNS-t a sejt úgy tekintse a sajátjának, hogy a rajta hordozott információnak megfelelően szintetizáljon egy fehérjét.

Az expressziós vektorokkal szembeni követelmények az alábbiak:

- Jó hatásfokkal történő m-RNS szintézis
- A szintézis ki- és bekapcsolhatósága
- A fehérjeszintézis megsokszorozása
- A termék szekréciója

Mi biztosítja a jó hatásfokú fehérjeszintézist?

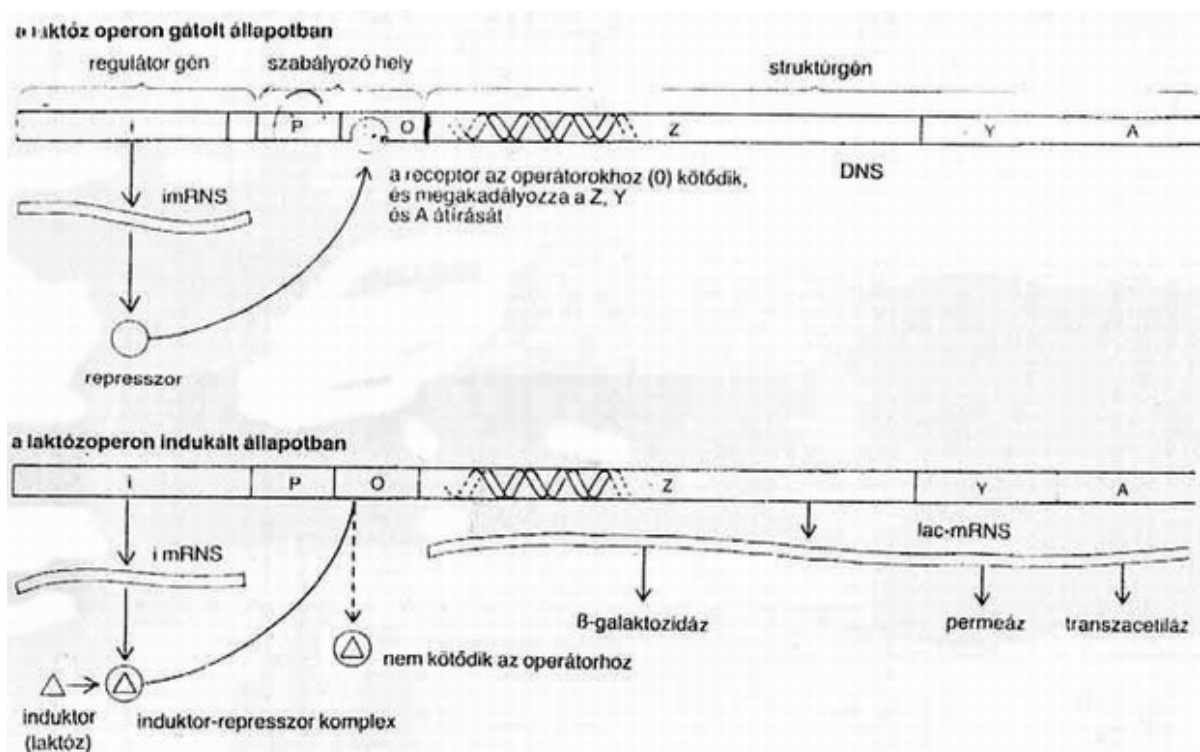
Gazdaspecifikus promóter: olyan promóterrégió, amelyhez a gazda m-RNS polimeráz enzime kötődik

Erős promóter: olyan promóter, amely nagyfokú (tökéletes) komplementaritást mutat a gazdasejt m-RNS polimeráz enzimjével, azaz a polimeráz nagy gyakorisággal, jó hatásfokkal képes kapcsolódni a kötőhelyhez, a promóterrégióhoz.

Hogyan oldjuk meg, hogy ne dolgozza magát halálra sejt, még mielőtt felszaporodna?

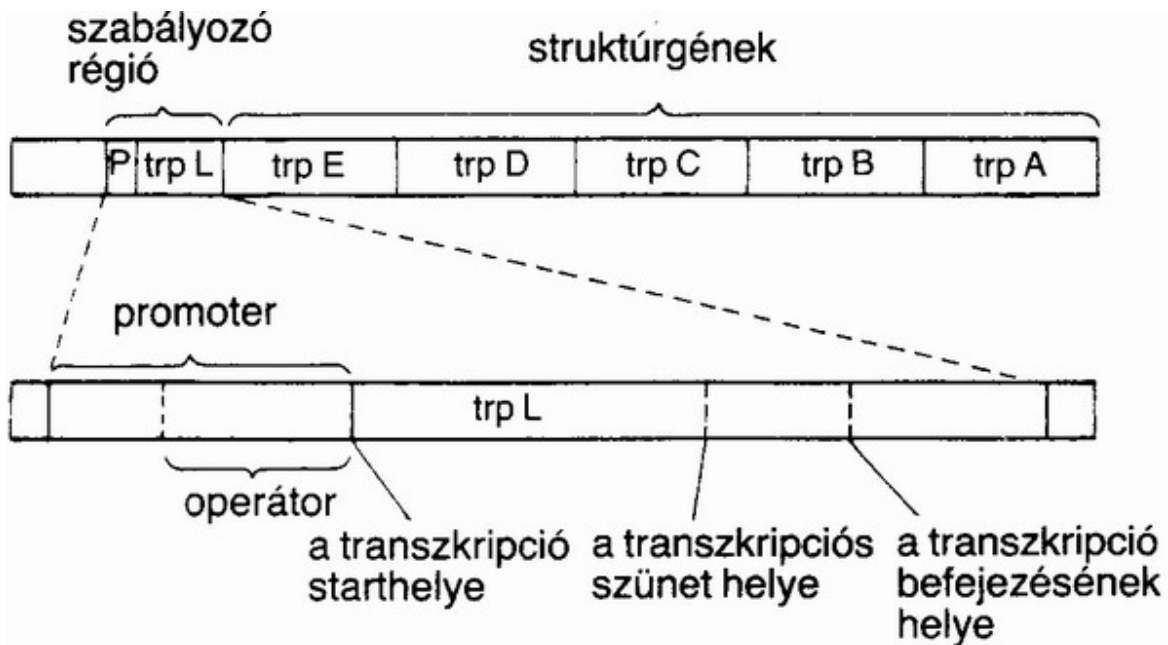
Ki- és bekapcsolható promóterre van szükség, olyanra, amelyet a sejtek felszaporodásának időszakában kikapcsolva tartunk, majd a megfelelő sejtkoncentráció elérése után bekapcsolunk, elindítjuk a termékképzési folyamatot.

Ki- és bekapcsolható szabályozószakaszokat a laktáz vagy a triptofán szintéziséért felelős gének szabályozó szakaszaiból nyerhetünk. A laktáz operon (lac Z, Y és A közös szabályozás alatt) szabályozószakasza laktóz tápközegbe adagolásával kapcsolható be. Amíg a sejtek szaporodnak, addig laktózmentes táptalajon tartjuk őket, laktóz bontásra, így a laktáz gén átírására nincs szükség, a génátírás represszálva van: a represszor az operátorhoz kötődik, a m-RNS-polimeráz nem éri el a struktúrgén kezdetét. Az inzulin és növekedési hormon klónozásának első megoldásai a laktáz-gén szabályozó szakaszát alkalmazták a mesterségesen előállított inzulin- és növekedési hormon struktúrgén elé.



9. ábra: A laktóz (Lac) operon géneinek működését (génátírást = transzkripciót) szabályozó represszorok és induktorok

Az állandó sebességgel szintetizálódó represszor (kör) a gén szabályozószakaszának „operátor” alegységéhez kötődik, ezáltal megakadályozza a m-RNS-polimeráz enzim „megindulását” a struktúrgénene, vagyis a génátírást. A laktóz, mint (induktor (háromszög) megjelenése versengést okoz az operátor és a laktóz között a represszor-molekuláért. Ha sok a laktóz, a represszormolekulák teljes egészében a laktózhoz kötődnek, azaz, lekapcsolódnak az operátorról. Ezzel szabaddá válik az út a m-RNS polimeráz megindulásához, amely elkezd szintetizálni a szabályozószakasz után álló struktúrgén(ek)ről a m-RNS-t.



10. ábra: Az *E. coli* triptofán (*trp*) operonja. Az operon elején lévő szabályozó elemek kinagyítva

A triptofán gén szabályozása során triptofán aktiválja a represszormolekulát. Ez az aktivált represszormolekula szabályozza a triptofán-szintézisért felelős gének átíródásának kezdeti sebességét. Ha már elegendő triptofán szintetizálódott a géntermékként előállított enzimek működése eredményeképpen, akkor a génátírás fokozatosan lelassul, majd leáll.

Hogyan növelhető még a termék-fehérje mennyisége?

Annak érdekében, hogy sejtjeinket ne dolgoztassuk halálra a gazdaságossági szempontok miatt fontos nagysebességű expresszióval még két eljárás alkalmazható, az amplifikáció, és a runaway replikáló plazmidok.

Az amplifikáció nagy kópiaszámban szintetizáló vektorokat feltételez. Természetes körülmények között a plazmidok és a fágok csak kis példányszámban vannak jelen a sejtben, de a nagykópiaszámúak több száz példányban. Gyakori, hogy a hőmérséklettel manipulálnak: a gazdasejt szaporodási optimumán nincs DNS átírás és fehérjeszintézis, viszont egy másik hőmérsékleten csökken a gazdasejt szaporodása, „megtelik” DNS-sel és célfehérjével.

A „runaway” mechanizmussal replikáló plazmidok esetében a plazmidok mennyiségét korlátozó kontrollrendszert teszik tönkre a hőmérséklet emelésével, így a plazmidok mindaddig szintetizálódnak, míg a sejt ki nem fogy a prekursorokból. Ennek eredményeképpen a sejt tele lesz plazmiddal, és ha adottak a fehérjeszintézis feltételei, akkor célfehérjével.

Nagymértékben növeli a fehérjeszintézis mértékét a szekrécións vektorok. Nemcsak a downstream folyamatok hatékonysága miatt, de amiatt is, hogy nem gyűlik fel a sejtben a termék, így az nem gátolja a további szintézist.

Hogyan növelhető a termék-fehérje kinyerése, a down-stream folyamatban?

Általában sokkal több a sejt saját fehérjéje, ebből kell a terméket „kihalászni”. A szekrécións vektorok segíthetnek ezen a problémán. Leggyakrabban transzportfehérjékhez (szignálfehérje) kapcsolt fúziós fehérjéket állítanak elő e célból, tehát a célgén termékét egy, a sejtmembránon keresztül történő aktív transzportot biztosító fehérjéhez kötve szintetizálják meg. A transzportfehérje lehet a gazda valamelyik saját fehérjéjét szállító transzportrendszer része, pl. baktériumoknál a lac Z, a penicillináz (bete-laktamáz) vagy bármelyik bakteriális exoenzim felhasználható szignálfehérjeként (ld. inzulin klónozása az ampicillin génbe).

Mik az elérhető termékkoncentráció korlátai?

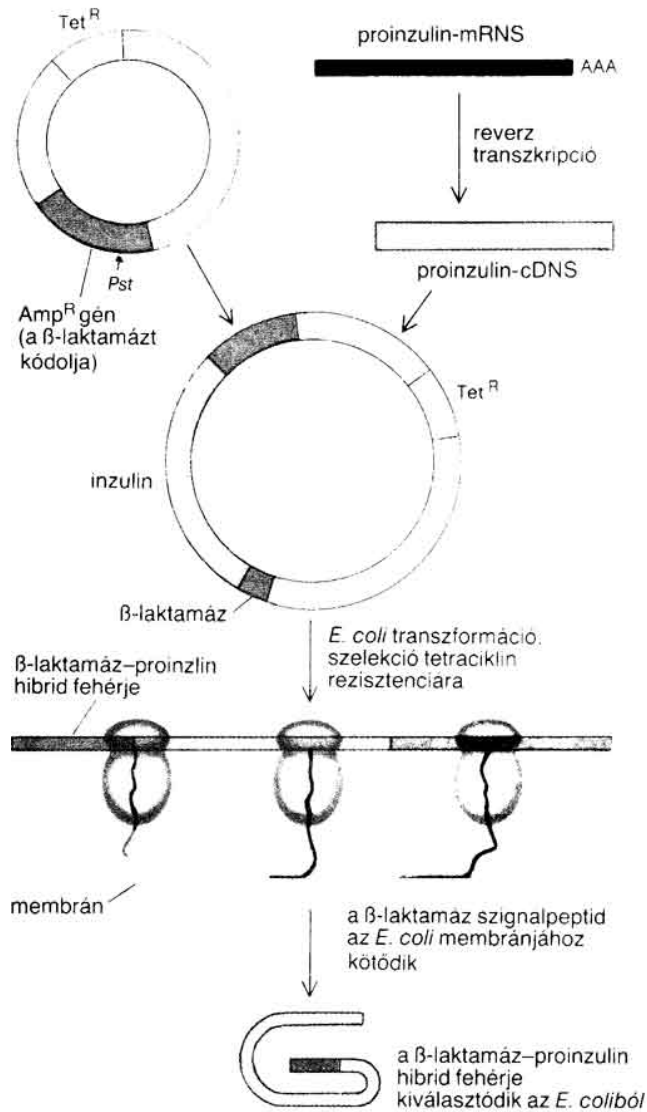
Gazdaságossági kritériumok miatt általában ökölszabály, hogy a termékképzés során a termékfehérje legalább 10 %-át érje el az összes fehérjének. Ez hatalmas koncentrációt jelent, amit a sejtanyagcsere és az egyensúlyi állapotok általában nem tûnnek tétlenül. Általános probléma az expressziós rendszerekben, – főként, ha nincs megoldva a szekréción – hogy a nagy koncentrációban előállított termékfehérje oldhatatlan zárványt (inclusion body) képez. A fehérje szerkezete ebben az oldhatatlan zárványban eltér az aktív formától, általában keresztkötésektől hálózatos szerkezetű, denaturált, emiatt inaktív.

A kezdetekben inclusion body keletkezése sikertelen rekombináns DNS terméknek minősítették, de az újabb kutatások egy sor megoldást javasolnak. Szerencsés esetben detergensben vagy ún. „kaotróp” reagensben oldva kicsomagolhatóak, majd a segédanyag lépcsőzetes elvonásával megkaphatjuk a natív formát.

Egy másik fenyegető veszély, hogy a termékfehérjét proteázok bontják el, főleg, ha nem biztosunk számukra megfelelő védelmet, stabilitást. Az inclusion body védelmet biztosítja ugyan, mégis inkább a natív forma előállítására törekszünk. Ennek proteázok által történő elbontására sor kerülhet még a citoplazmában, ha a sejt nem saját vagy rosszul sikerült fehérjének minősíti. Ugyanez megtörténhet a periplazmális térben, vagyis a sejthártya és a sejtfal közötti térben, ahova a transzportfehérjék szállítják a terméket. Tulajdonképpen a tápoldatban is megtörténhet a termék enzim bontása, hiszen ott is vannak proteázok. Emiatt a termék védelméről külön gondoskodnunk kell.

Inclusion body

Az egyik leújabb, egy sor régi problémát kiküszöbölő (de újakat produkáló) módszer a transzgénikus állatok használata expressziós rendszerként.



11. ábra: Szekréciót biztosító szignálfehérje klónozáskor

A prokarióta szignálszekvencia lehetővé teszi a fehérje szekrécióját. A proinzulin-c-DNS-t a β -laktamáz génjébe klónozták, és a β -laktamáz proinzulin fúziós fehérje kiválasztódik az *E. coli* sejtéből azért, mert a fehérje N-terminális végén jelen van a szignálpeptid.

Megfelelő, hatékony és gazdaságos expressziós rendszer kifejlesztéséhez alaposan ismerni kell a gazdasejtet, annak fiziológiai, biokémiai jellegzetességeit.

Kereskedelemben kapható plazmidok száma egyre nő, amelyek a legkülönbözőbb igényeknek tesznek eleget.

pBR322 DNA			
#SD0041	0.1mg	<p>Description</p> <p>pBR322 DNA is isolated from <i>E.coli</i> (<i>dam</i>⁻, <i>dcm</i>⁻) and purified by ion exchange chromatography. The molecule is a double-stranded circle, 4361 base pairs in length.</p> <p>For detailed information see p.302.</p>	<p>Quality Control</p> <p>More than 90% is in the supercoiled form.</p> <p>Concentration</p> <p>0.5mg DNA/ml.</p> <p>Storage Buffer</p> <p>10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA.</p>
pTZ19R DNA			
#SD0141	0.05mg	<p>Description</p> <p>pTZ19R DNA is isolated from <i>E.coli</i> (<i>dam</i>⁻, <i>dcm</i>⁻) and purified by ion exchange chromatography. The molecule is a double-stranded circle, 2862 base pairs in length.</p> <p>For detailed information see p.308.</p>	<p>Quality Control</p> <p>More than 90% is in the supercoiled form.</p> <p>Concentration</p> <p>0.5mg DNA/ml.</p> <p>Storage Buffer</p> <p>10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA.</p>
<i>Related Products</i>			
• M13/pUC Sequencing Primers see Section 7			
pUC18 DNA			
#SD0051	0.05mg	<p>Description</p> <p>pUC18 DNA is isolated from <i>E.coli</i> (<i>dam</i>⁻, <i>dcm</i>⁻) and purified by ion exchange chromatography. The molecule is a double-stranded circle, 2686 base pairs in length.</p> <p>For detailed information see p.304.</p>	<p>Quality Control</p> <p>More than 90% is in the supercoiled form.</p> <p>Concentration</p> <p>0.5mg DNA/ml.</p> <p>Storage Buffer</p> <p>10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA.</p>
<i>Related Products</i>			
• M13/pUC Sequencing Primers see Section 7			
pUC19 DNA			
SD0061	0.05mg	<p>Description</p> <p>pUC19 DNA is isolated from <i>E.coli</i> (<i>dam</i>⁻, <i>dcm</i>⁻) and purified by ion exchange chromatography. The molecule is a double-stranded circle, 2686 base pairs in length.</p> <p>For detailed information see p.304.</p>	<p>Quality Control</p> <p>More than 90% is in the supercoiled form.</p> <p>Concentration</p> <p>0.5mg DNA/ml.</p> <p>Storage Buffer</p> <p>10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA.</p>
<i>Related Products</i>			
• M13/pUC Sequencing Primers see Section 7			
pUC57 DNA			
SD0171	0.05mg	<p>Description</p> <p>pUC57 DNA is isolated from <i>E.coli</i> (<i>dam</i>⁻, <i>dcm</i>⁻) and purified by ion exchange chromatography. The molecule is a double-stranded circle, 2710 base pairs in length.</p> <p>For detailed information see p.304.</p>	<p>Quality Control</p> <p>More than 90% is in the supercoiled form.</p> <p>Concentration</p> <p>0.5mg DNA/ml.</p> <p>Storage Buffer</p> <p>10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA.</p>
<i>Related Products</i>			
• M13/pUC Sequencing Primers see Section 7			

12. ábra: Plazmidkínálat katalógusban

Bakteriofágok, mint vektorok

A bakteriofágok vektorként alkalmazása a transzdukció, vagyis a bakteriofágok közvetítette génátvitel *in vitro* felhasználásán alapul. A géntechnikus a fág számára nem létfontosságú DNS szakaszokat cél-DNS-re cseréli ki. A lambda fág esetében például a genom közel 30 %-a felesleges, azaz kicserélhető idegen DNS-re.

A klónozendó DNS összekapcsolása a fág DNS-sel hasonló módon folyik, mint a plazmidok esetében. A célgénnel összeillesztett fág DNS-t *in vitro* csomagolás után lehet bejuttatni a baktériumsejtbe, egyszerű fágfertőzés útján.

Az egyik első fág, amelyet vektorként alkalmaztak a *Escherichia coli* lambda-fágja. Ez egy úgynevezett mérsékelt fág, ami azt jelenti, hogy a két alternatív életmenet közül (**ld. fágok**) a lizogénia dominál, vagyis az, hogy a baktérium kromoszómájába beépülve a baktérium DNS-től megkülönböztethetetlenül profág formájában van jelen mindaddig, amíg egy mutáció nem indukálja, amikor kihat a baktérium kromoszómájából és áttér a lítikus szaporodási ciklusra.

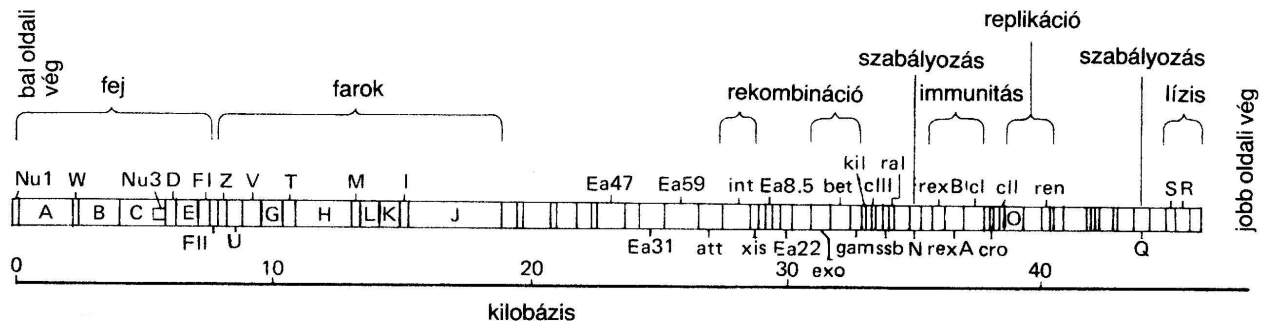
A lambda-fág 48 513 bázispárból áll és 61 génje van. Sanger teljesen megszekvenálta.

A lambda-fágba beépíthető legnagyobb DNS 15 kB. Ahhoz, hogy a csomagoló enzim-rendszer becsomagolja a lambda DNS-t a fágfejbe, ahhoz a DNS mérete legalább 45-50 kB kell legyen (a genom 75 %-a), de legfeljebb a teljes genom 106 %-a lehet. Egy teljes emlősgenomot tartalmazó klóntár, melyben nagy valószínűséggel minden gén megtalálható, csak több millió fágplakkban (fágklónban) tartható fenn.

A T7 fág DNS-e kb. 40 000 bázispárból áll, 50 gént tartalmaz. A genom 92 %-a ki is fejeződik. Mind klónozásra, mind **kozmid** készítésére felhasználták.

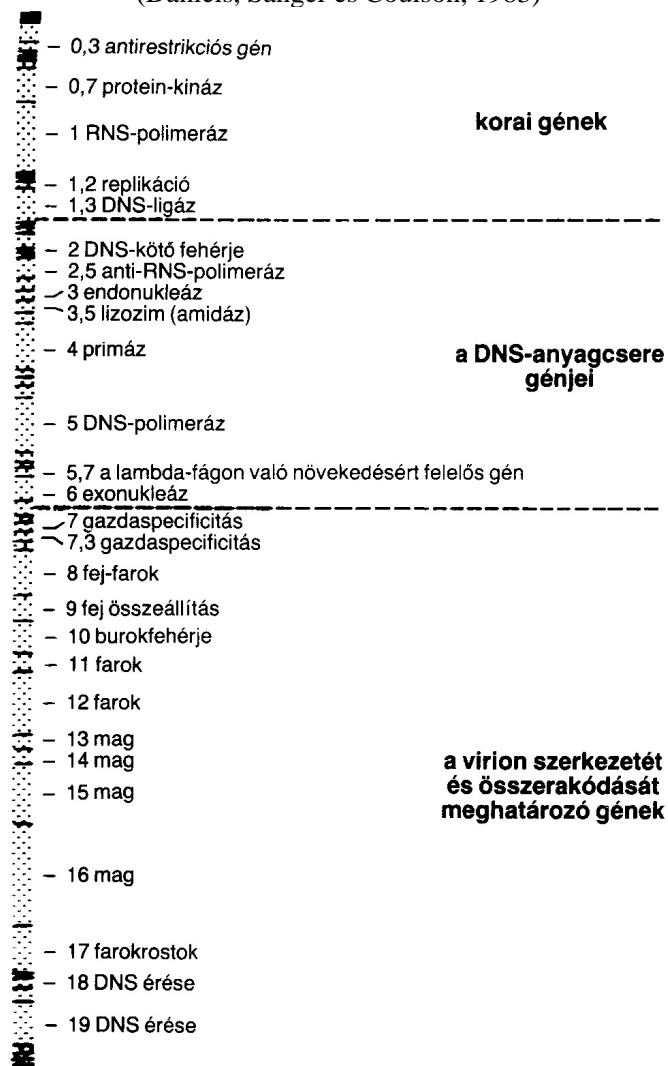
A T4 fág szintén az *E. coli* fágja, főleg onnan ismert, hogy a klónozáshoz szükséges ligáz enzimet T4 faggal fertőzött *E. coliból* nyerik ki.

Az M13 fág is jól használható klónozó vektor. Egyfonalas fág, amely a replikáció során kétfonalas formává alakul. Az egyfonalas utódsejtbe az eredeti egyfonalas alakban jelenlévő + szál kerül. A kétfonalas replikatív formát használják klónozó vektorként. A fág igen kicsi, 7 200 bázispárból áll, restriktív endonukleázos hasítási helyeket tartalmaz, ahova könnyen be lehet építeni idegen DNS-t. Legfontosabb felhasználása az M 13 fág, hogy egyfonalas templátot szolgáltat a **Sanger-féle** DNS-szekvenáláshoz.



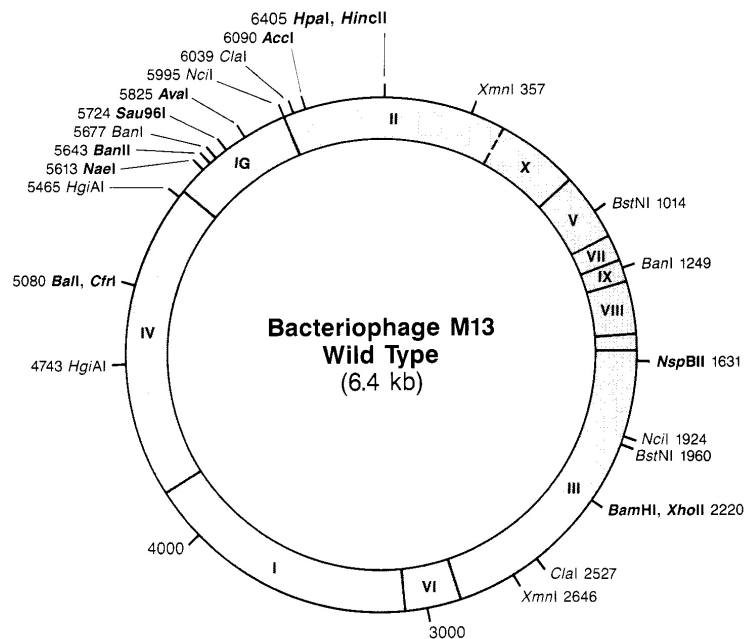
13. ábra: A λ fág genetikai, fizikai és funkcionális térképe

A térkép koordinált rendszerét a középső vonal mutatja. A géneket és funkciójukat a vonal fölött jelöltük. (Daniels, Sanger és Coulson, 1983)



14. ábra: A T7 bakteriofág DNS-ének genetikai és fizikai térképe.

A végeken elhelyezkedő repetitív szakaszok helyzetét (a három fekete terület) és a T7 géneket a nukleotidszekvenciák helyzetének megfelelően jelöltük (Dunn és Studier, 1983).

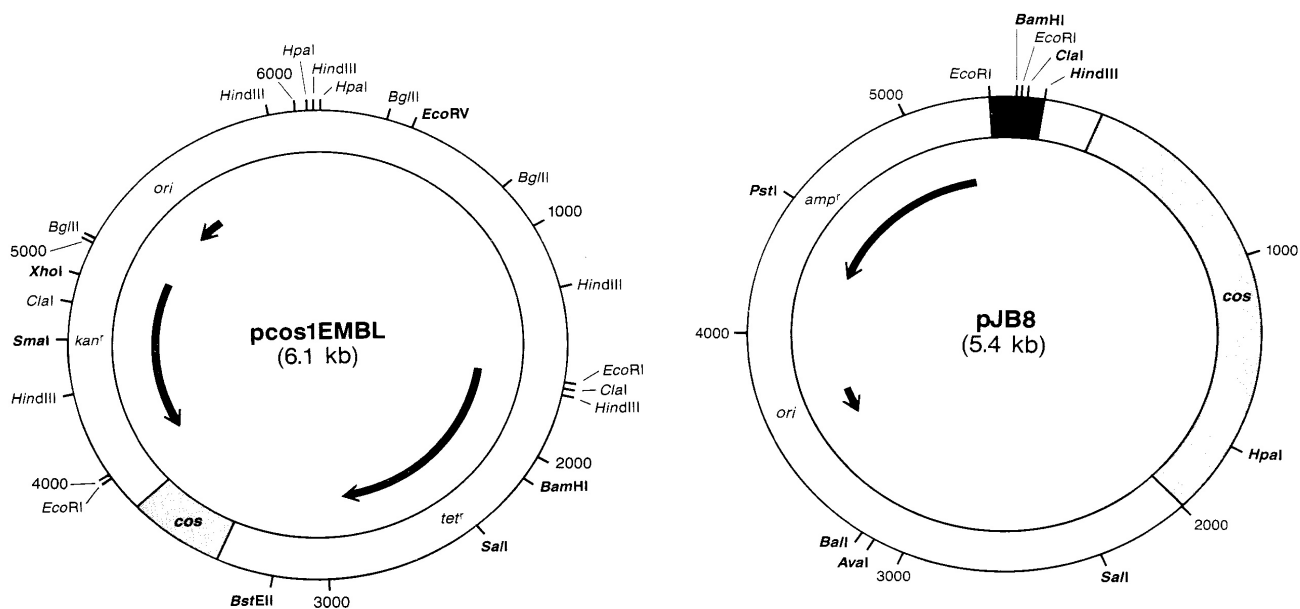


15. ábra: Az M13 bakteriofág restrikciós térképe (van Wezenbeek et al. 1980)

Kozmidok

A kozmidok létrejöttét az az igény sietette, hogy egyre nagyobb DNS darabokat lehessen klónozni, hogy a klóntárak, – melyek a gyakorlati munka elengedhetetlen eszközeivé váltak a klónozás során • egy-egy genomot minél kevesebb klónban tartalmazzanak, illetve, hogy minél kevesebb klónt kelljen átvizsgálni, amikor egy gén kikeresése folyik.

Láttuk, hogy a lambda-fág segítségével maximum 15 kB nagyságú DNS darabok klónozása oldható meg. Azt is láttuk, hogy a lambda fág DNS egy részéről bebizonyosodott, hogy nem is szükséges a fág anélkül is fertőzőképes és szaporodóképes. Egy bátor feltételezés később bizonyítást nyert: fágunk álcázott plazmiddal is lehet baktériumot fertőzni. A fágunk álcázás a csomagolóenzim számára szükséges. A csomagolóenzim a természetes csomagolás során a teljesen ép fágok konkatenátként egymáshoz kötött genomjain is csak egyetlen részt ismer fel, az ún. cos helyet, mely a lineáris fág-DNS két végén lévő komplementer egyszálú szakaszok, a konkatenáton viszont kétszálú cos szekvenciák. A feltételezés az volt, hogy ha ezt a kétszálú cos szekvenciát ráépítik egy plazmidra, majd ebbe a kozmidnak nevezett képződménybe 35-45 kB nagyságú eukariota genomdarabokat építenek be, akkor ezt a gyűrű alakú DNS molekulát a csomagolóenzim a cos helynél felismerve, azt be fogja csomagolni.



16. ábra: Kozmidok térképei

A rekombináns kozmid *in vitro* pakolása után lehet elvégezni a fágokkal való fertőzést. A baktériumba a fág fehérjeburok farki részének közreműködésével bekerült DNS a baktériumsejt plazmájában mint plazmid fog működni. Mint aktív fág természetesen nem működőképes, hiszen a *cos* génen kívül egyetlen fág eredetű gén sincs rajta. Ez biztonsági szempontból is előnyös.

Az *in vitro* pakoláshoz ma már biotechnológiai termékeket és segédanyagokat előállító cégek készletet (kit) kínálnak, mely a fágburok feji és farki részleteit tartalmazó készítményből, pakolóenzimből, a pakoláshoz szükséges ATP oldatából és megfelelő pufferoldatokból áll.

Az *in vitro* csomagolás receptje a laborgyakorlatok mappában található meg.

<ftp://intranet.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/csomagolas>

A kozmidok segítségével készített génbankok, vagy klóntárak (**ld. még klóntárak**) például a humán genom esetében minimum 200 000 klónra van szükség, míg a lambda-fág felhasználásával 500 000 klónra. Ez a szám 10 000-re csökkenthető YAC vektorok alkalmazásával.

PhageMaker® *in vitro* λ Packaging System

High-efficiency one-tube λ packaging

Novagen's PhageMaker® System is optimized for maximum packaging efficiencies of cDNA and genomic DNA inserts ligated with any bacteriophage λ vector. This one-tube system is extremely easy to use: simply add up to 5 µg of ligated vector plus insert to the extract and incubate at room temperature for 2 hours.

Features

- The negligible background of < 10 pfu per extract is orders of magnitude lower than conventional two-extract systems.
- The extract is devoid of *EcoK* and other restriction systems (*merA*, *merBC*, *mrr*) that recognize methylated DNA. Therefore,

PhageMaker is especially recommended for constructing highly representative cDNA and genomic DNA libraries in which the insert DNA is methylated.

- The one-tube configuration enables the use of multiple aliquots from the same tube, thus providing a significant cost savings over other systems.
1. Gunther, E. J., Murray, N. E., and Glazer, P. M. (1983) *Nucleic Acids Res.* **21**, 3903-3904.
 2. Rosenberg, S. M., Stahl, M. M., Kobayashi, I., and Stahl, S. W. (1985) *Gene* **38**, 165-175.
 3. Rosenberg, S. M. (1987) *Meth. Enzymol.* **53**, 95-103.

Product	Size	Cat. No.
PhageMaker® System	6 extracts 11 extracts	69307-3 69307-4

Components:

- 11 × 50 µl PhageMaker Extracts
- 2 µg PhageMaker Control DNA
- 0.2 ml LE392 Host Strain

Additional Information Available

PhageMaker Protocol	TB024
---------------------	-------

T7Select Packaging Kit

Ultimate efficiency in T7Select library construction

T7Select® Packaging Extracts are optimized for maximum packaging efficiencies of T7Select vectors ligated with insert. The high efficiency extracts (> 5 × 10⁶ pfu/µg with Control DNA) make it easy to produce a library containing at

least 5 × 10⁷ recombinant plaques per microgram of arms. The extracts are made from a specially designed phage that reduces the non-recombinant cloning background to below 0.1%.

Product	Size	Cat. No.
T7Select Packaging Kit	6 extracts	70014-3

Components:

- 6 T7 Packaging Extracts
- 1 µg T7Select Packaging Control DNA
- 0.2 ml BL21 Glycerol Stock
- 0.2 ml BLT5403 Glycerol Stock
- 0.2 ml BLT5615 Glycerol Stock

Additional Information Available

T7Select System Manual	TB178
------------------------	-------

17. ábra: *In vitro* pakoláshoz kínált kit

Lambda DNA

#SD0011

0.5mg

Description

λ DNA is used as a substrate in restriction enzyme research and in the testing of restriction endonuclease activity. Phage is isolated from a heat-inducible lysogenic *E. coli* W3110 (*cl857 Sam7*) strain. DNA is isolated from purified phage by phenol extraction and dialyzed against 10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA. It has a molecular weight of 31.5 × 10⁶ daltons and contains 48502 base pairs. For detailed information see p.296.

Quality Control

Gel analysis for purity and homogeneity of *Aha*, *CpoI* and *HindIII* fragmentation patterns.

Concentration

0.3mg DNA/ml.

Storage Buffer

10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA.

Lambda DNA (*dam*⁻, *dcm*⁻)

#SD0021

0.5mg

Description

λ DNA is used as a substrate in restriction enzyme research and for testing of restriction endonuclease sensitivity to Dam or Dcm methylation. Phage is isolated from a heat-inducible lysogenic *E. coli* GM2163 (*cl857 Sam7*) strain. DNA is isolated from purified phage by phenol extraction and dialyzed against 10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA. It has a molecular weight of 31.5 × 10⁶ daltons and contains 48502 base pairs. For detailed information see p.296.

Quality Control

Gel analysis for purity and homogeneity of *Eco31I*, *TaqI* and *XbaI* fragmentation patterns.

Concentration

0.3mg DNA/ml.

Storage Buffer

10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1mM EDTA.

18. ábra: Néhány fág a kereskedelmi forgalomban

Élesztő plazmidok

Az élesztők közül genetikai szempontból a *Saccharomyces cerevisiae* a legismertebb Genomja viszonylag kicsi, csak négyszerese a *E. coli* genomjának.

Az élesztőben a baktériumokhoz hasonlóan előfordulnak plazmidok. Legismertebb természetes élesztőplazmid a **2-mikronos gyűrű**, mely egy autonóm módon replikálódó DNS. Van replikációs origója, és ún. REP génjei, melyek viszonylag kis extrakromoszómális kópiaszámot biztosítanak úgy, hogy csak akkor választják szét a plazmidreplikációt a normális sejtosztódástól, amikor a plazmid kópiaszáma lecsökkent a sejtben. Ekkor beindul a plazmid független replikációja, amely mindaddig tart, amíg a kópiaszám el nem éri a sejtenkénti 30-50 darabot.

A 2-mikronos gyűrűt **YEp**-nek is nevezik, azaz élesztő episzómális plazmidnak (yeast episomal plasmid). Egy sor élesztő-klónozó vektort fejlesztettek ki belőle.

ARS (autonomously replicating sequences) szekvenciák felelősek a független replikációért. Ilyen ARS szekvenciákat kimutattak már plazmidokon, pl. a 2-mikronos gyűrűn is, de magán a kromoszómán is. Az ARS szekvencia nagy kópiaszámot eredményez, de gyakran instabilis, mert hiányzik az a mechanizmus, mely biztosítaná a sejtosztódás során a nagy kópiaszámot és az utódsejtekbe jutást. Az ARS szekvenciákat tartalmazó plazmidokat **YRp**-nek azaz replikálódó élesztő-plazmidoknak (yeast replicating plasmids) is nevezik. Egy ARS szekvenciát tartalmazó *E.coli* plazmid például nagyon jó hatásfokkal transzformálódik, nagy lesz a kópiaszáma, de, főleg, ha nincs szelekciós nyomás a sejtosztódáskor elvész, nem kerül át az utódsejtekbe, 10 generáció elteltével szinte teljesen eltűnik.

Vannak a kromoszómába integrálódó élesztő-plazmidok is, melyek a kromoszómába integrálódva stabilan bekötődnek az élesztőgenomba, osztódáskor megkettőződnek és átadódnak az utódsejtbe. Ezeket **YIp**-nek (yeast integrating plasmid) nevezik.

A kromoszómák kettéosztódását és igazságosan egyik félnek az utódsejtekbe jutását az élesztőkromoszóma centromerjéből származó CEN szakaszok biztosítják. A CEN szekvenciák felelősek a kromoszómák mitotikus orsóhoz kapcsolódásáért. Ha ilyen CEN szakaszt építünk az ARS szekvenciákat is tartalmazó függetlenül replikálódó plazmidokra, akkor biztosíthatjuk a nagy kópiaszámú plazmid stabil fennmaradását a generációk során át. Az ilyen mesterséges élesztőkromoszómákat **YAC** vektoroknak (yeast artificial chromosomes) nevezik.

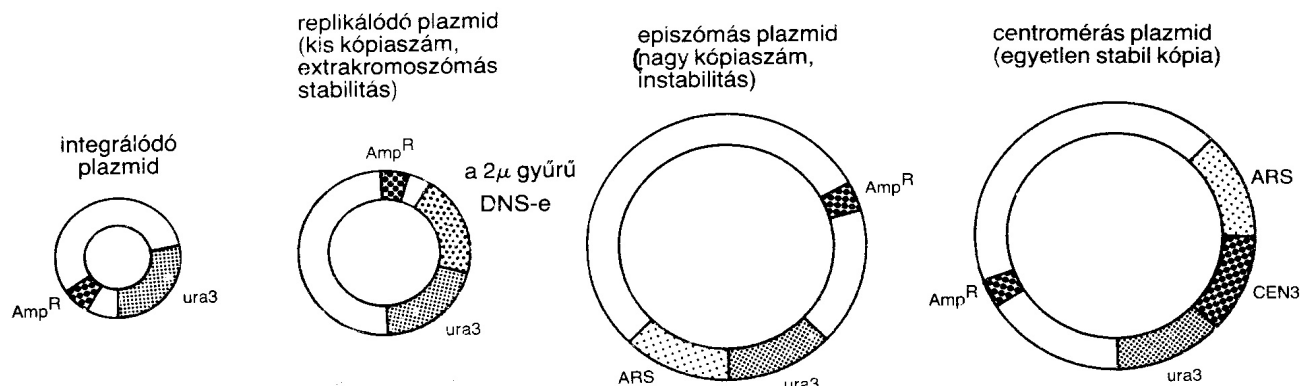
A YAC vektorok a centroméren kívül az élesztőkromoszóma végeiről, a teloméerekről is tartalmaz darabokat. Ezeknek az a szerepük, hogy megakadályozzák a kromoszóma letörését, vagy más DNS-hez kapcsolódását. Tehát a **YAC** minden olyan szakaszt tartalmaz, amely a kromoszóma replikációjához és az utódsejtbe kerüléshez szükséges. Ezekon a szakaszokon kívül a YAC vektorra ráépítenek még egy, a gazdasejtben működőképes replikációs origót is. Ezeket a szakaszokat bármilyen egyszerű DNS darabra rá lehet építeni.

A YAC vektorok segítségével igen nagy genomdarabok, néhány millió bázispárból állók klónozása is megoldható. A **HUGO** project (Human Genome Project), mely a teljes emberi genom feltérképezését és szekvenálását tűzte ki célul ilyen vektorokat alkalmaz a klóntárak készítéséhez. Ezzel a technikával a teljes humán genom „elfér” 10 000 élesztőklónban. Így mind a tárolás, min a kikeresés lényegesen egyszerűbb feladat és olyan nagy gének is vizsgálhatóak, mint például a kétmillió bázisból álló izomsorvadásért felelős gén (muscular dystrophy).

A YAC vektort és többi élesztővektort nem csak klónozásra, hanem expresszióra is alkalmazzák. Mivel az élesztők maguk is eukarióták, így képesek kihasítani az intronokat. Az élesztősejtek glikozileznek is, de nem azonos módon az emlős sejtekkel. Ez egyes esetekben még előny is lehet, ha másképp akarjuk glikozilezni a fehérjét, mint ahogy az emlős sejtben glikozileződik (**pl. stabilitásnövelés, például a TPA klónozásánál**).

További előnyük az élesztőben történő expressziónak, hogy az élesztők a baktériumokhoz hasonlóan gyorsan szaporodnak, de nem termelnek annyi toxint, mint a baktériumok, amit aztán a rekombináns DNS termékből a tisztítás során el kell távolítani.

Az élesztő vektorok nagy része ingázó vektor (**ld. baktérium-plazmidok**), így az expresszáltatást megelőző manipulációkat a jól ismert és könnyen használható *E. coli* gazdarendszerben lehet végezni. Kifejlesztettek élesztő kozmidot is, melyek az *E. colival* ingázó vektoroknak olyan továbbfejlesztése, mely a baktériumba való bejuttatás hatásfokának javítására *in vitro* csomagolást lehetővé tévő szakaszt, vagyis *cos* régiót is ültetnek a mesterséges DNS kreációra.



19. ábra: Az élesztő négy plazmidtípusa

Az élesztő négy plazmidtípusa. Az *integráló* plazmid tartalmazza az élesztő egy szelektálómartertulajdonságának génjét, de nincs replikációs kezdőpontja. Így az ilyen plazmid csak akkor stabil, ha beépül az élesztő kromoszómájába. A *replikáló* plazmid tartalmazza a szelektáló élesztőmarkert és az élesztő 2 μm-es DNS-ének egy darabját. A 2 μm-es kör alakú DNS-ben megtalálhatók a replikációs kezdőpont és a „rep” gének. Az utóbbiak tartják stabilan a plazmidot extrakromoszómásan és viszonylag alacsony kópiaszámban. Az *episzómás* plazmid az ARS szekvenciát hordozza, ami lehetővé teszi a plazmid önálló replikációját az élesztősejtben. Nincs viszont olyan mechanizmus, ami fenntartaná az ilyen extrakromoszómás plazmidot nagy kópiaszámban a mitózis során. Az ARS-t hordozó plazmidok ezért nem stabilak. A stabilitást a CEN3 szekvencia beépítése okozza. Az élesztő centromeronjának egy darabja, amely a mitózis folyamán az osztódási orsóhoz kapcsolódik. A CEN3 szekvencia gondoskodik az extrakromoszómás plazmid szabályos eloszlásáról a mitóziskor.

Növényi rekombináns DNS vektorok

A növényi szövettenyésztés, a növényi biotechnológiák birtokában a növényi rekombináns DNS technikák számtalan lehetőséget nyitottak meg számunkra. A tény, hogy izolált növényi sejtekkel tudunk dolgozni, és hogy protoplasztokból regenerálható a teljes növény, lehetővé teszi, hogy a növényi protoplasztokkal az élesztőgombákhoz és a baktériumokhoz hasonló módon végezzük a klónozást és a sejtfüzió ellenpontjaként egyetlen kiválasztott gén bejuttatását oldjuk meg.

A növényeknél alkalmazható génvektorok olyan talajbaktériumok, melyek parazitaként genetikailag befolyásolják a növényt, miután megfertőzték. Ezt a természetes génátviteli módszert alakították a génebeszék a baktériumok transzformációjához és a fágok transzdukciójához hasonlóan céljaik szolgálatába.

Az *Agrobacterium tumefaciens* egy plazmid segítségével váltja ki a daganatot, vagyis a fertőzött növényi sejtek szabályozatlan és független növekedését. A baktérium beépíti a Ti plazmidját a

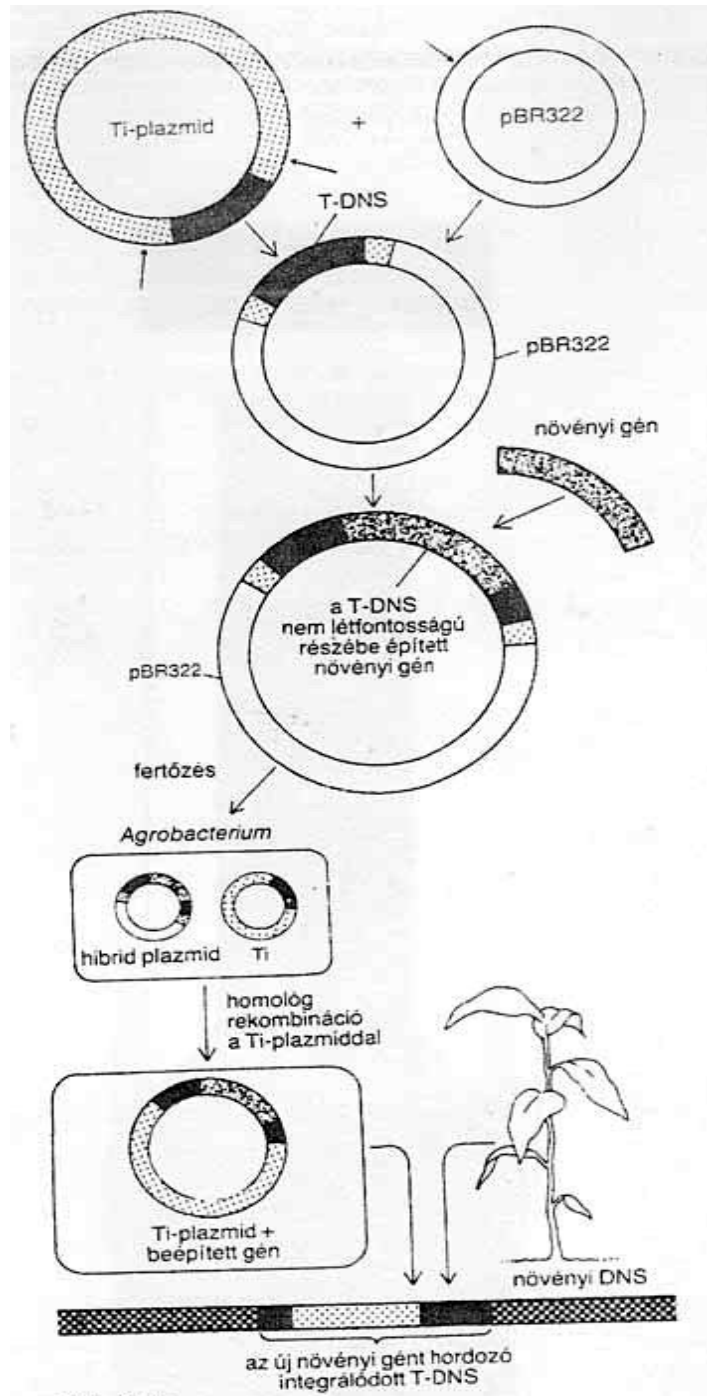
növényi sejt kromoszómájába. A Ti plazmidon olyan, aminosav termeléséhez szükséges kód van, amelyet csak a fertőző baktérium tud felhasználni szén- és nitrogénforrásként. Ezek az aminosavak az opin az oktopin vagy a nopalín lehetnek

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-e, nagysága 20 000 bázispár, ez jut be a gazdasejtbe a fertőzést követően, majd kovalensen beépül a növényi kromoszómába. Az aminosavak kódján kívül növényi hormonanalógok szintéziséhez szükséges információkat is hordoz, melyek segítségével a gyökér- és szárnövekedést leállítja, ezzel is előnyt kényszerítve ki a tumorsejtek növekedéséhez.

A T DNS-ről azt is megállapították, hogy mendeli öröklődésmentet mutat, tehát, ha egyszer már beépült a kromoszómába, ott úgy viselkedik, mint a növény saját génjei.

A Ti plazmid előnyösen használható vektor, mert: az *Agrobacterium tumefaciens*nek igen széles gazdaköre van. Szinte minden kétszikű növényt képes transzformálni. Ha a kívánt gént sikerül beépítenünk a Ti plazmid megfelelő helyére, a T régióba, akkor a többit már a baktériumra bízhatjuk.

A Ti plazmid túlságosan nagy mérete miatt (180 kB) a génszűrészek a T régiót kivágják a plazmidból és csak azzal dolgoznak tovább. Beépítik egy *E. coli* plazmidba, majd elszaporítják. A célgént a T DNS-be beépítik, majd ezt a hibrid molekulát még mindig *E. coli*-ban replikáltatják. Amikor rekombináns T DNS már nagyobb mennyiség áll rendelkezésre, akkor a hibrid molekulát bejuttatják az *Agrobacterium tumefaciens*-be, ahol az a natív Ti plazmidba homológ rekombinációval kerül be. Ha ezzel fertőzik a növényt, a célgén a T DNS-sel együtt beépül a rákos növény kromoszómájába.



20. ábra: A Ti plazmid felhasználása vektorként

Először restrikciós enzimmal hasítják a plazmid T DNS-ét és pBR322 plazmidban klónozzák. Ezt követően beépítik az idegen gént a pBR322 klónozott T DNS-ébe. A keletkező hibrid plazmidot összekeverik normál Ti plazmidot hordozó *Agrobacterium* tenyésztel. Annak DNS-e rekombinálódik a hibrid plazmidéval, és így az idegen gént tartalmazó plazmid alakul ki. Az idegen gént hordozó *Agrobacteriummal* fertőzik meg a növényt, és így a módosított T DNS bejut annak kromoszómájába.

A gén a baktérium előlése után is működőképes lesz. A baktériumnak az a génje, mely a növény regenerálódását gátolja inaktíválható, így a T DNS bejuttatás után a protoplasztból teljes növényé fejlődhet. A transzformált sejtek szelekciója is nagyon egyszerűen oldható meg: hormonmentes táptalajon csak a transzformánsok tudnak növekedni.

Egyszerűsítették a transzformációt, miután rájöttek hogy a **T DNS**-en kívül csak a baktérium Ti plazmidjának **vir** szakaszára van szükség a transzformációhoz és a fertőzőképességhez. A végső megoldás az lett, hogy az egyik *Agrobacterium tumefaciens* plazmidon a T DNS, a másikon a **vir** régió lett külön-külön bevive a sejtbe. Így nem kellett a nagy Ti plazmiddal dolgozni és főleg nem kellett a rekombináns T DNSnek a Ti plazmidba homológ rekombinációval való beépülésére alapozni, ami nem túl jó hatásfokú folyamat.

A Ti plazmid transzformációja közvetlenül növényi protoplasztokba is lehetséges, de ennek a folyamatnak lényegesen rosszabb a hatásfoka, mint a baktérium vektor közvetítésével történőnek.

Növényekbe vektor nélkül is lehetséges DNS-t bejuttatni (**ld. bejuttatás**).

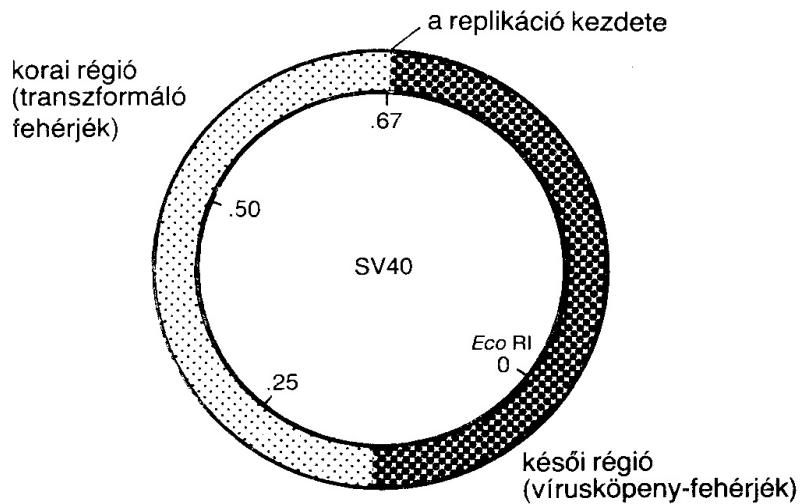
Állati vírusvektorok

A vektor nélkül történő DNS bevitelt transzformációnak neveztük, de állati sejtek esetében • a transzformáció kifejezés már foglalt voltára való tekintettel • gyakran a vektor közreműködése nélküli folyamatot is transzfekciónak nevezik. Hasonlóan transzfekciónak nevezik a vírus vektorok által közvetített DNS bejuttatást, mely mind az átvitel, mind az expresszió hatásfokát nagyban megnöveli.

Az állati vírusok közül a következőket tárgyaljuk részletesen: DNS tumorvírusok: SV40, polioma vírus, adenovírusok, vaccinia vírusok, retrovírusok, embrionális karcinóma sejtek.

Az SV40 vírusvektorok

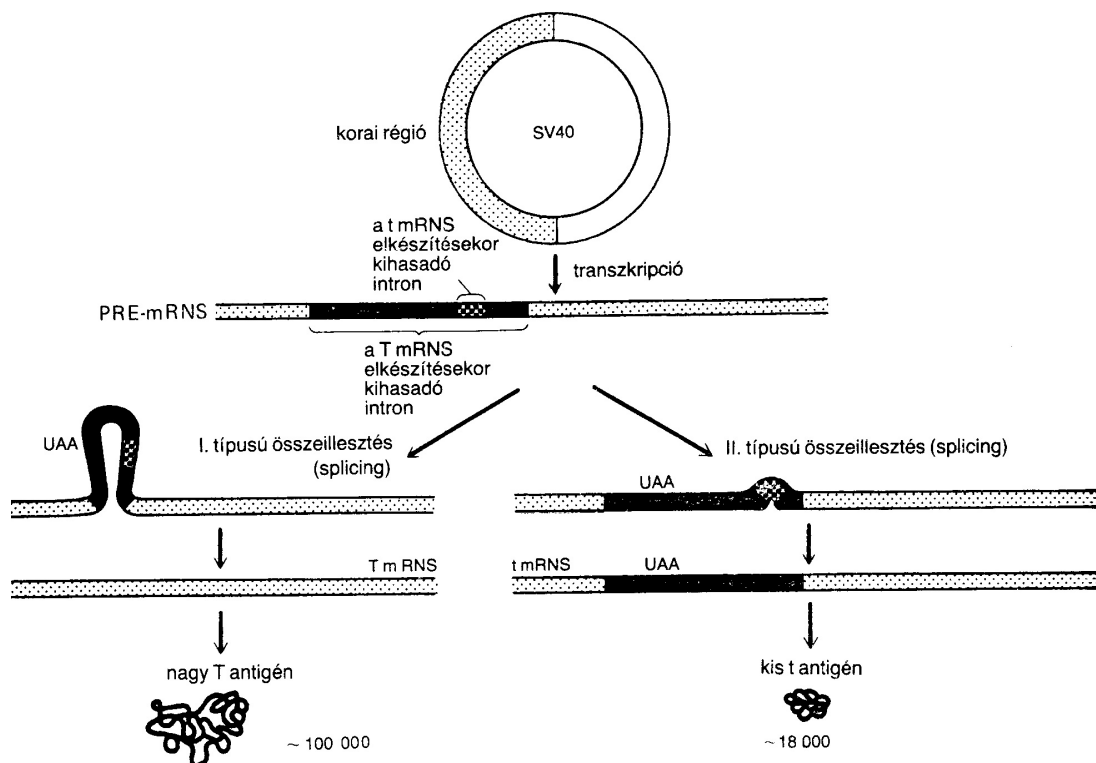
Az SV40 a legkorábban megismert és legáltalánosabban használt emlős vírus-vektor. Méret igen kicsi, a gömb alakú kapszulában egy 5243 bázispárból álló gyűrű alakú DNS van. A DNS-en restriktív endonukleáz hasítási helyek vannak, általában mindegyikből csak egy, ezért a vírus natív formája is alkalmas klónozó vektor. A kis méret előny, amikor *in vitro* manipulációkat végzünk, de hátrány olyan szempontból, hogy a genomon nincsenek felesleges részek, melyeket helyettesíteni lehetne a klónozendó DNS-sel.



21. ábra: Az SV40 kromoszómája

A korai primer transzkriptum kódolja a transzformáló (nagy T és kis t) fehérjéket. A késői régió primer transzkriptuma kódolja a vírus köpenyfehérjéit (VP1, VP2 és VP3).

A genom funkcionálisan korai és késői régiókra oszlik a bakteriofágokhoz hasonlóan (**ld. ott is**). A korai régiók az egész lítikus ciklus során kifejeződnek, a késői gének viszont csak a DNS replikációt követően, a vírus szerkezeti fehérjéinek szintézise idején működnek. A DNS replikáció kezdőpontja korai és késői szakasz között helyezkedik el. Érdekes megemlíteni azt a felfedezést, amit éppen a DNS tumorvírusok korai régióival kapcsolatban fedeztek fel, ez pedig a DNS-ről megszintetizált RNS „összeillesztés” (splicing), ami megmagyarázza azt, hogy egy viszonylag kis DNS szakasz, hogyan lehet felelős egymagában a tumorfehérjék (szerepük a rákos állapot kialakítása és fenntartása) szintéziséért és a vírus replikációért. A splicing során az RNS transzkriptum két vagy több eltérő módon is összeilleszthetődik.



22. ábra: Splicing

Ugyanannak a primer korai transzkriptumnak a különböző összeillesztése (splicing) a nagy T és a kis t fehérjéket kódolja. A nagy T mRNS-éből egy translációs stop kódon (UAA) kihasad a splicing során, a kis t m-RNS-ben viszont benne marad a stop kódon. Ennek köszönhető, hogy bár kis t m-RNS sokkal hosszabb, mint a nagy T m-RNS, mégis kisebb fehérje szintetizálódik róla.

Az SV40 vektor fejlesztése során kezdetben a vírus kis méretéből adódó hátrányokat igyekeztek kiküszöbölni. Ennek egyik megoldása az volt, hogy a vírus késői génjeit a klónozandó DNS-re cserélték. A késői szakasz hiánya a vírusok termelésének hiányához vezet. A vírustermelést egy segédvektor alkalmazásával oldották meg, amely tartalmazza vírustermeléshez szükséges késői géneket. Ezek együttesen alkalmazva teljessé teszik a folyamatot.

Kezdetben a lítikus SV40 vírus használták, melynek hátránya, hogy elpusztítja a fertőzött sejteket. Később kifejlesztették a nem lítikus SV40 vírust, mely a sejtben plazmidként replikálódik. Ehhez olyan gazda sejt vonal szükséges, mely állandóan termeli a T-antigént. Ha ilyen, pl. majomsejt vonalban dolgozunk, akkor a vektornak csak az SV40 replikációs origóját kell tartalmaznia. Ezzel a plazmidként replikálódó kisméretű vektorral (200 bázispár) bármilyen bevitt gén replikációját meg lehet oldani az említett sejt vonalban.

Az adenovírusok

Az adenovírusok emberekben és állatokban enyhe lefolyású megbetegedések sorát okozhatják. Génklónozásra két módon lehet őket felhasználni.

Az egyik a hagyományos klónozó, illetve expressziós vektorként való felhasználás. Ilyenkor a kóozandó fehérje génjét beépítik a vírusgenomba, majd fertőznek az *in vitro* becsomagolt vírussal. Az adenovírusok más vírusokhoz hasonlóan génjeiket „be tudják kapcsolni” úgy, hogy nagysebességgel replikálódjanak illetve, hogy a kódolt fehérjetermék nagy mennyiségben termelődjenek. A vírusgenom egy részének helyettesítése a célgénnel az azon kódolt fehérje termeléséhez vezet.

A másik alkalmazás élő vírusvakcina előállítására. Ilyenkor az adenovírus genomjába egy veszélyes, patogén vírus antigénjét kódoló DNS szakaszt építik be, vagyis annak a fehérjének a kódját, mely immunválaszt vált ki az állatból. A rekombináns adenovírussal fertőzött élőlényben termelődni fog az idegen fehérje, az antigén (mely önmagában természetesen nem veszélyes) és ki fogja váltani az immunválaszt és a hosszútávú immunitást. Tehát az enyhe adenovírussal kiváltott immunitással együtt megszerezhető egy veszélyes vírussal szembeni ellenálló képesség is.

Vaccinia vírusok

A vaccinia vírusok a bárányhimlő rokonai, de ártalmatlan, biztonságos vírusok, melyeket egy sor biotechnológiában alkalmaznak. Több sejttípust is képesek fertőzni, és viszonylag nagy idegen géneket lehet beleépíteni. Többféle sejt fertőzésével lehet megtalálni a legmegfelelőbb expressziós rendszert, akár emlős sejtvonalakat humán fehérjék kifejezéséhez.

A vaccinia vírusokat ún. „élő vakcínák” előállítására is használják. Ez azt jelenti, hogy emberre vagy állatra veszélyes vírusok antigénjének genetikai kódját beépítik a vaccinia vírus genomjába, majd fertőznek vele. Ilyenkor az okozó antigénje immunválaszt és antitesttermelést vált ki a beoltott emberben, s így módon az védettséget szerez (aktív immunizálás ártalmatlan oltóanyaggal).

Retrovírus vektorok

A retrovírusok RNS-t tartalmazó tumorvírusok. A géntechnikákban nemcsak, mint vektort alkalmazzák, hanem segítségével ismerték meg és termeltetik a reverz transzkriptáz enzimeket, melyek a *in vitro* DNS rekombináns technika egyik fontos segédanyaga.

A retrovírusok genomja két egymással teljesen megegyező RNS lánc dimerje. Az RNS mérete 8-10 kB, de egyes defektív vírusoknál a méret mindössze 3,2 kB. A vírus RNS genomjára jellemző, hogy az emlősgenom m-RNS-éhez hasonlóan az 5' végén egy sapka (cap) a 3' végén pedig poli-A farok található.

A különböző RNS vírusok felépítése nagyon hasonló: az RNS-genom egy középső magban (core) található egy kevés reverz transzkriptáz enzimhez és szerkezeti fehérjéhez (GAG) kapcsolódva. Ezt a magot membránburok veszi körül. A membrán felépítése hasonló a gazdasejt sejtmembránjához és tartalmazza a vírus által kódolt glikoproteint (env). Az erősen onkogén vírusok még egy negyedik fehérje kódját is tartalmazzák, a gazdasejt ráksejtté alakulásáért felelős fehérjét. A gyengén onkogén, krónikus vírusok nem alakítják a sejteket ráksejtté, csak lassan indukálnak daganatot.

A fertőzés minden esetben egy DNS-provírus intermedieren keresztül történik. A kétszálú DNS intermedier szintézisét az RNS alapján a reverz transzkriptáz enzim végzi. A kétszálú DNS a megfertőzött sejt magjába vándorol és ott rekombinálódik, a sejt genomjával, azaz beépül a gazdasejt kromoszómájába.

A retrovírusok vektorként való alkalmazása kézenfekvő. Szinte minden állatfajnál alkalmazhatóak célgénnek sejtbe, majd sejtmagba juttatására, a gazdasejt genomjába illesztésre és a kifejeződés biztosítására. Ily módon nagyon sok állati sejtet, illetve sejtenyészetet lehetne ipari célokra, egyes fehérjék termeltetésére hasznosítani.

Az állati sejtekbe vektor közvetítése nélkül is viszonylag könnyen lehet DNS-t bejuttatni. Ezeket az eljárásokat ld. a **DNS bejuttatása sejtbe** c. fejezetben.

DNS bejuttatása sejtekbe

Mind a természetes, mind a manipulált DNS különböző sejt típusokba juttatására egy sor kifejezést alkalmazunk. Ezek a kifejezések több szakterületről származnak és ennek megfelelően más és más értelemben használják. Még mielőtt a kifejezések bábeli zűrzavarát ismertetnénk, különböztessük meg a DNS bevitelének két alapvetően különböző módozatát, vagyis a meztelen DNS önmagában való, segédorganizmus nélkül történő, pusztán fizikai-kémiai-biokémiai módszerek útján történő bejuttatását attól az esettől, amikor a folyamat szelektivitását és hatékonyságát növelendő a DNS

sejten belülré juttatásához más biológiai rendszereket, pl. vírusokat, vagy baktériumokat használunk fel.

A transzformáció a mikrobiológus, a bakteriológus számára azt a folyamatot jelenti, amikor a DNS kívülről, a baktériumot körülvevő közegből átkerül a baktérium sejtfalán és membránján és bekerül a sejt citoplazmájába. Ez egy természetes folyamat, mely mind lineáris DNS-fragmentumokkal, mind pedig plazmidokkal megtörténhet. A természetben az adaptáció, a célszerű rekombináció egyik, a baktériumok ivaros folyamatától eltérő génátadási folyamatról van szó. (ld. baktériumok rekombinációja). Ezt a természetes folyamatot optimalja a géntechnikus, a sejt, a közeg és a felveendő DNS, valamint e három kölcsönhatásait figyelembe véve.

A transzformáció kifejezés a növényi, de főleg az állati sejtenyésztéssel foglalkozó számára a sejtek átalakulását jelenti, ezért ők a DNS illetve a gének bármilyen úton történő, tehát a direkt bevitelét **transzfecciónak** nevezik, akkor is, ha ez a bevitel nincs vírus-, vagy parazita fertőzéshez kötve, amire a kifejezés eredetileg utal.

A transzdukción elnevezés elsősorban a baktériumok között, fág közvetítésével történő géncserét jelenti. Az *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmidjával végzett génmanipulációkkal kapcsolatban is alkalmazott kifejezés, de összességében egyre kevésbé használják.

1. DNS direkt, vektor nélküli bevitel sejtbe

A DNS direkt bejutása a sejtbe azt jelenti, hogy a meztelen DNS biológiai közreműködés nélkül, pusztán fizikai-kémiai-biokémiai alapon jut be a sejtbe valamilyen valószínűséggel. A géntechnikus ezt a valószínűséget igyekszik megnövelni az erre a célra kidolgozott és alkalmazott géntechnikákkal, receptekkel. A transzformációval történő DNS bejuttatás célja mind klónozás, mind expresszió lehet.

Baktériumok transzformációja plazmid DNS-sel

Baktériumok DNS-sel való transzformációja a természetből is jól ismert folyamat. Holt sejtekből kiszabadult lineáris kromoszómateredékeken lévő gének is képesek a közegből (vér, szennyvíziszap, gyümölcslevek, stb.) baktériumok belsejébe kerülni, ott rekombinálódni a kromoszómával és kifejeződni. A kompetens baktériumok tehát spontán is felvehetik a DNS-t megfelelő körülmények között. A géntechnikus viszont képes ennek a ritka folyamatnak a valószínűségét megnövelni a folyamat részleteinek optimalása útján.

A kompetens baktérium olyan fiziológiai állapotban van, hogy a külső térből való DNS felvétele maximális. Ilyen fiziológiai állapotba úgy kerülhet, hogy a szaporítás megfelelő szakaszába hozzuk és olyan pufferoldatban szuszpedáljuk, ami a DNS sejtbe lépését elősegíti.

A DNS alakja, mérete, koncentrációja a közegben szintén jelentős faktor. A klónozás során mindig plazmid DNS-sel transzformálunk, arra kapcsoltuk a klónozendó DNS-t. A plazmid a sejtben önreplikációra képest, ez a klónozás sikerét jelenti. A bejutás sikerét a plazmid azzal növeli, hogy kisméretű, kompakt molekuláról van szó, mely viszonylag védett a roncsolódással, töredezéssel szemben. A membránon való átjutást zárt gyűrű vagy szuperhélikális formája is segíti a lineáris DNS-sel összehasonlítva.

Meg kell itt jegyeznünk, hogy a r DNS technikákban alkalmazott a természetes plazmidok nagy részével ellentétben olyan mutánsok, melyekből kiírtották a sejtől sejtbe átkerülésért, a mozgékonyágért felelős géneket. Ennek biztonsági okai vannak: annak megelőzésére szolgálnak, hogy a bélbe bekerülve ne tudjanak egy másik bélbaktériumba átkerülni és elterjedni a bélmikroflórában.

A DNS sejtbe kerülését nagyban befolyásolja a közeg összetétele. Mandel és Higa (1970) megfigyelték, hogy kalcium (Ca) jelenlétében sokszorosára növekszik az *E. coli* DNS felvétele. Az elérhető határfok kezdetben 10^5 - 10^7 transzformáns/ug plazmid volt, további optimalizálással ezt az értéket 10^7 - 10^8 -ra lehetett felvinni. A határfok értékelésénél vegyük figyelembe, hogy a sejteknek csak egy kis része valóban kompetens, még optimális szaporodási szakaszt tekintve is, és hogy a közegben oldott plazmid DNS-ek közül mindössze minden 10 000-dik kerül be sejtbe.

A kalcium hidakat képez a sejt felületének makromolekulái és a DNS között. A sejt felületére kötött DNS molekulák bejutásának nagyobb a valószínűsége, mint a közegben oldott és statisztikus eloszlást mutató molekuláké.

A membránon való átjutást a membrán adekvát módon történő fellazítása, fluiditásának megnövelése segíti. A membránt felépítő lipidek szénhidrogénláncait a hőmérséklet emelésével lehet fluiddá, folyóssá és emiatt átengedőbbé tenni. A hősokk néhány percig tartó hőfokemelés jelent, az optimális $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ról 42 - $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra. Ekkor a sejt felületére tapadt plazmidok hőmozgásuk és a megfolyt membrán miatt nagyobb valószínűséggel lépik át a membránt és kerülnek a sejt belsejébe.

A plazmid transzformációval történő baktériumba juttatását a laborgyakorlatok leírását tartalmazó mappában találhatjuk.

<ftp://intranet.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/trafo>

Sejtfúzióval összekötött DNS bevitel, azaz transzformáció akkor valósul meg, ha baktériumokat DNS jelenlétében fuzionáltatják. A baktériumokat fúzió előtt protoplasztokká alakítják, azaz sejtfalbontó enzimmel, pl. lizozimmal leemésztik a sejtfalat. A sejtfúzió elősegítéséhez polietilén-glikol (PEG) adagolnak a közeghez, melyben a sejtek protoplasztjai szuszpendálva vannak. Ha sejtek fúziója, vagyis membránjaik összeolvadása a transzformálandó DNS oldatában történik, akkor akkor a fúziós termékek magukba zárnak valamennyit a közegből és a benne oldott DNS-ből.

Élesztőgomba transzformációja

Az élesztő szferoplasztjai, vagyis a cellulóz sejtfaltól megszabadított sejtjei is képesek felvenni a hozzáadott DNS-t. CaCl_2 és polietilén-glikol (PEG) javítják a folyamat hatékonyságát, a polietilén-glikol átjárhatóvá teszi a sejtmembránt, ezzel elősegíti a DNS bejutását.

Az élesztősejtbe mind élesztőplazmid, mind *E. coli* plazmidok bevihetőek transzformációval. *E. coliban* működő plazmidok transzformálhatóak élesztőgombába és ott önreplikációra is képesek, ha ráültetik az élesztőben felismerhető origót. Ilyen ingázó plazmidok, melyek mind az *E. coli*, mind az élesztő replikációs origóját tartalmazzák, alkalmasak arra, hogy a klónozás *E. coliban*, ebben a nagyon jól jól ismert gazdasejtben történő előkészítése és ellenőrzése mellett az expressziót élesztőben oldják meg.

Az élesztőplazmidok (ld. plazmidok) egyik fajtája autonóm replikálódó (ARS) formában, egy másik pedig kromoszómába épülve megmaradhat. Replikációs kezdőponttal rendelkező élesztőplazmidok transzformációs gyakorisága elérheti akár az 1 %-ot is.

Növényi sejtek transzformálása

A növényi szövettenyésztés, a növényi biotechnológiák lehetővé teszik, hogy egyetlen izolált növényi sejttel úgy dolgozzunk, olyan génmanipulációkat vigyünk véghez, mint bármelyik mikroorganizmuson, és ha már a manipuláció megtörtént, akkor az izolált sejtből regeneráljuk a teljes növényt. Izolált növényi sejtek protoplasztjaiba tetszés szerint DNS-t tudunk bejuttatni, biztosítani a bevitt gének expresszióját.

A növények génmanipulálásának célja lehet a hagyományos nemesítési célokkal egyező, például betegségekkel szembeni rezisztencia kialakítása egy olyan gén bevitelével, mely megakadályozza a patogén hatását, vagy rezisztencia bizonyos növényvédőszerrel, például gyomirtószerrel

szemben, hogy a vetemény gyomoktól való megszabadítására szelektíven lehessen alkalmazni azt a bizonyos szert, hiszen az csak a gyomokat fogja károsítani.

A betegségek, a növényi kártevő rovarok elleni védekezés egyik megoldása, hogy rezisztens fajokból, vagy vad ősből kinyerni a betegség elleni rezisztenciáért felelős gént és azt beültetni az érzékeny kultúrfajtába. Ez főleg bakteriális és gomba kártevőkkel szemben adhat megoldást. A másik lehetőség, hogy teljesen új gén segítségével érjük el az ellenállóképesség kialakulását. Ilyen gén lehet a *Bacillus thuringiensis* toxinjának a génje. A toxin a rovarok bebábozódását akadályozza meg. A bakteriális gént sikeresen beültették dohányba és paradicsomba, majd burgonyába is. A *Bacillus thuringiensis* toxint termelő dohány már kereskedelmi forgalomban is van az USA-ban. Ennek engedélyeztetése, lévén, hogy nem eszik meg, hanem elégetik, tehát nem az élelmiszer minőségi kritériumoknak kell eleget tennie, tehát viszonylag enyhébb biztonsági és egészségkritériumoknak.

A toxin génjének beültetésétől eltérő stratégia egy olyan enzim génjének a beültetése, mely megtámadja a kártevőt. A kitináz enzim génjéről van szó, mely képes lebontani a kitinváz rovarokbélburkár a növény emésztése során.

Vannak olyan fehérjék, főleg enzim-inhibitorok, amelyek a kártevő bélsatornájában hatnak, amikor az már emészteti a növényt. Ezek a fehérjék a rovar valamelyik életfontosságú enzimjét gátolják, például tripszin-inhibitorok.

Csak a géntechnikák segítségével elérhető új tulajdonságok kialakítása is lehet a cél. Kutatók ezrei dolgoznak például a légköri nitrogén megkötéséért felelős, azt lehetővé tevő gén növényekbe ültetésével, melynek segítségével a növények majd a „levegőből” is megélnék, hiszen annak nitrogéntartalmát fogják testükbe építeni, nem pedig az energiaigényes nitrogén-műtrágyákat.

A DNS növényi sejtbe történő bejuttatásának legfőbb akadálya a sejtfal. A vastag, merev sejtfal nem teszi lehetővé, hogy a növény a baktériumokhoz hasonlóan DNS-t vegyen fel a környezetéből. A növényi sejtek génszabványos átalakításához tehát az izolált növényi sejtől először protoplasztot kell készíteni olyan ozmotikus viszonyok között tartva ezt, hogy a sejt hártájára a belső ozmózisnyomással azonos nyomás nehezedjen, továbbá meg kell akadályozni a sejtfal spontán visszaépülését, vagyis a sejtfalbontó enzimek koncentrációját állandó értéken tartani. Ha ezy sikerül megcsinálni, akkor következhet a DNS bejuttatása a protoplasztba. Ennek leggyakoribb módszerei az egyszerű transformáció, azaz a DNS direkt bejuttatása, a mikroinjektálás, az elektroporáció és a

génpuska (biolisztika). Biológiai közvetítéssel az *Agrobacterium tumefaciens* felhasználásával történhet növényekbe génbevitel.

Növényi protoplasztok transzformálása idegen DNS-sel lehetséges a sejtfa eltávolítása után. Egyes esetekben egyszerűen a DNS hozzákeverésével is megtörténik, természetesen megfelelő körülmények között.

Növények mikroinjektálása leggyakrabban vagy DNS tartalmú liposzómákkal történik, ilyenkor a sejt citoplazmája a cél, vagy közvetlenül a sejtmagba. Utóbbi nehezebb, de jól kontrollálható a beinjektált DNS mennyisége.

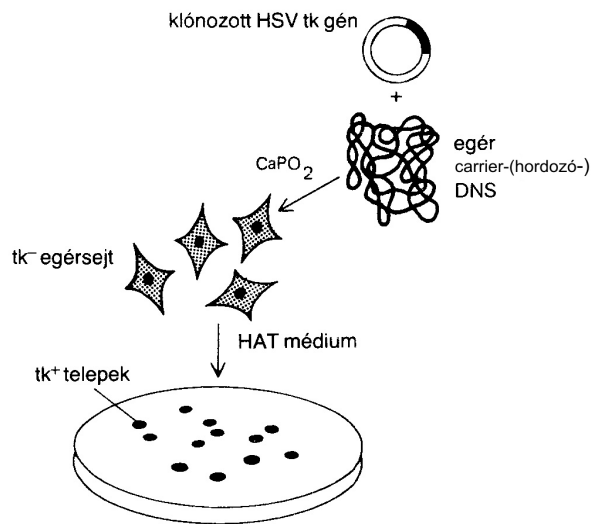
A biolisztika, vagyis a génpuska alkalmazása nem olyan hatékony eszköz a növényeknél, mint az állatok esetében. A növényi sejtbe jó hatásfokkal és könnyűszerrel bejut a DNS, de a kromoszómába épülés hatásfoka általában gyenge, így transzgénikus növények előállítására nem alkalmas.

Emlőssejtek transzformálása, transzgénikus állatok

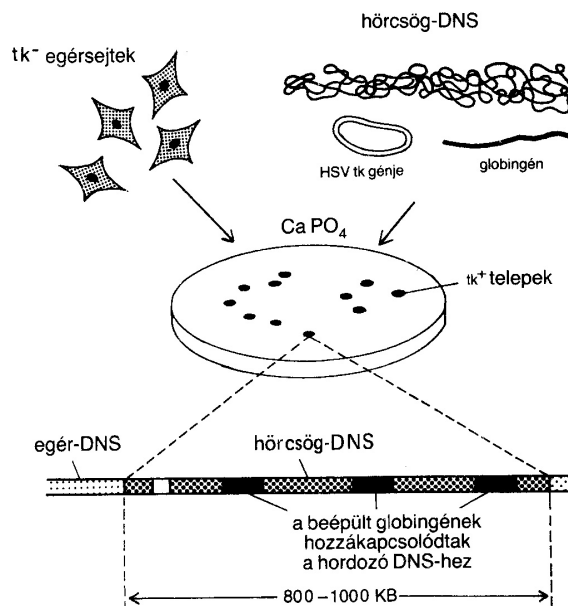
Az emlőssejtek transzformálásának jelentősége igen nagy, gondoljunk csak a génterápiára. Egyes örökletes genetikai betegségek oka, egy hiányzó, vagy hibás gén. Az ilyen betegséget a sejtekbe bevitt ép génekkel lehet gyógyítani, a hiányzó vagy kiesett funkciót pótolni. Ilyenkor egy soksejtű lény egyes szöveteibe, vagy összes sejtjébe be kell juttatni az ép gént és biztosítani kell annak expresszióját. Az olyan állatot, amely sejtjeiben egy másik organizmusból származó gént tartalmaz, transzgenikus állatnak nevezzük. Ez a kifejezés nem általánosodott az összes élőlényre, csak kimondottan transzformált állatok illetve állati sejtek esetében használják. Állatok esetében viszont akkor is használják, ha a gén bevitele vírusok vagy tumorsejtek segítségével történik.

Az első emlőssejt transzformációs kísérletek sejttenyészetben folytak a *Herpes simplex* vírus (HSV) timidinkináz enzimjének génjével. Timidinkináz deficiens mutáns emlőssejttenyészetet hoztak össze a herpeszvírus timidinkináz génjével, acélból, hogy a hibás emlőssejteket kijavítsák. Az emlőssejtek a DNS-t képesek felvenni, ha az kalcium-foszfát csapadék formájában kerül a sejtrel kapcsolatba. A kalciumfoszfát csapadék formát valószínűleg fagocitózissal kebelezi be a sejt, és az így bekerült DNS egy része integrálódik a kromoszómába. A felvett vírus eredetű timidinkináz gén véletlenszerűen épült be az emlőssejt kromoszómájába. Ha ehhez a timidinkináz génhez bármilyen más gént kapcsolnak, a kapcsolt gén is könnyűszerrel bejutott a kompetens sejtekbe és rekombináldott a kromoszómával. Az is világossá vált, hogy a timidinkináz génnek nem is elsősorban vektor, hanem inkább marker szerepe van, azaz jelzi az idegen gén beépülését. Az idegen

gén akkor is beépül transzformációval a kromoszómába, ha nincs előzetesen hozzákapcsolva a timidinkináz génhez. Érdekes, hogy ilyen esetben is egymás mellett épülnek be a transzformált sejt kromoszómájába, ez azt jelenti, hogy a DNS-ek a sejtben belül ligálódnak. Ezt a folyamatot kotranszformációnak nevezik.



23. ábra: A herpesz szimplex vírus (HSV) timidin-kináz génjének bevitele a tk^- egérsejtekbe



24. ábra: Kotranszformáció a génátvitel során.

Amikor a Ca^{2+} -os kicsapással eukarióta sejtekbe viszik a tk gént, a hordozó-DNS egy része vagy bármely más a precipitátumban levő DNS hozzákötődik, kialakítva egy nagy (800-1000 kilobázisú) szerkezetet, amely azután beépül a kromoszómába.

Transzgénikus állatok előállítása nem olyan egyszerű, mint a növényeké, ahol a teljes növény regenerálható egyetlen izolált sejtből a növényi sejt úgynevezett totipotenciálja miatt. Ahhoz, hogy az egész állat transzgénikus legyen, a csírá, a petesejtet, vagy a spermiumot, vagy a megtermékenyített zigótát kell megváltoztatni, vagyis transzformálni a szükséges gént tartalmazó DNS-sel. A kifejlett állat egyes sejtjeinek transzformálása általában nem megoldás egy hiányzó gén pótlására. A fent említett kalciumfoszfátos DNS csapadék sejtbe juttatásán kívül más fizikai-kémiai eljárások is alkalmazhatóak DNS állati ivarsejtbe, vagy zigótába juttatására, illetve a bejuttatás hatékonyságának növelésére. Ilyen módszerek a mikroinjektálás, az ivarsejtek transzformációja (transzfekciónak is nevezik), az elektroporáció, kromoszómák injektálása, embrionális sejtek összekeverése kiméra kifejlesztése céljából. Láthatjuk ebből a felsorolásból, hogy a transzgénikus állatok előállításánál az egyetlen gén bevitelétől egy teljes genom beviteléig teljes a stratégiai skála.

Mikroinjektálás

Idegen DNS emlőssejtbe juttatására meglepő módon igen hatékonyak bizonyult a mikroinjektálás, vagyis az, hogy egy igen vékonyra kihúzott üveg mikropipettával egyenesen a sejtmagba injektáljuk a DNS-t. Ezt mikroszkópra szerelt mikromanipulátorral lehet kivitelezni. Aki ügyes kézzel tudja csinálni a mikroinjektálást, az óránként 500-1000 sejtbe is képes injektálni. Az injektált sejtek felébe stabilan beépül a bevitt gén. Nagy előnye, hogy bármely gén bevihető bármilyen sejtbe. Hátránya a kivitelezés nehézsége.

Ha a mikroinjektálás a megtermékenyített petesejtre irányul, akkor a teljes állat transzgénikussá tehető. Már az 1970-es évek elején bebizonyították, hogy korai embriókba injektált gének a nevelőanyagában kifejlődött egerek 40 %-ában megtalálhatóak voltak. Az eredetileg beinjektált gének a megszületett egér legkülönbözőbb szöveteiben fordultak elő, stabilan beépültek és öröklődtek.

A mikroinjektálás első tapasztalatai után a technikát úgy módosították, hogy az injektálást petesejt megtermékenyítése utánra időzítették, amikor a már egyesült ivarsejtek magjai még nem olvadtak össze. A klónozott gént rendszerint a spermiumból származó sejtmagba injektálják, mert az bonyolult átalakulások után egyesül a petesejt magjával és ezek az átalakulások segítik az idegen gén beépülését. A manipulált petesejtet ezután vagy a petevezetékbe transzplantálják, vagy a blasztula stádium elérése után a méhbe ültetik be.

Kutatási célból bármilyen gén petesejtbe injektálása megoldható, történelmi jelentőségű volt az emberi interferon és az inzulin génjének, a nyúl béte-globingénjének, a *Herpes simplex* vírus

timidinkináz génjének vagy az egér leukémia vírus cDNSének mikroinjektálása. Ezekből a kezdeti kísérletekből meg lehetett állapítani, hogy 5 000 - 50 000 bázispár nagyságig lehet DNS-t bejuttatni, hogy a bejuttatott gének integrációja nem kromoszómaspecifikus és, hogy a bevitel hatásfoka igen jó, még a kezdeti kísérletek átlaga is eléri a 10 %-ot, ami 1-2 %-os beépüléstől egészen 40 %-os beépülésig változó hatásfok átlagát jelenti.

Manapság már rutinszerűen alkalmazzák a mikroinjektálást marha, birka, kecske és disznó esetében. A mikroinjektálás két fő céllal szokott történni. Az egyik a háziállatok nemesítése, a másik hogy ezeket a génmanipulált állatokat expressziós rendszerként alkalmazzák.

Mikroinjektálás szerepe az állatnemesítésben

A génmanipulációval történő nemesítés céljai azonosak a hagyományos nemesítési módszerek céljaival. Ezek a produktivitás fokozása, a termelésbiztonság és a technológiai igények kielégítése.

Kísérletek folytak például sertés esetében transzgénikus növekedési hormon gén bevitellel, más kísérletek a gyapjú, vagy a tej minőségének javítását célozzák.

A megnövekedett növekedési hormonszint a táplálék jobb kihasználásához, gyorsabb növekedéshez, nagyobb tömegű hús termeléséhez vezetne, de egy sor kellemetlen mellékhatás lerontja ezeket az előnyöket, nem beszélve az etikai, jogi és a szociális megfontolásokról.

Transzgénikus állat, mint expressziós rendszer

Humán gyógyászati célú fehérjék expresszióját és termelését úgy oldották meg ezekkel az állatokkal, hogy nemcsak hogy beültették a kívánt termék génjét, de azt sem bízták a véletlenre, hogy milyen szövetekben mikor és mi módon fejeződjék ki. Olyan promotert és olyan szignál peptid szekvenciáját tettek a gén mellé, amelyek azt eredményezték, hogy a fehérje a tejmirigyben termelődjék és a tejben választódjék ki. Egyes gyógyszerek esetében a tejjel kiválasztott fehérje koncentrációja 3 g/liter.

Összehasonlítva a transzgénikus állatokat, mint expressziós rendszert az emlőssejttenyészetekkel, óriási a transzgénikus állatok előnye. Nincs szükség bonyolult fermentorra, steril tenyésztésre, bonyolult összetételű és drága tápközegre és adalékokra, nincsenek zavaró fehérjék, endotoxinok, sejtmaradványok. Ezt az eljárást az angol nyelvű újságírók az igen találó „pharming” elnevezéssel illették.

Ma már készítettek a kutatók állatokat, amelyek alfa-1-antitripszint képesek termelni és a tejükben kiválasztani néhány g/liter koncentrációban. Különböző cégek más és más állatban valósították meg a gén expresszióját. Újabban a birka és a kecske használata visszaszorította a tejtermelési és fogyasztási szokások miatt kezdetben favorizált tehenet, hiszen ezek a kisebb állatok szaporábbak és gyorsabban növekednek fel.

Transzgénikus állatok a humán betegségek tanulmányozására

A transzgénikus állatok máig legsikeresebb alkalmazása az ember betegségeinek modellezésében történt. Elsősorban viszonylag ritka betegségek tanulmányozására alkalmas a transzgénikus állati modell, tehát olyanokéra, melyeknél kicsi a betegszám, és amelyeknek a kifejlődése lassú és ezért nem ismerhetők fel a kezdeti stádiumban. A transzgénikus állati modell segítségével megkerülhetők az embereken végzett kísérletek, amelyek gyakran sem etikai sem praktikus okokból nem elfogadhatóak.

A modell állatokon kialakított emberi betegségeket jól lehet tanulmányozni a kialakulás, a lefolyás, a diagnosztizálás és a gyógyítás szempontjából. Új gyógyszerek és terápiák kipróbálást lehet elvégezni például nagyszámú egéren.

Az AIDS kutatására kifejlesztett humanizált egér megfertőzhető az AIDS vírusával a beültetett humán CD4 génnek köszönhetően. A Hu-SCID egérnek nincs saját működő immunrendszere. Hanem AIDS gyanús humán immunsejteket ültettek bele, ilyenformán ez az egér tulajdonképpen egy kiméra. Az immunhiányos egeret immunrendszerének drasztikus tönkrételével nyerik. Ez történhet besugárzással, vagy egy olyan toxin génjének transzgénikus bevitelével, amely a limfocitákban fejeződik ki és tökéletesen „kiüti” az immunrendszert.

A diabetes és más olyan betegségek modellezésére, ahol specifikus sejtek csoportjának működése csökkent, vagy hiányzik, olyan transzgénikus állatokat állítanak elő, melyeknél a toxin-gén csak a kérdéses szövetben expresszálódik.

A diabetes esetében a toxin csak a hasnyálmirigy Langerhans-féle sejtjeiben fejeződik ki, azokat megöli, az állat többi része egészséges marad.

A rákos megbetegedéseket a megfelelő onkogén beültetésével lehet elérni. Az onkogén beültetése specifikus rákot alakít ki igen nagy gyakorisággal. Az első transzgenikus állat a *myc* onkogén tanulmányozására lett kifejlesztve, becenevén „*myc-mouse*”. A *myc* génhez egy olyan promotert kapcsoltak, amely az onkogén termékét a tejmirigyekben expresszáltatja. Az egerbe ennek az

onkogénnek egy működésképtelen, mutált változatát már korábban beépítették, így a *myc* gén bekapcsolása a homológ rekombináció révén volt lehetséges. A modell mind a rák kialakulásának tanulmányozására, mind pedig a kezelési stratégia kutatására alkalmas. A Harvard Egyetemen állították elő ezt az onko-egeret, amelyet szabadalmaztattak is. Ez volt az első eset, hogy egy állatot szabadalmaztattak.

Az immunfunkciók vizsgálata olyan transzgenikus modelleken lehetséges, amelyeknél az immunproblémák alapjait képező hibát alakítják ki, vagyis azt, hogy az immunsejtek nem képesek megkülönböztetni a szervezet saját anyagait az esetlegesen károsaktól.

Az immunrendszer mechanizmusait olyan modelleken lehet vizsgálni amelyekben tönkretesznek bizonyos fajta immunsejteket, vagy beépítenek idegen fehérjék génjeit. Ilyen módon kutatják a az allergiákat, az arthritist, a multiple sclerosis, a diabetes autoimmun problémáit.

A *homológ rekombináció* segítségével olyan génhibák modellezhetőek, melyeknél egyetlen gén funkciója esett ki, például a kollagén betegségek, mint bizonyos csontképződési rendellenességek

Homológ rekombináció

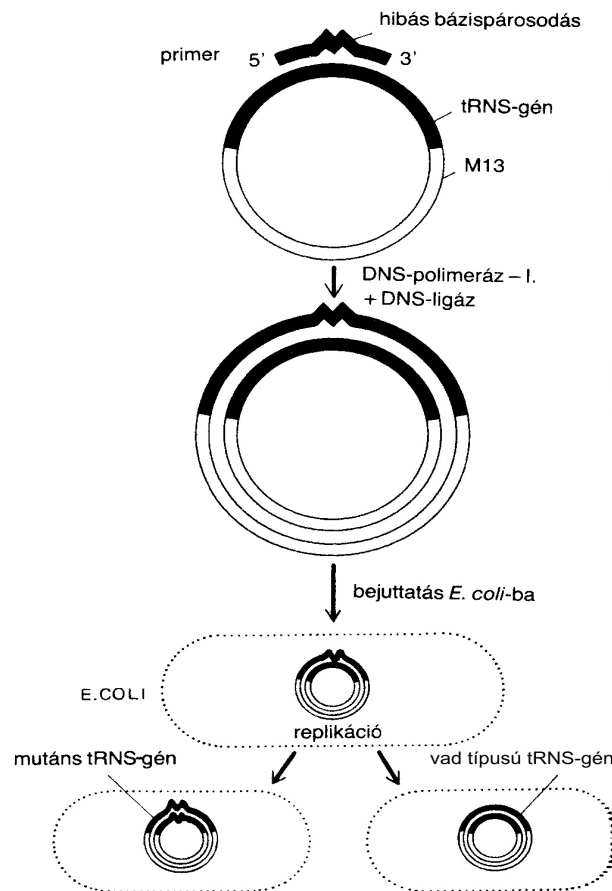
A homológ rekombináció azt jelenti, hogy az élő sejtben a DNS összekapcsolódik a vele homológ kromoszómazsónalattal. A kromoszóma elhasad és a homológ részletet tartalmazó DNS beépül a kromoszómába. A beépülő DNS lehet transzformációval bejuttatott DNS vagy plazmid.

A DNS-nek ez a specifikus kapcsolódási szokása lehetővé teszi új mutánsok előállítását azáltal, hogy a homológ szakasz irányítja a beépülést. A homológ szakaszt tartalmazó teljes plazmid beépül, vagyis integrálódik a kromoszómába. Ha a homológ DNS szakasz egy ismert gén részlete, akkor ez a gén tönkreteszhető azáltal, hogy a homológ, de nem ép gén a plazmidon hordozott többi génnel együtt beépül a kérdéses génbe, inaktíválva ezzel azt. Főleg élesztőgombáknál használatos technika, de transzgenikus állatoknál is alkalmazzák. Két különböző céllal: 1. Gének tönkretétele betegségek modellezése céljából, 2. Expresszálandó gének megfelelő helyre irányítása, a kromoszóma olyan részére, ahol ki tud fejlődni és nem tesz tönkre esszenciális géneket.

A homológ rekombináció felhasználása a génterápiában igen ígértes, annak ellenére, hogy bizonyos mellékhatásoktól ma még lehet tartani.

Irányított mutagenézis

A bizonyos DNS szekvenciák által irányított mutagenézis (site directed mutagenesis) segítségével céltudatos bázissorrend változásokat tudunk elérni a sejt egyes génjeiben. A mesterséges DNS egy hibát tartalmaz az ép génhez képest. Az eredeti gént tartalmazó DNS egyszálú változatához (M13 fágban készítve) keverve a mesterségesen előállított hibás darab hibridizál a csak kismértékben eltérő ép szállal. A DNS polimeráz ezen a kétszálú darabon, mint primeren (indítómolekulán) megindul és megszintetizálja a kiegészítő szálát. Ekkor a kétszálú DNS egyik szála ép, a másik hibás lesz. Bejuttatva a sejtbe a felemás DNS-t, az első replikáció után egy ép és egy hibás génu utódot fog létrehozni.



25. ábra: Szubsztitúciós mutáns létrehozása szintetikus oligonukleotiddal

12-15 bázisból álló oligonukleotidot szintetizálnak úgy, hogy egy-két bázis eltéréssel egy bizonyos DNS szakasz komplementere legyen. Amikor a komplementer fonalat hordozó klónnal keverik, az oligonukleotid kapcsolódik ahhoz, bár nem lesz tökéletes a bázispárosodás mindaddig, amíg a hibridálási feltételek nem szigorúan korlátozottak; a hibás bázispárok az oligonukleotidszegmens közepén helyezkednek el. Ezután az oligonukleotid primerként szolgál a DNS-polimeráz-I-nek, amely szintetizálja a komplementer szál maradék részét. Amikor a keletkező kettős fonalas molekulát *E. coli*-ba juttatják, ott az replikálódik, s létrehozza vagy a vad típusú, vagy a mutáns szekvenciát.

Biolisztika, génpuska

A kifejezés a ballisztika elferdítése. A ballisztika hajított testek és lövedékek mozgásának leírásával foglalkozó tudomány. A biolisztika névre keresztelt eljárás lényege, hogy a sejtbe juttatandó DNS-t összekeverik apró, mikron átmérőjű fém-részecskékkel, például tungstennel. Ezután ezt a DNS-fém keveréket nagy sebességgel belövik a sejtekbe, mint a lövedéket. Ez a lövedék a sörétre emlékeztet legjobban. Bejuttatása részecske pisztollyal történik. Ezek az apró sörétszemcsék átllyuggatják a sejt határoló felületét és a sejt plazmájába juttatják a DNS-t.

Előnye, hogy bármilyen sejtípusra alkalmazható, baktériumok, gombák, növényi és állati sejtek egyaránt kezelhetőek ilyen módon. Még sejtrészecskéket, sejtszervecskéket, például a mitokondriumot vagy a sejtmagot is meg lehet célozni a speciális génpuskával.

Ennek az eljárásnak vannak egyéb változatai is, például, amikor nem mechanikus fegyverrel lüvik be a részecskéket, hanem elektromosan kiváltott gyújtószikra segítségével hirtelen elpárologtatott vízcseppből felszabaduló gőz energiájával. Ebben az esetben az elektromos energia nagyságával lehet szabályozni a mini-robbanás erejét és beállítani az optimális bejuttatási határfokot.

Belövással izolált sejteken kívül szövetekbe, sőt élő szövetekbe is be lehet juttatni DNS-t.

Növények esetében nem nagyon hatékony eljárás, mert annak ellenére, hogy bejut a DNS a sejtbe, a kromoszómába rossz határfokkal épül be.

Kísérletekben sikerült egér bőrébe és fülébe DNS-t juttatni megfelelően átalakított génpuskával.

A DNS jó néhány napig aktív maradt a sejtekben, mígnem később lebomlott. Ezek a kísérletek azt sugallják, hogy a génpuska alkalmas megoldás lehet az emberi szomatikus génterápia során a DNS élő szervezetbe juttatására. Ma még vannak hátrányai ezeknek a génpuskáknak, például azok a szöveteket roncsoló mellékhatások, melyet nem maga a bevitt részecske okoz, hanem a génpuska működése közben fellépő légáramok vagy gőzbuborékok.

A Cornell Egyetemen kidolgozott módszer alapján a Du Pont kereskedelmi forgalomban is elérhető eljárást sé eszközt dolgozott ki.

Elektroporáció

A transzformációt, vagyis a meztelen DNS-nek a közvetlen sejtbe juttatását az elektromos erőtér alkalmazása elősegíti. A sejtfüzió hatékonyságának növelésére is alkalmazzák.

A körülményeket optimálni kell, nehogy a sejtek megsérüljenek, felrobbanjanak az elektromos erőtérbe kerülve. A transzformálandó sejteket a DNS-t tartalmazó oldatba teszik, majd az egészet elektromos erőtérbe helyezik, például váltóáramot adnak rá. Az elektromos erőtér módosítja a sejt lipidmembránjának állapotát, megnövelve sejtthártya átjárhatóságát, részecskéknek, molekuláknak a külső térből való felvételét (pinocitózis).

Főleg növényi sejtekbe való DNS bejuttatásnál sikeres és elterjedt az elektroporáció, történelmileg is a növényi sejtfüziónál (szomatikus hibridek, poliploidok előállítás) történő alkalmazásából fejlődött tovább. Egyéb sejtípusoknál, például mikroba- és állati sejteknél más módszerek kapnak prioritást (ld. transzformáció, transzfecció).

2. DNS bevitel közvetítő segítségével

DNS sejtbe juttatása liposzóma közvetítéssel

Liposzómákat kiterjedten alkalmaznak hidrofób gyógyszerek, kozmetikumok, egyéb ágensek. sejtmembránon át történő sejtbe juttatáshoz. Liposzómákba zárt DNS-t könnyen felveszi a máj és a spleen és viszonylag könnyen és gyorsan kifejeződnek.

Kalciumfoszfátos komplex

Kalciumfoszfáttal komplexált DNS-t jó hatásfokkal veszi fel a máj és az izomszövet. A gének egy része képes kifejeződni bejuttatás után. Ennek a ténynek nagy figyelmet szentelnek, mert ettől várják az izomsorvadás elleni génterápia megvalósulását.

Transzdukció

Transzdukció tulajdonképpen a vírus közreműködésével történő génbejuttatás baktériumba. A természetes folyamat baktériumból baktériumba történő génátvitel (természetes genetikai rekombináció) jelent. A folyamatot tetszés szerinti célgén bejuttatására is fel lehet használni: manipulált genomú fággal történő fertőzés által.

Transfekció

Általában vírus közvetítésével történő génbevitel növényi vagy állati sejtbe, de gének közvetlen (közvetítő nélküli) bejutására is alkalmazzák ezt a kifejezést (vö. transzformáció). Az emlős és a növényi géntechnikákban nagyon általános értelemben használják: mindenféle génbevitelre és rekombinációra.

Parazita baktérium közvetítésével

Agrobacterium tumefaciens közvetítésével, ld. a növényi vektoroknál.

Tartalomjegyzék

Géntechnika jegyzet

2. rész

Dr. Gruiz Katalin

Vektorok	2
Baktériumok plazmidjai	4
A plazmidok térképe.....	6
A jó plazmid-vektor	7
Plazmid-vektorok mérete:	8
Önreplikáció	8
Amplifikáció	9
Plazmidok felszaporítása, kinyerése	10
Expressziós vektorok	12
Mi biztosítja a jó hatásfokú fehérjeszintézist?	12
Hogyan oldjuk meg, hogy ne dolgozza magát halálra sejt, még mielőtt felszaporodna?	13
Hogyan növelhető még a termék-fehérje mennyisége?	14
Hogyan növelhető a termék-fehérje kinyerése, a down-stream folyamatban?	15
Mik az elérhető termékkoncentráció korlátai?	15
Bakteriofágok, mint vektorok	18
Kozmidok	20
Élesztő plazmidok	23
Növényi rekombináns DNS vektorok.....	25
Állati vírusvektorok	28
Az SV40 vírusvektorok	28
Az adenovírusok	31
Vaccinia vírusok	31
Retrovírus vektorok	31
DNS bejuttatása sejtekbe	32
1. DNS direkt, vektor nélküli bevitele sejtekbe	33
Baktériumok transzformációja plazmid DNS-sel	33
Élesztőgomba transzformációja	35
Növényi sejtek transzformálása	35
Emlősejtek transzformálása, transzgénikus állatok	37
Mikroinjektálás	39
Mikroinjektálás szerepe az állatnemesítésben	40
Transzgénikus állat, mint expressziós rendszer	40
Transzgénikus állatok a humán betegségek tanulmányozására	41
Homológ rekombináció	42
Irányított mutagenézis	43
Biolisztika, génpuska.....	44
Elektroporáció.....	45
2. DNS bevétel közvetítő segítségével.....	45
DNS sejtbe juttatása liposzóma közvetítéssel.....	45
Kalciumfoszfátos komplex.....	45
Transzdukción	45
Transfekción.....	46
Parazita baktérium közvetítésével	46