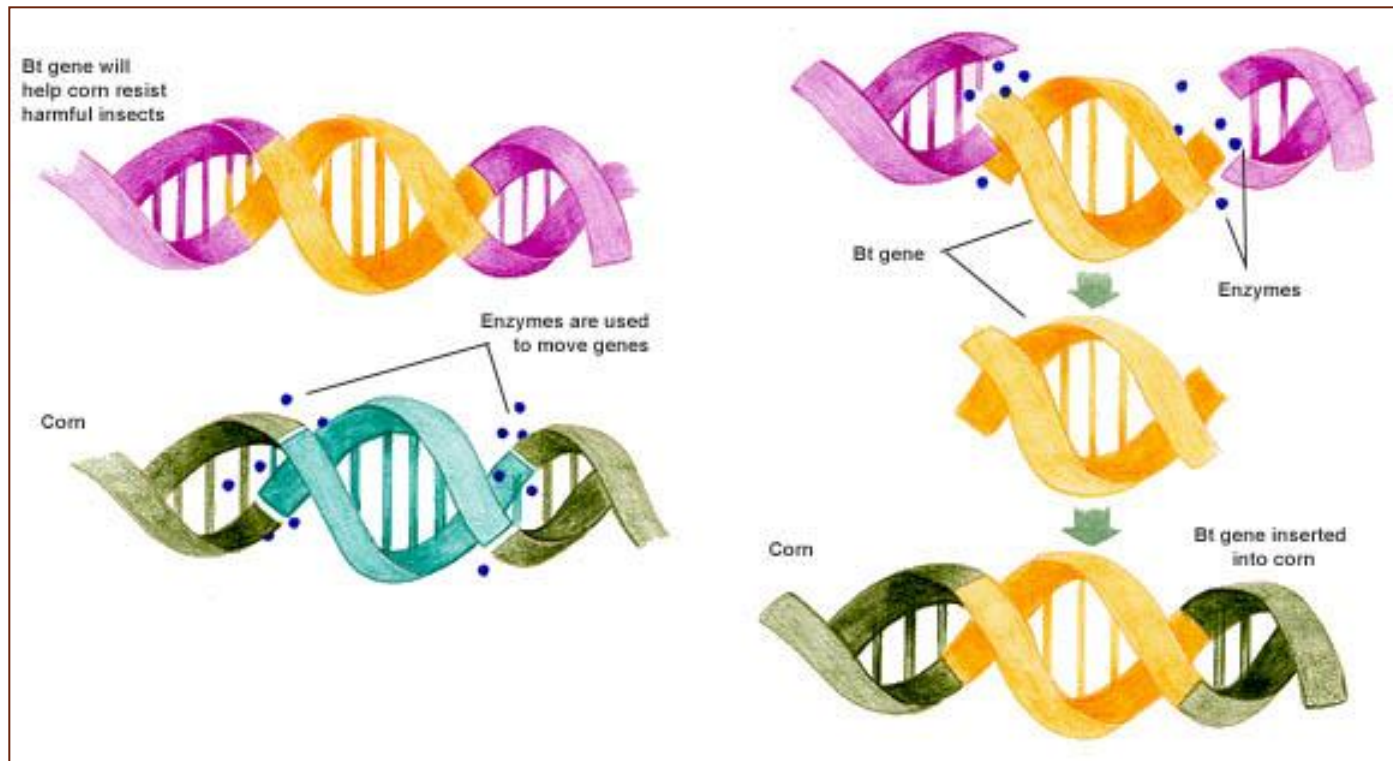


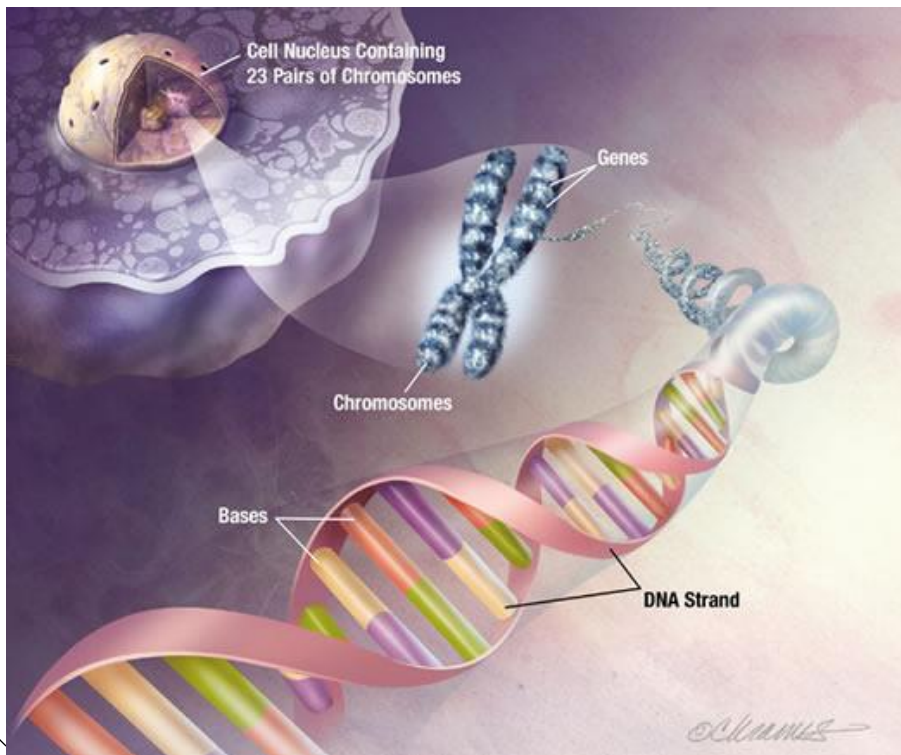
# Tehnologija rekombinantne DNK



Tehnologija rekombinantne DNK ili genetičko inženjerstvo su jedno od najrevolucionarnijih dostignuća u nauci u poslednjih 40 godina.

To je skup metoda uz pomoć kojih se može da manipuliše genetičkim materijalom. Tehnike koje su omogućile spajanje dijelova DNK iz različitih organizama i njihovo unošenje u nove domaćine nazvane su tehnologija rekombinantne DNK ili genetičko inženjerstvo.

Molekula DNK dobijena spajanjem dijelova DNK iz različitih organizama u in vitro uslovima zove se **hibridna DNK**.



## Genetičko inženjerstvo (ili tehnologija rekombinantne DNK)

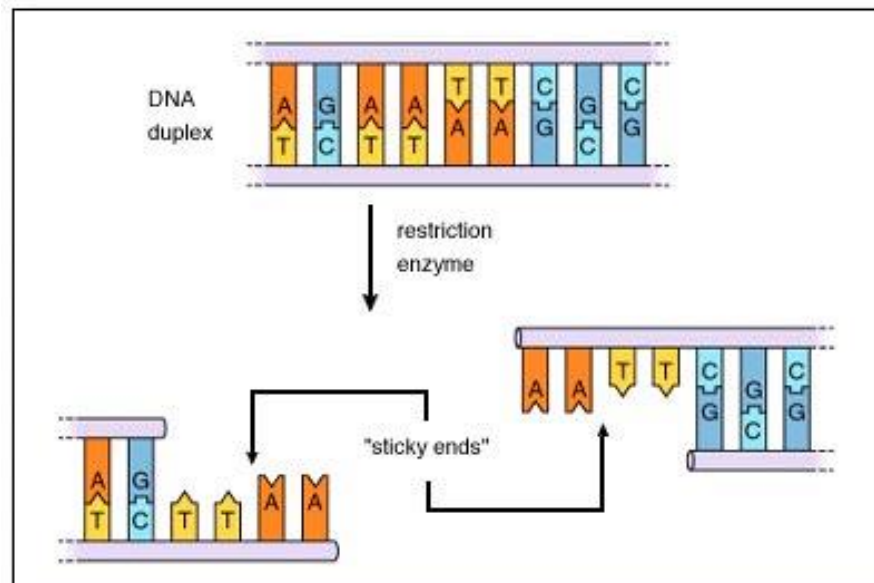
je dobijanje novih hibridnih molekula nasljednog materijala izvan ćelije i njihovo spajanje s prenosiocem (virusom, plazmidom ili drugim), čime se omogućava njegovo unošenje u organizam domaćina u kojem oni prirodno ne postoje, ali u kojem se mogu umnožavati.

# Molekularne osnove genetičkog inženjeringa

- Osnovni problem u proučavanju i radu sa DNK bio je u veličini molekula DNK kao sastavnog dijela hromozoma (velika molekula).
- Zato se postavilo pitanje kako i na koji način dobiti manje dijelove ili fragmente DNK koji bi poslužili za proučavanje, a da se pri tome ne izgubi njena funkcija.
- Taj problem je riješen **otkrićem restrikcioničkih enzima – 1968 (švajscarski naučnik Warner Arber, koji je za to 1978 dobio Nobelovu nagradu).**



- riječ «**restrikcioni enzimi**» govori da su ovo ograničeni enzimi, odnosno enzimi koji prepoznaju samo određene kratke redosljede nukleotida na kojima će da djeluju.
- Enzim prepoznaje određenu nukleotidnu sekvencu (restrikcijsko mjesto) od **4 do 8 nukleotidnih parova** (najčešće **heksameri** nukleotida) i na tom mjestu rasijeca dvolančanu DNK.
- Rasijecanje ili cijepanje se dešava hidrolizom,
- Enzimi prepoznaju određeni redosljed baza u lancima DNK. To su tzv. **palindromski rasporedi** nukleotida u lancima molekule DNK, što znači da su istog redosljeda nukleotida čitani u jednom i drugom lancu, ali obrnutim smjerom (strelice) kao npr. na slici niže



Restrikcioni enzimi mogu da sijeku dvolančanu molekulu na dva načina:

- u osi simetrije palindroma i time grade **tupe krajeve** (npr. *Rsal* ili *HpaI*),
- lijevo (*EcoRI*) ili desno (*PstI*) od ose simetrije i time grade kose ili ljepljive krajeve.

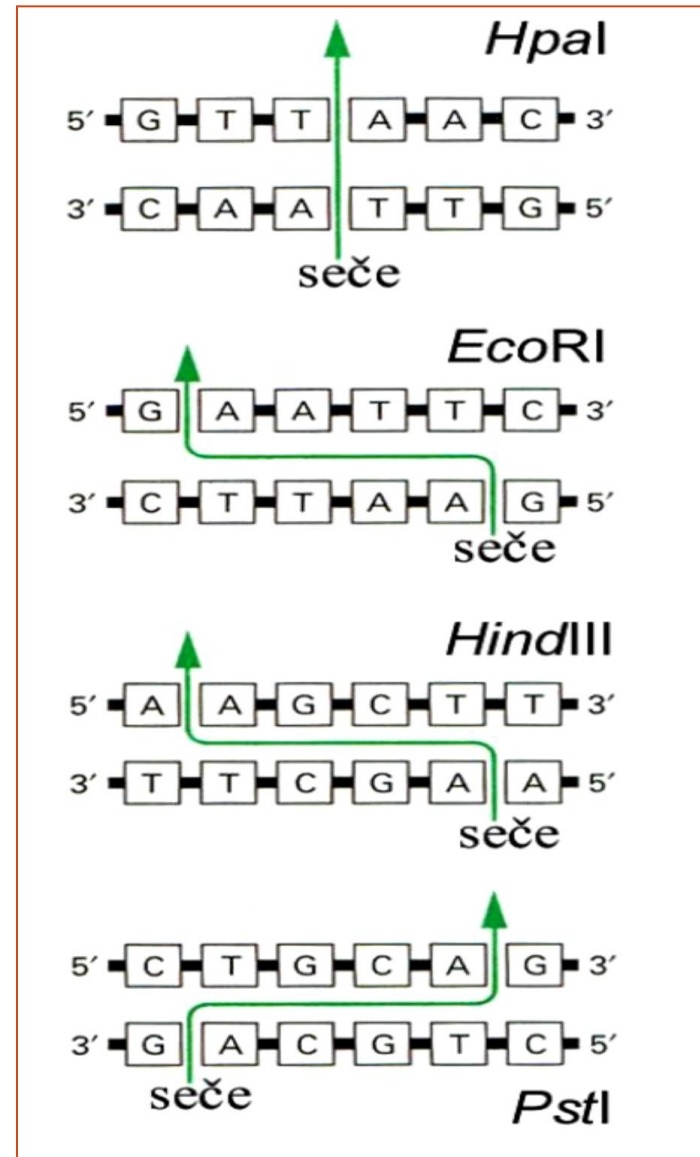
Kod kosog sječenja fragmenti ostaju u jednom ili drugom lancu palindroma jednostruki tzv. **izduženi krajevi** nazvani i **ljepljivi krajevi**, jer se lako spajaju s isto takvim izduženim krajevima istog redoslijeda d baza.

- Restrikcioni enzimi pokazuju **strogu specifičnost** prema određenom heksameru.

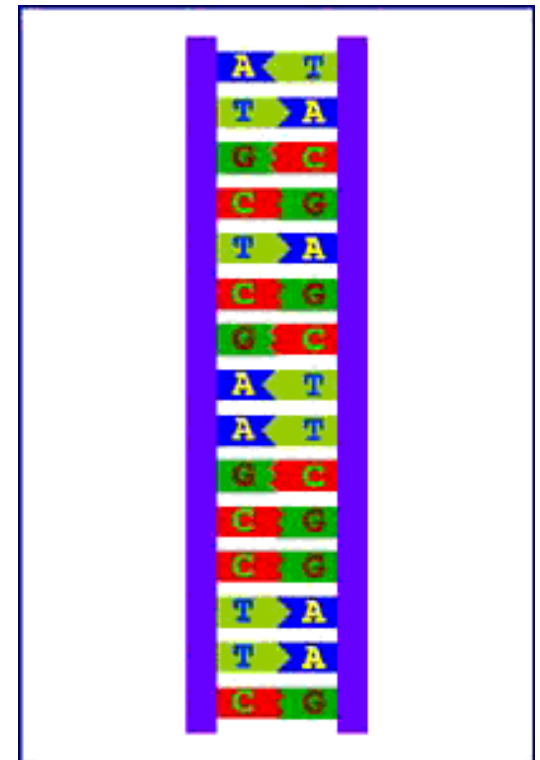
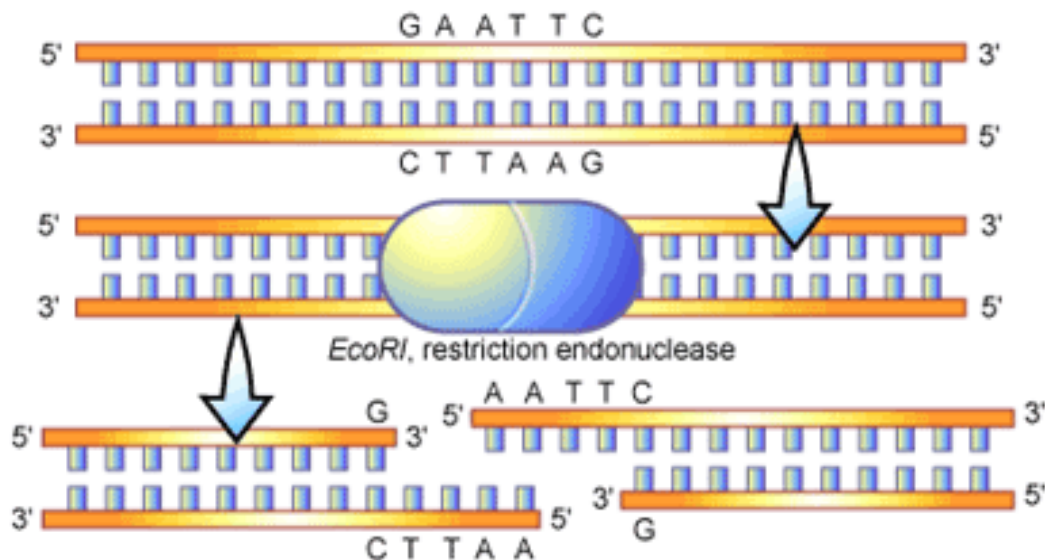
Npr. enzim *HpaI* prepoznaje sekvencu **GTTAAC** i uvijek pravi tupe krajeve,

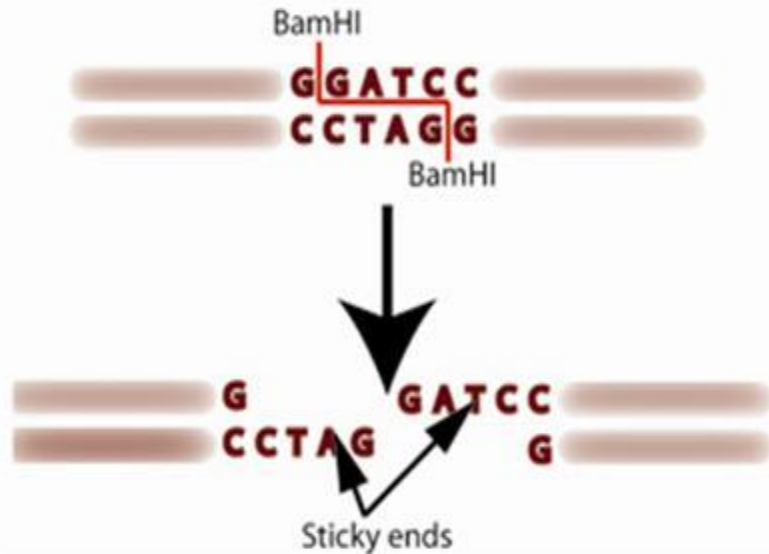
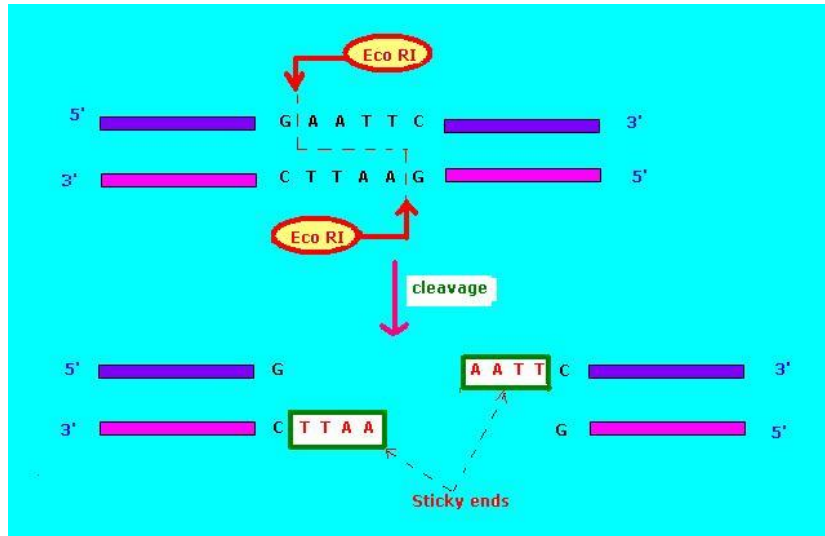
Enzim *EcoRI* siječe fragmente sa jednolančanim ljepljivim **5' krajem AATT**, a

Enzim *HindIII* fragment sa **AGCT** ljepljivim krajem



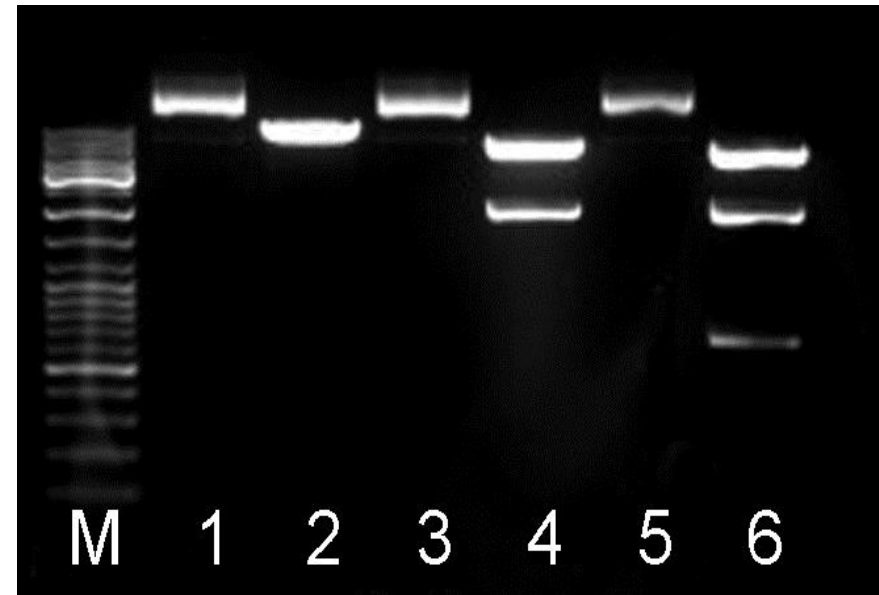
- Kako je redosljed purinskih i pirimidinskih baza u DNK stalan (određen), tako će i jedan restrikcioni enzim uvijek naći svoj palindrom i na tom mjestu pocijepati dvolančani molekul DNK što će davati fragmente DNK koji su uvijek iste veličine.
- Enzim siječe DNK na jednom ili više mjesta zavisno koliko fragmenata sa tim redosljedom pronade.





- Do danas je nađeno i proučeno preko 500 različitih restrikcionih enzima, koji sijeku DNK na različite načine.
- Izolovani su uglavnom iz različitih mikroorganizama po kojima su dobili imena kao npr.
  - **EcoRI** (iz *Escherichia coli* soj RI),
  - **BamHI** (iz *Bacillus amyloliquefaciens* HI),
  - **Sau3A** (iz *Streptomyces albus* G) itd.

- Otkriće restrikcionih enzima značajno je unaprijedilo istraživanja na području molekularne genetike, jer je bilo moguće proučavati strukturu i funkcije malih fragmenata (odsječaka) DNK mnogo jednostavnije nego metodama klasične genetike.
- Fragmenti DNK dobijeni nakon sječenja restrikcionim enzimima veoma se lako mogu odvojiti na gelu agaroze jer pokretljivost molekula DNK zavisi od veličine (manji fragmenti pokrecu se brže od većih) i pomiču se od negativnog prema pozitivnom polu slabe struje.



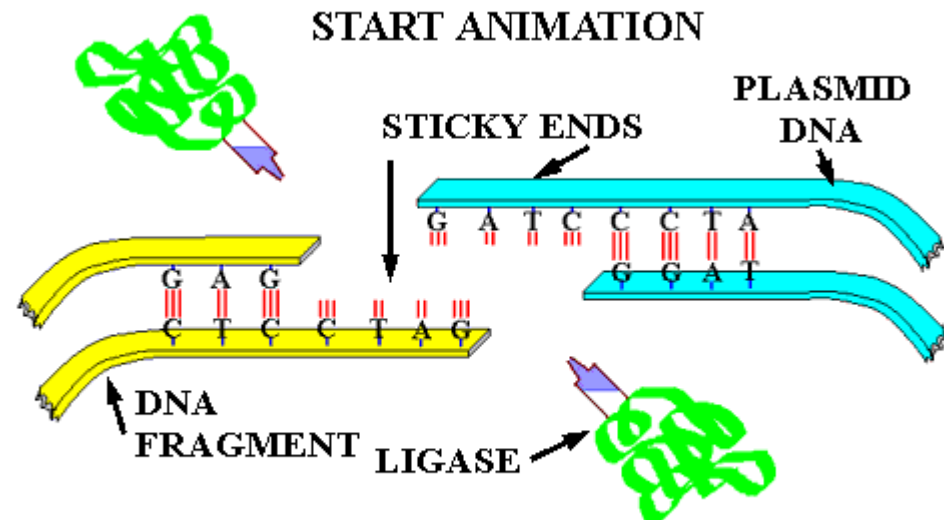
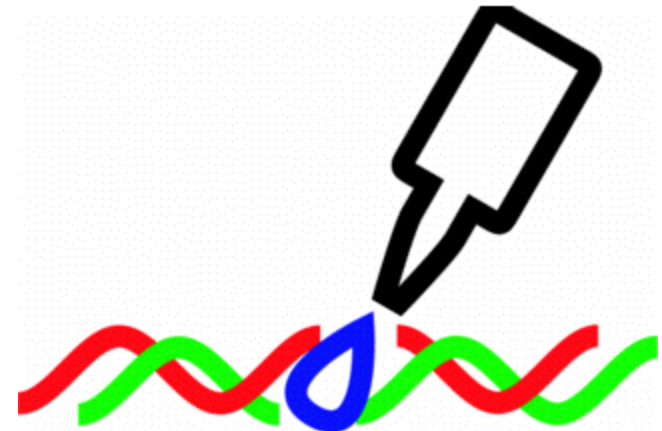


Nakon otkrića enzima koji cijepaju DNK lanac, sljedeći važan događaj za genetičko inženjerstvo **bilo je otkriće enzima koji mogu spajati prekinute lance DNK molekule** i to između susjednih nukleotida u dvolančanoj molekuli DNA.

Ti enzimi otkriveni su 1967. godine.

Otkriveni su istovremeno u pet istraživačkih laboratorija neovisno, nazvani **su ligaze**, a dobiveni su ili iz bakterije **E. coli** ili od bakterijskog **faga T4**.

- Takvi enzimi, zvani **ligaze** dobijeni su ili iz bakterije *E. coli* ili od bakterijskog faga T4,
- Povezuju krajeve koji su preostali u jednom i drugom lancu nakon što su se spojili komplementarni jednolančani ljepljivi krajevi.
- To je omogućilo da se 1970. dokaže mogućnost spajanja dva molekula DNK dobijena od različitih organizama.



- Ovim otkrićima stvoreni su preduslovi za izvođenje **in vitro** spajanja dva molekula DNK od različitih organizama u jednu novu molekulu, tzv. **hibridnu molekulu DNK**.
- **1973** prvi put uspješno ubačena segment DNK jedne vrste u genom druge vrste.
- Prva osoba kojoj je to uspjelo bio je biohemičar **Paul Berg** (1980 Nobelova nagrada).
- On se smatra **ocem genetičkog inženjstva** ili tehnologije rDNK.

# Vektori za rekombinovanu DNK

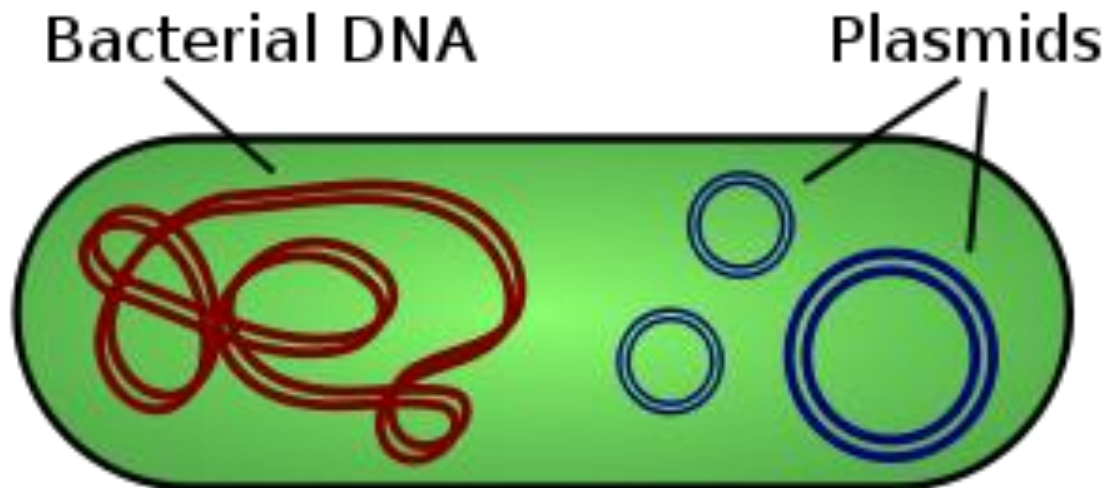
Po stvarnju hibridne molekule DNK pitanje je bilo mogu li se takve molekule unijeti u aktivne ćelije i tamo iskazati svoja svojstva.

Ukazala se potreba za vektorima (prenosiocima)??

Veoma važno otkriće jeste otkrivanje vektora koji služe za prenošenje i samoreplikaciju fragmenata DNK.

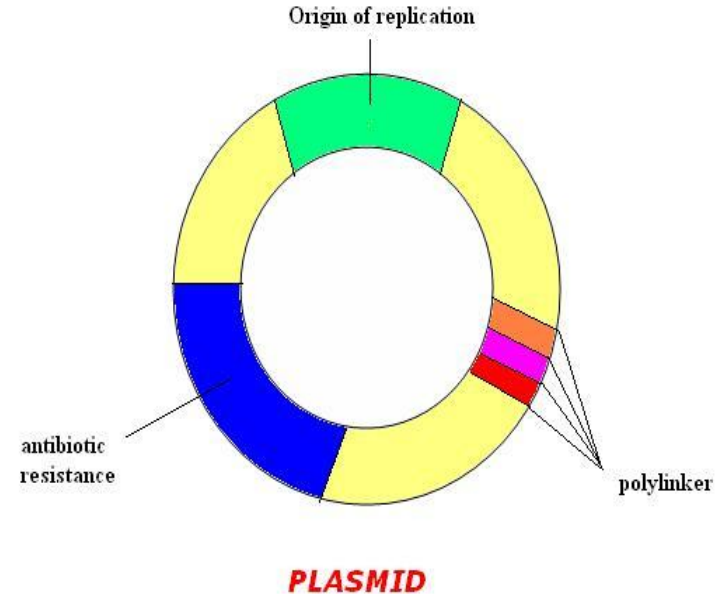
Najčešće se koriste **plazmidi koji su ekstrahromozomski molekuli DNK raznih prokariota.**

**Plazmidi** su mali kružni dvolančani molekuli DNK koji se obično nalaze u bakterijama i oni imaju sposobnost da se replikuju nezavisno od bakterijskog genoma.

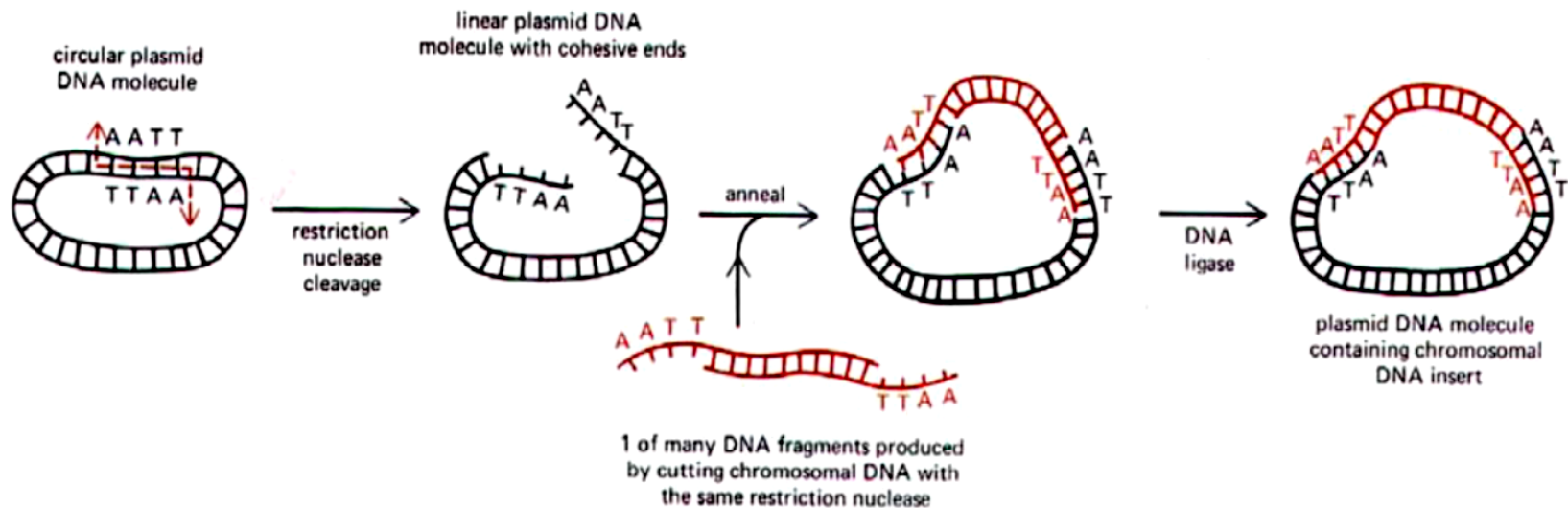


## Osobine plazmida

- Prvo je sposobnost samostalne replikacije u određenom domaćinu, što znači da se mogu umnožavati nezavisno od hromozoma svog domaćina.
- Neka od svojstava plazmida kodirana su njihovom DNK, kao što je otpornost prema antibioticima ili teškim metalima, pa to mogu uspješno poslužiti za prepoznavanje jedinice domaćina u koju je rekombinantni molekul DNK unešen.
- Imaju restrikciona mjesta - što su bila bitna svojstva plazmida kao vektora.



- Budući da većina mikroorganizama, koji bi mogli poslužiti kao domaćini, ne dozvoljava unošenje stranog hibridnog molekula DNK u svoju citoplazmu to je predstavljalo ozbiljnu poteškocu.
- Taj problem riješili su 1970. god. M. Mandel i A. Higa s Univerziteta na Hawaima, SAD, koji su pokazali da ćelije **bakterije *E. coli* koje su obrađene rastvorom  $\text{CaCl}_2$  mnogo djelotvornije primaju DNK faga lambda.**

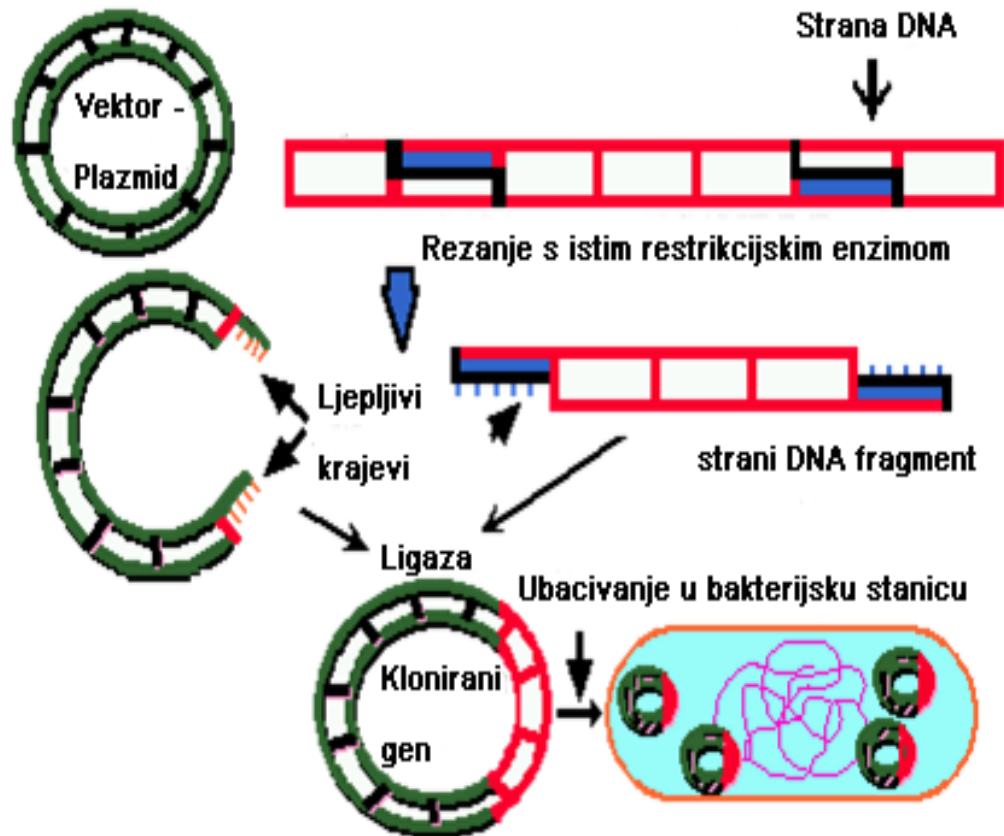


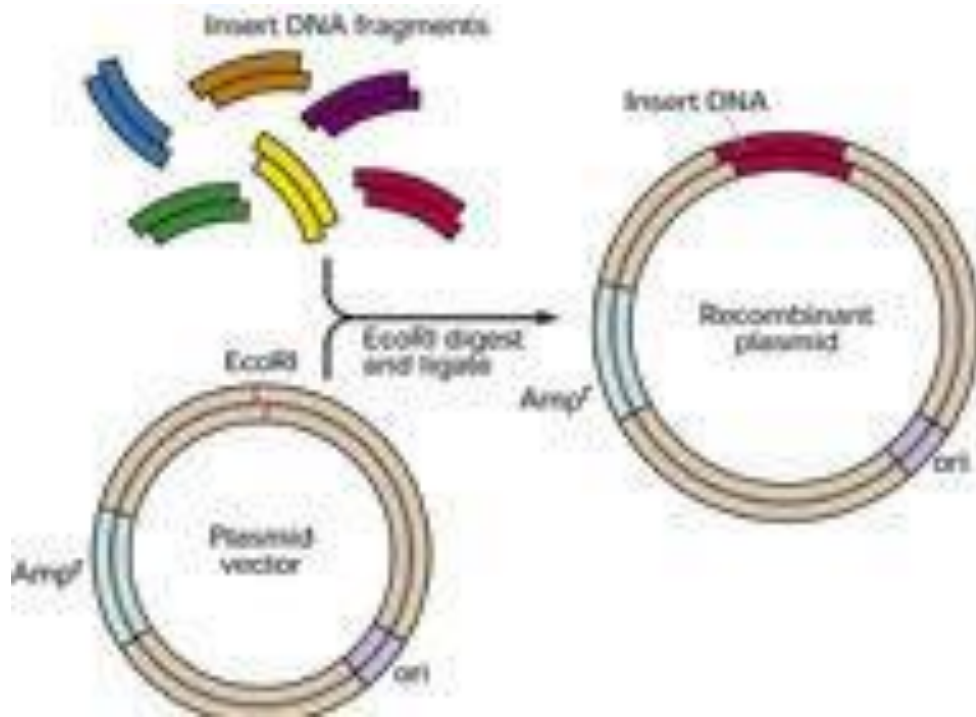
## Prenošenje (vraćanje) rekombinovanog plazmida u ćeliju domaćina - u bakteriju

Kao domaćin u kome se omogućava umnožavanje vektora - plazmida koristi se obično bakterija **Escherichia coli**.

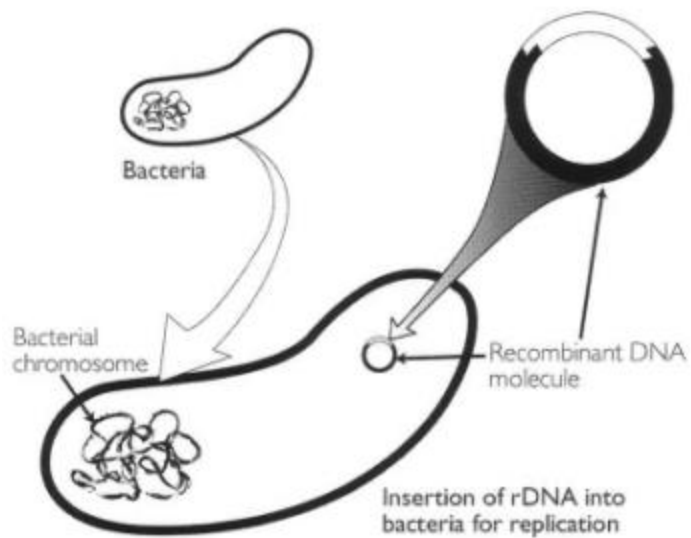
U ćeliji domaćinu pri svakoj daljoj replikaciji dolazi do umnožavanja plazmida a time i sekvence DNK koja je ubačena u plazmidni vektor.

**Isti fragment se može opet izvaditi, a može se i prepisati.**





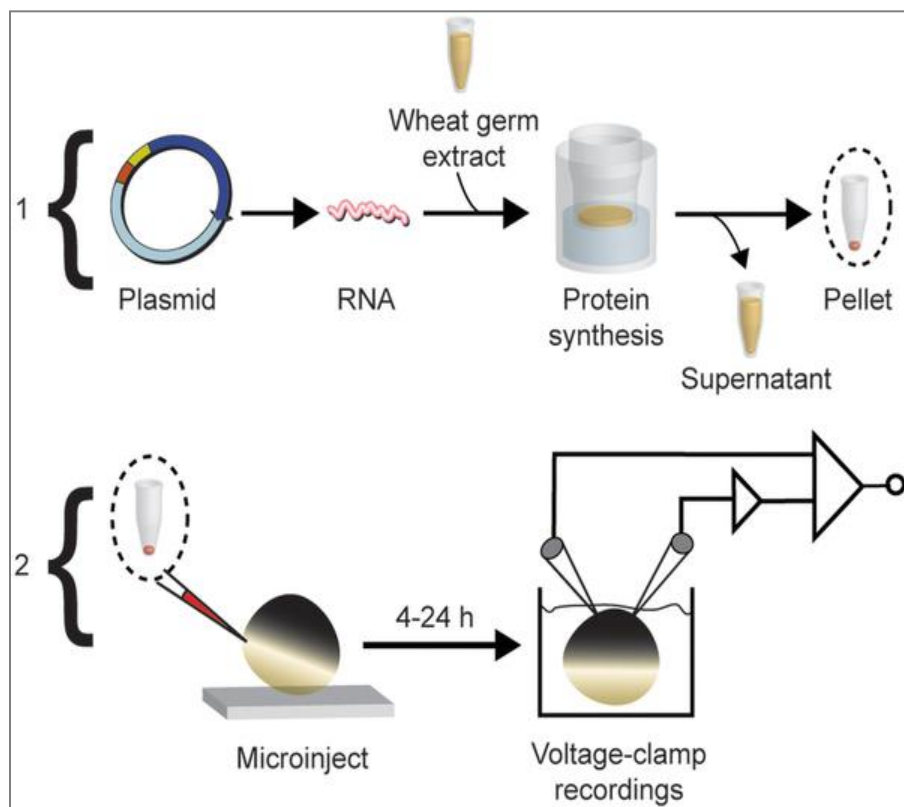
*in vitro* hibridni molekul DNK koji se sastoji od fragmenata DNK, plazmida iz *E. coli* i plazmida iz *Staphylococcus aureus*.





**Primjenom tehnologije rekombinantne DNK dobijen *in vitro* hibridni molekul DNK od dva različita organizma unešena u domaćina u kojem je taj molekul ekspimirao (izrazio) svojstvo iz drugog organizma.**

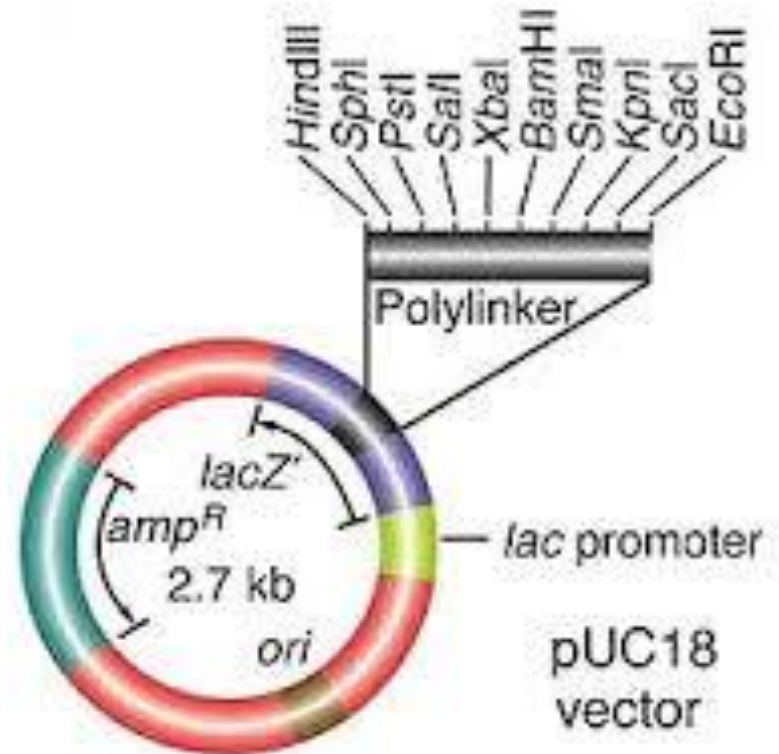
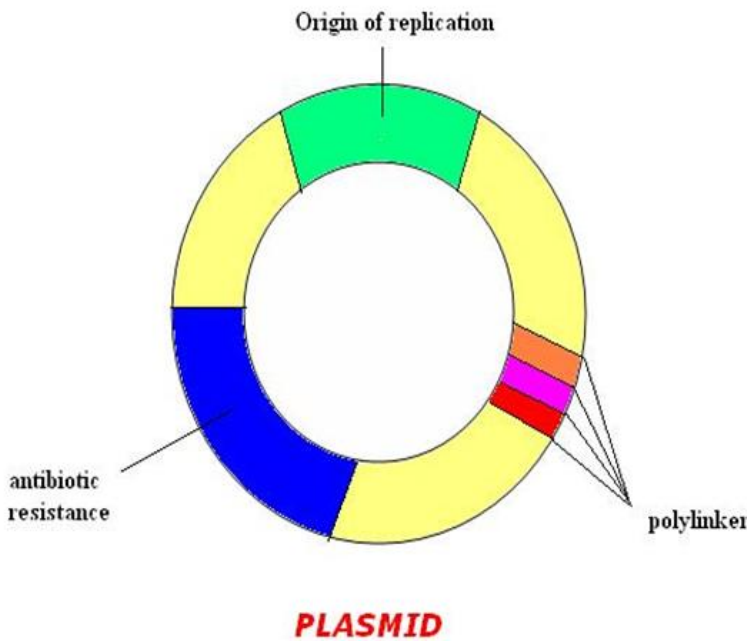
Naravno da se ubrzo postavilo pitanje može li se konstruisati hibridni plazmid koji bi sadržao gene od bakterija i od viših organizama i da li takav gen može ispoljiti (ekspimirati) svoje djelovanje u novom domaćinu.



Tehnika rDNA nam omogućava korišćenje i prenošenje jednog gena čija je funkcija dobro poznata iz jednog organizma u drugi.

Ranije su korišćeni **prirodni plazmidi** sa **samo jednim restrikcionim mjestom**,

**Danas** se koristi nekoliko vrsta plazmida u koje se ugradi jedan **region sa većim brojem restrikcionih mjesta** za brojne endonukleaze i on se naziva **polylinker region**.



**Za različite vrste DNK fragmenata primjenjuju se različiti vektori:**

**Plazmidi** – koriste se uglavnom za male fragmente. Rekombinanti plazmidi lako se selektuju antibioticima (do nekoliko stotina bp).

**Bakterofage - Fag lambda-** koristan je za kloniranje velikih fragmenata DNK (15-20 kbp).

**Kozmidi** - kombinovani plazmidi (plazmidno-fagni vektori) koji su pogodni za kloniranje većih fragmenata (45 kbp).

**Plazmidi kvasca-** omogućavaju direktno proučavanje genske regulacije kod eukariota.

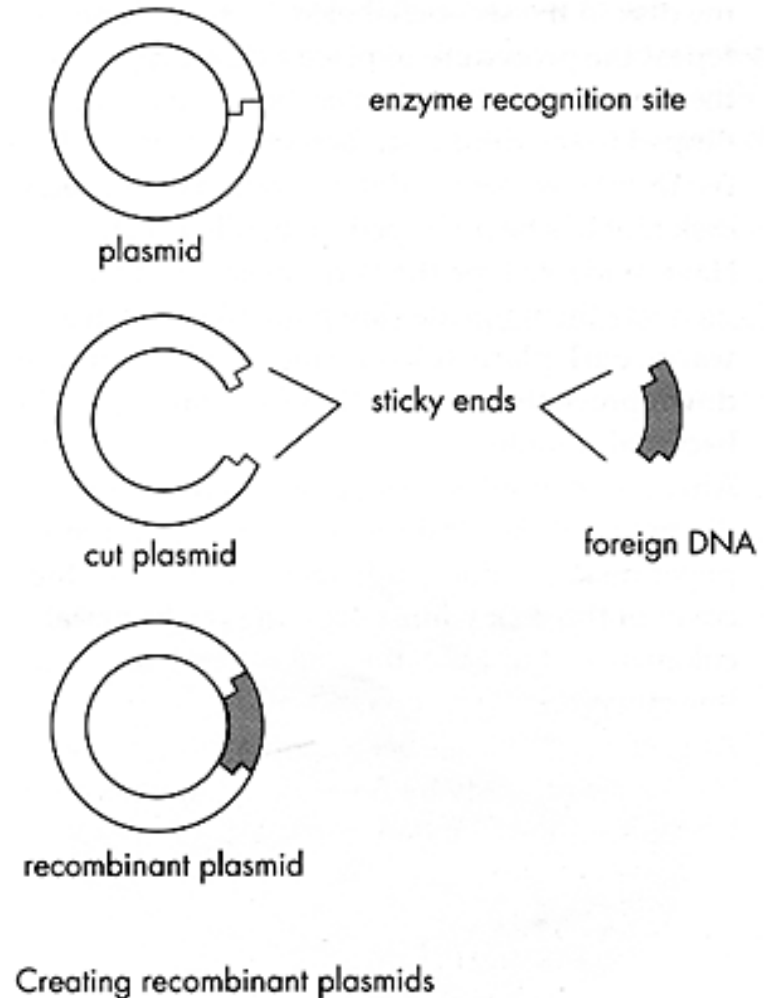
**Plazmidi biljaka-** infekcija biljaka bakterijom (*Agrobacterium*) i prebacuje te plazmide u ćelije biljke domaćina.

## Poželjne osobine vektora za kloniranje su:

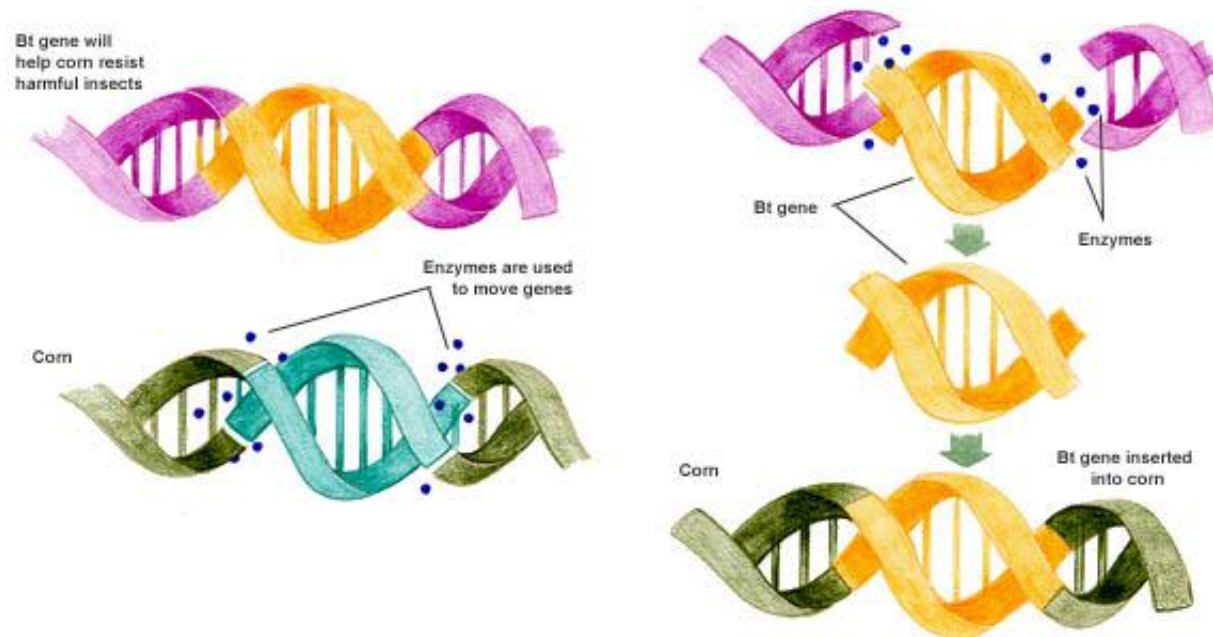
- Mala veličina koja omogućava laku izolaciju nakon upotrebe,
- Lako prenosivi iz ćelije u ćeliju (transformacijom ili infekcijom),
- Laka izolacija iz ćelija domaćina,
- Pogodnost detektovanja (preko gena za otpornost na antibiotike ili sl),
- Mogućnost dobijanja velikih količina ciljanog fragmenta DNK,
- Mogućnost insertovanja fragmenata DNK.

- S obzirom na klasično ukrštanje genetičkog materijala u cilju oplemenjivanja mikroorganizama, biljaka i životinja sa ciljem odabira jednog željenog svojstva

**tehnologija rDNA omogućava da se selekcioniše jedno vrijedno genetičko svojstvo (ili vise) iz različitih organizama na molekularnom nivou, pri čemu se mogu isključiti druga svojstva (koja nisu interesantna u tom momentu).**



- Tehnika rDNA nam omogućava korištenje i prenošenje jednog gena čija je funkcija dobro poznata iz jednog u drugi organizam.
- Primjenom klasične selekcije i oplemenjivanja velika garnitura gena nepoznatih funkcija prenosi se između srodnih organizama.
- Genetičko inženjerstvo omogućava, zbog veće tačnosti manipulacije da se izbjegne rizik dobijanja organizma sa neočekivanim svojstvima i da se izbjegne dugotrajno testiranje, pokušaja i greške selekcijskim oplemenjivanjem.



## **Primjena tehnologije rekombinantne DNK odnosno GI je mnogostruka:**

### **U medicini:**

- **Proizvodnja velikih količina različitih supstanci** za liječenje različitih bolesti ( inzulin, hormon rasta, faktori rasta, faktori zgrušavanja te vakcine protiv hepatitisa B, herpesa, bjesnila.
- **Skvenciranje humanog genoma** – identifikacija gena za bolesti,
- Genska terapija i sl.

### **U poljoprivredi:**

- Proizvodnja biljaka otpornih na herbicide, sušu, hladnoću, visoku temperaturu, preveliku količinu soli, biljke bolje prehrambene vrijednosti;
- u selekciji i oplemenjivanju domaćih životinja,
- očuvanje genetičkog divrziteta.

S obzirom na klasični način ukrštanja u cilju oplemenjivanja mikroorganizama, biljaka i životinja gdje je cilj odabir – selekcija na jednu osobinu, tehnologija rDNA omogućava korišćenje i prenošenje samo gena čija je funkcija dobro poznata iz jednog u drugi organizam.

Ova tehnika omogućava da se izbjegne rizik dobijanja organizma sa neočekivanim svojstvima i izbjegavanje dugotrajnih testiranja.

## U industriji:

- Genetički modifikovane bakterije koje razgrađuju toksični otpad.
- Genetički modifikovani kvasci koji koriste celulozu za proizvodnju glukoze i alkohola za gorivo.
- Uzgoj algi u marikulturi.
- Poboljšanje metoda u prehrambenoj industriji.

Umnožavanje rekombinovane molekule DNK (rDNK) unesene u domaćina naziva se i **kloniranje**