

GYÓGYSZERÉSZETI BIOTECHNOLÓGIA

Bevezetés biotechnológiába

E1-2

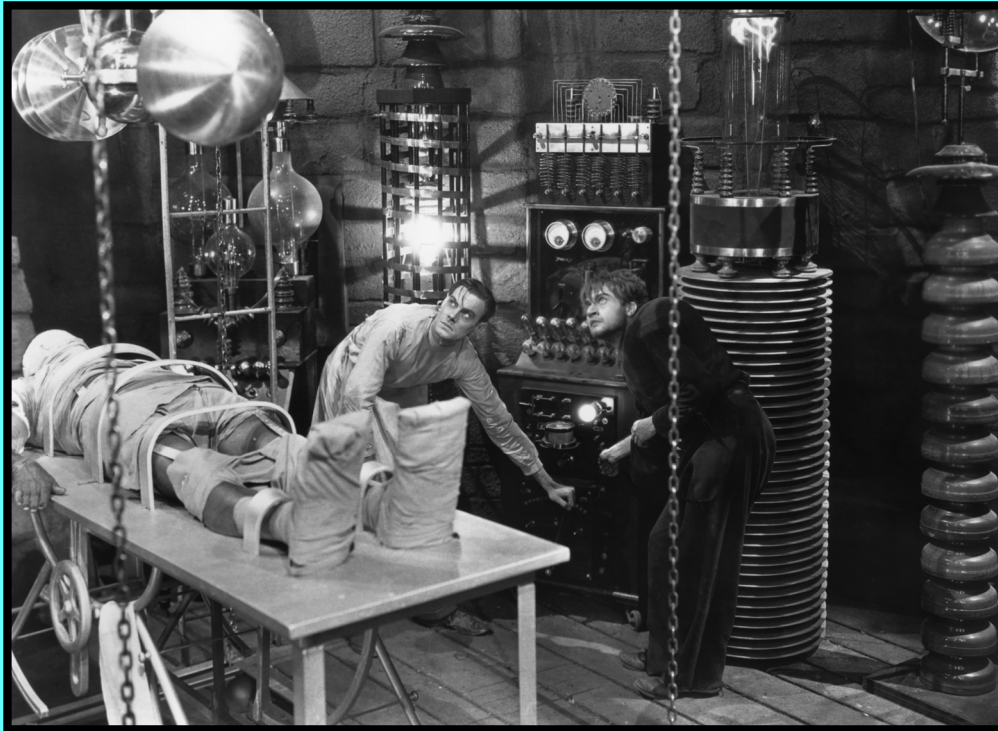
**Tradiccionálisan mire támaszkodik az
orvosi diagnosztika és terápia?**

**Tünetekre illetve tünet-együttesekre és a
meghatározó tünetek enyhítésére**

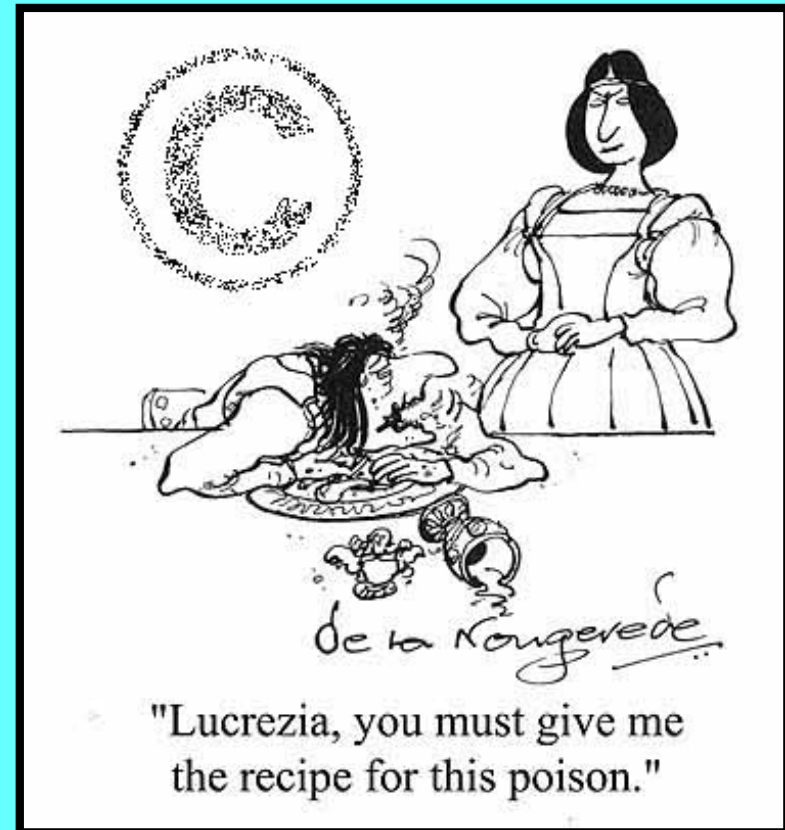
**Gyógyszerek és gyógyszeresztelési
rendszerek kifejlesztése**

A közvélemény szerint a biotechnológus

orvos



gyógyszerész



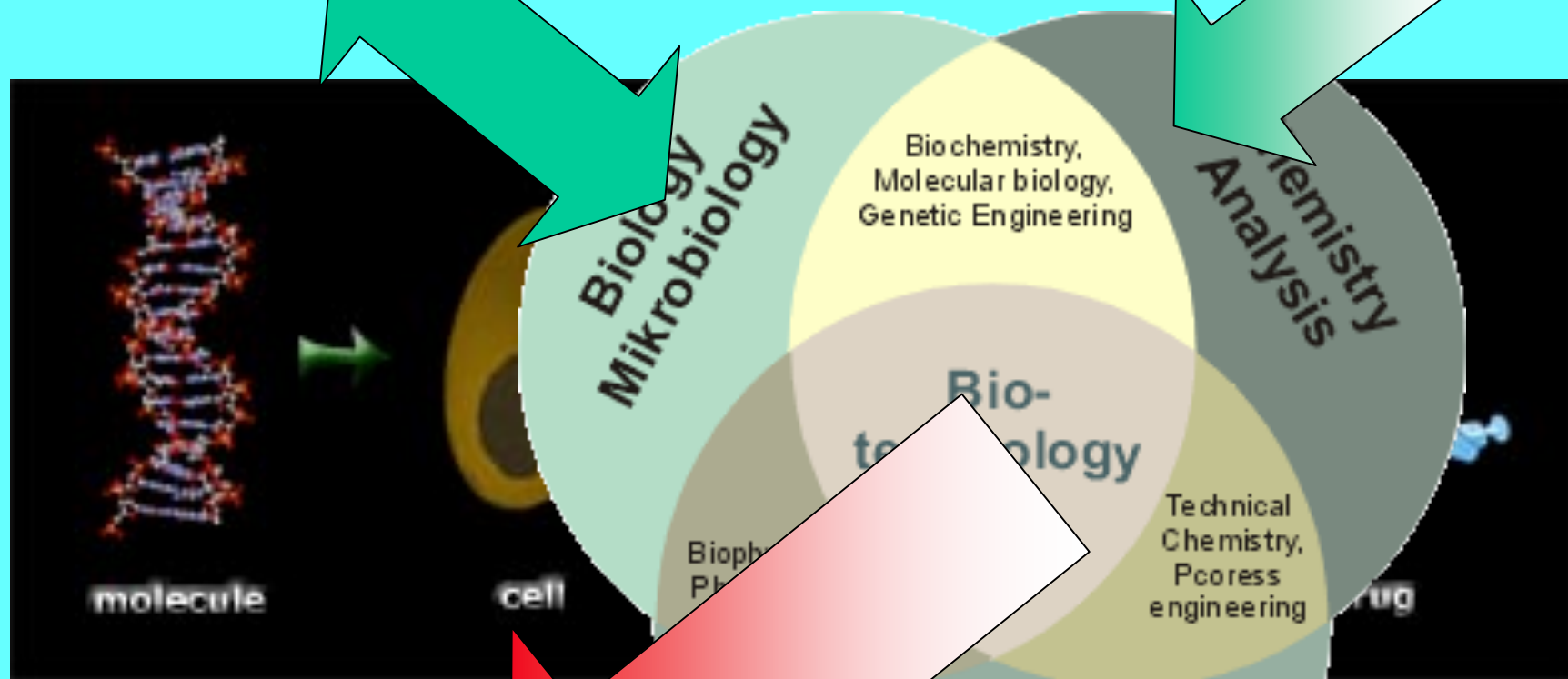
Cél:

**Hatékony és egyénre szabott terápiához
elengedhetetlen mind specifikusabb
hatóanyagok kifejlesztése**

Hogyan érhetjük ezt el?

- 1. Alapkutatósi eredmények felhasználása: a molekuláris biológia, bakteriológia, biokémia, immunológia területéről**
- 2. Alapkutatósi eredmények ötvözése**

Üzlet *Jog/etika*
A biotechnológia helye és helyzete



Életminőség

Gyógyszerészeti Biotechnológia témakörei

Bevezetés a molekuláris biotechnológiába I. (DNS, RNS, fehérje szintézis pro- és eukariótákban, baktériumok, plazmidok, bakteriofágok)

Bevezetés a molekuláris biotechnológiába II. (Rekombináns DNS technikák, restriktív enzimek, DNS módosító enzimek, hibridizációs technikák, PCR, RT-PCR, Q-PCR)

Fehérjék a terápiában: növekedési faktorok, citokinek, antitest alapú terápiák, antivirális, daganatellenes terápiák bevezetése, expressziós rendszerek

Immunizálás, az antitestre jellemző tulajdonságok, hibridóma technika, ellenanyag termelés, tisztítás, jelölés

Rekombináns fehérje expresszió, ipari szintű fehérje tisztítás, transziens transzfekció, mesterséges kromoszóma, rekombináns fehérjék formulációja

Rekombináns hemopoetikus növekedési faktorok (G-CSF, GM-CSF, EPO, SCF, thrombopoetin)

Rekombináns inzulin, rekombináns növekedési hormon, rekombináns FSH

Rekombináns interferonok és interleukinek, rekombináns thrombolitikus szerek; rekombináns alvadási faktorok

Rekombináns interferonok és interleukinek, citokin gátló hatású biológiai terápiák, rekombináns thrombolitikus szerek; rekombináns alvadási faktorok

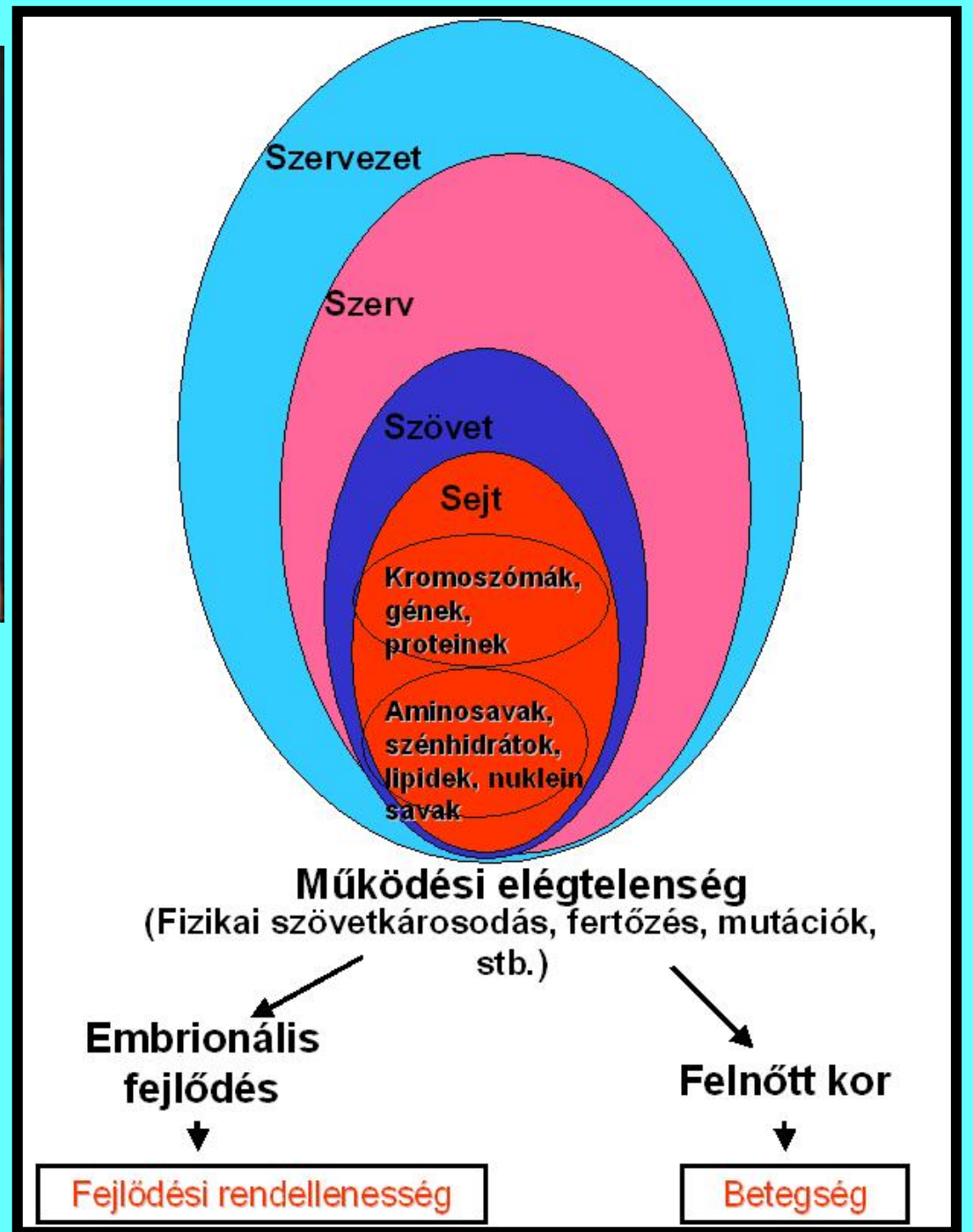
Ellenanyag alapú biológiai terápiák I-III. (Felhasználási területek, Poliklonális ellenanyagok, IVIG, Poliklonális ellenanyagok, IVIG, monoklonális ellenanyagok, humanizált, kiméra antitestek, új fejlesztési irányok)

Vakcínák

Célzott terápiák (targeting), nanotechnológia

Embrionális-, felnőtt őssejt technikák, Tissue engineering

Biológiai terápiák tesztelési rendszerei, modell rendszerek, klinikai vizsgálatok



**Betegség = celluláris folyamatok
egyike nem illetve nem elég
hatékonyan működik**



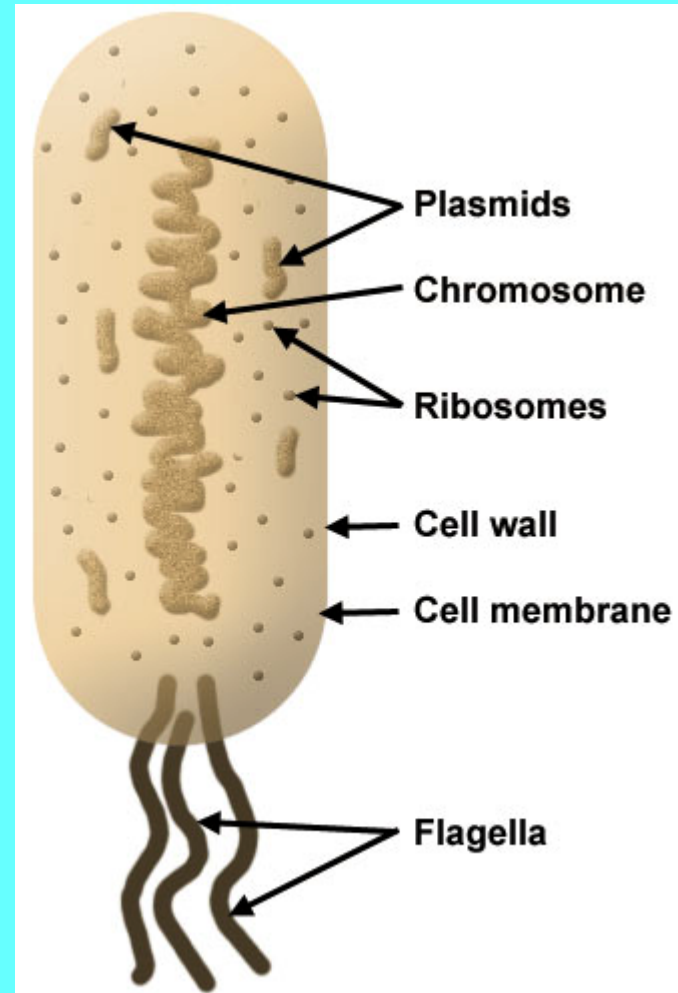
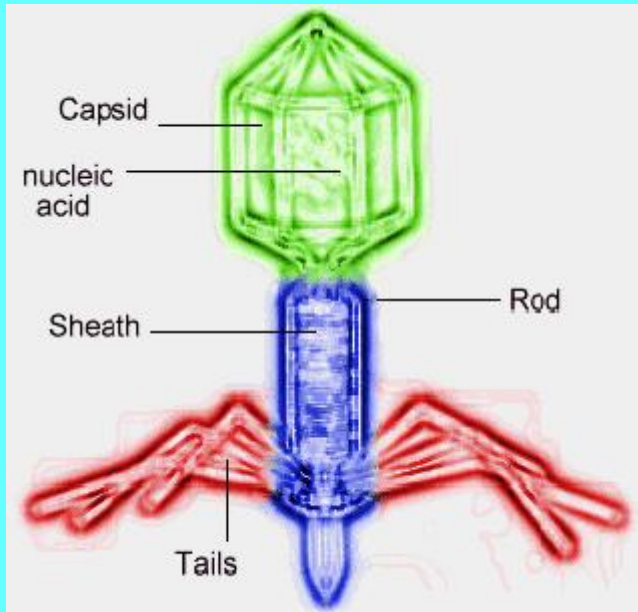
Szöveti funkció elégtelensége

Okok:

1. Fertőzések
2. Spontán ill. indukált mutációk
3. Fizikai károsodás

A BIOTECHNOLÓGIA MOLEKULÁRIS ALAPJAI

Vírusok, prokaryoták, eukaryoták

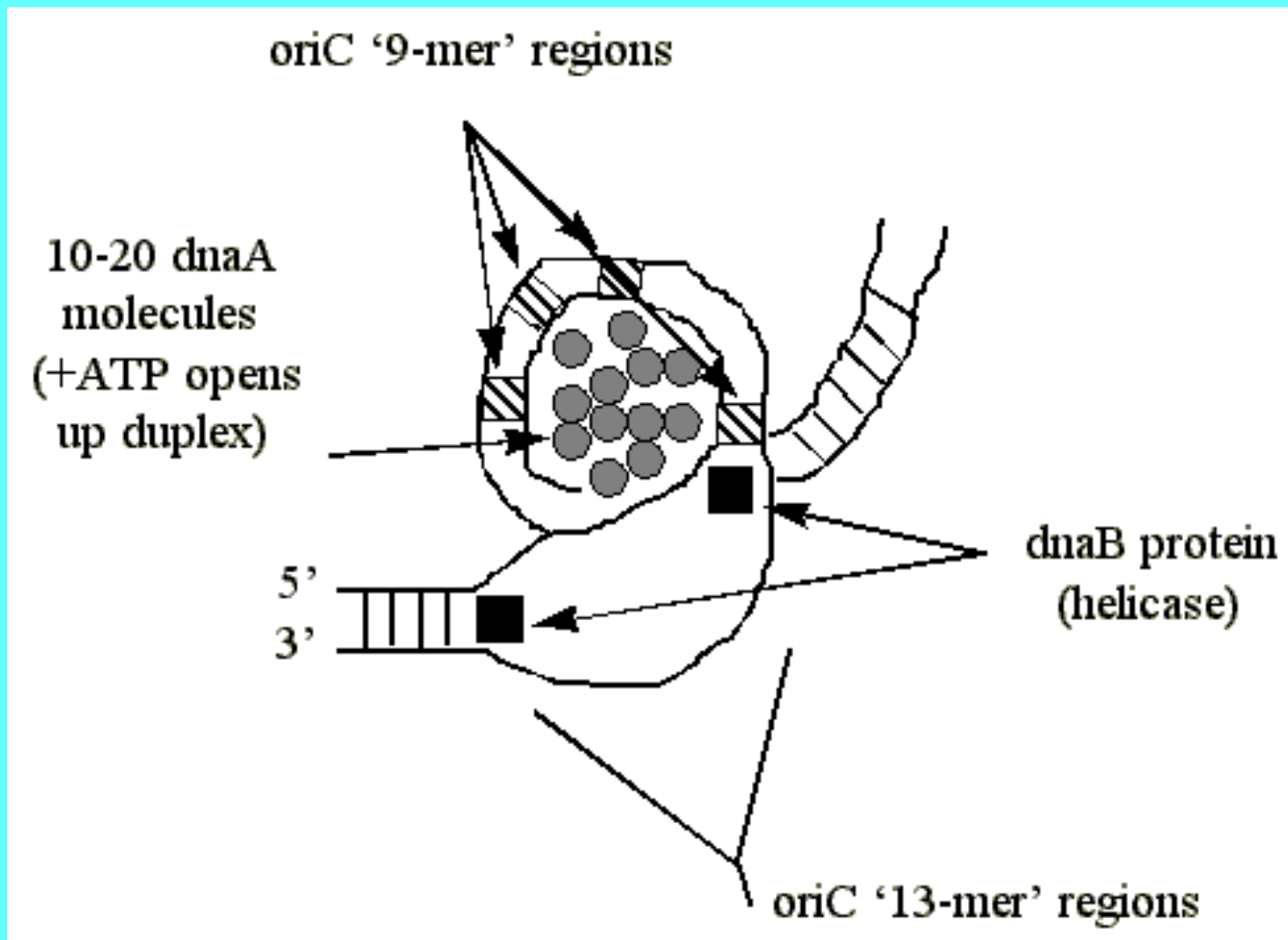


A bakteriális sejtosztódás főbb fázisai

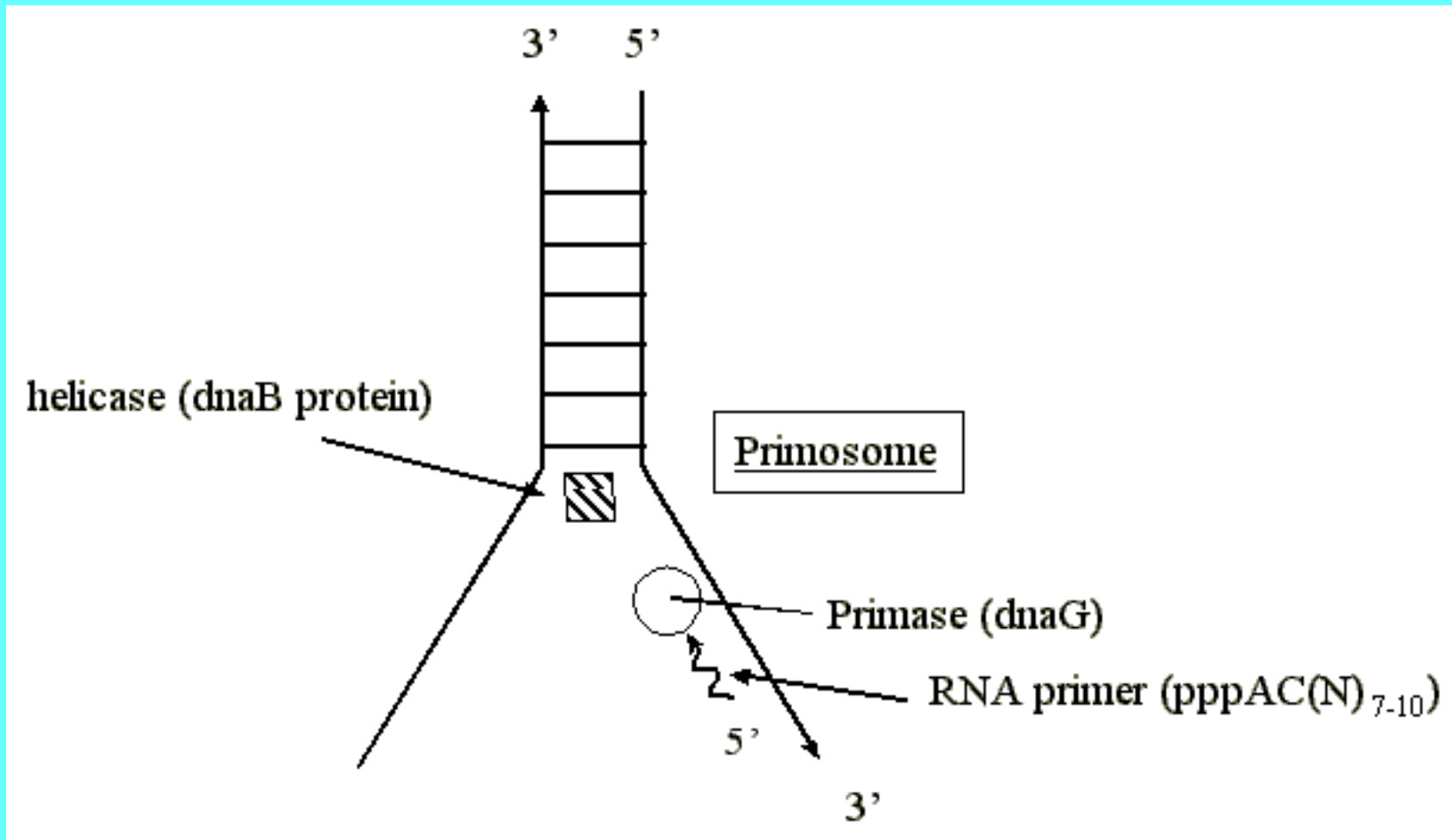
I.

- ***E. coli* genom:** 4 Mb (4×10^6 bázispár)
- ***OriC*:** 240 bp, repetitív 9/13-as A/T gazdag szekvenciákat tartalmazó EGYETLEN régió a genomban.
- 10-20 dnaA protein kötődik ATP jelenlétében az *OriC* régióhoz, újabb ATP hatására a kettős lánc szétválik (melting).
- A szétvált láncokhoz 1-1 dnaB protein (helikáz) kapcsolódik: ***prepriming komplex kialakulása***

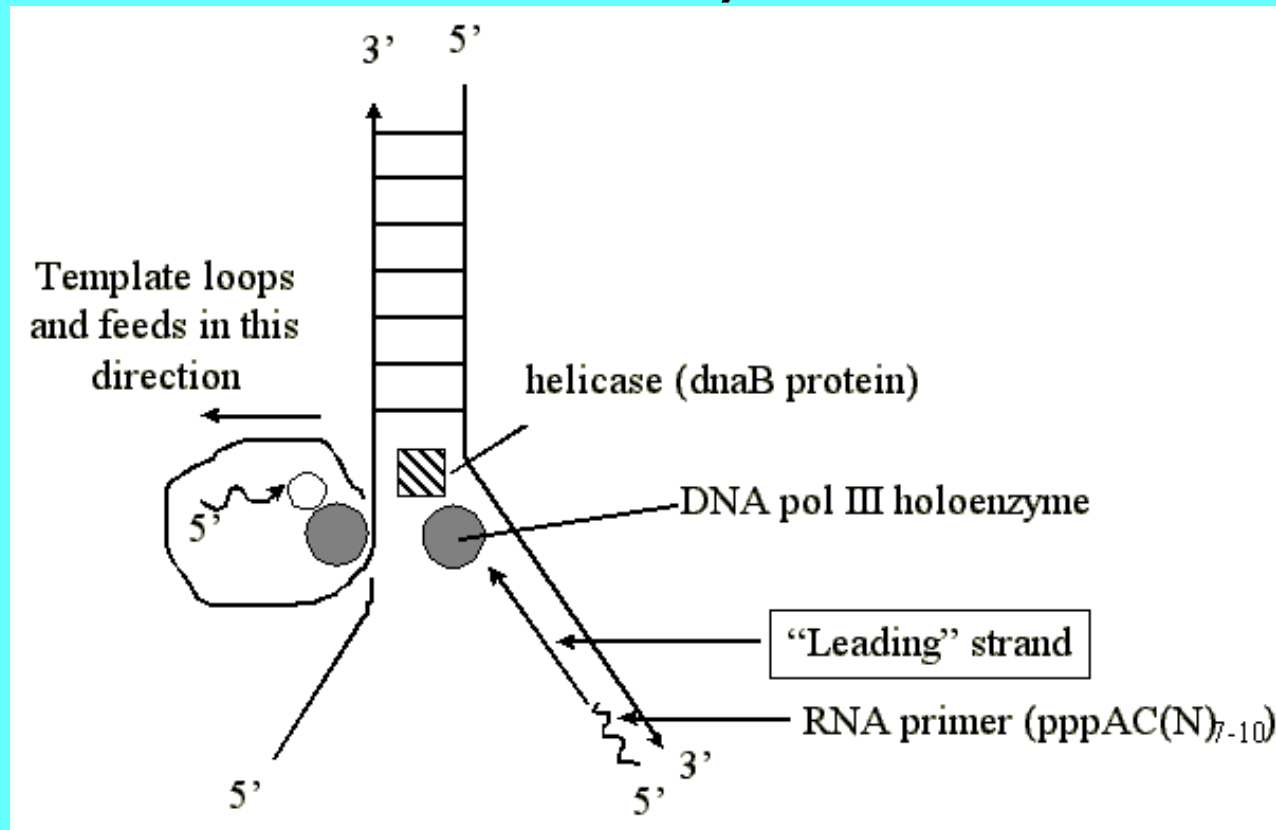
Prepriming komplex E. coli replikációjában



A bakteriális sejtosztódás főbb fázisai II: a primoszoma kialakulása a dnaG protein (primáz) kötődésével a dnaB-hez: *RNS primer* *szintézise*

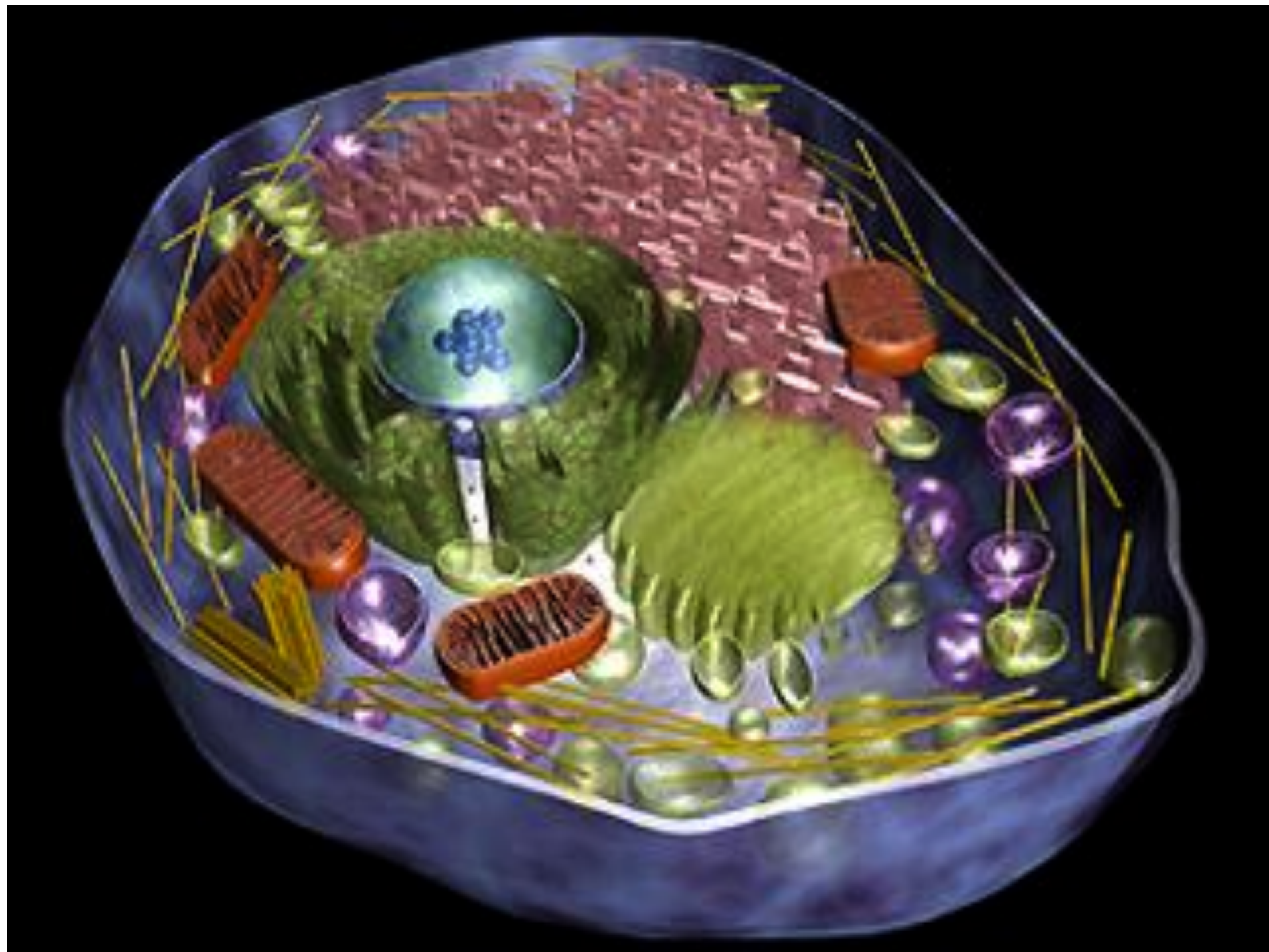


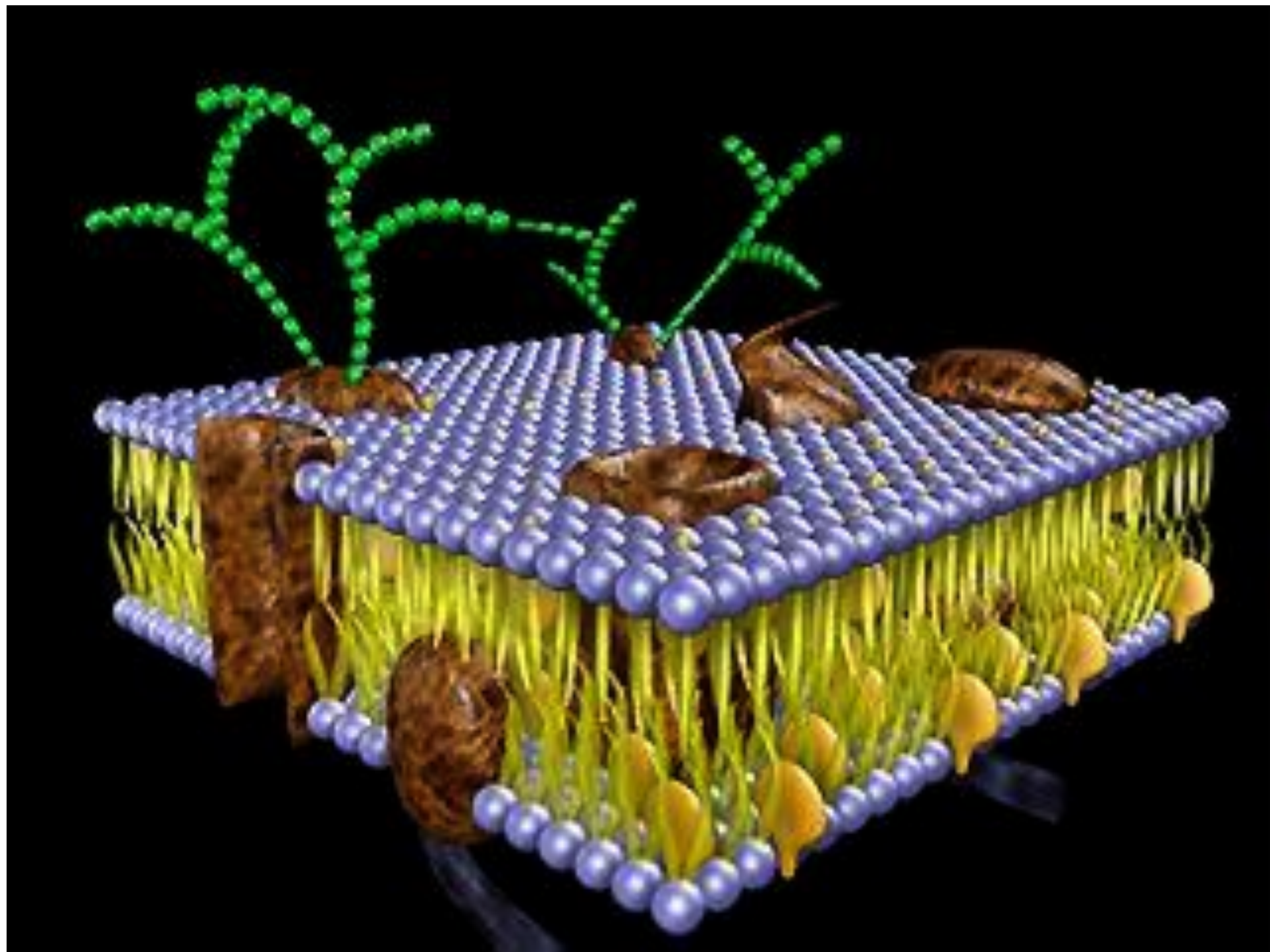
A bakteriális sejtosztódás főbb fázisai III: DNA Pol III hatására elongáció a vezető szálon (*leading strand*), cirkuláris szakaszok képződése a lemaradó szálon (*lagging strand*, linearizálódás után Okazaki-fragmentum: RNS primer utáni rövid DNS szál)



A bakteriális replikáció főbb elemei:

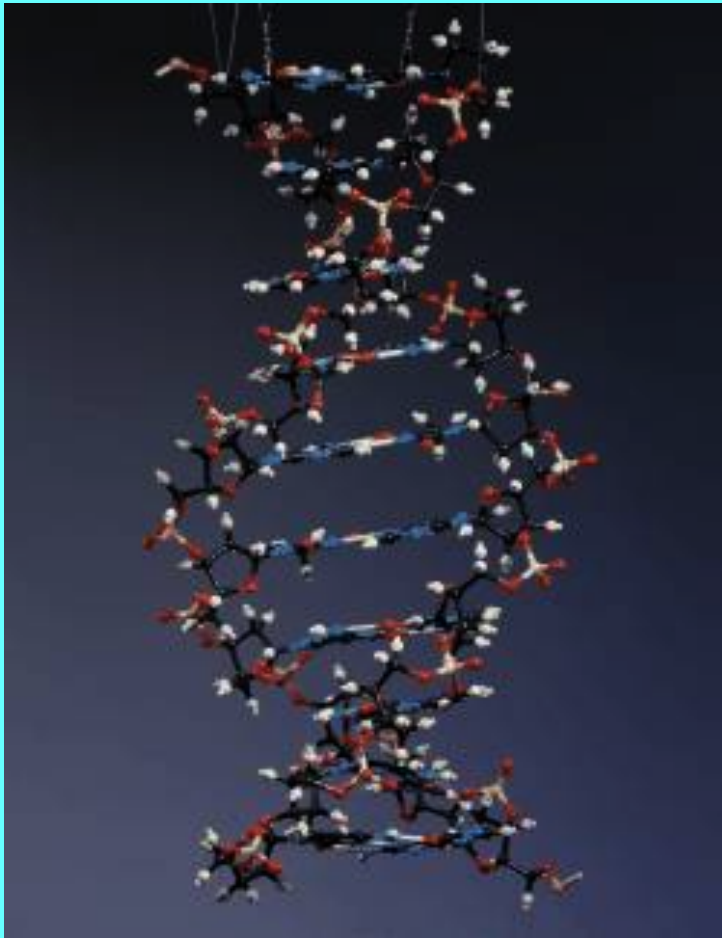
- A dnaA protein + ATP szétválasztja a duplexet az OriC régióban.
- dnaB (helicase) és ATP kötődik (Prepriming komplex), záródás gátlása.
- Primáz (dnaG)-helikáz komplexképződés (primoszoma), RNS primerek (pppAC(N)₇₋₁₀) képzése .
- RNS primereket felhasználva DNA pol III a „vezető” szálon folyamatosan extendálja dNTP-k beépítésével az RNS primert.
- A „lemaradó” szál hurokképződése során cirkuláris RNS-DNS elemekből szakaszos replikáció Pol III révén.
- A Pol I leválasztja az RNS primer régiókat az Okazaki fragmentumokról 5' - 3' exonukleáz aktivitás révén
- Pol I leválik és a ligáz az elmaradó szálon összekapcsolja a DNS fragmentumokat .
- Termináció, topoizomeráz hatására leválás a templát-szálról



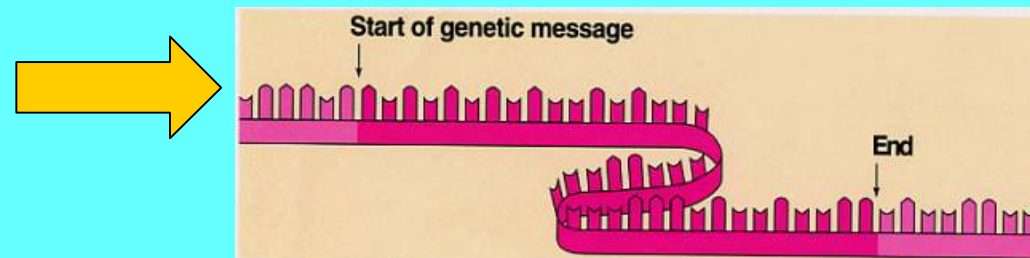


Az információ áramlása

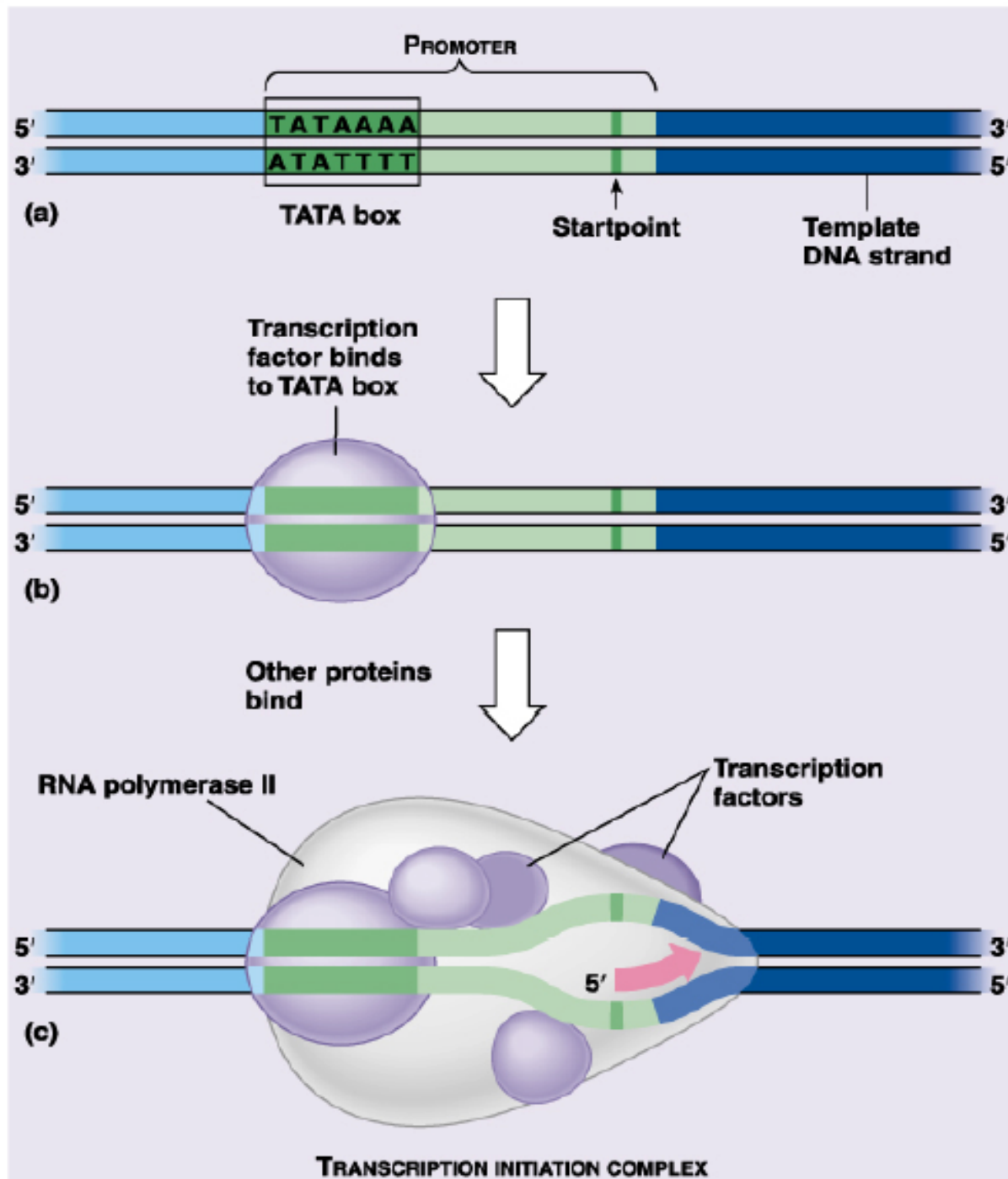
DNS



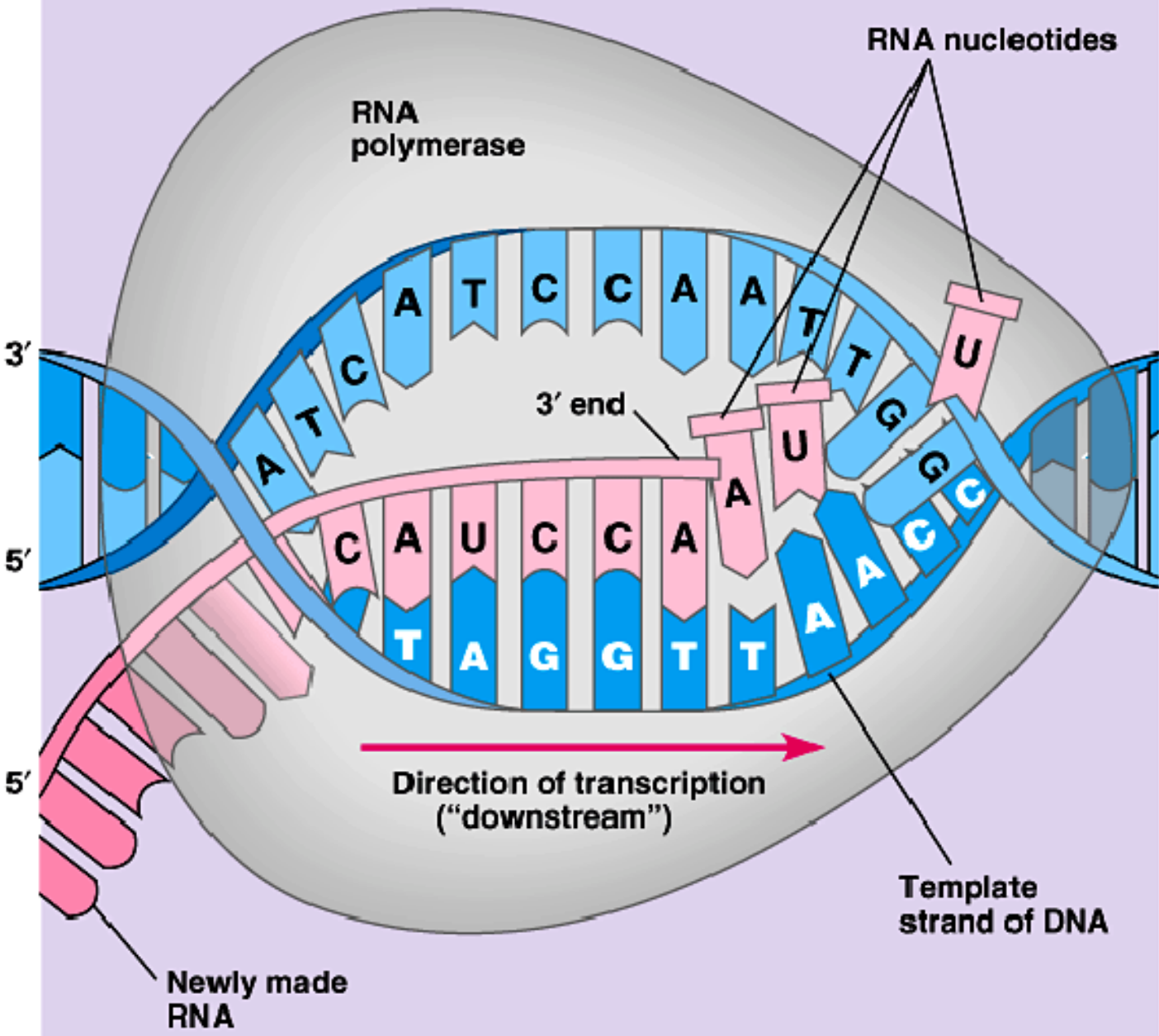
RNS

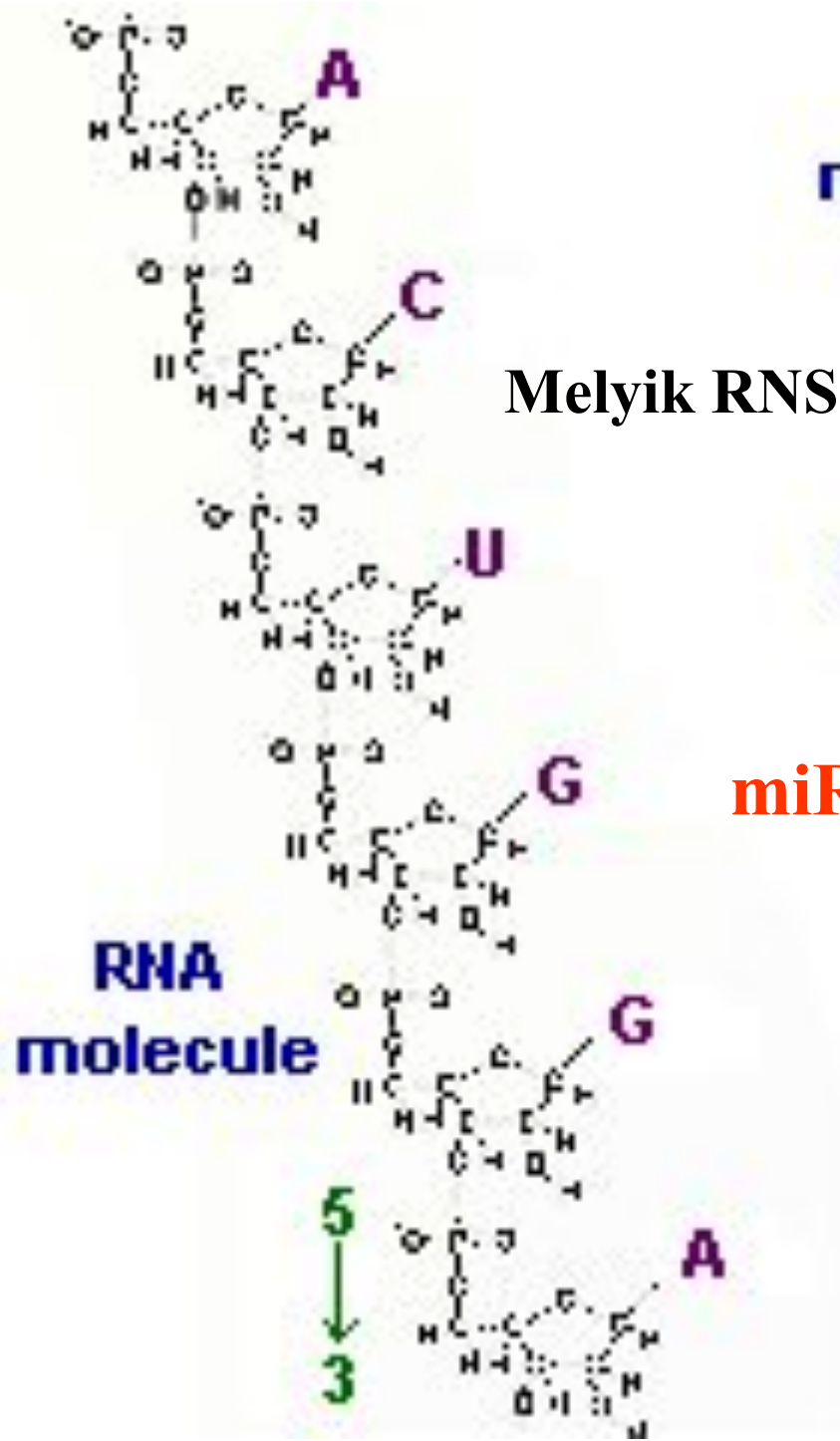


Fehérje



ELONGATION

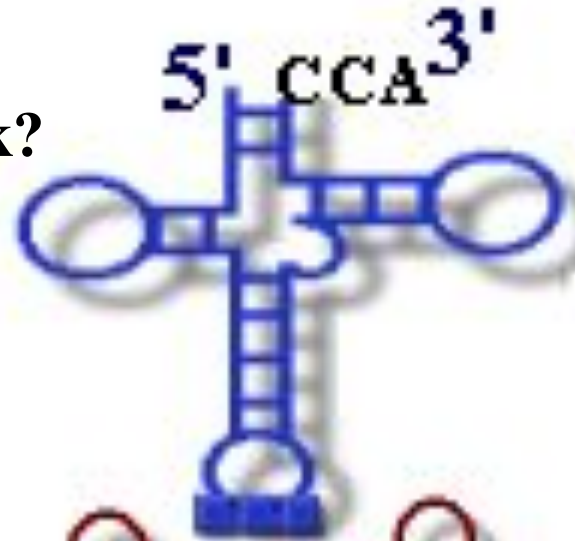




Melyik RNS hiányzik?



tRNA



miRNA

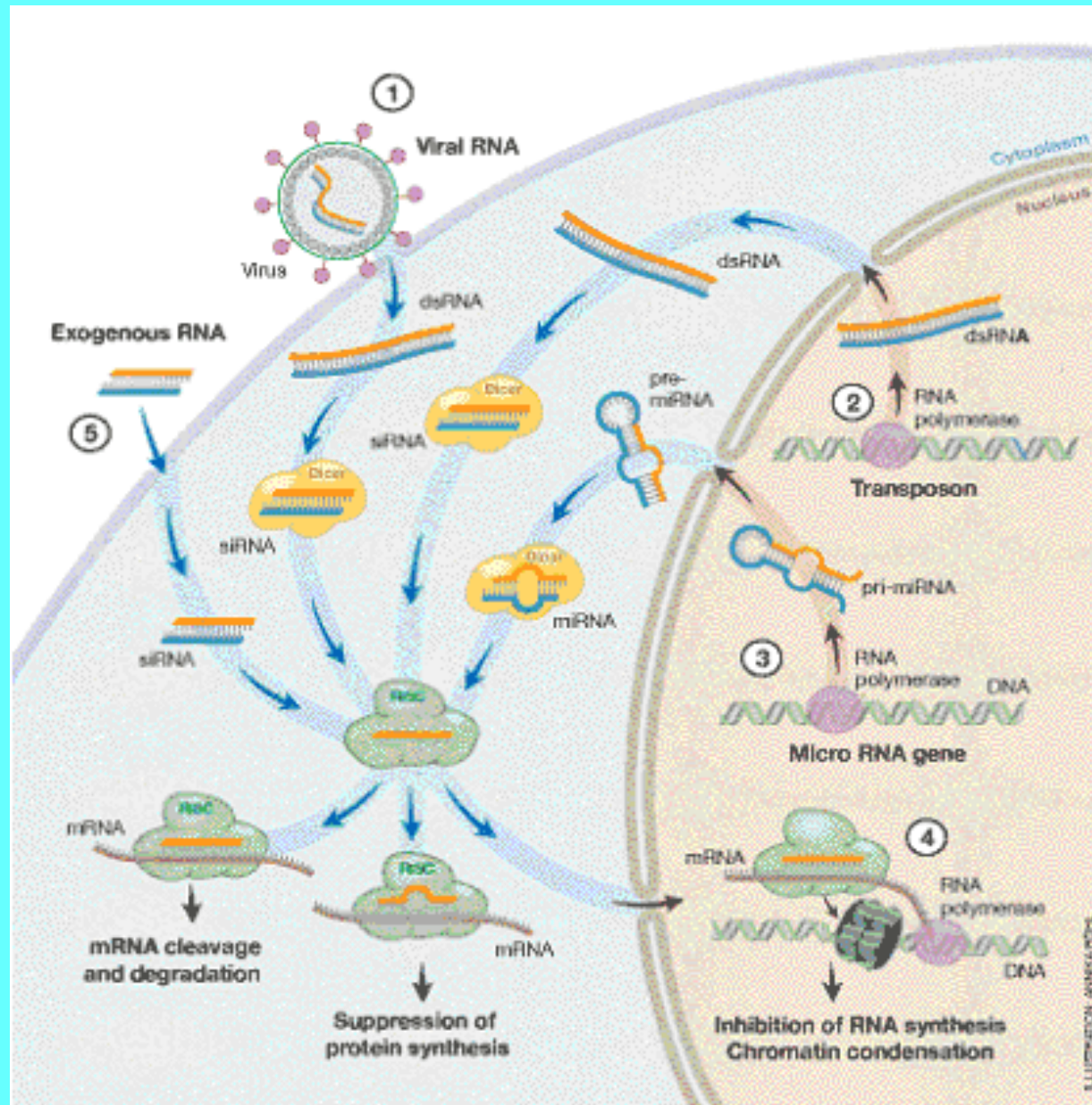
rRNA



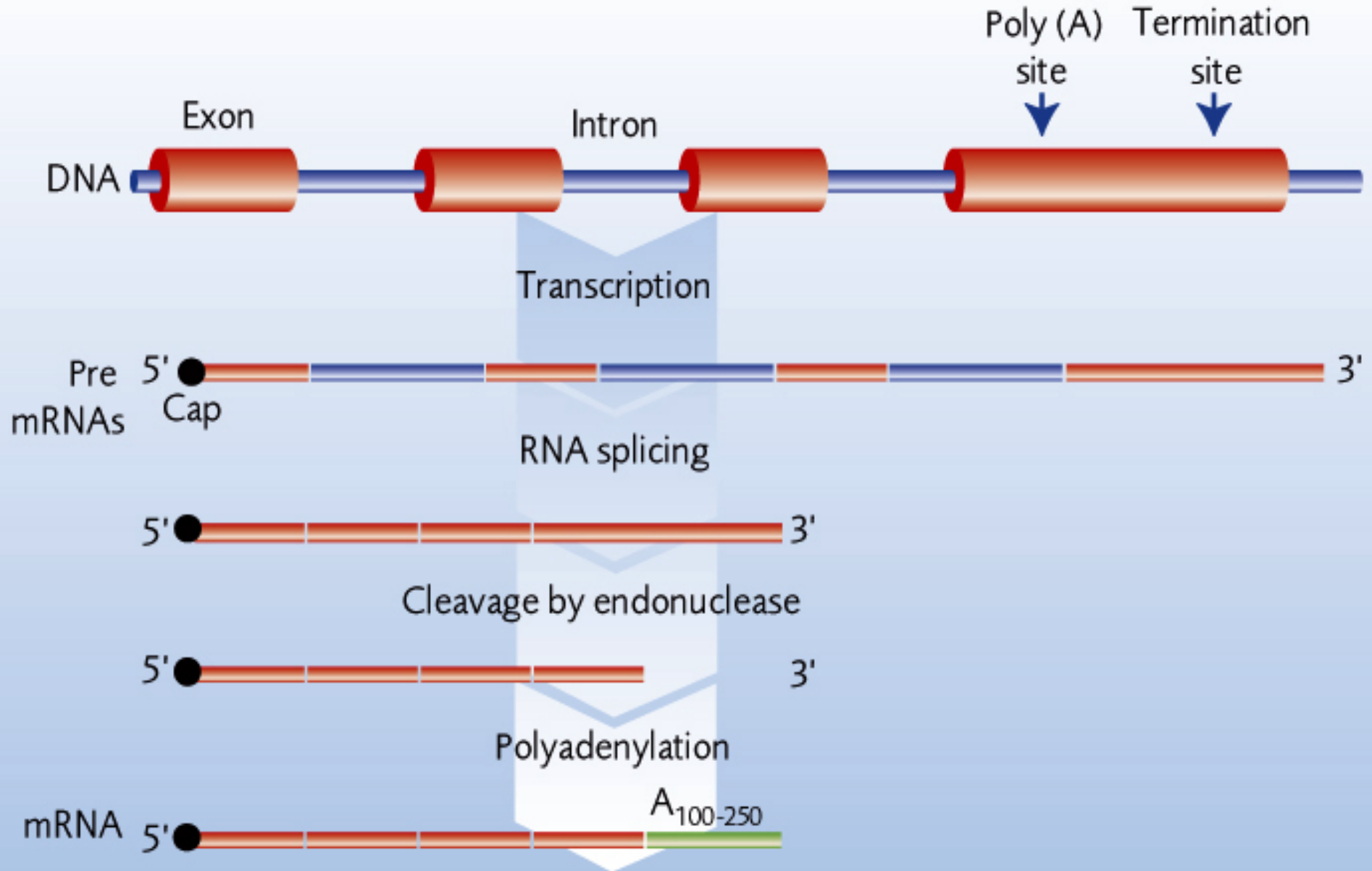
2006 Nobel Prize

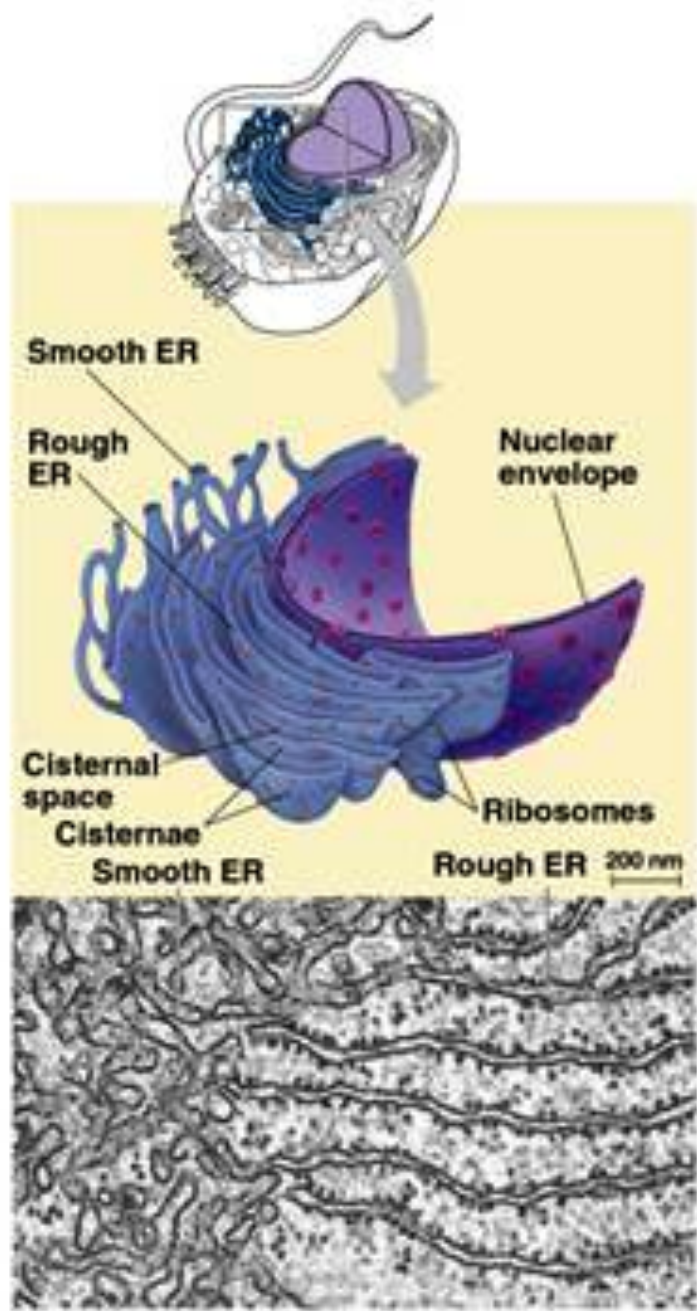
Professor **Andrew Z. Fire** at Stanford University, California, USA,

Professor **Craig C. Mello** at the University of Massachusetts Medical School in Worcester, USA

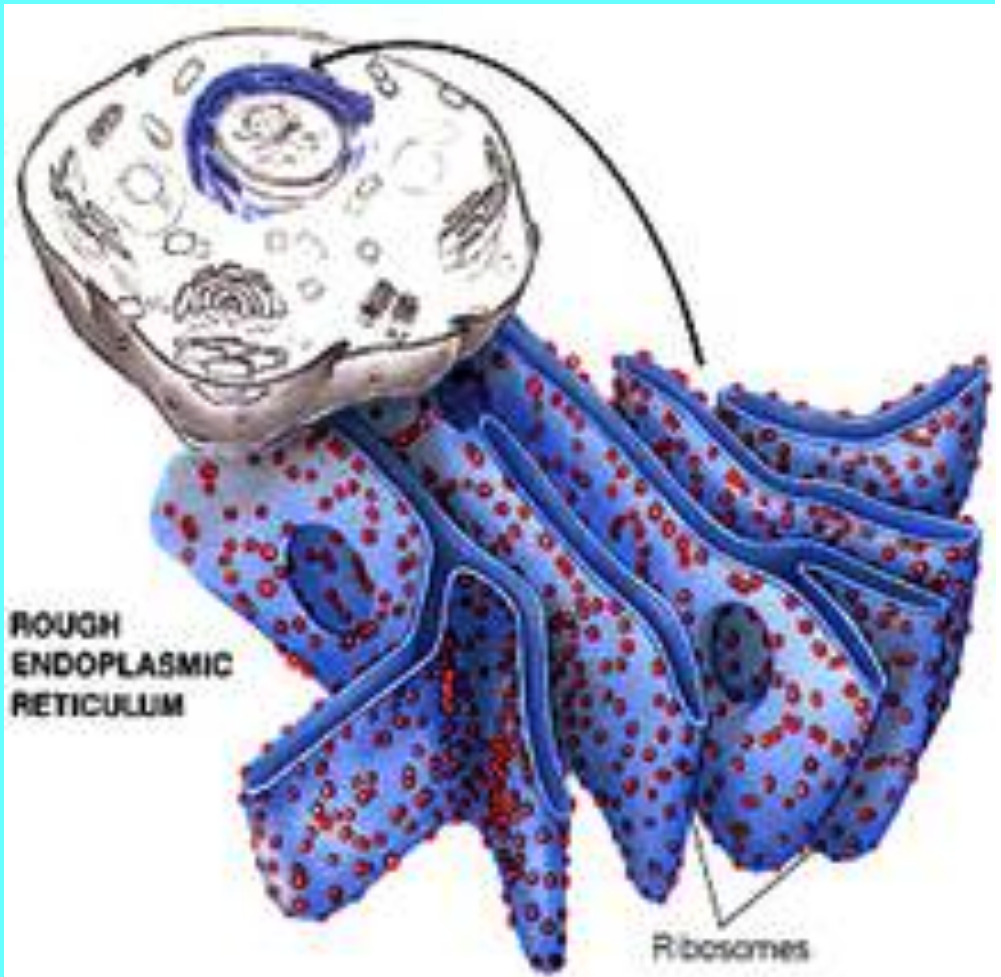


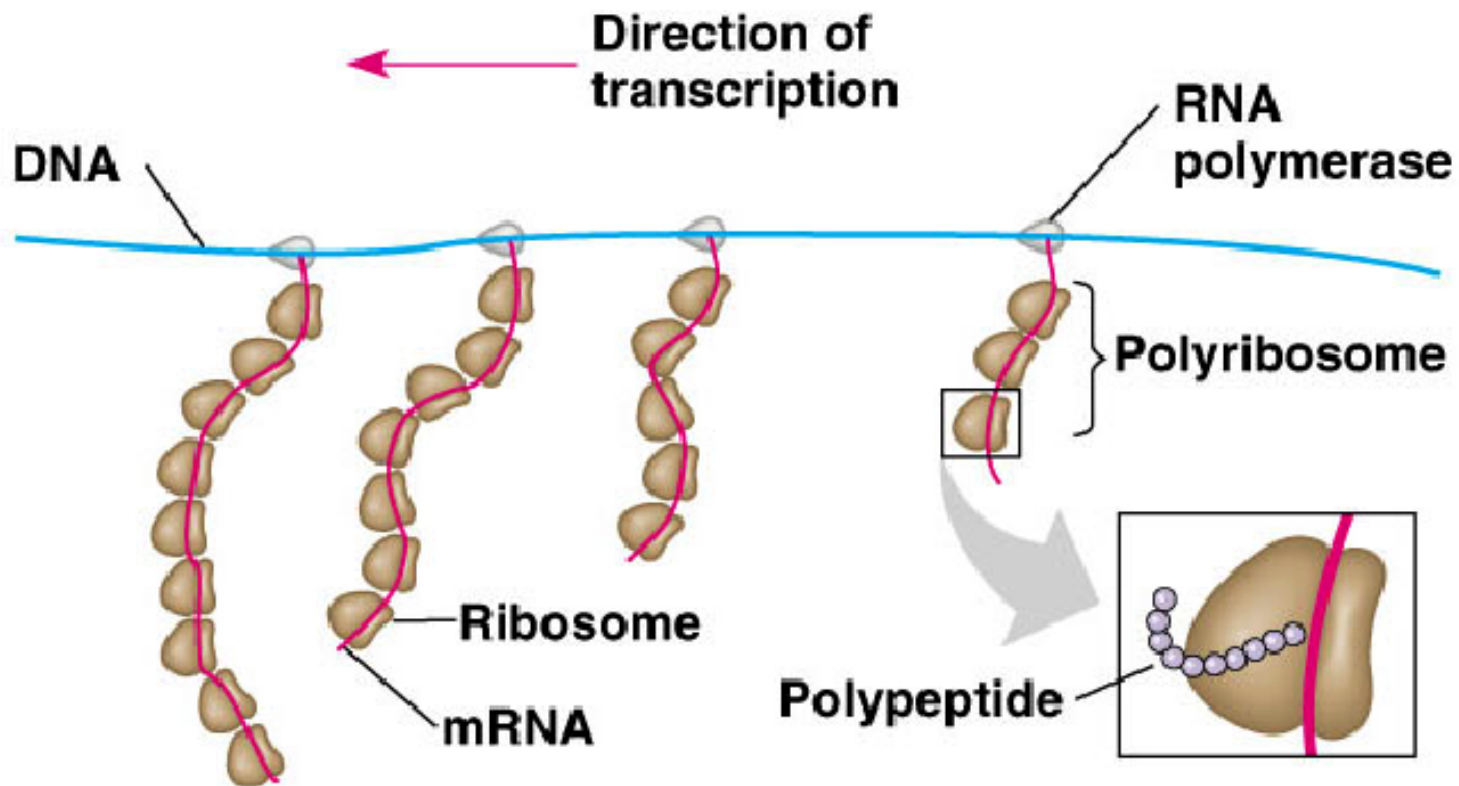
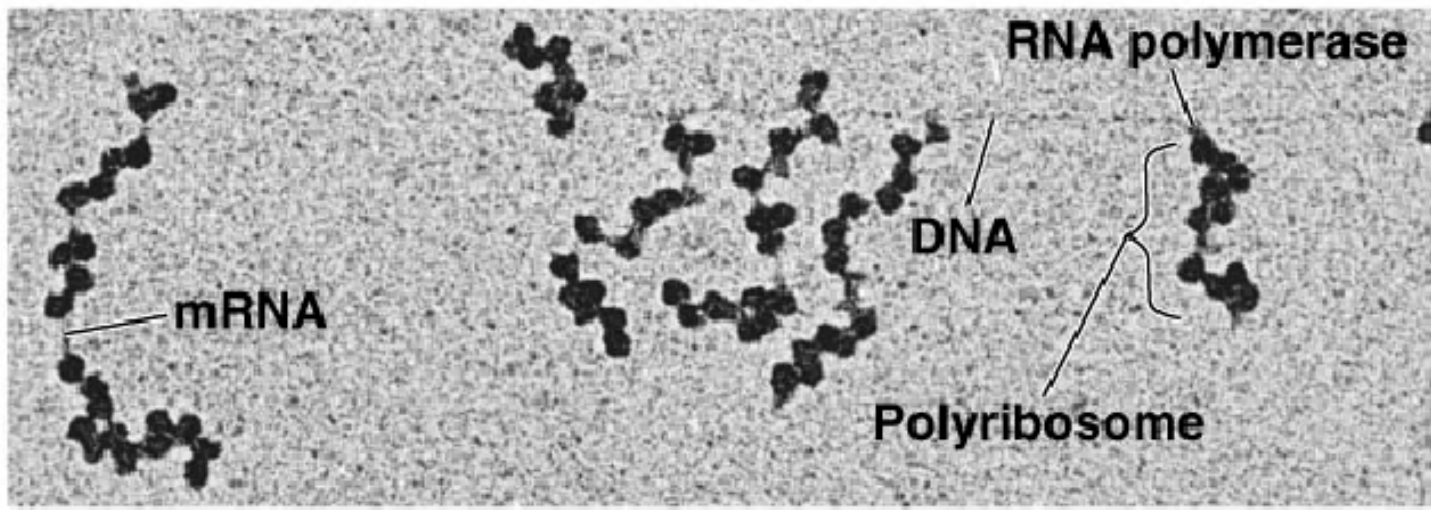
RNA processing



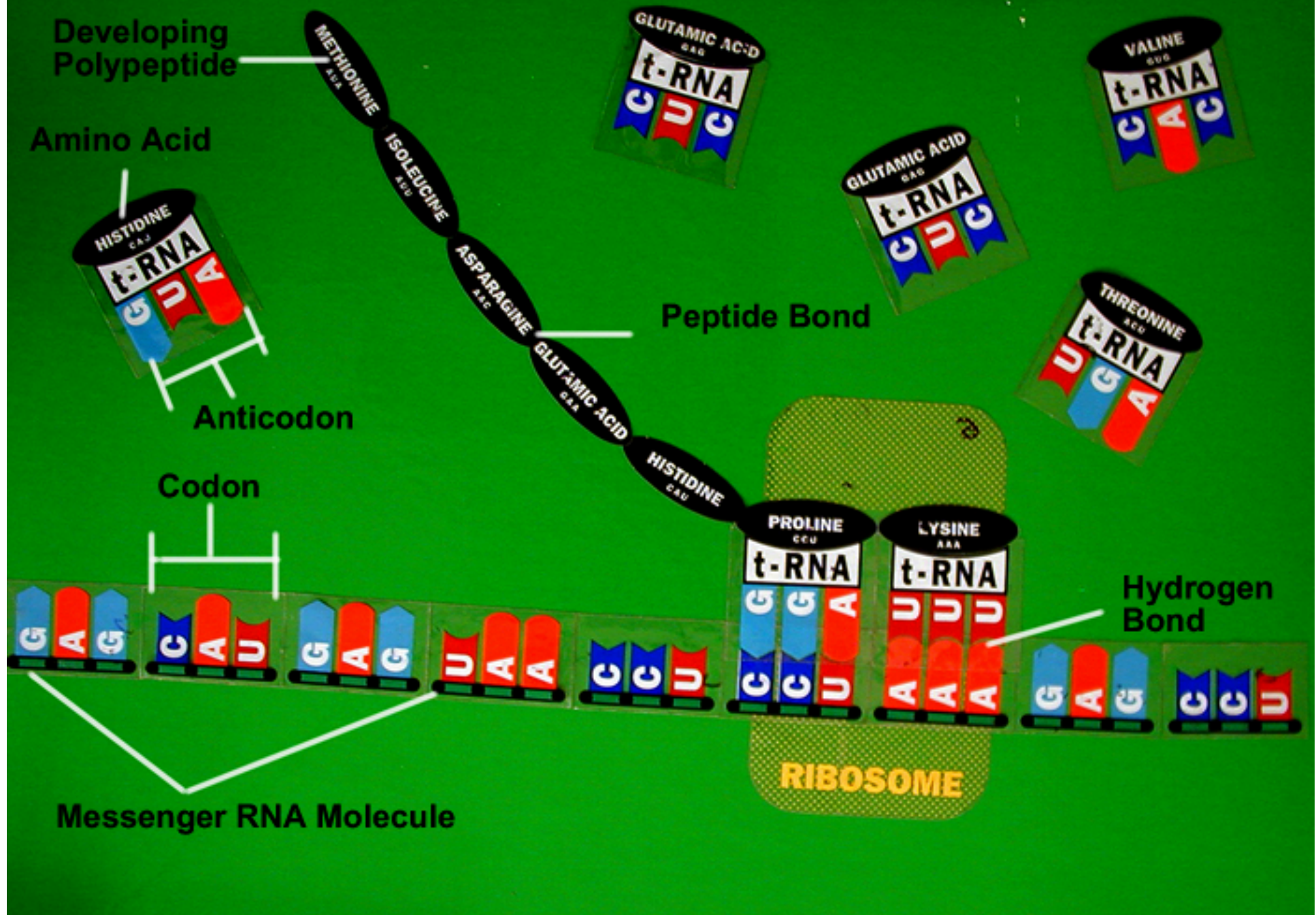


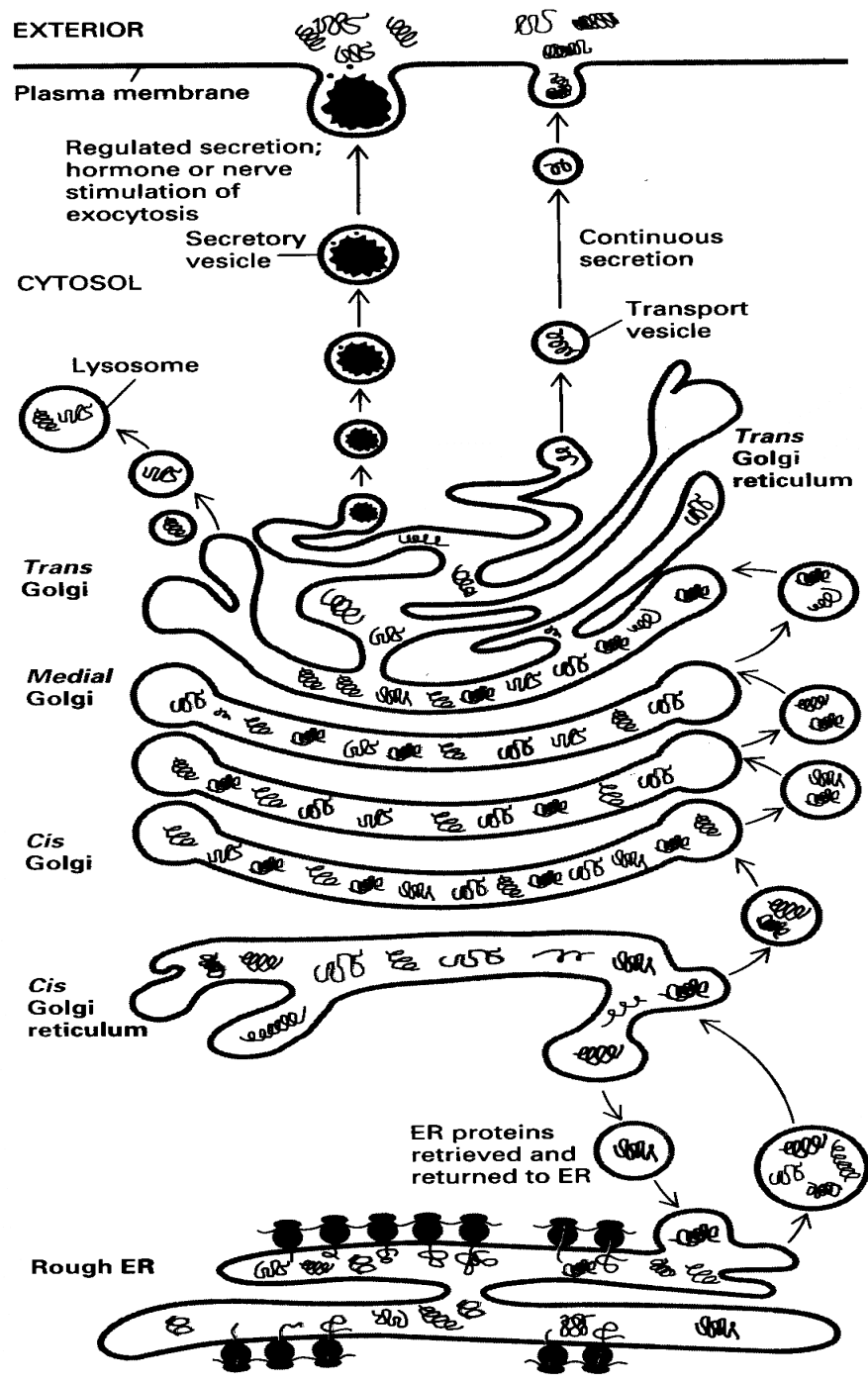
Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



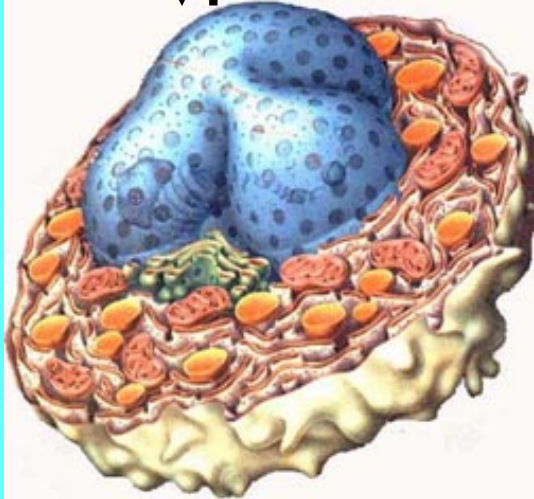
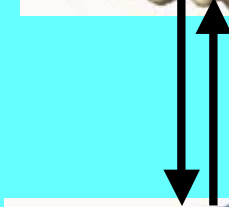
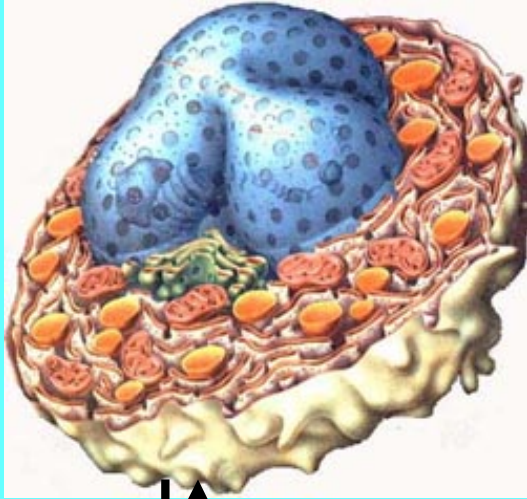
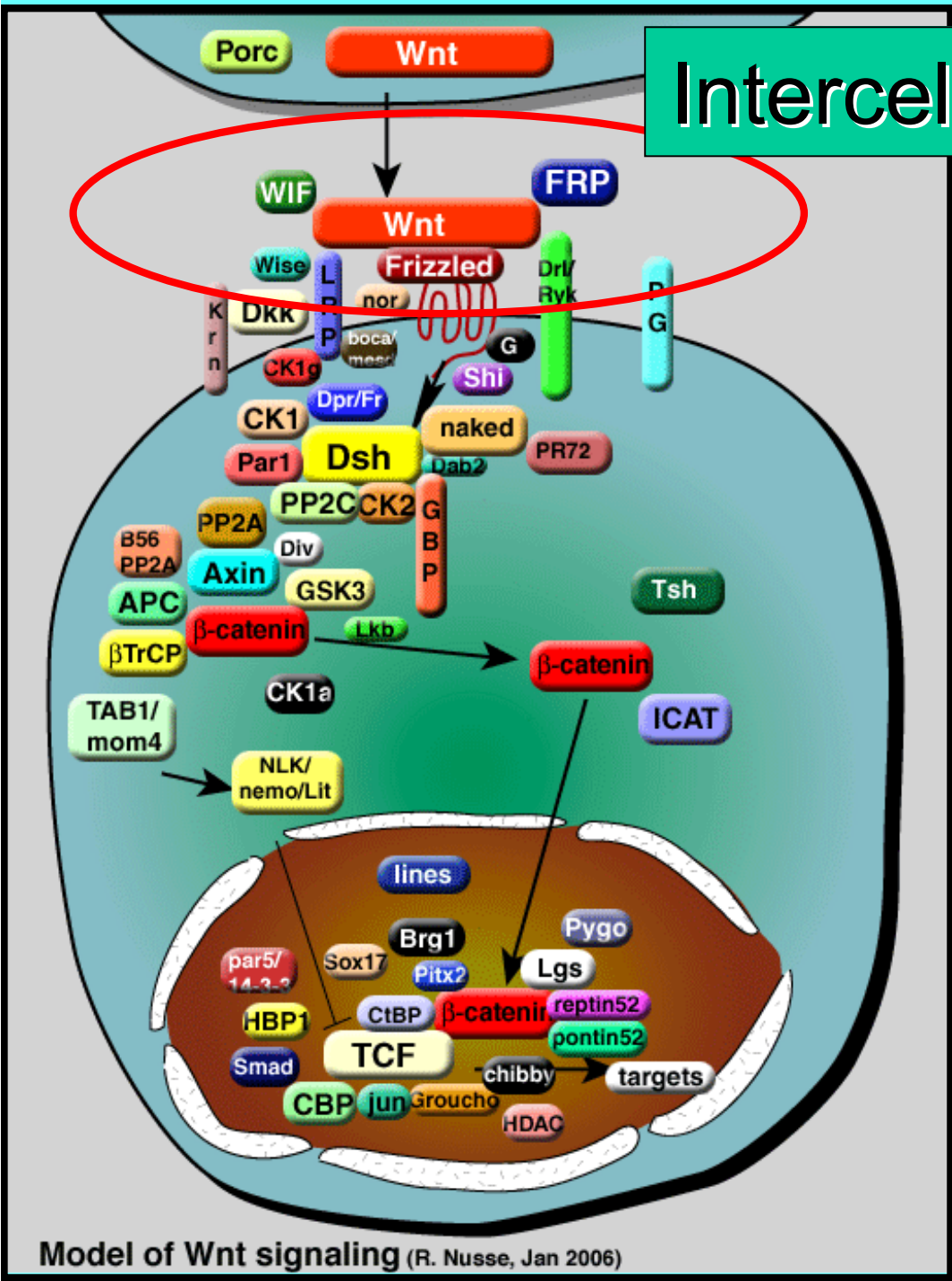


Translation

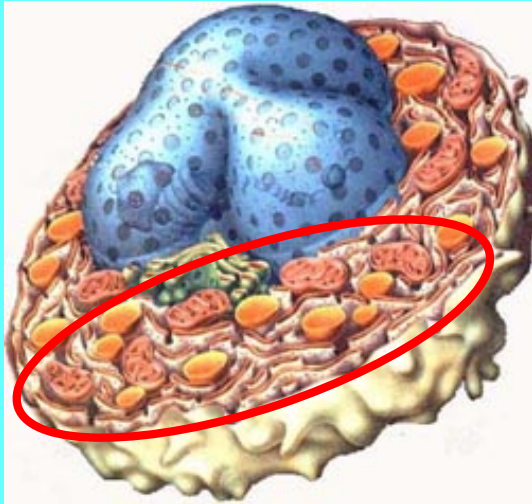
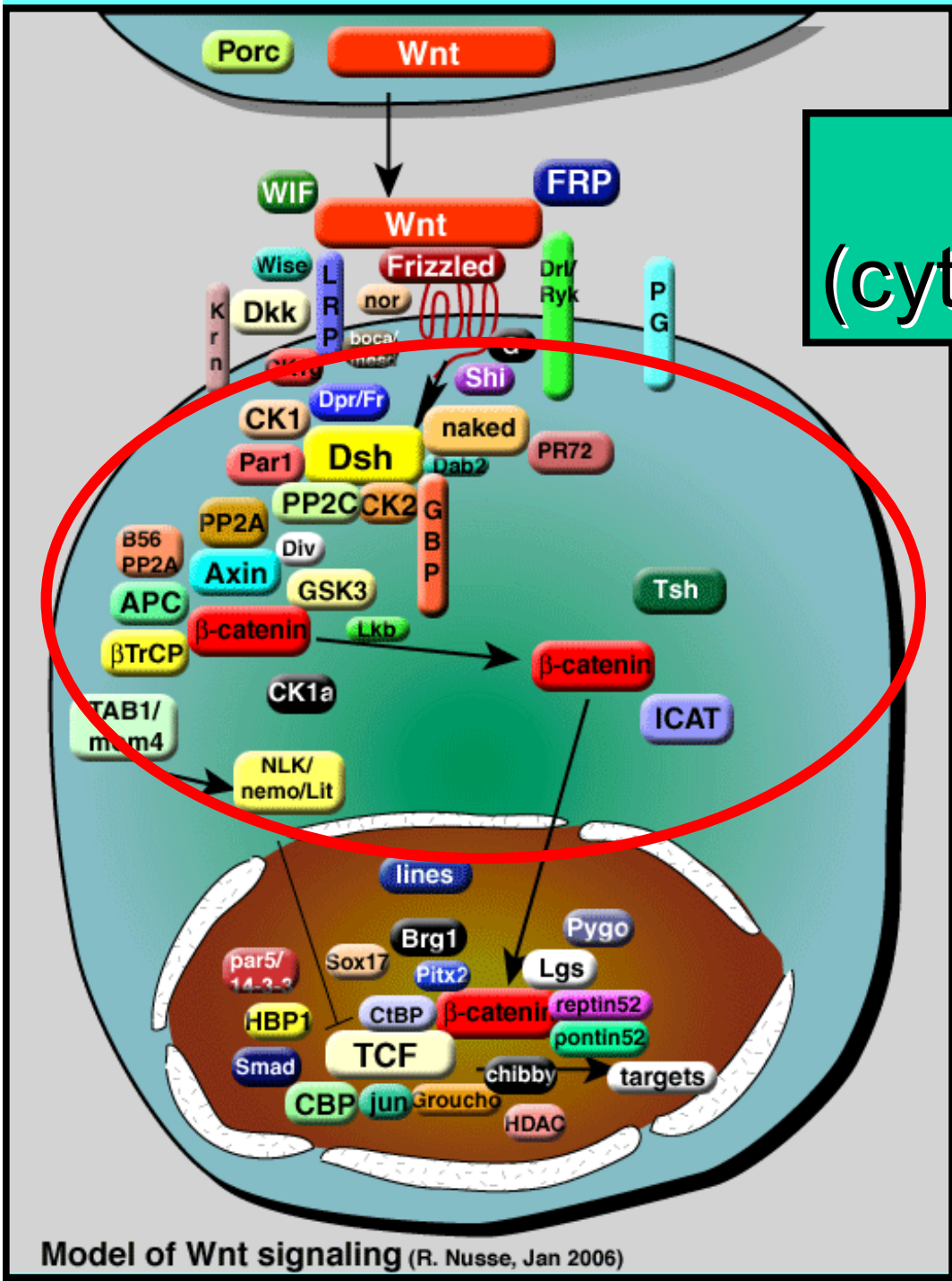




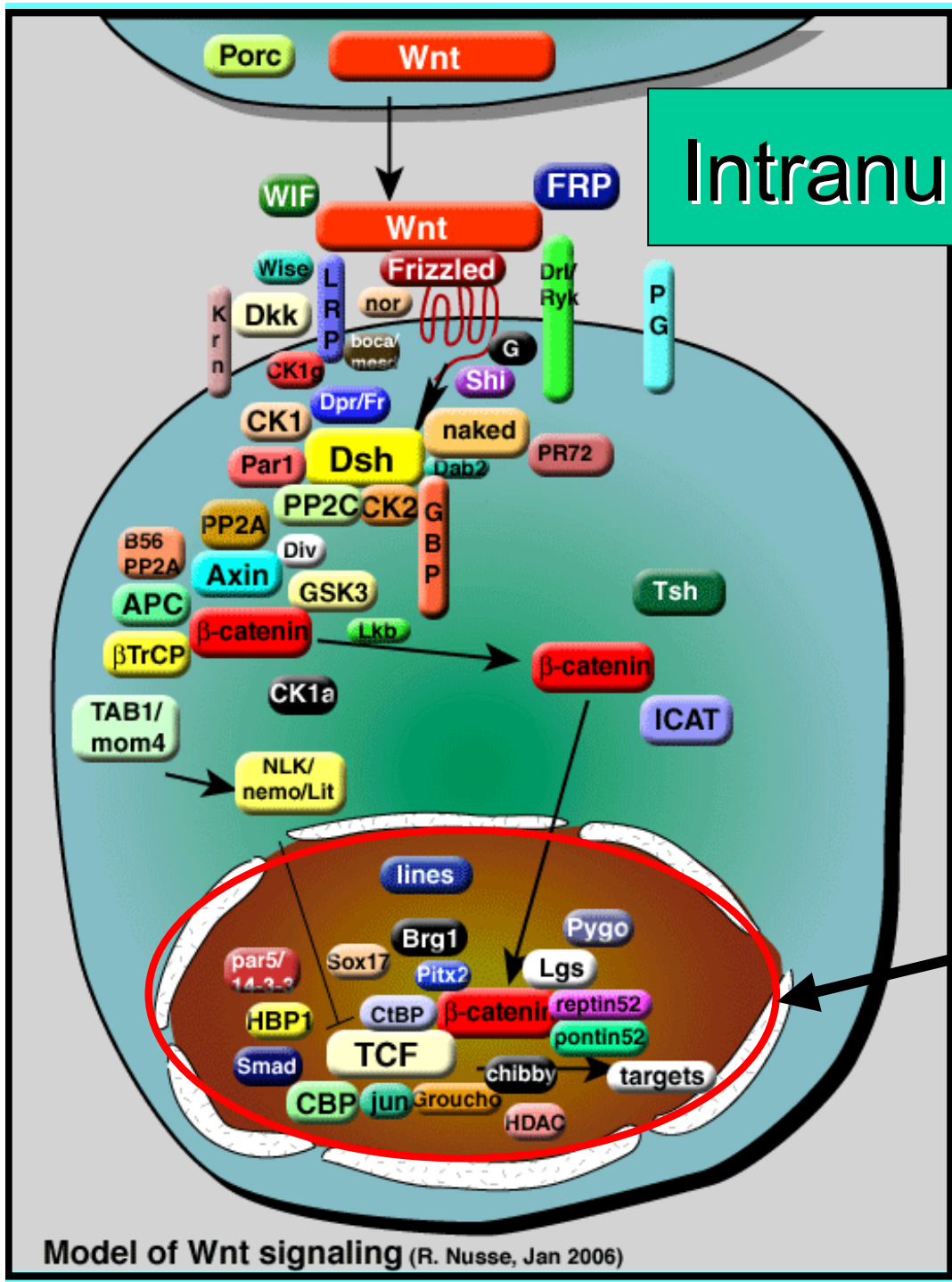
Intercelluláris jelátvitel



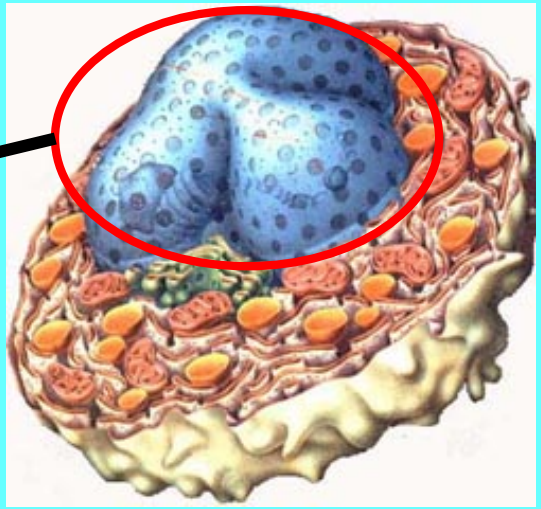
Intracelluláris (cytosol) jelátvitel

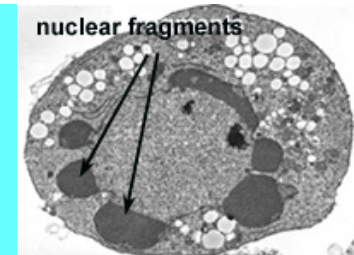
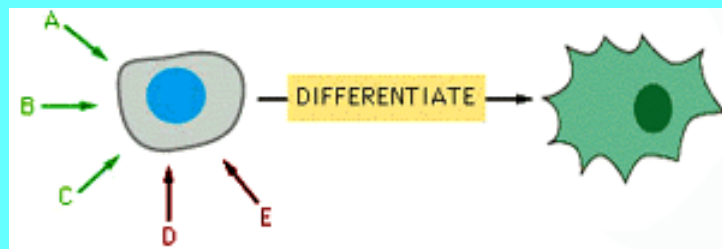
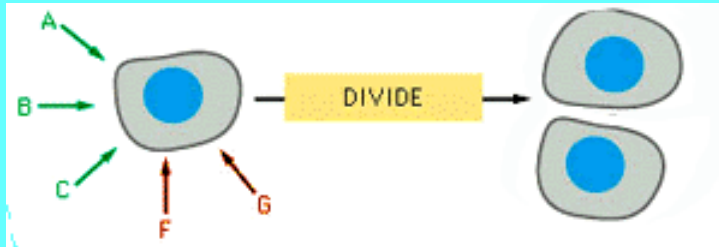
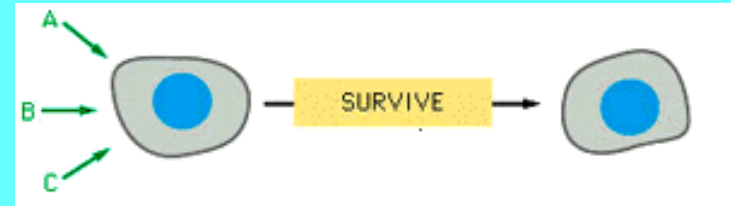


Intranukleáris jelátvitel



Model of Wnt signaling (R. Nusse, Jan 2006)

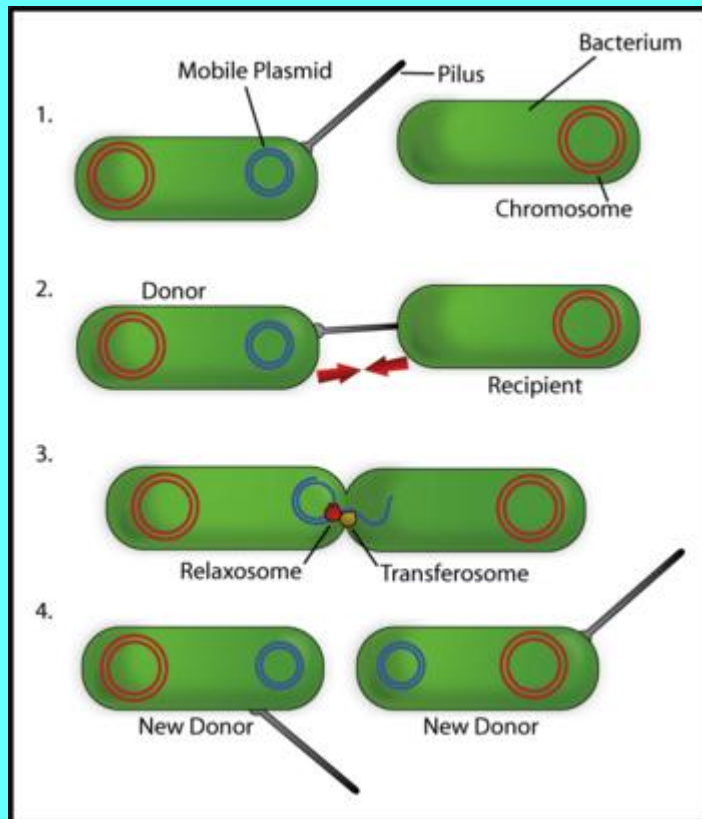




KLÓNOZÁS

Mi a plazmid?

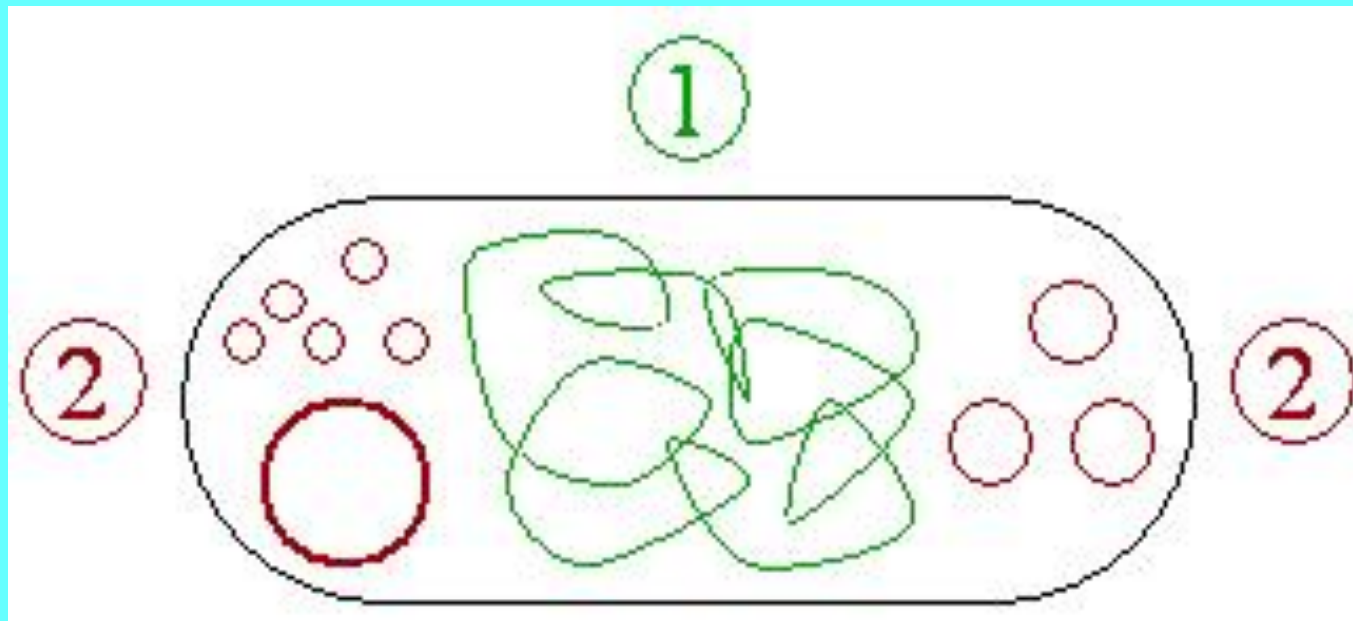
(Joshua Lederberg 1952)



Cirkuláris, dupla láncú DNS, ami a kromoszómális DNS-től függetlenül replikálódik.

Méretük 1-től 400 kbp-ig terjedhet.

Egy baktériumban lehet egy nagy, illetve több száz kisebb, avagy több ezer mesterséges plazmid (vektor), amelyeket a magas „copy number”-re külön szelektáltak (pl **pUC** plazmidok).



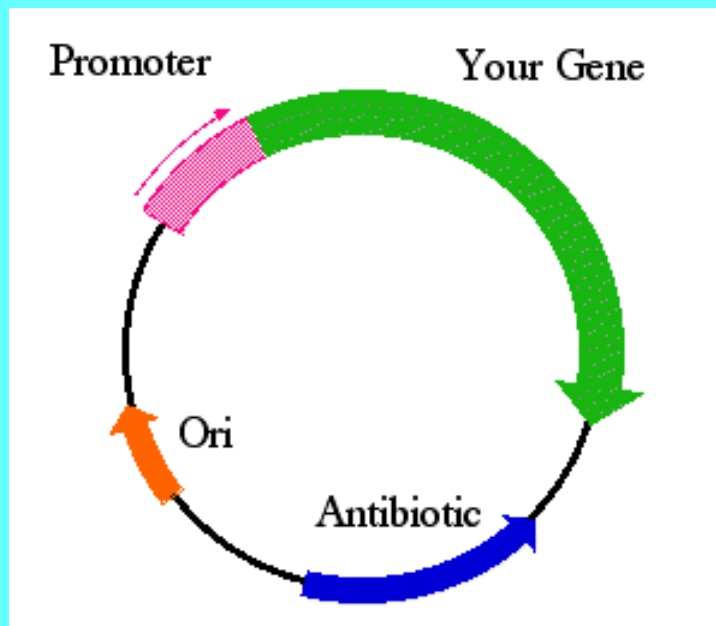
Mesterséges plazmid

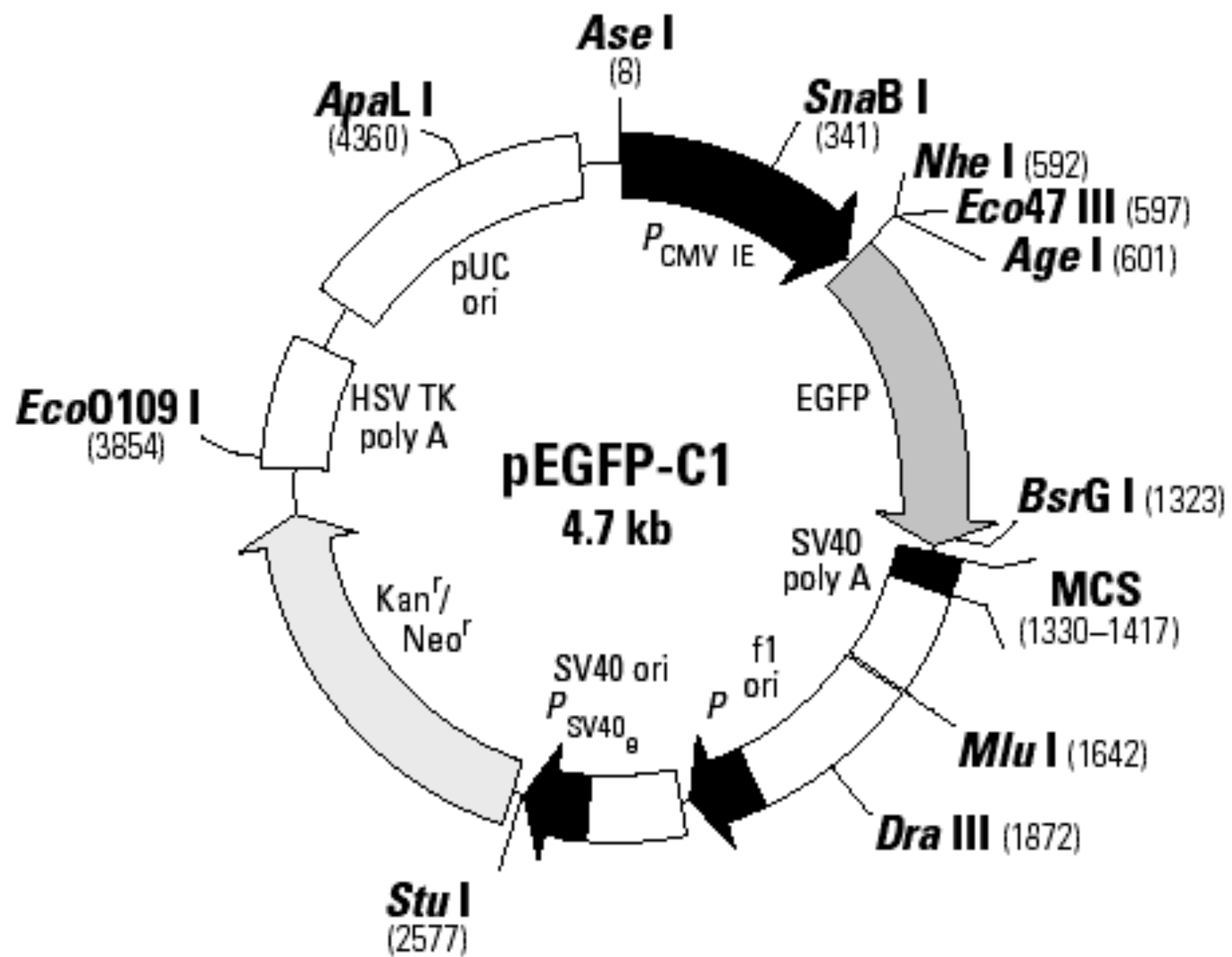
Promoter

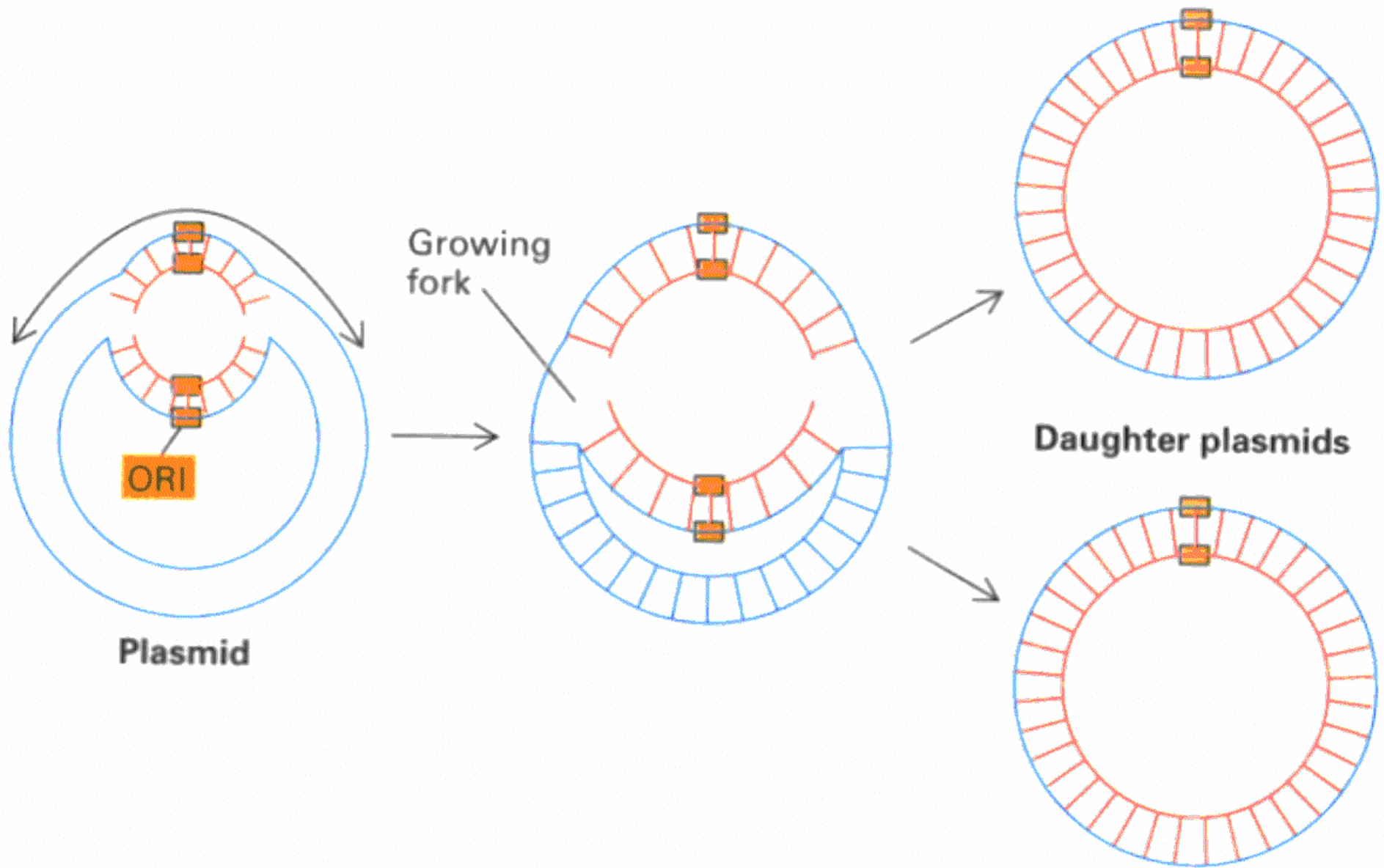
Multiple cloning site

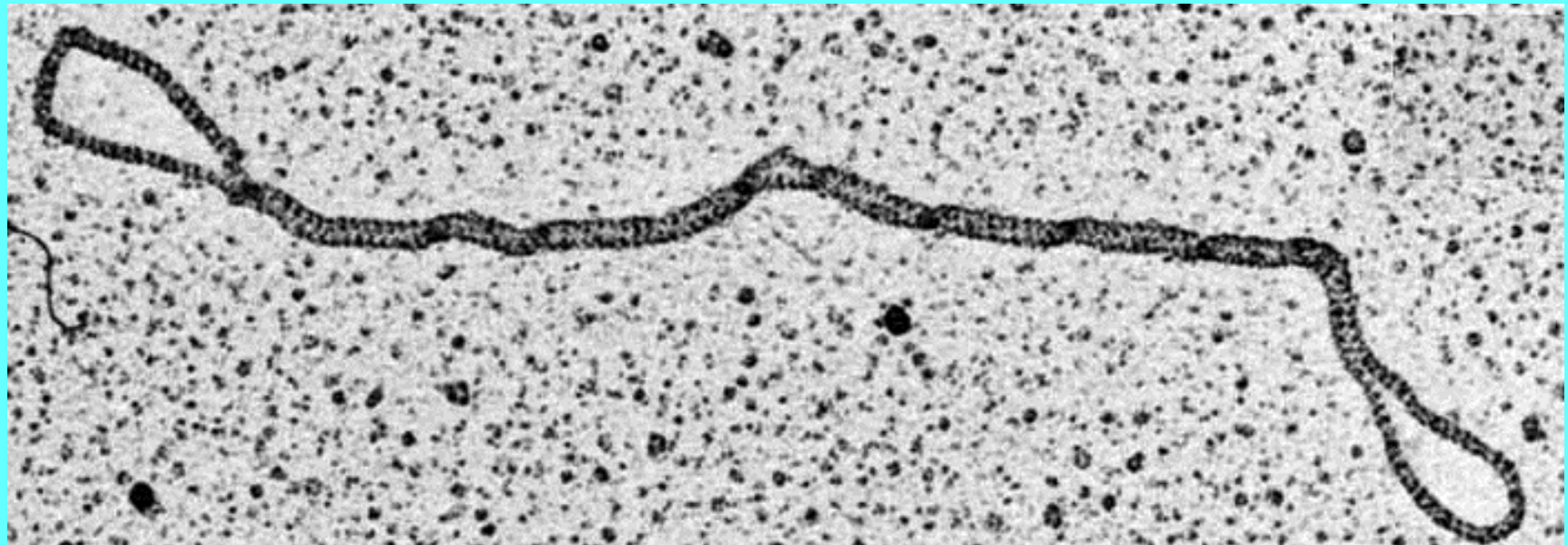
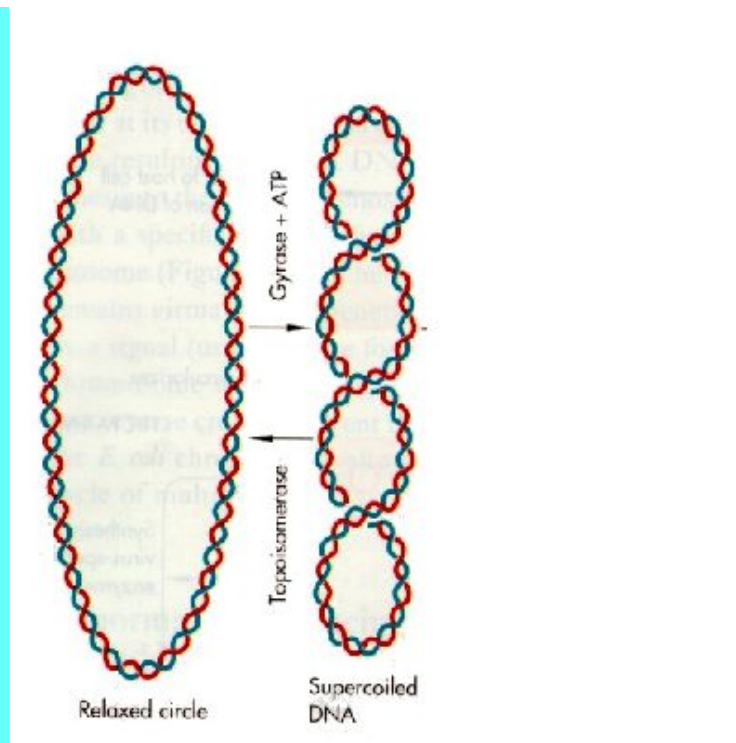
Antibiotikum rezisztencia gén, mint szelekciós marker

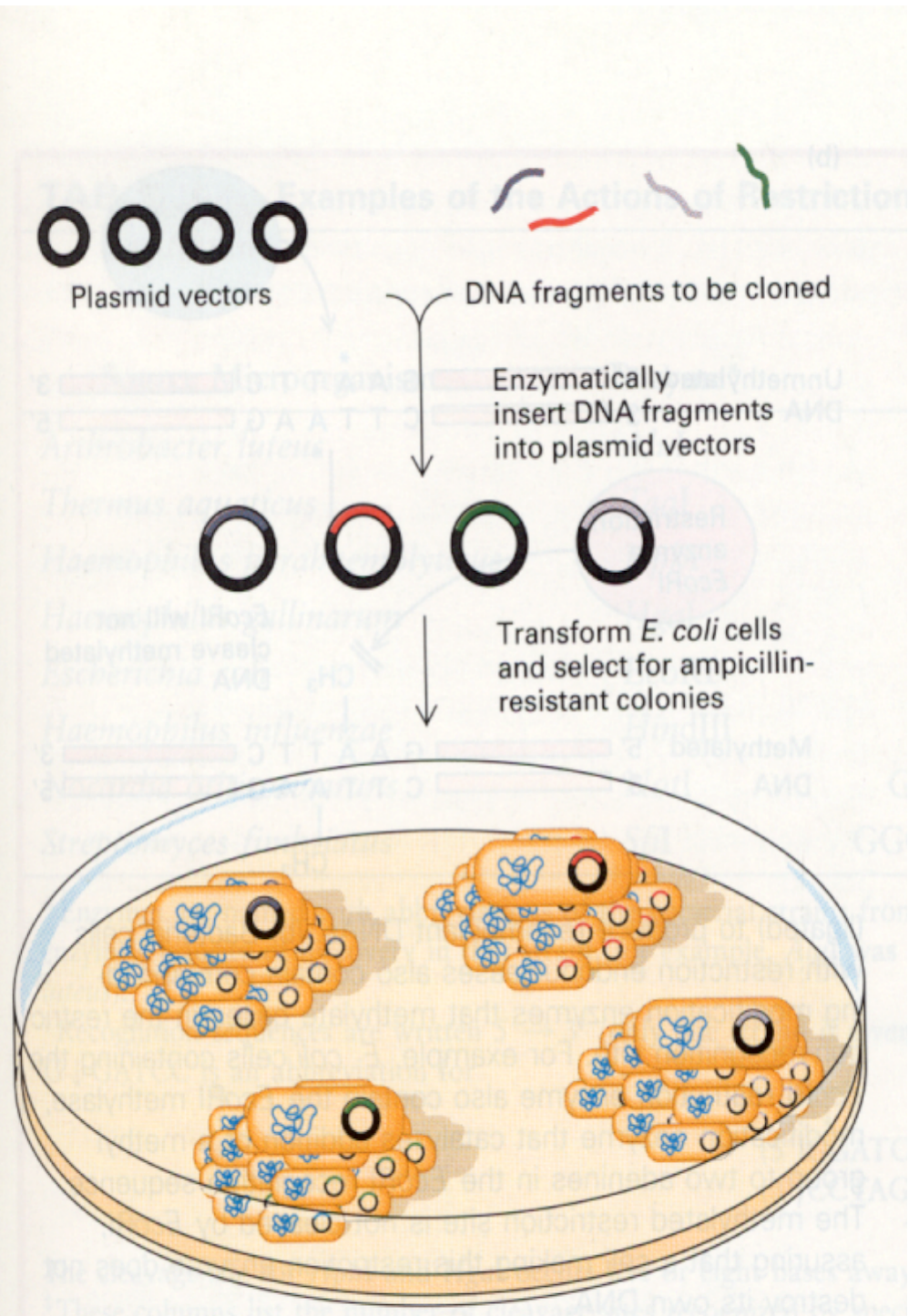
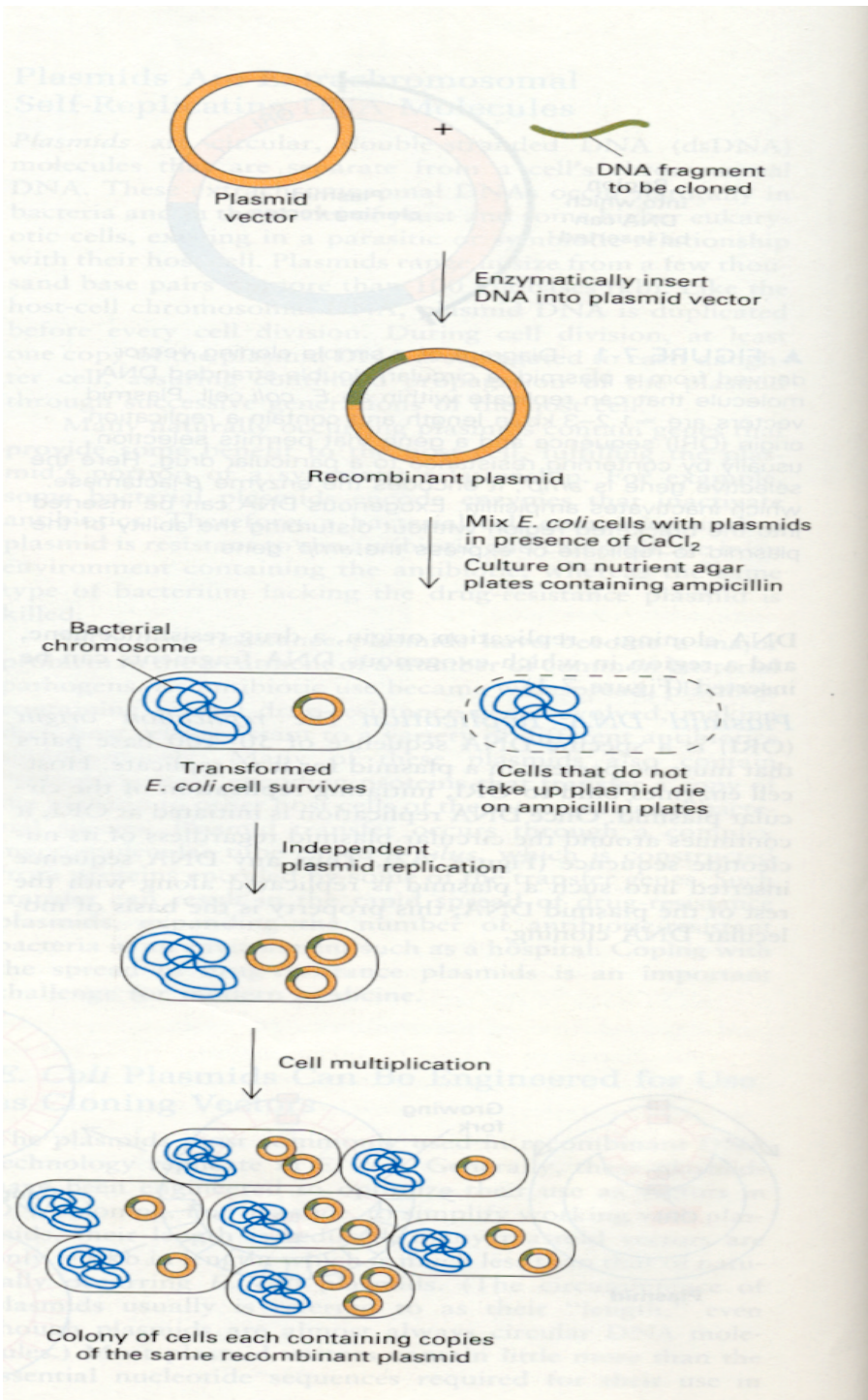
Ori (origin vagy a replikáció kezdő pontja)











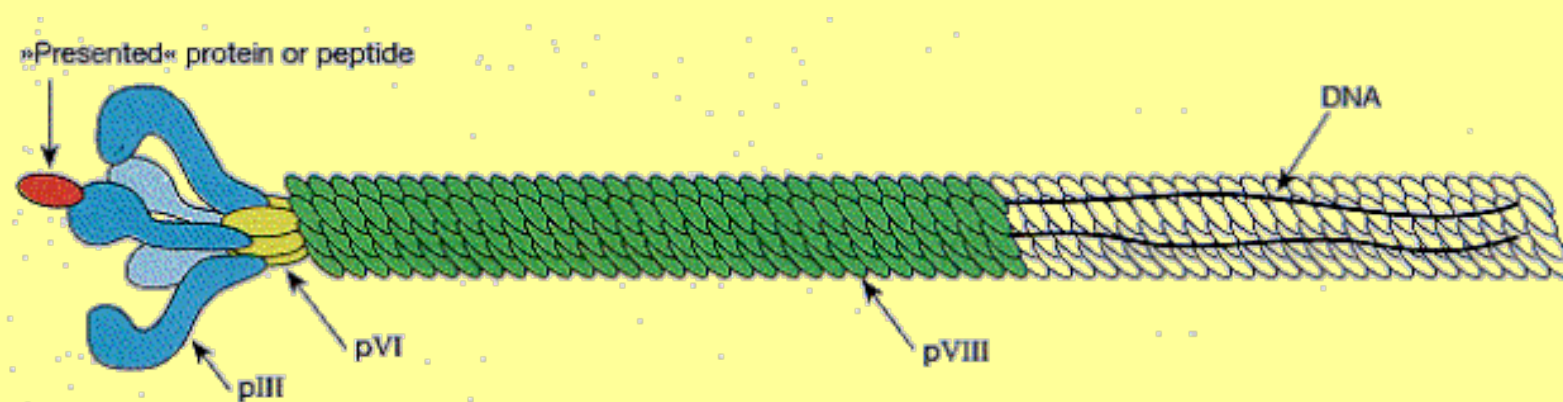
Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.

Smith GP

Science (1985) 228:1315-7

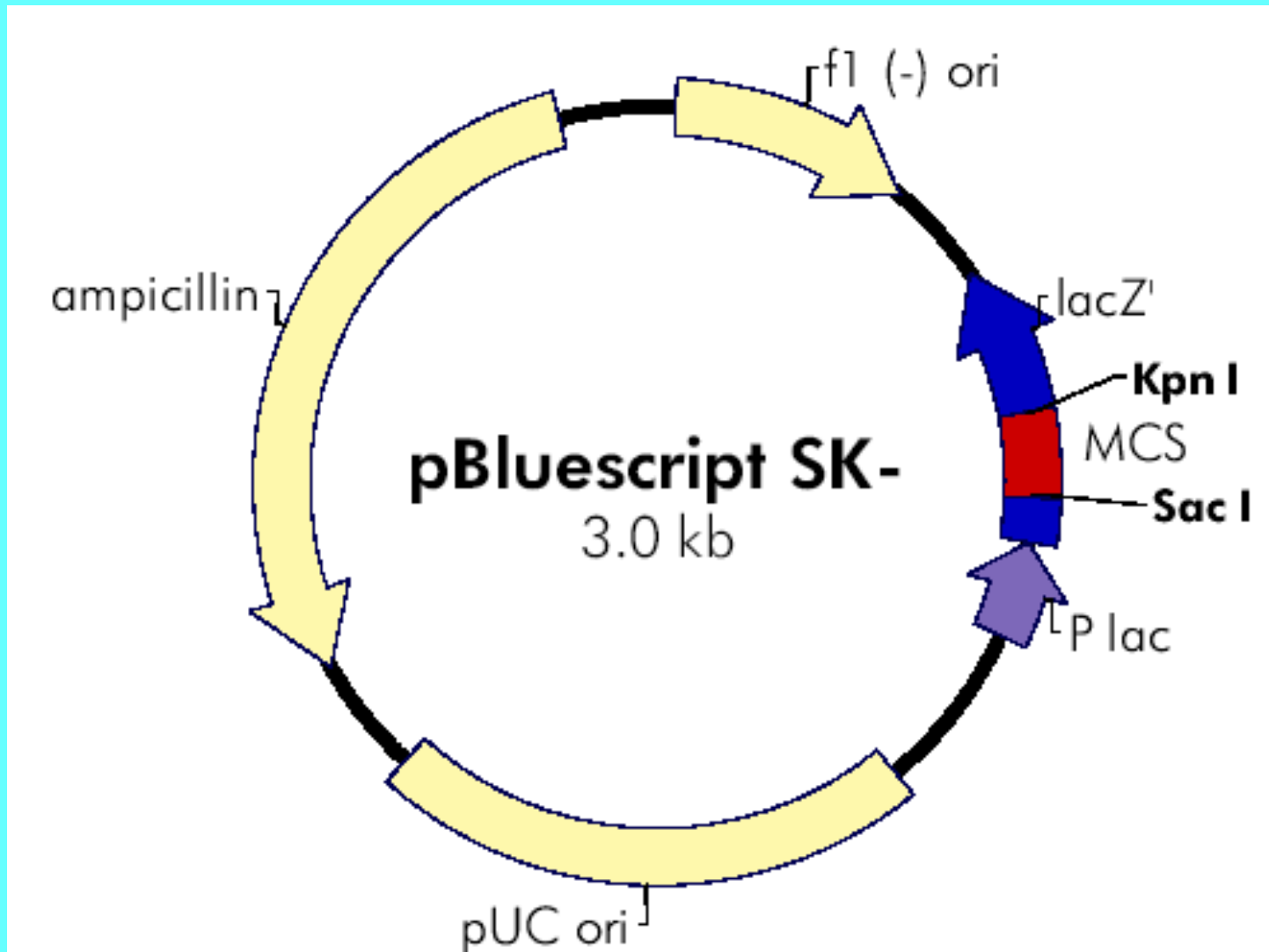


Foreign DNA fragments can be inserted into filamentous phage gene III to create a fusion protein with the foreign sequence in the middle. The fusion protein is incorporated into the virion, which retains infectivity and displays the foreign amino acids in immunologically accessible form. These "fusion phage" can be enriched more than 1000-fold over ordinary phage by affinity for antibody directed against the foreign sequence. Fusion phage may provide a simple way of cloning a gene when an antibody against the product of that gene is available.



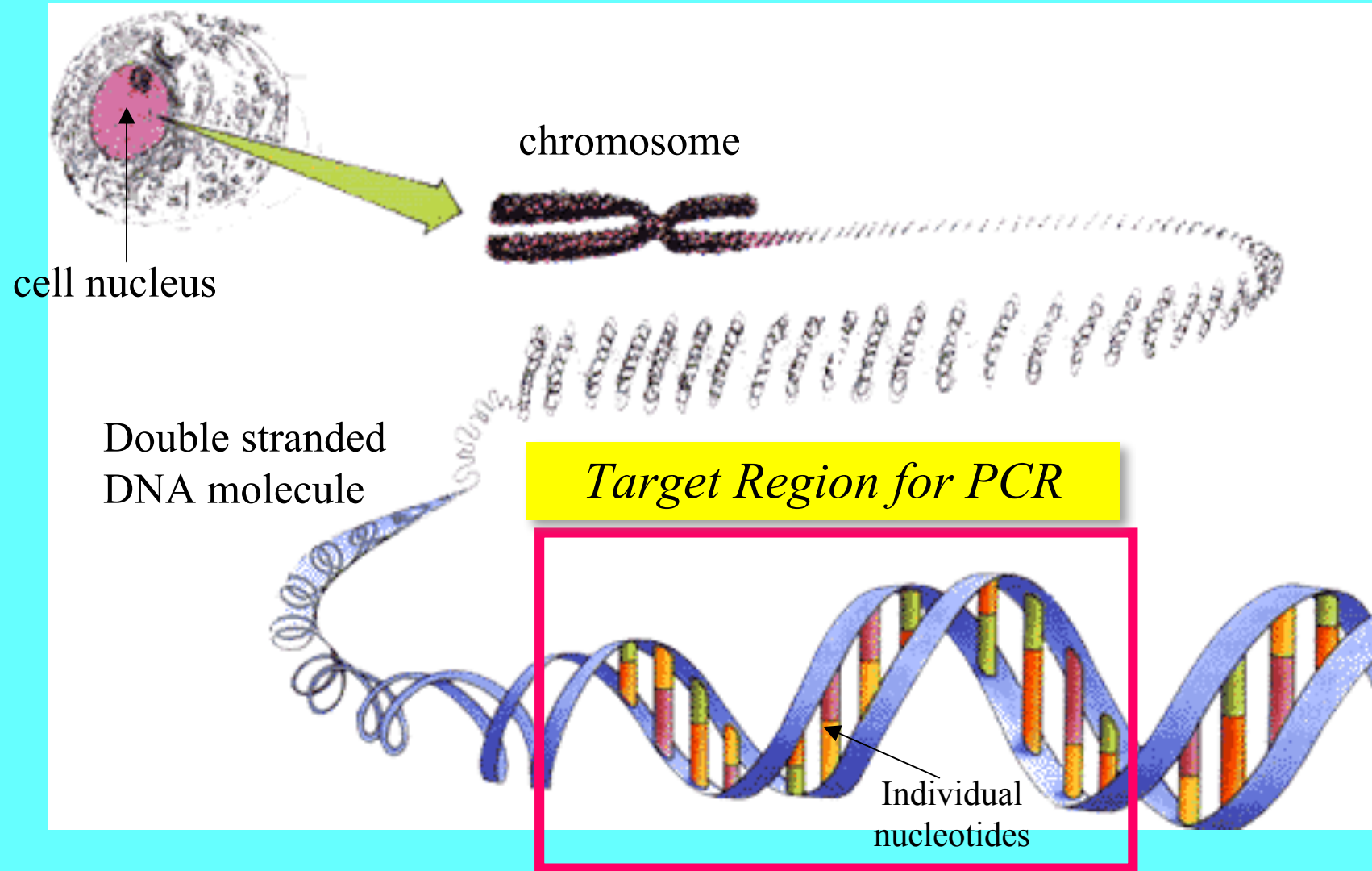
Phagemid

Phagemid vagy **phasmid** egy olyan klónozó vektor típus, ami a filamentous phage M13 és plazmid hibridje. Úgy nő, mint egy plazmid, de egy-szálú DNS-t tartalmaz vírusba csomagolva.



HOGYAN JUTUNK A KLÓNOZNI
KÍVÁNT GÉNEKHEZ?

DNA in the Cell



Növekedési hormon (GH)

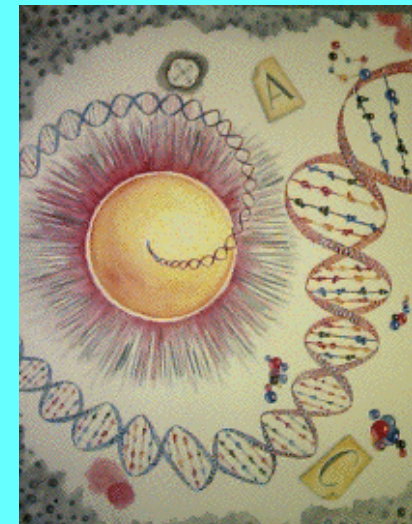
Inzulin

Hogyan azonosítjuk a szükséges szekvenciát?

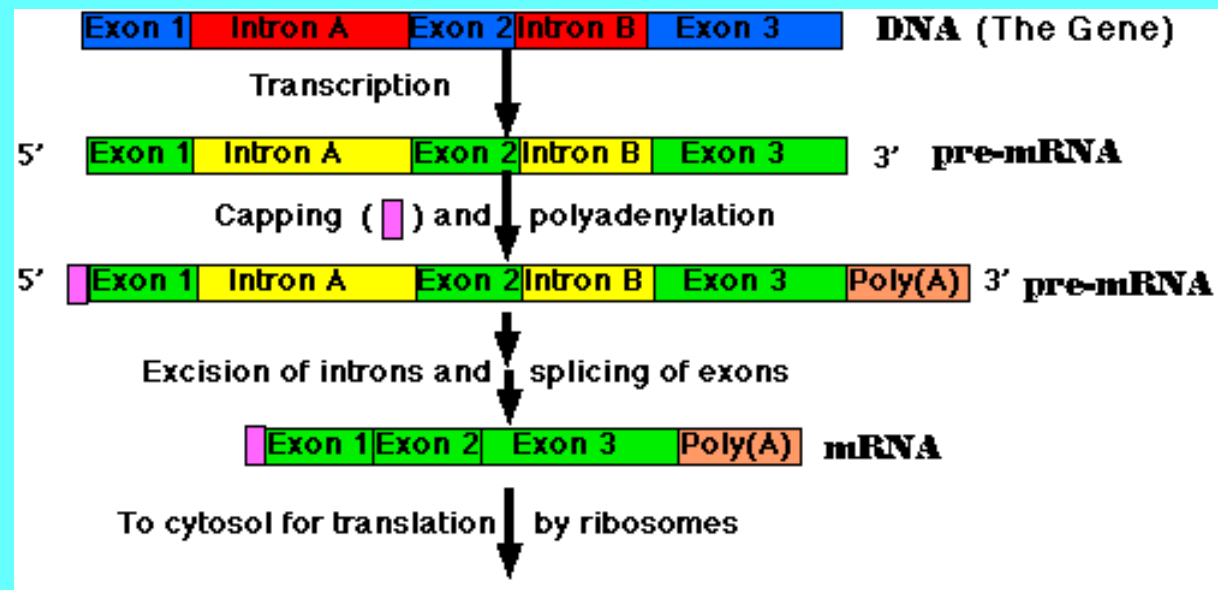


Gének szekvenálásával (humán genom projekt)

Gének kromoszómákra való térképezésével (humán genom projekt)



Melyik jobb módszer a rekombináns proteinek szempontjából: a teljes genomikus DNS klónozása vagy az mRNS klónozása?

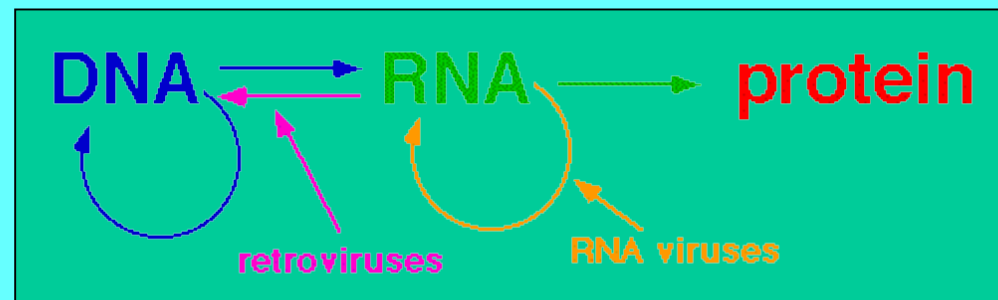
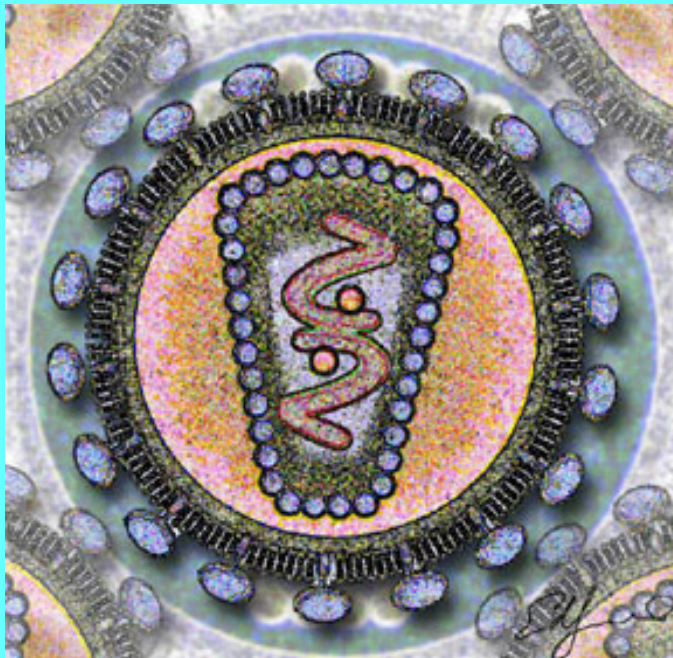


Mi a cDNS?

A cDNS „complementary” DNS-t jelent, egy olyan szintetikus DNS, amelyet a messenger RNS, vagy mRNS alapján készítünk, reverz transzkriptáz enzim segítségével.

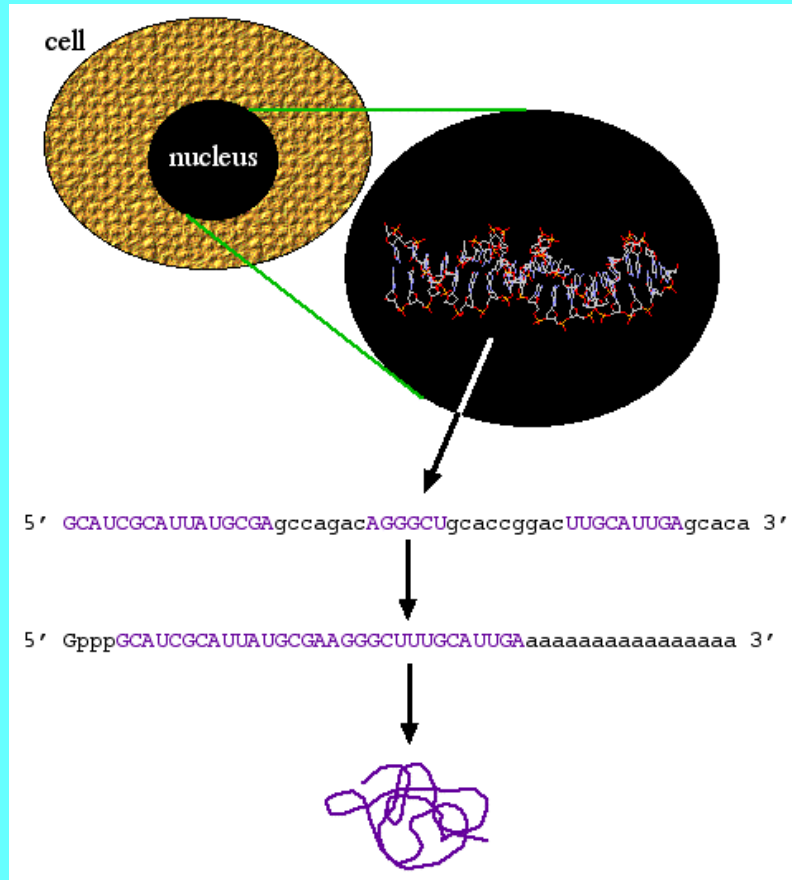
Honnan ismerjük a reverz transzkriptázt?

A reverz transzkriptáz avagy RNS irányított DNS polymeráz enzim segítségével egy szálú RNS-ből dupla szálú DNS-t készít.



mRNS alapján cDNS készítése

cDNS készítése



5' GpppGCAUCGCAUUAUGCGAAGGGCUUUGCAUUGAaaaaaaaaaaaaaaaaa 3'

(dGTP)_n
(dCTP)_n
(dATP)_n
(dTTP)_n



← primer 5'

oligo dT primer

← 5'
ttttttt

5' GpppGCAUCGCAUUAUGCGAAGGGCUUUGCAUUGAaaaaaaaaaaaaaaaaa 3'

specific primer

← 5'
acgtaact

5' GpppGCAUCGCAUUAUGCGAAGGGCUUUGCAUUGAaaaaaaaaaaaaaaaaa 3'

random primer

← 5'
nnnnnn

5' GpppGCAUCGCAUUAUGCGAAGGGCUUUGCAUUGAaaaaaaaaaaaaaaaaa 3'

Primerek készítése

Humán GH mRNS transzkript variáns 5

1: [NM_022562](#). Reports Homo sapiens grow.. [gi:20809252] [Links](#)

LOCUS NM_022562 376 bp mRNA linear PRI 20-AUG-2006

DEFINITION Homo sapiens growth hormone 1 (GH1), transcript variant 5, mRNA.

ACCESSION NM_022562

VERSION NM_022562.2 GI:20809252

KEYWORDS

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini;
 Catarrhini; Hominoidea; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 376)

AUTHORS Giordano, M., Godi, M., Giacomelli, F., Lessi, M., Mellone, S.,
 Paracchini, R., Petri, A., Bellone, J., Ravazzolo, R., Bona, G. and
 Momigliano-Richiardi, P.

TITLE A variation in a Pit-1 site in the growth hormone gene (GH1)
 promoter induces a differential transcriptional activity

JOURNAL Mol. Cell. Endocrinol. 249 (1-2), 51-57 (2006)

PUBMED [16517055](#)

REMARK GeneRIF: A polymorphism in a Pit-1 site in the growth.

Summary: The protein encoded by this gene is a member of the somatotropin/prolactin family of hormones which play an important role in growth control. The gene, along with four other related genes, is located at the growth hormone locus on chromosome 17 where they are interspersed in the same transcriptional orientation; an arrangement which is thought to have evolved by a series of gene duplications. The five genes share a remarkably high degree of sequence identity. Alternative splicing generates additional isoforms of each of the five growth hormones, leading to further diversity and potential for specialization. This particular family member is expressed in the pituitary but not in placental tissue as is the case for the other four genes in the growth hormone locus. Mutations in or deletions of the gene lead to growth hormone deficiency and short stature.

Transcript Variant: This variant (5) is missing exons 2, 3 and 4, leading to a frameshift that generates the shortest isoform (5). The majority of the sequence encoding the signal peptide is missing, including the signal cleavage site. The carboxy terminus of this isoform (5) is unique among all other GH1 isoforms.

COMPLETENESS: full length.

FEATURES [Location/Qualifiers](#)

SOURCE 1..376

```

/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="17"
/map="17q24.2"
1..376
/gene="GH1"
/note="synonyms: GH, GHN, GH-N, hGH-N"
/db_xref="GeneID:2688"
/db_xref="HGNC:4261"
/db_xref="HPRD:00751"
/db_xref="MIM:139250"
63..155
/gene="GH1"
/go_component="extracellular region"
/go_function="hormone activity [pmid 8943276]"
/go_process="signal transduction [pmid 8943276]"
/note="isoform 5 is encoded by transcript

variant 5;

pituitary growth hormone"
/codon_start=1
/product="growth hormone 1 isoform 5"
/protein_id="NP_072056.1"
/db_xref="GI:13027820"
/db_xref="GeneID:2688"
/db_xref="HGNC:4261"
/db_xref="HPRD:00751"
/db_xref="MIM:139250"
/translation="MATEAGRWQPPDWADLQADLQVVRHKLTR"
72^73
/gene="GH1"
/note="Region: location of alternate exons 2, 3

and 4"
STS 197..336
/gene="GH1"
/standard_name="RH77971"
/db_xref="UniSTS:14554"

polyA_signal 357..362
/gene="GH1"

polyA_site 376
/gene="GH1"

ORIGIN
1 aggatcccaa ggccaactc ccgaaccac tcagggtctc gttgacagct cacctagctg
61 caatggctac agaggctgga agatggcagc ccccgactg ggagatctt caagcagaac
121 tacagcaagt tcgacacaaa ctacacaac gatgagcac tactcaagaa ctacgggctg
181 ctctactgct tcaggaagga catggacaag gtcgagacat tctgycat cgtgcagtgc
241 cgctctgtgg agggcagctg tggctctag ctgccgggt ggcacccctc tgacccctc
301 ccagtgctc tctggcct ggaggtgc actccagctc ccaaccgct tctcctaata
361 aattaagtt gcatca
//

```

Restriktációs Endonucleases

Leggyakrabban használt enzimek: Alu I, Cla I, Eco47 III, Hae III, Kpn I, Nde I, Pst I, Sac II, Sfi I, Xho I, BamH I, Dpn I, EcoR I, Hind III, Msp I, Nhe I, Rsa I, Sal I, Sma I, Xma I, Bgl II, Dpn II, EcoR V, Hpa II, Nco I, Not I, Sac I, Sau3A I, Xba I

Komplett lista: Aar I, Ban II, BseG I, BspP I, Cfr I, EcoN I, Hsp92 II, Nla IV, Rsa I, Tai I, Aas I, Bbs I, BseJ I, BspT I, Cla I, EcoO109 II, Ppo I, NmuC I, Rsr I, ITaga I, Aat I, IIBbu I, BseL I, BsrB I, Cpo I, EcoR I, Kas I, Not I, Sac I, Itaq I, Acc65 I, BbvC I, BseM I, BsrD I, Csp45 I, EcoR I, VKpn2 I, Nru I, Sac I, Itas I, AccB7 I, Bbv I, BseM I, IBSrF I, Csp6 I, Ehe I, Kpn I, Nsb I, Sal I, Tat I, Acc I, BceA I, BseN I, BsrG I, Csp I, Esp3 I, KspA I, Nsi I, Sap I, Tau I, Acc I, IIBcg I, BseR I, Bsr I, Dde I, Fau I, Lwe I, Nsp I, Sat I, Tfi I, Aci I, Bci I, VIBse I, BsrS I, Dpn I, Fnu4H I, Mbi I, Oli I, Sau3A I, Tli I, Acl I, Bcl I, BseX I, BssH I, Dpn I, Fok I, Mbo I, Pac I, Sau96 I, Tru1 I, Ade I, Bcn I, BseY I, BssK I, Dra I, Fse I, Mbo I, Pae I, Sbf I, Tru9 I, Afe I, Bcu I, Bsg I, BssS I, Dra I, IIFspA I, Mfe I, PaeR7 I, Sca I, Tse I, Afl I, IIBfa I, Bsh1236 I, Bst1107 I, Drd I, Fsp I, Mls I, Pag I, Sch I, Tsp45 I, Afl I, IIBfi I, Bsh1285 I, Bst98 I, Eae I, Gsu I, Mlu I, Pau I, ScrF I, Tsp509 I, Age I, Bfm I, BshN I, BstAP I, Eag I, Hae I, IIMly I, Pci I, Sda I, TspR I, Ahd I, BfrB I, BshT I, BstB I, Eam1104 I, Hae I, IIMme I, Pdi I, Sdu I, Tth111 I, Ale I, BfuA I, BsiE I, BstE I, IIEam1105 I, Hga I, Mnl I, Pdm I, SexA I, TurboNae I, Alo I, BfuC I, BsiHKA I, BstF5 I, Ear I, Hha I, Mph1103 I, Pfl23 I, ISfaN I, TurboNar I, Alu I, Bfu I, BsiW I, BstN I, Eci I, Hin1 I, Msc I, PflF I, Sfc I, Van91 I, Alw21 I, Bgl I, Bsl I, BstO I, Ecl136 I, IHin4 I, Mse I, PflM I, Sfi I, Vsp I, Alw26 I, Bgl I, IIBsma I, BstU I, EclHK I, Hin6 I, Msl I, Pfo I, Sfo I, Xag I, Alw44 I, Blp I, BsmB I, BstX I, Eco105 I, Hinc I, IIMspA1 I, Ple I, Sgf I, Xap I, Alw I, Bme1390 I, BsmF I, BstY I, Eco130 I, Hind I, IIMsp I, Pme I, SgrA I, Xba I, AlwN I, Box I, Bsm I, BstZ I, Eco147 I, Hinf I, Mss I, Pml I, Sin I, Xce I, Apa I, Bpi I, BsoB I, Bsu15 I, Eco24 I, HinP1 I, Mun I, Ppi I, Sma I, Xcm I, ApaL I, Bpl I, Bsp119 I, Bsu36 I, Eco31 I, Hpa I, Mva1269 I, PpuM I, Smi I, Xho I, Apo I, Bpu10 I, Bsp120 I, BsuR I, Eco32 I, Hpa I, IIMva I, PshA I, Sml I, Xho I, IIAsc I, Bpu1102 I, Bsp1286 I, Btg I, Eco47 I, Hph I, Mwo I, Psi I, Smu I, Xma I, Ase I, BsaA I, Bsp1407 I, Bts I, Eco47 I, IHHpy188 I, Nae I, Psp1406 I, SnaB I, XmaJ I, AsiS I, BsaB I, Bsp143 I, Bve I, Eco52 I, Hpy188 I, IINar I, Psp5 I, ISpe I, Xmi I, Ava I, BsaH I, Bsp143 I, ICac8 I, Eco57 I, Hpy8 I, Nci I, PspG I, Sph I, Xmn I, Ava I, IIBsa I, Bsp68 I, Cai I, Eco57M I, Hpy99 I, Nco I, PspOM I, Ssp I, Avr I, IIBsaJ I, BspD I, Cfo I, Eco72 I, HpyCH4 I, IINde I, Pst I, Stu I, Bae I, BsaM I, BspE I, Cfr10 I, Eco81 I, HpyCH4 I, VNde I, IIPsu I, StyD4 I, Bal I, BsaW I, BspH I, Cfr13 I, Eco88 I, HpyCH4 I, VNGoM I, VPsy I, Sty I, BamH I, BsaX I, BspL I, Cfr42 I, Eco91 I, HpyF10 I, VNhe I, Pvu I, Swa I, Ban I, BseD I, BspM I, Cfr9 I, EcoICR I, Hsp92 I, Nla I, IIPvu I, ITaa I

AviII . . . TGCGCA . . .

. . . ACGCGT . . .

Acc16I, *FspI*, *NsbI* **37°C**

AvrII . . . CCTAGG . . .

. . . GGATCC . . .

AspA2I, *BlnI*, *XmaII* **37°C**

AxyI . . . CCTNAGG . . .

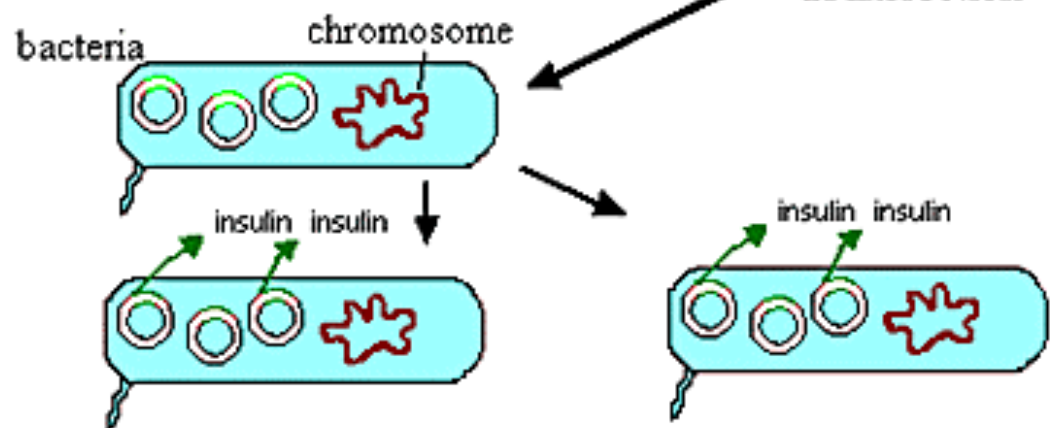
. . . GGANTCC . . .

Bse21I, *Bsu36I*, *Eco81I* **37°C**

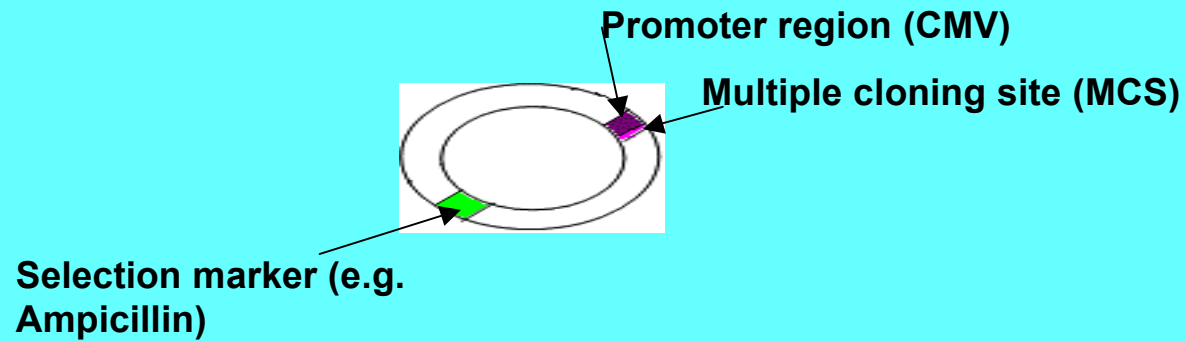
Transfer of the Insulin gene



Cloning the Insulin Gene



Transfer and cloning of the Insulin gene

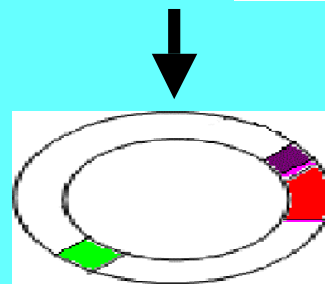


Gene in question is amplified using sequence specific primers with additional sticky ends and high fidelity proof reading enzymes

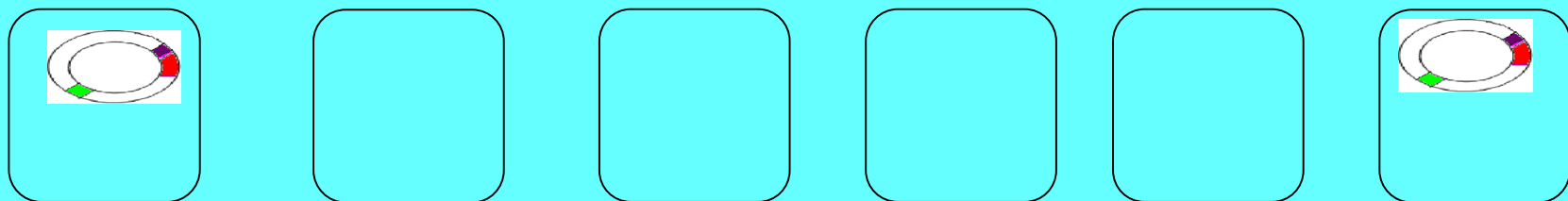
Plasmid linearised by a restriction enzyme



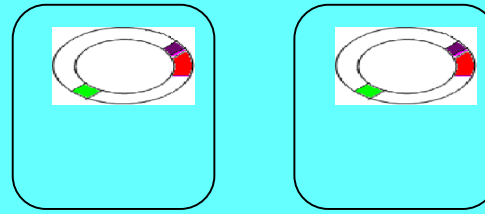
Ligation



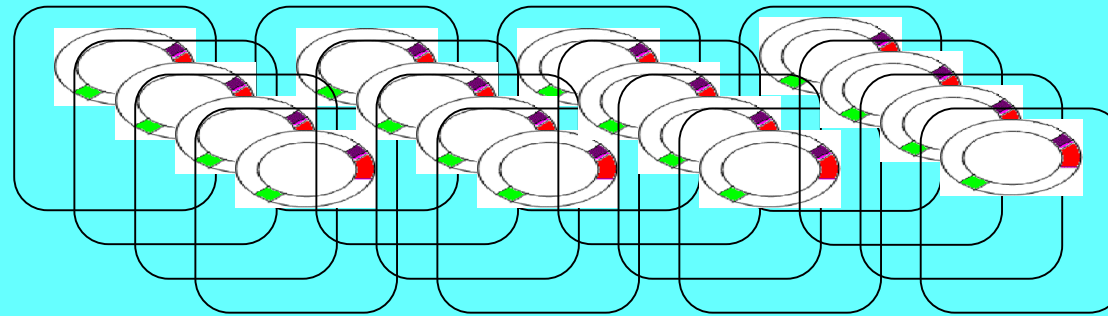
Transformation



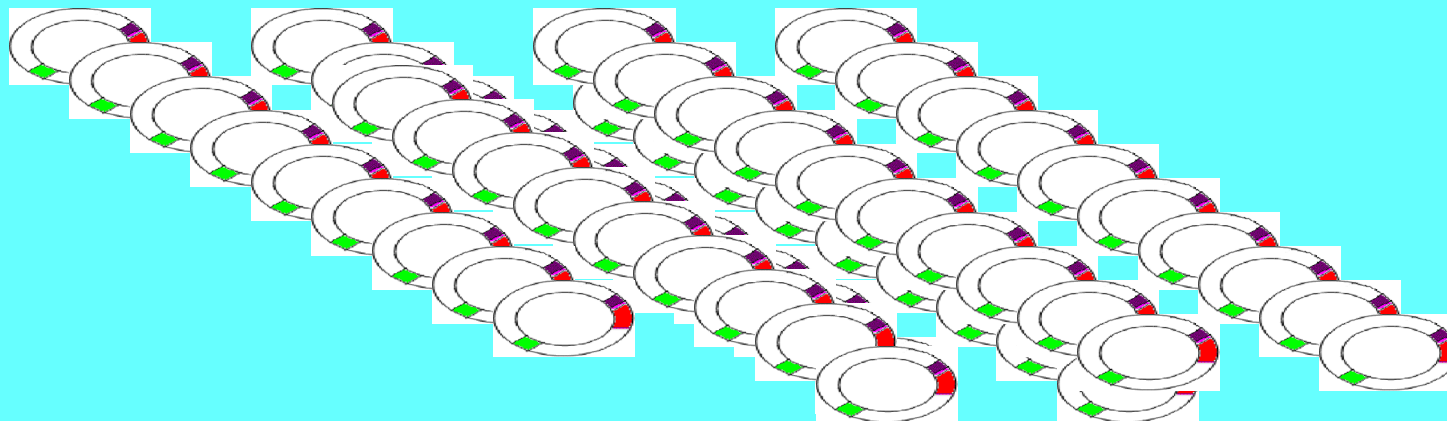
Bacterial selection



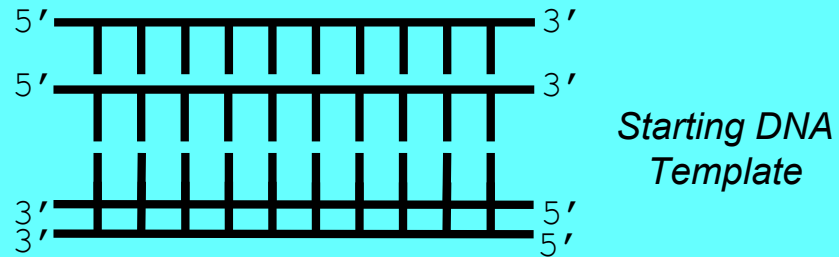
Bacterial proliferation



Plasmid purification

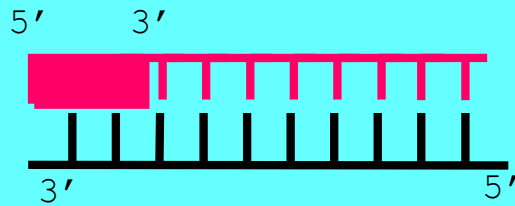


DNA Amplification with the Polymerase Chain Reaction (PCR)

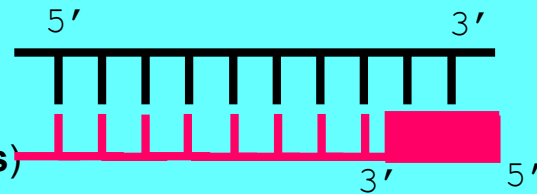


Separate strands
(denature)

Forward primer

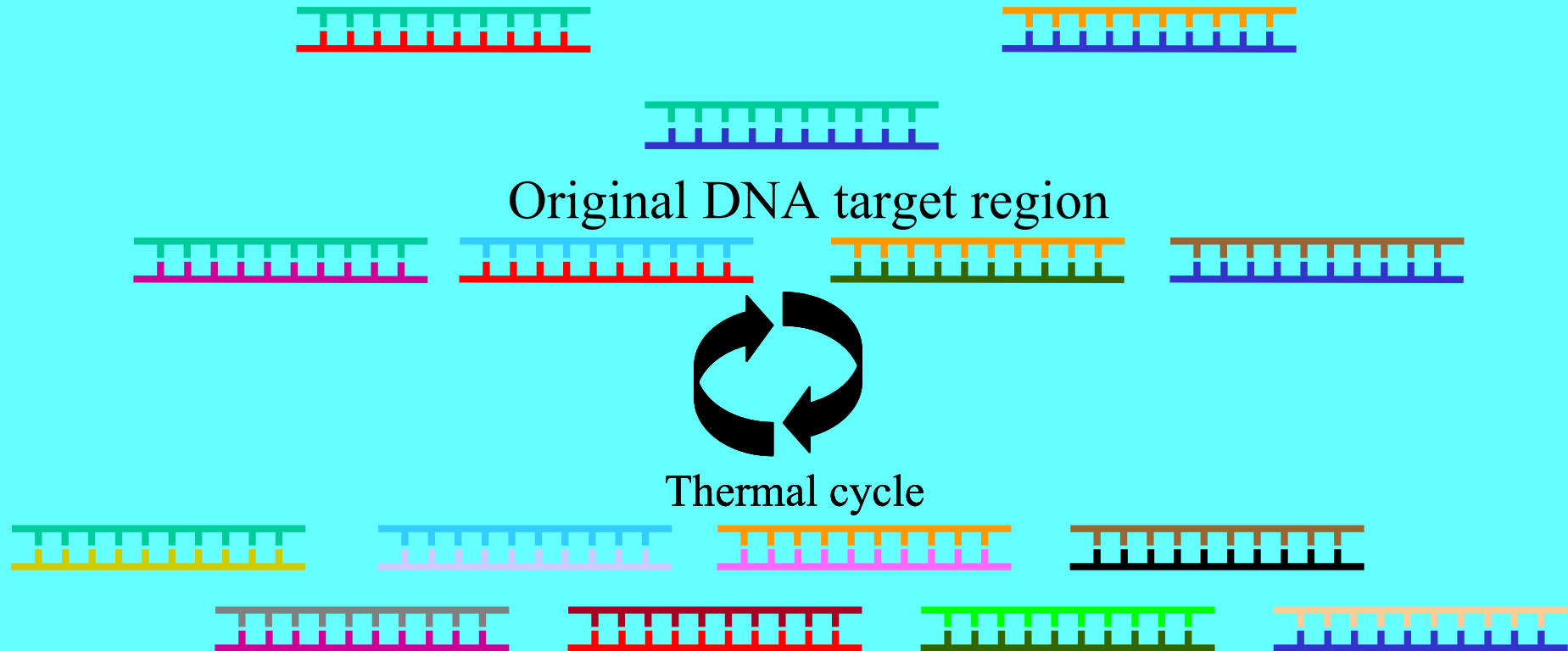


Make copies
Add primers
(extend primers)
(anneal)



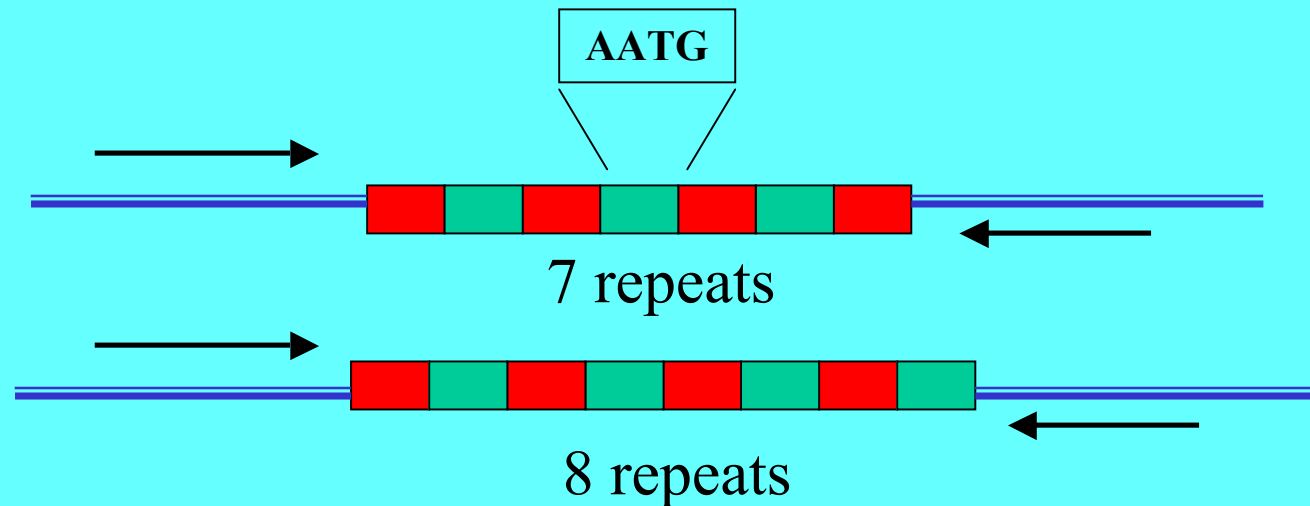
Reverse primer

PCR Copies DNA Exponentially through Multiple Thermal Cycles



In 32 cycles at 100% efficiency, 1.07 billion copies of targeted DNA region are created

Short Tandem Repeats (STRs)

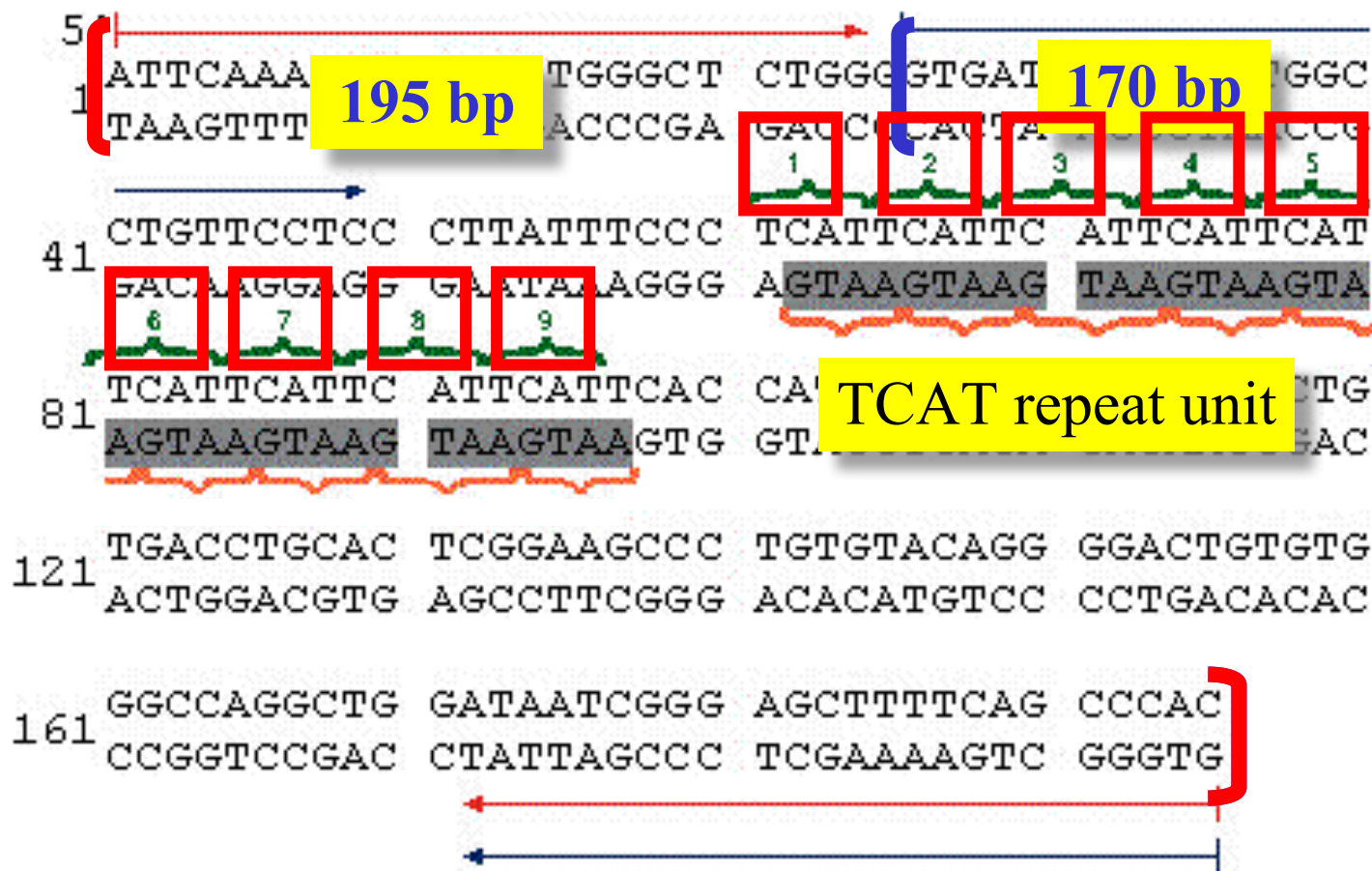


the repeat region is variable between samples while the flanking regions where PCR primers bind are constant

Homozygote = both alleles are the same length

Heterozygote = alleles differ and can be resolved from one another

HUMTH01 Sequence from GenBank (Accession D00269)



Different primer sets produce different PCR product sizes for the same STR allele



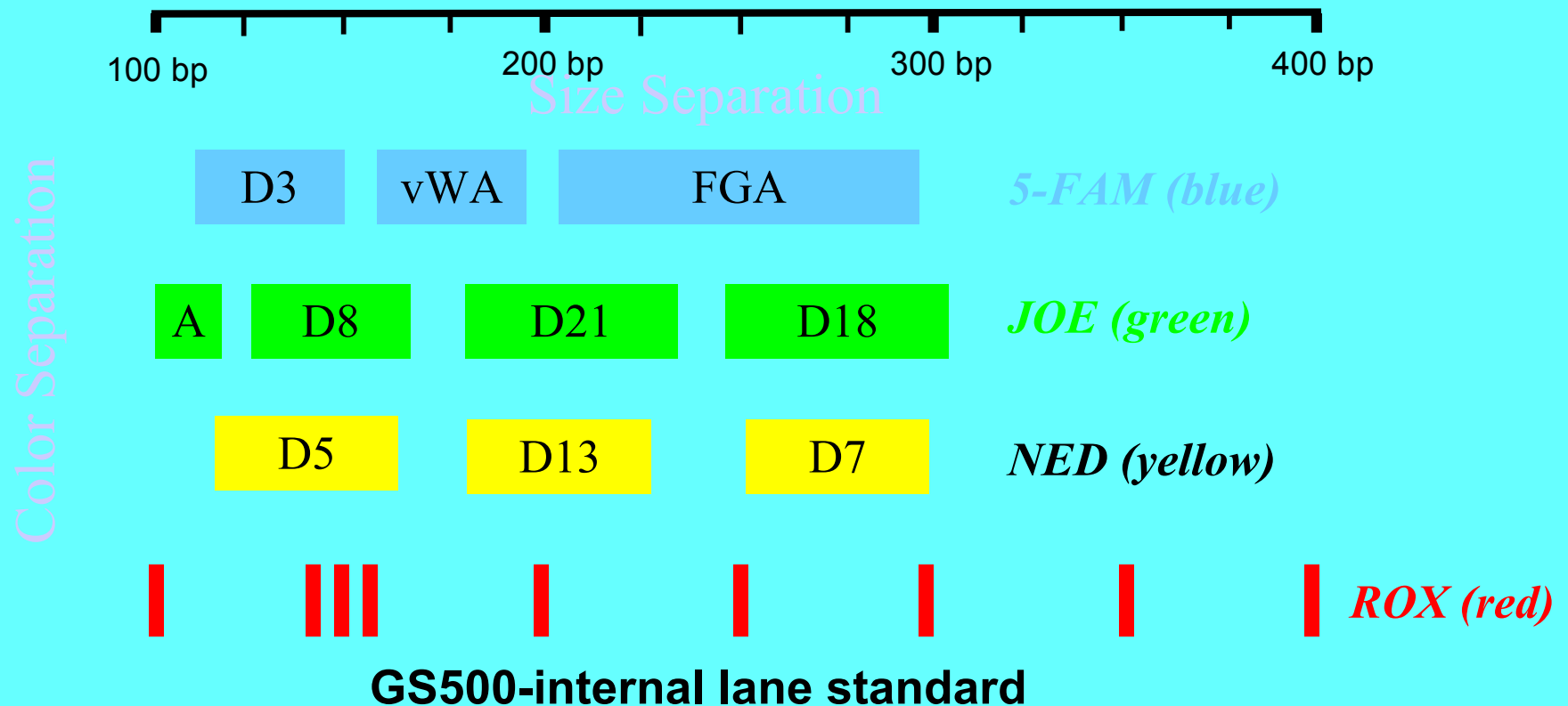
Multiplex PCR

- Over 10 Markers Can Be Copied at Once
- Sensitivities to levels less than 1 ng of DNA
- Ability to Handle Mixtures and Degraded Samples
- Different Fluorescent Dyes Used to Distinguish STR Alleles with Overlapping Size Ranges

An Example Forensic STR Multiplex Kit

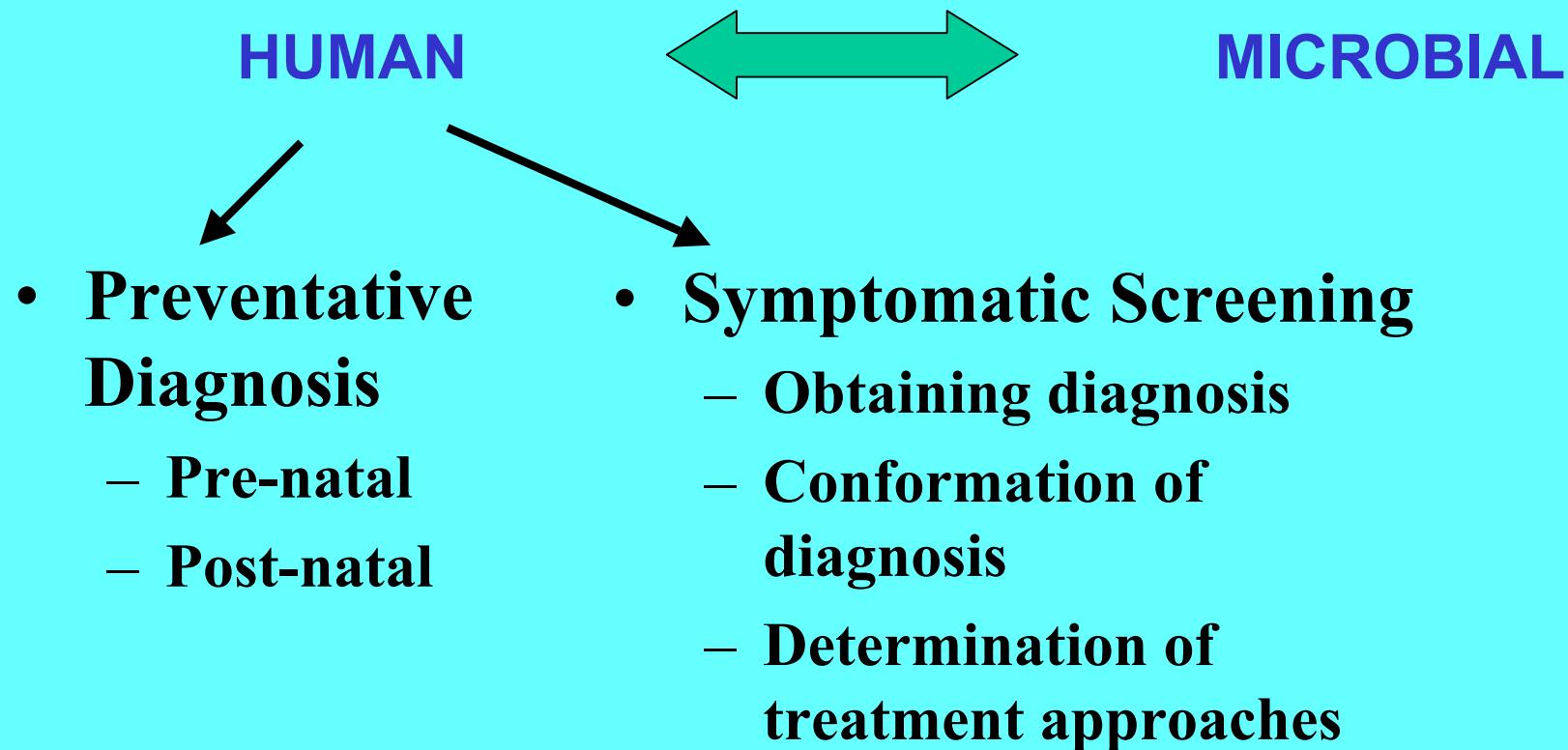
AmpFISTR® Profiler Plus™

Kit available from PE Biosystems (Foster City, CA)



9 STRs amplified along with sex-typing marker amelogenin in a single PCR reaction

Genetikai információ használata Orvosi diagnosztikában



Orvosi hasznosítás

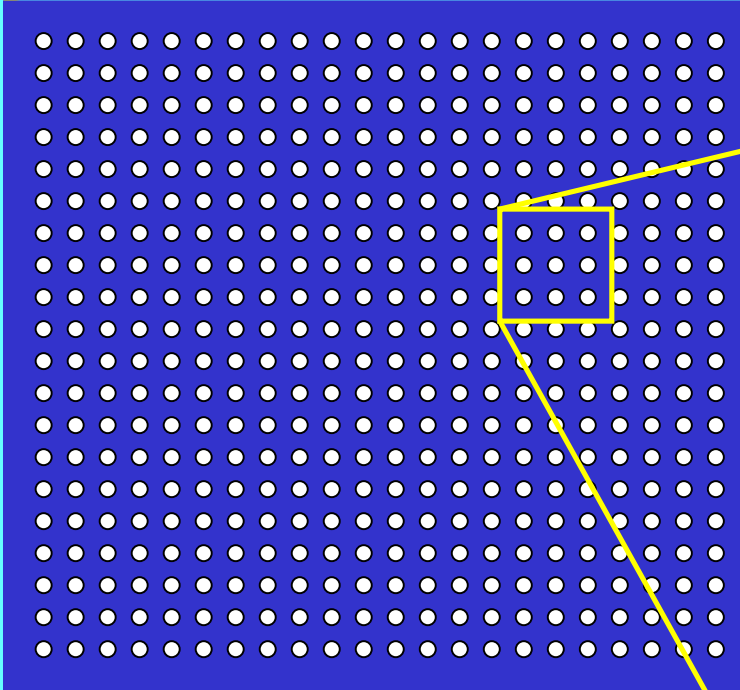
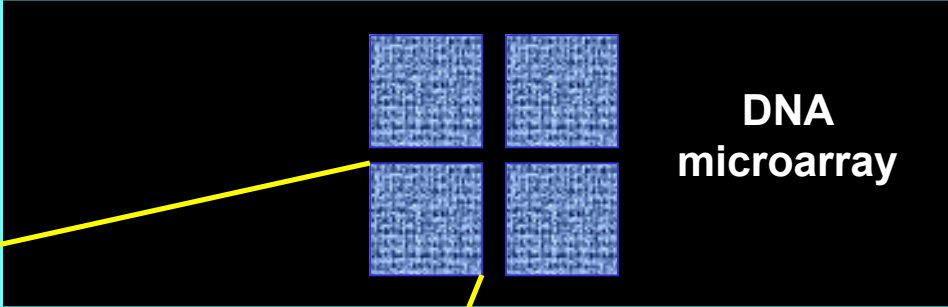
- A kezelés hatékonyságának monitorozása
- Drog és génterápiás célpontok keresése

Microarrays

What is a microarray?

- A microarray is a compact device that contains a large number of well-defined immobilized capture molecules (e.g. synthetic oligos, PCR products, proteins, antibodies) assembled in an addressable format.
- You can expose an unknown (test) substance on it and then examine where the molecule was captured.
- You can then derive information on **identity and amount** of captured molecule.

Microscope slide



	16	17	18
7	Actin DNA	CyclinD DNA	DHFR DNA
8	RB DNA	E2F1 DNA	tubulin DNA
9	control DNA	Myc DNA	Src1 DNA

Microarray Technology



Manufacture or Purchase Microarray



Hybridize



Detect



Data Analysis