

Kolegij Molekularna biologija

METODE MOLEKULARNE BIOLOGIJE II: Tehnologija rekombinantne DNA

dr. sc. Gordana Maravić
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

GM
2004

- Važnost tehnologije rekombinantne DNA
- Alati za manipulaciju molekulama DNA (vektori, enzimi, stanice domaćina)
- Principi molekularnog kloniranja
- Primjena – analiza genske funkcije *in vivo* i *in vitro*

GM
2004

DOBIVANJE DNA

- **Izolacija DNA iz stanica**
 - umnažanje odabranog odsječka DNA metodom PCR (*engl. polymerase chain reaction*)
 - dobivanje odsječaka DNA kidanjem DNA restrikcijskim enzimima
- **Izolacija mRNA**
 - prevođenje odabrane mRNA u cDNA (*engl. copy DNA*) metodom RT-PCR (*engl. reverse transcription polymerase chain reaction*)
- **Sinteza oligonukleotida (DNA)**

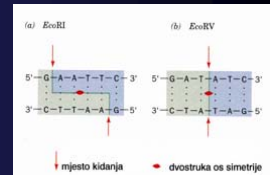
GM
2004

Restrikcijske endonukleaze

- enzimi koji prepoznaju točno određeni slijed nukleotida od 4 do 8 baza u dvolančanoj DNA i kidaju oba lanca dvostruke uzvojnice
- TIP II - kidaju DNA unutar samog mjesta prepoznavanja koje ima dvostruku rotacijsku simetriju (palindrom)
- dio restrikcijsko-modifikacijskog sustava bakterija za zaštitu od strane DNA

NOMENKLATURA:

EcoRI: *Escherichia coli* RY13;
I - prva izolirana RE



GM
2004

VEKTORI ZA KLONIRANJE

- Plazmidi
- Bakteriofagi
- Kozmidi
- Umjetni kromosomi
- Obilježja:
 - niska molekulska masa (2-40 kb)
 - selektivni biljag za otkrivanje u stanici domaćinu
 - veliki broj jedinstvenih restrikcijskih mjesta za ugradnju strane DNA

GM
2004

UVOĐENJE DNA U STANICU DOMAĆINA

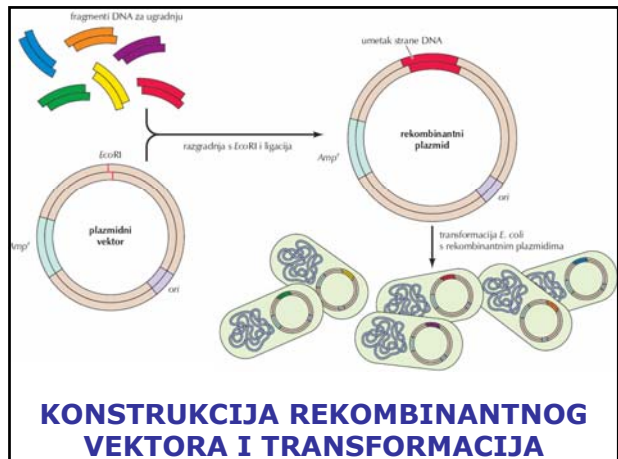
- **TRANSFORMACIJA** – proces prijenosa gole DNA u bakterije
- **TRANSFEKCIJA** – unos DNA u animalne stanice
- **MIKROINJEKTIRANJE** – prijenos DNA u animalne stanice uporabom mikropipeta

GM
2004

OSNOVNI PRINCIP KLONIRANJA

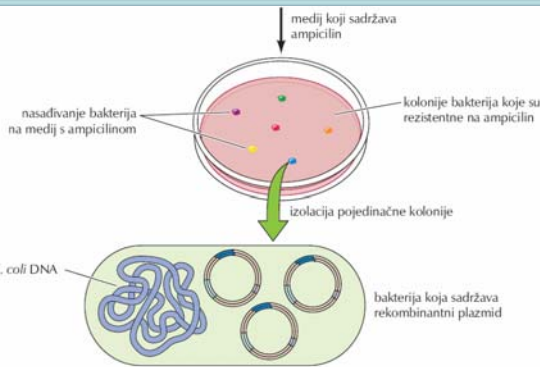
- odabrani odsječak DNA uvodi se u molekulu DNA koja se replicira neovisno o replikaciji genoma stanice (**vektor**)
- **rekombinantna (kimerna) molekula DNA unosi se u odgovarajuću stanicu domaćina (*Escherichia coli*; *Saccharomyces cerevisiae*; kultura stanica)**
- **umnožavanjem stanica domaćina dobiva se velika količina kloniranog gena**
- **ukoliko vektor sadrži odgovarajuće kontrolne elemente za sintezu RNA i proteina, stanica domaćina može proizvesti velike količine RNA i proteina kodiranih kloniranim genom**

GM 2004



KONSTRUKCIJA REKOMBINANTNOG VEKTORA I TRANSFORMACIJA

KONSTRUKCIJA REKOMBINANTNOG VEKTORA I TRANSFORMACIJA



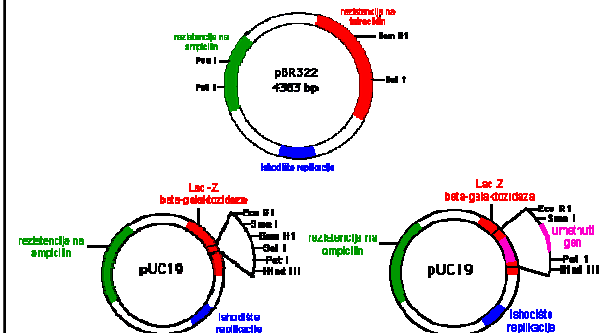
GM 2004

Vektori - plazmidi

- kružne, izvankromosomske, dvolančane molekule DNA
- **veličina: 1-200 kb**
- **sadrže vlastito ishodište replikacije**
- **daju stanici korisna svojstva:**
 - rezistencija na antibiotike
 - rezistencija na teške metale
 - proizvodnja toksina i dr.
- **za kloniranje fragmenata do ~10 kb**
- **plazmidi koji se koriste u molekularnom kloniranju: sadrže višestruka mjesta za kloniranje (*engl.* multiple cloning site)**
- **kreirani su kombiniranjem fragmenata različitih plazmida**

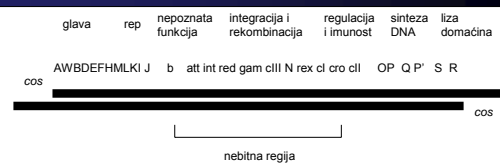
GM 2004

Primjeri plazmida



Vektori - bakteriofagi

- virusi koji inficiraju bakterije
- **bakteriofag λ - za kloniranje fragmenata DNA do 16 kb**
- **središnja regija genoma nije potrebna za infekciju stanice domaćina - zamjenjuje se stranom DNA**



GM 2004

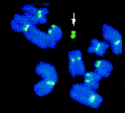
Vektori - kozmidi

- plazmidi koji sadrže 2 *cos* mjesta bakteriofaga λ
- *cos* mjesto - slijed od 14 pb potreban za pakiranje DNA u glavu bakteriofaga
- za kloniranje fragmenata do 49 kb
- nemaju gene bakteriofaga pa se po unosu u stanicu domaćina ponašaju kao plazmidi

GM 2004

Vektori – umjetni kromosomi

- Vektori za kloniranje velikih fragmenata DNA
- PAC (P1 artificial chromosome) – kao plazmid
- BAC (bacterial artificial chromosome) – kao plazmid
- YAC (yeast artificial chromosome)
 - linearan osječak DNA koji sadrži sve elemente za replikaciju
 - ishodište replikacije ARS (*engl.* autonomously replicating sequence)
 - centromera - dio kromosoma za koji se vežu niti diobenog vretena tijekom mitoze i mejoze
 - telomere - krajevi linearnih kromosoma koji omogućuju njihovu replikaciju



GM 2004

Tablica 3-3. Vektori za kloniranje velikih fragmenata DNA

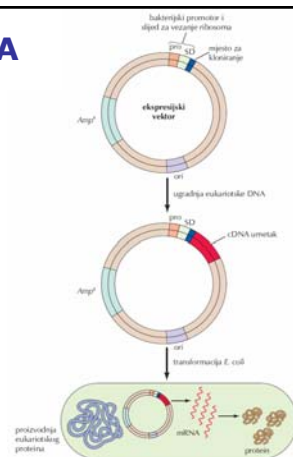
Vektor	Veličina fragmenata (kb)	Stanica domaćin
Kozmidi	30–45	<i>E. coli</i>
Bakteriofag P1	70–100	<i>E. coli</i>
P1 umjetni kromosomi (PAC)	130–150	<i>E. coli</i>
Bakterijski umjetni kromosomi (BAC)	120–300	<i>E. coli</i>
Kvašćev umjetni kromosom (YAC)	250–400	kvasac

PROIZVODNJA PROTEINA

- gen se klonira u tzv. *ekspresijski vektor* (sadrži kontrolne sljedove za transkripciju i translaciju)
- uz jaki promotor proizvodnja proteina u stanici domaćinu može biti čak do 30% veća od normalne (*prekomjerna ekspresija*) – eksprimirani produkt može predstavljati i do 10% ukupnih proteina stanice

GM 2004

PROIZVODNJA PROTEINA



GM 2004

PROIZVODNJA PROTEINA

PROBLEM:

- kloniranje eukariotskih gena u prokariotsku stanicu domaćina:
 - bakterija ne prepoznaje eukariotske kontrolne elemente za sintezu RNA i proteina
 - eukariotski geni sadrže introne, a prokariotski ne - bakterija ne može izrezati introne
 - bakterija nema posttranslacijsku modifikaciju proteina
 - bakterijske proteaze mogu razgraditi eukariotske proteine

GM 2004

PROIZVODNJA PROTEINA

RJEŠENJE:

- kloniranje dijela eukariotskog gena koji kodira za protein pod kontrolu bakterijskih regulatornih elemenata
- kloniranje cDNA da bi se izbjegli introni
- kloniranje u tzv. *shuttle* vektore pogodne za umnožavanje u prokariotskim i eukariotskim stanicama (npr. bakterija i kvasac)
- ekspresija proteina

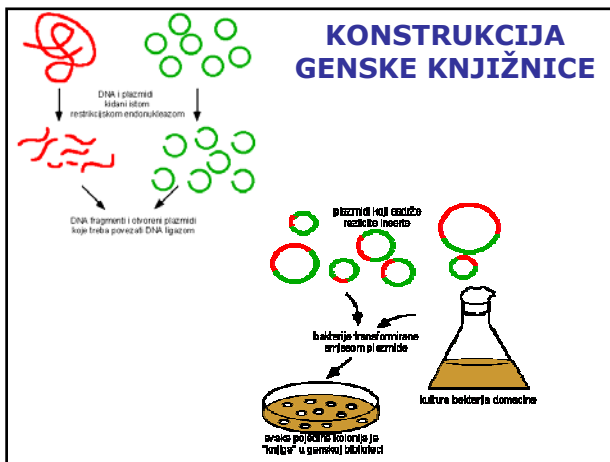
GM 2004

GENSKE KNJIŽNICE

- **GENOMSKA KNJIŽNICA**
 - zbirka kloniranih fragmenata DNA dobivenih klanjanjem ukupne genomske DNA organizma restrikcijskim enzimima
- **cDNA KNJIŽNICA**
 - zbirka kloniranih fragmenata cDNA dobivene reverznom transkripcijom ukupne mRNA organizma
 - biblioteka je dovoljno velika da s velikom vjerojatnošću sadrži svaki gen prisutan u genomu
- **PRETRAŽIVANJE**
 - hibridizacija *in situ*
 - kao proba može poslužiti:
 - mRNA
 - sintetski oligonukleotid
- **EKSPRESIJSKA KNJIŽNICA**
 - pretraživanje - Western blot sa specifičnim protutijelom

GM 2004

KONSTRUKCIJA GENSKE KNJIŽNICE

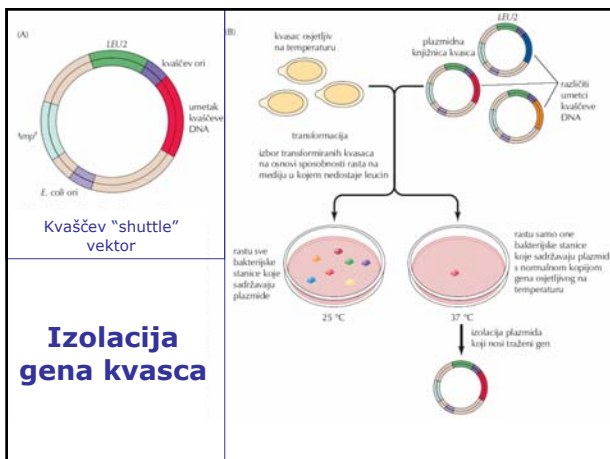


Analiza genske funkcije u eukariotima

Genetičke analize u kvascima

- Utvrđivanje funkcije gena na temelju promijenjenog fenotipa
- U kvascu je lako izolirati mutante kao i u bakterijama
- Komplementacija defekta u temperaturno osjetljivim i drugim mutanatima otkriva pojedinačni gen koji je odgovoran za promijenjeni fenotip - izolacija pojedinačnog gena iz DNA knjižnice

GM 2004



Analiza genske funkcije u eukariotima

- **Prijenos gena u životinje**
 - transfekcija, mikroinjektiranje
 - nije jednostavan proces kao u bakterija i kvasaca
 - u većini stanica prolazna ekspresija - unešena DNA se u jezgri prepisuje samo nekoliko dana
 - samo 1% stanica - ugradnja strane DNA u genom - izolacija stabilno transformiranih stanica uz antibiotik
- **Prijenos gena u biljke - unos plazmida u bakteriju *Agrobacterium tumefaciens* kojim se inficiraju biljne stanice u kulturi**

GM 2004

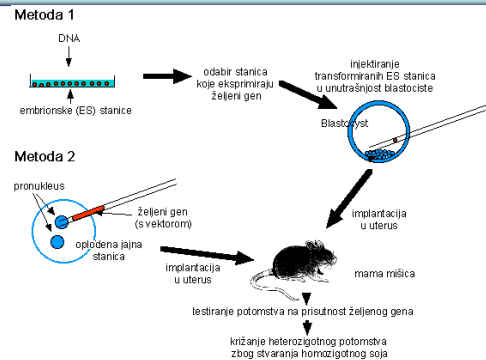
TRANSGENSKJE ŽIVOTINJE

- životinje čiji kromosomi sadrže stabilno integrirane kopije gena ili genske konstrukte koji potječu od drugih organizama, odnosno, izvorno se ne nalaze u toj životinji
- uvođenje strane DNA u oocite ili embrije (blastociste)
 - mikroinjektiranje linearne DNA u pronukleus
 - prijenos embrionskih stanica u blastocistu



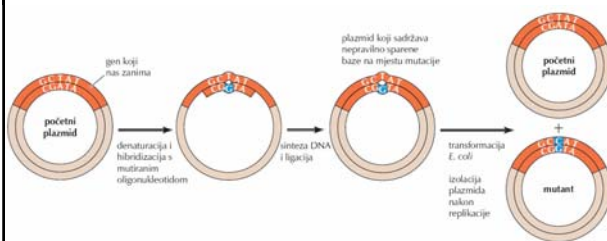
GM 2004

STVARANJE TRANSGENSKIH ŽIVOTINJA

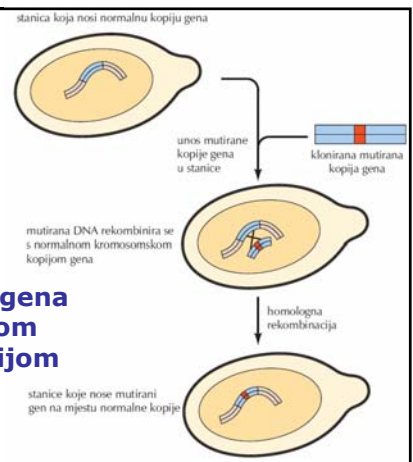


GM 2004

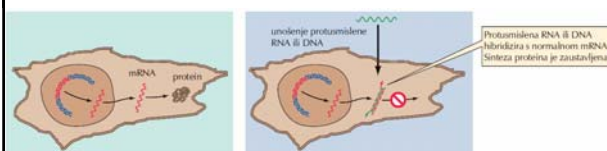
Mutageniza klonirane DNA



Inaktivacija gena homolognom rekombinacijom

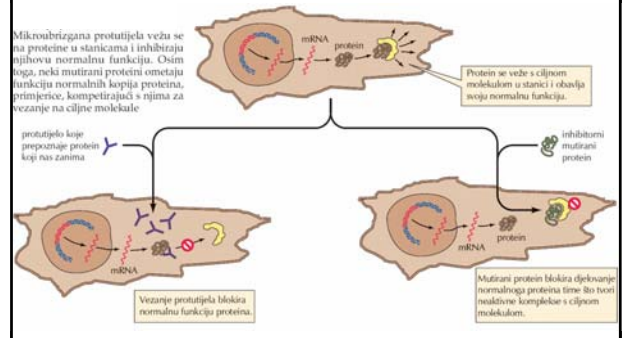


Inhibicija ekspresije gena protusmislenu RNA ili DNA



Protusmislenu RNA ili jednolančana DNA komplementarna je s molekulom mRNA ciljnog gena – stvaranje hibrida s mRNA blokira transkripciju i rezultira razgradnjom mRNA

Izravna inhibicija funkcije proteina



PRIMJENE TEHNOLOGIJE REKOMBINANTNE DNA

- Inzulin (→ diabetes)
- Eritropoetin (→ anemija)
- Somatotropin (→ deficijencija rasta)
- Faktor VIII (→ hemofilija)
- α -, β -, γ -interferoni (→ imunomodulatori, tumori, virusne infekcije, multipla skleroza)
- Interleukin-2 (→ imunomodulator)
- Faktor koji stimulira granulocite i makrofage i faktor koji stimulira granulocite (→ kemoterapija, povećavaju otpornost prema infekcijama, nakon transplantacije koštane srži kod leukemija, ...)
- Aktivator tkivnog plazminogena
- Epidermalni faktor rasta (→ zarastanje rana, opekotina, čireva)
- Prourokinaza (→ antikoagulans kod srčanog udara)
- Monoklonska protutijela
- Cjepiva (→ HBV, DaTP, HAV, Lyme disease, rotavirus...)
- Proteini koštane morfogeneze (→ lomovi kostiju, rekonstruktivna kirurgija)

GM 2004

PRIMJENE TEHNOLOGIJE REKOMBINANTNE DNA

- Geni koji čine bakterije toksičnima za pojedine insekte prenijeti su u bakterije koje žive na korijenima biljaka
- Stvaranje novih sojeva mikroorganizama sa sposobnošću:
 - razgradnje pojedinih štetnih tvari
 - ekstrakcije metala iz ruda
 - stvaranja etanola iz celuloznog otpada
 - pročišćavanja otpadnih voda
 - poboljšanja industrijske fermentacije
 - stvaranja različitih enzima i drugih korisnih spojeva

GM 2004

PRIMJENE TEHNOLOGIJE REKOMBINANTNE DNA

- Određivanje uloge određenog proteina
- Razvojna genetika sisavaca
- Analiza regulacije genske ekspresije

GENSKA TERAPIJA

- poremećaji SŽS, jetre, koštane srži, tumori...
- deficijencije hormona, enzima i koagulirajućih faktora...
- unošenje nemutiranih gena
- unošenje DNA ili RNA koje će onemogućiti ekspresiju mutiranih štetnih gena (*engl. antisense genetics*)

GM 2004

PRIMJERI TRANSGENSKIH ŽIVOTINJA

- **Herman**
 - govedo u koje je unesen gen za humani laktoferin (injektiran u oplodenu jajnu stanicu)
- **Dolly**
 - 1997.
 - uklonjena je jezgra iz neoplođenog jajeta, stanica je fuzionirana sa stanicom odrasle ovce i implantirana u uterus
- **Polly**
 - = Dolly + gen za faktor IX

GM 2004