

PRIMENA GENETIČKOG INŽENJERINGA

Doc. dr Snežana Marković
Institut za biologiju i ekologiju
Prirodno-matematički fakultet
Univerzitet u Kragujevcu

MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA - MBT

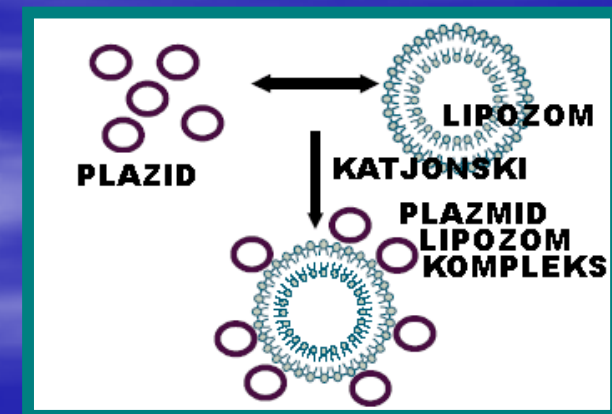
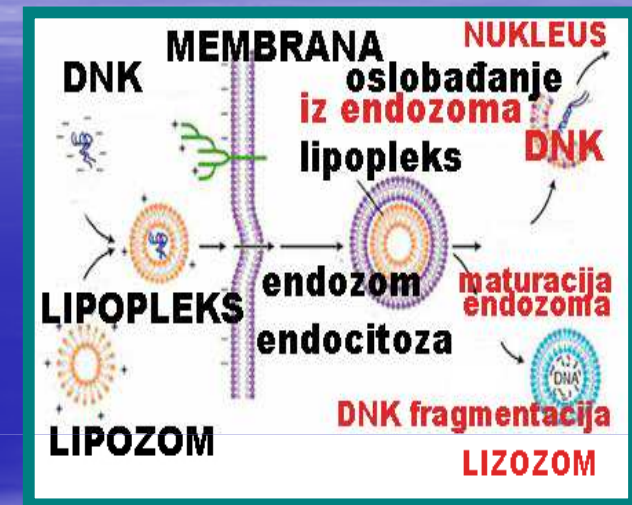
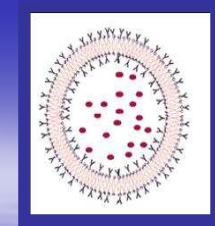
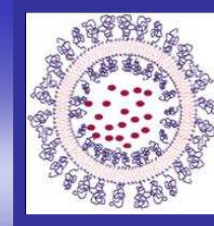
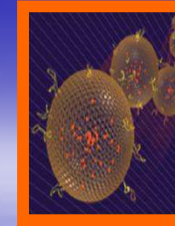
TEHNOLOGIJA REKOMBINOVANE DNK

GENETIČKO INŽENJERING

KLONIRANJE DNK

- MBT – niz tehnika pomoću kojih se može manipulirati malim fragmentima genoma ili pojedinačnim genima, u cilju ispitivanja njihove strukture, regulacije ekspresije gena, upoznavanja strukture i uloge njihovih proteinskih produkata
- MBT – upoznavanje osnova života – mogućnost menjanja osnova života
- Primena u fundamentalnim i primenjenim naučnim disciplinama
- Kloniranje DNK – dobijanje velikog broja identičnih fragmenata DNK, počev od jednog koji se umnožava mnogo puta
- Kloniranje DNK 1973. g.; 1976. g. kloniran somatostatin, zatim insulin

- **TRANSFEKCIJA** – unošenje i ekspimiranje kloniranih gena/DNK fragmenata u eukariotsku ćeliju
- **EUKARIOTSKE ĆELIJE GAJENE U KULTURI** se tretiraju da bi im se povećala propustljivost membrane i izvršilo ubacivanje željenog gena/segmenta DNK:
 - (1) elektroporacija,
 - (2) tretman lipidima,
 - (3) mikroprojektilima
 - (4) mikroinjeciranjem
 - (5) DNK ili RNK virusima (najviše korišćeni retrovirusi)
 - (6) koprecipitat sa kalcijum fosfatom; ova metoda se prvo razvila za indukciju infektivne, viralne DNK u životinjsku ćeliju i nazvana je transfekcija.

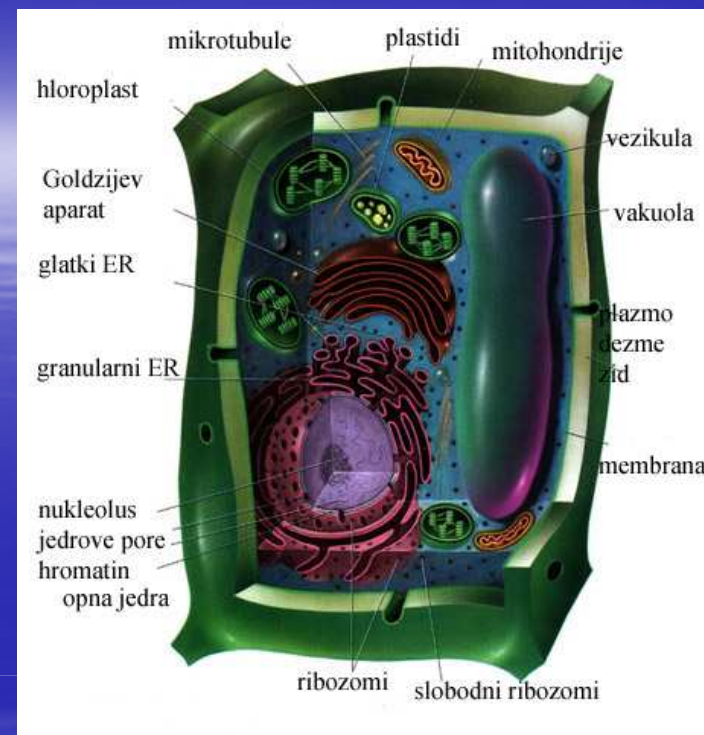


MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA BILJAKA

GENETSKI MODIFIKOVANE BILJKE

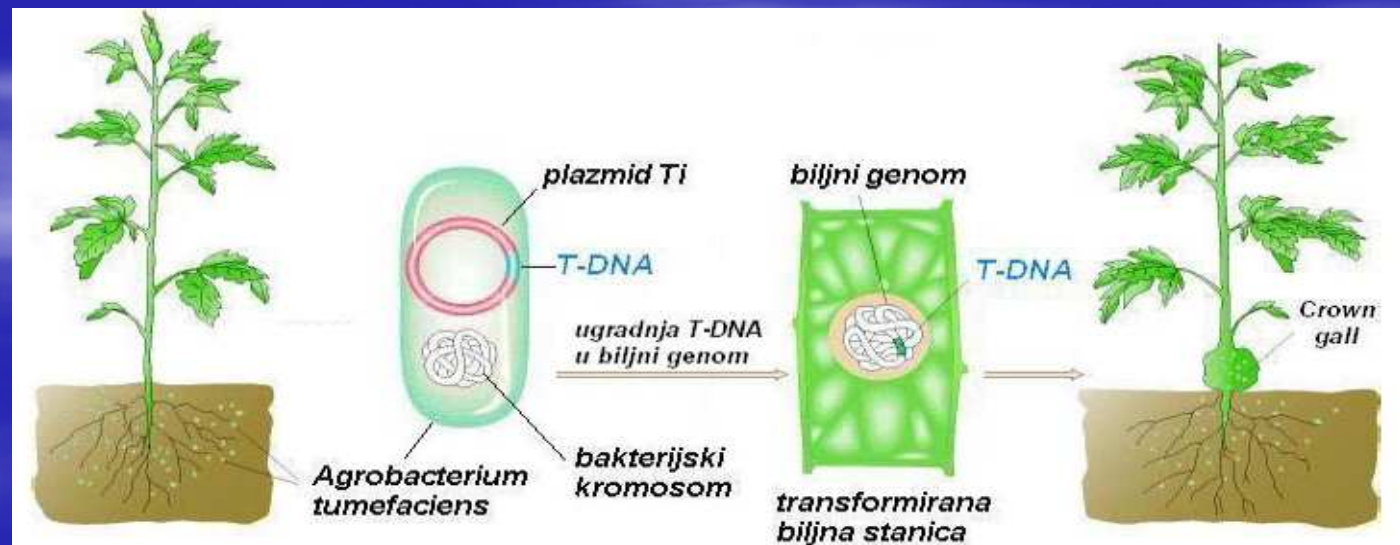
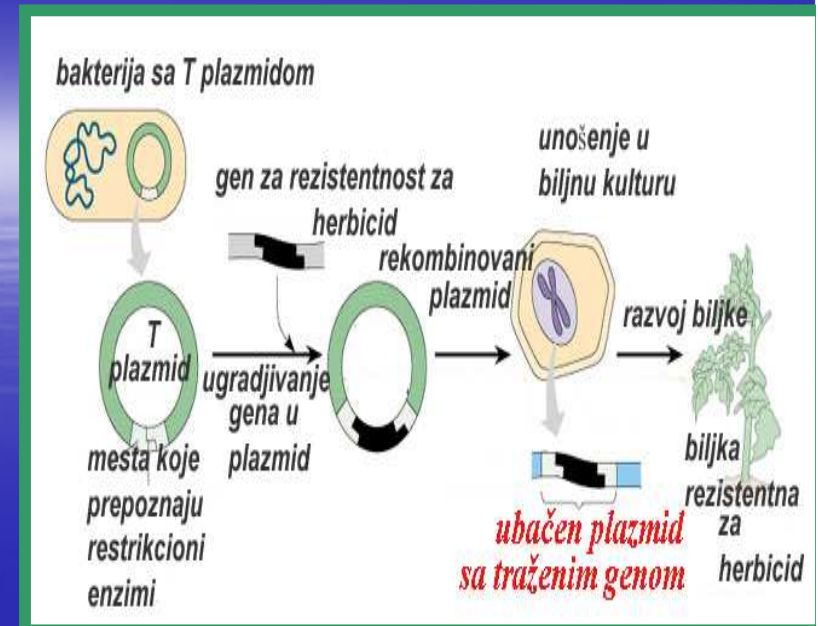
- Cilj tehnologije rekombinovane DNK ili genetičkog inženjerstva je planska promena genoma živih organizama.
- Planska promena genoma se najčešće izvodi »isecanjem gena« (transgena) za neko svojstvo iz jednog organizma i njegovim presađivanjem i transformacijom u drugi. Na ovaj način nastaju genetski modifikovani organizmi (GMO) tj. transgene biljke, životinje ili mikroorganizmi, čiji je genom »obogaćen« transgenom, čineći ih tako korisnijim za čoveka.
- Konstrukcija novih varijeteta kultivisanih biljaka (transgene biljke), odnosno poljoprivrednih kultura; dobijanje varijeteta koji daju veći prinos sa istim ili povećanim hranljivim kvalitetom biljke.
- Transgene biljke rezistentne na insekte, patogene, herbicide, stresore sredine...
- Transgena soja, kukuruz, pamuk.
- Transgene biljke otporne na insekte dobijene ubacivanjem Bt (*Bacillus thuringiensis*) gena za sintezu proteina toksičnog za insekte.

- **Klonirana DNK ubačena u biljke.**
 - Uklanja se ćelijski zid – protoplast okružen plazma membranom.
 - DNK tada može biti ubačena elektroporacijom, primenom plazmida Ti iz *Agrobacterium tumefaciens*, bombardovanjem sa mikroprojektilima koji sadrže DNK, tehnikom “in planta”.
 - Ove partikule se ubacuju direktno u biljnu ćeliju, neke od ćelija bivaju ubijene, ali druge postaju stabilno transformisane.
- **Vektor koji efikasno ubacuje rekombinantnu DNK u biljnu ćeliju je dobijen iz biljnih virusa.**
- **Ti plazmid - u prirodi *A. tumefaciens* se vezuje za biljnu ćeliju, Ti plazmid se prebacuje u ovu ćeliju i ugrađuje u hromozomalnu DNK.**
- **Mnoge biljke mogu da se regenerišu iz pojedinačnih kultivisanih ćelija - transgena biljka može se direktno dobiti iz transgene ćelije**



- Ti plazmid je izolovan iz zemljišne bakterije *A. tumefaciens*.
- Kad bakterija inficira biljnu ćeliju deo Ti plazmida region T-DNK se integriše u genom biljke.
- Funkcije potrebne za ovaj transfer su na Ti plazmidu.
- T-DNK - kontroliše funkciju infekcije,
 - produkciju tumora i
 - sintezu jedinjenja nazvanih opini (nopalini i opopin)

Bakterija koristi opine za sopstvene potrebe .



Transgenične biljke na tržištu



Pamuk otporan na insekte - Bt (*Bacillus thuringiensis*) toksin ubija nametnike (*Helicoverpa zea*)

• *transgen* = Bt protein



Normalan

Transgenični

Kukuruz otporan na insekte - Bt toksin ubija nametnika *Ostrinia nubilalis*

transgen = Bt protein



Nova generacija transgeničnih biljaka



Zlatna riža - povećana količina vitamina A
transgen = tri enzima u biosintetskom putu vitamina A



suncokret - otpornost na bijelu plijesan
Bijela plijesan proizvodi toksične oksalate
transgen = oksalat oksidaza iz pšenice

Biljke otporne na herbicide

- Soja, kukuruz (na tržištu poznati kao "Roundup ready" usjevi)
- Uskoro šećerna repa, salata, malina, pšenica...)
- **Gliofozat i glufozinat** - najčešće klase herbicida u uporabi (komercijalno ime "Roundup")
- **Transgen** - modificirana EPSP sintaza ili fosfinotricin-N-acetiltransferaza

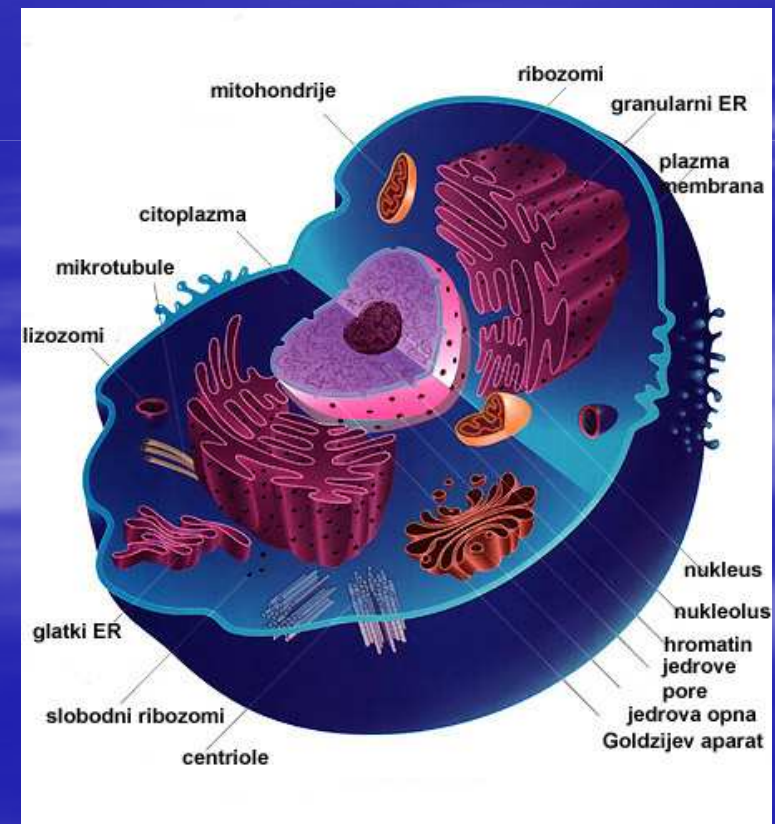


MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA ŽIVOTINJA

GENETSKI MODIFIKOVANE ŽIVOTINJE

- Transgene životinje nose gene iz drugih vrsta
- Prvo napravljen transgeni miš, pa zečevi, svinje, ovce, krave
- (i) Transgene životinje kao model sistemi bolesti (OnkoMiš)
 - Prirodno ili veštačko ukrštanje i selekcija životinja radi dobijanja poboljšanih osobina
- (ii) Transgene životinje koje će imati poboljšane ili razvijene nove ekonomski značajne osobine na efikasniji način
 - Proizvodnja transgenih krava koje daju mleko bogato κ -kazeinom ili sa aktivnom laktazom
 - Transgeni pilići
- (iii) Transgene životinje kao bioreaktori za dobijanje proteina od važnosti za medicinsku upotrebu ili kao izvor ksenotransplantata

- Ubacivanje klonirane DNK u životinje - genski transfer – TRANSGENEZA.
 - Upoznavanje strukture i funkcije animalnih genoma, embriogeneze, maligne transformacije, uzroka nastajanja bolesti;
 - Terapija i lečenje naslednih bolesti;
 - Karakterizacija mehanizama regulacije genske ekspresije i procesovanje proteina; geni koji kontrolišu rast i diferencijaciju životinjskih ćelija; geni odgovorni za abnormalni rast u humanim ćelijama kancera.
- Tehnike kloniranja omogućavaju ugradnju stranog gena u embrion, ili izmenu nekog gena embriona, čime se dobija TRANSGENA ŽIVOTINJA.

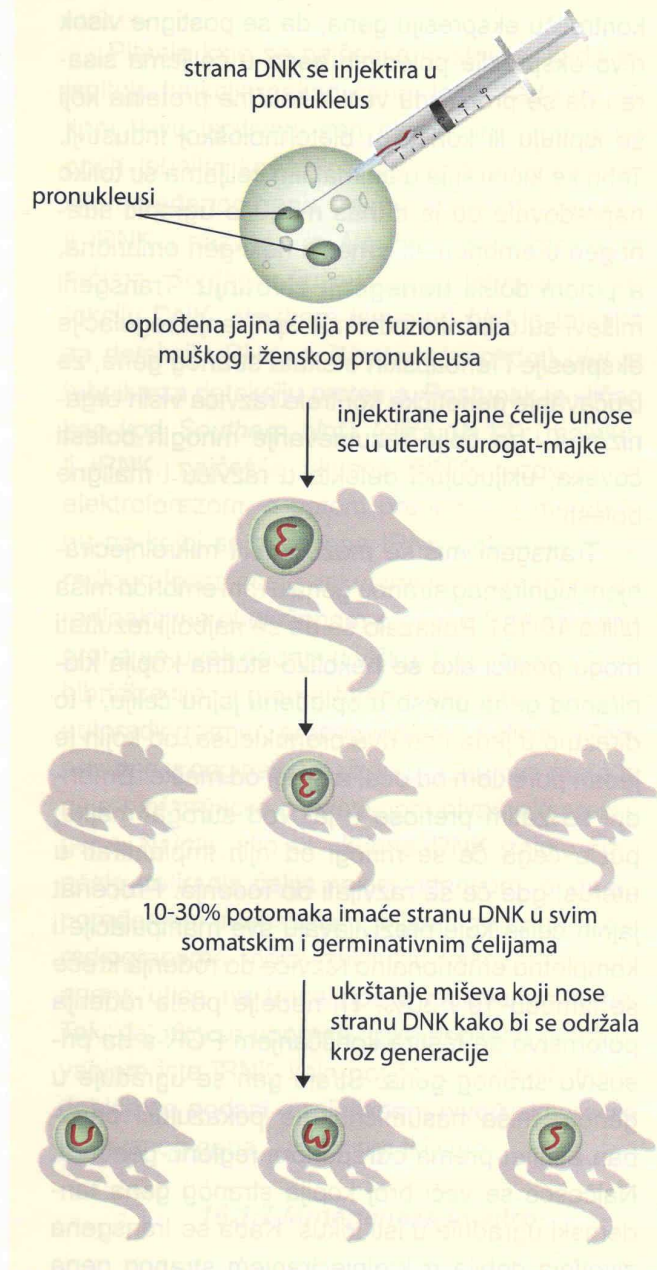


TRANSGENI MIŠEVI

- Mikroinjeciranje kloniranog stranog gena u rani embrion miša; unos nekoliko stotina kopija kloniranog gena u jedan od dva pronukleusa oplođene jajne ćelije
- Embrioni se prenose u jajovod surogat majke; razvoj embriona
- 10-30% jajnih ćelija preživljava sve manipulacije transgeneze
- Tri nedelje nakon rođenja potomstvo se testira na prisustvo stranog gena primenom PCR tehnike
- Prvi transgeni miš (“supermiš”) je nosio gen za hormon rasta iz pacova (Palmiter i Brinster, 1982.)



Slika 16.16. „Supermiš“.



Slika 16.15. Transgene životinje.

»NOKAUT« MIŠEVI

- Genetički modifikovani miševi kod kojih je isključen jedan ili više gena metodom nokaut gena.
- Nokaut miševi su izuzetno važni animalni modeli za proučavanje gena koji su sekvencionisani ali njihova funkcija još nije utvrđena.
- Izazivanje inaktivacije određenog gena kod miševa, nakon čega se posmatraju eventualna odstupanja od normalnog stanja ili ponašanja može ukazati istraživačima na verovatnu funkciju datog gena.
- Primeri istraživanja u kojima se koriste nokaut miševi su:
 - proučavanje i modeliranje različitih vrsta raka, gojaznosti, srčanih oboljenja, dijabetesa, artritis, neuroza, starenja i Parkinsonove bolesti;
 - Nokaut miševi nude i biološki kontekst u kome se mogu razvijati i ispitivati lekovi i drugi terapijski pristupi.

■ KLONIRANJE

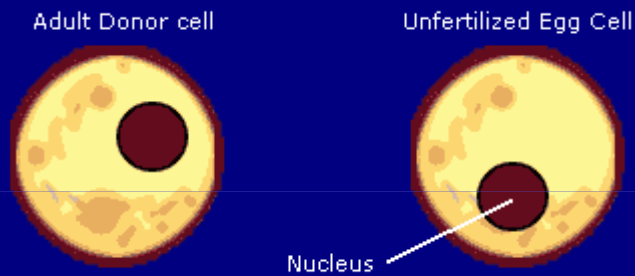
- Termin klon je prvi put upotrebljen 1963. god od strane Britanskog biologa Haldana.
- Kloniranje - stvaranje grupe genetski istovetnih organizama, koje nastaju od jedne jedinke aseksualnim putem, čime se dobijaju nove jedinke, istovetne kao organizam od koga su dobijene.
- Osnovni smisao je da se ovim umnožavanjem ukida svaka individualna različitost, koja se normalno dobija seksualnom reprodukcijom.
- U životinjskom svetu postoje prirodni klonovi - jednojajni blizanci.
- Prvi eksperiment kloniranja je uradio Gurdon 1962. Gurdon je izolivao jedro iz visoko diferencirane somatske ćelije žabe i ubacio ga u anukleiranu oocitu, čime je započela dekada u istraživanjima bazirana na «nuklearnom transferu».

■ KLONIRANJE SISARA

- 1997. godine Vilmur i saradnici su izvršili prvo kloniranje sisara. Pošlo se od pretpostavke da diferencijacija i razviće nisu praćeni gubitkom ni usložavanjem gena, i da je DNK u svim ćelijama ista.
- Izabrali su ćeliju iz vimena ovce, koju su prethodno uveli u fazu mirovanja. Koristeći tehnike slične onima koje je koristio Gurdon izolovali su jedro iz ćelija vimena jedne odrasle ovce. Ovaj nukleus su ubacili u oocitu, iz koje je jedro prethodno uklonjeno. Ovi pokušaji su uspeli tek iz 276 puta.
- Ovakva ćelija je podeljena nekoliko puta i embrion je ubačen u matericu surogat majke, koja je donela na svet Doli, ovčicu koja je bila klon majke ovce čije je jedro uzeto.
- Ovca Doli je klon jer je nastala iz diploidne somatske ćelije, a ne spajanjem jajne ćelije i spermatozoida.

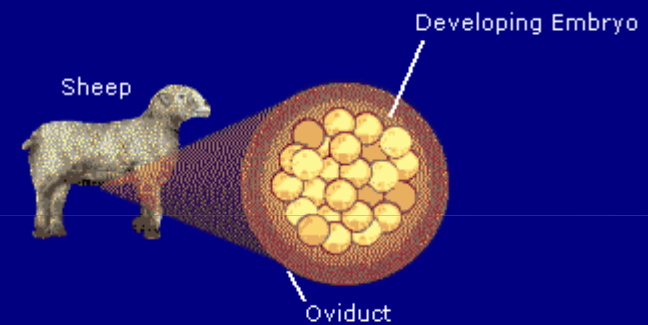
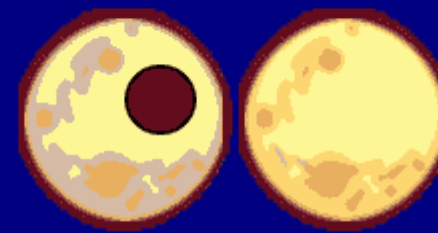
Ovca Doli je umrla (sa 6,5 godina) od raka pluća izazvanog virusom. Doli je još kao mala patila od artritisa. Doline telomere bile 20% kraće nego kod normalnih ovaca njene starosti; rak pluća je bio poslednji u seriji njenih medicinskih problema.



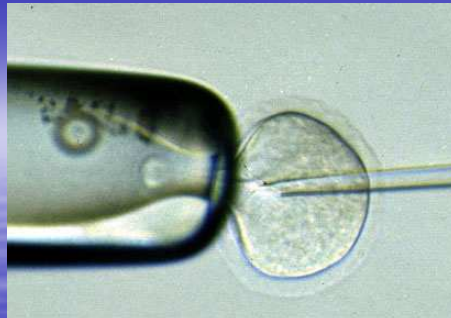


STEP 2: The donor cell is starved. The absence of nutrients causes the cell to enter a suspended state, matching the state of the enucleated egg cell.

Adult Donor cell (suspended state) Enucleated Egg Cell



STEP 5: After developing in an oviduct for around six days, the embryo is transplanted into the uterus of a surrogate mother ewe. This ewe will carry the developing sheep until it is born.



Donor Cell



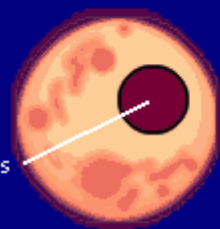
Unfertilized Egg



Nucleus

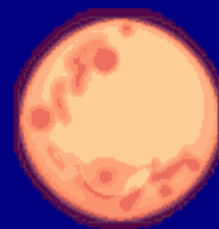
STEP 1: The nucleus of the egg cell is removed.

Cumulus Donor Cell



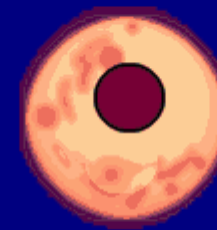
Nucleus

Enucleated Egg

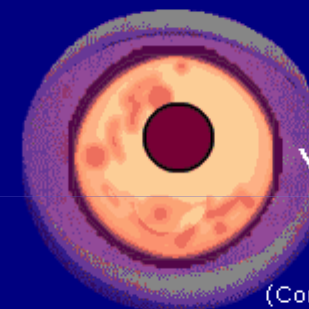


STEP 2: Cumulus cells were used as donor cells because they remain naturally in a suspended state. The nucleus of a cumulus cell was inserted into the enucleated egg.

Egg Cell Containing Donor Cell Nucleus



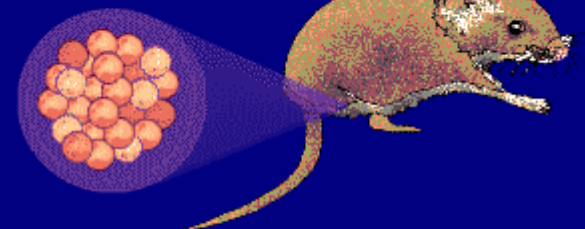
Egg Cell Containing Donor Cell Nucleus



Culture
(Containing cytochalasin B)

Surrogate Mother

Developing Embryo

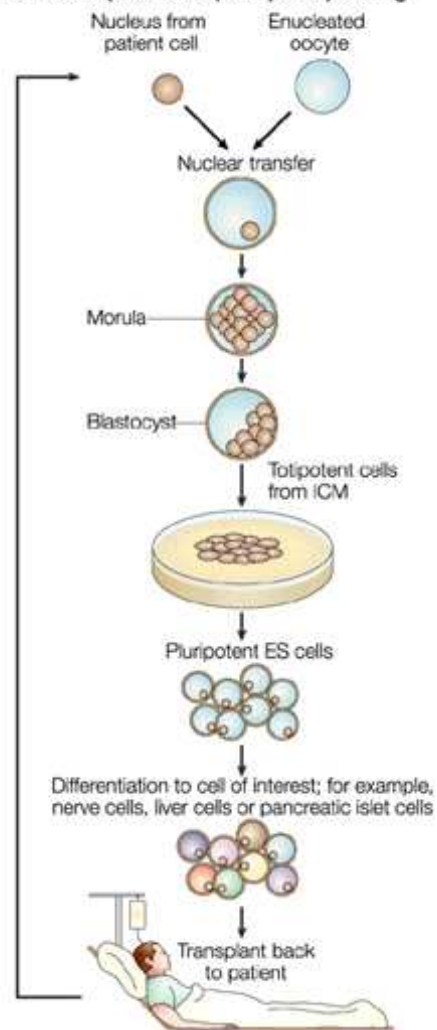


STEP 5: The egg cell develops into an embryo which is implanted into the uterus of a surrogate mother mouse. After a normal gestation period, a cloned mouse is born.

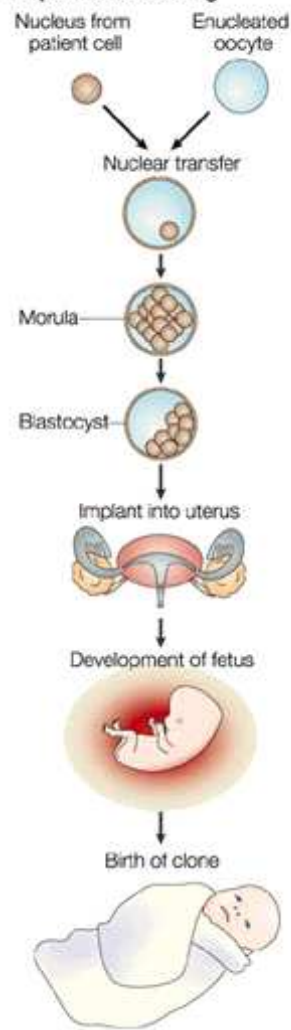
MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA U MEDICINI

- REPRODUKTIVNO I NEREPRODUKTIVNO KLONIRANJE
- Kloniranje ljudi
 - Reproduktivno kloniranje - stvaranje embriona koji se zatim implantira u matericu sa ciljem da se razvije klonirano dete; zabranjeno u većini država.
 - Terapeutsko (nereproduktivno) kloniranje - klonirani embrion se ne implantira u matericu već se koristi za generisanje stem (matičnih) ćelija.
- Terapeutsko kloniranje - primena u medicini u prenosu terapeutskog gena u obolelo tkivo, transplantaciji gena (kod delecija), korekciji gena (ispravljanje mutacija), povećavanju ekspresije ciljnog gena, ciljanom uništenju pojedinih ćelija unosom gena ubojice, ciljanom inhibicijom genske ekspresije.

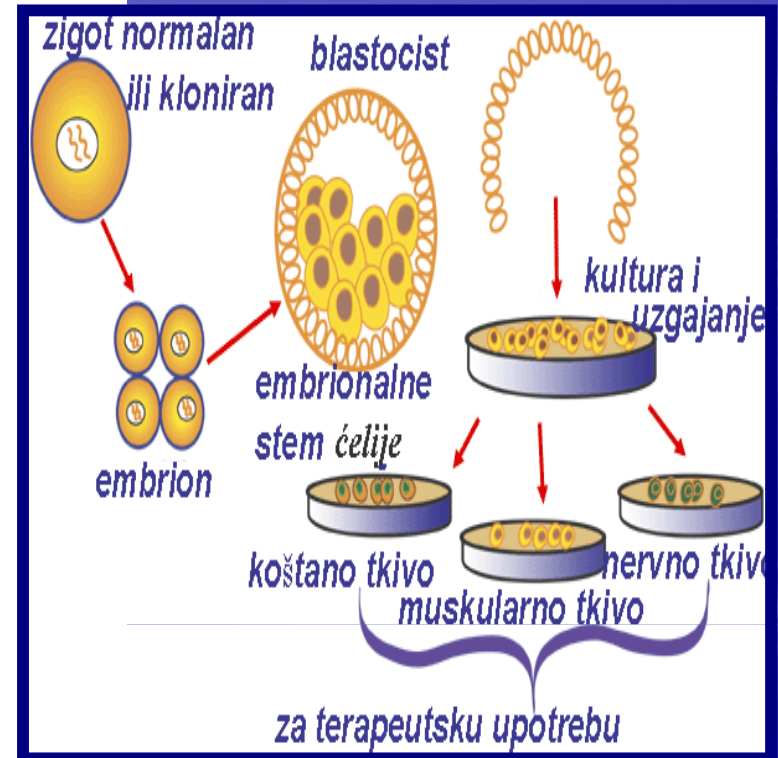
a Non-reproductive (therapeutic) cloning



b Reproductive cloning



Nature Reviews | Genetics

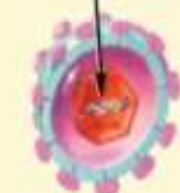


■ GENSKA TERAPIJA

- Primarni zadatak istraživanja u humanoj molekularnoj biologiji - utvrditi prirodu oštećenja na nivou gena, kao i njihov efekat na simptome određenog genetičkog oboljenja.
- Jedan od pristupa izučavanja naslednih bolesti - uporedo izolovati mutirani i normalni gen i analizirati ih.
- Definisanje izmenjenog gena koji uzrokuje bolest omogućava
 - Kreiranje dijagnostičkih testova
 - Gensku terapiju
- Genska terapija - zamena oštećenog ili nefunkcionalnog gena zdravim genom ili njegovim produktom; u užem smislu - tretman bolesti unošenjem genetičkog materijala u ciljno tkivo pacijenta.
- Prema ciljanim ćelijama genska terapija se deli na:
 - somatsku - somatske ćelije obolele osobe su potencijalna meta u genskoj terapiji; sve promene se ne prenose na potomstvo;
 - germinativnu - popravka defekata u ćelijama germinativnih linija, čime se promene prenose na potomstvo; u većini zemalja zabranjeno.

DIREKтна DOSTAVA

terapeutski gen
pakovanje gena u vektor



iniciranje u pacijenta

targetni organ

ĆELIJSKA DOSTAVA

GENETSKI MODIFIKOVANE ES ĆELIJE

ES HLA

SCNT

ES ĆELIJE

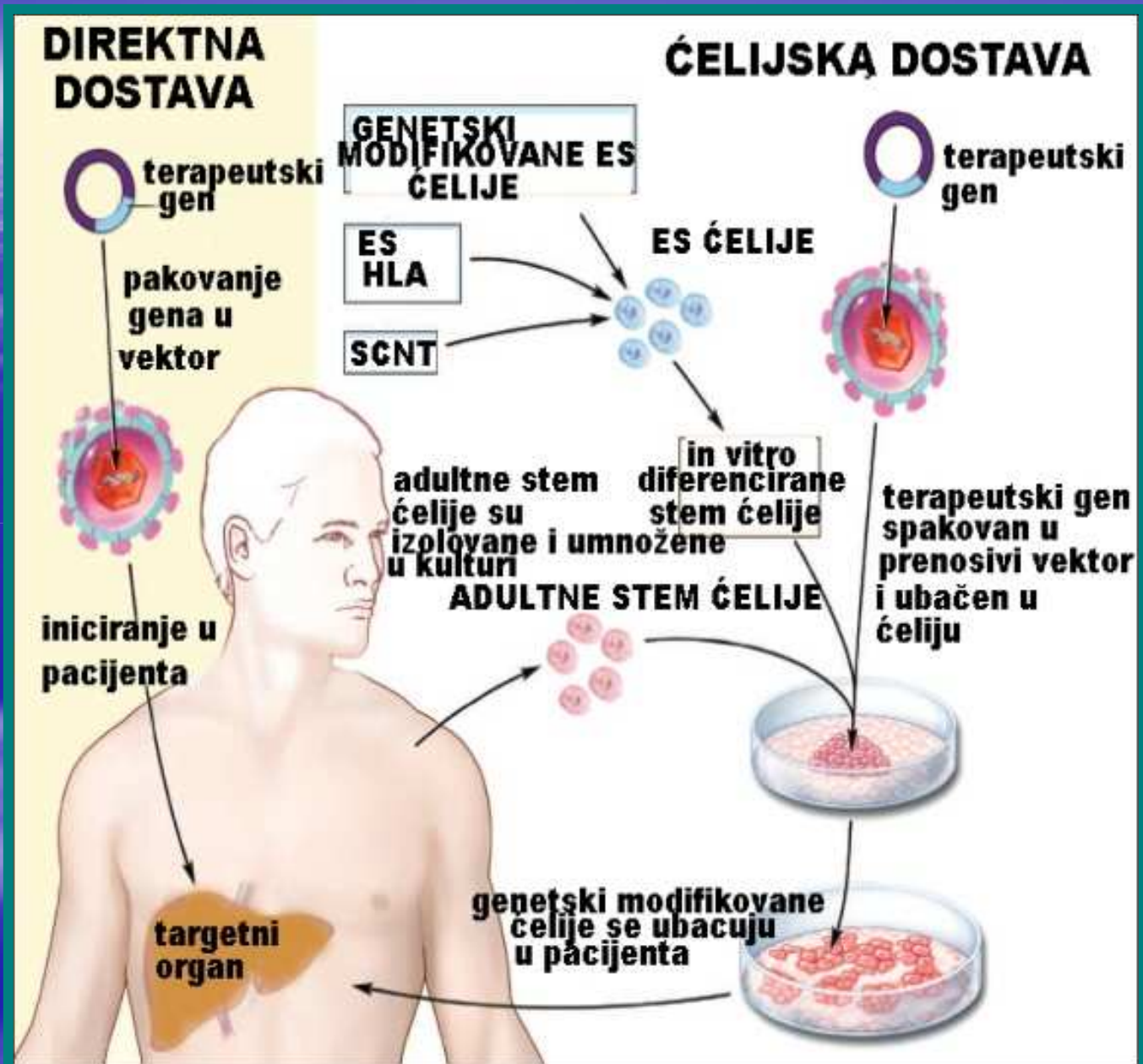
adultne stem ćelije su izolovane i umnožene u kulturi

ADULTNE STEM ĆELIJE

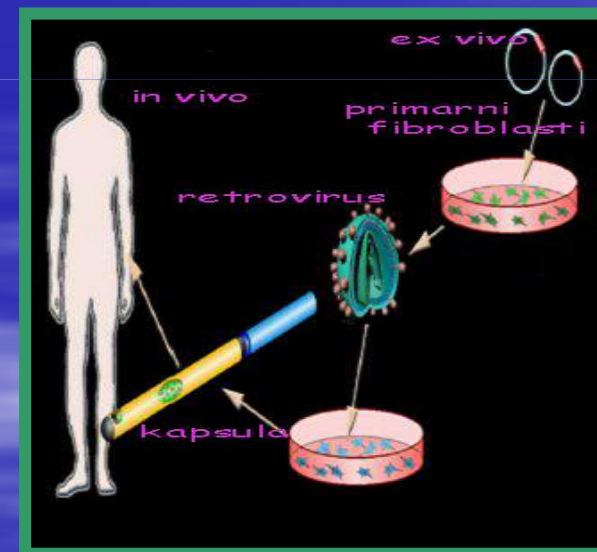
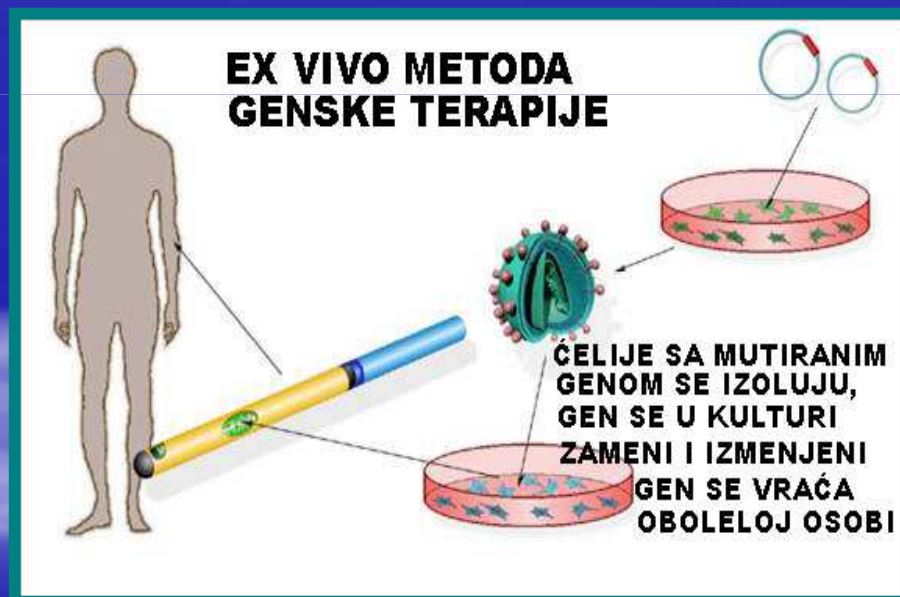
in vitro diferencirane stem ćelije

terapeutski gen spakovan u prenosivi vektor i ubačen u ćeliju

genetski modifikovane ćelije se ubacuju u pacijenta



- Dva pristupa u genskoj terapiji *ex vivo* i *in vivo*
- *Ex vivo* terapija - ciljane ćelije pacijenta se izoluju, genetski modifikuju *in vitro* i potom vrate pacijentu;
- *In vivo* terapija - genski defekti se ispravljaju direktno u oboleloj osobi; metode unošenja zdravog gena direktno u određeno tkivo pacijenta pomoću čiste plazmidne DNK ili pomoću pojedinih virusa kao vektora.

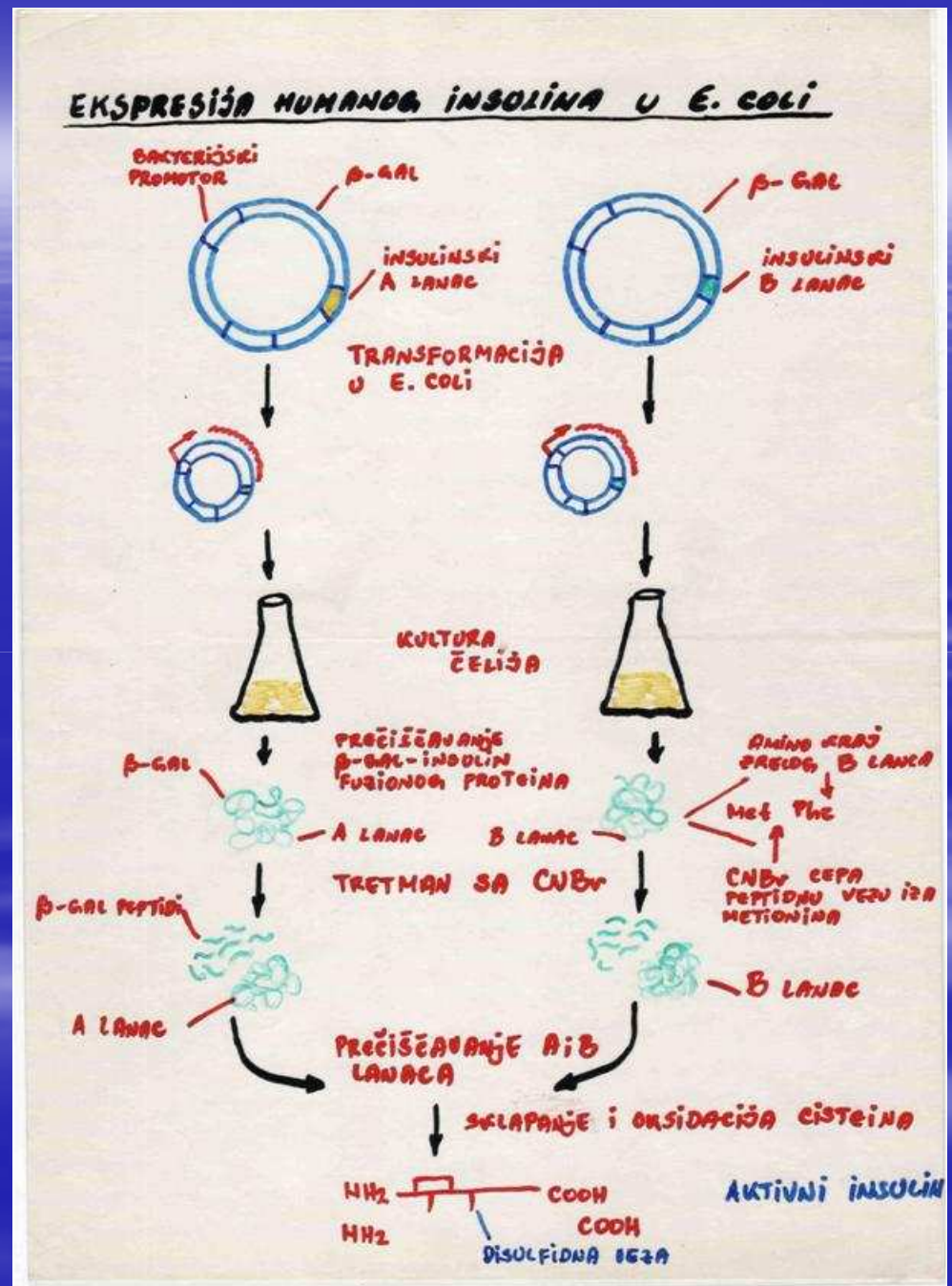


MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA U MEDICINI

- **Proizvodnja proteina od interesa za humanu terapiju metodama genetičkog inženjerstva.**
- **INSULIN – PRVI REKOMBINANTNI LEK ZA LJUDSKU UPOTREBU**
- **Hormon koji reguliše nivo šećera u krvi**
- **Luče ga β -ćelije Langerhansovih ostrvaca pankreasa u cirkulaciju**
- **Insulin pomaže preuzimanje glukoze u ćelije (najviše u ćelije jetre i mišiće) i sintezu glikogena**
- **Nedostatak insulina je praćen šećernom bolešću (Diabetes melitus) – terapija su svakodnevne injekcije insulina**
- **Nekada je insulin dobijan ekstrakcijom iz pankreasa svinja i krava – primenjen kod ljudi može da izazove imunu reakciju**
- **Rekombinantni humani insulin ne izaziva imunu reakciju**
- **Insulin se stvara kao jednolančani pre-pro-hormon; pro sekvenca sadrži ekstra amino kiseline koje služe za transport i pakovanje insulina u trodimenzionalnu strukturu**
- **U toku sekrecije pro sekvenca se seče proteazama i nastaju A i B lanci insulina povezani dvema S-S vezama**
- **Cilj kloniranja gena za insulin je da se dobije krajnji funkcionalni produkt - hormon**

Rekombinantni insulin

- Ekspresioni sistem je E. coli
- Konstrukcija sintetičkih gena za A i B lance insulina
- A i B lanci insulina se odvojeno kloniraju u plazmid E. coli koji nosi gen za β -galaktozidazu
- U E. coli se eksprimiraju zajedno geni za β -galaktozidazu i A, odnosno B lanac insulina
- Ovi veliki proteini se prečišćavaju od bakterijskih ekstrakata
- Delovanjem cijanogen bromidom (BrCN) razdvajaju se A, odnosno B lanac insulina od β -galaktozidaze
- Prečišćavanje A i B lanaca insulina
- Formiranje funkcionalnog insulina



MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA U MEDICINI

- Proizvodnja monoklonskih antitela.
- ANTITELA – IMUNOGLOBULINI (Ig)

Funkcije Ig su da specifično prepoznaju, neutralizuju i opsonizuju antigene i aktiviraju sistem komplementa; onoliko različitih IG koliko različitih antigena

Klase: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE

Struktura: L-lanac (laki; 22000; isti u svim klasama) i

H-lanac (teški; 55000; specifičan za klasu)

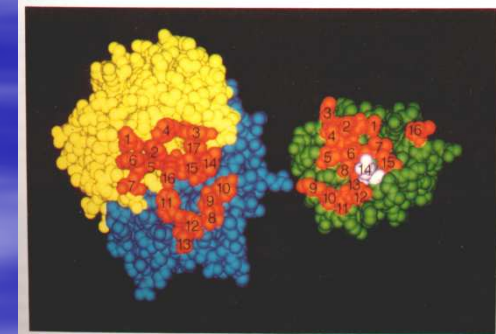
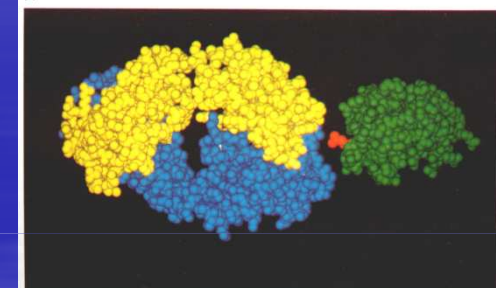
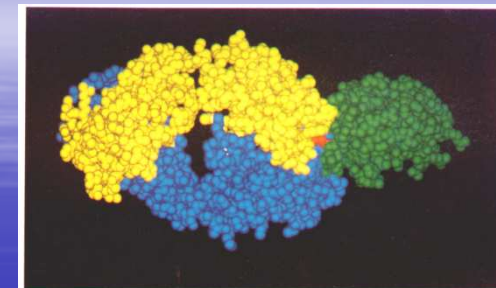
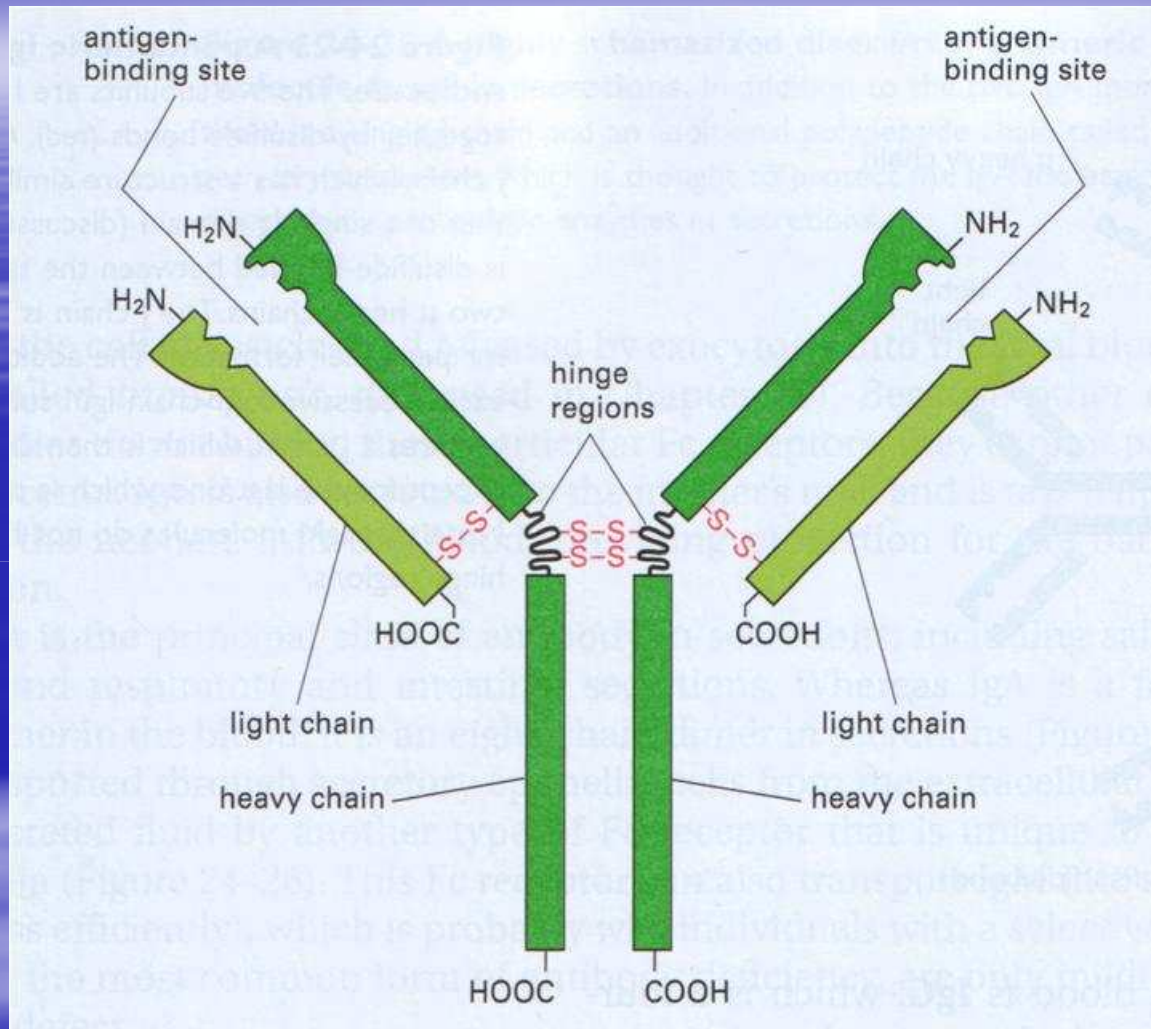
Molekul imunoglobulina: 4 polipeptidna lanca (2 laka i 2 teška lanca, vezani S-S mostovima i nekovalentnim vezama)

Li H lanci sadrže:

Konstantne regione – karakteristični za klasu AT i definišu ulogu AT

Varijabilne regione – specifični za antigen i vezuju antigen

U okviru varijabilnih regiona samo nekoliko amino kiselina je odgovorno za prepoznavanje antigena (CDR – *complementary determinig regions*)



- **MONOKLONSKA ANTITELA FUNKCIONIŠU KAO “MAGIČNI MECI”**
- Antitela (AT) su selektivni proteini koji se vezuju samo za specifične antigene
- Koncept “magični metak” – tretman u kome se specifičnim AT pronalaze i uništavaju infektivni agensi i tumorske ćelije
 - Specifično prepoznavanje kreiranog AT i antigena (proteina, receptora) na površini ili unutrašnjosti ćelija infektivnih agenasa, ili tumorskih, izmenjenih ćelija organizma
 - Izmenjena ćelija organizma mora da eksprimira neki drugačiji gen i proteinski produkt u odnosu na normalnu ćeliju
 - Specifična AT mogu za sebe da vežu lek koji specifično može uništiti ciljanu ćeliju ili infektivni agens
- Za komercijalnu upotrebu je potrebno dobiti veliku količinu specifičnih AT
- Ranije su korišćeni mijelomi (tumori matičnih krvnih ćelija) kao izvor specifičnih AT – nedovoljno specifična metoda
- MBT i tehnologija monoklonskih AT (MAT)
- Miš ili pacov se inokulišu zeljenim antigenom → imuni odgovor životinje → izolovanje specifičnih limfocita iz slezine → limfociti se spajaju sa ćelijama mijeloma (hibridomi) → produkcija specifičnih MAT na inicijelni antigen
- MAT se koriste u
 - dijagnozi infekcija i kancera
 - direktno korišćenje u tretmanu kancera, zapaljenja i imunih oštećenja

Miš je inokulisan željenim antigenom

Proliferacija B limfocita u mišu i produkcija specifičnog AT

Limfociti iz slezine + mijeloma ćelije (uz tretman polietilen-glikolom)

Hibridne ćelije rastu u HAT medijumu (ne sadrži HPRT enzim i ćelije mijeloma umiru; limfociti umiru jer ne mogu da žive dugo u kulturi)

Rastu samo hibridne ćelije

Tečnost kulture ćelija se testira na prisustvo specifičnog MAT

Izdvajaju se odgovarajuće ćelije hibridoma koje proizvode željeno MAT i koriste komercijalno ili zamrzavaju na -80°C ("ćelijske banke")

