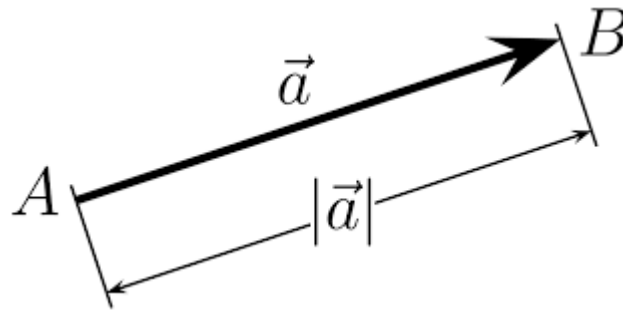
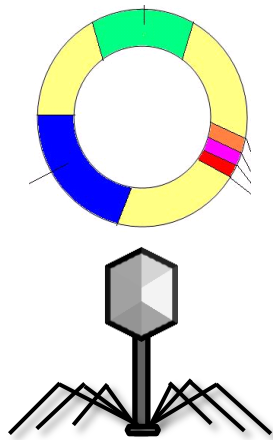


# 6. óra

## Génátvitel vektorokkal

2017. március 12.

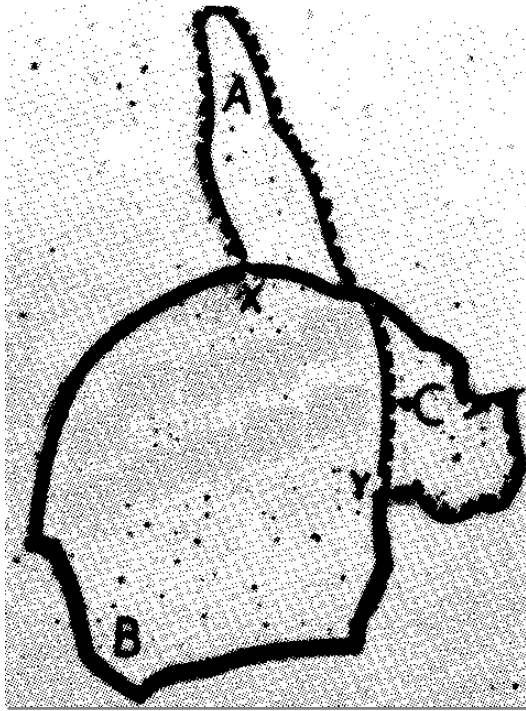


**Vektorok: idegen genetikai információ sejtbe juttatására alkalmas biológiai rendszerek**

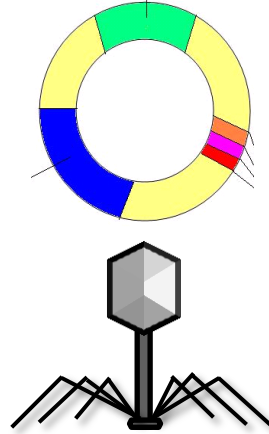


# Hogy néznek ki a gének, amiket módosítani akarunk?

## Prokarióta genomi DNS (másolás közben)



## Genomon kívüli DNS



## Eukarióta genomi DNS



1 db kromoszóma

46 db kromoszóma (embernél 23 pár)

egyszeres = haploid DNS készlet

Többszörös = diploid DNS készlet

aszexuális szaporodás (osztódás)

Kivéve: ivarsejtek (1x-es = haploid génekészlet)

Nem genomi DNS-t is tartalmaznak

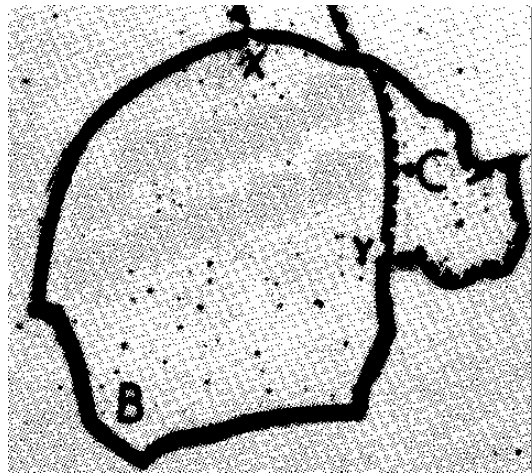
Plazmidok (nem minden sejt)

Mitokondriumok (~prokarióta-szerű DNS)



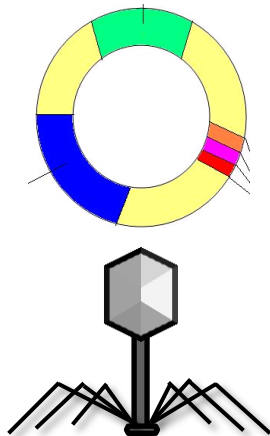
# Milyen cellal végezhetünk génmódosításokat?

Prokarióta genomi DNS  
(másolás közben)



1 db kromoszóma

Genomon  
kívüli DNS



Eukarióta genomi DNS



Több db kromoszóma  
(embernél 23 pár)

1. IPARI célú DNS módosítás

baktériumok

növények, gombák,  
állati (akár emlős) sejtkultúrák

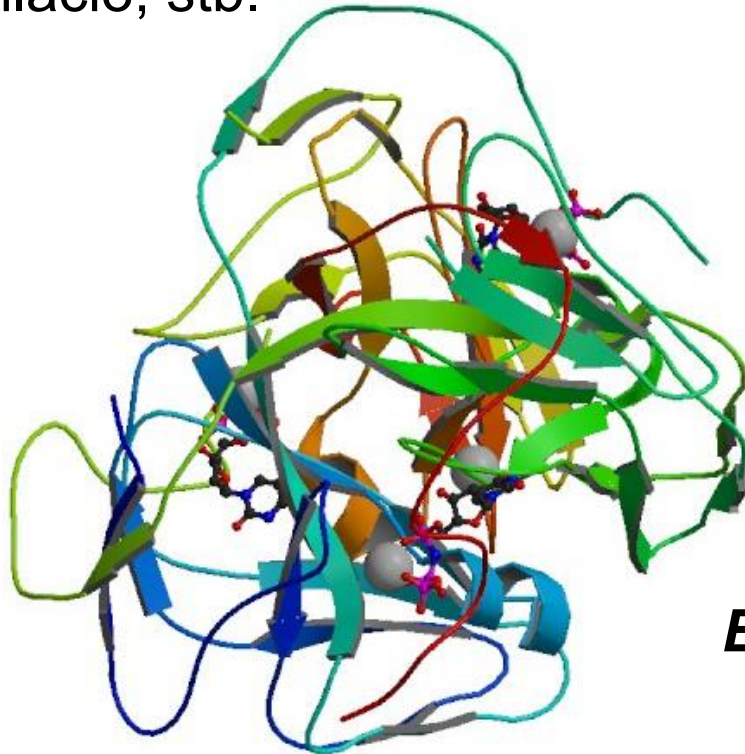
2. KUTATÁSI célú

3. GYÓGYÁSZATI célú DNS módosítás (pl. CRISPR rendszer, kutatás alatt) → GÉN TERÁPIA (gene therapy)

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

# Alkalmas lehet-e egy baktérium emberi fehérje megtermelésére?

- Attól függ, hogy a fehérje **tartalmaz-e intront** és az emberben átesik-e a felépítését követő, **poszttranszlációs módosítás**on.
- Pl. intronok kivágása (csak eukariótákban), glikoziláció, metilezés, foszforiláció, stb.



*Egy kutatási célra Escherichia coli BL21 baktérium törzsben előállított emberi fehérje, a **dUTPáz**.*

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

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



# A DNS módosítások a maradandóság szempontjából

- **átmenetiek** (tranzienst) vagy **stabilak** lehetnek.
- **Átmeneti**: a bevitt géneket a sejtek kifejezik (expresszálják), de a kívülről bevitt információ nem épül be a genomi DNS-ükbe.

Emiatt a sejtosztódáskor nem örökítik tovább.

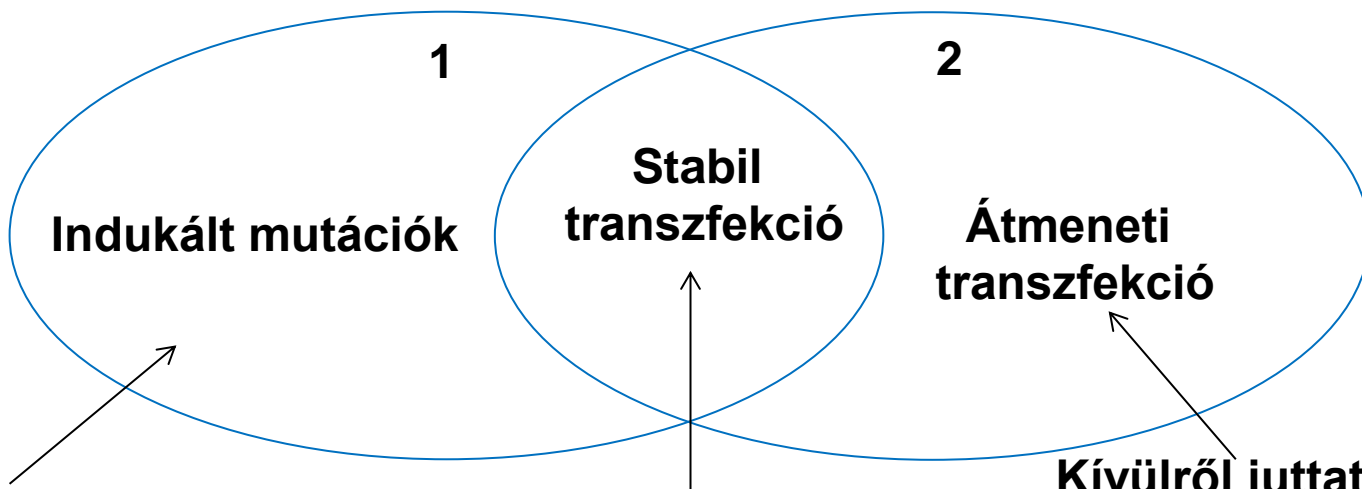
- **Stabil**: az idegen gén beépül a módosítani kívánt sejt genomi DNS-ébe. Emiatt a bevitt információ a sejtosztódások során tovább is örökítődik. Stabil módosítás a genomi DNS-t ért mutáció is.
- Transzformálás: idegen, nem vírus eredetű DNS bejuttatása prokariótákba és nem állati eukarióta sejtekbe.
- Transzfektálás: idegen, nem vírus eredetű DNS bejuttatása eukariótákba.
- Transzdukció: vírus eredetű DNS bevitele a sejtbe.



# Mennyire maradandó az adott génmódosítás?

1. a sejt genomi DNS-ének módosítása (**mutáció**)
  - Indukált mutációk: mindig véletlenszerűek („statisztikusak”)
  - Irányított mutagenézis! Pl. kémcsőben PCR vagy „in vivo” CRISPR

2. genomon kívüli DNS-en kódolt információ felhasználása  
→ VEKTOROK (**transzformáció/transzfekció/transzdukció**)



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

**Kívülről juttatunk be genetikai információt, és Ezzel módosítjuk a genomi**

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

**DNS-t → osztódáskor továbböröklődik!**

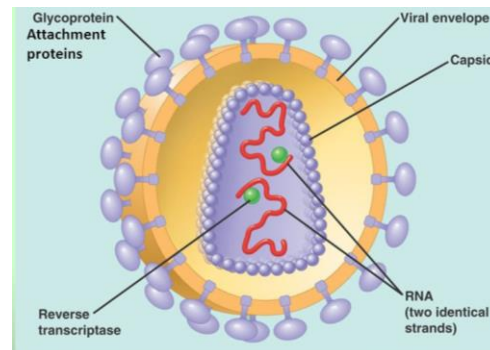


# „Természetes” génmódosítás vírusfertőzéssel

**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) transzfekeció**,  
Sejtosztódás esetén az utódsejtek nem öröklék a vírus DNS-t.

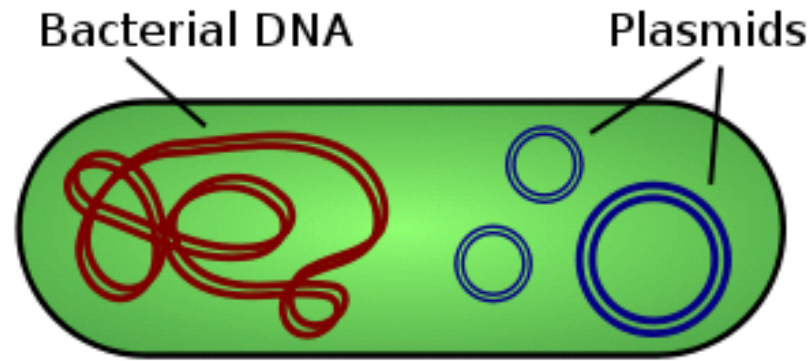
Megj.: az adenovírusok többnyire légzőszervi megbetegedéseket okoznak (pl. megfázás → légcsőhurut → tüdőgyulladás).



***A HIV vírus keresztmetszeti ábrázolása***



# „Természetes” génmódosítás horizontális génátvitellel → plazmid átadásával



- A genomi DNS-től függetlenül létező (replikálódó) 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.**



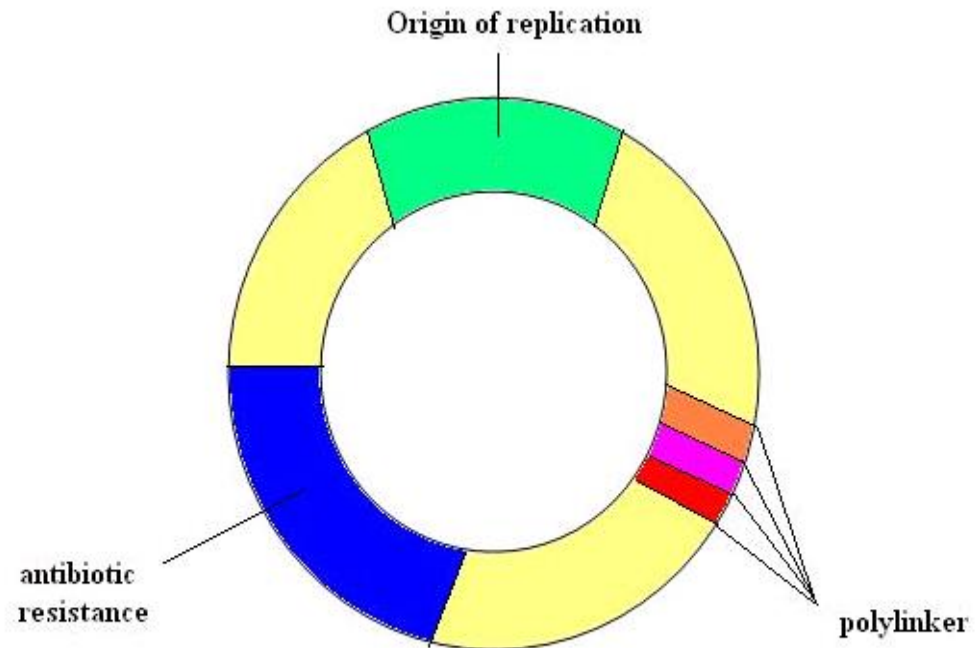


# Plazmidok

Plazmidoknak nevezzük a baktériumokban, egyes élesztőkben, algákban és növényfajokban található, a kromozómáktól független DNS darabokat. A plazmidok általában gyűrű alakú és kettősszalú 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.



**PLASMID**



# III/3. Gének átvitele vektorokkal

***Másoljuk le a természet megoldásait!***

Vektor: (molekuláris) biológiai rendszer, amely képes új/idegen genetikai információt bejuttatni egy sejtbe. Független sokszorozódásra képes.

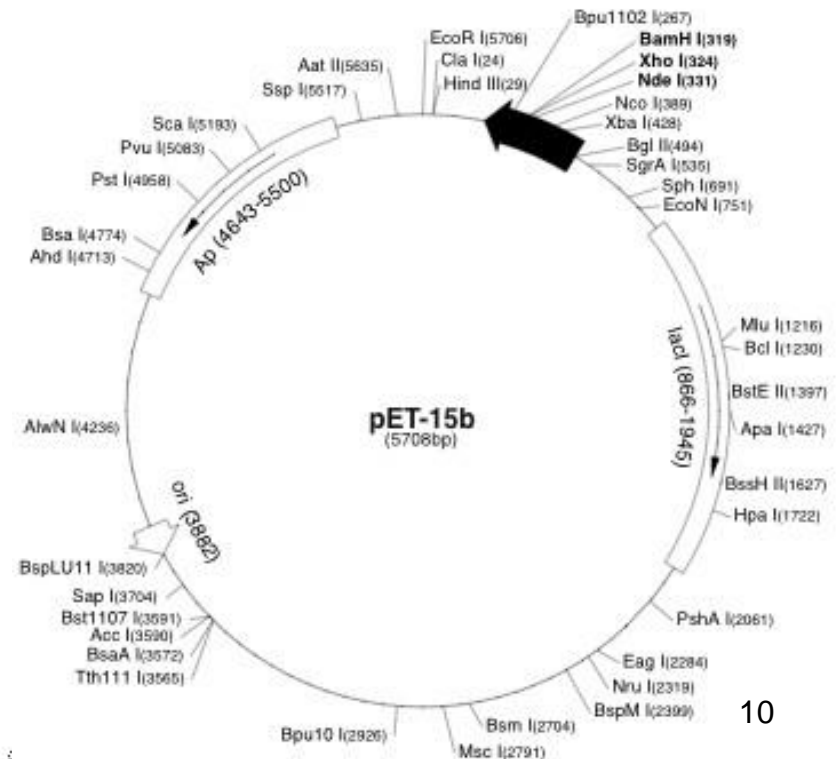
A vektorba a számunkra hasznos géneket ültethetjük be.

## A vektorok lehetnek:

- Plazmidok (1-10 kb)
- Bakteriofágok (10 – 23 kb)
- Más vírusok
- Mesterséges kromoszómák (~300 kb)

***pET-15b, egy mesterséges plazmid***

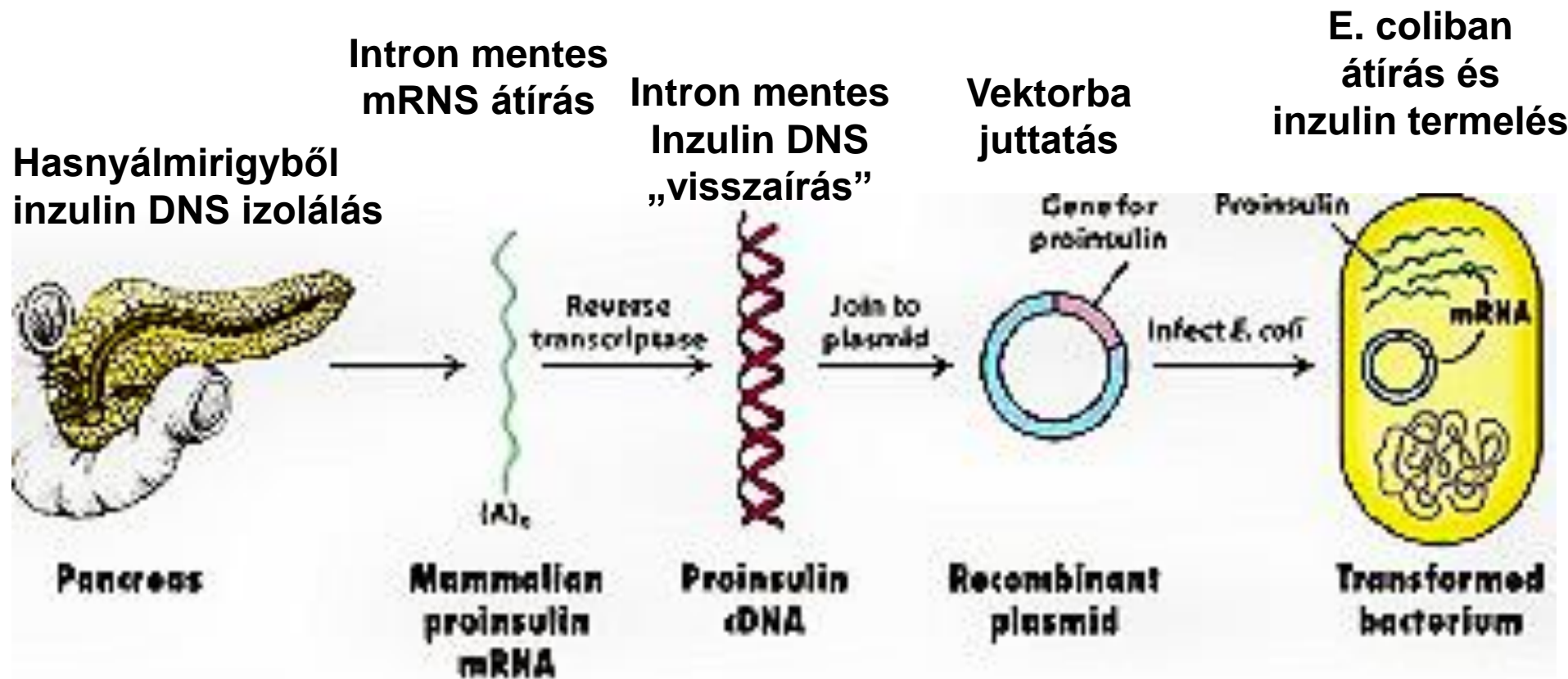
***Ára egyéni árképzés szerint :S***



# Mire jók a vektorok?

- Az adott sejttől idegen DNS bejuttatását és megsokszorozását, és
- Az adott sejttől idegen fehérjék előállítását tudjuk elérni velük.

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



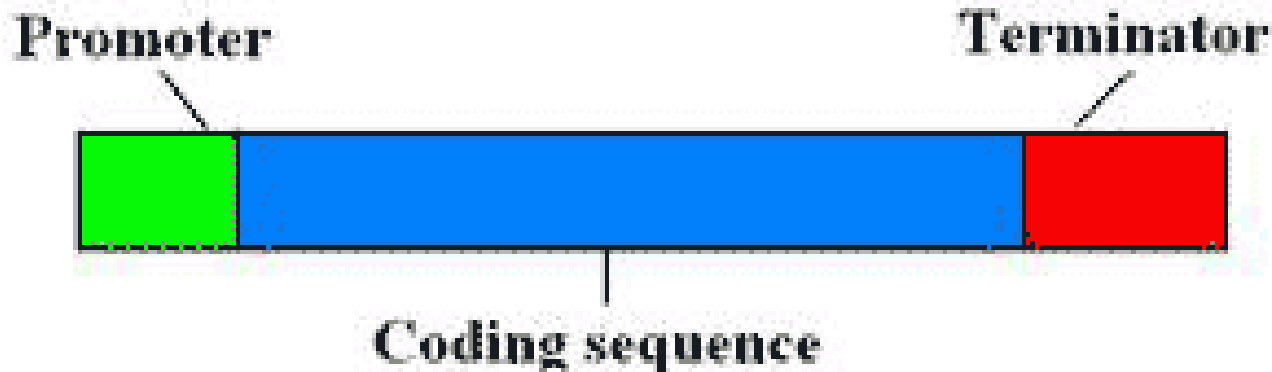
# A vektorok működése és funkció szerinti csoportosítása

Más csoportosítás szerint:

Klónozó vektorok: csak a gén(ek) bevitelére alkalmas, a kiíráshoz nem tartalmaz semmit.

Expressziós vektorok: a bevinni kívánt gén(ek) mellett a szabályozott kiíráshoz szükséges szakaszokat is tartalmazza →

Expressziós kazetta/keret: a célgén előtt: promóter szakasz, utána: terminátor szakasz.



# Hogyan működnek a plazmid vektorok

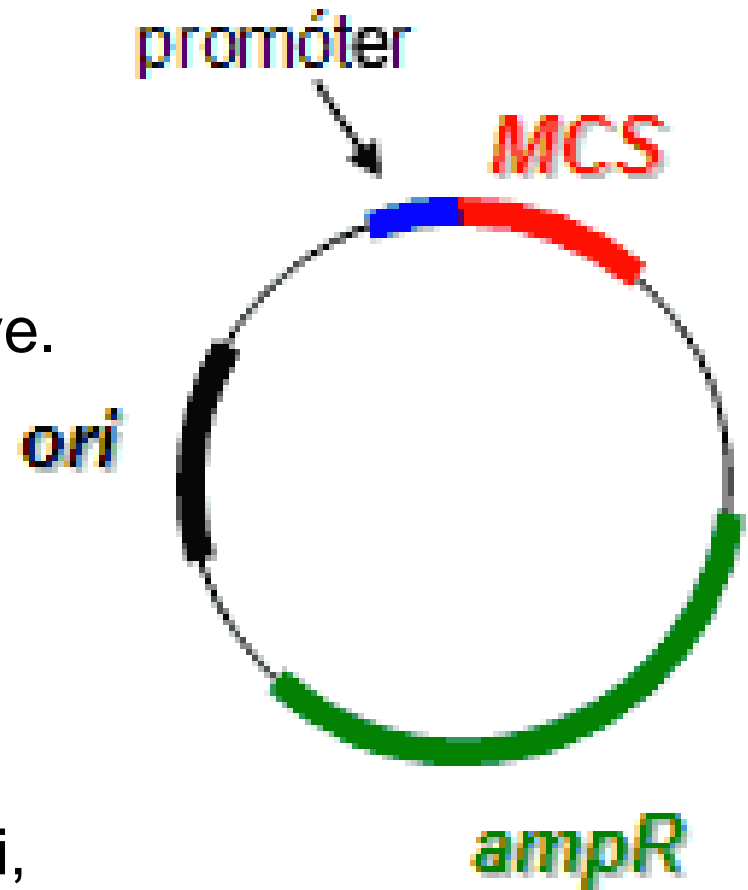
A plazmid vektorok jellemző részei:

ori = replikációs origó

A DNS másolás kezdőpontjának helye.

ampR = ampicillin rezisztencia gén

MCS = multiple cutting site = (több-féleképpen) felvágható szakasz = itt lehet felnyitni a gyűrűt, és beilleszteni, amit akarunk.



# Plazmid vektorok

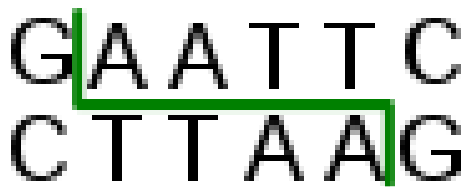
A plazmid vektorok jellemző részei:

- 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 szelekcióját segítik, pl. antibiotikum rezisztencia → antibiotikumot tartalmazó tápoldaton csak a plazmidos sejtek növekednek, a többi elpusztul.



# 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

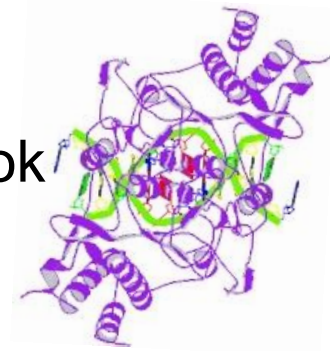
- A hasítóhelyek tükörképi = palindrom szekvenciák.



# Restriktációs enzimek

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

Nevezéktan és specifitás...



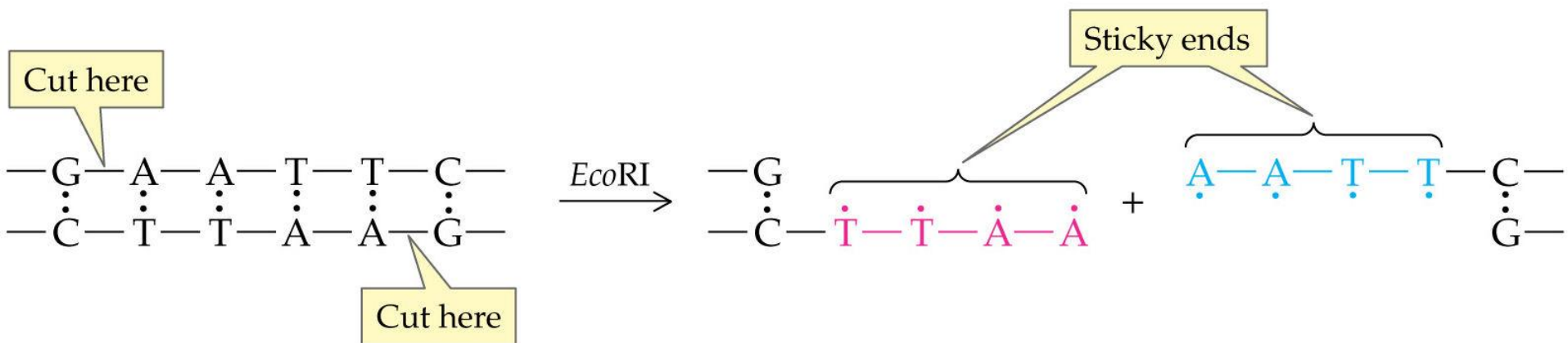
Mikroorganizmus	Enzim	szekvencia 5' → 3'	Bontási helyek száma			
			λ	Aα 2	SV40	φx17
<i>Arthobacter luteus</i>	AluI	AG CT	>50	>50	35	24
<i>Brevibact. albidum</i>	Ball	TGG CAA	15	17	0	0
<i>H. aegypticus</i>	HaeIII	GG C'C	>50	>50	19	11
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaI	GTT AAC	13	6	4	3
<i>Serr. marcescens 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. Tükröképi DNS szakaszoknál „ragadós véget” hoznak létre.



# Hogyan vihetők át gének plazmidokkal?

## 3. Bevitel a gazdasejtbe:

- kémiai,
- elektromos hatásokkal

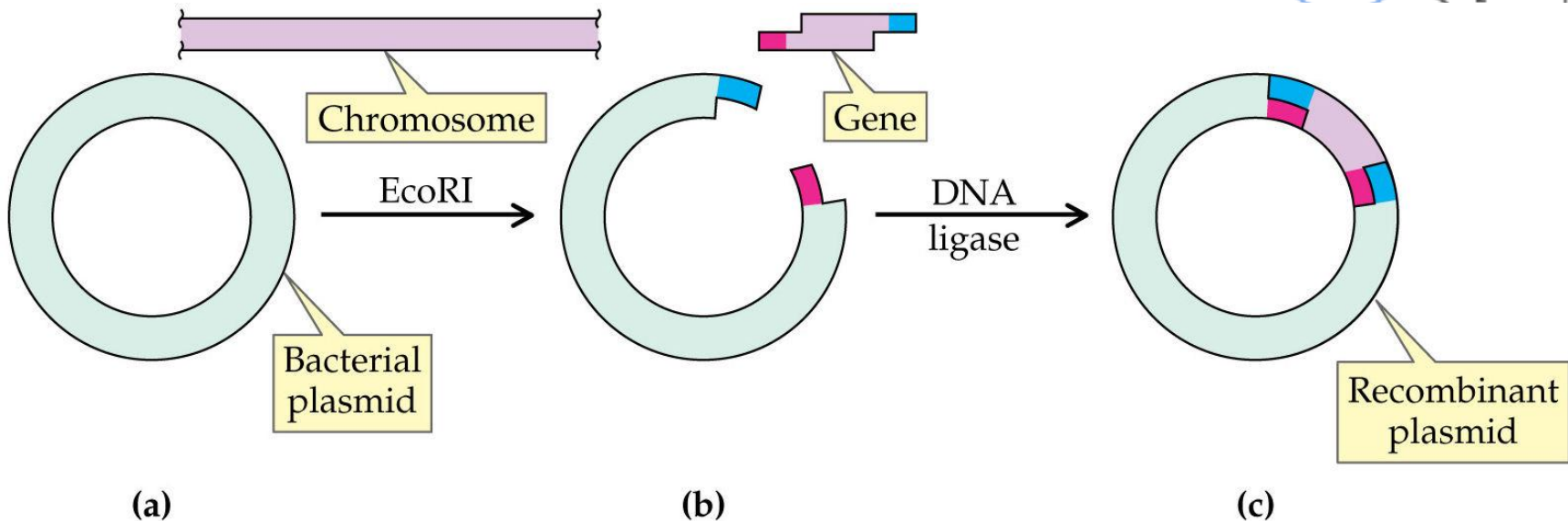
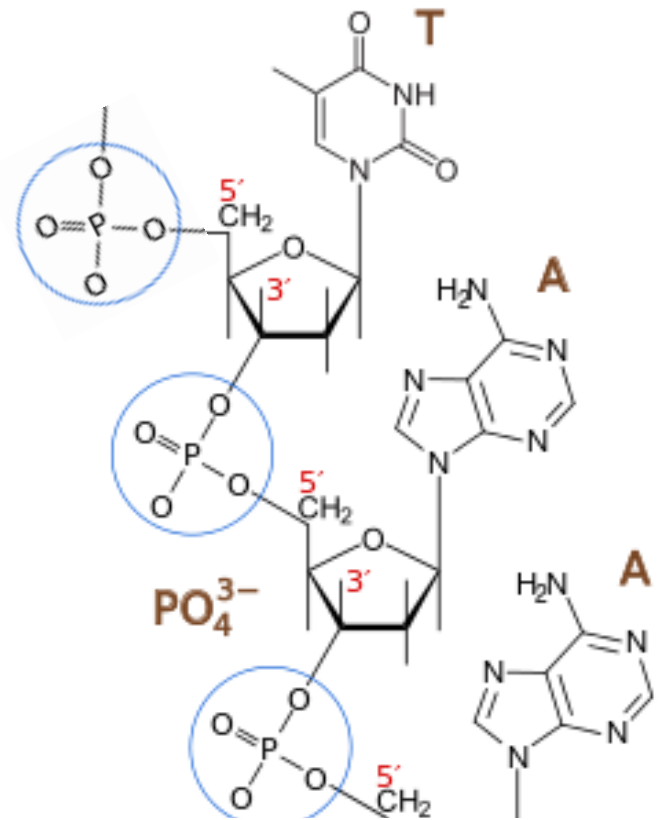
## 4. Manifesztáció + szelekció: a kívánt gén mellé egy marker (nyomjelző) gént is beépítenek (pl. antibiotikum-rezisztencia), ami segít kiválasztani azokat a sejteket, ahol megtörtént a beépülés, és „működik” a plazmid. Az adott antibiotikumot tartalmazó táptalajon csak a rezisztenciagént (azaz a plazmidot)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



# Génátvitel plazmidokkal

„Ragasztó”: a ragadós végek maguktól is összetapadnak, de a cukor-foszfát lánc összekapcsolásához kell egy enzim (T4 DNS-ligáz).

Hogyan készítünk **komplementer ragadós végeket**? → PCR reakcióval

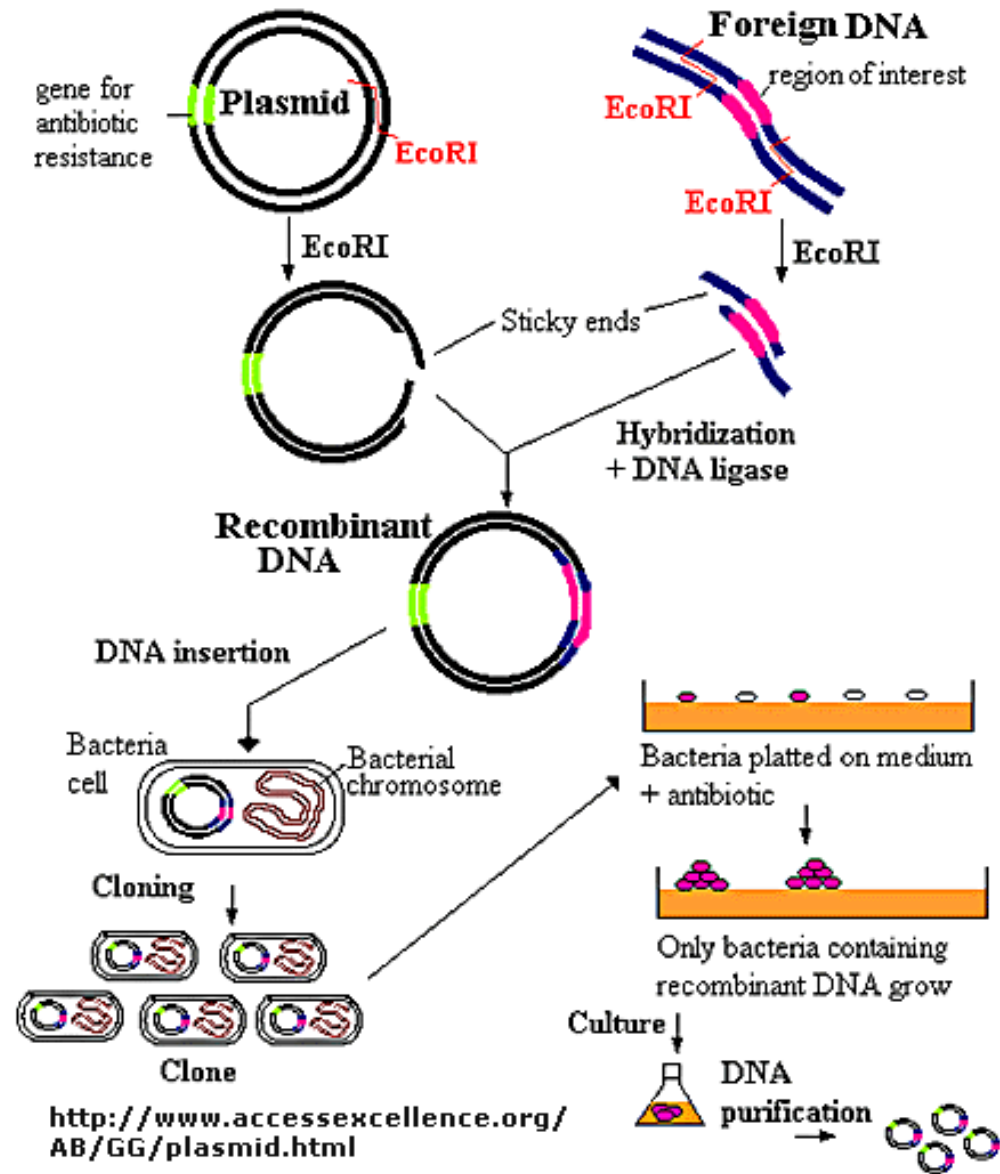


# Idegen DNS sejtbe juttatásának folyamata

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



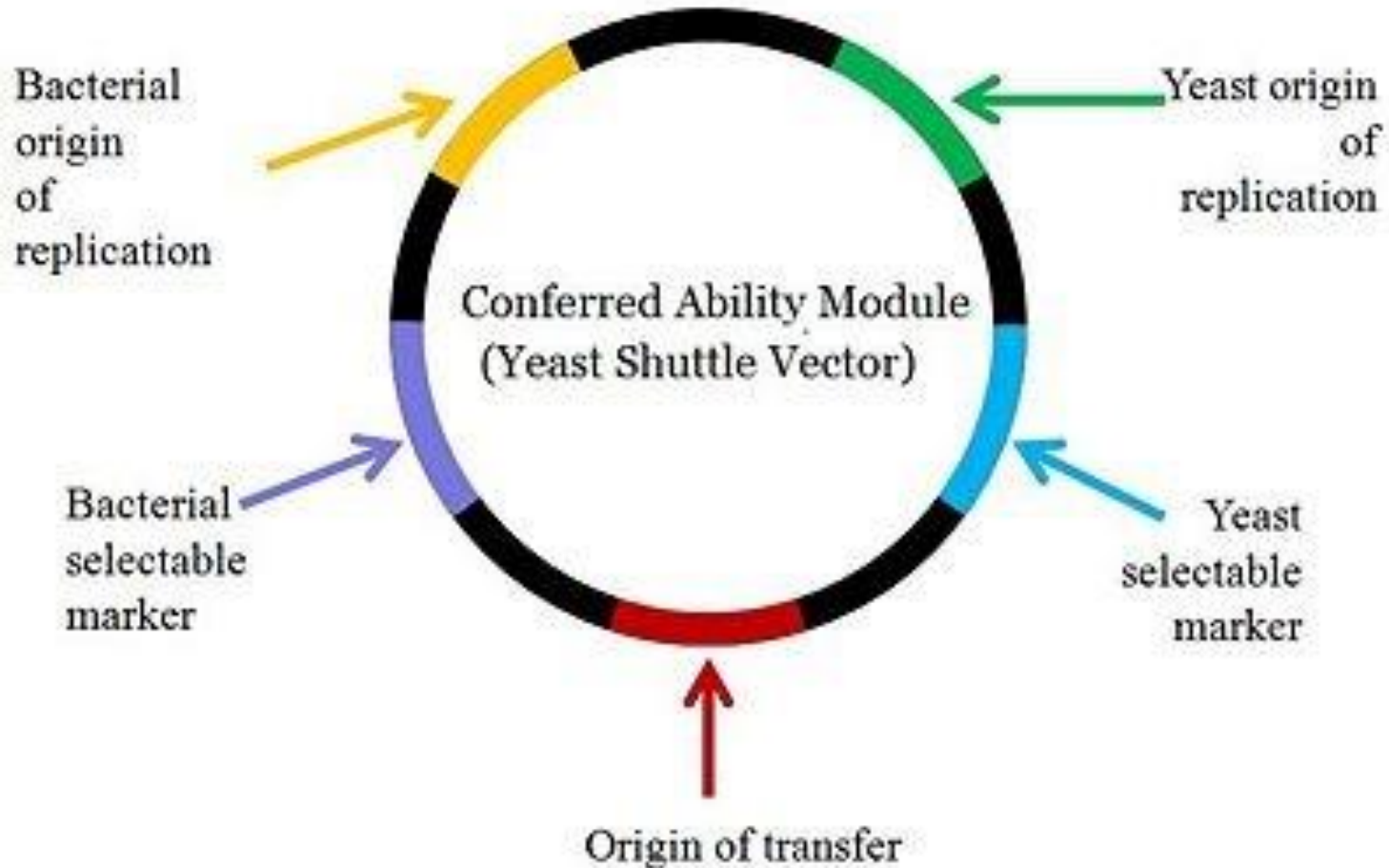
# Ingázó (shuttle) vektorok

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 hajszálgöyökér 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

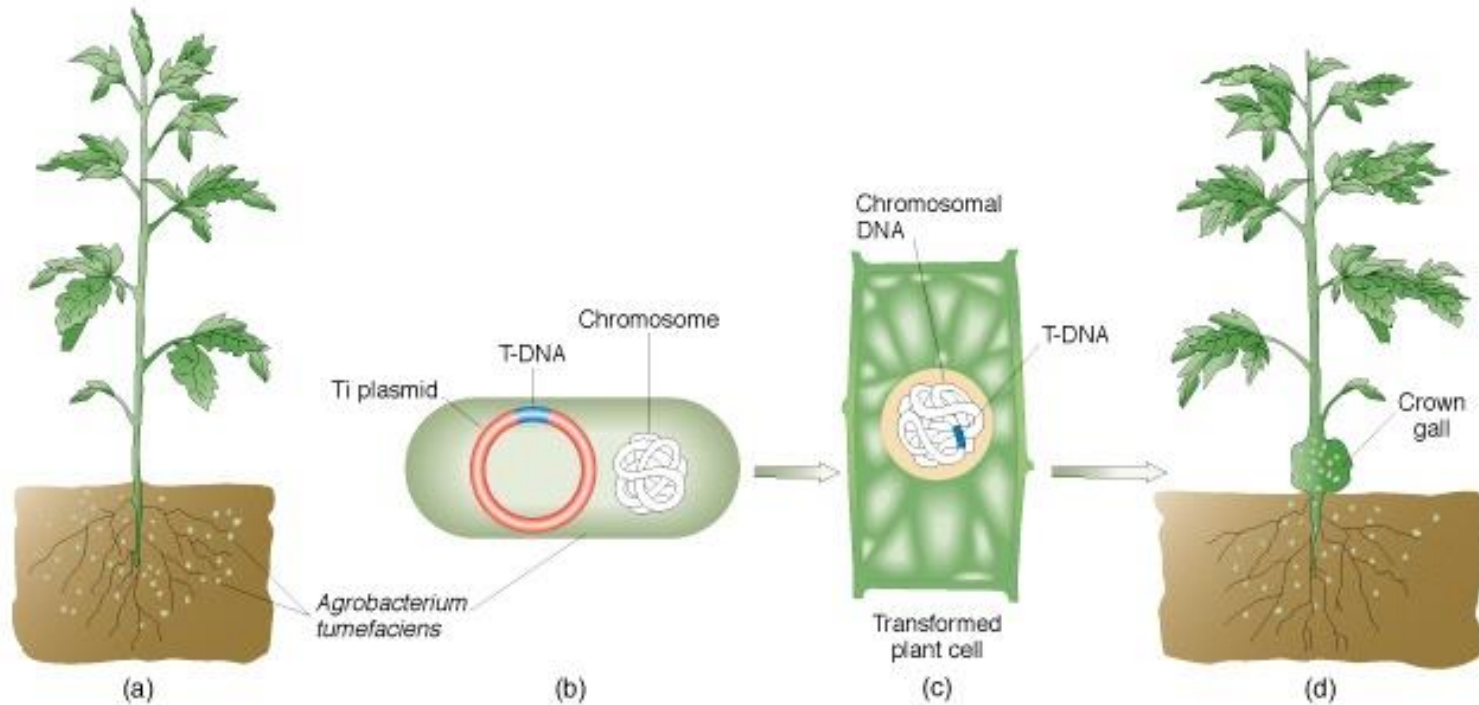
Az *Agrobacterium tumefaciens* egy Gram-negatív növénypatogén talajbaktérium, amely a kétszikű növényeket a sebzési helyeken megfertőzi és tumorokat okoz rajtuk. A baktériumok patogenitása összefügg a tumorindukáló (Ti) plazmid jelenlétével. A Ti plazmid egy része (transzfer DNS = T-DNS) a kórfolyamat során átkerül a növényi sejtbe és a sejtmag DNS-állományába integrálódik (A T-DNS régióban helyezkednek el a tumorok kialakulásáért felelős gének.)

V.ö.: HPV fertőzés  
embernél...



# Az *A. tumefaciens* fertőzés

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



# 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 gazdasejtbe a fertőzést követően, majd stabilan beépül a növényi kromoszómába.

A sejtburjánzás mellett olyan aminosav származékokat termeltet a növény, 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 gazda növények kromoszómaiba 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

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 tumorsejtől kiindulva is regenerálható szaporodóképes növény.

