

## Manipulation med gener og celler



Da man først havde bestemt strukturen af DNA og afsløret den genetiske kode, var grundstenen lagt til den moderne molekylære biologi, og med epokegørende tekniske opdagelser i 1970'erne blev det muligt at undersøge biologiske/medicinske spørgsmål på et helt andet niveau end tidligere. Det var først og fremmest opdagelsen af

**restriktionsenzym**er og **DNA-ligaser**, der gjorde det muligt at udvikle den teknik, der nu er helt almindelig i alle molekylær-biologiske laboratorier verden over, nemlig DNA-kloning.

For at undersøge celler er man først nødt til at adskille cellen fra vævet ved hjælp af **proteolytisk enzym**er og andre agenter der bryder disse adhæsive bindinger mellem cellerne. Men det er ikke nok. Man vil også gerne se på en bestemt celle ved at kigge på deres antigener, et bestemt protein der er udtrykt på en bestemt celle. Man kan bl.a. bruge maskine **elektrisk fluorescence-activated cell sorter**, hvor celler bliver kørt i en lang kæde gennem en laser og bliver identificeret. Den maskine kan identificere 1 celle ud af 1000 pr. sek.

Herefter kan celler komme i medium, hvor de kan vokse.

Man ved at mange celler holder op med at dele sig, når deres ender, der koder for gentagende sekvens er brugt. Man kan tilføje enzymet **telomerase**, men så vil de dele sig uhæmmet og udvikle til cancerceller. Man tilføjer derfor dem et gen i stedet for der koder for katalytisk subunit af telomerase. Hermed vil cellerne blive "udødelige", og kan overleve mange år, og man kan analysere forskellige cellelinier. En ny teknik er at man analyserer **embryonisk stamceller**, der endnu ikke er differentierede, og på den måde kan man få dem til at udvikle sig i en bestemt retning til udvikling af et bestemt væv (kunstige organer) ved hjælp af nogle signal proteiner, der kan bruges som transplantationen, men det er stadig et forsøg.

Restriktionsenzym f.eks. **nuklease** er et enzym, der genkender og klipper helt specifikke basesekvenser i det dobbeltstrengede DNA-molekyle. De er udtaget fra bakterier, og deres navne reflekterer deres origins. Afhængig af, hvor ofte denne baserækkefølge findes, vil der dannes DNA-fragmenter af forskellige størrelser. Ved at foretage en **gelelektroferase** (adskillelse af restriktionsfragmenterne) kan forskellige arters restriktionsfragment-mønster sammenlignes og et muligt slægtskab fastslås. DNA-fragmenter kan adskilles i en **agarose-geler** eller **polyakrylamid-geler**. I en særskilt bane på gelen køres størrelsesmarkørerne, dvs. en blanding af DNA-fragmenter, hvis størrelser man kender på forhånd. Ud fra disse kan man så anslå størrelsen på det DNA, man ønsker at undersøge. Der findes forskellige metoder til at visualisere de enkelte DNA-bånd efter en gel-kørsel. De to mest anvendte er enten farvning med et stof, et fluorescerende molekyle (hvorefter kan man belyse den med ultraviolet lys for at se de enkelte DNA-bånd) eller radioaktivt mærkning af DNA.

De kemiske bindinger mellem baserne i de to nukleotidkæder er svage hydrogenbindinger, der let brydes f.eks. ved opvarmning. Dette fænomen kaldes for **denaturering**. Afkøles DNA-molekylerne igen, vil de komplementære nukleotidkæder pga. baseparingsreglerne finde sammen på ny. Dette kaldes for

**renaturering.** Denne viden kan bruges til at identificere tilstedeværelsen af kendte gener i et DNA-molekyle. Hvis man f.eks. mærker et kendt gen med radioaktivitet, og det efter opvarmning og afkøling bindes til et denatureret ukendt DNA-molekyle, ved man, om dette ukendte DNA indeholder det kendte gen eller ej. Denne teknik kaldes for **hybridisering**.

Inden for molekylærbiologien refererer klon som regel til en gruppe af identiske celler eller DNA-molekyler, der stammer fra samme oprindelige celler eller samme oprindelige molekyle.

**Plasmider** var de første kloningsvektorer, der blev benyttet i rekombinant DNA-teknologien. Plasmider er cirkulære DNA-molekyler, som findes naturligt i bakterier og gærceller, hvor de er adskilt fra cellens kromosomale DNA. Lige som cellens kromosomale DNA replikeres før hver celledeling, replikeres også plasmid-DNA mindst en gang, så der ved celledeling kan overføres mindst en kopi af plasmidet til hver dattercelle. De har restriktions sites. Mange naturlige forekommende plasmider indeholder gener, som under bestemte betingelser er til gavn for værtscellen. F.eks. er der nogle der indeholder gener, der koder for enzymer med evne til at inaktivere forskellige antibiotika. Bakterier der indeholder disse plasmider er altså resistente over for bestemte antibiotika. Denne egenskab sammen med en anden vigtig egenskab hos mange plasmider, nemlig evnen til at overføre kopier af sig selv til andre bakterieceller af samme eller beslægtede typer, er blevet et stort problem i behandlingen af en del bakterieinfektioner, hvor de sædvanlige antibiotika ikke længere er i stand til at slå infektionerne ihjel.

Plasmidet klippes med et restriktionsenzym, og DNA (ofte et gen) man er interesseret i at klon, klippes med samme restriktionsenzym, så enderne kommer til at passe sammen. Til sidst limes plasmid og gen sammen med enzymet DNA-ligase og cellen transformeres med det rekombinant plasmid, dvs. man får cellerne til at optage plasmider.

Molekyler der oversættes til DNA ved hjælp af et enzym, **revers transskriptase**, at det bruger mRNA som skabelon og laver DNA. Dette DNA kaldes for **cdNA**, altså DNA, der er komplementært til mRNA. Det adskiller sig fra genomisk-DNA ved at kun at indeholde exon-sekvenser. Alle de kunstigt frembragte cdNA-molekyler – der altså repræsenterer alle gener, der udtrykkes i de bestemte celletyper – klones i plasmider eller bakteriofager. Resultatet er et **cdNA-bibliotek** for de pågældende celletyper. Sådan laver man bl.a. insulin.

For at klon et stykke DNA, anvender man en metode **PCR, polymerase chain reaction**. Følsomheden eller effektiviteten af PCR er så stor, at det er nok med blot en enkelt celle til at undersøge f.eks. tilstedeværelse af bestemte mutationer, som er knyttet til forskellige genetiske sygdomme. Sådan en følsomhed er det ikke overraskende, at metoden er flittigt anvendt til retsgenetiske analyser. Det der sker, at man laver mange kopier af det gen eller DNA-stykke, man er interesseret i, sådan at man får så store mængder af det, at man kan undersøge det yderligere ved hjælp af andre metoder. Det eneste man behøver at kende på forhånd, er en kort DNA-sekvens i hver ende af det DNA-stykke, der skal laves kopier af. Ud fra disse korte sekvenser kan der laves en primer, der passer til hver ende – og ved hjælp af disse og en speciel DNA-polymerase, der kan tåle meget høje temperaturer plus de fire DNA byggesten, kan PCR foregå.

Gener kan modificeres med en lang række forskellige enzymatiske og kemiske metoder. Disse modificerede gener kan så sættes tilbage, dvs. erstatte de oprindelige gener i genomet, ved hjælp af specielle teknikker. Herved fås de såkaldte **knock out** organismer. Formålet er at slå funktionen af det pågældende gen ud. Man ødelægger altså det meste af det oprindelige gen og ser hvilken effekt det har på dyret. Alternativt kan generne indsættes nye steder i genomet ved en mere tilfældig proces, og herved får **transgene** organismer. I dette tilfælde sprøjtes DNA direkte ind i cellekernen i det befrugtede æg. Resultatet bliver at genet sættes ind tilfældige steder.