# 10. Vektorok

A vektorok olyan genetikai elemek, melyek képesek idegen DNS-t az élő sejtbe juttatni. A leggyakoribb vektorok plazmidok vagy bakteriofágok (rövidítve: fágok), de használnak a kettő kombinációjával létrehozott kozmidokat, vagy óriási rekombináns DNS-t tárolni képes mesterséges kromoszómákat is. A vektorokat a molekuláris biológiában betöltött funkciójuk szerint két csoportba oszthatjuk: **klónozó** vagy **expressziós** vektorok. Néha ez a határ nem is olyan éles, vannak olyan vektorok, amelyek mindkét funkciónak megfelelnek. A klónozó vektorok arra valók, hogy általában sok-sok lehetséges DNS-szekvencia közül valamelyiket felvegyék és azt egy különálló élőlénybe (legtöbbször baktériumba) juttassák. Mivel majdnem minden baktérium más és más genetikai állománnyal fog rendelkezni, a belőlük kinövő telepeket tudjuk majd genetikailag azonosítani (például a már ismertetett kolóniahibridizáció technikájával). Az expressziós vektorokba egy jól meghatározott, felsokszorosított DNS-szekvenciát ültetünk, ilyenkor minden vektorba elméletileg ugyanaz a szekvencia kerül. Ezek a vektorok a beültetett DNS-szakasz előtt tartalmaznak valamilyen promóterszekvenciát, ezáltal az adott DNS-ről RNS és az esetek többségében fehérje termelődik, ha a vektort a megfelelő organizmusba juttatjuk. A fehérjeexpressziós rendszerekről a következő fejezetben lesz szó.

**10.1. Plazmidok**

A plazmidok cirkuláris, extrakromoszomális DNS-darabok, természetes körülmények között is megtalálhatóak baktériumokban. Az **F plazmidok** az ún. szexplazmidok, segítségükkel azonos fajba tartozó baktériumok között horizontális géntranszfer lehetséges. Az **R plazmidok** a reszisztenciaplazmidok, valamilyen anitbiotikum elleni rezisztenciát biztosító gén található rajtuk. A **Col plazmidok** kolicinogén faktorokat (antibiotikumokat) termelnek más baktériumok ellen. A plazmidok önálló replikonok; saját replikációs origóval rendelkeznek, replikácójuk többnyire független a kromoszóma replikációjától, vagy a sejtosztódástól. A replikáció a replikációs origó jellegéből fakadóan történhet kétféleképpen: Téta-replikációval (a 2 szál egy helyen szétnyílik, és mindkét oldalon megszintetizálódik a komplementer szál), vagy ún. „rolling circle” replikációval (az origónál az egyik lánc elhasad, a keletkező nick-nél keződik el ugyanennek a szálnak a szintézise). Ez utóbbi replikációtípus nagyon elterjedt egyes vírusoknál, hosszú, egyszálú konkatamereket képezhetnek ezen a módon.

**10.1.1. pBR322**

A molekuláris biológiában mesterséges úton, különböző DNS-darabok „összevarrásával” létrejött plazmidokat használnak. Az egyik legrégebben használt vektor a pBR322. A replikációs origón kívül tartalmaz **két** (ampicillin és tetraciklin) **antibiotikum-rezisztencia gént** is, melyek lehetővé teszik a transzformált baktériumok kiszelektálását (10-1. ábra). A pBR322 már **pozitív és negatív szelekcióra** is alkalmas: csak azok a baktériumok maradnak életben az antibiotikumos táptalajon, amelyekbe bejutott a plazmid. Ha idegen DNS-t ültetünk a második antibiotikum-rezisztencia gén közepébe, és erre az antibiotikumra szelektálunk, csak azok a klónok fognak életben maradni, amelyek plazmidjai nem tartalmazák az inzertet. A pozitív, a plazmidban idegen DNS-t tartalmazó, ezért a második fajta antibiotikumos táptalajon elpusztuló baktériumok visszakeresése replika (másolat) plate-ek segítségével történik. (Az új, második antibiotikumot tartalmazó táptalajt az első plate-ről nitrocellulóz membránra itatott telepekkel fertőztük.) Ezekből a pozitív klónokból lehet kiválasztani néhányat, további vizsgálat céljára. A plazmidokba jellemzően **1–20 kilobázispáros** idegen szekvenciát lehet beilleszteni. Hosszabb szekvenciák már nem stabilak (könnyen rekombinálódhatnak), és a nagyméretű plazmidok transzformációs hatékonysága is rohamosan csökken, ezért az ennél hosszabb szekvenciákat nem plazmidba szokták klónozni.

10-1. ábra

http://en.wikipedia.org/wiki/File:PBR322.svg

2013.09.23.

**10.1.2.Antibiotikumok, rezisztencia**

Mik azok az antibiotikumok? Tulajdonképpen mérgek, melyek valamilyen (többnyire enzim-gátlás) mechanizmus révén toxikusak azokra a sejtekre, amelyek szenzitívek az adott antibiotikumra. A rezisztenciát a plazmidról átíródó fehérje okozza, mely valamilyen módon (többnyire a toxikus anyag lebontásával vagy szerkezeti módosításával) kivédi a toxicitást. A molekuláris biológiában használt antibiotikumok jó része (de nem mindegyik!) a **fehérjeszintézis** valamelyik lépését **gátolja**. Mivel prokariótákban és eukariótákban a fehérjeszintézisben részt vevő enzimek struktúrája eltérő (gondoljunk csak a riboszómák különbözőségére), az általunk használt antibiotikumok specifikusan vagy csak a prokarióta-, vagy prokarióta és eukarióta sejtekre egyaránt toxikusak. **Prokarióta-**antibiotikumok például az ampicillin, tetraciklin, streptomicin, kanamicin, kloramfenikol, míg **pro- és eukariotákra** egyaránt toxikus a zeocin, a blasticidin, a hygromicin B, a G418, a puromicin, a neomicin.

**10.2. Bakteriofágok**

A bakteriofágok a baktériumokon élősködő **vírusok**. Genetikai állományukat a baktériumba juttatva átprogramozzák annak a működését. A vírusok ún. korai génjeinek működése a virális genom megsokszorozódására, késői génjeik működése pedig a vírus fehérjeburkának elkészítésére hivatott. Bakteriofágokkal mint vektorokkal képesek vagyunk az általunk kívánt DNS-t a baktériumsejtbe juttatni.

**10.2.1. λ-fág**

A lambda-fág egy 48,5 kilobázispár hosszú, **nyílt kettős szálú** DNS-t tartalmaz. A DNS középső, körülbelül 20 kbp. részét **ki lehet cserélni** idegen DNS-re anélkül, hogy a fág szaporodási rátája, replikációs képességei sérülnének. A lambda-fág jellemzően **klónozó vektor**: klónozás során DNS-ének a két szélét (**fágkarok**) hozzáligáljuk a DNS-könyvtárból származó, körülbelül 15-20 kilobázispár (kbp.) fragmentekhez, majd a kész konstrukciókat csomagoljuk a vírus kapszidfehérjéibe. A teljes bakteriofág genomnak a beültetés után **38 és 53 kbp. közé** kell esnie, hogy a kapszidba történő csomagolás megtörténjen (10-2. ábra). A fertőző rekombináns vírusok képesek DNS-üket bejuttatni, majd megsokszorozni az E.coli sejtben. A burokfehérjék megtermeltetése után a vírusok a baktérium lízisét előidézve ki tudnak szabadulni a sejtből, hogy aztán újabb gazdasejteket fertőzzenek. (A fertőzés-szaporodás ciklusukkal ún. tarfoltokat (**plakkokat) képezhetnek** baktériumpázsitot tartalmazó agarlemezen.)

10-2. ábra

http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch19/19\_09-lambda-vector.jpg

2013.09.23.

**10.2.2. M13 fág**

Az M13 egy hosszú bakteriofág, melynek **cirkuláris egyszálú** (single-stranded, ss.), 6407 nukleotidból álló DNS-e van (10-3. ábra). A fertőzés után a DNS-hez megszintetizálódik a második lánca, ezt az állapotot hívják replikatív formának. A fág a már ismertetett „rolling circle” módon replikálódik, a fertőzés korai szakaszában a keletkező egyes szál mindig újra kiegészül kettős szállá. A fertőzés késői szakaszában a második DNS-szál szintézise gátlódik, a keletkező egyszálú DNS-ek kerülnek majd be az új fágokba. Ugyancsak késői szakaszban termelődnek meg a kapszid fehérjéi, amik becsomagolják a ss.fág DNS-eket. Az M13 fágfertőzés lassítja ugyan a baktérium szaporodását, de többnyire **nem lizálja** a sejtet: szépen elhagyja anélkül, hogy az elpusztulna. A bakteriofág DNS-e dupla szálú formában manipulálható, idegen DNS-szakaszok ültethetők bele. Az M13 fág DNS-ét nem csak **klónozó vektorként**, de **expressziós vektorként is** használhatjuk; az *in vitro* fehérjekapcsolatokat vizsgáló „**fág-display**” technikához is M13 bakteriofágot használunk (lásd: 15. fejezet).

10-3. ábra

http://www.wwnorton.com/college/biology/microbiology2/img/eTopics/sfmb2e\_eTopic\_1101\_2.jpg

2013.09.25.

**10.3. Kék-fehér szelekció**

A +/- antibiotikum-szelekciónál van egyszerűbb út is, hogy kimutassuk az idegen DNS sikeres integrálódását a plazmidba. Ilyenkor a DNS-darabot nem az antibiotikum-rezisztencia, hanem a **β-galaktozidáz enzim** egyik alegységének génjének közepébe integráljuk. Ha a gént elrontjuk, nem termelődik funkcióképes β-galaktozidáz enzim. Ezt úgy tudjuk detektálni, hogy míg az ép enzim a tejcukor helyett adott **mesterséges szubsztrátot** (**X-gal**) elhasítja és **kék termék** keletkezik, addig az inzertet tartalmazó génről nem keletkezik működőképes enzim, az nem hasítja az X-galt, ezért fehér színű baktériumtelep nő ki az agarlemezen (10-4. ábra).

10-4. ábra

http://www.sigmaaldrich.com/prodimages/b/b3928.jpg

2013.09.25.

A lacZ gén kettős szabályozás alatt áll. **Alacsony glükóz szint** esetén a baktériumokban **cAMP** keletkezik, amely aktiválja a **CAP** (catabolite activator protein) transzkripcós faktort. Aktiváció hatására a CAP **homodimert** képez, beköt a lacZ gén promóteréhez, **szétnyitja a DNS két szálát**, minek következtében az RNS-polimeráz oda tud kapcsolódni, hogy elkezdhesse a gén átírását. Hogy ez megvalósulhasson, a baktériumokat **glükóz-mentes agarlemezen** kell tenyészteni. De ez a gén működésének csak az egyik, még nem elégséges feltétele. A lacZ promóter szekvenciája mögött található egy **operátor-régió**, melyhez hozzákapcsolódik egy **inhibitor fehérje (LacI)**, amely gátolja az RNS-polimeráz kapcsolódását. (A lacI génnek gyenge konstitutív promótere van, ezért a fehérje mennyisége mindig alacsony, de állandó szinten termelődik). A gént úgy tudjuk meghajtani, ha ezt az inhibitort is leszedjük az operátor-régióról. Ehhez egy másik tejcukor-analógot, az enzim által emészthetetlen kötést tartalmazó izopropil-β-D-galaktopiranozidot (**IPTG**) adjuk az agarlemezhez, mely a baktériumsejtbe bejutva az inhibitor fehérje térszerkezetét megváltoztatja, így az disszociál a DNS-ről (10-5. ábra).

10-5. ábra

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Blue\_white\_assay\_Ecoli.jpg

2013.09.25.

**10.3.1. pUC18/19**

A talán legrégebbi, igen elterjedt, kék-fehér szelekciót lehetővé tévő vektorok a pUC18 és pUC19 vektorok. Ezek legnagyobbrészt az **M13 fág** DNS-ét tartalmazó rekombináns vektorok. Tartalmaznak téta-megkettőződéshez szükséges replikációs origót, ampicillin-rezisztencia gént (a róla termelődő β-laktamáz bontja az ampicillin és a karbanecillin antibiotikumok 4-atomos gyűrűjét), és a β-galaktozidáz enzim egyik **(α) peptidjének** a génjét (10-6. ábra).

10-6. ábra

http://openclipart.org/detail/130471/plasmid-vector-by-gsagri04

2013.09.25.

A β-galaktozidáz enzim valójában egy négy alegységből álló **homotetramer**. Alegységei 1024 aminosavból állnak. A **11.-41. amiosavakra deléciós**, ezért működésképtelen β-galaktozidázzal (ezt hívják **ω-peptidnek**) rendelkező mutáns törzsek képesek visszanyerni laktózbontó képességüket, ha egy rövid, mindössze az **első 59 aminosavat** (ez az ún. **α-peptid**) kódoló DNS-szakaszt juttatnak be és fejeztetnek ki a sejtben. A két peptid összetapad, ugyan peptidkötéssel kovalensen nem kötődik, együtt mégis **működőképes enzimet** alkot. A kék-fehér szelekcióhoz használt E. coli törzsek csak a **lacZω** gént tartalmazzák (10-5. ábra). A baktériumba juttatandó pUC18/19-en található a **LacZ α-peptid** génje. Ebben a lacZα génben található egy ún. **polilinker** régió (**multicloning site, MCS**), amely igen sok II. típusú **restrikciós endonukleáz hasítóhelyét** tartalmazza, egy viszonylag rövid szakaszon belül. Ez azért jó, mert ezekre a helyekre lehet majd beilleszteni az idegen DNS-t.

**10.4. Vektorok *in vitro* transzkripcióhoz**

*In vitro* transzkripció során a reakció mikrocentrifuga-csőben zajlik. Többnyire a polilinker régió mindkét oldalán található egy-egy **promóter régió** (**T3**, **T7** vagy **SP6**), amely a megfelelő, adott **bakteriofágra** jellemző RNS-polimeráz felismerőhelye. A polilinker helyre illesztett DNS-szekvencia így mindkét irányban átírható; az „antisense” RNS akár kontrollként szolgálhat majd a „sense” RNS-sel végzett kísérletekben. *In vitro* módon átírt RNS-ekkel vizsgálható például azok térszerkezete, kapcsolódása fehérjékhez, enzimatikus aktivitása (ribozimek) vagy mikroinjektálást követően hatása az élő sejtekre (akár, mint virális szekvenciákat tartalmazó RNS-ek). Az így átírt mRNS-eket használhatjuk ***in vitro* transzlációhoz** is. Természetesen **jelölt RNS**-eket is készíthetünk, amelyeket például blot-hibridizációnál, *in situ* hibridizációnál, nuclease-protection assay-nél, használhatunk. Az *in vitro* transzkripcióhoz használatos vektorok jellemző képviselői a pGEM vektorcsalád tagjai.

A pGEM vektorok tartalmazzák a lacZα gént, melynek belsejében található a MCS. Az MCS két oldalán pedig a kétféle, RNS-polimeráz specifikus promóter régió (például SP6 és T7) helyezkedik el. A transzgén sikeres beültetése után kék-fehér szelekcióval lehet kiválasztani a pozitív klónokat. Vannak olyan pGEM vektorok is, amelyeket nyitottan, ragadós végekkel (**túlnyúló 3’ T-vel**) árusítanak. Ez a PCR-termék egyszerűsített klónozását teszi lehetővé (lásd később). A ragadós végek melletti restrikciós endonukleáz hasítóhelyek ebben az esetben nem elsősorban a klónozást, hanem az *in vitro* transzkripció során szükséges nyílt konstrukciók létrehozását segítik **(„run-off” RNS-szintézis**) (10-7. ábra).

10-7. ábra

http://www.promega.com

2013.09.25.

**10.5. Fágemid vektorok**

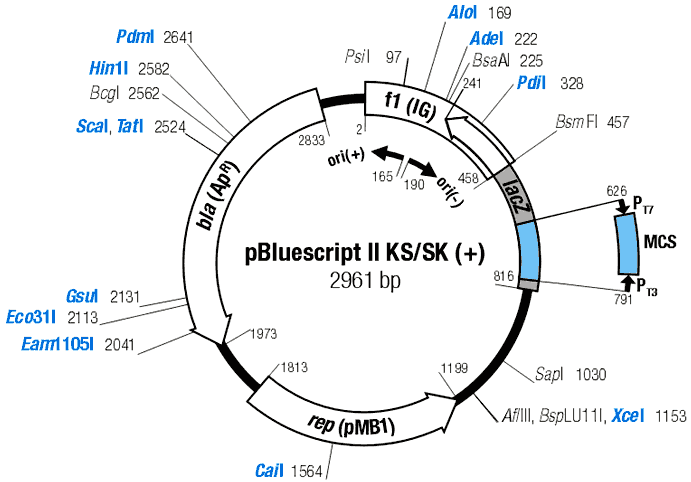
A fágemid vektorok olyan plazmidok, melyek képesek kétszálú (téta-replikáció), és egyszálú („rolling circle”) replikációra is. Ez úgy lehetséges, hogy **mindké**t replikációfajtához szükséges **replikációs origót** tartalmazzák. A fágemid vektorok mind **transzformációval**, mind **transzdukcióval** (virális fertőzéssel) be tudnak jutni a baktériumba. Ha egy fágemid vektort tartalmazó baktériumot ún. **helper-fággal** fertőzünk, akkor a fágemid „rolling circle” replikációval megsokszorozódik, és a helper-fág DNS-e által termelt virális kapszidokban kijut a sejtből. (A fágemid vektor nem kódolja a fágkapszid fehérjéit, ezért van szükség a vad típusú helper-fágra a vektor becsomagolására és sejtből való kijuttatására.) A távozó fágok között helper-fágok is vannak, de kisebb mennyiségben, mint a fágemidet tartalmazó fágok (rosszabbul pakolódik a DNS-ük, mint a fágemid vektor). Egyszálú fágemid vektorban lévő DNS-szakaszokat használtak korábban **szekvenálási** reakció **templátjaként**. Ma az egyszálú formát elsősorban **irányított mutagenezis** létrehozására használják (lásd: 13. fejezet).

A fágemidet tartalmazó fágok képesek újabb baktériumokat nagy hatásfokkal fertőzni, így a fág segítségével létrejött géntranszfer (transzdukció) hatásfoka sokkal jobb, mint bármelyik ismert transzformációs eljárás.

**10.5.1. pBluescript**

A pBluescript vektorok igen összetettek. A kétféle replikációs origón kívül tartalmaznak ampicillin-rezisztencia gént, **lacZα** gént multicloning site-tal (kék-fehér szelekcióhoz), T3 és T7 promóter régiókat (*in vitro* transzkripcióhoz) (10-8. ábra). A pBluescript vektorok használhatók kónozásra (ampicillin és kék-fehér szelekció), a konstrukciók helper-fág segítségével egyszálúsíthatóak (fág-forma), használhatóak szekvenálásra, irányított mutagenezisre, *in vitro* transzkripcióra.

Tulajdonképpen mind az előbb példaként ismertetett pGEM, mind pedig a pBluescript olyan fágemid vektorok, amelyek mind *in vitro* transzkripcióra, mind klónozásra (majd a pozitív klónok szelektálására), mind szekvenálásra, mind irányított mutagenezisre alkalmasak. Csak azért szenteltünk két külön alfejezetet a transzkripciós vektorok és a fágemid vektorok ismertetésére, mert nem mindegyik fágemid vektor használható *in vitro* transzkripcióra, és nem mindegyik, *in vitro* transzkripcióra használható vektor viselkedik fágemidként.



10-8. ábra

http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/keogh/pbluescript%2B.gif

2013.09.25.

**10.6. Kozmidok**

A kozmidok (cosmid) olyan, λ-fág alapú vektorok, melyekből hiányoznak a λ-fág génjei, de megtalálható bennük a DNS becsomagolásához elengedhetetlen **cos-régió**. A kozmidokban van téta-replikációhoz szükséges replikációs origó, tehát a baktériumban kétszálú plazmidként tudnak replikálódni (10-9. ábra). Gyakran találunk bennük f1 replikációs origót rolling circle replikációhoz, és/vagy SV40 (SimianVacuolating virus 40) replikációs origót is, ami az emlőssejtekben történő replikációt teszi lehetővé. **40-45 kbp.** hosszú szekvenciát lehet egy kozmidba illeszteni. A konstrukciók elkészítése után a DNS-t kapszidfehérjékkel keverjük, amely így fertőzőképes fággá áll össze. Ezzel a fággal fertőzve a sejteket, tudjuk a konstrukciót E. coliba juttatni, ahol az cirkularizálódik, és replikációra képessé válik.

10-9. ábra

A fozmidok (**fosmid**) olyan kozmidok, melyek alapjai baktériumok F-plazmidja. Olyan szakaszokat tartalmaznak, melyek **alacsony kópiaszámot** biztosítanak számukra a sejten belül (repE), és olyan géneket (parA, parB, parC), melyek szaporodás során a fozmidok **egyenlő eloszlását** biztosítják az utódsejtek között (10-10. ábra). Az alacsony kópiaszámnak köszönhetően a beléjük klónozott DNS-szakaszok sokkal stabilabbak, kevésbé rekombinálódnak. Mintegy **40 kbp**-os idegen DNS-szakaszt képesek a fozmidok tárolni.

10-10. ábra

http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/epicentre/fos5fig2.gif

2013.09.25.

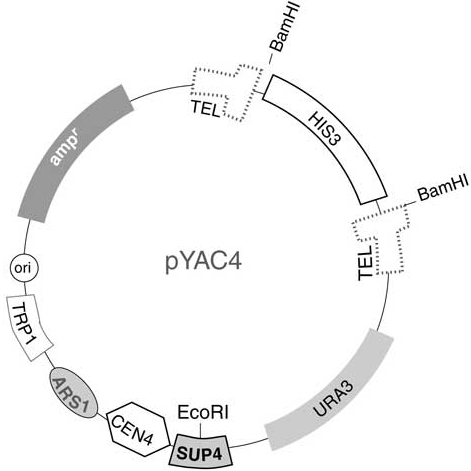
**10.7. Mesterséges kromoszómák**

A mesterséges kromoszómák olyan vektorok, melyek igen **nagy méretű DNS-darabot** (több száz, néha ezer kbp.) képesek tárolni, ezáltal remekül használhatóak genomi könyvtárak készítéséhez. Olyan régiók és gének találhatóak rajtuk, melyek lehetővé teszik a sejtosztódás során az utódsejtekbe való vándorlásukat.

**10.7.1. YAC**

A YAC (yeast artificial chromosome) egy mesterséges kromoszóma, mely tartalmaz **centromér**, **telomér,** és az élesztőben történő **replikációhoz szükséges** szakaszokat. Megtalálható bennük az **antibiotikum-rezisztencia** gén (E. coliban történő szaporításhoz), valamint aminosav-, ill. nukleotid-szintézishez szükséges enzimek, mint szelekciós markerek (10-11. ábra). A YAC kapacitása igen nagy: **100–3000 kbp.** hosszúságú idegen DNS-t is hordozni képes. Az összeligált rekombináns YAC-ot juttatjuk be az élesztősejtbe.

A YAC előnye, hogy igen nagy DNS-darabokat, akár **óriásgéneket is** képes hordozni 1-1 klón. Az élesztőben a génekről esetlegesen expresszálódott fehérjék **poszttranszlációsan** tovább érhetnek, kialakítva ezáltal a megfelelő **natív szerkezetet**. A YAC hátránya viszont, hogy a YAC-klónok genetikailag nem stabilak, gyakran találnak közöttük ún. kimérákat, melyek vagy a klónozás során, vagy rekombináció következtében jöttek létre. Ezekben a kimérákban az egyes genetikai elemek nem a megfelelő sorrendben helyezkednek el, ami meggátolhatja a helyes szekvencia felderítését.



10-11. ábra

http://www.biochem.arizona.edu/miesfeld/teaching/Bioc471-2/pages/Exam1YAC4.jpg

2013.09.25.

**10.7.2. BAC**

A BAC (bacterial artificial chromosome) vektorok mesterséges bakteriális kromoszómák. **F-plazmid** alapúak, tartalmaznak olyan géneket/szakaszokat, amelyek az alacsony kópiaszámot, és az osztódás során az utódsejtek közötti egyenlő eloszlást biztosítják (parA, parB, parC, repE). Kapacitásuk **120–300 kbp**, genomi könyvtárak készítésére kiválóan alkalmasak. Tartalmaznak **antibiotikum-rezisztencia** gént, többnyire valamilyen (például kék-fehér) szelekcióra alkalmas gént (**lacZα**), és néha T7, T3 vagy SP6 fágok promóter-régióit a MCS két oldalán (*in vitro* transzkripcióhoz) (10-12. ábra). A fozmidoktól annyiban különböznek, hogy a BAC-ok nem mindig képesek bakteriofágokba csomagolódni: egyrészt a sokkal nagyobb inzert miatt, másrészt a cos régió esetleges hiánya miatt. **Stabilitásuk** viszont hasonló a fozmidéhoz, **sokkal nagyobb, mint a YAC-é** (nagyon alacsony a rekombinációs rátájuk).

10-12. ábra

http://www.seropia.com/bt/transgenic%20org.html

2013.09.26.

Nagyobb stabilitásuk miatt választották őket a **humán genomi könyvtár** hordozóiként a Human Genom Project folyamán, melynek célja a teljes emberi genom megszekvenálása volt. Igen gyakran használják őket teljes **vírusgenomok** klónozására és vizsgálatára. Ilyenkor olyan BAC-ot használnak, ami alkalmas emlőssejtekben való szaporodásra. A sejtekben a BAC-ból „kiszabadul” a virális inzert, aminek (esetleges genetikai manipuláció során megváltozott) működését vizsgálni lehet. A technika előnye, hogy míg emlőssejtekben vírusok nagy mennyiségben való tenyésztése sokkal nehézkesebb, baktériumban könnyen lehet nagy mennyiségű, esetleg módosított vírusgenomot felszaporítani, amit a vizsgálat során visszajuttatnak az emlőssejtbe.

Gyakran használnak BAC-okat hosszú DNS-szakaszok eukarióta (élesztő, emlős stb.) integrálására. Ilyenkor a vektorok a genom megfelelő szakaszával homológ rekombinációs szakaszokat tartalmaznak.

A PAC a BAC-hoz nagyon hasonló felépítésű és működésű mesterséges kromoszóma. A P1 bakteriofág genetikai állományának módosításával készült rekombináns vektor. A P1 fág tartalmaz olyan elemeket (cre/loxP), amelyek a fág genomjának integrálódását segíti elő. Ezek a szakaszok segíthetik a legalább részben P1 fág eredetű vektorok integrálódását a gazdasejt genomjába.

**10.7.3. HAC**

Az **emberi** mesterséges kromoszómák (human artificial chromosome, HAC) viszonylag új keletű vektorok. Emlős- (emberi) sejtekben ideális vektorok: tartalmazzák mindazokat a régiókat, amelyek emlőssejtekben történő megmaradásukhoz és megfelelő időben történő szaporodásukhoz szükséges (10-13. ábra). Kópiaszámuk állandó, igen alacsony (1-2), a többi kromoszómával egy időben replikálódnak. Nincs limit, hogy mekkora DNS-szakaszt ültetünk beléjük, elvileg **bármekkora**, hosszú intronokkal ellátott **gének befogadására alkalmasak**. A virális vektorokkal szemben nagy előnyük, hogy rekombinációs hajlandóságuk sokkal alacsonyabb, ezért genetikailag sokkal stabilabbak.

A HAC-ok felhasználási területe elsősorban a génterápiás kezeléseknél lehet elsődleges. Ezeknél a kezeléseknél fontos követelmény, hogy az expresszáltatni kívánt fehérjék mennyisége szigorúan kontrollált legyen, és a gyógyulást követően a gének végleg kikapcsolhatóak legyenek. Ennek egyik megoldása, hogy kondicionális HAC-okat gyártanak, amely adott körülmények között nem képesek az utódsejtekbe vándorolni, így elvesznek. *In vivo* alkalmazásukat hátráltatja, hogy még nincs olyan mechanizmus, amellyel megfelelő hatékonysággal a célsejtekbe tudnák juttatni (jelenleg a transzdukciós hatékonyság 5 százezred körül van).

10-13. ábra

http://chromoresearch.co.jp/e/chromosome/

2013.09.26.

**10.8. Virális vektorok**

Csakúgy, mint a prokariótáknál, eukarióták esetében is lehetséges alternatíva a transzgének bejuttatása vírusok segítségével. A virális vektorok a gazdavírus jellegétől függően vagy **integrálódnak** a genomba (retrovírus, például lentivírus eredetű vektorok, 10-14. ábra), vagy **episzómaként** vannak jelen a sejtben (adenovírus, poliómavírus, papillómavírus, vagy Epstein–Barr-vírus eredetű vektorok). Az emlőssejt-tenyészetekben alkalmazott virális vektorok egyik fontos felhasználási területe lehet a génterápiás gyógyítás.

10-14. ábra

http://www.lentigen.com/images/product\_diagram.jpg

2013.09.26.

A virális vektorok nagy előnye, hogy a vírus segítségével **nagy hatásfokkal** jutnak be a célsejtbe. Az integrálódás előnye, hogy minden utódsejtben megtalálható lesz a transzgén, Hátránya, hogy ha valamely átíródó, vagy szabályozó régió közepére integrálódik, génmutációt okozhat, aminek következménye lehet valamely fehérje alul- vagy túlműködése. Ezek a genetikai változások súlyos elváltozásokat, gyakran rákos proliferációt okozhatnak. Az episzomális vektorok előnye, hogy az integrálódás káros következményeivel nem kell számolnunk. Hátránya, hogy az episzómák szaporodása gyakran nem függ a sejt osztódástól. Az episzómák száma az utódsejtekben igen változó lehet, megfelelő replikáció és eloszlási mechanizmsok híján túlszaporodhatnak az utódsejtekben, vagy eltűnhetnek az utódsejtekből. Ezért hosszú távon azok a virális vektorok jelenthetik a **génterápiás** kezelésekre a megoldást, amelyek nem integrálódnak, episzómaként alacsony, de stabil kópiaszámban vannak jelen a sejtekben, replikációjuk a gazdasejtéhez kötött, osztódás során egyenlő arányban jutnak az utódsejtekbe. A kutatók ma már egyre közelebb járnak egy ilyen ideális vektor elkészítéséhez.