

Géntechnológiai módszerek



Géntechnológia

- = *génsebészet*, „*genetic engineering*”
- Lehetővé teszi az élőlények egyes tulajdonságait meghatározó gének azonosítását,
- Megismerhetjük az egyes élőlények teljes genetikai állományát (**DNS szekvenálás**)
- **Irányított mutációkat** hozhatunk létre, eltávolíthatunk egyes géneket de újakat is adhatunk a genetikai állományhoz
- Géneket „átültethetünk” más organizmusokba (kód univerzális), ahol megtörténhet a bevitt szekvencia transzkripciója és transzlációja, ez használható fehérjék termelésére (**heterológ fehérje expresszió**)
- Az eredetitől eltérő funkciót vagy aktivitást is „hozzárendelhetünk” egy fehérjéhez (**fehérjemérnökség**, „**protein engineering**”)
- Lehetőség van saját sejtjeinkbe új genetikai információt bejuttatni bizonyos betegségek gyógyítása érdekében (**génterápia**)

Rekombináns DNS technológia

- Ahhoz hogy ezeket a technikákat gyakorlatban alkalmazni lehessen, rekombináns DNS-re van szükség
- **A rekombináns DNS egy hordozó DNS molekulából (vektor) és a vizsgálni kívánt DNS-ből (inzert) álló „hibrid” (kiméra) molekula, melyeket molekuláris klónozással állítunk elő**

Rekombináns DNS = vektor DNS + inzert DNS

- A **molekuláris klónozás** egy specifikus inzertet tartalmazó rekombináns DNS felszaporítása megfelelő gazdasejtben (pl. *E. coli*). Ezeknek a sejteknek a klónjaiból (bakteriális kolóniák) izolálhatjuk a molekuláris klón rekombináns DNS-t
- Létezik *in vitro* DNS szaporítási módszer is, a polimeráz láncreakció (PCR), azonban ezzel a módszerrel szigorúan véve nem molekuláris klónokat állítunk elő

Inzertek

- Típusai:
 - Gén: egy fehérje teljes génje (ezt használjuk, ha a gént akarjuk vizsgálni)
 - Génfragmens
 - cDNS (*complementary* - komplementer DNS): az mRNS-ről reverz transzkriptázzal készített másolat (ezt használjuk ha fehérjét akarunk expresszálni)

Inzertek

- A vizsgálandó DNS-szakasz több helyről is származhat:
 - Ha nem ismerjük a vizsgálni kívánt gént pl. cDNS-tárat kell létrehoznunk
 - Ha ismert a DNS szekvenciája:
 1. **Előállíthatjuk az inzertet** mi magunk, **ha rendelkezünk a genomiális DNS-mintával** (két specifikus primer segítségével a genomiális DNS-ből a minket érintő szakaszt **PCR-rel** tudjuk amplifikálni)
 2. **Szintetizáltathatjuk** az inzertet (drága, de gyors)
 3. Klónadatbázisból (pl. Addgene) megvesszük az inzertet tartalmazó rekombináns DNS-t, amiből restrikciós enzimekkel **kivághatjuk a szakaszt, és PCR-rel felszaporíthatjuk** („*subcloning*”) (ez a legolcsóbb)
 4. **cDNS-t állítunk elő** a fehérjét nagy mennyiségben expresszáló szövetből, sejtből

mRNS izolálás és cDNS inzert

- Ha a gén által kódolt fehérjét szeretnénk vizsgálni cDNS-re lesz szükségünk
- cDNS előállítása:
 1. Megfelelő szövetből **totál RNS izolálása**
 2. A totál RNS-ből **az mRNS izolálása** (csak néhány %-a a teljes RNS-nek, azonban csak ez rendelkezik poli-A címke, így affinitás kromatográfiával tisztítható)
 3. **A cDNS előállítása** az mRNS-ről reverz transzkriptáz segítségével

Alternatív módszer: a totál RNS-ből cDNS írása, melyet RT-PCR-rel sokszorozhatunk

Vektorok

- **A klónozendó DNS (az inzert) hordozómolekulái**
- Legfőbb tulajdonsága, hogy *képes önálló szaporodásra* valamilyen gazdaszervezetben (*replikon*)
- Kis méretűnek kell lennie (2-200 kbp)
- Egyedi restriktációs helyekkel kell rendelkeznie
- Tartalmaznia kell legalább egy szelekciós marker gént
- A replikon típusa dönti el, hogy milyen gazdaszervezetben képes szaporodni
- Vektorok eredetük szerint lehetnek: plazmidok, fágok, kozmidok, vírusok

Vektorok felépítése

- **Szelekciós marker**: a táptalajon kizárólag a vektort tartalmazó baktériumok növekedését teszi lehetővé (általában ez antibiotikum-rezisztencia gén)
- **Klónozó hely**: a vektorban az inzert előtti és utáni, csak egyszer előforduló jellegzetes, rövid (néhány bp) szekvencia, mely lehetővé teszi az inzert szelektív beépítését/kihasítását
- **Promóter régió**: közvetlenül a klónozó hely és a gén előtt helyezkedik el, lehetővé teszi a transzkripciót, meghatározza a fehérje mennyiségét (az RNS-polimeráz enzim bekötődési helye). Általában szabályozható, faktorok jelenlétében indul be a génexpresszió.

Vektorok típusai

Klónozó vektorok

- Amibe egyszerűen lehet DNS szakaszt inzertálni
- DNS információ tárolására, sokszorosítására használjuk
- Multiklónozó helyel (*MCS: multiple cloning site*) kell rendelkezni: a vektorban csak egyszer előforduló, egymás mellett elhelyezkedő különböző restrikciós endonukleáz felismerő helyek

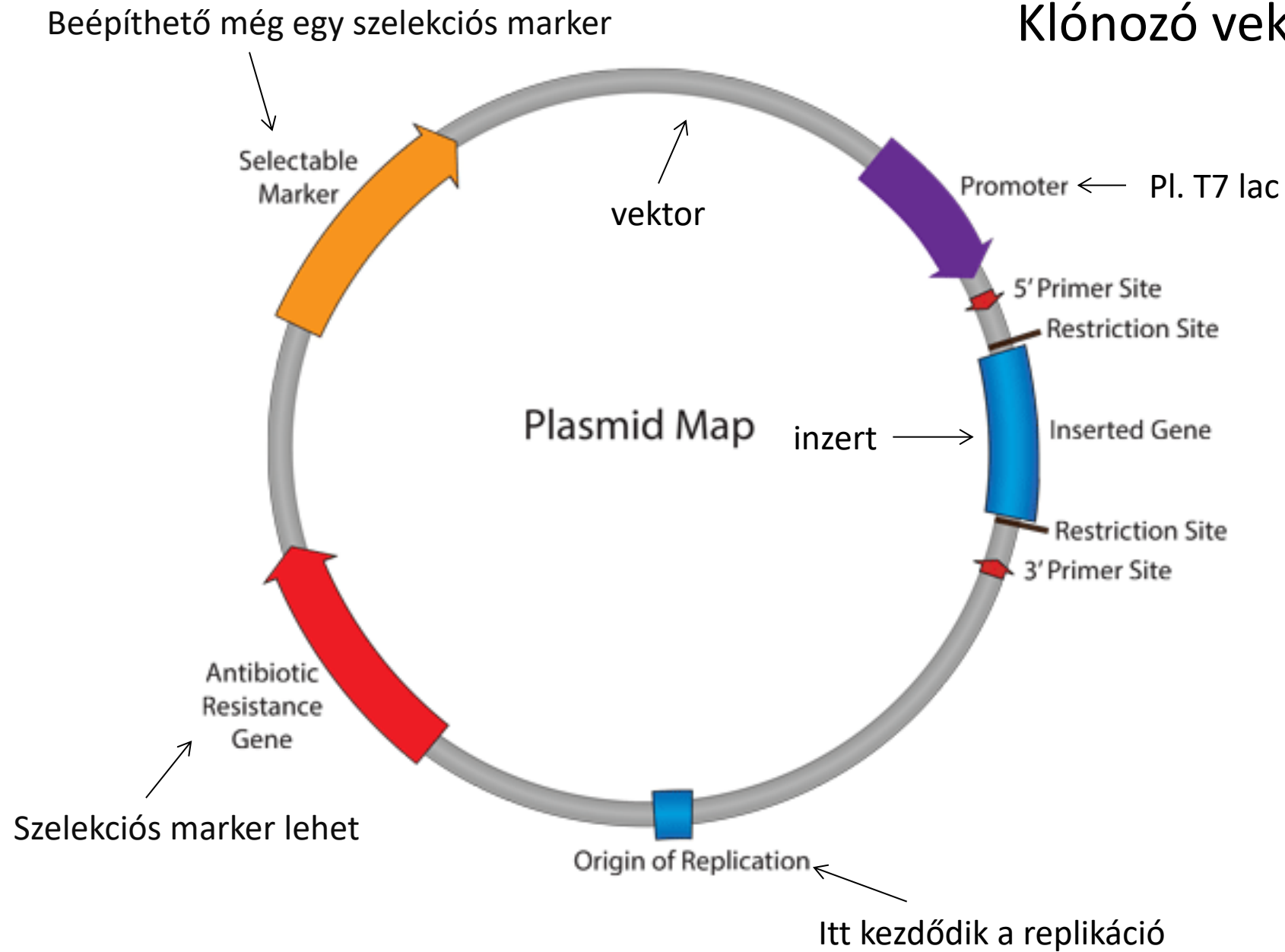
Expressziós vektorok

- Amivel az inzertet fehérje formában ki lehet fejezni (expresszálni)
- Tartalmaznia kell egy szabályozható promóter régiót

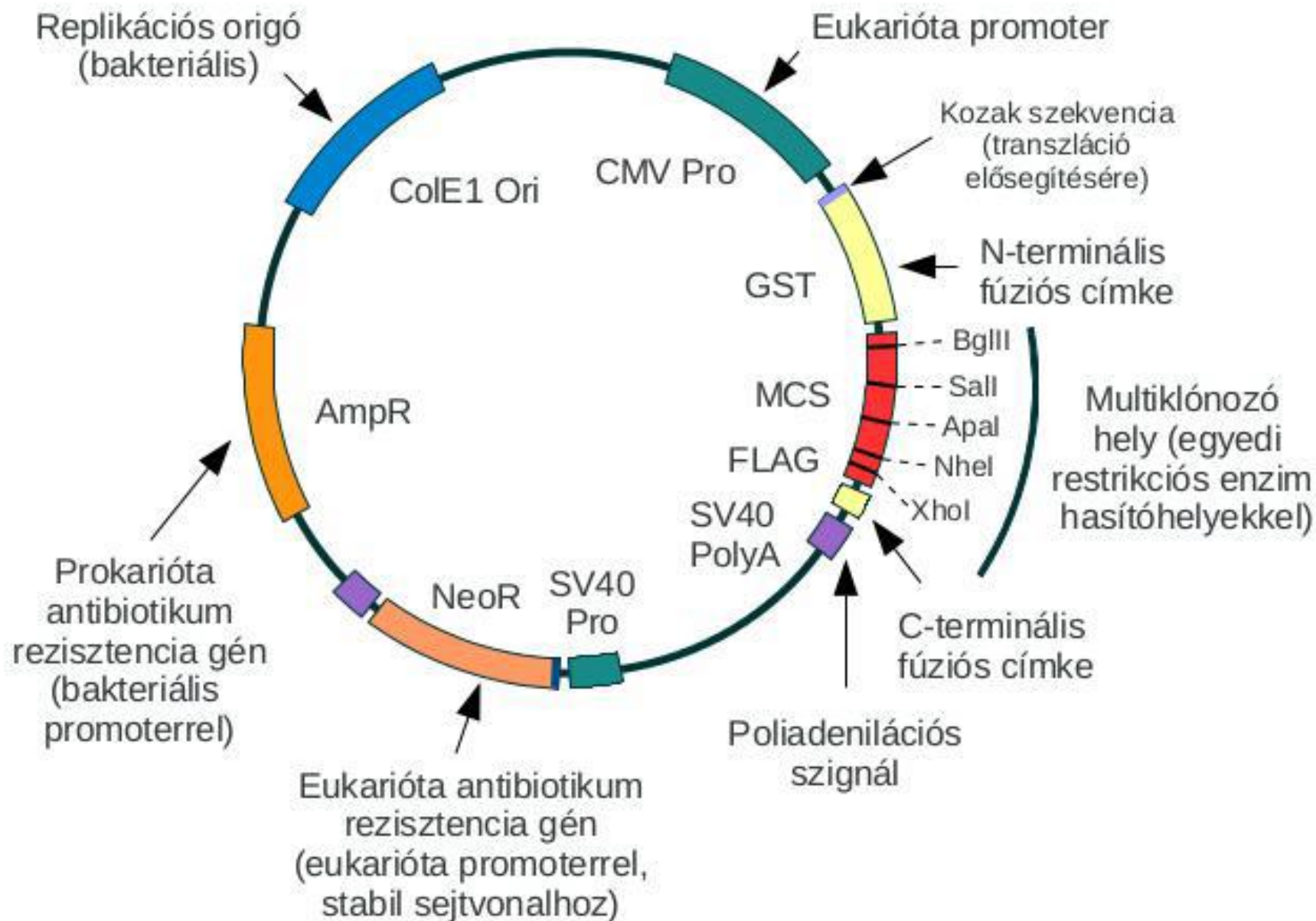
Gazdaszervezetek

- A legelterjedtebb gazdaszervezet: *Escherichia coli* (molekuláris klónozás mindig itt történik), annak a nem-patogén K-12-es törzse (az emberi bélcsatornában nem képesek szaporodni), illetve fehérje expresszióhoz a BL21-es törzs
- *Eukarióta gazdaszervezetek* (élesztő, rovar, növényi, állati, emberi sejtek): csak ún. „*shuttle*” vektorokat használhatunk, amik képesek kétféle gazdaszervezetben is szaporodni (oka: a molekuláris klónozás, felszaporítás minden esetben *E. coli*-ban történik, és a már felszaporított konstrukciót juttatjuk be az eukarióta gazdába)

Klónozó vektor



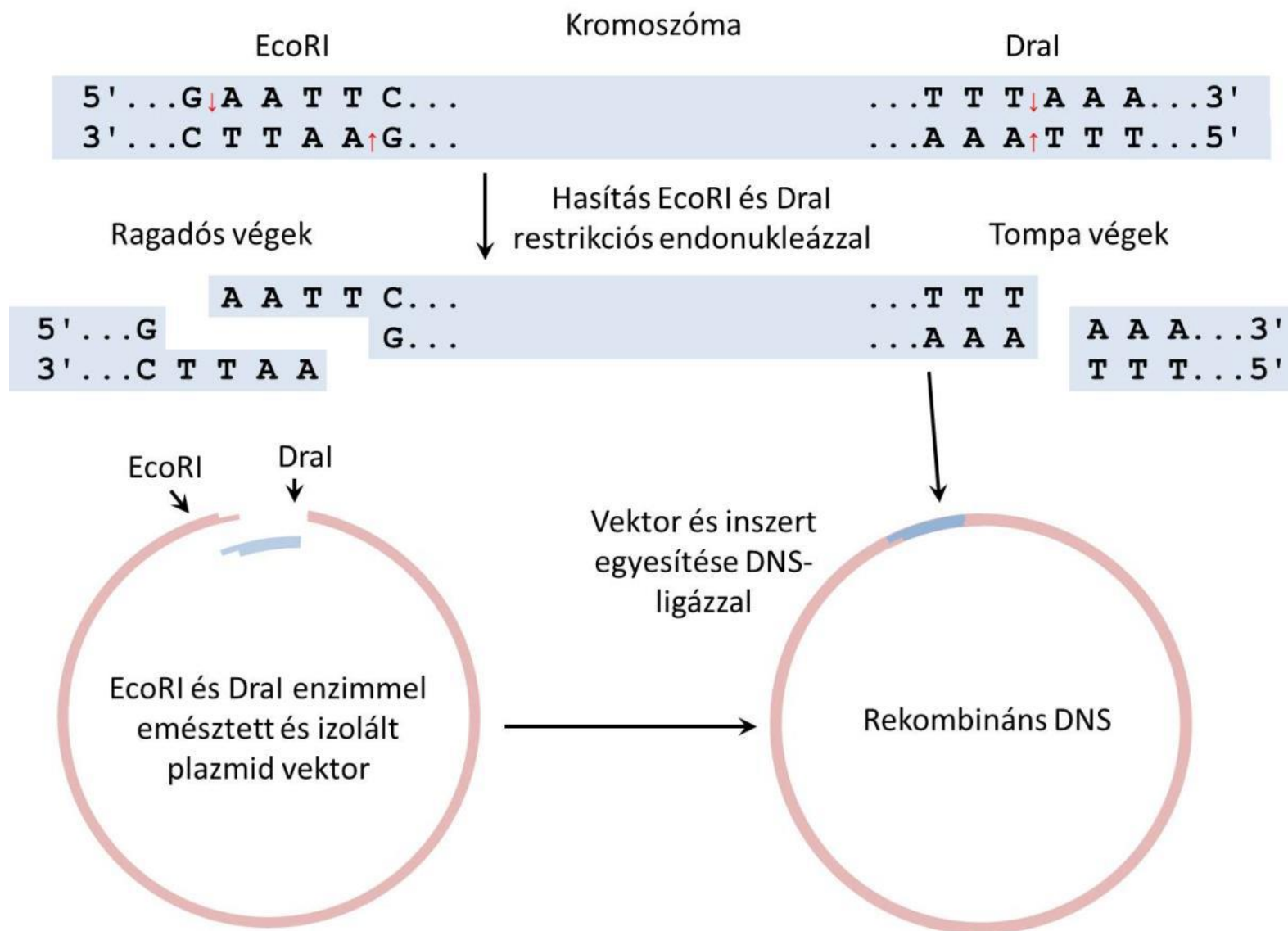
Expressziós / shuttle vektor



A molekuláris klónozás enzimeei

- Restrikciós endonukleázok
 - Foszfodiészter kötést hidrolizáló enzimek
 - A baktériumokat az idegen DNS-el szemben védő molekuláris rendszer
 - Nagy számban fordulnak elő (~4000), nagy géntechnológiai változatosságot biztosítva (II. típusúakat használják)
 - Palindrom szekvenciákat ismernek fel, specifikus helyeken (ált. 4-8 bp)
 - Hasítás történhet tompa végek (*blunt end*) és ragadós végek (*sticky end*) keletkezésével is
 - Pl. EcoRI, NheI, XhoI, DraI, HindIII, stb.
- DNS-ligáz
 - Foszfodiészter-kötés létrehozásával képes két DNS molekulát vagy egy DNS molekula két végét kovalensen összekapcsolni
 - Leggyakrabban a T4 bakteriofággal fertőzött *E. coli*-ből izolált **T4-ligáz** használják

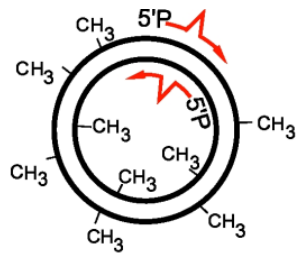
Rekombináns DNS létrehozása direkcionális klónozással



Helyspecifikus mutagenézis

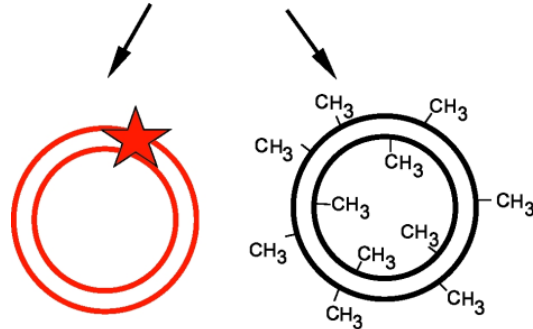
(Site-directed mutagenesis)

- Célja **csak egy adott pozíció, vagy rövid génszakasz megváltoztatása** egy rekombináns DNS-molekulán (pl. meghatározott helyzetű amber STOP kodon beépítése egy fehérje expressziós vektorába)
- Lépései („*QuickChange*” módszer):
 1. Olyan *oligonukleotid primer pár* létrehozása, mely egy metilált templát DNS-szakaszhoz hibridizál és *tartalmazza a kívánt mutációt*
 2. A primerekkel és a templát rekombináns DNS-sel *PCR* reakciót végzünk, *DNS-polimeráz* segítségével felszaporítjuk a *módosítást tartalmazó rekombináns DNS molekulát*
 3. Emésztés *DpnI* restrikciós enzimmal: olyan különleges restrikciós enzim (II.M típusú), amely csak metilált DNS-t ismer fel és hasít. A templát DNS elbontására használják (mivel a cél-DNS molekula *in vitro* körülmények között keletkezett, ezért még nem tartalmaz *in vivo* módosításokat, pl. metil-csoportokat a guaninokon, a templát ezzel ellentétben igen)
 4. A módosított DNS-t tartalmazó oldat *transzformálása* baktérium sejtekbe



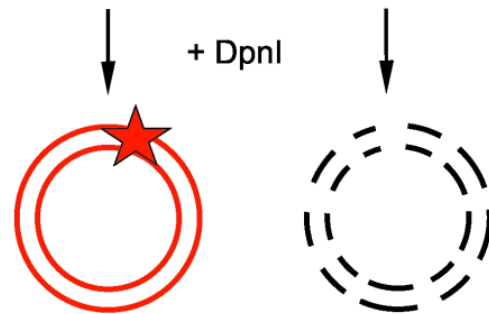
A QuickChange mutagenesis módszerhez bármilyen duplaszálú, metilált DNS plazmid használható. A mutációt hordozó oligonukleotidok a denaturált plazmid DNS-hez anellálnak.

+ T7 DNS polimeráz, T4 ligáz



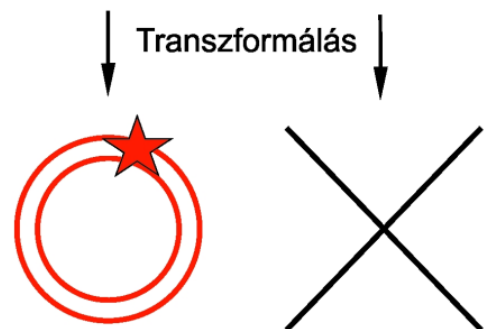
T7 DNS polimeráz és T4 ligáz szintetizálja és cirkularizálja a mutációt tartalmazó új szálát.

+ DpnI



DpnI endonukleáz a metilált, vad típusú DNS szálát lebontja.

Transzformálás



A mutációt tartalmazó új DNS plazmidot mutS- *E. coli* baktériumban szelektálódik és szaporodik.

⚡ „mismatch”

★ mutáció

Helyspecifikus mutagenézis

- Primer tervezése: a mutációtól mind 5', mind 3' irányban legalább 15 bp-t tartalmazzon és a templáttal komplementer legyen, illetve 3' végén G/C bázisokat tartalmazzon (erősebb a 3 H-hidas G/C kötés mint a 2 H-hidas A/T)

Példa amber STOP kodon (**TAG**) bevitelére alkalmas primerre:

forward: **ctgaatgaccgcttcgccTAG**tacatcgacaaggtg

reverse: **caccttgatgatgtaCTA**ggcgaagcggtcattcag

- A módszerrel végrehajtható szubsztitúció mellett deléció és inzerció is

Génbeviteli eljárások

- A plazmid DNS bevitelére baktérium vagy eukarióta sejtekbe többféle lehetőségünk van:
 - Transzformálás:
 - A **baktériumsejtek** képesek a környezetből DNS molekulák (pl. plazmid DNS) felvételére, ez az eljárás a transzformáció
 - **Kompetens sejtek**re van hozzá szükség (kompetens az a sejt, mely képes a környezetéből DNS-t felvenni)
 - Legkönnyebben az *E. coli* tehető kompetenssé (pl. CaCl_2 -oldatban való inkubációval, mely segíti a plazmid DNS kötődését a baktériumfal lipopoliszacharidjához; vagy hősokkal, melytől a sejtmembrán fluidabb lesz)

Génbeviteli eljárások

– Transzfekció:

- Alapja ugyanaz mint a transzformálásé, csak itt a célsejtek **eukarióta sejtek**
- *Kémiai transzfekció:* kationos hordozóhoz kötik a negatív töltésű DNS-t és ezt a komplexet juttatják be a sejtbe
- *Kationos lipid* (pl. lipofektamin): liposzómákat képez, magába foglalva a DNS-t
- *Kalcium-foszfát:* foszfát pufferhez (pl. HEPES) CaCl_2 -t adunk, a keletkező $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ csapadék a felületén megköti a DNS-t
- *Kationos polimerek*

– Infekció:

- Rekombináns **fág (baktériumokba)** vagy **vírus (emlős sejtekbe)** segítségével juttatjuk be a rekombináns DNS-t
- Előnye: gyakorlatilag 100% hatékonyságú

Génbeviteli eljárások

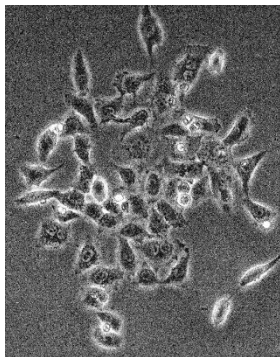
– Elektroporáció:

- Az egyik leghatékonyabb módszer **minden sejtípusra**
- A sejtszuszpenziót és a bejuttatni kívánt plazmidot olyan küvettába helyezzük, aminek két oldalán alumínium-elektródák találhatók és **nagyfeszültséget** hozunk létre (10,000-100,000 V/cm néhány μ s-ms-ig), amely ideiglenesen lyukakat képez a foszfolipid kettős rétegben és a sejtfalon, amin keresztül megindul a plazmid beáramlása. Amint a membrán töltöttsége megszűnik, a lyukak bezáródnak és a sejteket gyorsan táptalajba helyezzük regenerálódásra
- Hátránya: igen toxikus; Előnye: nagy hatásfokú

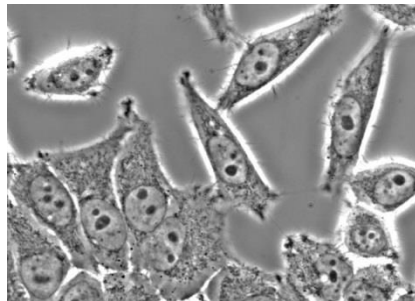
Emlős sejtvonalak

- A fehérje expresszióra használt sejtvonalakat primer sejtenyészetekből nyerik, de **immortalizáltak**. Ez azt jelenti, hogy korlátlan ideig képesek sejtosztódásra, kultúráik hosszú ideig fenntarthatók (immortalizálás vírusokkal; vagy daganatos sejt ami természetes módon „halhatatlan”)
- Leggyakoribb sejtvonalak:
 - CHO: Chinese hamster ovary
 - COS: afrikai zöld majom veséjéből, SV40 vírussal immortalizálva
 - HeLa: Henrietta Lacks méhnyakrákos sejtjeiből származik, természetes módon halhatatlan
 - HEK293: human embriotic kidney, adenovírussal immortalizálva

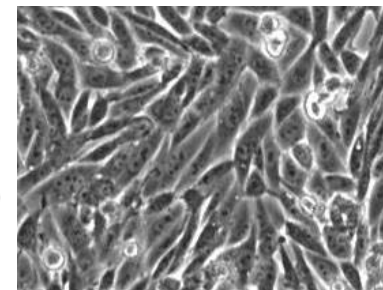
HEK293



HeLa



CHO



Stabil transzfekció

- Az expressziós vektor homológ rekombinációval integrálódik a gazdasejt genomjába (integrálódó vektor)
- Hatásfoka nagyon kicsi, mindenképp szükség van szelekciós markerek használatára
- A stabilan transzfektált sejtek már külön sejtvonalat alkotnak és önállóan fenntarthatók
- Előnye a homogenitás (a sejtek 100%-a expresszál), a stabilitás, illetve a nem túl magas expressziós szint (kevésbé „szól” bele a sejt normál működésébe)

Tranziens transzfekció

- Az expressziós vektor nem integrálódik a genomba, csak a transzfektált sejtekben fejeződik ki a fehérje, nem képes stabil klónok létrehozására
- Előnye: magas fehérje expressziós szint, nincs szükség szelekcióra, a transzfekció után a sejtek 12-72 órával már vizsgálhatók
- Hátránya: nem hat a teljes sejthalmazra, hatásfoka kicsi

Transzfekció sikerességének ellenőrzése: fluoreszcens fúziós (riporter) fehérjékkel (N-vagy C-terminális)

Rekombináns DNS ellenőrzése

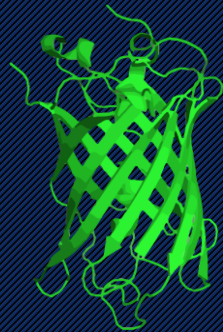
- Analitikai emésztéssel: az *in vitro* rekombinációban használt két restriktációs enzimmel emésztést végzünk→ha a rekombináns DNS megfelelő, vissza kell kapnunk az üres vektort és az inzertet. Az emésztés sikerességét agaróz gélen való futtatással ellenőrizzük
- Szekvenálással: a szekvenálás a DNS nukleotid sorrendjének meghatározása
 - Leggyakoribb módszer: **Sanger-féle lánctermínációs módszer**

Fúziós fehérjék

24

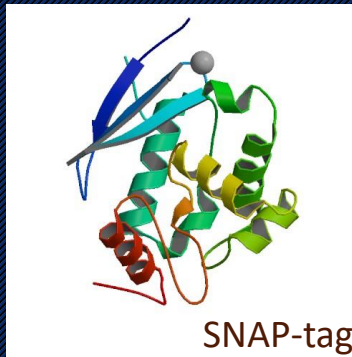
Terminal tagging

Fluorescent proteins



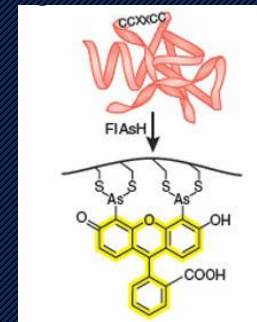
238 amino acids

Small enzymes



SNAP: 182 amino acids

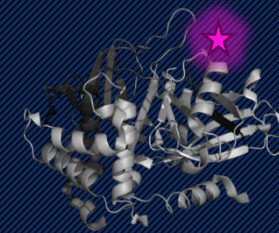
Rare motifs



Cys₄-tag
6-15 amino acids

Any positions

*Non-canonical
amino acids with
unique functions*



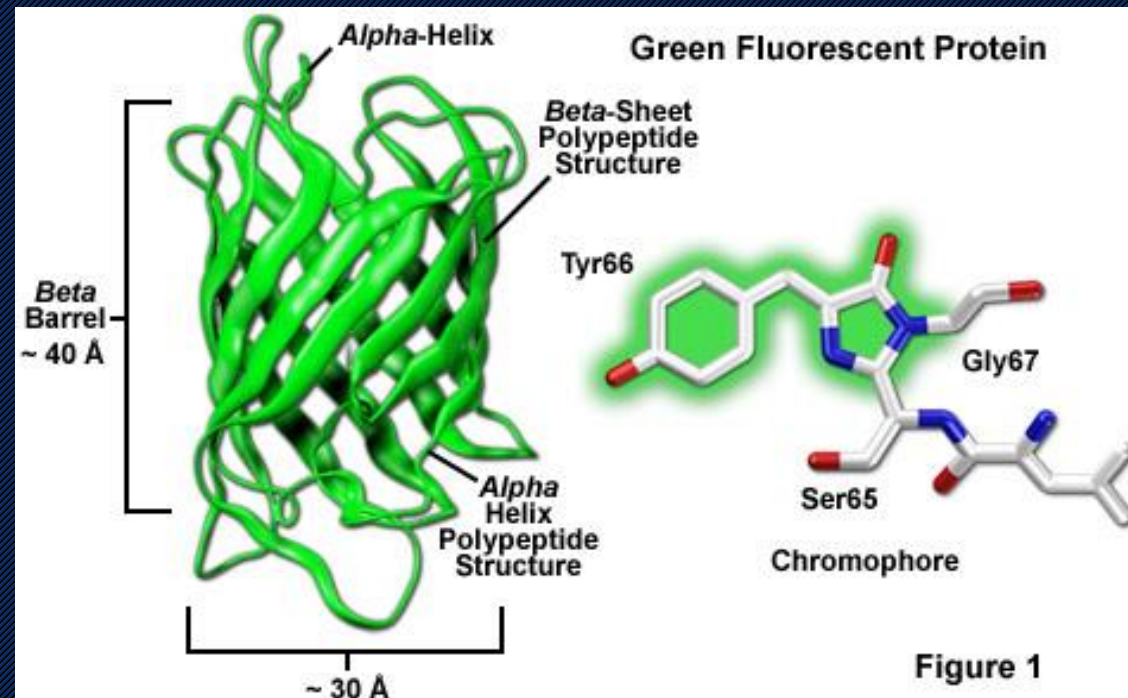
Genetic encoding
1 amino acid

D. Jung, K. Min, J. Jung, W. Jang, Y. Kwon, *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 862.
K. Lang, J. W. Chin, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4764.

Fluoreszcens fehérjék

25

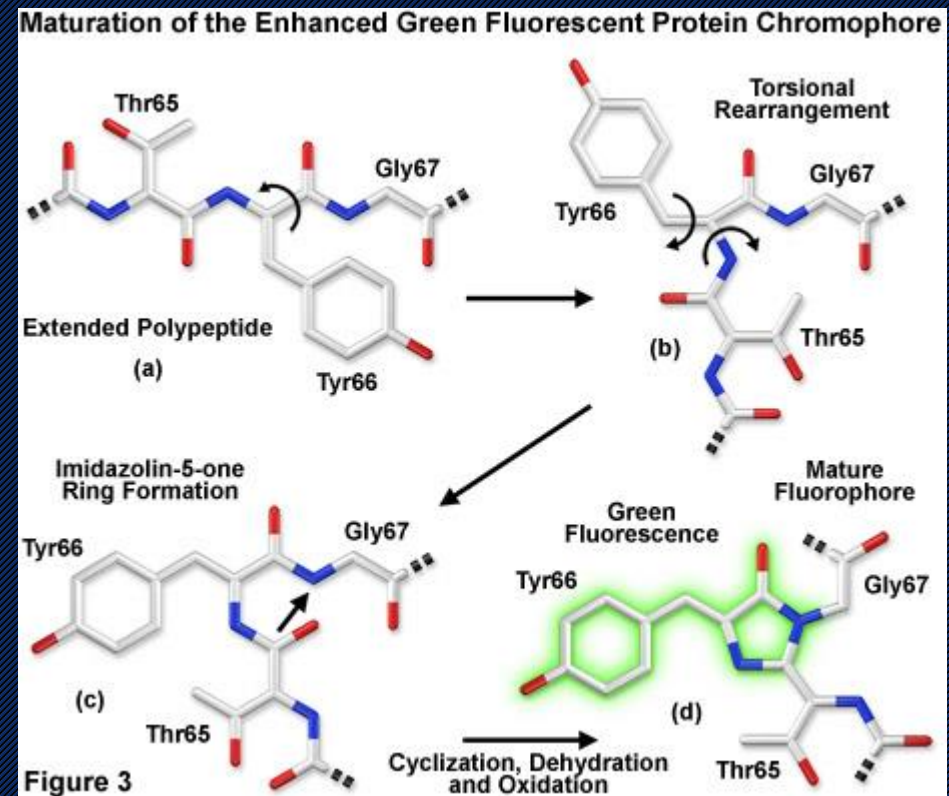
- *Aequorea victoria*
- 238 aminosav, 26,9 kDa
- Oxigén kell az éréshoz



Fluoreszcens fehérjék

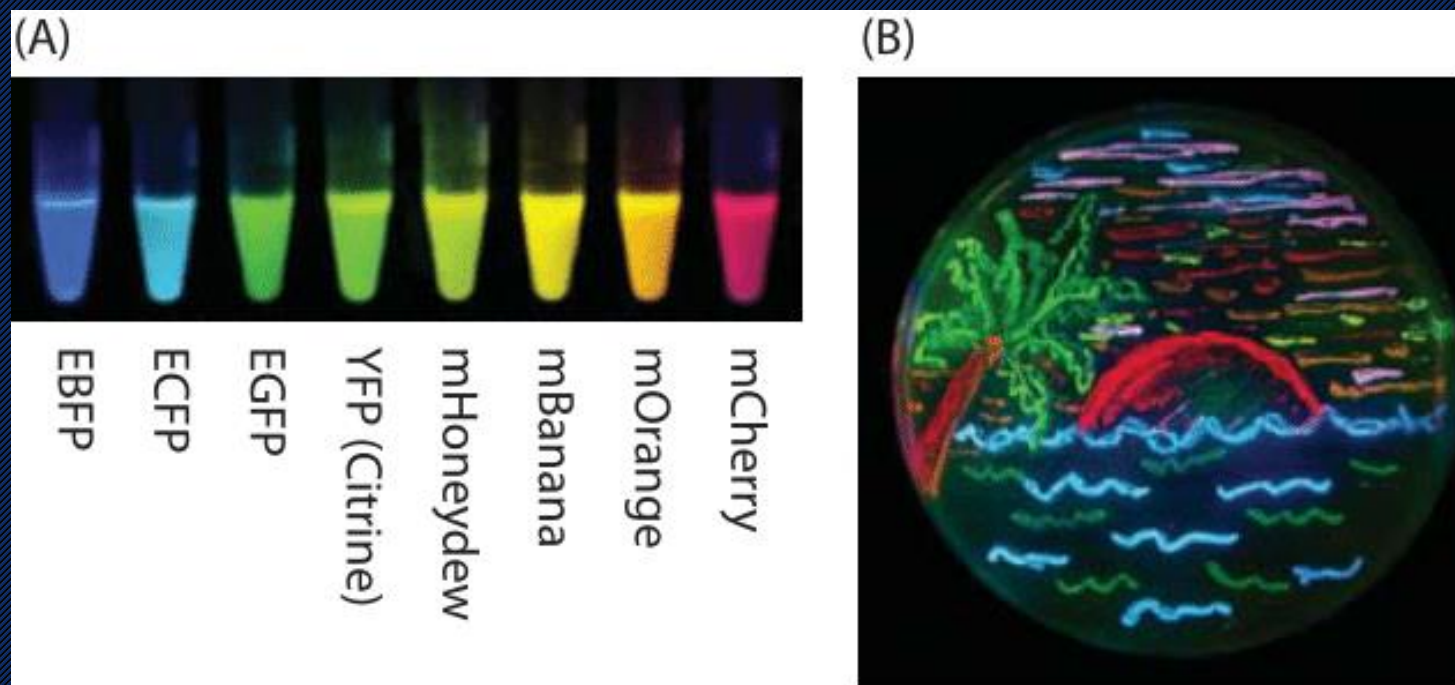
26

- *Aequorea victoria*
- 238 aminosav, 26,9 kDa
- Oxigén kell az éréshez



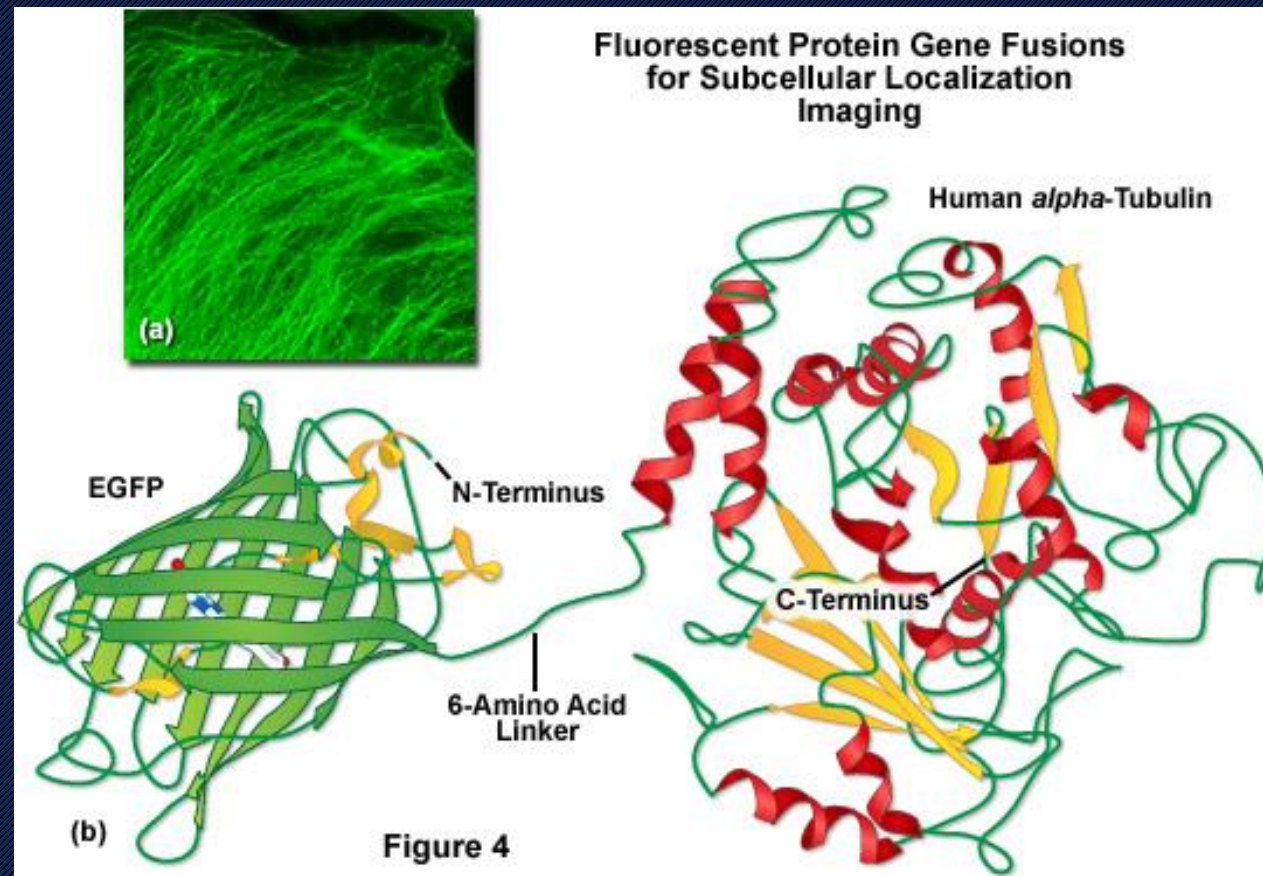
Fluoreszcens fehérjék

27



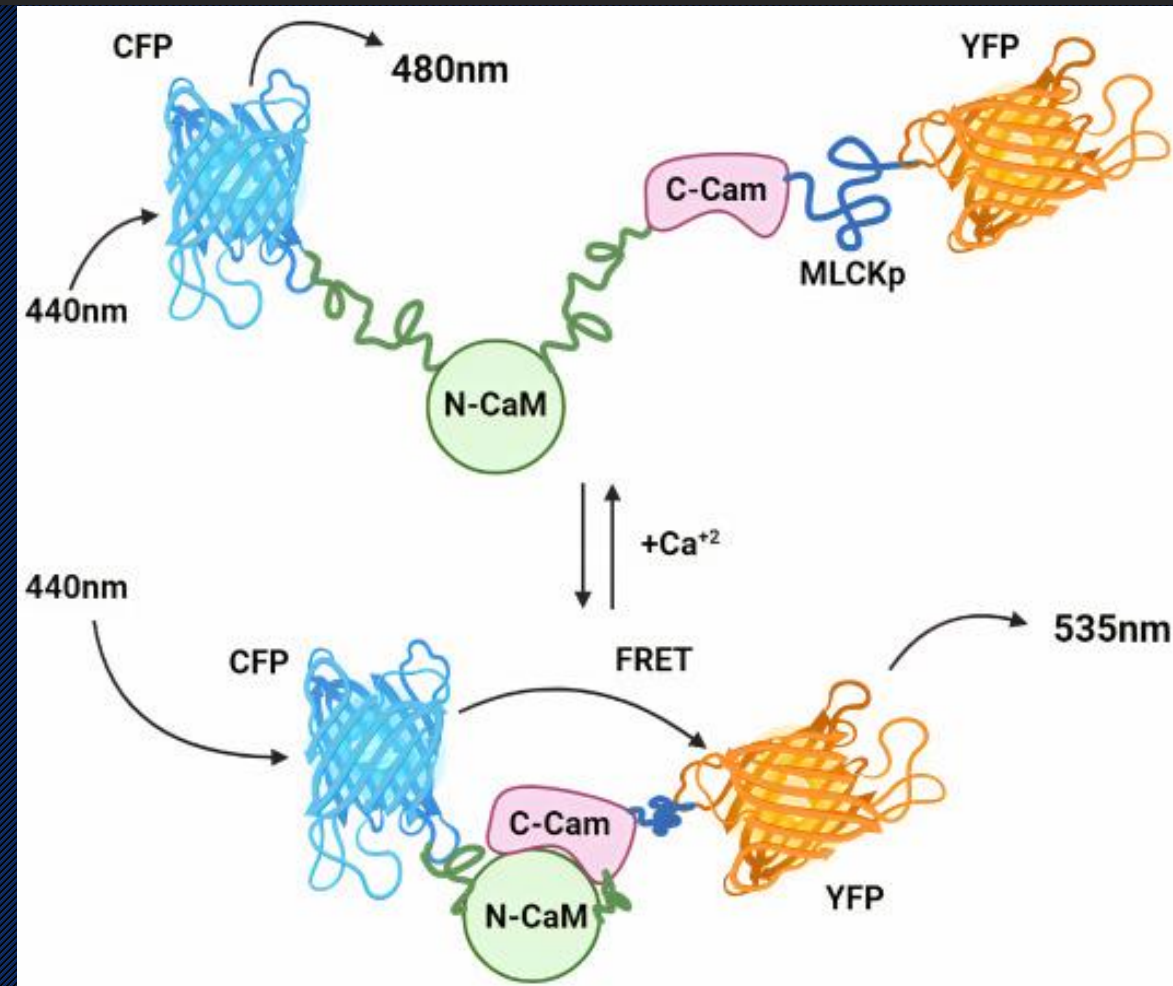
Fluoreszcens fehérjék

28



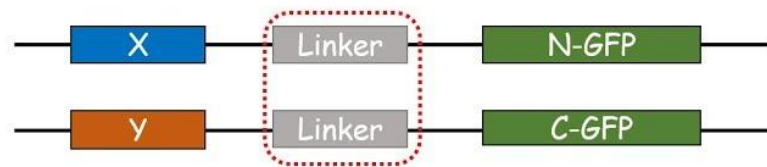
Fluoreszcens fehérjék

29

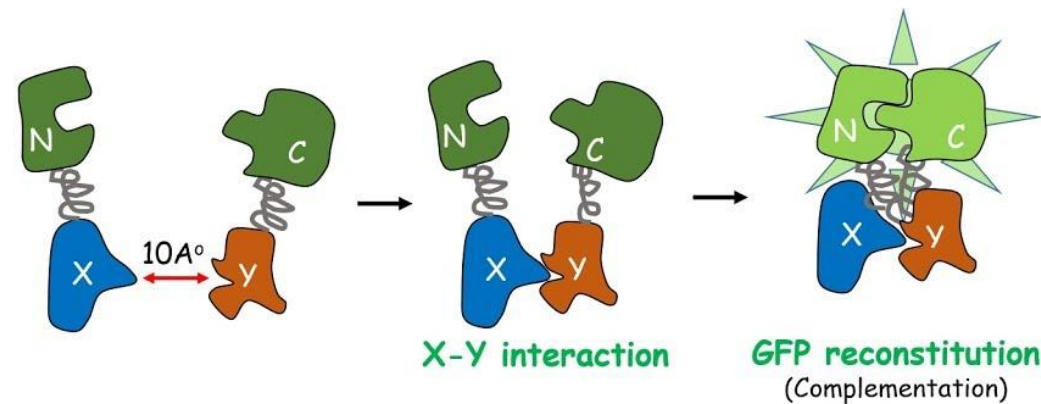


Fluoreszcens fehérjék

30



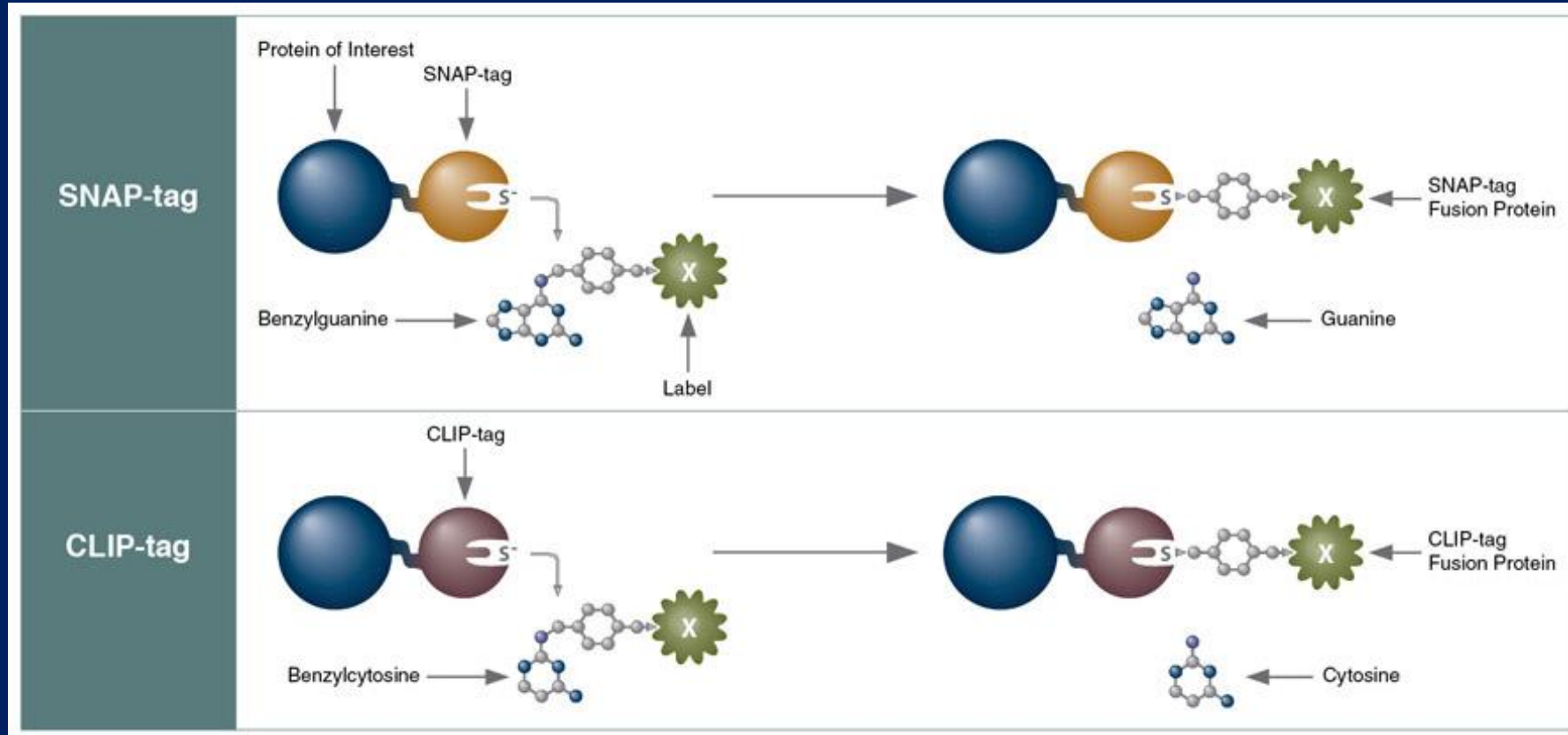
What is BiFC ?
Bimolecular Fluorescence
Complementation
How BiFC works?



Önjelölő TAG-ek: Snap and Clip tags

31

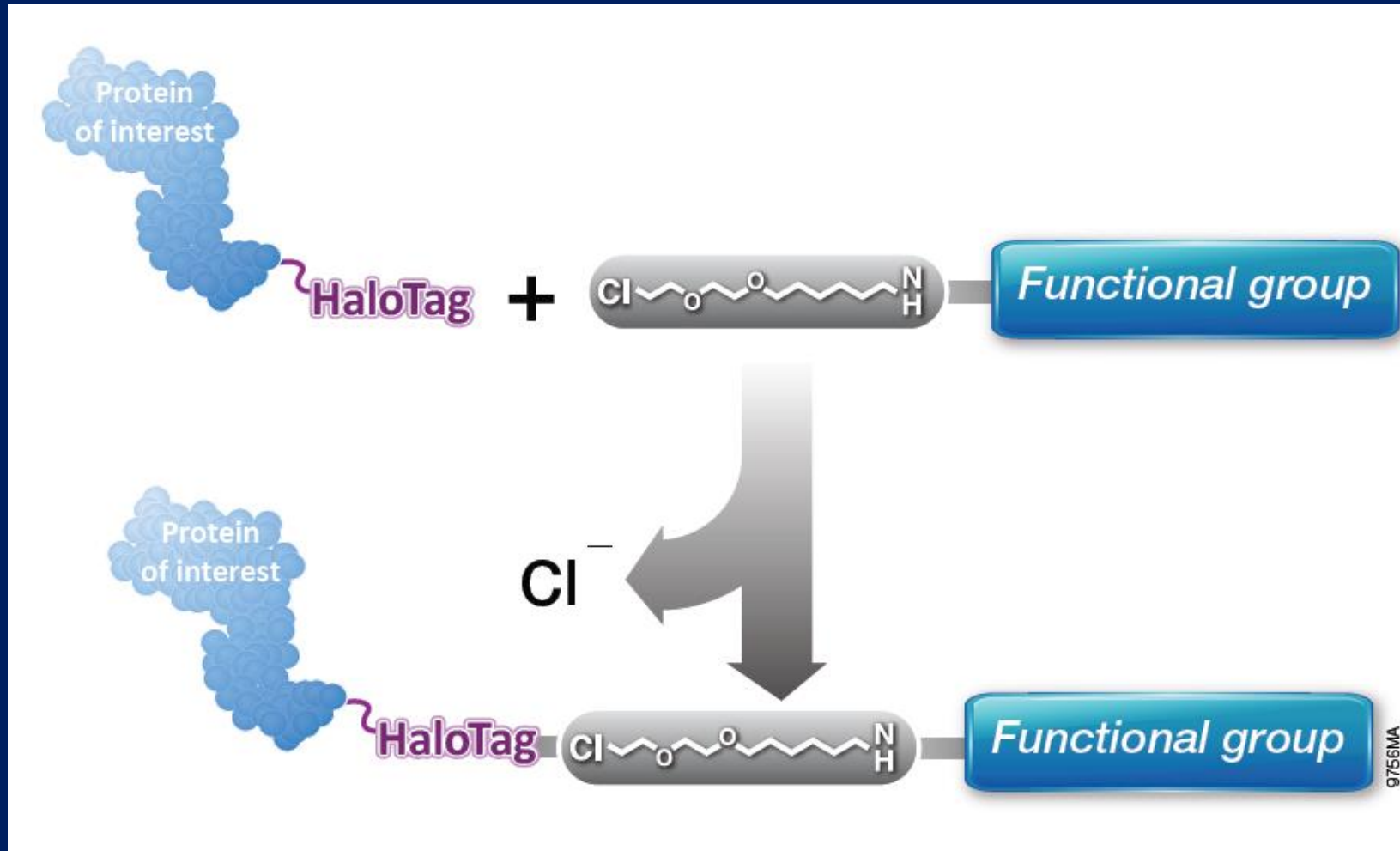
O-6-Methylguanine-DNA methyltransferase activity



- A. Juillerat A, et al.(2003). *Chem. Biol.* 10, 313

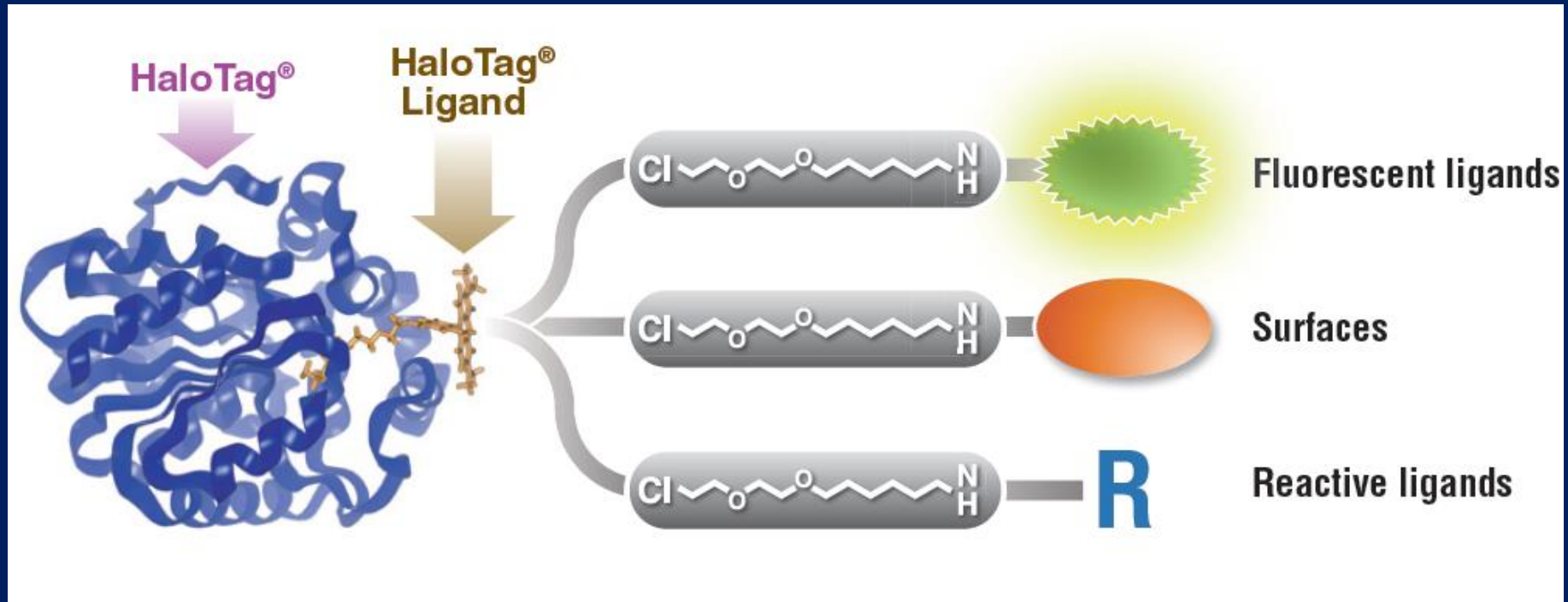
Halo tag

32



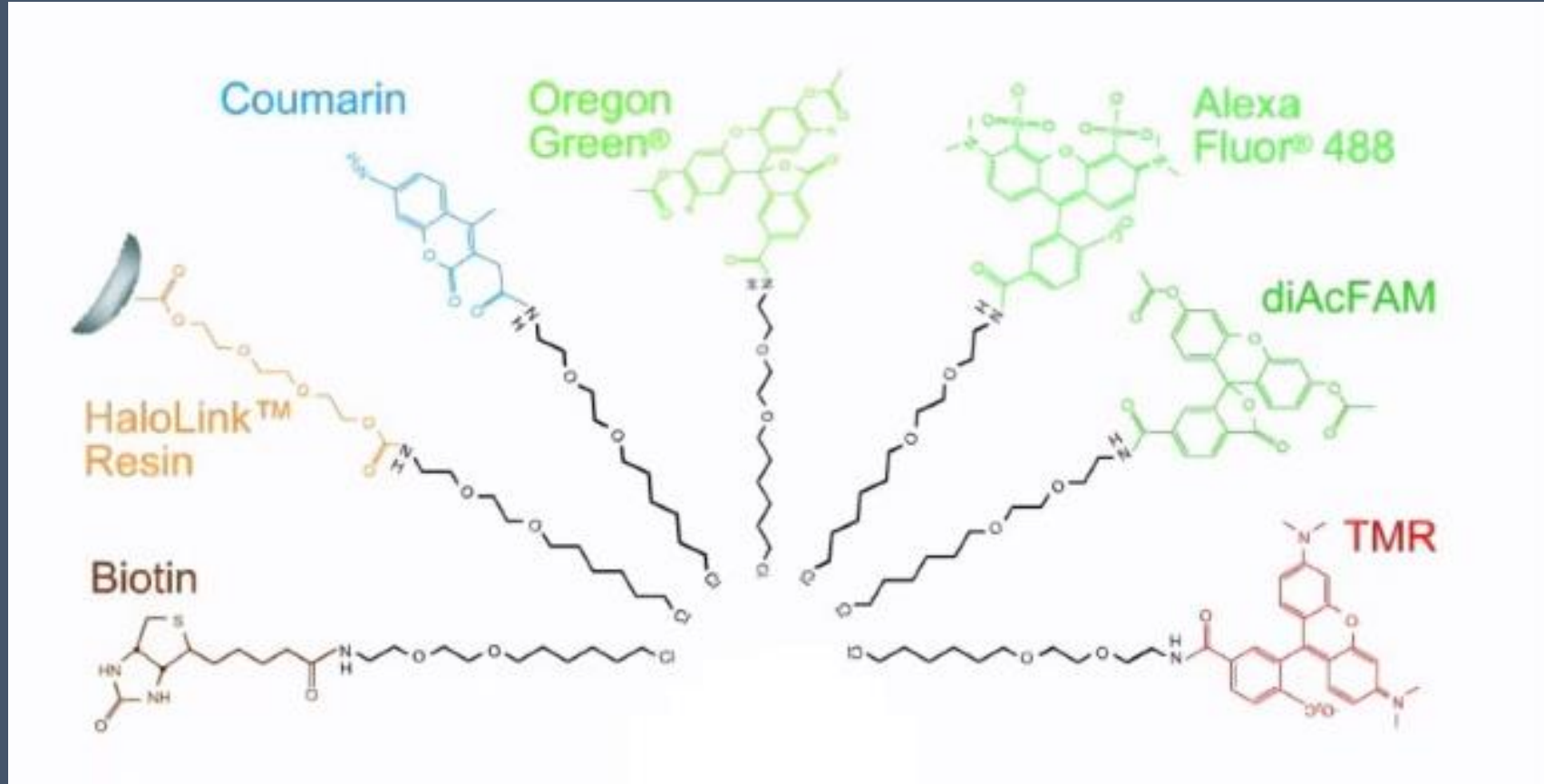
Halo tag

33



Halo tag

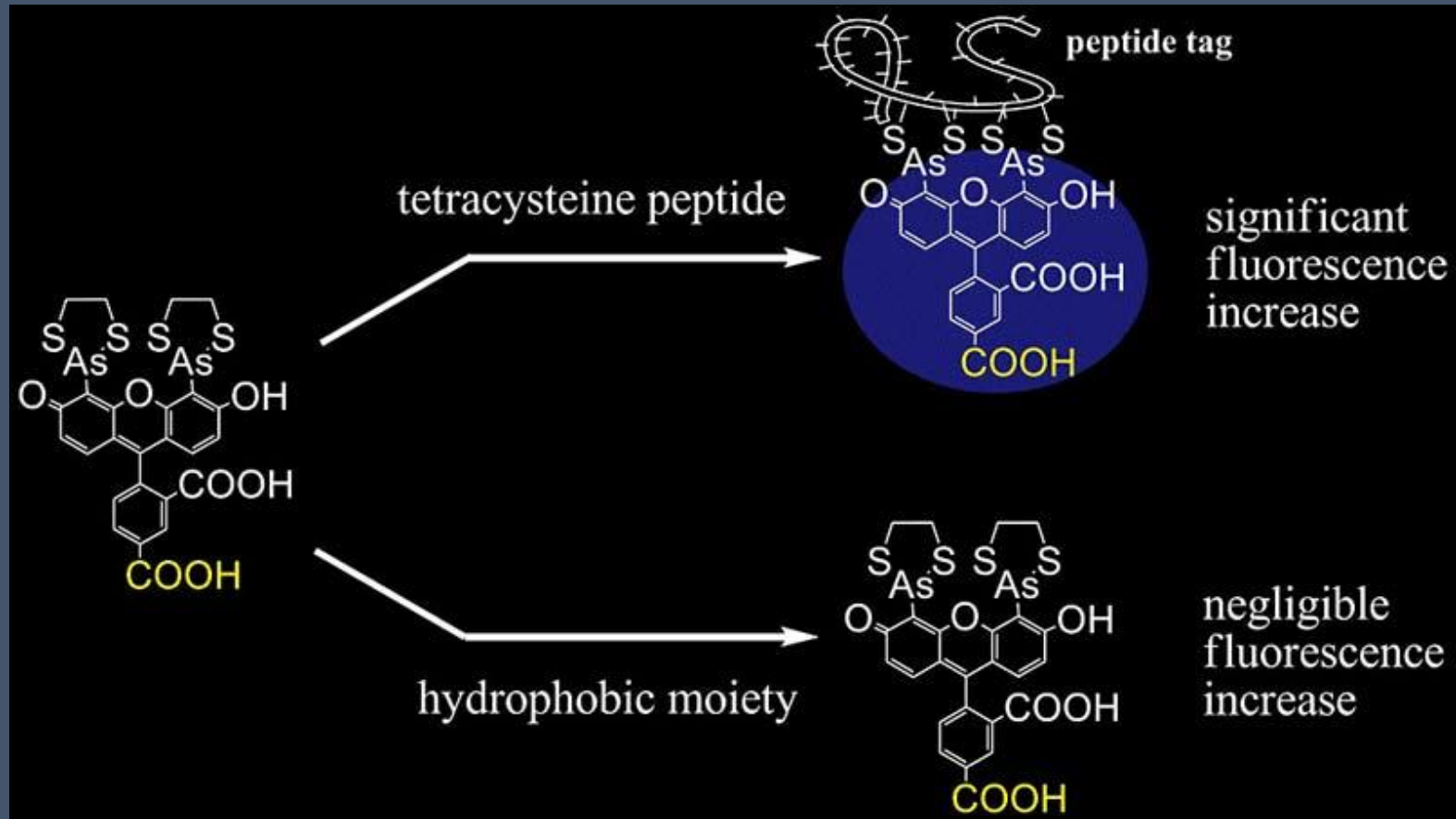
34



- G. V. Los et al. (2008) *ACS Chem. Biol.*, 3, 373
- www.promega.co.uk

Unnatural sequences of natural functions

35



- B. A Griffin, et al. (1998). *Science*, 281, 269

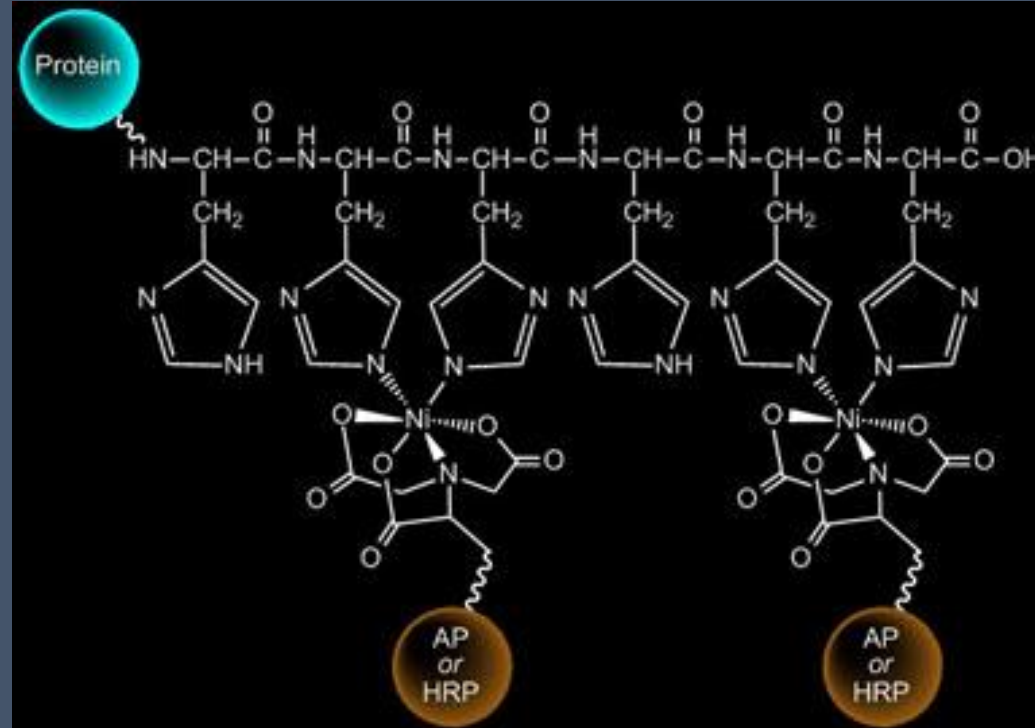
Unnatural sequences of natural functions



-
- B. A Griffin, et al. (1998). *Science*, 281, 269

Unnatural sequences of natural functions ³⁷

(His6)



- Mainly for affinity chromatography

Példa: Vimentin fehérje fluoreszcens jelölése géntechnológiai úton: Vim-mOrange

1. Vimentint tartalmazó rekombináns DNS létrehozása

– Felépítése:

- Inzert: humán vimentin cDNS-e + fúziós fluoreszcens fehérje – mOrange)
- Vektor: pN1 (bakteriális vektor vírus elemekkel)
- Promóter: CMV-ből (enhancerrel) (prokarióta promóter)
- Kozak-szekvencia
- PoliA-farok (SV40-ből)
- Neomicin- (stabil sejtvonal létrehozásához) és kanamicin-rezisztencia (molekuláris klónozáshoz *E. coli*-ban) saját poliA-farokkal (Herpes simplex vírusból) és promóterrel (SV40-ből)
- Két replikációs origó: egy a vimentinnek, egy az antibiotikum-rezisztencia-génnek

– Elkészítése:

- Az inzertet és a vektort a DraIII és a NheI restriktációs enzimekkel emésztettük, majd tisztítottuk (PCR purification kit)
- Az inzertet és a vektort összekevertük és T4-ligázzal összeillesztettük
- A kész plazmidot Top10 *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk elektroporációval
- A sejteket kanamicint tartalmazó agar gélen növesztettük, majd néhány kolóniából miniprepet készítettünk, a tisztított plazmidot analitikai emésztéssel ellenőriztük

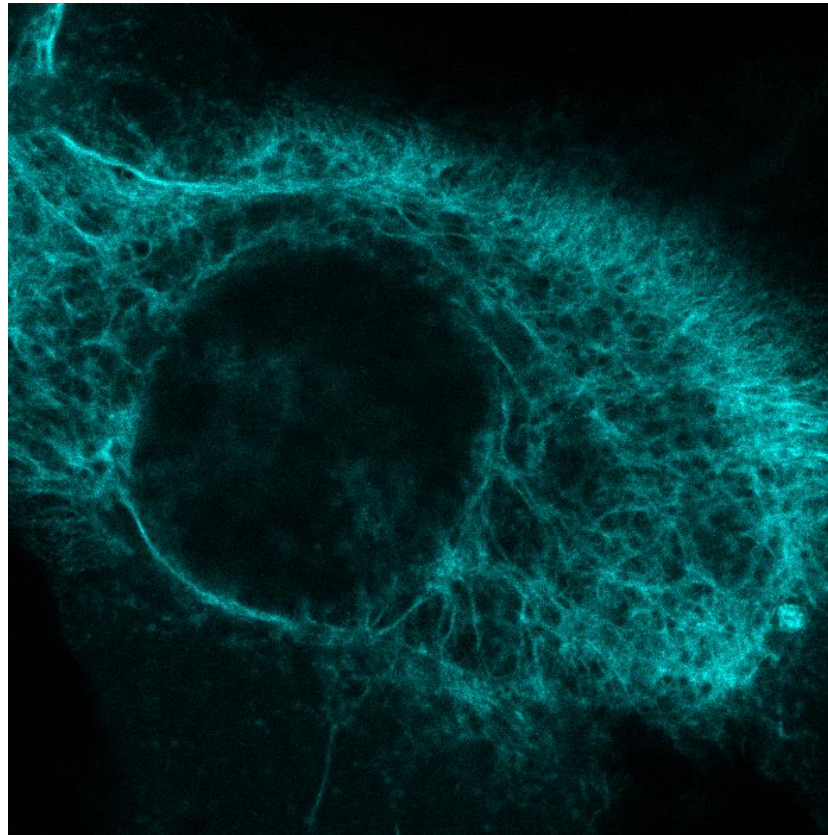
5'...CACNNN[▼]GTG...3'
3'...GTG[▲]NNNCAC...5'

A DraIII hasítóhelye

5'...G[▼]CTAGC...3'
3'...CGATC[▲]G...5'

A NheI hasítóhelye

Példa: Vimentin fehérje fluoreszcens jelölése géntechnológiai úton: Vim-mOrange

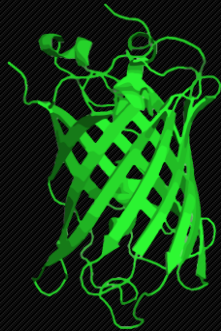


Fehérjék helyspecifikus jelölése

40

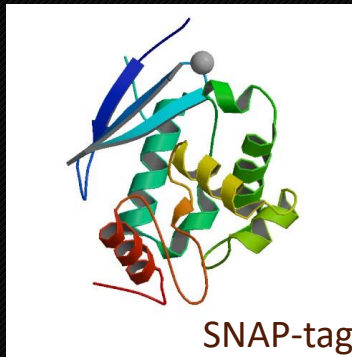
Terminal tagging

Fluorescent proteins



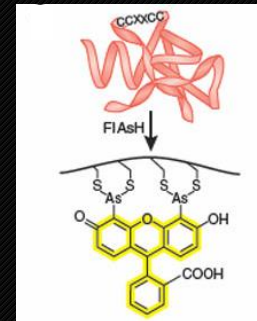
238 amino acids

Small enzymes



SNAP: 182 amino acids

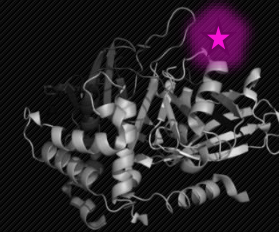
Rare motifs



Cys₄-tag
6-15 amino acids

Any positions

*Non-canonical
amino acids with
unique functions*



Genetic encoding
1 amino acid

D. Jung, K. Min, J. Jung, W. Jang, Y. Kwon, *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 862.
K. Lang, J. W. Chin, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4764.

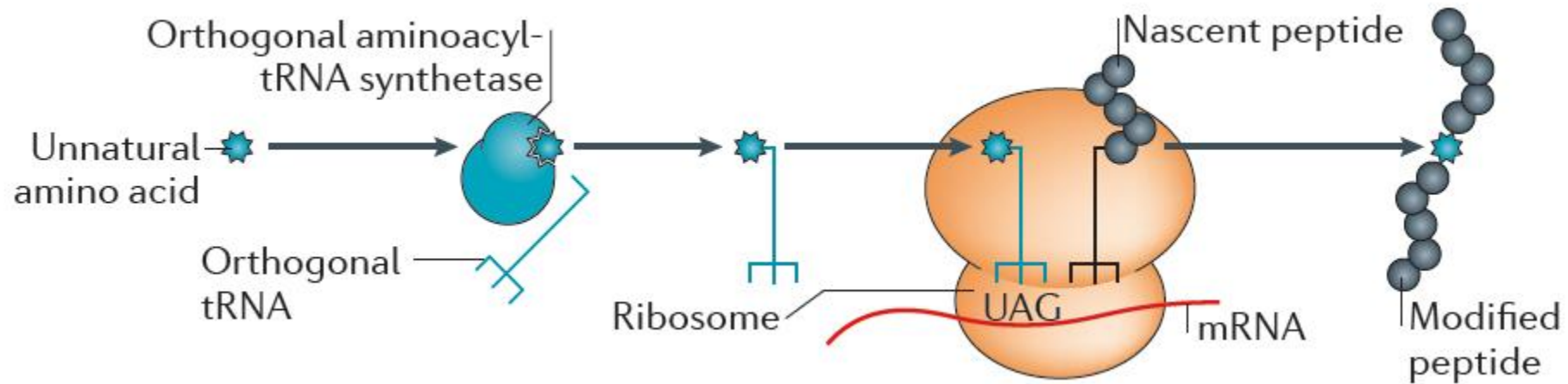
Bioortogonális funkciók genetikai bevitele - STOP kodon szupresszió

- Terminációs/nonszenz kodonok
- Nincs olyan tRNS, melynek antikodonja komplementer lenne velük→nem kötődik hozzá tRNS→leáll a fehérjeszintézis
- STOP kodont felismerő tRNS: a genetikai kód kiterjesztése 3 típus:
 - UAG: amber („különutas” szervezeteknél pl. Pyl)
 - UGA: opal
 - UAA: ochre

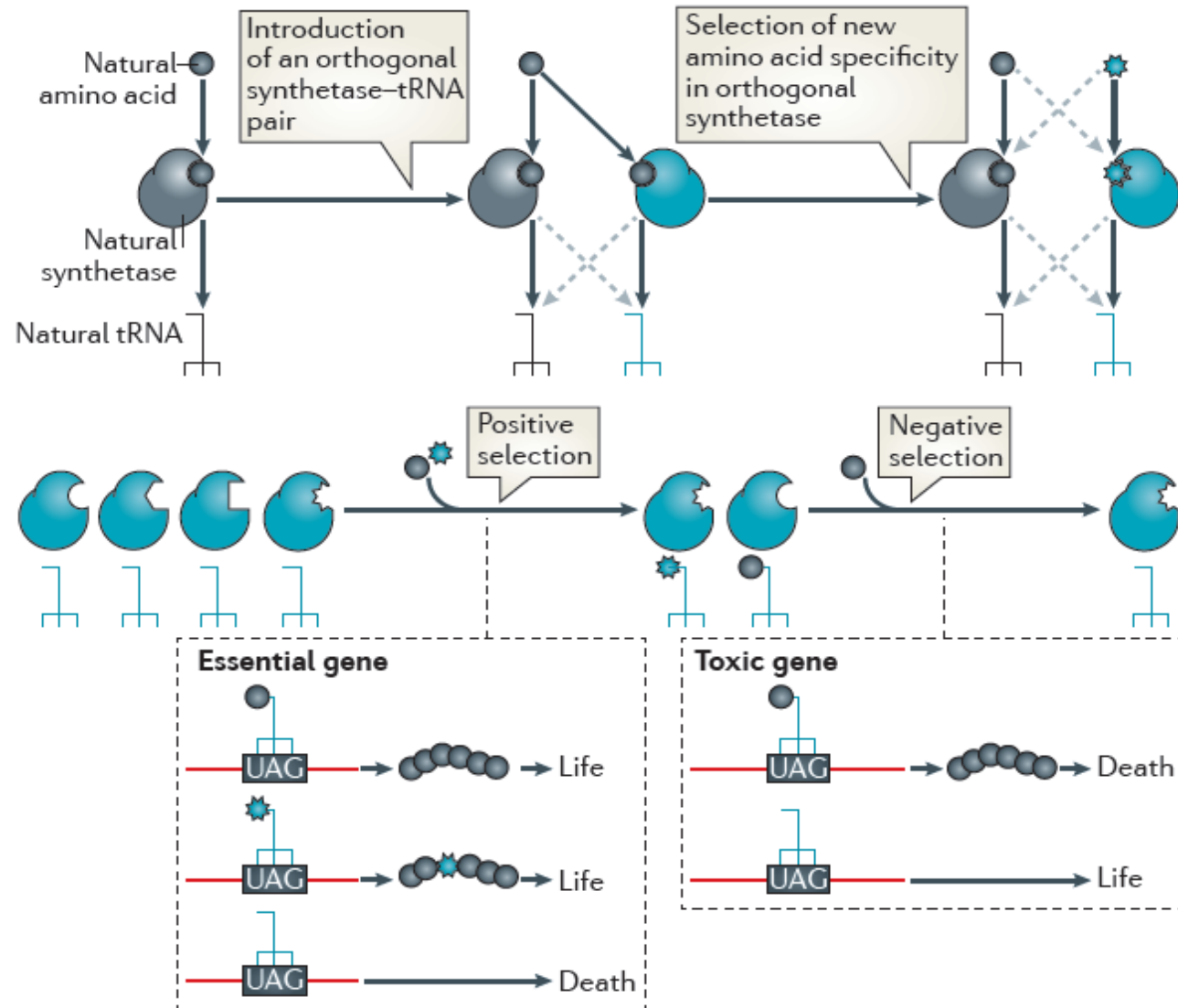
A genetikai kód kiterjesztéséhez szükséges

- Ortogonális tRNS-szintetáz/tRNS pár
- Amber stop kodon a fehérje génjében
- Nem természetes aminosav
 - Fluoreszcens oldallánc
 - Szelektív reakcióra képes funkció

Nem-természetes aminosavak bevitele fehérjékbe – ortogonális tRNS/szintáz pár



Ortogonalis tRNS/tRNS-szintáz kifejlesztése



Bioortogonális reakciók

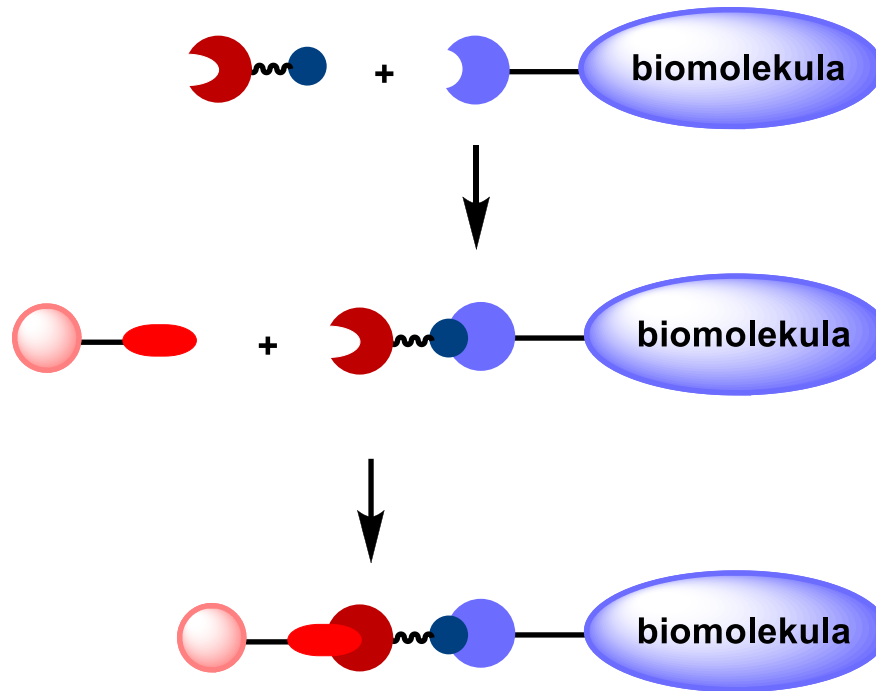
- Bio = biokompatibilis (nem toxikus, nem invazív)
- Ortogonális = kizárólag a komplementer funkcióval lép reakcióba – nincs keresztreakció, nem-természetes, „szervezetidegen” funkciók
- Gyors, kvázi kvantitatív („klikk”-reakciók)
 - Stabil kovalens kötést hoz létre, moduláris, minimális „ártalmatlan” melléktermék, vizes közeg, fiziológiásan stabil, termodinamikusan kedvezményezett, sztereospecifikus

Bioortogonális modulok

- Célvegyület (biomolekula)
- „Kémiai hírvivő” – bifunkciós, biokompatibilis mesterséges vegyület, amelyhez szelektíven kapcsolható a cél- és a jelzővegyület is. (metabolizmus, genetikai kód kiterjesztése)
- Jelzővegyület (fluoreszcens, radioaktív, NMR aktív)

Jelzés bevitele két lépésben

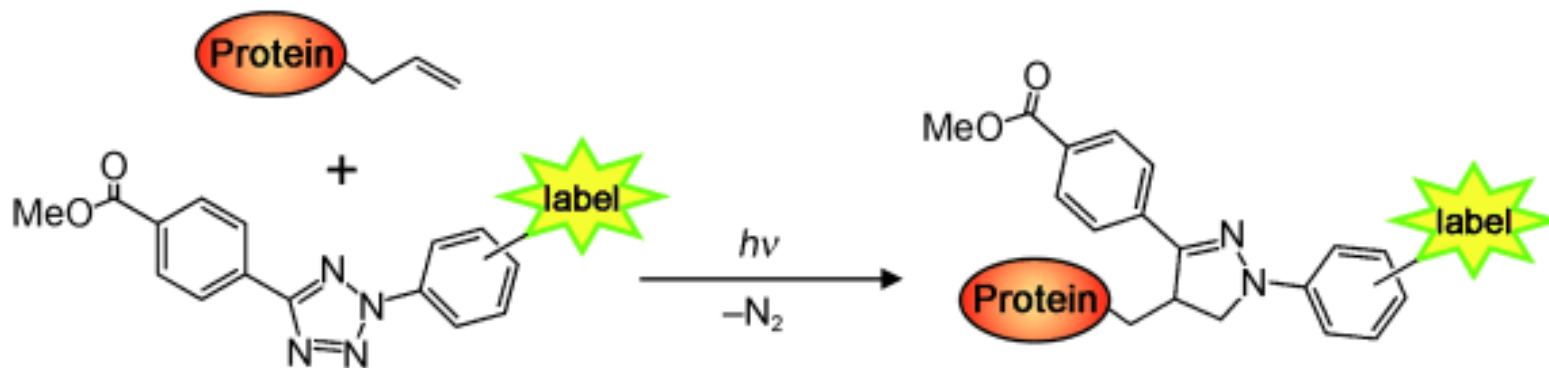
- Először a kémiai hírvivő, majd a jelzés
- Kisebbségi módosítás, kevésbé befolyásolja a tulajdonságokat, könnyebb bevinni
- Fluoreszcens jelzésnél lehet pl. fluorogén jelzést alkalmazni (nincs háttérfluoreszcencia)



Bioortogonális reakciók

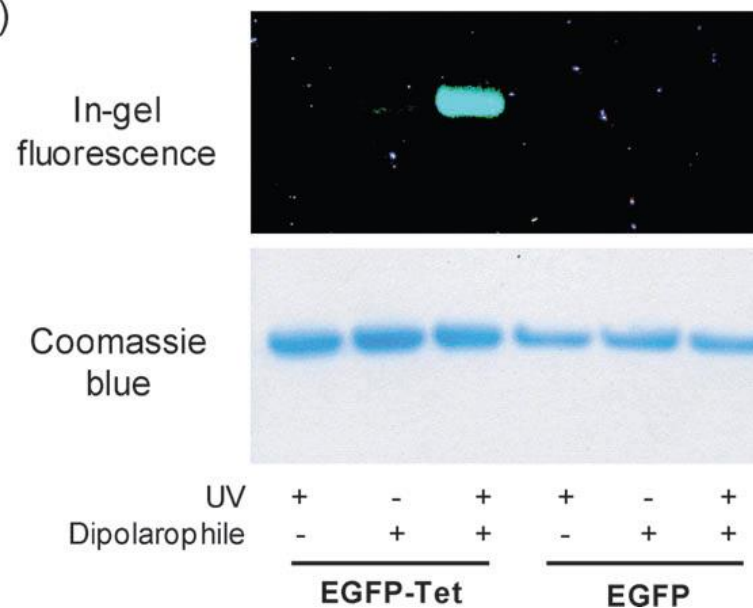
- Fotoindukált cikloaddíció (tetrazol + olefin)
- Staudinger ligáció (azid + foszfin)
- Azid-alkin cikloaddíció Cu(I) katalizált / Cu mentes
- Diels-Alder reakció (tetrazin + transz ciklooktén)

Fotoindukált 1,3 dipoláris cikloaddíció

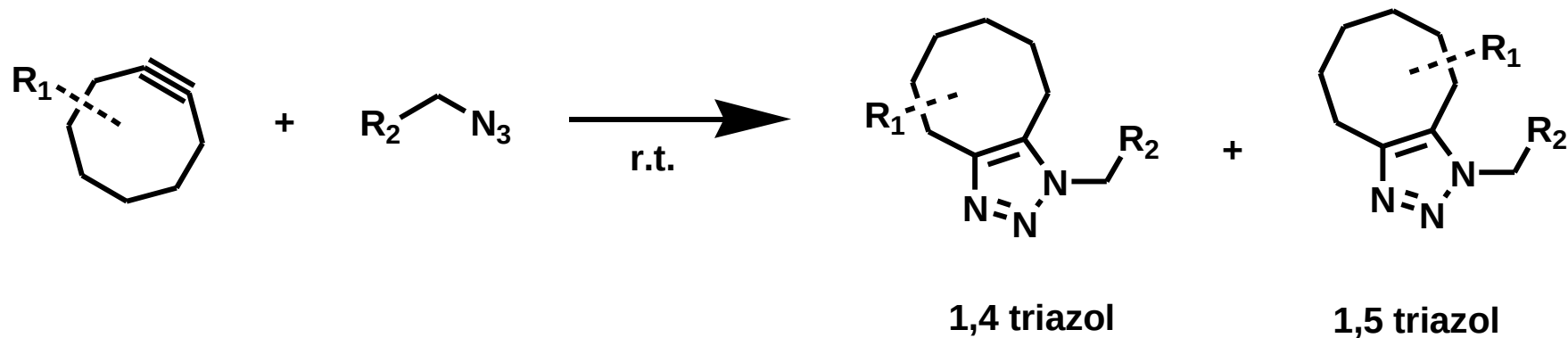


- Gyors
- Szelektív
- Fluoreszcens termék (nincs háttérfluoreszcencia)
- UV fény

b)

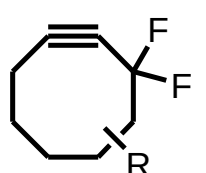
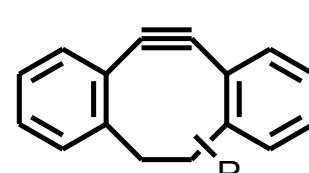
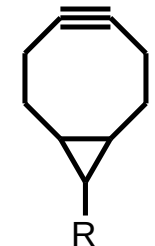
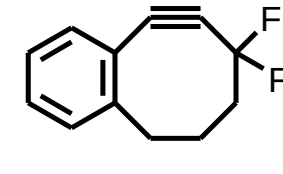
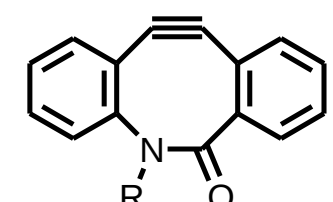
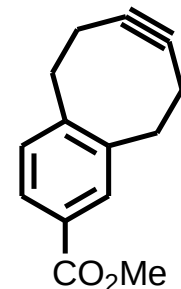


Cu(I) mentes klikk reakció



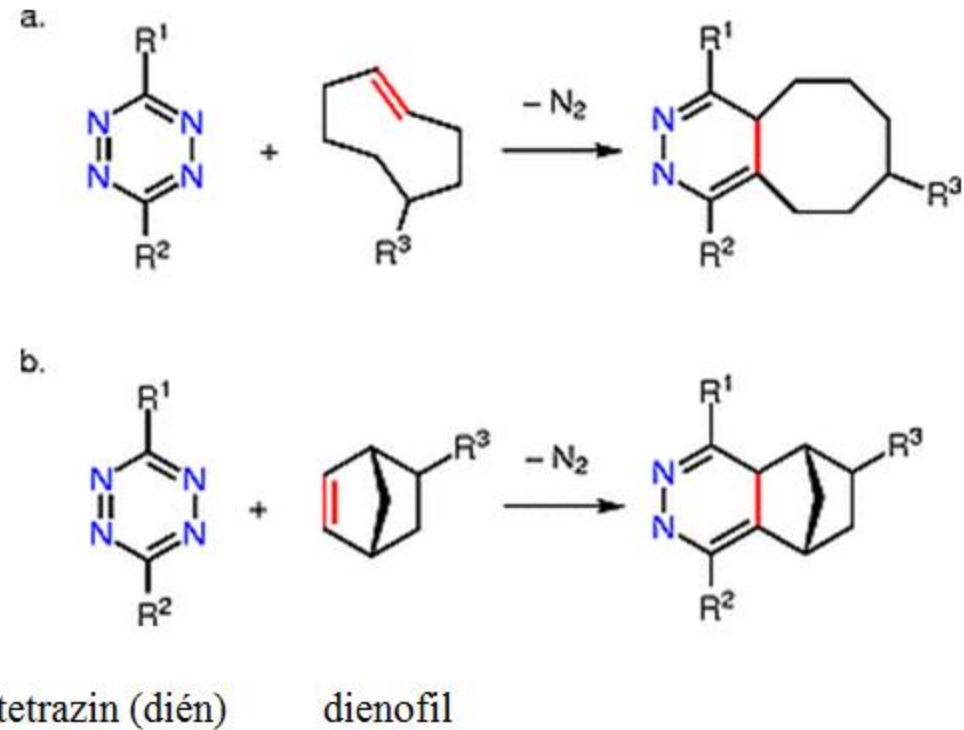
- $\text{-C(sp}^3\text{)-C(sp)-} = 155\text{-}163^\circ$
- $\sim 75,3$ kJ/mol gyűrűfeszültség
- Nem szükséges Cu(I)
- Lassabb, bonyolult reagensek

Ciklooktin reagensok

					
DIFO	DIBO	<i>endo/exo</i> BCN	DIFBO	BARAC	COMBO
0.08^[a]	0.05^[a]	0.14 / 0.11^[b]	0.22^[a]	0.96^[a]	0.24^[a]
		0.29 / 0.19^[c]			0.80^[d]
				clogP = 4,8	clogP = 1,9

[a] acetonitril [b] víz-acetonitril (1:3 v/v) [c] víz-acetonitril (2:1 v/v) [d] víz-acetonitril (3:4 v/v)

Diels-Alder reakció



- Biokompatibilis
- Gyors
- Bonyolult reagensek (transz-ciklooktén)

Példa: Vimentin fehérje kettős fluoreszcens jelölése géntechnológiai úton

Az amber STOP kodon beillesztése (Quickchange)

- Az oligonukleotid primer pár megtervezése a felsorolt szempontok figyelembe vételével (GC-gazdag, 3' és 5' 15 bp, komplementer, középen a mutációt tartalmazza)

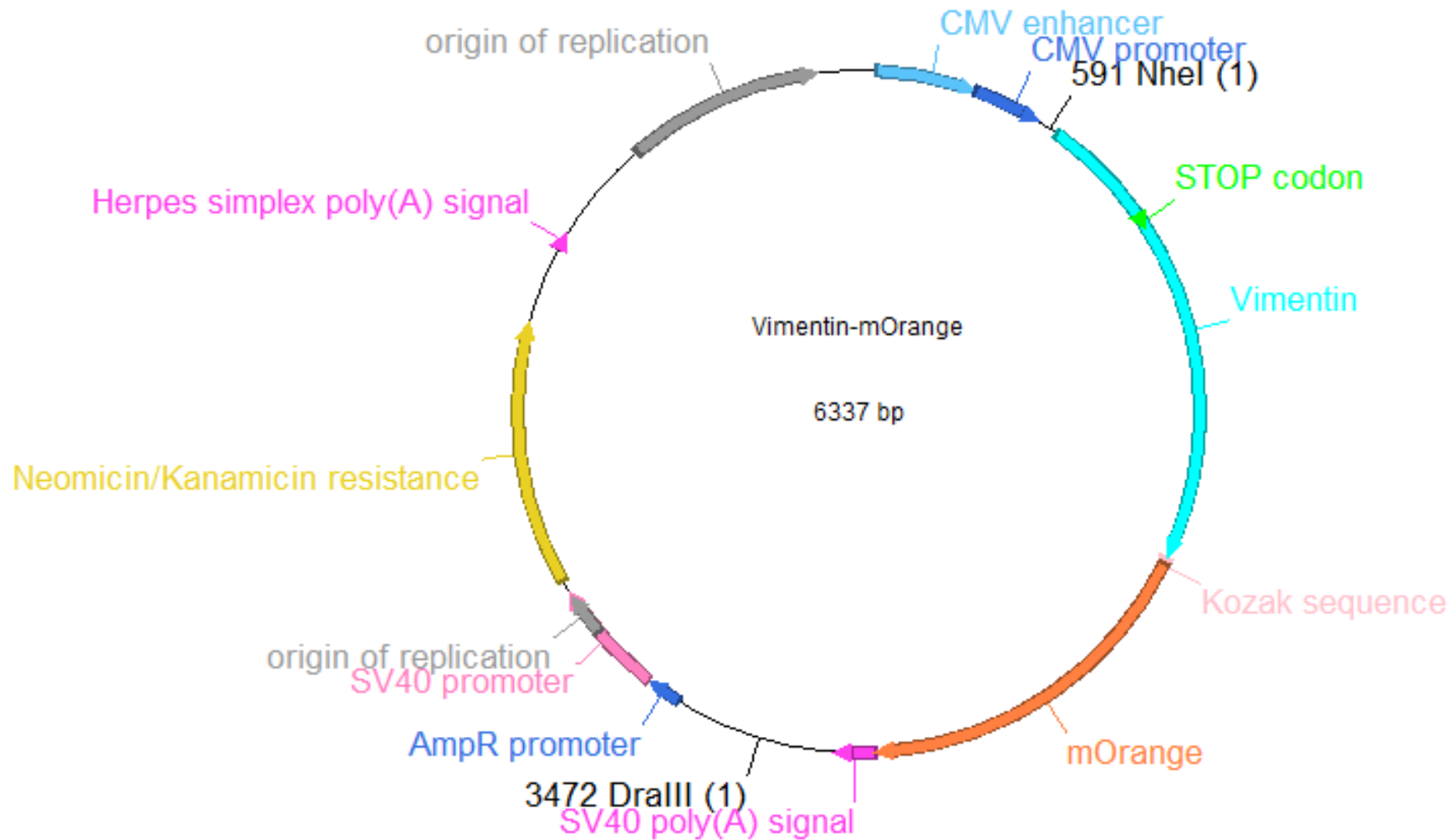
Primer pár amber STOP kodon (TAG) bevitelére a vimentin cDNS N116 helyére:

Forward (3' irányba): ctgaatgaccgcttcgccTAGtacatcgacaaggtg

Reverse (5' irányba): caccttgatgatgtaCTAaggcgaagcggtcattcag

- PCR reakció az előzőleg elkészített vimentin-mOrange plazmiddal és a fenti primer párral DNS-polimeráz (*Phusion*) hozzáadásával (TAG helye: Vim, Vim-mOrange közti linker v mOrange)
- A PCR reakció termékét DpnI enzimmel emésztettük a templát DNS elbontása érdekében (4-5 h 37 °C inkubáció)
- A DpnI enzimet dezaktiváljuk 80 °C-on 10 perc alatt
- Innen az előzőekhez hasonlóan járunk el: a kapott plazmidot Top10 *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáljuk elektroporáció segítségével
- A baktériumsejteket kanamicint tartalmazó agar táptalajon növesztjük egy éjszakán keresztül
- Néhány kolóniát kiválasztunk, melyekből miniprep-et készítve szaporítjuk fel és tisztítjuk a kívánt plazmidot
- A plazmid helyességét (az amber STOP kodon jelenlétét) szekvenálással ellenőrizzük

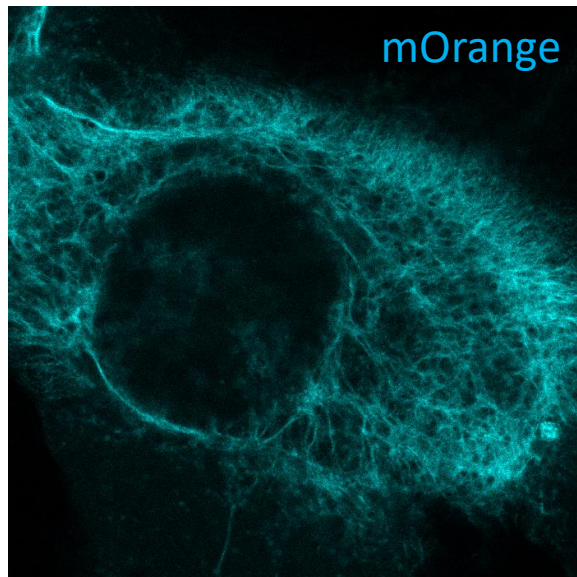
A vimentin^{116NTAG}mOrange plazmid felépítése



Példa: Vimentin fehérje fluoreszcens jelölése géntechnológiai úton

A vimentin^{N116TAG→BCN}mOrange expressziója eukarióta sejtekben

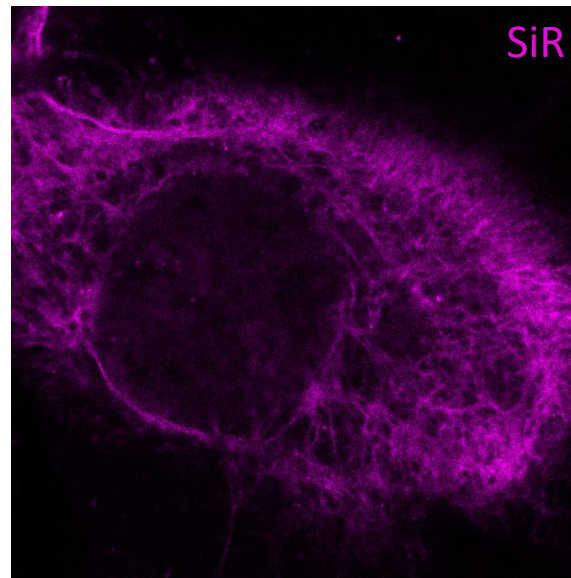
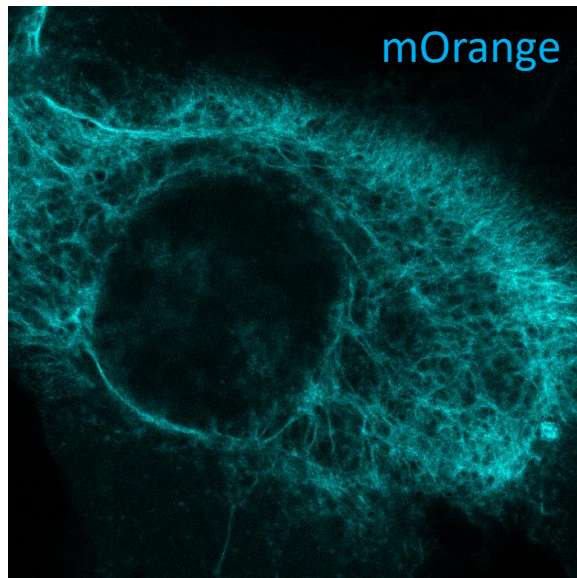
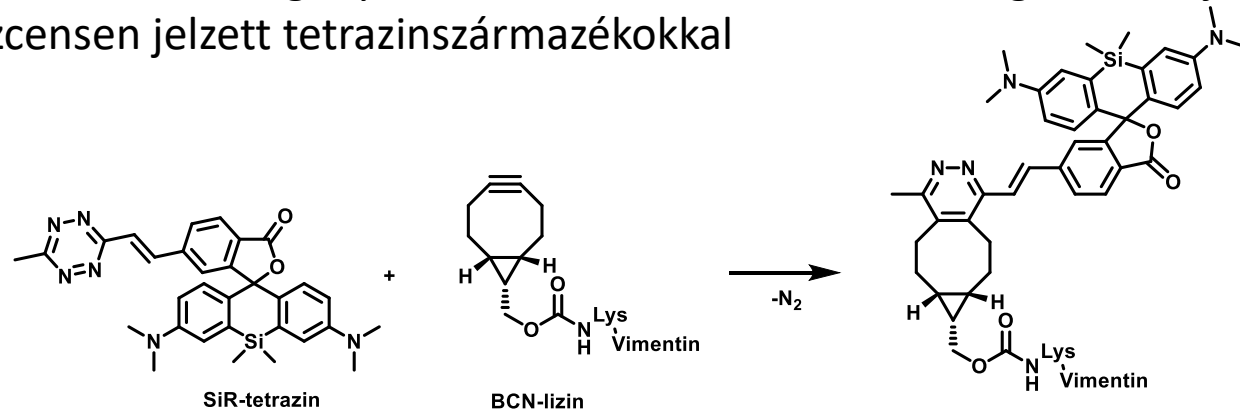
- Az amber STOP kodon helyére a vimentinbe a 116-os pozícióba BCN-lizint építünk pirrolizin(Pyl)-tRNS és tRNS-szintetáz (RS) pár segítségével, így a fehérje ezen a módosításon keresztül bioortogonálisan jelölhetővé válik
- Ko-transzfekció COS7 emlős sejtekbe: több plazmid (Pyl-tRNS, RS, vimentin^{N116TAG}) egyidejű bejuttatása sejtekbe kationos lipid transzfekciós reagens (lipofektamin) segítségével
- A transzfekció sikerességének ellenőrzése fluoreszcens mikroszkóppal (sikeres transzfekció esetén a fluoreszcens vimentin a sejtekben mikroszkóposan detektálható)



Példa: Vimentin fehérje fluoreszcens jelölése géntechnológiai úton

4. A vimentin^{N116TAG→BCN}mOrange fluoreszcens jelölése

- A BCN inverz elektronigényű Diels-Alder reakcióban bioortogonálisan jelölhető fluoreszcensen jelzett tetrazinszármazékokkal

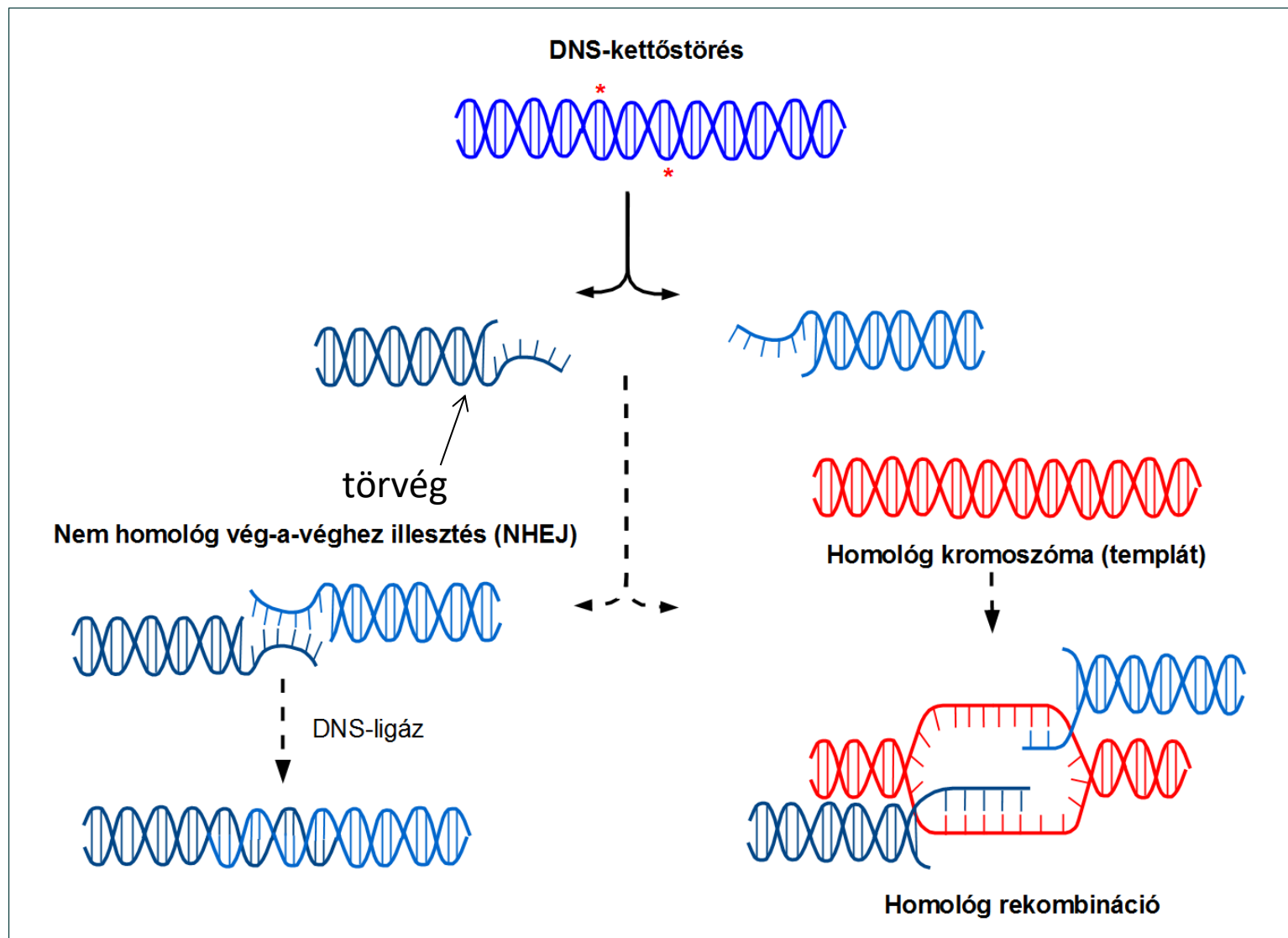


Kolokalizáció a két fluoreszcens jel között (átfednek teljesen): ez annak a jele, hogy a Diels-Alder reakció specifikusan lezajlott

Célzott génmódosítás, genomszerkesztés

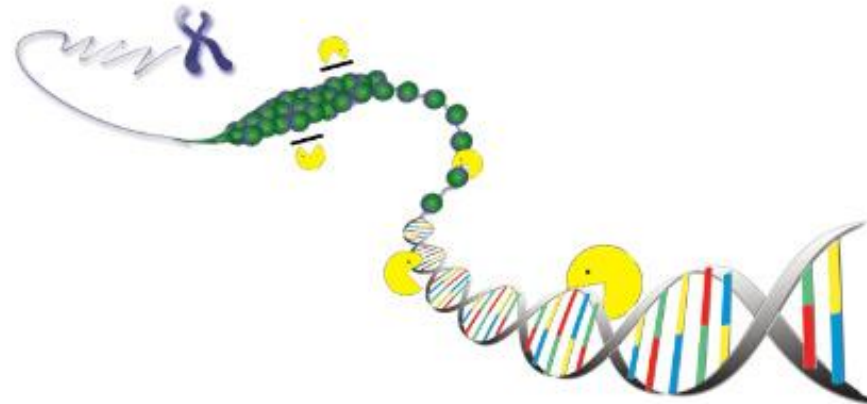
- Plazmidokkal és egyéb külsőleg bevitt, genetikailag **nem stabil** elemekkel nem lehet a legtöbb organizmus saját, belső működését tartósan megváltoztatni
- Ha az élőlények **saját DNS-ét (genomját)** akarjuk megváltoztatni, az sokkal bonyolultabb:
 - a kromoszómák *sokkal nagyobb méretűek* (millió-milliárd bp), nem tudunk kellően rövid de mégis egyedi szekvenciákat találni, a restriktációs endonukleázok ezért nem használhatók
 - A kromoszómák *fizikai mérete* is sokkal nagyobb, egy-egy ekkora makromolekula manipulálása, bejuttatása bonyolult feladat
- A célzott génmódosítási eljárások a **DNS kettős törések javítómechanizmusán** alapulnak

DNS kettőstörés javító mechanizmusok



Célzott génmódosítás DNS kettős törésen keresztül

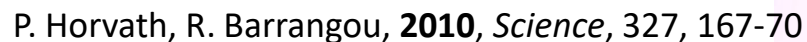
- Ha a sejtekbe **linearizált rekombináns DNS**-t juttatunk (nagyobb hatékonyságú, mint a cirkuláris), akkor azt az eukarióta sejtek törvédként fogják érzékelni és ez aktiválni fogja a kettős törést javító mechanizmusokat→keresztezni fogja saját kromoszómájával→genomjában célzottan módosított élőlény jön létre
- Szükségünk van hozzá:
 - Endonukleázra (mely a DNS kettős spirálját elvágja)
 - Megfelelően megtervezett templátra, amit beépítünk
 - Felismerő régióra, amely elvezeti az endonukleázt az elvágandó pozícióhoz
- Nukleázokon alapuló módszerek:
 - Meganukleáz
 - Zinc finger nukleáz
 - TALEN
 - **CRISPR-Cas9**



- Clustered
- Regularly
- Interspaced
- Short
- Palindromic
- Repeats

Bakteriális szerzett immunitás:

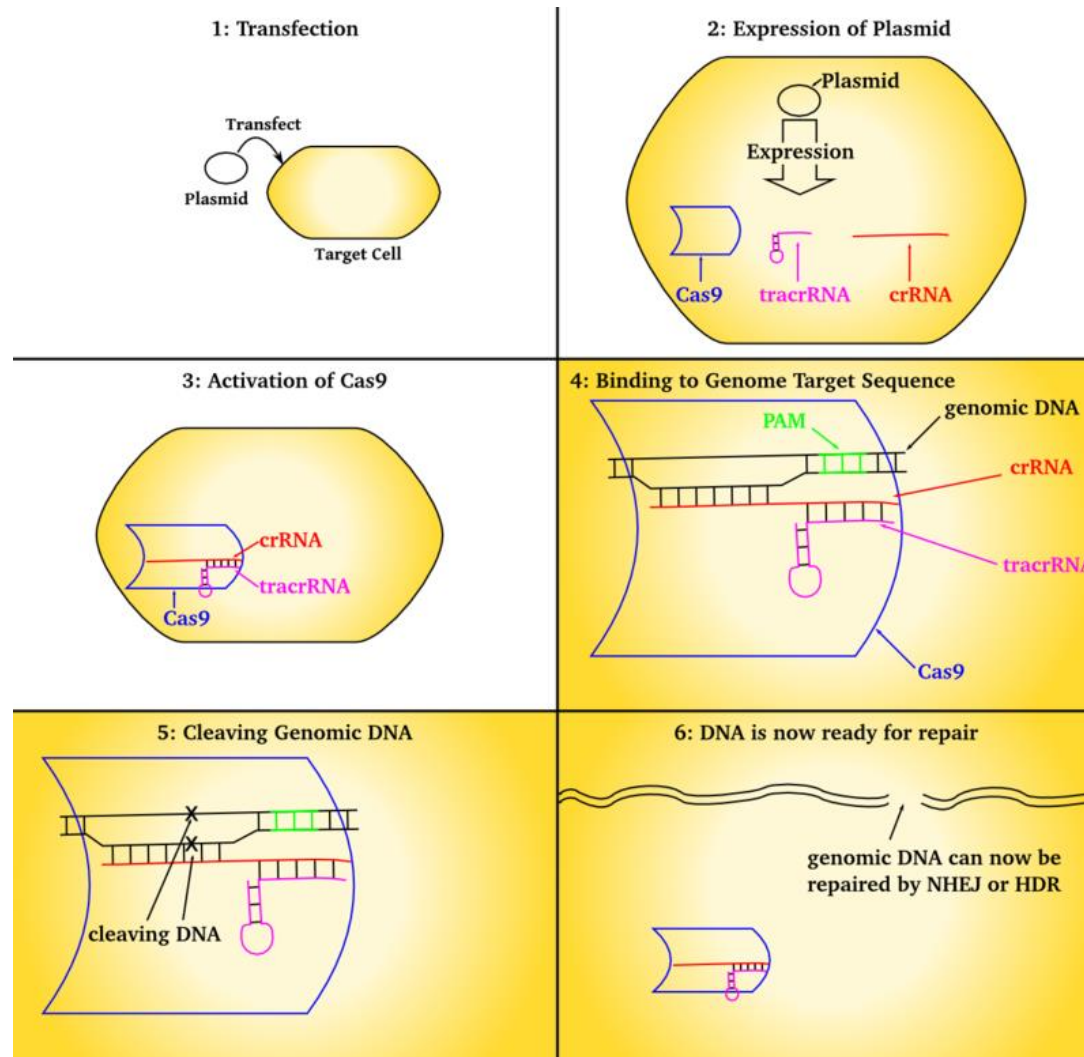
- Protospacer virális DNS-ből
- Cas beilleszti ismétlődő szekvenciák közé
- Vírustámadáskor átíródik (pre-crRNA)
- CRISPR kivágása (Cas)
- crRNS Cas9 nukleázhoz köt
- Cas9 crRNS által meghatározott szekvenciánál elvágja a virális DNS-t
- Vírus inaktiváció



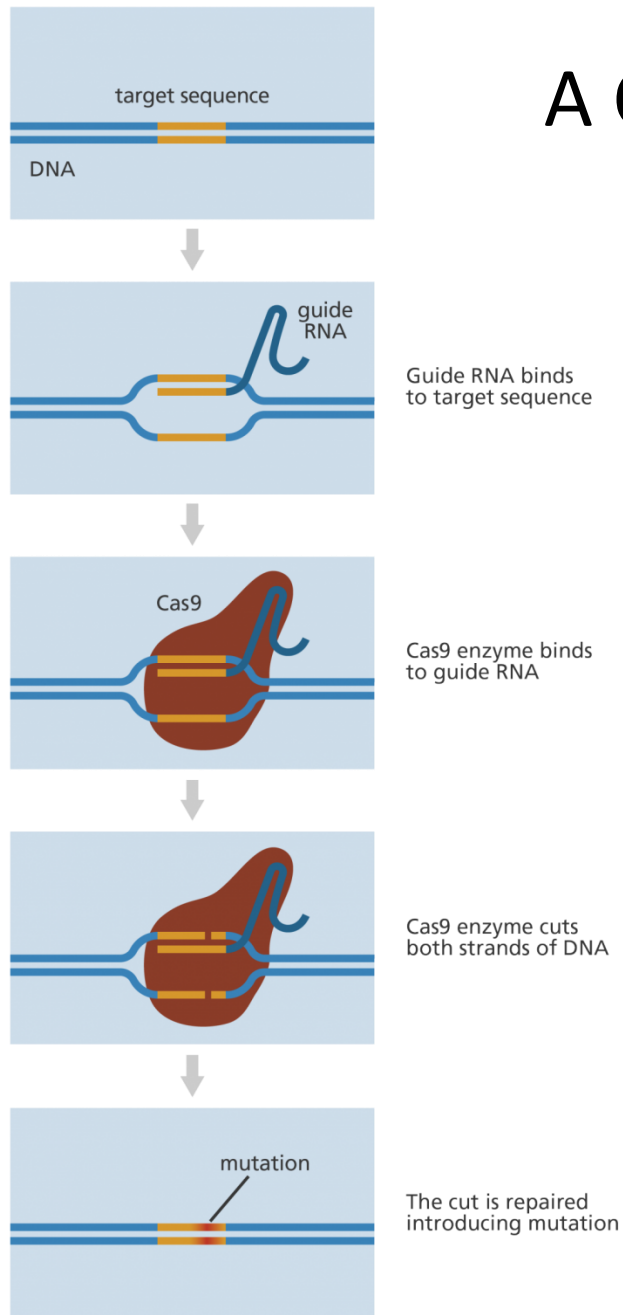
CRISPR-Cas9 rendszer részei

- **crRNS (CRISPR-RNS):** a protospacer-ről íródik át (pre-crRNS), amit a Cas1/2 enzim alakít tovább crRNS-sé. A Cas9 nukleázt irányítja a módosítandó pozícióba a kettősszalú DNS-en.
- **tracrRNS (transactivating RNS):** a crRNS-sel hibridizálódik, az általuk képzett RNS-komplex kötődik a Cas9 nukleázhoz.
- **Guide RNS:** A tracrRNS és a crRNS komplexe, mely a Cas9 enzimhez kötődik és a módosítani kívánt pozícióba irányítja azt.
- **Cas9:** a kettős szálú DNS specifikus pozícióban való elvágására képes nukleáz.
- **PAM (protospacer adjacent motif):** közvetlenül a kettős szálú DNS módosítani kívánt szakasza után lévő rövid (2-6 bp) szekvencia, mely a genomban máshol nem fordul elő. A Cas9 enzim-felismeréséhez szükséges.

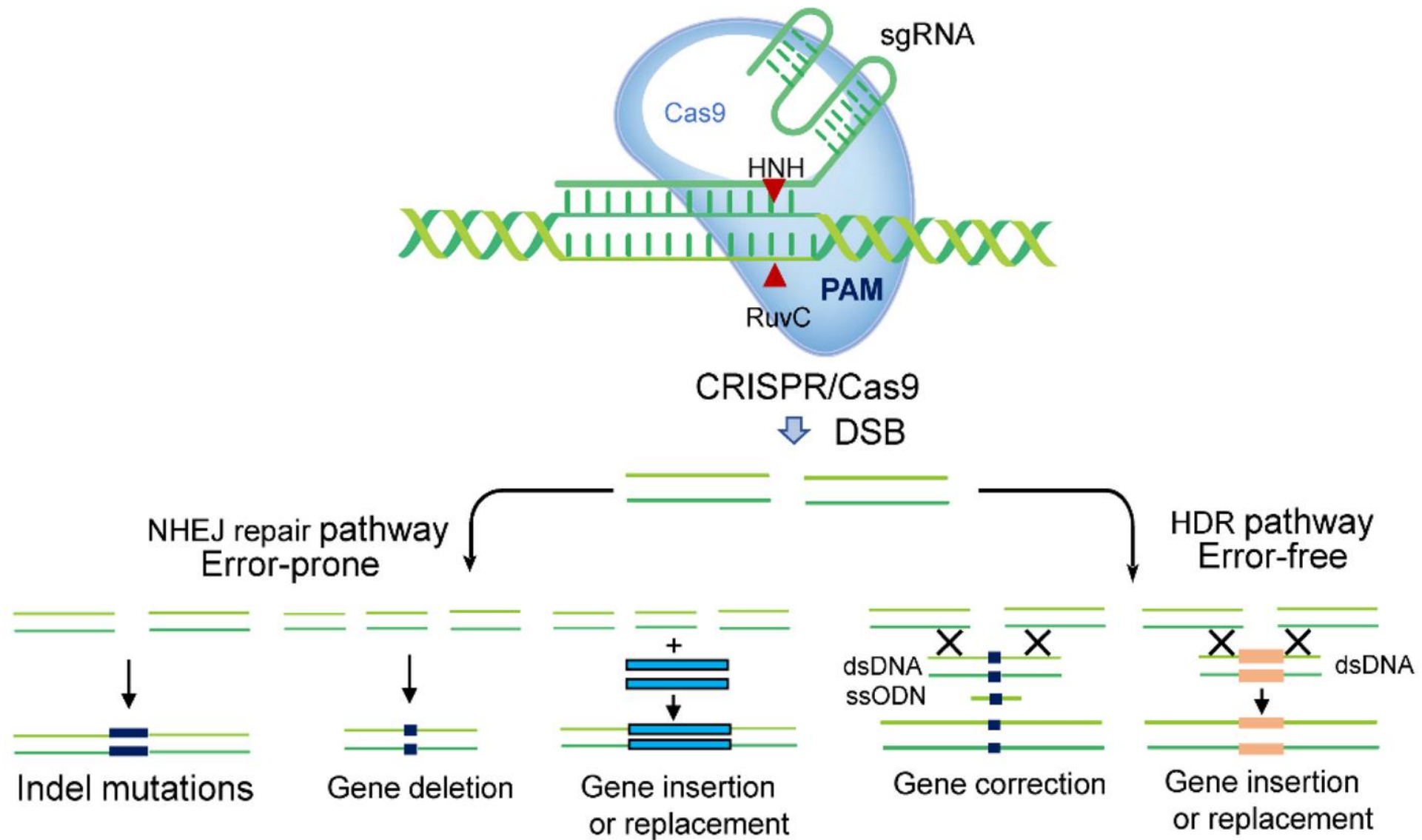
CRISPR-Cas9 rendszer részei



A CRISPR-Cas9 rendszer működése:



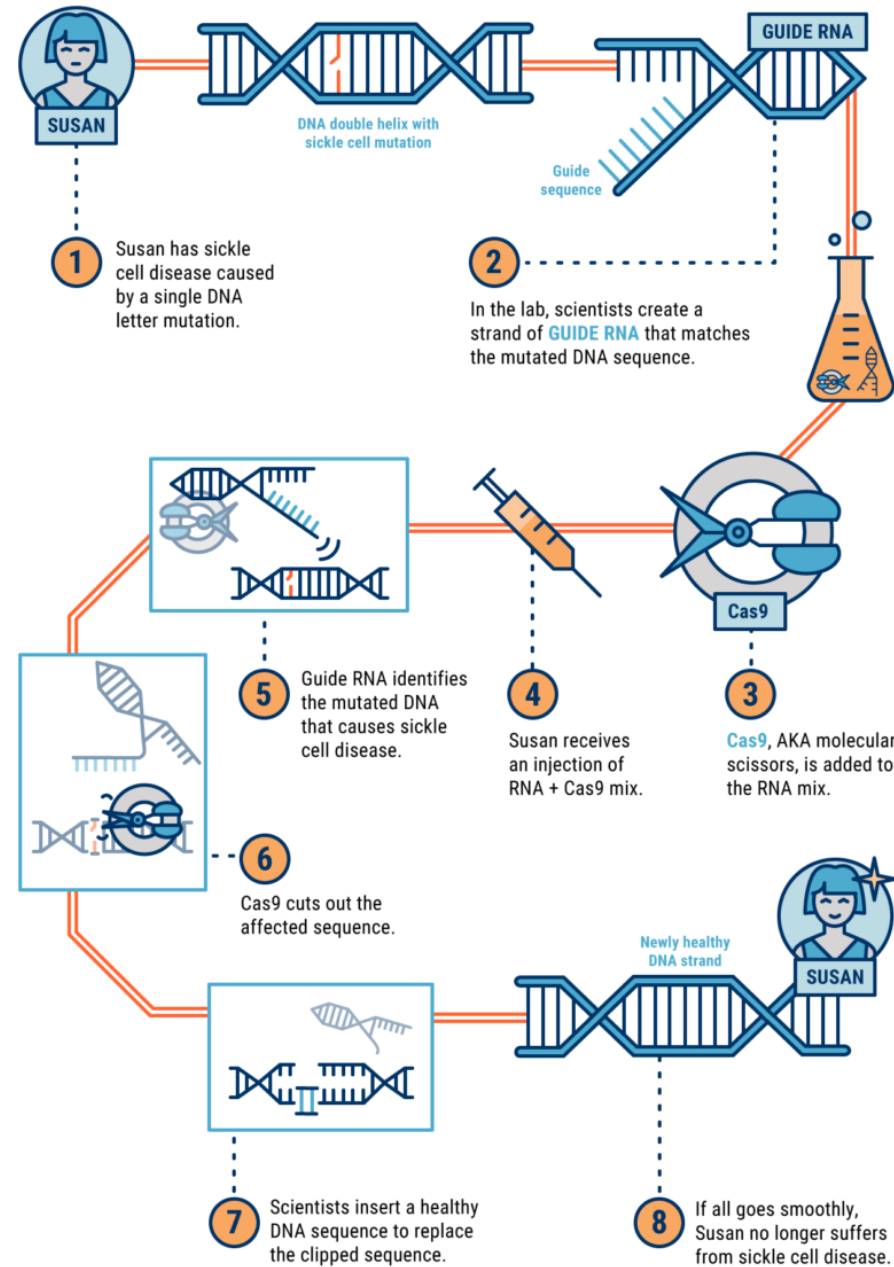
- 1) Az általunk megtervezett guide RNS (mely tartalmazza a módosítani kívánt DNS-szakasszal komplementer crRNS-t (20 bp), a fix tracrRNS-t, és a PAM motívumot (NGG)) hibridizál a kettős szálú DNS egyik szálával
- 2) A Cas9 felismeri a guide RNS-t, hozzákötődik és elhasítja a kettős szálú DNS-t (*double-strand break*)
- 3) A DNS-törés helyén beindulnak a sejt saját DNS javító mechanizmusai és az általunk bevitt, módosítást tartalmazó (javító)templát DNS-t használva templátként (a vágás helyétől mindkét irányban tartalmaz egy 40-90 bp-os komplementer régiót), helyreállítja a kettős szálú DNS-t (homológ rekombináció)
- 4) A helyreállított DNS tartalmazza a kívánt mutációt



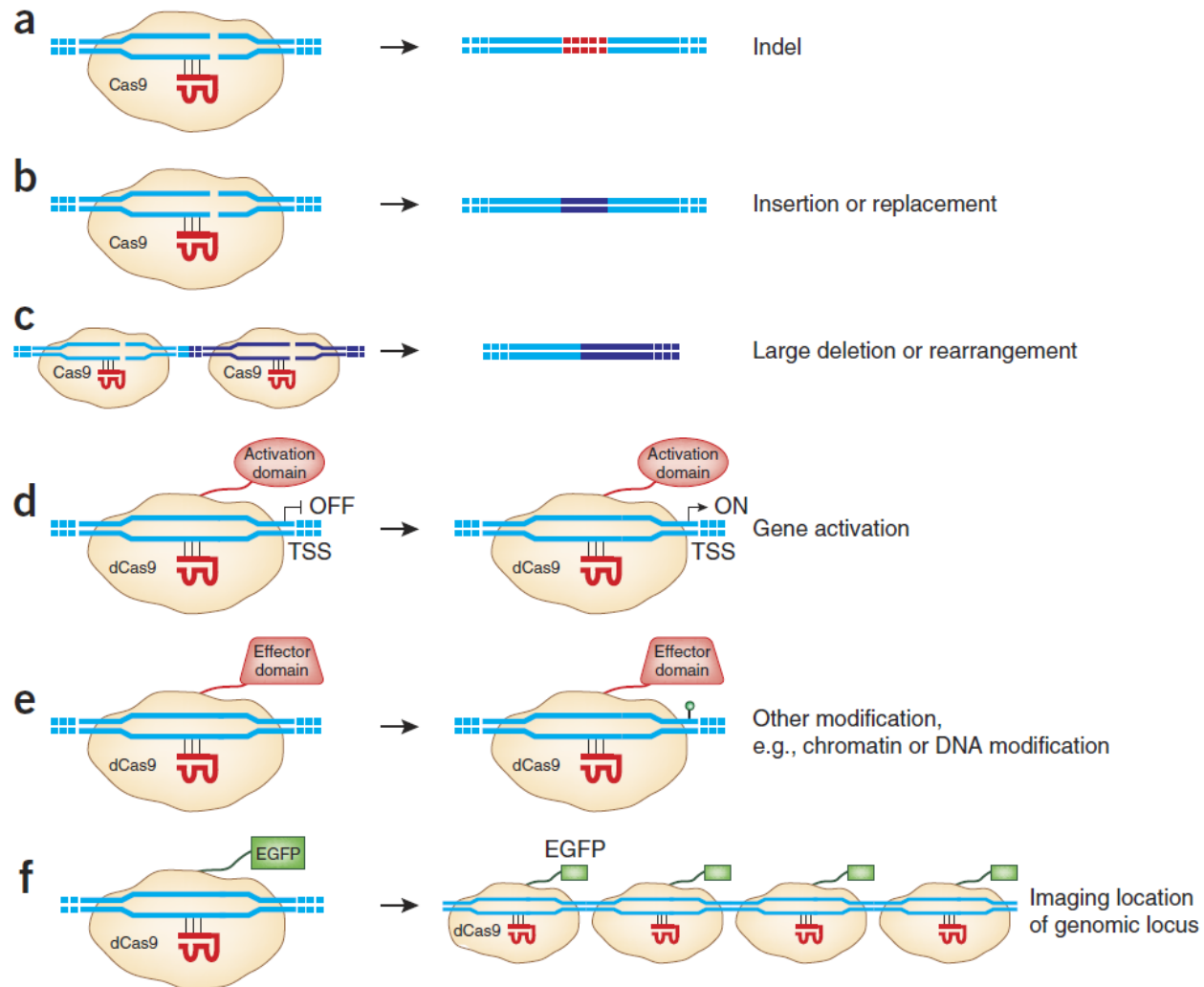


What Is CRISPR?

UNDERSTANDING HOW THE CRISPR GENE-EDITING PROCESS WORKS



Genomszerkesztési lehetőségek



CRISPR-Cas9 alkalmazásai

GENETIKA KUTATÁS

- ~2000 gén azonosítása (pl. ASXL1 myeloid leukémia)
- Állatmodellek genetikai betegségekre

MEZŐGAZDASÁG

- Rezisztens fajok
- Nem barnuló gomba
- Tápanyag-dúsított fajok

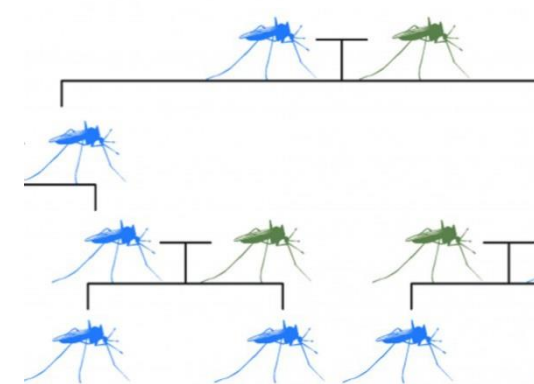
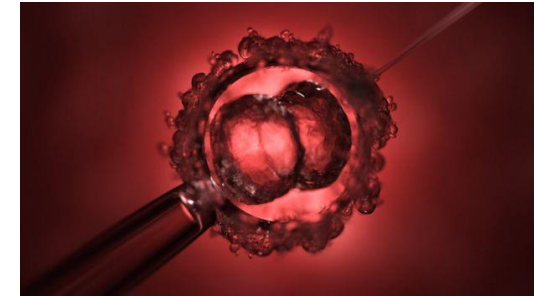
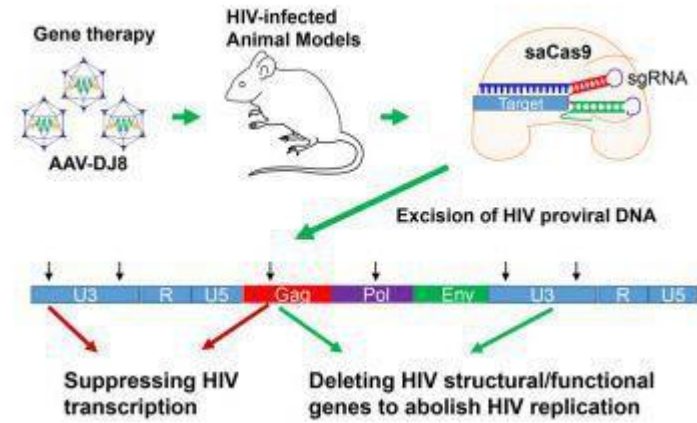
BIOTECHNOLÓGIA

- Probiotikus kultúrák
- Antibiotikumok, vakcinák fejlesztése
- Bioüzemanyag
- Zöldkémiai alapanyagok termelése

GYÓGYÁSZAT

- Cisztás fibrózis
- AIDS (HIV-egér modell, *ex vivo* betegek vérésejtjeiben)
- Duchenne izom-disztrófia
- Sarlósejtes anémia
- Sztatin-rezisztens hiperkoleszterinémia és hiperlipidémia
- T-sejt függő rákos megbetegedések (US clinical trial)
- Retinitis (egér modell)
- Genetikai alapú májbetegségek (PCSK9-egér modell)
- Májrák (egér modell)
- Hepatitis, Herpes, HPV
- Immunterápia
- Tüdőrák (Kína-klinikai fázis)
- Malária, Zika elleni védekezés (szúnyogok sterilizálása)

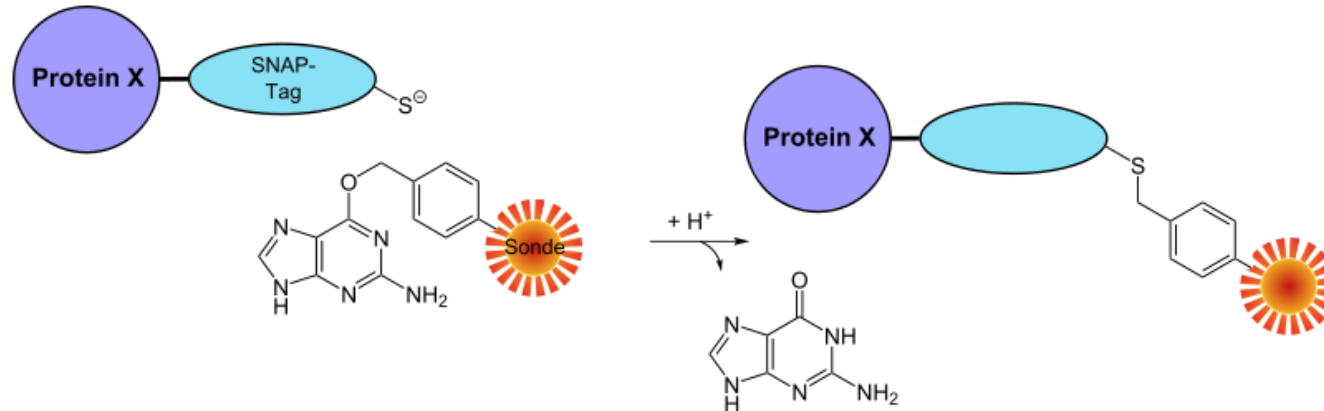
CRISPR-Cas9 alkalmazásai



Példa: CRISPR-Cas9 alkalmazása vimentin fluoreszcens jelölésében

- A vimentin fluoreszcens jelölése ebben az esetben **SNAP-tag**-en keresztül történt:

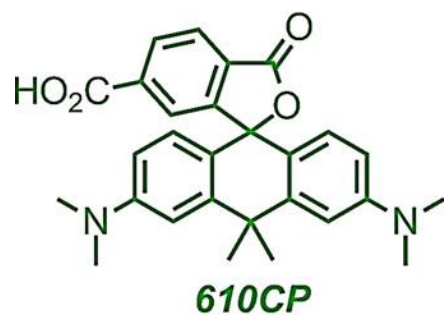
– SNAP-tag:



- A SNAP-tag fúziós fehérje, amelyet a célfehérjéhez kötünk, csakúgy mint a fluoreszcens fehérjét, azonban a fluoreszcens jelölést ebben az esetben kismolekulás szerves festékekkel végezzük
- CRISPR-Cas9 rendszert alkalmazva az emlős U2OS sejtek saját genomjában lévő vimentin gént cserélték ki annak SNAP-tag-gel fuzionált verziójára

Példa: CRISPR-Cas9 alkalmazása vimentin fluoreszcens jelölésében

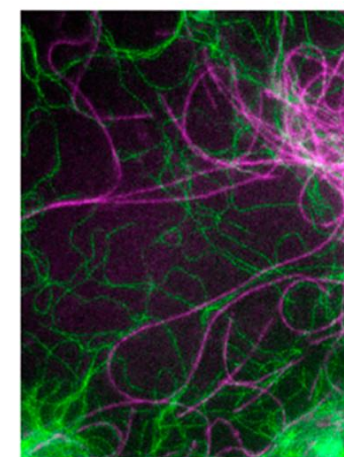
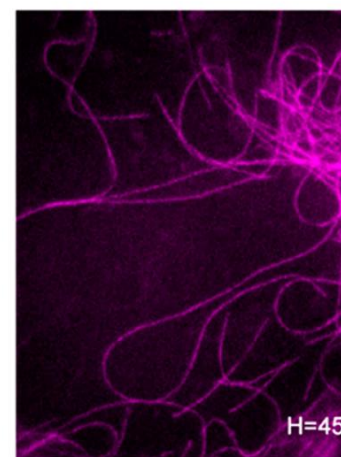
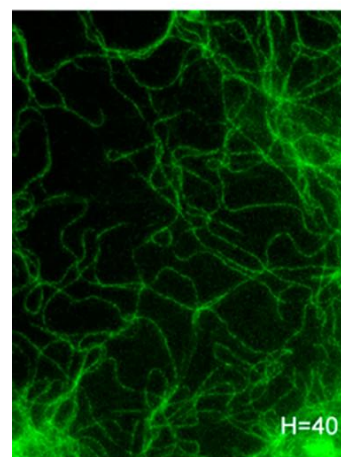
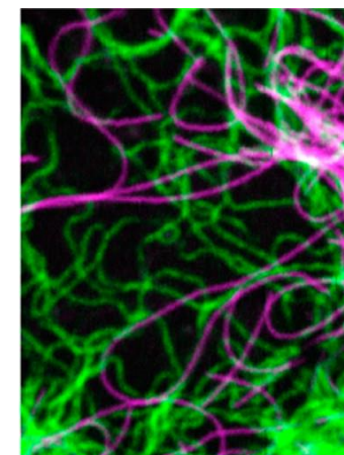
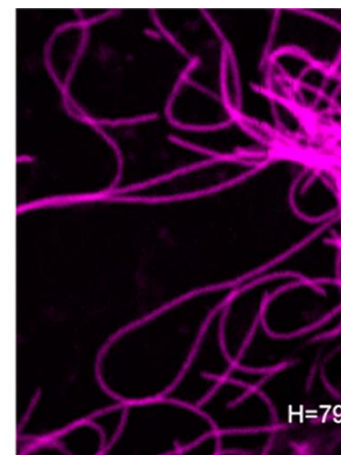
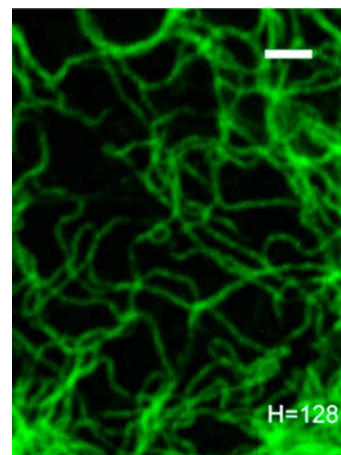
1. A guide RNS elkészítése, mely a vimentin génjéhez vezeti a Cas9 enzimet
2. Ún. *donor mátrix* készítése, mely tartalmazza a bevinni kívánt génszakaszt (tartalmaz egy kb 600-900 bp hosszú homológ kart a kicserélendő génnel + a SNAP-tag-et)
3. U2OS emlős sejteken ko-transzfekciót végzünk a donor mátrix, a guide RNS és a Cas9 enzimet kódoló plazmidokkal
4. 1 hét múlva fluoreszcensen jelzett SNAP-ligandumot adunk a sejtekhez, mely a módosított vimentin-SNAP-tag-hez kötődik, így fluoreszcens mikroszkóppal detektálható
5. A fluoreszcensen jelzett sejteket áramlási citométerrel (fluorescence activated cell sorting – FACS) kiválogatjuk (az össz. Sejtpopuláció mindössze 0,1-5%-a) és tovább növesztjük
6. A megnövesztett sejteket 2-3 hét múlva újra ellenőrizzük fluoreszcens mikroszkóppal, és a pozitív sejtpopulációk genomját PCR-rel és Western blot-tal ellenőrizzük (tényleg a SNAP-tag-gel jelölt vimentin van-e a genomban)



Átfedés

konfokális

STED



71