

Лекция 4.

Клеточное и ядерное репрограммирование. Методы генетической модификации клеток.

Преподаватель кафедры МиОП к.м.н. Шафигуллина А.К.

Генетическая модификация – изменение генома живого организма с использованием технологии генной инженерии, путем внедрения одного или нескольких генов взятых у одного организма-донора другому.

После такого внедрения (переноса) полученное растение уже будет называться **генетически модифицированным**, или же **трансгенным**.



Преимущество ГМ:

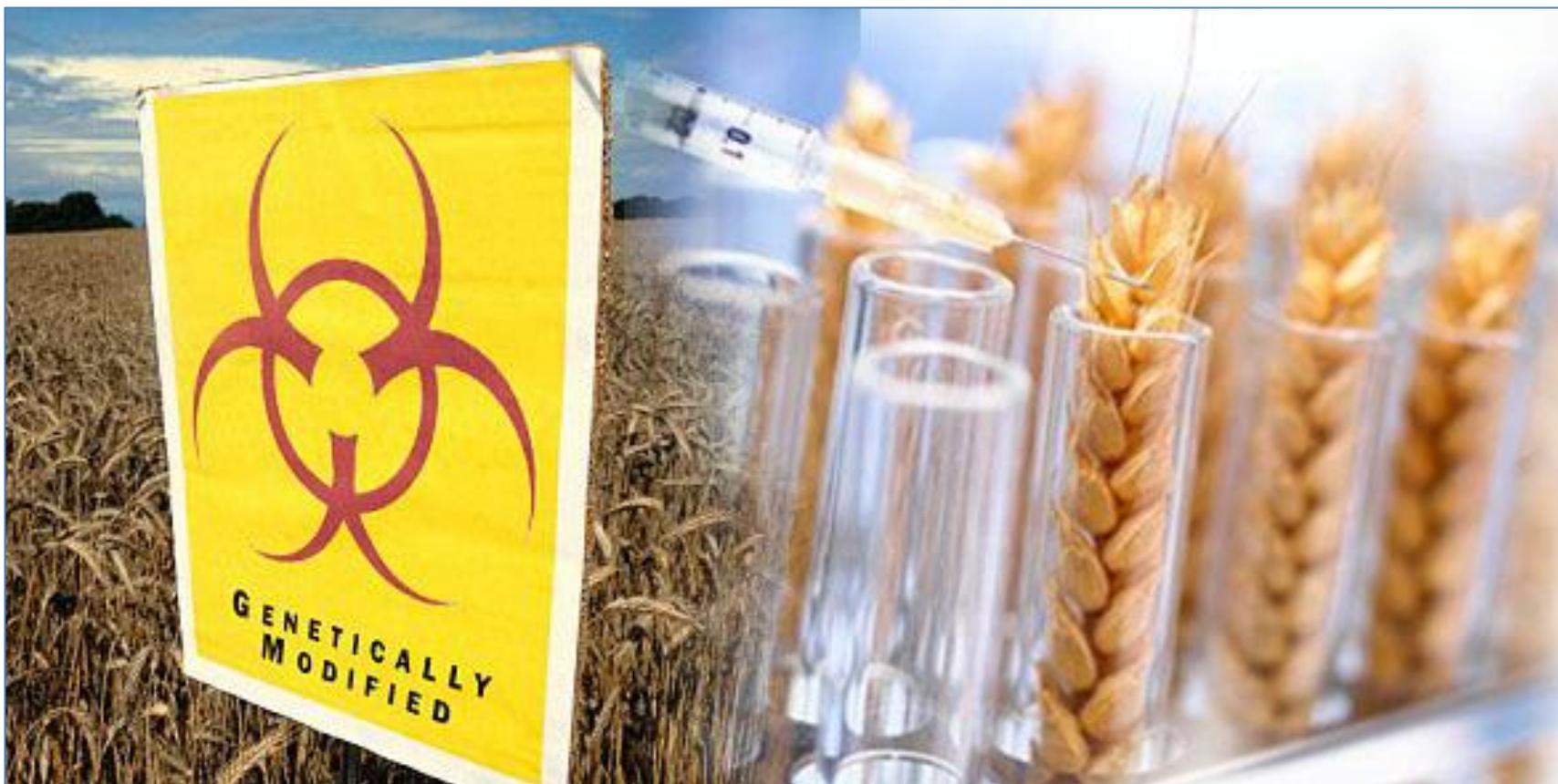
- В отличие от традиционной селекции исходный геном почти не затрагивается и получает новые признаки.

К таким признакам можно отнести устойчивость к:

- различным факторам окружающей среды (к морозу, засухе, влаге и т.д.),
- к болезням,
- к насекомым-вредителям,
- улучшенные ростовые свойства,
- устойчивость к гербицидам,
- пестицидам.
- можно изменить пищевые свойства растений: вкус, аромат, калорийность, времени хранения.



Если необходимо вывести новый сорт пшеницы и чтобы этот сорт приобрел некоторые признаки риса, то традиционная селекция тут бессильна. Методами **генной инженерии** можно подопытному растению перенести определенные характеристики (свойства) и все это будет осуществляться на уровне **ДНК**, отдельных генов. Подобным способом, например, можно пшенице перенести **ген** морозоустойчивости.

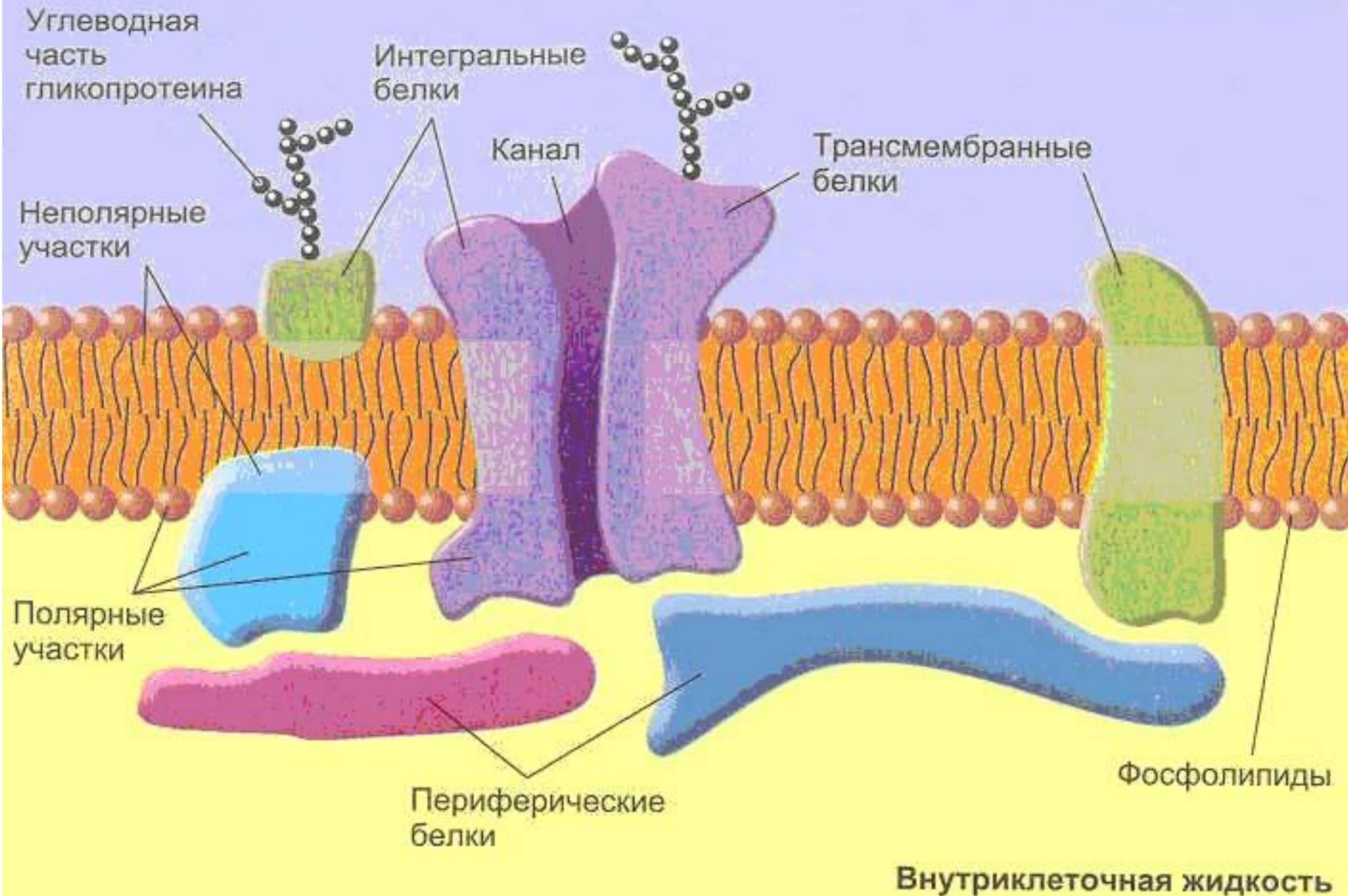


Генетическая модификация может быть вызвана следующими способами:

- конъюгацией (обусловленной плазмидами дикого типа) у прокариот,
- генетической рекомбинацией *in vitro*,
- слиянием протопластов,
- использованием мутагенов,
- гибридизацией клеток,
- трансформация.



Внеклеточная жидкость



Углеводная часть гликопротеина

Интегральные белки

Канал

Трансмембранные белки

Неполярные участки

Полярные участки

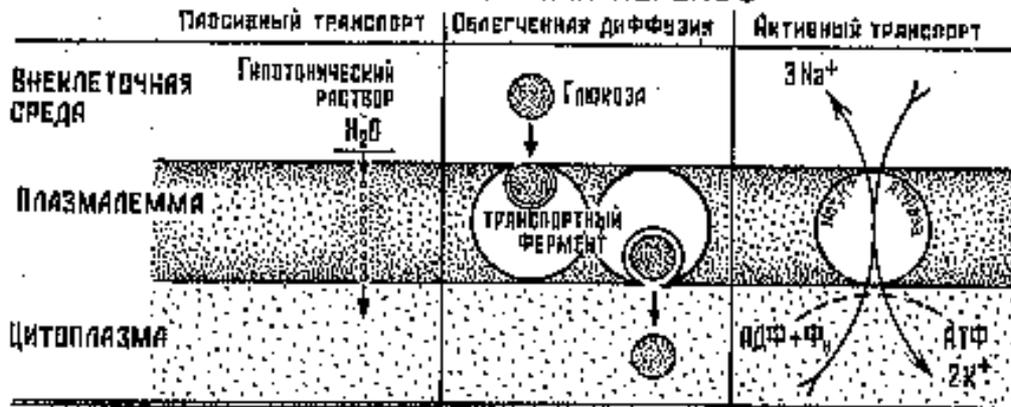
Периферические белки

Фосфолипиды

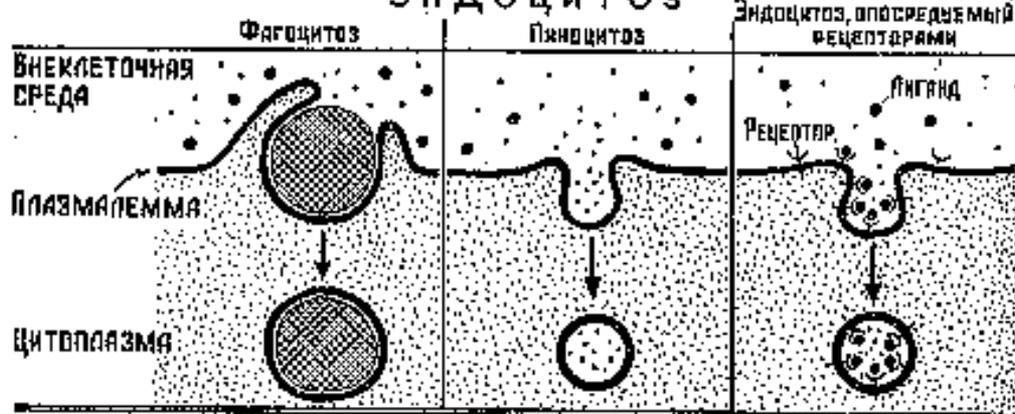
Внутриклеточная жидкость

A

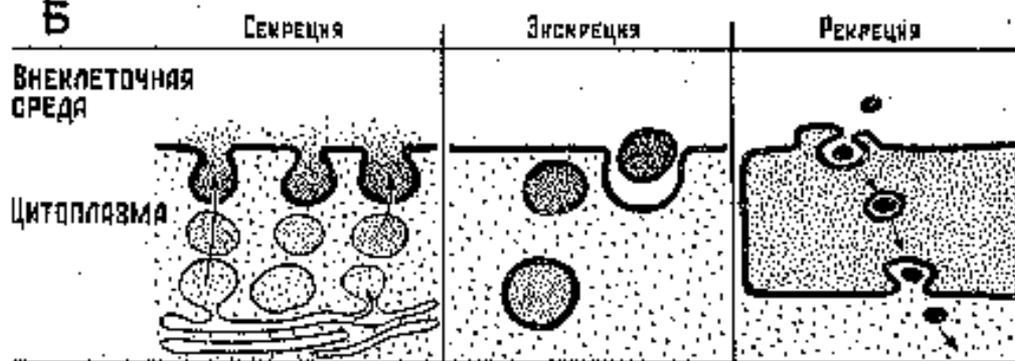
ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС



ЭНДОЦИТОЗ



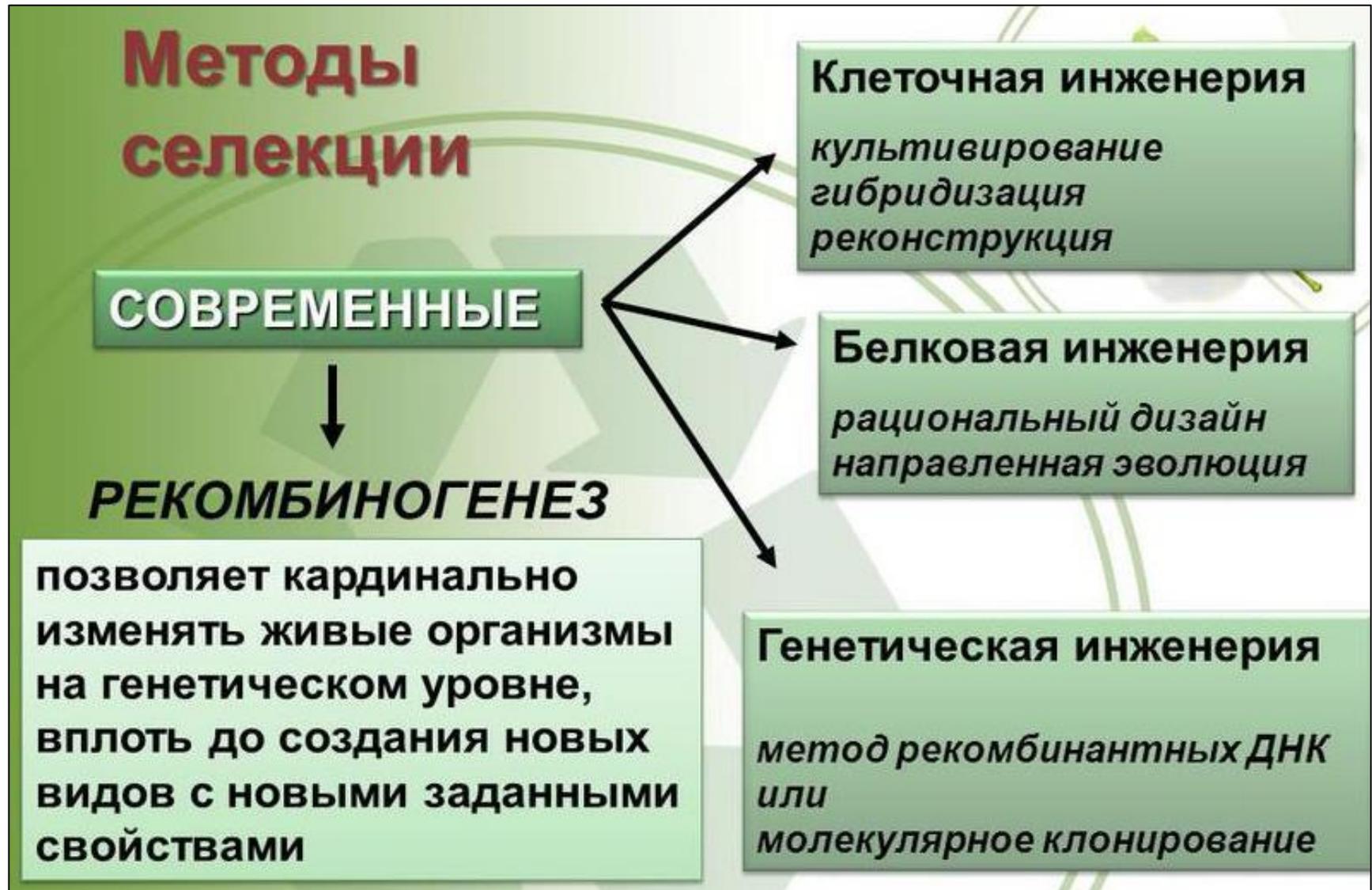
Б



Трансформация — процесс поглощения клеткой организма свободной молекулы ДНК из среды и встраивания её в геном, что приводит к появлению у неё новых наследуемых признаков, характерных для организма-донора ДНК.



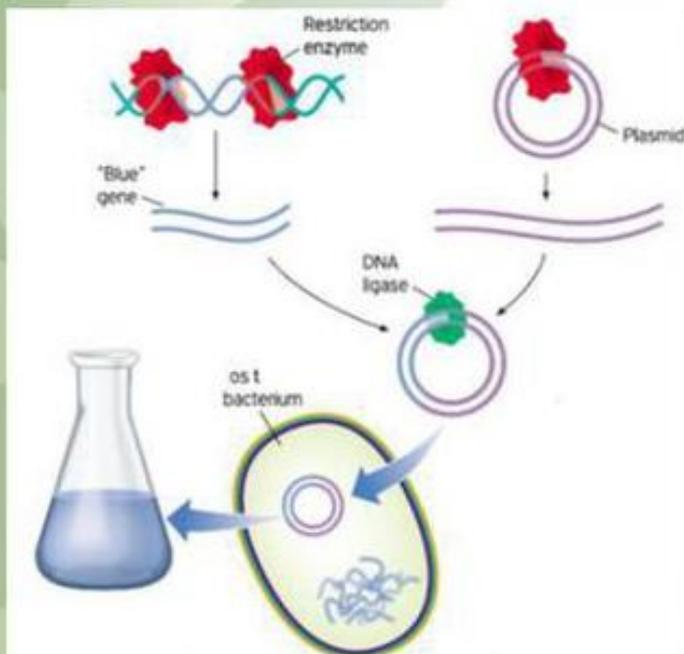
Рекомбинация – процесс реорганизации генома, обмен участками ДНК.



Генетическая инженерия или молекулярное клонирование

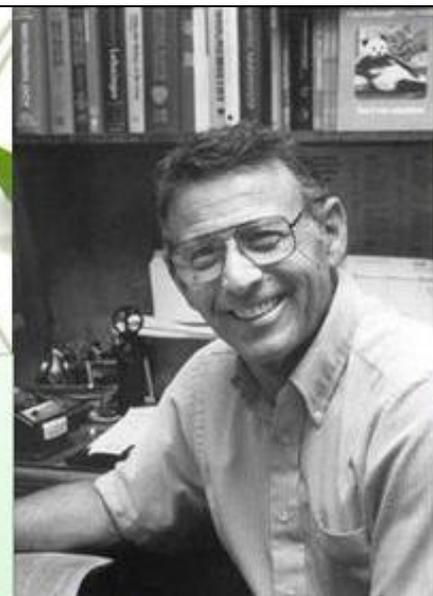


Метод создания новых генетических программ путем конструирования и внесения новой генетической информации в уже существующие живые организмы



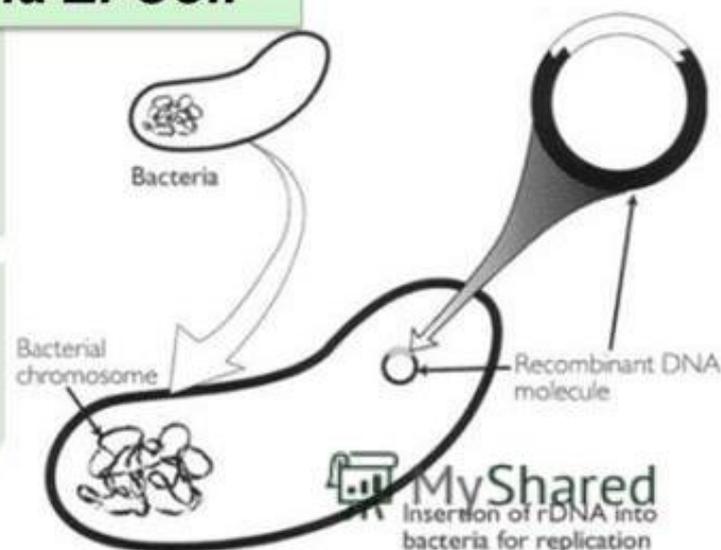
История метода

Berg, Paul (США)
(р. 1926)
Нобелевская премия
по химии, 1980



1972 г. – появление методологии

**Пол Берг сконструировал рДНК из
фрагмента ДНК вируса SV40,
бактериофага λ и оперона *E. Coli***





Поль Берг



Стенли Коэн



Герберт Бойер



Анни Чанг

**1972 г. Анни Чанг
Герберт Бойер
Поль Берг
Стенли Коэн**

установили, что при помощи ферментов *рестриктаз* можно порезать две любые молекулы ДНК и сделать из них одну *рекомбинантную ДНК*

ТЕХНИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ



I этап Получение гена



II этап Создание рекомбинантной ДНК



III этап Создание трансгенного организма



IV этап Отбор модифицированных систем

Рекомбинантная ДНК – искусственно сконструированная ДНК, несущая фрагменты генетической информации разных организмов

Трансгенез – процесс перенос гена или группы генов из одного организма в другой и создание условий для его/их экспрессии

Векторы – системы доставки трансгена, обеспечивающие его интеграцию, амплификацию и экспрессию

Классификация векторов по реципиентным системам



Вектора прокариот

Естественные
плазмиды
бактериофаги

Искусственные
космиды
фазмиды
бакмиды

Вектора эукариот

Естественные
плазмиды
вирусы

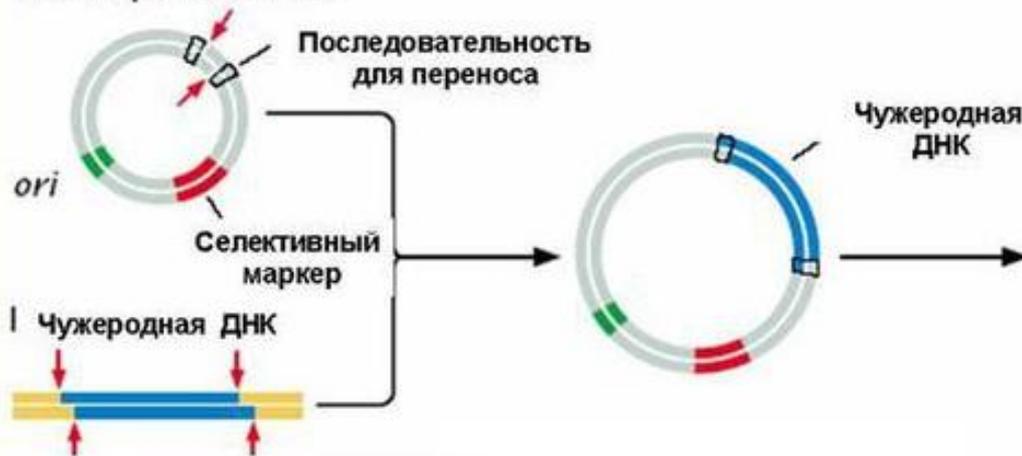
Искусственные
челночные векторы

Бакмиды – челночные векторы на основе генома бакуловируса, способные существовать в клетках *E.coli*

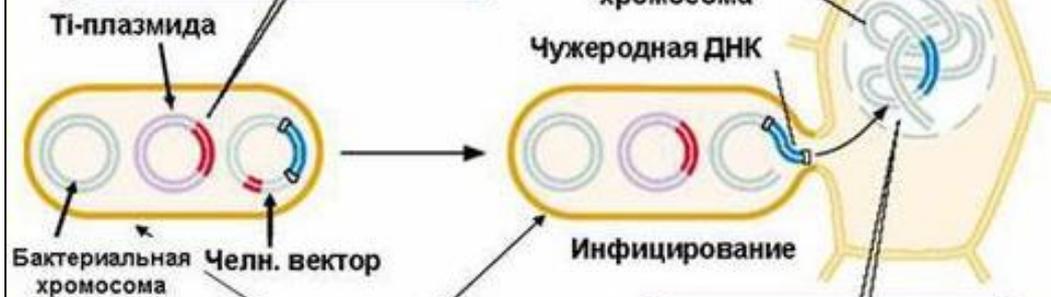
Космиды – плазмидные векторы, в которые встроен участок генома фага λ , обеспечивающий возможность упаковки молекулы в фаговую частицу

Фазмиды – векторы, которые содержат генетические элементы плазмид и бактериофагов

Челночный вектор – плазмида, способная к репликации в клетках разных хозяев



Тi-плазмида, помощник для переноса



Агробактерия *Agrobacterium tumefaciens*



MyShared

<http://filecs.exdat.com>

Классификация векторов по функциям



Клонирующие

вектора, обеспечивающие репликацию гибридной молекулы в клетке

Экспрессирующие

вектора, обеспечивающие правильную и эффективную экспрессию чужеродной ДНК в клетке-реципиенте

Интегративные

вектора, обеспечивающие интеграцию чужеродной ДНК в геном реципиента



Методы введения рДНК в клетку-реципиент



Естественные

Конъюгация

Трансфекция

Трансдукция

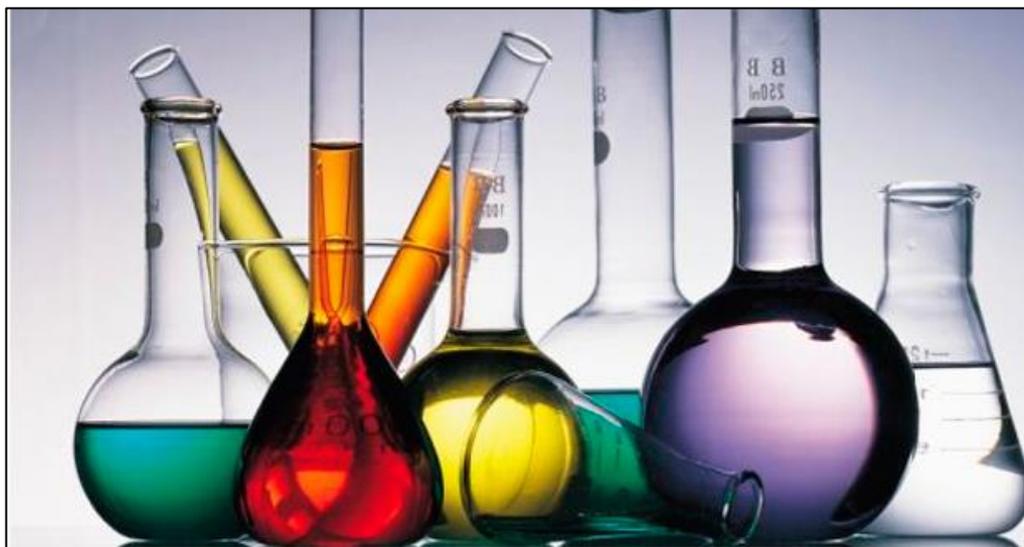
Искусственные

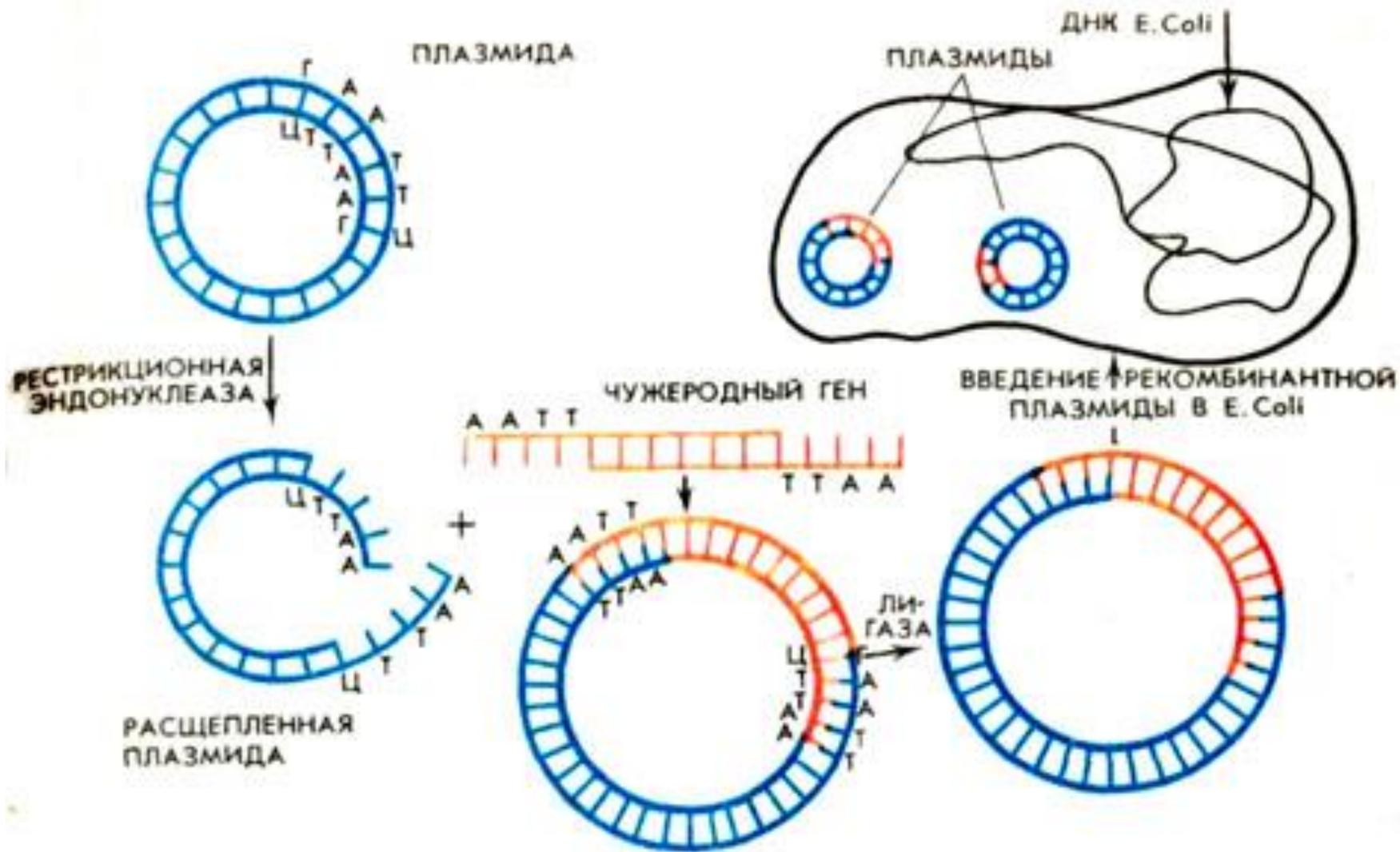
Трансформация

Материалы, используемые для трансфекции,
относятся к трем основным типам:

- 1) микрочастицы,
- 2) катионные полимеры
- 3) липосомы.

Один из самых дешёвых и наименее надежных методов является **кальций-фосфатная трансфекция**, изобретённая в 70-х годах XX века. Изотонический раствор, содержащий буфер HEPES, фосфат и ДНК, смешивают с хлористым кальцием. Образуется осадок из частиц фосфата кальция и ДНК, размер которых лежит в нанометровом диапазоне. Суспензию добавляют к культуре клеток, которые поглощают частицы (как именно, авторы не уточняли). Лучше всего такая трансфекция проходит с эмбриональными клетками почки человека линии 293 (HEK 293), но с несколько меньшей эффективностью трансфицируются и многие другие линии.



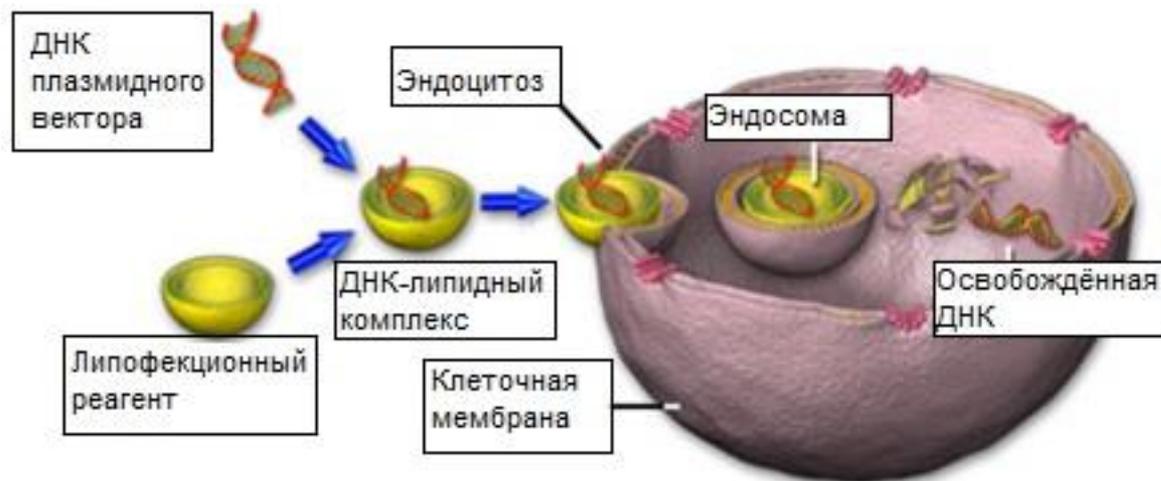


Более эффективен метод, в котором используют **липосомы**, структуры, много меньшие по размерам, чем клетки, состоящие из липидной мембраны, окружающей ДНК в водной фазе. Их строение напоминает строение клеток, которые тоже окружены фосфолипидной мембраной. Липосомы могут сливаться с клеточной мембраной, после чего их внутреннее пространство сливается с содержимым клеток. Для образования липосом обычно используют положительно заряженные липиды, так как ДНК и клеточные фосфолипиды заряжены отрицательно, а частицы с разным электростатическим зарядом притягиваются друг к другу.

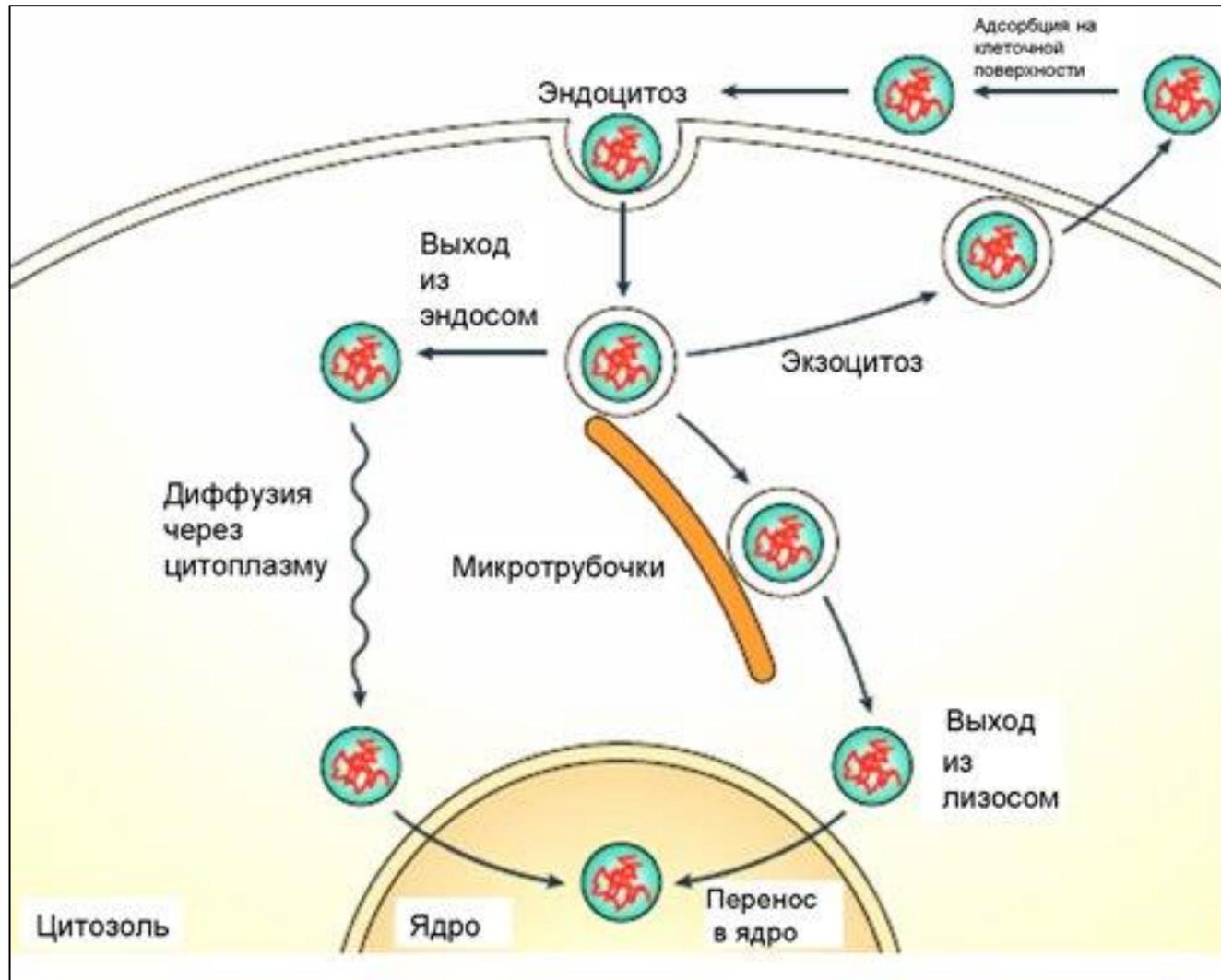
К **преимуществам** данного метода можно отнести:

- 1) низкую токсичность липосом по отношению к клеткам,
- 2) экзогенный генетический материал защищен от действия нуклеаз посредством транспортировки в липосомах.

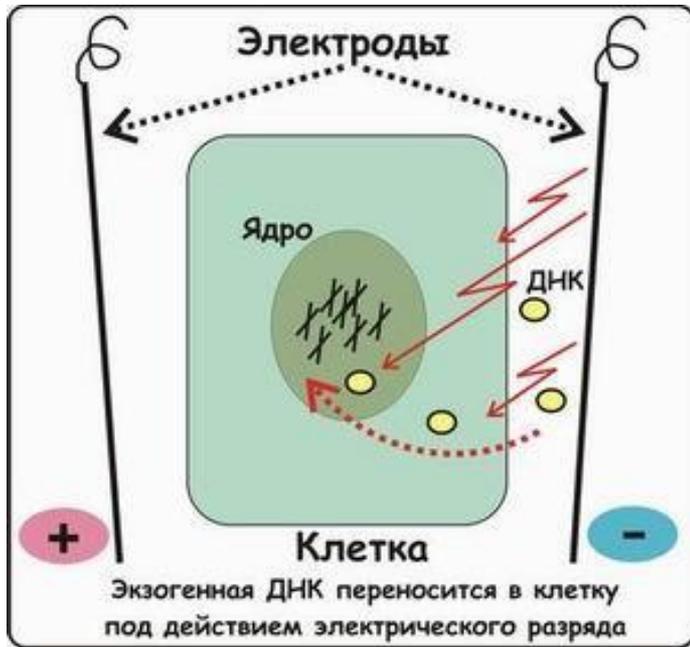
Недостатком данного метода является то, что количество личинок, экспрессирующих трансген сокращается с возрастом.



Ещё один метод трансфекции — использование положительно заряженных водорастворимых полимеров, таких как **ДЭАЭ-декстран** или **полиэтиленимин**. Отрицательно заряженная ДНК связывает поликатионы, и образовавшийся комплекс поглощается клетками путём эндоцитоза.



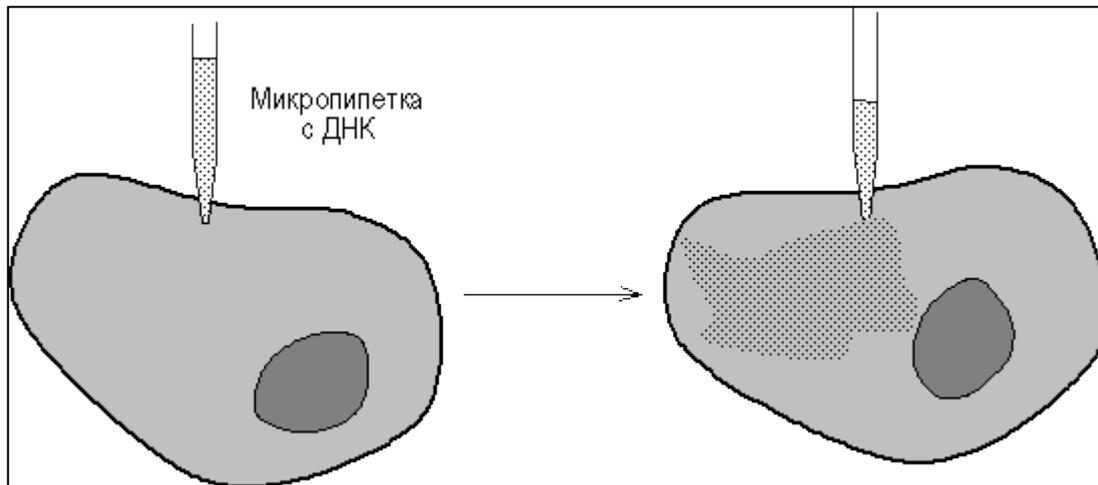
Электропорация



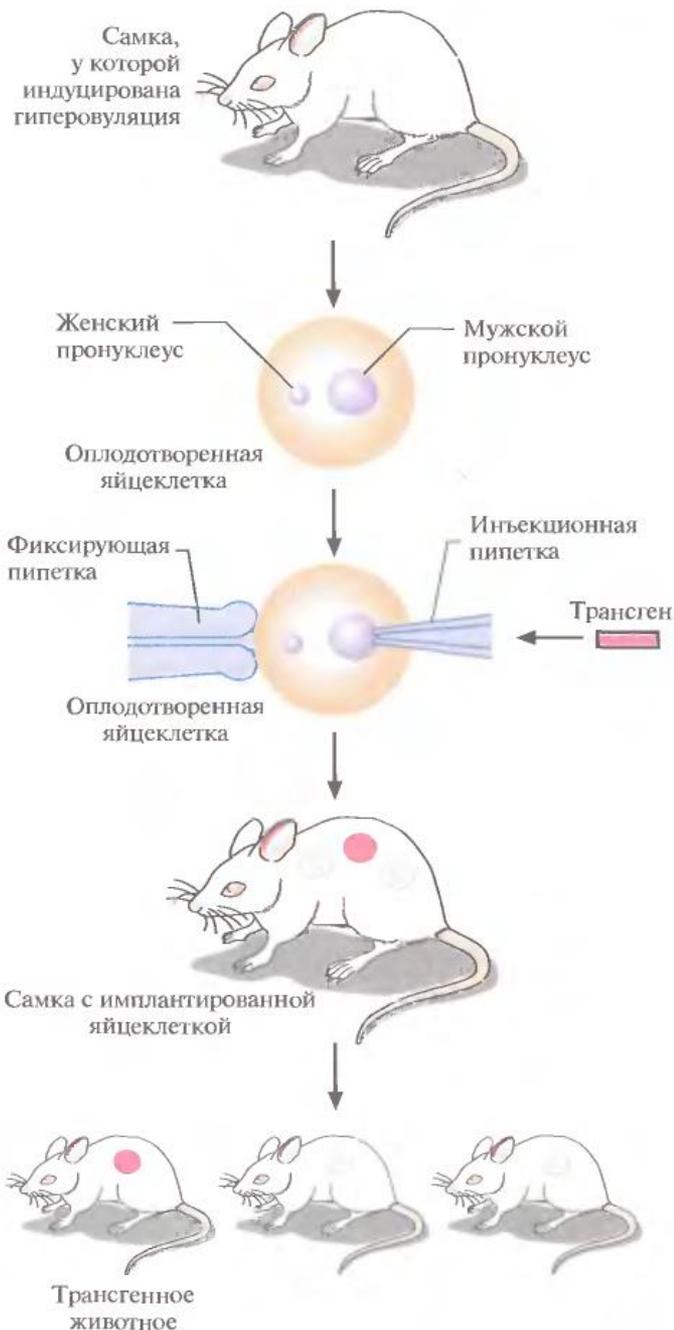
Этот метод основан на способности клеточной мембраны, становиться проницаемой для экзогенных молекул ДНК под действием импульсов высокого напряжения (напряжение 200 - 350 В, длительность импульса 54 мс). Когда различия в потенциалах на внешней и внутренней поверхности мембраны превысят определенный уровень, формируются временные поры, через которые способны проходить экзогенные молекулы. Изменение количества пор в мембране обратимо при условии, что величина или продолжительность импульсов высокого напряжения не превысит критического предела. Размер пор зависит от длины импульсов, силы электрического поля, а также ионного состава среды.

Недостатком использования электропорации является постепенная деградация и уменьшение экспрессии трансгена со временем.

Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1-0.5 микрона и микроманипулятора (рис. 45). Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы (ТК) и плазмиду рBR322, были инъецированы в ТК⁻клетки и было показано, что ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался. Метод введения ДНК с помощью микроинъекций был разработан в начале 70-х годов Андерсоном и Диакумакосом. В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 час инъецировать 500-1000 клеток, причем в лучших экспериментах в 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

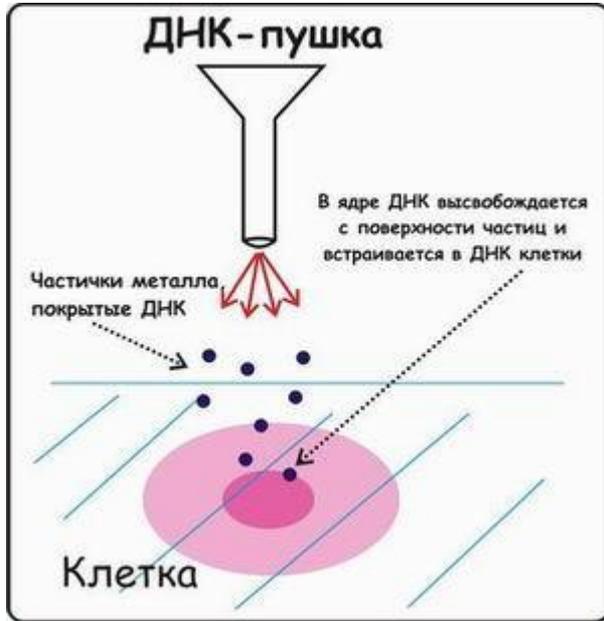


Метод микроинъекций ДНК



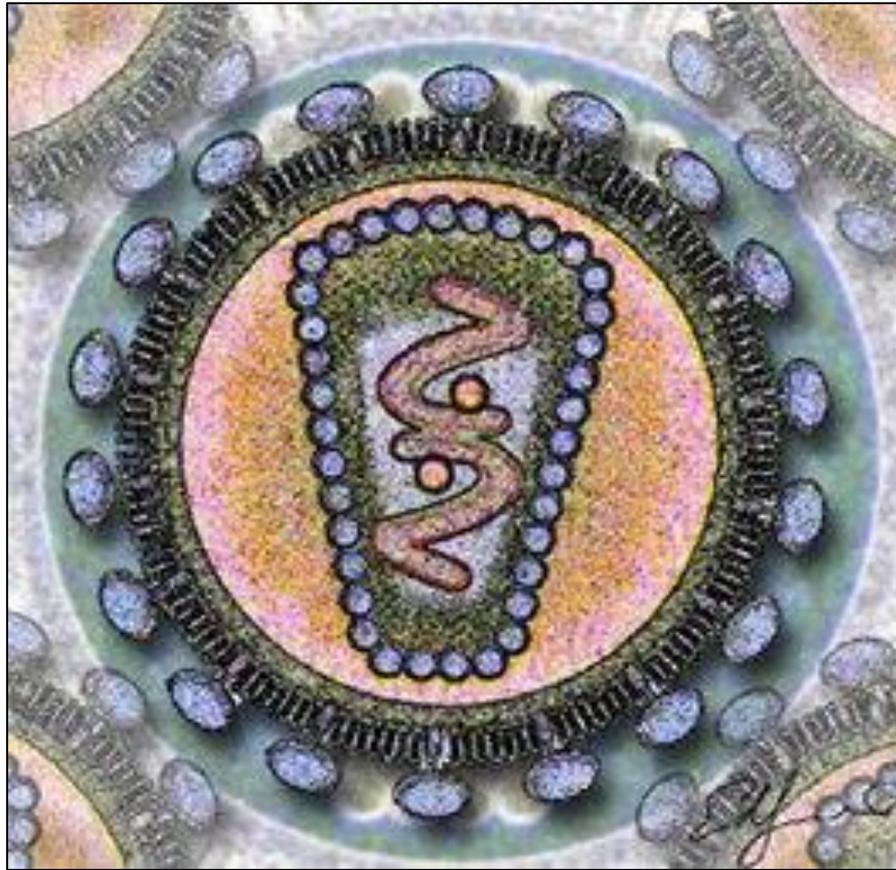
1. Увеличение числа яйцеклеток, в которых будет инъецирована чужеродная ДНК, путем стимуляции гиперовуляции у самок-доноров. Сначала самкам вводят сыворотку беременной кобылы, а спустя примерно 48 ч — хорионический гонадотропин человека. В результате гиперовуляции образуется примерно 35 яйцеклеток вместо обычных 5—10.
2. Скрещивание с самцами самок с гиперовуляцией и их умерщвление. Вымывание из яйцеводов оплодотворенных яйцеклеток.
3. Микроинъекция ДНК в оплодотворенные яйцеклетки — как правило, сразу после выделения. Часто вводимая трансгенная конструкция находится в линейной форме и не содержит прокариотических векторных последовательностей.

Биобаллистическая трансформация

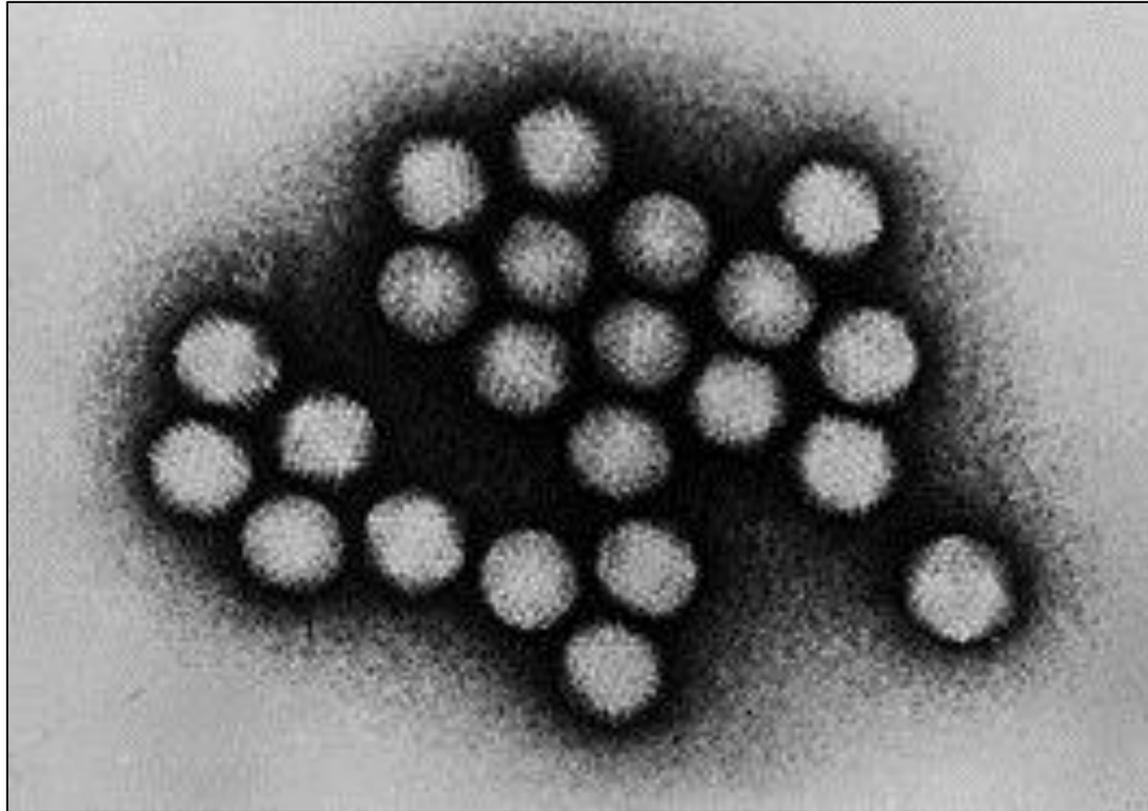


Существенным **недостатком** этого метода является то, что эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, довольно редко развиваются в полноценных взрослых особей, большая часть из них рано или поздно гибнет.

Суть метода биобаллистической трансформации заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, платины или золота, диаметром от 0,1 до 3,5 мкм, напыляется векторная ДНК, содержащая необходимую для трансформации генную конструкцию. Вольфрамовые, платиновые или золотые частички, несущие ДНК, на целлофановой подложке помещаются внутрь биобаллистической пушки. Суспензия животных клеток или эмбрионов, на ранней стадии развития, помещается под биобаллистическую пушку на расстоянии 10-25 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления частички металла с огромной скоростью выбрасываются из пушки и, пробивая мембраны, входят в цитоплазму и ядра клеток. Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления частичек металла, в то время как в зоне 0,6-1 см от центра будут находиться трансформированные клетки (Рис.3). Далее клетки или эмбрионы животных переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации. Бомбардировка микрочастицами была использована, например, для трансформации оплодотворенных яйцеклеток креветки, морского ежа. Процент выживших клеток после бомбардировки составляет приблизительно 70%, а также была доказана экспрессия трансгена у некоторых разновидностей рыб. Главным преимуществом данного метода является высокая эффективность встройки векторной ДНК, а также то, что можно получить трансгенные клетки в самые кратчайшие сроки.

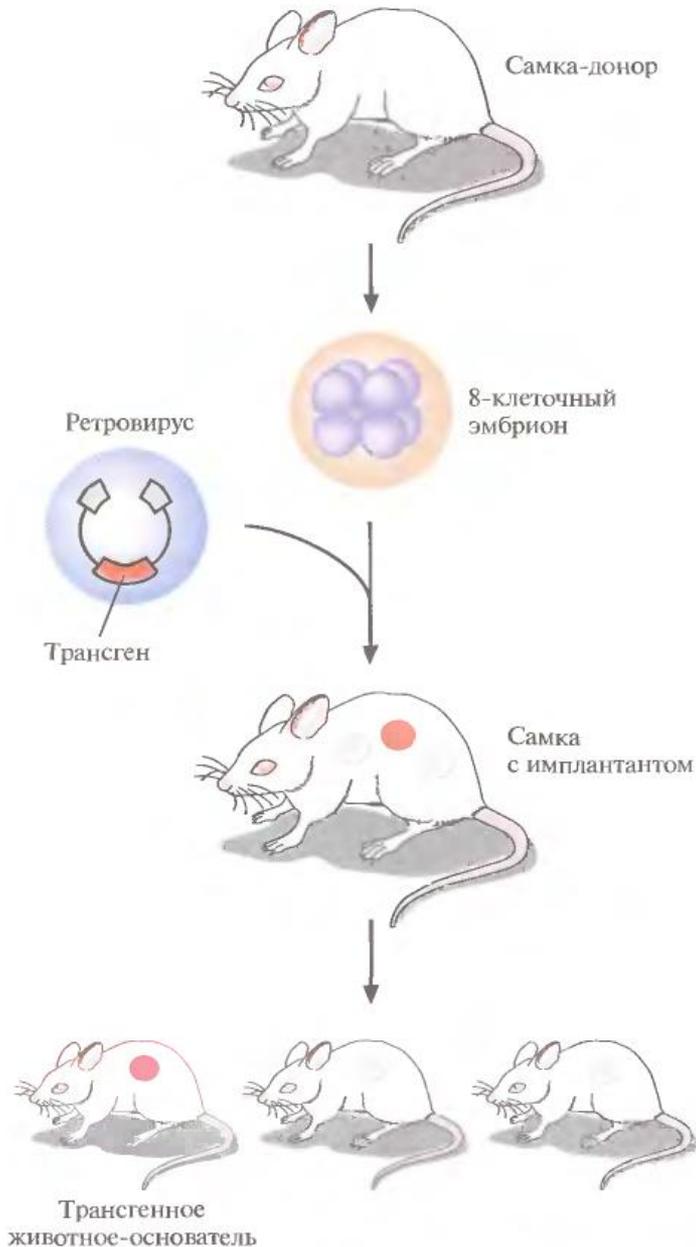


Лентивирусы (**РНК**-содержащие вирусы) способны доставлять значительное количество генетического материала в клетку хозяина и обладают уникальной среди ретровирусов способностью реплицироваться в неделящихся клетках, что делает лентивирусы удобным вектором для доставки генетического материала в молекулярной биологии. Ярким представителем этого рода является вирус иммунодефицита человека.



Аденови́русы ([лат.](#) *Adenoviridae*) — семейство **ДНК**-содержащих [вирусов](#) [ПОЗВОНОЧНЫХ](#), лишённых липопротеиновой оболочки.

Использование ретровирусных векторов



Более простым способом доставки чужеродных генов в геном животного-реципиента является использование векторов на основе вирусов (рис. 1). В этом случае эмбрионы на ранней (восьмиклеточной) стадии развития инкубируют в культуральной среде в присутствии фибробластов, в которых образуются рекомбинантные ретровирусы, и после заражения такими вирусами эмбрионы пересаживают псевдобеременным самкам мышей, где они продолжают свое развитие. Кроме **простоты** одним из преимуществ данного способа введения ДНК является то, что в геном клеток зародышей интегрируется, как правило, одна копия исследуемого гена, фланкированного длинными концевыми повторами вирусной хромосомы, что может способствовать **эффективной экспрессии гена**.

Однако к **недостаткам метода** следует отнести необходимость проведения дополнительных генно-инженерных манипуляций при подготовке ретровирусного вектора, ограниченную емкость вектора (размер вставки – до 10 т.п.о.), вследствие чего трансген может оказаться лишенным прилегающих регуляторных последовательностей, необходимых для его экспрессии, и мозаицизм образующихся трансгенных животных, которые состоят из клеток как содержащих, так и не содержащих трансгены.

I этап Получение гена



II этап Создание рекомбинантной ДНК



III этап Создание трансгенного организма



IV этап Отбор модифицированных систем

Цель:

оценка результата молекулярного клонирования

Методы:

маркерный, иммунологическая детекция, скрининг, картирование, секвенирование



Если необходимо закрепить введенный ген и в потомстве трансфицированных клеток, то его следует включить в ядерный геном. Такая **трансфекция** называется **стабильной**. Для этого в клетки вводят ещё один ген, который облегчает селекцию трансфицированных клеток и поэтому именуется *маркером селекции*. Например, маркером селекции может быть ген резистентности к некоторому антибиотику. Некоторые клетки совершенно случайно включают чужеродную ДНК в свой геном, и задача в таком случае состоит лишь в том, чтобы отобрать потомство таких клеток (клон), что несложно сделать в присутствии антибиотика, губительного для всех клеток кроме трансфицированных.



Отбор по векторам

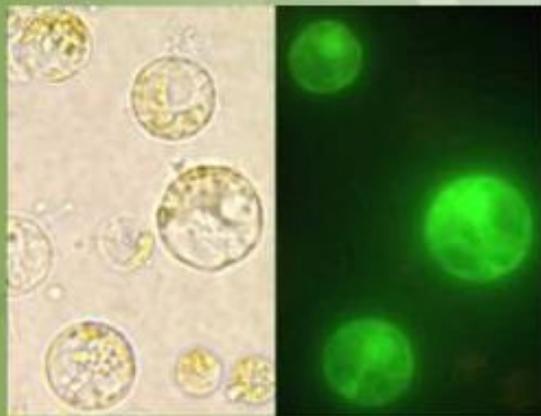
Селективные, репортерные маркеры



- а) Применение репортерных (маркерных) генов первого, второго и третьего поколений:
 - NPT-ген (неомицинфосфотрансфераза и других антибиотикоустойчивых генов)
 - GUS-ген (глюкуронидаза)
 - GFP-ген (greenfluorescenceprotein)
- б) Селекция клеток на средах с антибиотиками
- в) Обнаружение продуктов экспрессии репортерных генов и/или их активности

Отбор по векторам.

GFP



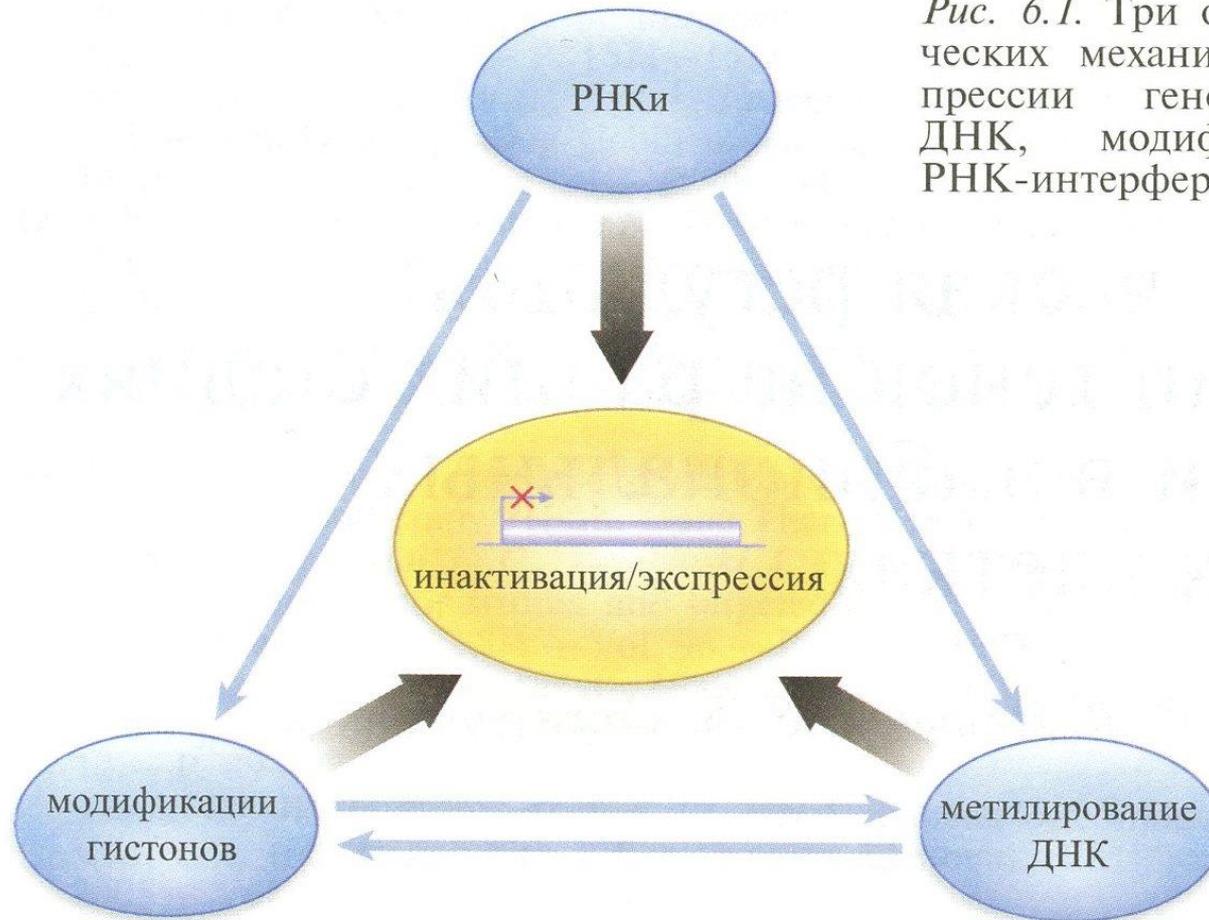


Рис. 6.1. Три основных эпигенетических механизма регуляции экспрессии генов: метилирование ДНК, модификация гистонов, РНК-интерференция.

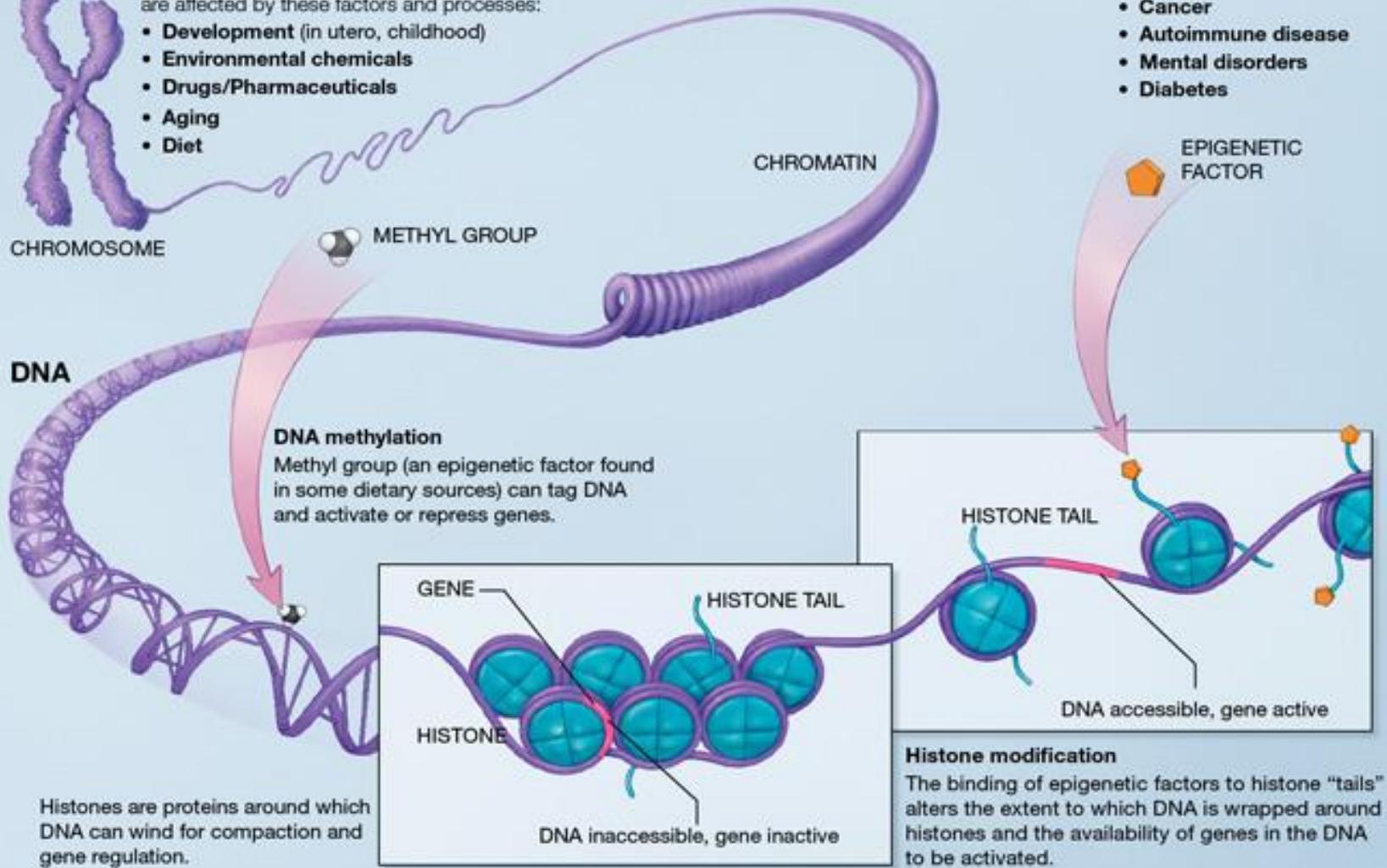
EPIGENETIC MECHANISMS

are affected by these factors and processes:

- Development (in utero, childhood)
- Environmental chemicals
- Drugs/Pharmaceuticals
- Aging
- Diet

HEALTH ENDPOINTS

- Cancer
- Autoimmune disease
- Mental disorders
- Diabetes



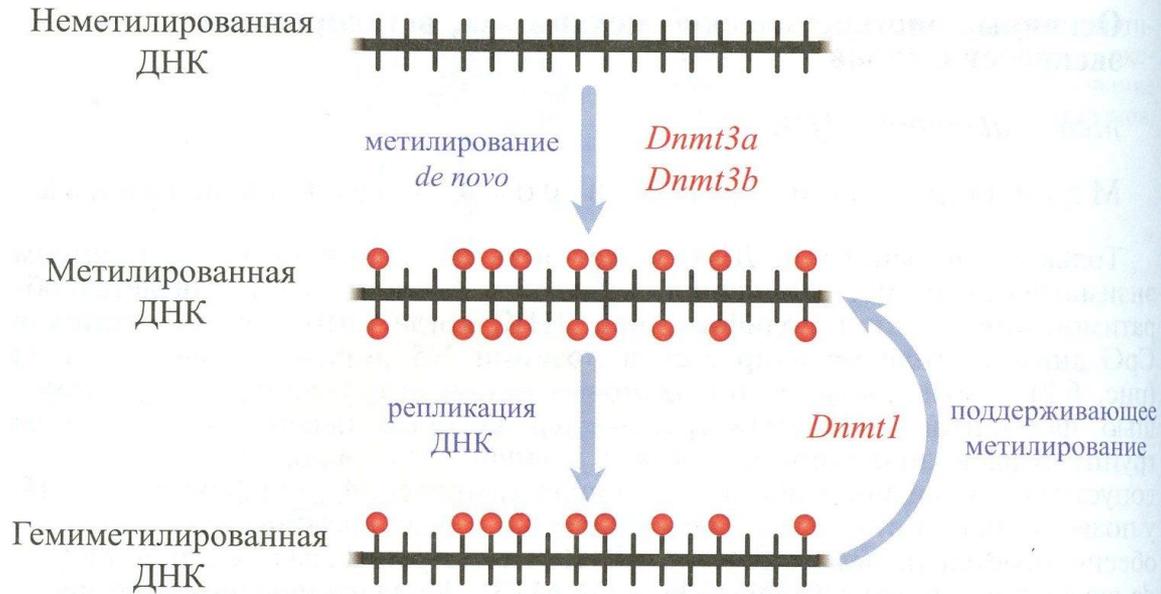


Рис. 6.3. Метилирование *de novo* и поддерживающее метилирование ДНК.

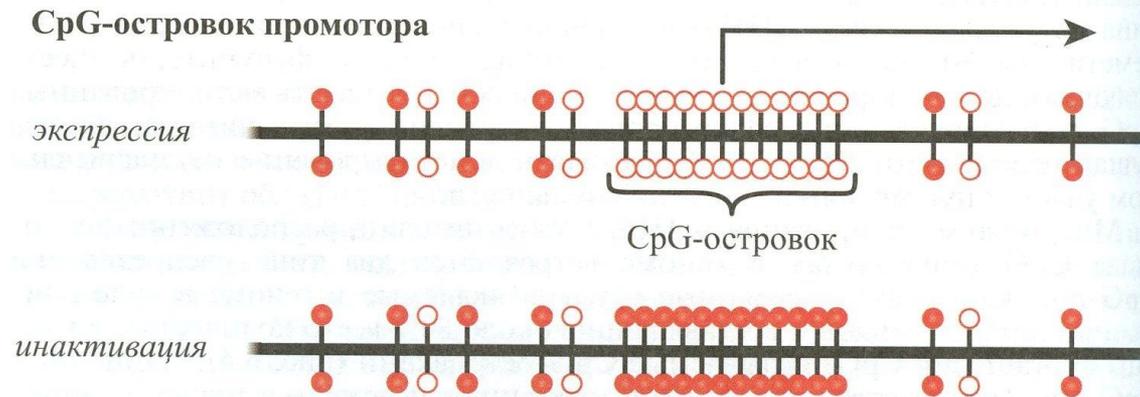


Рис. 6.4. Метилирование СрG-островка приводит к инактивации экспрессии гена. Заштрихованные кружки — метилированные СрG-динуклеотиды; стрелка — экспрессия гена.

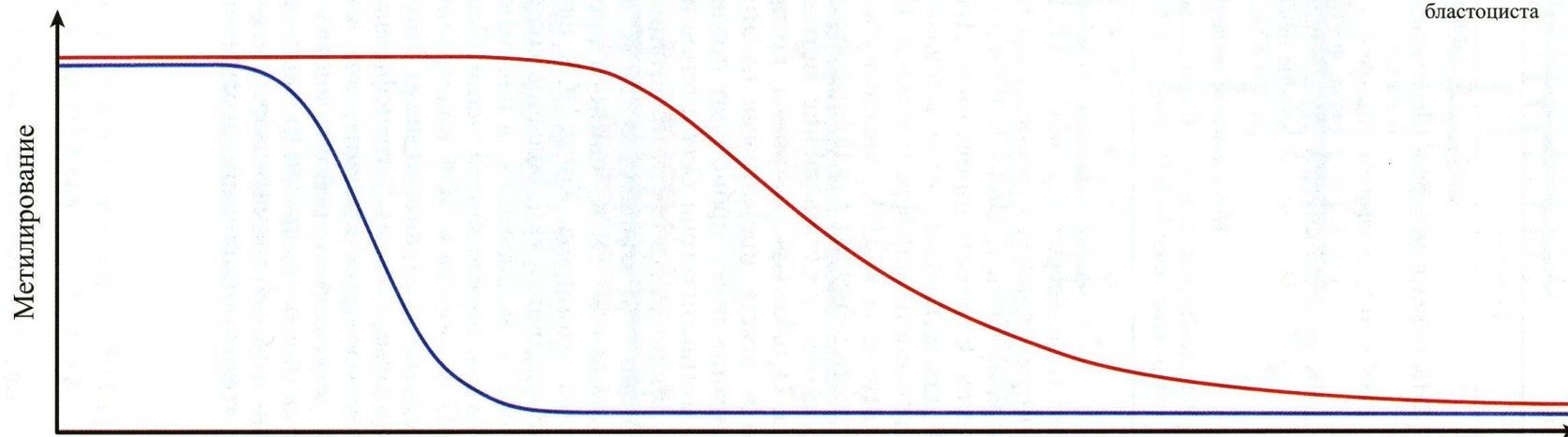
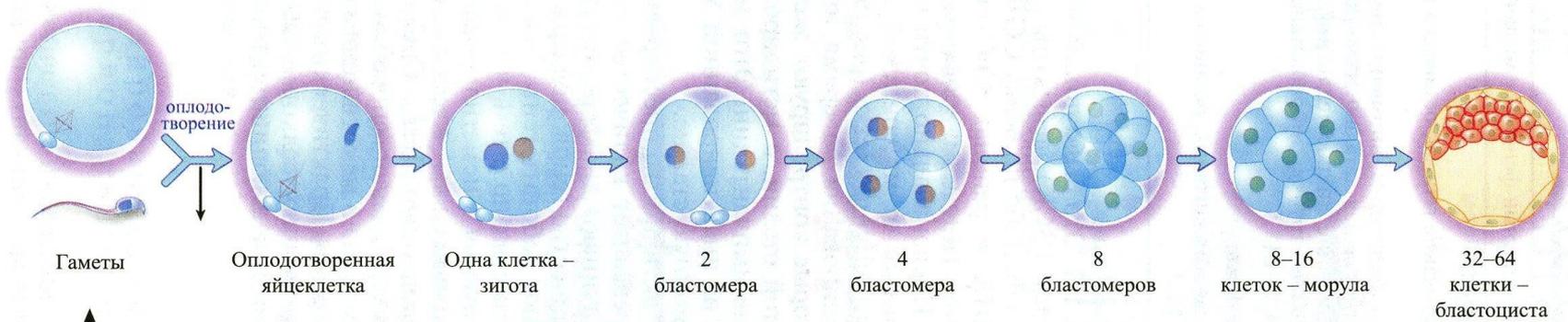


Рис. 6.5. Динамика деметилирования на ранних стадиях эмбриогенеза.

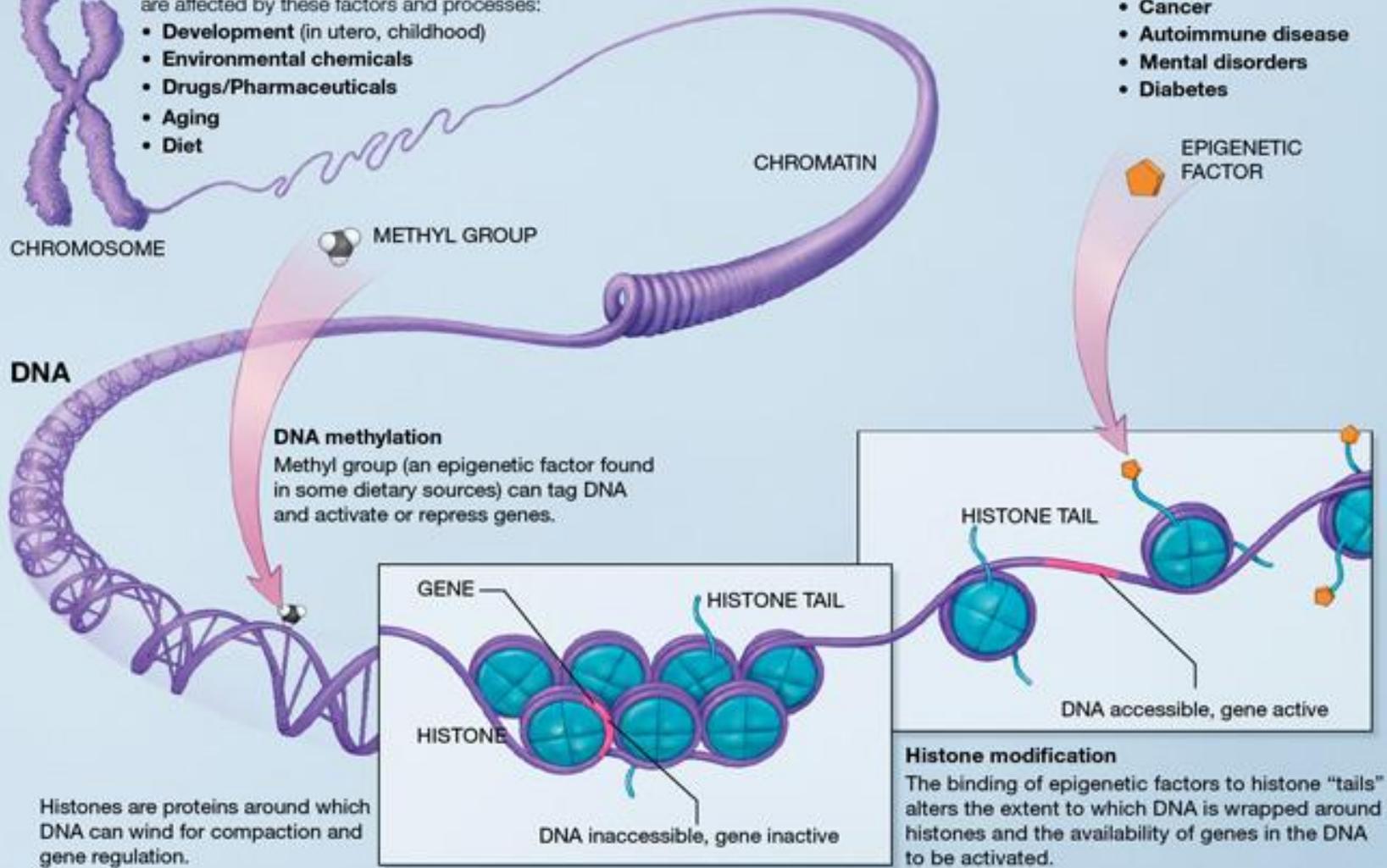
EPIGENETIC MECHANISMS

are affected by these factors and processes:

- Development (in utero, childhood)
- Environmental chemicals
- Drugs/Pharmaceuticals
- Aging
- Diet

HEALTH ENDPOINTS

- Cancer
- Autoimmune disease
- Mental disorders
- Diabetes





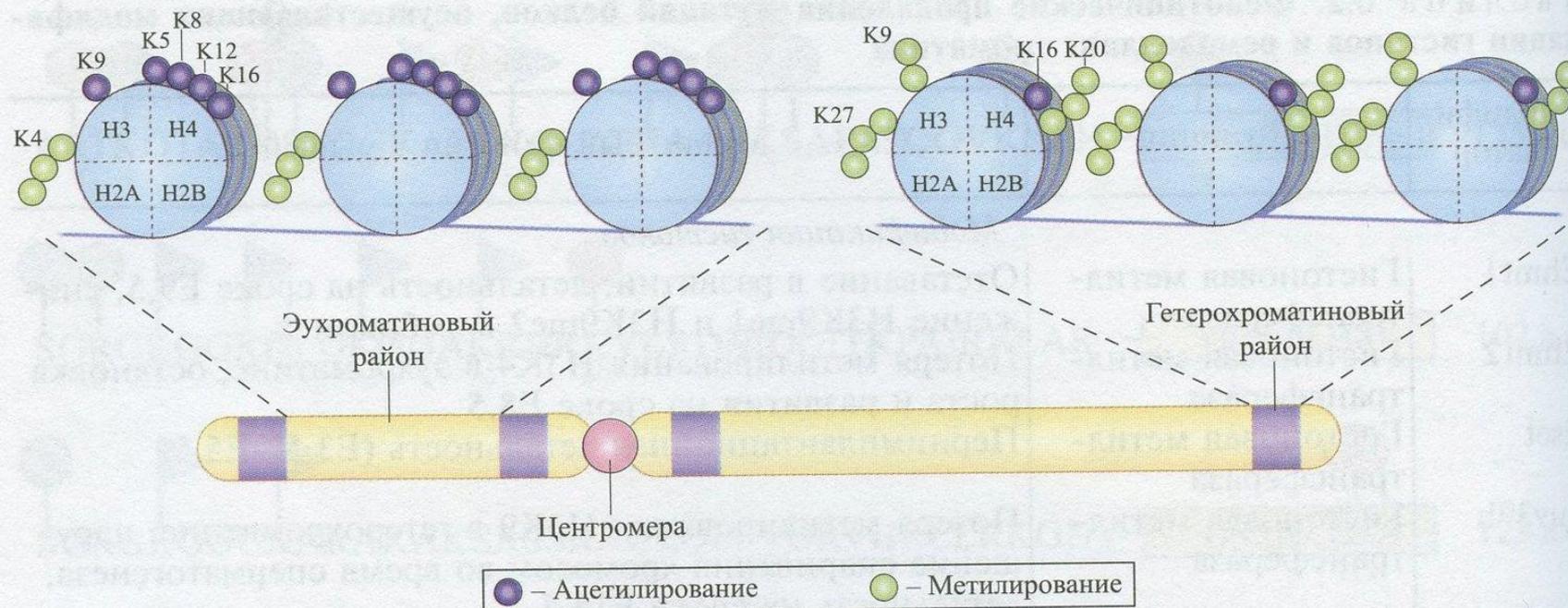


Рис. 6.7. Метилирование и ацетилирование гистоновых белков в эухроматиновых и гетерохроматиновых районах.

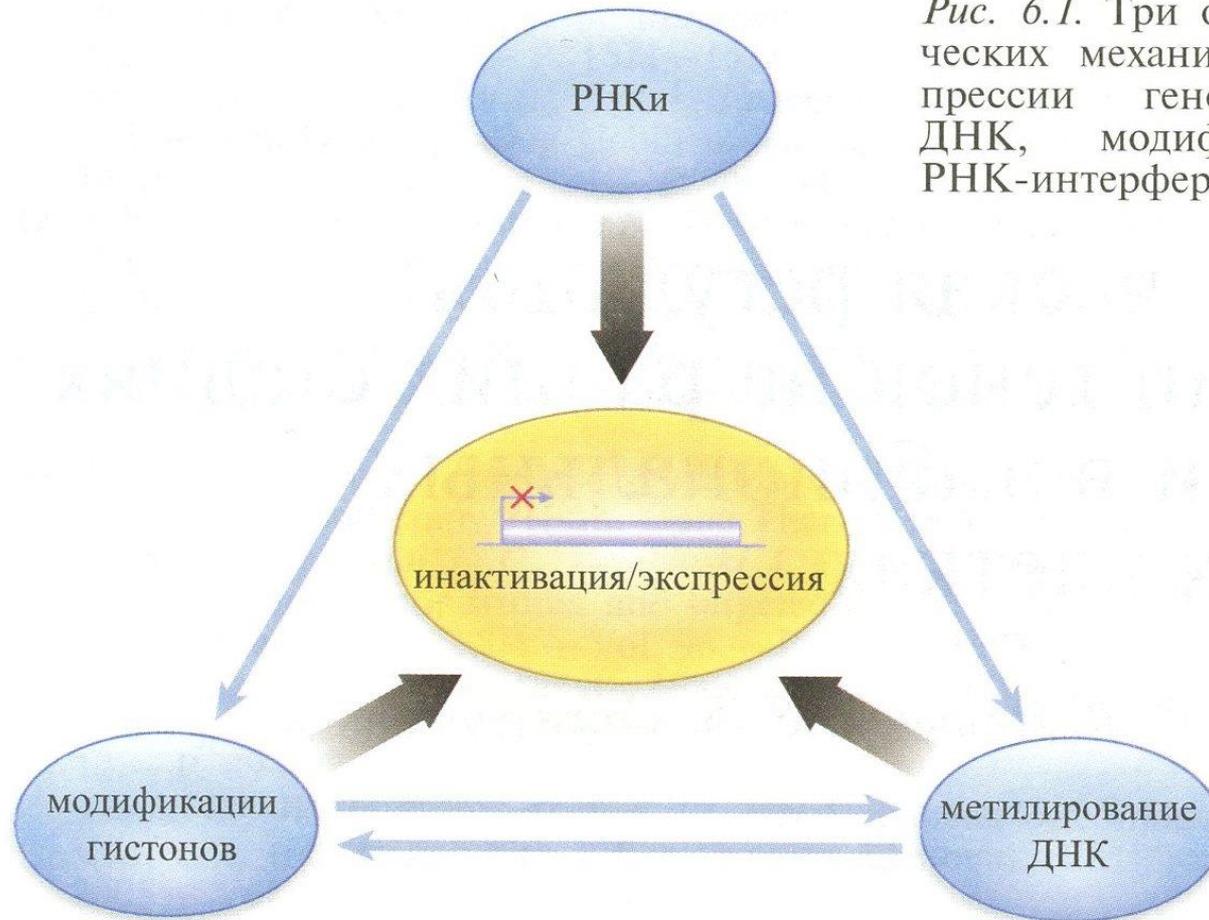
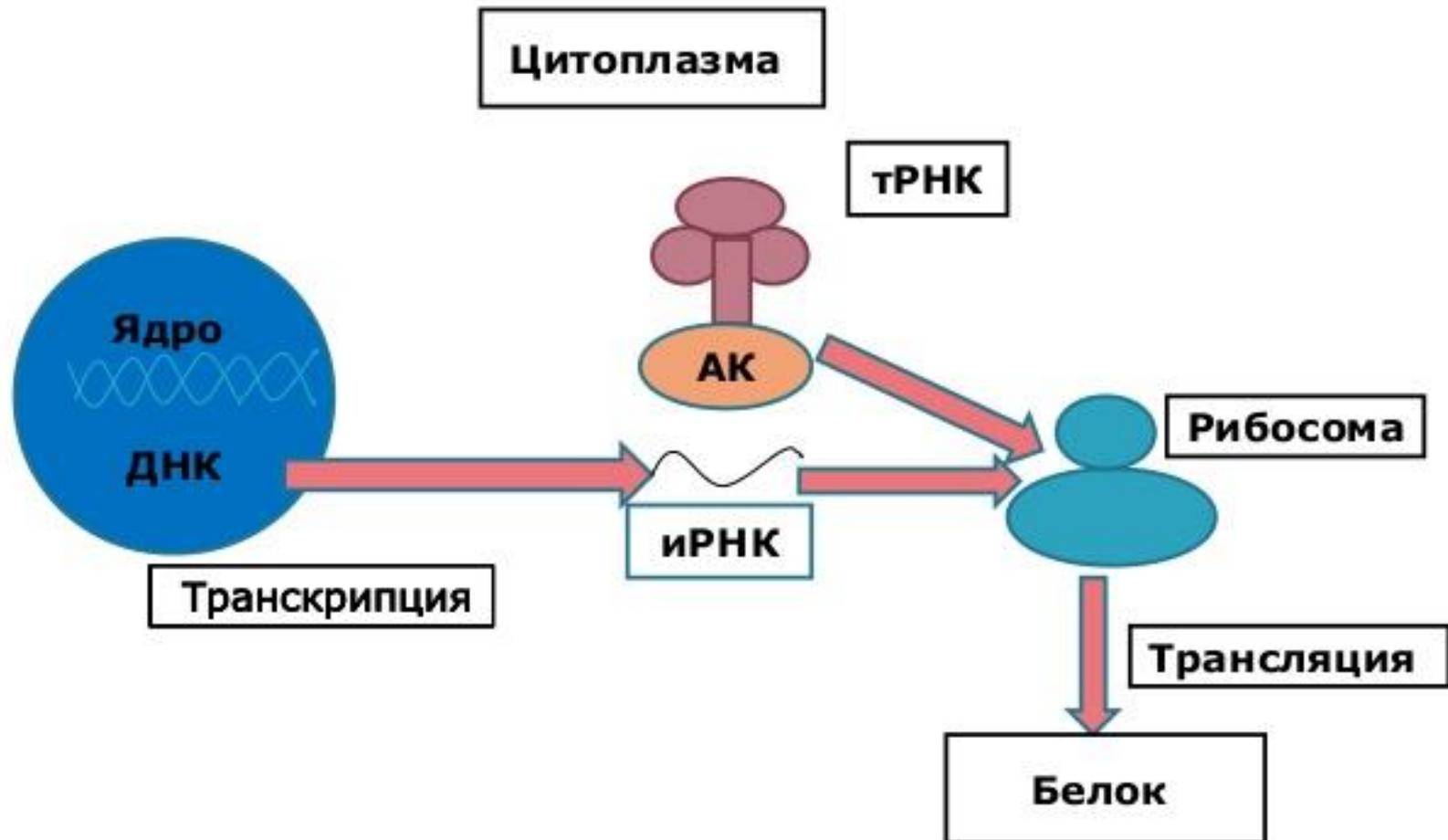
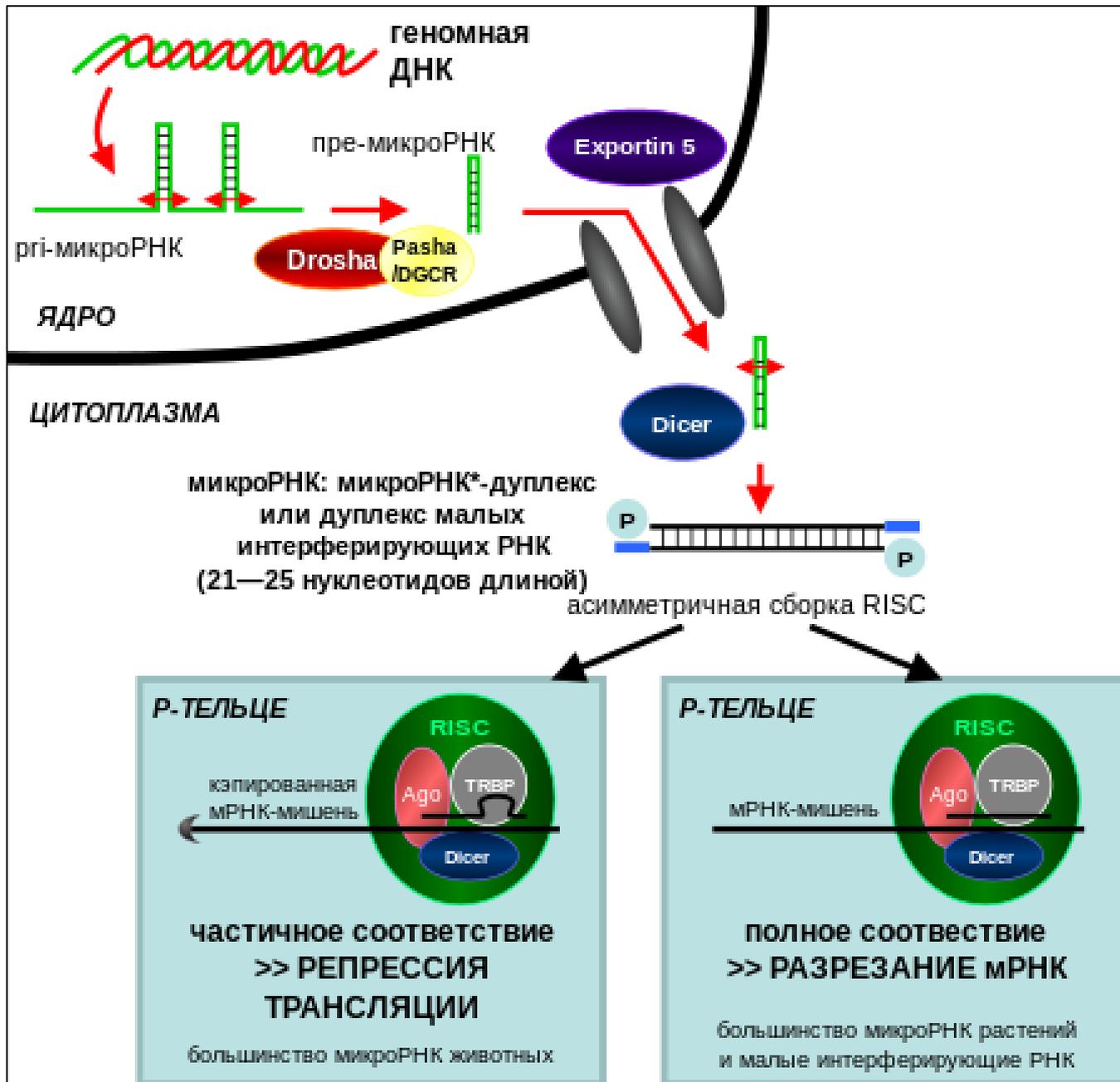


Рис. 6.1. Три основных эпигенетических механизма регуляции экспрессии генов: метилирование ДНК, модификация гистонов, РНК-интерференция.

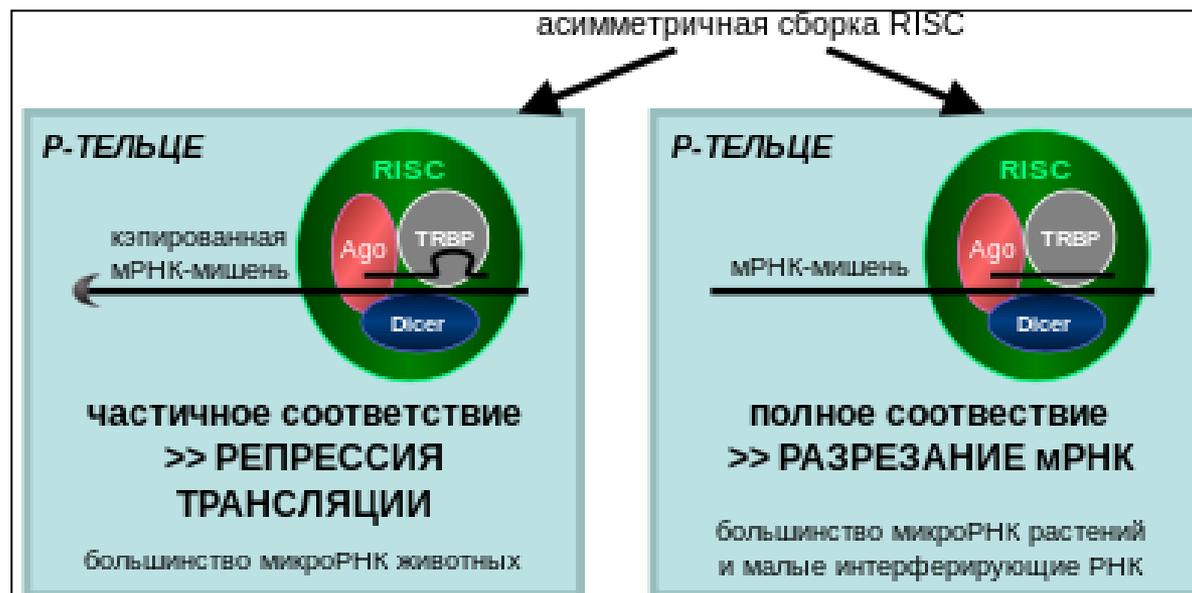
Схема синтеза белка





RNA-induced silencing complex или RISC — мультибелковый комплекс, в состав которого входит один из белков семейства [Argonaute](#) и [малые интерферирующие РНК](#) ([англ. siRNA](#)), предварительно подвергшиеся процессингу эндонуклеазой [Dicer](#). Dicer расщепляет предшественник siRNA, представляющий собой двуцепочечную молекулу РНК ([dsRNA](#)) на одноцепочечные фрагменты. Затем RISC образует комплекс с РНК-мишенью, что приводит либо к репрессии её трансляции в случае неполной комплементарности, либо к расщеплению её последовательности приблизительно в середине участка спаривания в случае полной или почти полной комплементарности.

Данный процесс имеет значение как в регуляции активности генов с помощью [microRNA](#), так и в защите от [вирусных](#) инфекций, так как вирусы часто используют двуцепочечные РНК как инфекционный вектор.



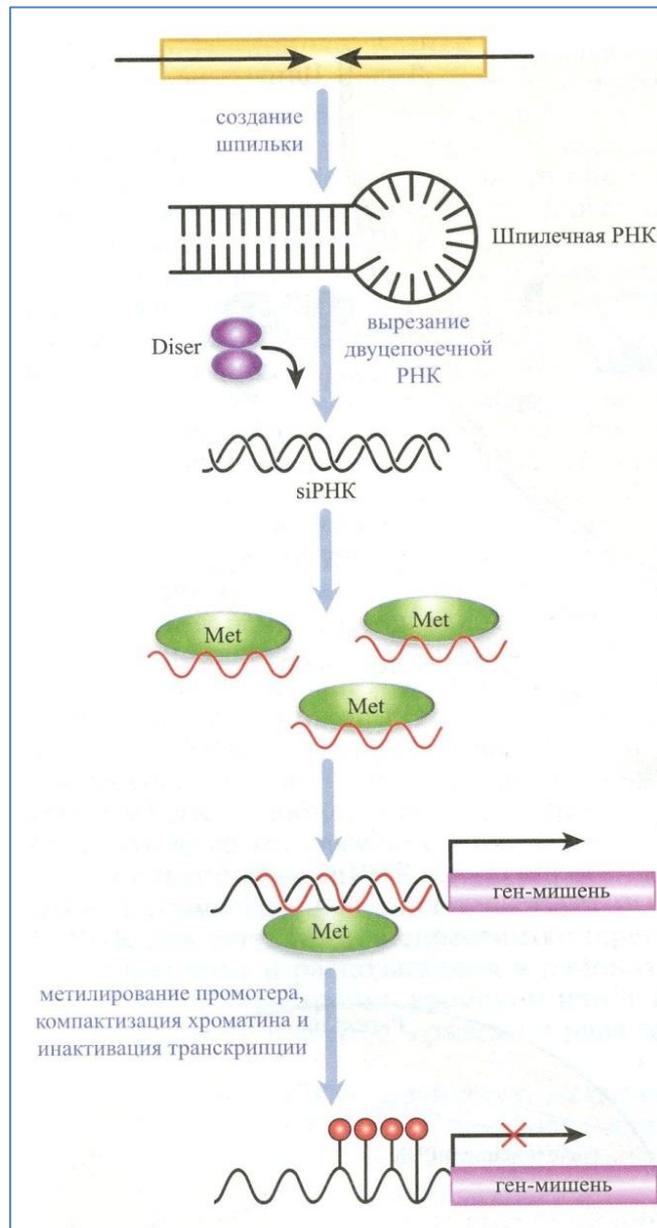


Рис. 6.13. Метилирование промоторных районов генов посредством siРНК.

Met — *de novo* метилтрансфераза, заштрихованные красным кружки — метилированные цитозины.

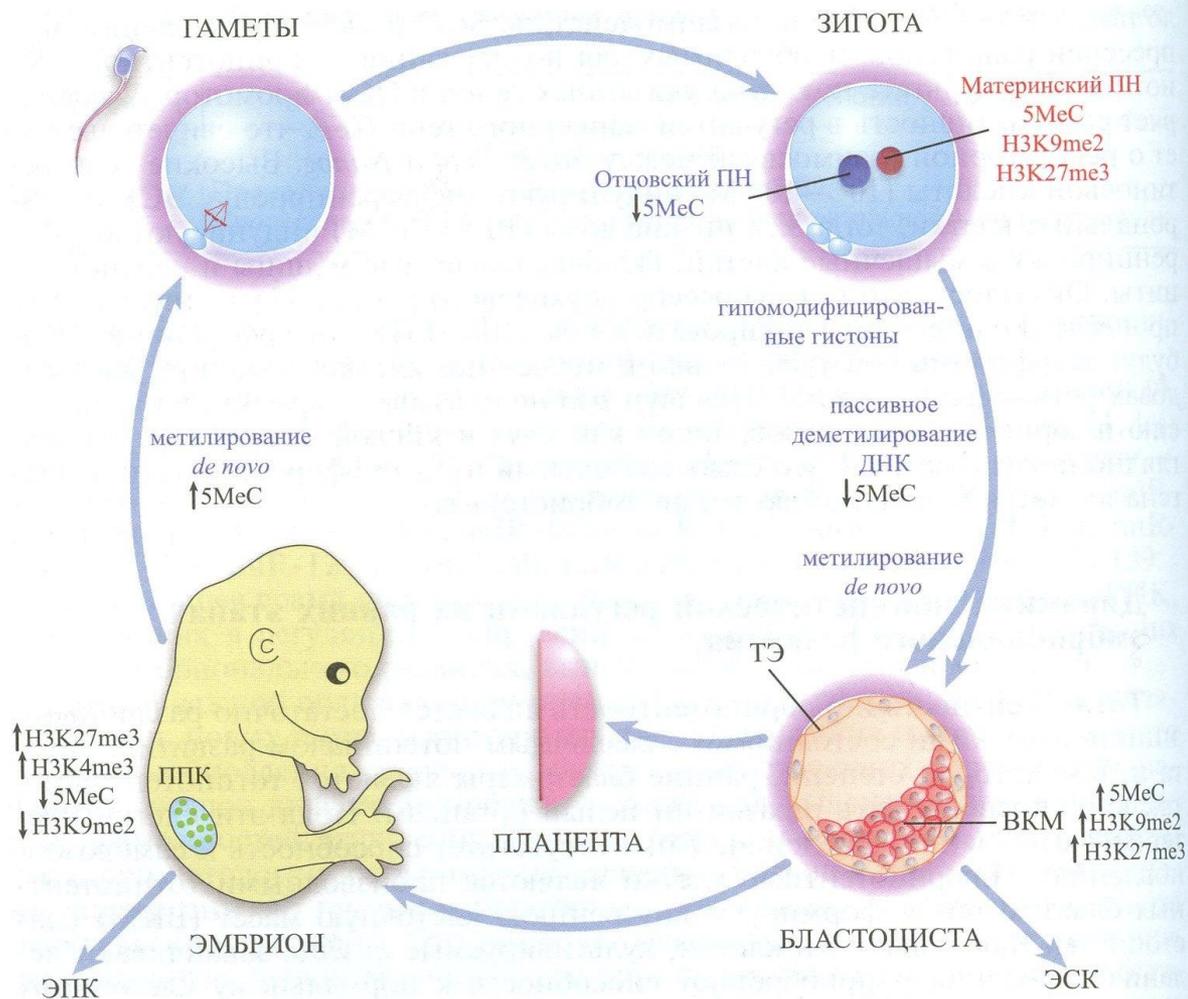


Рис. 6.14. Генетическая и эпигенетическая регуляция плюрипотентности на ранних этапах эмбрионального развития мыши.

ПН — пронуклеус; ВКМ — внутренняя клеточная масса; ТЭ — трофэктодерма; ЭСК — эмбриональные стволовые клетки; ЭПК — эмбриональные половые клетки; ППК — примордиальные половые клетки; 5MeC — метилирование цитозина; стрелка вверх — увеличение; стрелка вниз — снижение.