

Tehnologija rekombinantne DNA

Celična biologija z genetiko
1. Letnik 2012/13



Osnove današnje DNA tehnologije

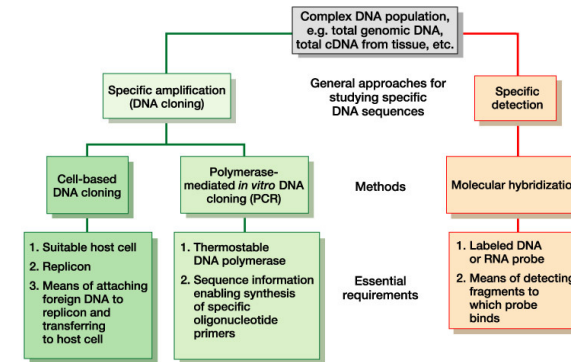


Figure 5-1 Human Molecular Genetics, 3/e. © Garland Science 2004

Kloniranje DNA

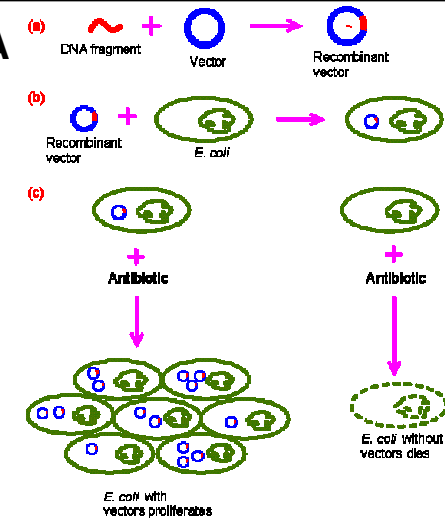
- Kloniranje DNA = **specifično pomnoževanje** določenega odseka DNA
- Poznamo dva načina pomnoževanja:
 - **Kloniranje DNA v gostiteljskih celicah** (*cell-based DNA cloning*) = *in vivo*
 - **Kloniranje DNA neodvisno od celic** (*cell-free DNA cloning*) = *in vitro* reakcija PCR



Kloniranje DNA v celicah

Poteka v štirih stopnjah:

- Prilava rekombinantne DNA** (želeni fragment vstavimo v t.i. vektor)
- Transformacija** (vnos rekombinantne DNA v gostiteljsko celico)
- Razmnoževanje celičnih klonov**
- Izolacija** rekombinantnih DNA klonov

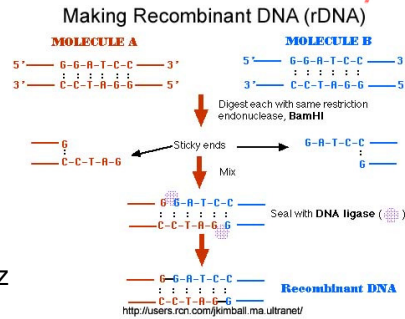


(d) Isolation of recombinant DNA clones

(a) Priprava rekombinantne DNA za kloniranje

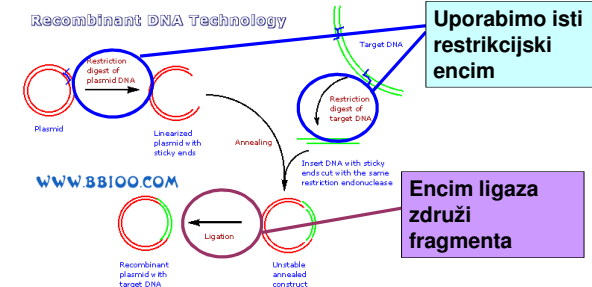
- Rekombinantna DNA molekula nastane pri **zdržitvi dveh fragmentov DNA iz različnih virov**

- DNA režemo z **restriktivnimi endonukleazami** in "lepimo" (zdržujemo) z **ligazami**



(a) Priprava rekombinantne DNA za kloniranje

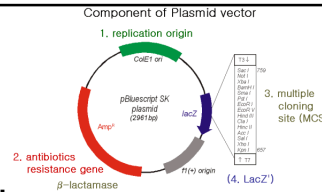
- Fragmenti DNA, ki so bili razrezani z isto restriktivno endonukleazo imajo **komplementarne lepljive konce**
- Encim **ligaza** združi fragmente DNA v eno molekulo = rekombinantna DNA
- **Želeni fragment DNA ustavimo v t.i. vektor, ki omogoča prenos v gostiteljsko celico in pomnoževanje tarčnega fragmenta v gostiteljski celici (neodvisno od gostiteljskega genoma)**



Vektorji

Značilnosti v zaporedju vektorjev:

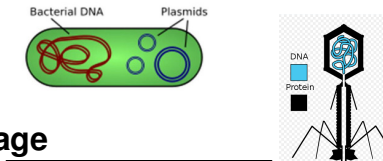
1. mesto **ORI** (mesto začetka podvojevanja) – omogoča neodvisno podvojevanje rekombinantne DNA v gostiteljski celici
2. **Selekcijski označevalci**
 - **pozitivni** = omogočajo razlikovanje gostiteljskih celic, ki so sprejele vektor od tistih, ki ga niso
 - **negativni** = omogočajo razlikovanje med gostiteljskimi celicami, ki so sprejele vektor z vstavljenim tarčnim zaporedjem DNA od tistih, ki so sprejele "prazen vektor"
3. **Mesto MSC** (multiple cloning site) = mesto znotraj negativnega selekcijskega označevalca, kamor se integrira segment DNA



Vektorji

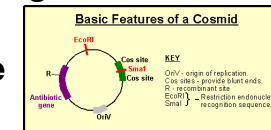
Glede na **velikost genske informacije**, ki jo lahko vnesemo v vektor, in **na kakšen način se informacija prenese v gostiteljsko celico**, ločimo:

- **Plazmide**

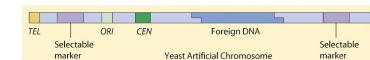


- **Bakteriofage**

- **Kozmide**

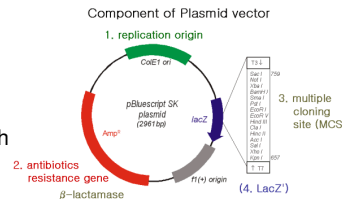
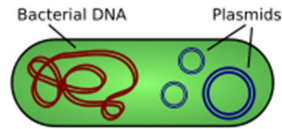


- **YAC (umetni kromosomi kvasovk)**



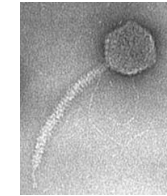
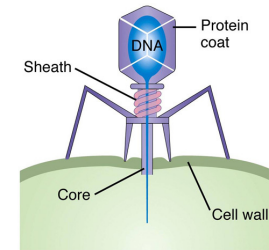
Plazmidi

- Izvenkromosomska, ciklična, dvovijačna DNA, ki je prisotna skoraj v vseh bakterijah, kvasovkah in algah (1 – 4 Mbp)
- Podvojujejo se neodvisno od centralnega genoma
- Naloge plazmidov:
 - Sodelujejo pri metabolizmu
 - Nosijo genetsko informacijo za različne produkte (antibiotiki, toksini)
 - Sodelujejo pri izmenjavi genetskih informacij med organizmi (s procesom konjugacije)



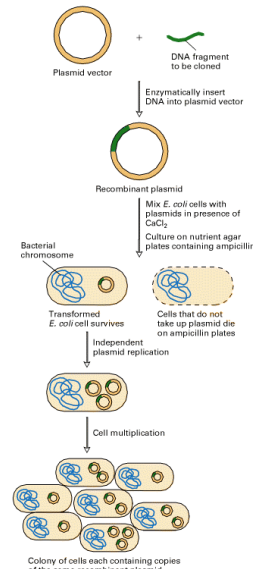
Bakteriofagi

- Bakterijski virusi
- Svojo DNA "vbrizgajo" v bakterijo in jo znotraj bakterije pomnožujejo (za pomnoževanje izkoriščajo replikacijske mehanizme bakterije)



Gostiteljske celice

- Večinoma se uporabljajo modificirane **bakterijske celice** ali **celice gliv** (ker se hitro delijo)
- Rekombinantna DNA (npr. vstavljena v plazmid) se pomnožuje neodvisno od genoma gostiteljske celice in se lahko v enem celičnem ciklu gostiteljske celice večkrat pomnoži



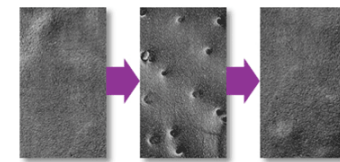
(b) Vnos rekombinantne DNA v gostiteljsko celico = transformacija

- Kemijske metode:** s CaCl_2 + ustrezna T
- Fizikalne metode:** mikroinjiciranje, elektroporacija, biolistika ("gene gun"), itd.



MIKROINJICIRANJE

The phenomenon of electroporation



- Controlled, millisecond electrical pulses induce temporary pores in the cell membrane
- Cell membrane reseals and is left unharmed

(c) Razmnoževanje gostiteljskih celic in selekcija pozitivnih klonov



- Po transformaciji celice razmažemo na **seleksijsko gojišče** in pustimo rasti na 37°C 24h
- Selekcijo je potrebno izvesti, ker:
 - Vse gostiteljske celice ne sprejmejo vektorja
 - Vsi vektorji ne vsebujejo tarčnega zaporedja DNA ("prazni vektorji")



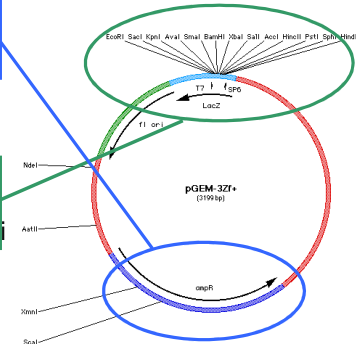
Primer selekcije pozitivnih klonov - modro-beli test (I)

- Vektor = plazmid**

(vsebuje zaporedje, ki omogoči rezistenco bakterij na antibiotik)

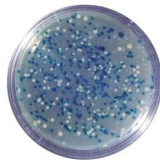
- gostiteljska celica = bakterija**

- MSC mesto** je znotraj gena za β -galaktozidazo (gen Lac Z) → če se vstavi tarčni DNA segment znotraj tega gena → nefunkcionalna galaktozidaza



Primer selekcije pozitivnih klonov - modro-beli test (II)

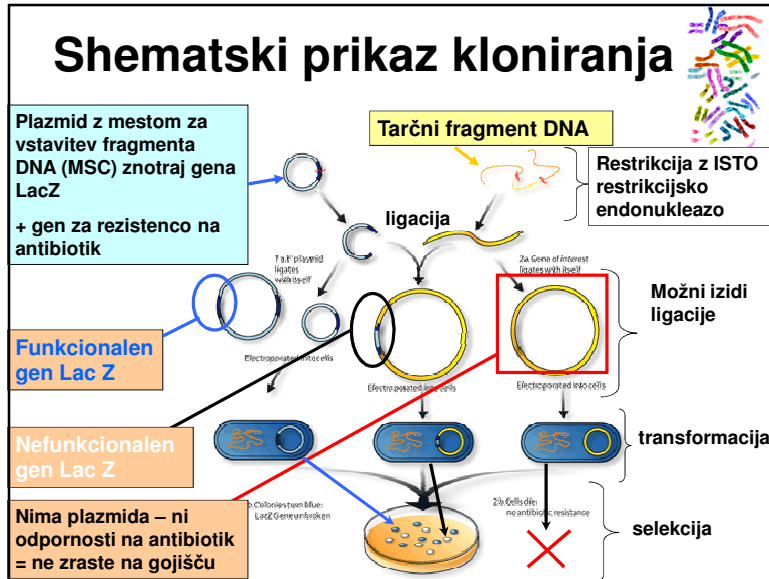
- V gojišču je prisoten **antibiotik** (ampicilin) → namnožijo se le tiste kolonije bakterij, ki so sprejele vektor (so rezistentne!) = **pozitivna selekcija**
- V gojišču je prisoten tudi substrat za β -galaktozidazo (tvori moder produkt) → moder produkt se tvori le pri bakterijah, ki so sprejele prazen vektor = **negativna selekcija**
- Bele kolonije, ki zrastejo na gojišču vsebujejo tarčni segment DNA**



(d) Izolacija rekombinantnih DNA klonov

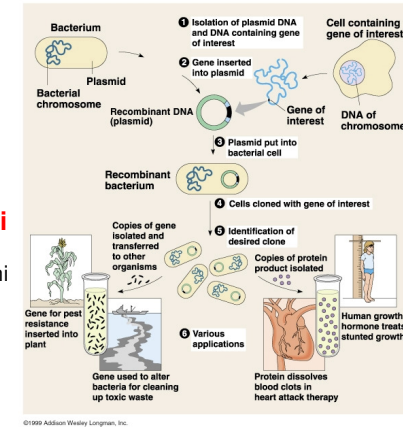


- Po uspešni selekciji, kolonijo iz trdega gojišča nacepimo in pripravimo tekočo kulturo celic
- Iz bakterijskih celic izoliramo plazmid z vstavljenim tarčnim DNA zaporedjem
- Zaradi klonalnega pomnoževanja pozitivne kolonije, se namnoži tudi plazmid in s tem tarčna DNA



Ekspresijsko kloniranje

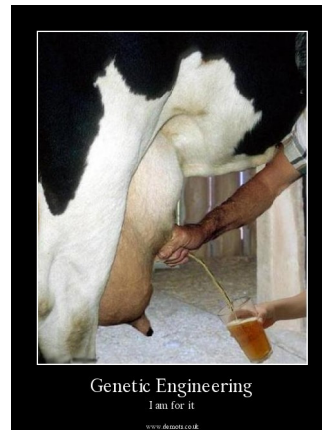
- Kloniranje namenjeno izražanju (ekspresiji) proteinskega produkta določenega gena
- Gostiteljske celice = **ekspresijski sistemi**
- **Namenjeno je biosintezi proteinov:**
 - Prehranski dodatki, encimi
 - Biološka zdravila (rekombinantni proteini: inzulin, eritropoetin, itd.)



- **Rekombinantna DNA tehnologija:** postopki za združevanje dveh DNA molekul različnega porekla (heterolognih DNA molekul), nastalih običajno kot rezultat *in vitro* spajanja (z encimom ligazo) DNA različnih organizmov.

- **Genetsko inženirstvo:** Je popularen izraz, ki ga uporabljajo za opisovanje *in vitro* metod manipulacije z DNA, z namenom izdelati nove kombinacije genov ali spremeniti sekvence.

Razlaga pojmov



Biotehnologija

- Integrirana uporaba molekularno-bioloških in inženirskih znanj za gospodarsko uporabo organizmov, njihovih delov in proizvodov
- Bolj enostavno rečeno je biotehnologija **uporaba živih organizmov, celic (biokultur) in njihovih delov za proizvodnjo človeku ali okolju koristnih produktov**, npr: jabolčnik, jogurt, sir s plemenito plesnijo, vzhajan kruh, penicilin, alkohol, insulin, itd.)

Več vrst – glede na namembnost:

1. Farmacevtska biotehnologija
2. Živilska biotehnologija
3. Rastlinska biotehnologija
4. Živalska biotehnologija
5. Mikrobnna biotehnologija
6. Medicinska biotehnologija
7. Okoljevarstvena biotehnologija



Kaj vse omogoča biotehnologija?

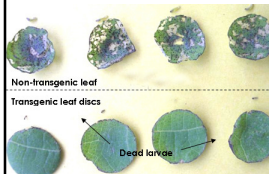


1. Poceni produkcija farmacevtskih učinkovin v rastlinah (molecular farming)

2. Prehrabene in industrijske rastline z zaželenimi lastnostmi: zlati riž (golden rice) z večjo vsebnostjo beta-karotena, kava z manjšo vsebnostjo kofeina, paradižnik z večjo vsebnostjo antioksidantov, krompir z večjo vsebnostjo proteinov, topoli z manjšo vsebnostjo lignina,...



3. Prehrabene in industrijske rastline odporne proti škodljivcem: Bt koruza, riž in bombaž

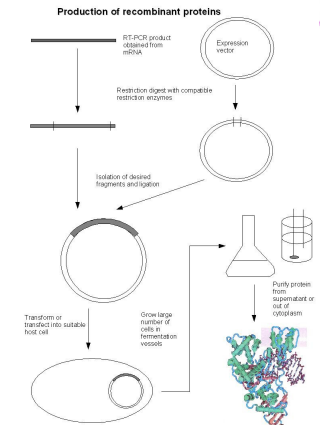


4. Vakcinacija s pomočjo prehrabnih rastlin: Banane (cepivo za hepatitis B, otroško paralizo, kolero), krompir (cepivo za rak na materničnem vratu)

Rekombinantni proteini

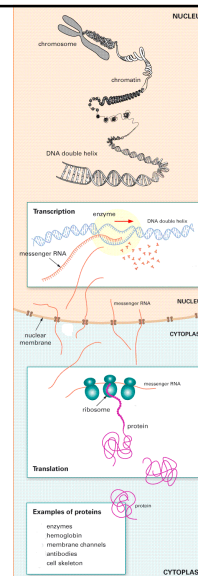


- Proteini, pridobljeni z **rekombinantno DNA tehnologijo** – v ustreznih **ekspresijskih sistemih**
- Za **raziskovalne namene** (npr. določanje funkcije gena oz. proteina)
- Za **industrijske namene**: industrijski encimi, zdravila, izboljšava lastnosti rastlin in živali, itd...



Izražanje rekombinantnih proteinov

- Potrebujemo **enostaven ekspresijski sistem**, v katerem se **gen učinkovito prepíše** in ustrezni **protein sintetizira v velikih količinah**
- Kot ekspresijski sistemi so primerni organizmi, ki so **genetsko dobro raziskani** in **enostavni za gojenje** (npr. E. coli)



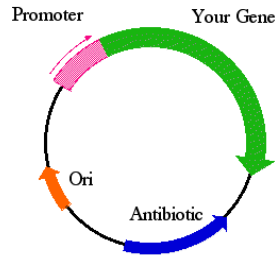
Izražanje gena v ekspresijskem sistemu (I)



- Proučevani gen iz istega organizma = **homologni ekspresijski sistem**
- Proučevani gen iz tujega organizma = **heterologni ekspresijski sistem**
- Večino genov danes izražamo v heterolognih eks. sistemih (predvsem za pridobivanje večjih količin kot v izvornem organizmu)
- Za izražanje sta primerna tako fragment **genomske DNA** kot **cDNA** (prokariotski genom nima intronov – primerna le cDNA!)

Izražanje gena v ekspresijskem sistemu (II)

- Fragment genomske DNA ali cDNA vstavimo v **specializiran vektor**, primeren za izražanje gena
- Običajno **plazmidni vektorji**, ki imajo v svojem zaporedju:
 - **ORI**, mesto **MCS**, gen za **rezistenco na antibiotik**
 - Regije, potrebne za **učinkovito transkripcijo in translacijo** vstavljenega tarčnega gena: močan **promotor**, tarčni gen mora imeti **kodon za začetek translacije, stop kodon**
- Želeni gen vstavimo v primeren vektor in nato vektor vnesemo v živo celico (ekspresijski sistem)



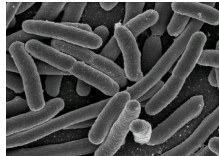
Izbira ekspresijskega sistema

- Zahtevnost priprave
- Ekonomska dostopnost
- Donos proteina
- Možnost posttranslacijskih modifikacij (prokariotske celice niso sposobne posttranslacijskih modifikacij!)
- Način izolacije proteina iz organizma (npr. pri bakterijah se lahko protein kopiči v citoplazmi, periplazmi ali se izloča v gojišče)

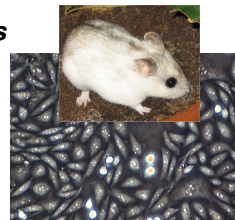
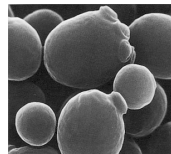


Primeri ekspresijskih sistemov

E. coli

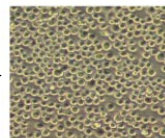


Saccharomyces cerevisiae

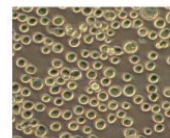


Celice CHO

Spodoptera frugiperda



Uninfected insect cells



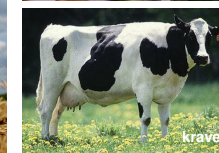
Insect cells infected with recombinant Baculovirus

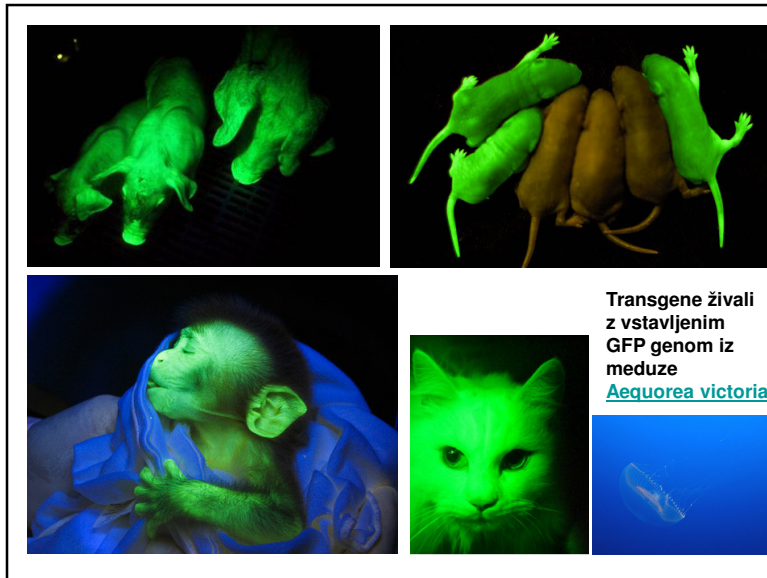
Vnos tarčnega gena z BEVS (baculovirus expression vector system)

Celice iz jajčnika gosenice (ali bube) metulja

Primeri ekspresijskih sistemov

Transgene rastline in živali:





Prvi transgeni hišni ljubljeneček: GloFish®



Original:
zebrafish (*Danio rerio*)



Zebrafish z vstavljenimi geni za fluorescirajoče proteine = GloFish®

Rekombinantna DNA tehnologija na živalih

- **Transgene živali:** vnos izbranega gena v oplojeno jajčece (za raziskovanje funkcije proteina, ekspresijo proteina med procesom diferenciacije, ali za proizvodnjo proteina)
- **Miši z izbitim genom (*Knockout mice*):** tarčni gen nadomestimo z nefunkcionalno različico
- **Genska terapija:** vnos "normalnega", zdravega gena, ki nadomesti okvarjen (mutiran) gen
- **Klonirana žival:** razvoj živali z identičnim genotipom (ovca Dolly)

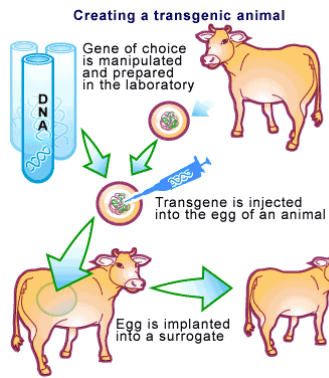


Kako kloniramo žival?

- <http://abcnews.go.com/GMA/video/pet-cloning-animal-15338125>
- http://hstalks.com/main/view_talk.php?t=121&r=18&c=252

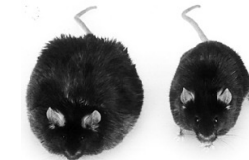
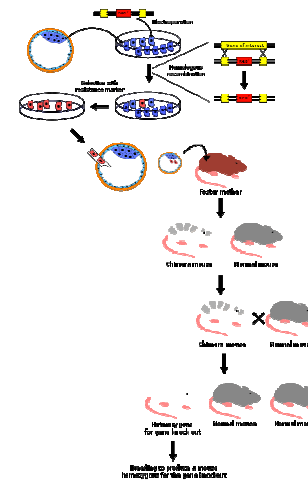


Kako nastane transgena žival?



- Vnos tarčnega gena z **mikroinjiciranjem** rekombinantne DNA v oplojeno jajčno celico (vnos je naključen – če se vključi znotraj pomembnega gena bo zarodek odmrli)
- **Implantacija oplojenega jajčeca** v maternico “nadomestne matere”
- Mladiček bo genetsko spremenjen – transgena žival

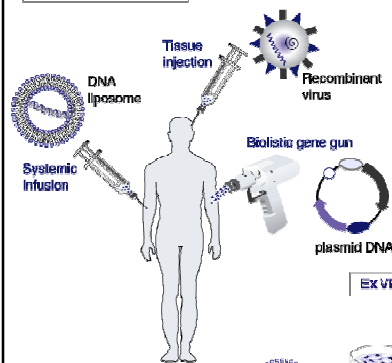
Kako nastane žival z izbitim genom?



Gen za leptin knock-out WT

1. Originalno (WT) zaporedje DNA spremenimo tako, da ni več funkcionalno in ga vstavimo v zarodne celice mišjega embria.
2. Po selekciji celic, kjer je prišlo do vnosa spremenjenega zaporedja, le-te vnesemo v drug mišji embrio (nastane himer).
3. Embrio vstavimo v nadomestno mater. Himerne mladičke križamo med seboj, da dobimo miši z eno vrsto celic, ki so heterozigotne za izbiti gen.
4. 25% potomcev heterozigotnih miši bo homozigotnih za izbiti gen = **knock out miši**.

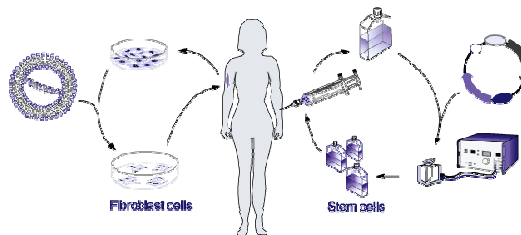
In Vivo Gene Therapy



Genetska terapija

Vnos genskega materiala z namenom zdravljenja bolezni, kjer nefunkcionalen gen nadomestimo s funkcionalnim.

Ex vivo Gene Therapy



Genetska terapija je dovoljena samo na somatskih celicah!

Ali je uporaba transgenih živali

etična?



"IF YOU'D LIKE TO, YOU CAN DISCUSS THE QUESTION OF EATING GENETICALLY-MODIFIED FOOD WITH OUR STAFF ETHICIST."