

Молекулярная генетика онтогенеза

Лекция 1

Существует мнение:

**Все, что сделано ранее и делается сегодня –
редукционистская биология.**

**Надо изучать биологические системы как единое
целое.**

**«Целое больше суммы всех его частей»
(Аристотель).**

Системная биология (systems biology) — междисциплинарная наука о жизни, изучающая сложные взаимодействия в живых системах, использующая подходы и методы, которые способны осуществлять одновременное детектирование многих характеристик.

Идея создания С.б. была представлена М. Месаровичем в 1966 г.

Иногда С.б. называют «интерактомикой».

Компьютерная модель полного жизненного цикла патогена *Mycoplasma genitalium* (2012 г.)

Идея: Если на базе огромного количества имеющейся информации создать модель, которая будет адекватно отражать действительность, она поможет предсказывать существование новых метаболических процессов и оценивать значимость планируемых экспериментов.

Для создания модели использовали данные из почти 1000 научных публикаций. Все расчеты производятся на кластере из 128 компьютеров, которые моделируют жизненный цикл клетки на молекулярном уровне, оперируя 1900 параметрами, включая взаимодействие 28 категорий молекул, таких как ДНК, РНК, белки, липиды, низкомолекулярные соединения и другие метаболиты.

U.S. Department of Energy выделил на эти работы 150 млн долларов на 10 лет (2008-2017).

Однако:

**Без достижений редукционистской биологии
невозможно создать «системную биологию».**

Нобелевские премии

2006 – Э. Файер и К. Мелло «за открытие РНК-интерференции — эффекта гашения активности генов».

2007 – М. Капеччи, М. Эванс и О. Смитис «за открытие метода внесения специфических изменений генов мышей с применением эмбриональных стволовых клеток».

2008 – О. Симомура, М. Чалфи и Р. Цянь «за открытие и разработку методов использования зеленого флуоресцентного белка».

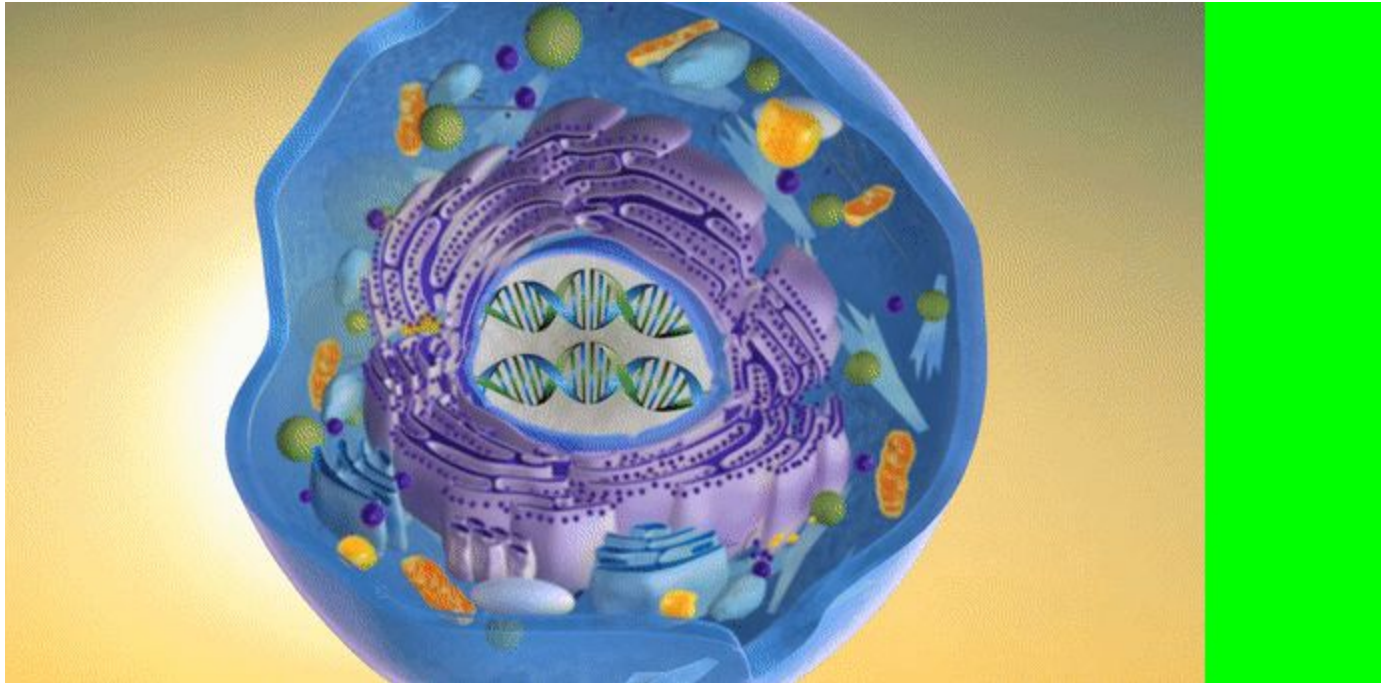
2010 – Р. Эдвард «за разработку технологии ЭКО».

2012 – С. Яманака и Дж. Гёрдон за работы по стволовым клеткам и клонированию животных.

2014 - Э. Бетциг, У. Мёрнер и С. Хелл «за создание метода флуоресцентной микроскопии высокого разрешения».

2015 – В. Кэмбелл, С. Омура и Ю.Ту «за разработку нового метода лечения паразитических заболеваний».

Нобелевская премия за 2017 год - (Внутриклеточные «часы»)



Утром белки-активаторы BMal1 и Clock переходят из цитоплазмы в ядро клетки и там прикрепляются к участку E-box на ДНК. При этом включаются в работу часовые гены *per* и *cry*. **Ночью** белки PER и CRY возвращаются в ядро и гасят активность белков BMal1 и Clock, образуя с ними прочный комплекс, что приводит к блокировке генов *per* и *cry*. Потом PER и CRY постепенно распадаются, высвобождаются молекулы BMal1 и Clock, чтобы начать новый суточный цикл.

Дж. Холл, М. Розбаш и М. Янг (США)

Генная инженерия *in vitro*

- Векторы (плазмиды, вирусы, фаги и др.)
- Ферменты (рестриктазы, лигазы, фосфатазы, ревертазы) (1967-1970 гг.)
- Клонирование генов (Г. Бойер, 1972 г.)
- Трансфекция генов (Грехем, Ван дер Еб, 1973 г.)
- Секвенирование ДНК (Ф. Сэнгер, В. Гилберт, 1975-1977 гг.)
- Саузерн-, Норзерн- и Вестерн-гибридизация (Э. Саузерн, 1985 г.)
- Экспрессии в *E. coli* искусственного гена (соматостатин, Г. Бойер, 1977 г.)
- PCR, RT-PCR (К. Муллис, 1983)
- Система CRISPR/Cas9 (2013 г.)
- Искусственная клетка (К. Вентер, 2010).

Предпосылки к переносу методов генной инженерии на системы *in vivo*

- культивирование соматических клеток животных *in vitro* (конец 50-х годов XX века, в России – Н.И. Шапиро),
- получение искусственных гетерокарионов, т.е. клеток содержащих два и более генетически различных ядра (Харрис, 1965),
- культивирование эмбрионов млекопитающих,
- пересадка эмбрионов, создание химерных организмов (А. Тарковский, 1961, Б. Минц, 1964).
- разработка методов переноса генов в эукариотические соматические клетки в культуре ,
- перенос генетического материала в половые клетки и эмбрионы млекопитающих (Яниш, 1976; Гордон, 1980)

Селективная среда ГАТ (НАТ) (гипоксантин, аминоптерин и тимидин)

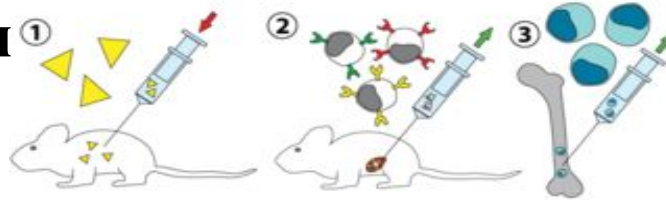
- 1) Основной путь синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований блокируется аналогом нуклеотидов – **аминоптерин**ом.
- 2) Для запасного пути синтеза необходимы два предшественника: **гипоксантин** и **тимидин**, которые фосфорилируются двумя ключевыми ферментами – **гипоксантин-фосфорибозилтрансферазой (ГФРТ)** и **тимидинкиназой (ТК)**.
- 3) На среде ГАТ клетки, мутантные по ГФРТ или ТК, погибают.

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ

(Д. Келер и Ц. Милштейн, 1984)

2) выделение В-лимфоцитов

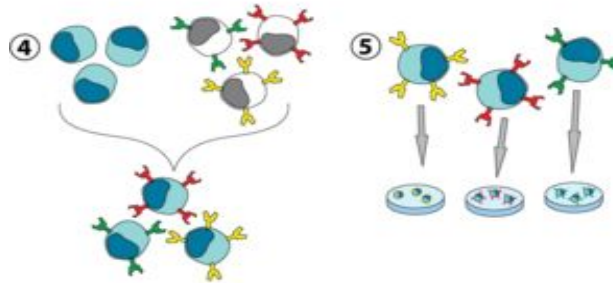
1) иммунизация



3) клетки миеломы

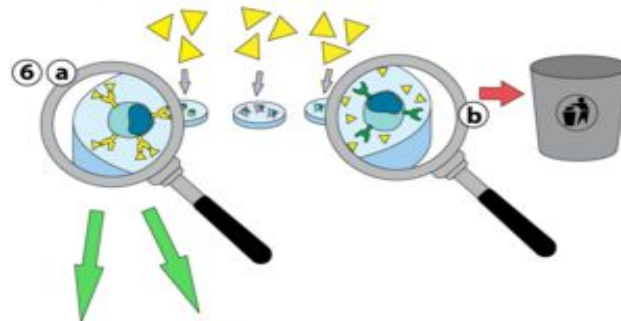
ГФРТ-

4) слияние

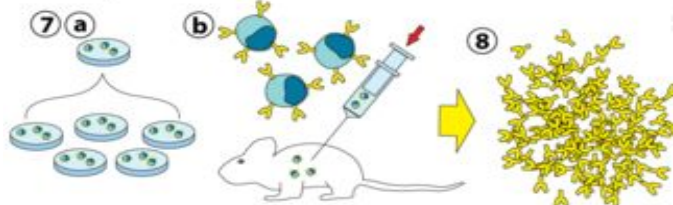


5) сегрегация

6) Селекция
(среда
ГАТ)

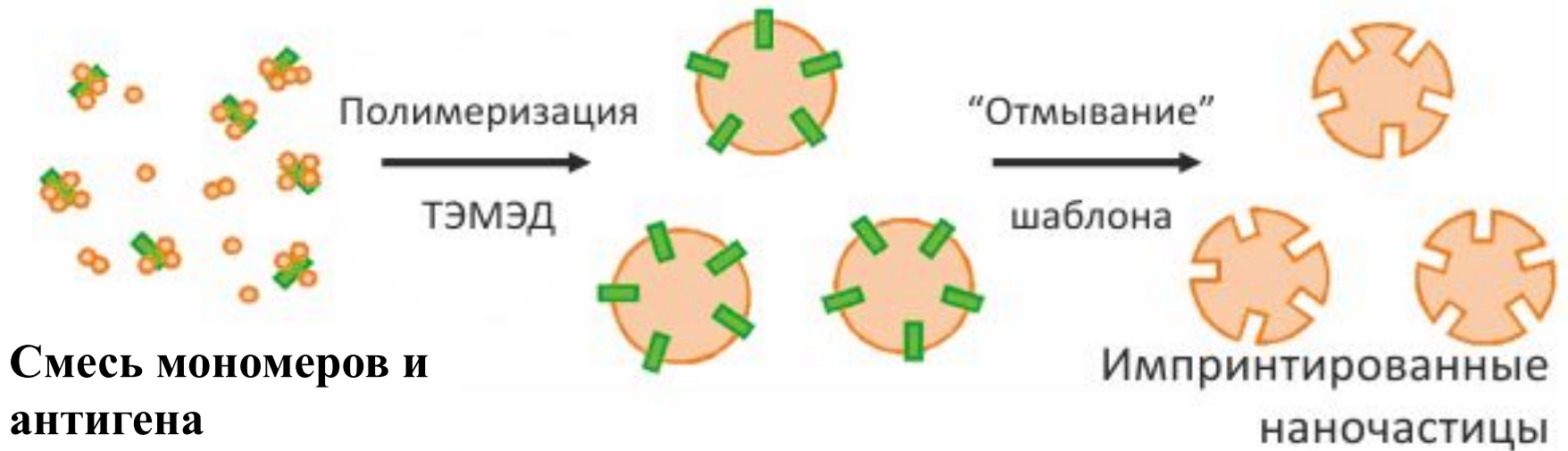


7) размножение



Моноклональные
антитела

Пластмассовые антитела?



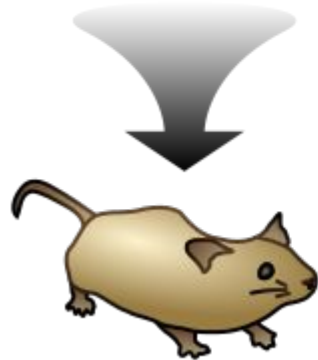
Трансдукция (transduction) [лат. *transductio* — перемещение] — перенос ДНК (генов) из одной бактериальной клетки в другую, осуществляемый умеренными или вирулентными бактериофагами, который приводит к изменению наследственных свойств клетки-реципиента. Явление Т. было открыто Д. Ледербергом и Н. Циндером в 1952 г.

Трансформация (transformation) [лат. *transformatio* — превращение] — 1) преобразование генотипа бактериальной клетки в результате включения в хромосому или плазмиду бактерии чужеродной ДНК. При этом клетка может приобрести и устойчиво передавать своим потомкам признак, ранее у нее отсутствующий. Впервые была открыта в 1928 г. Ф. Гриффитом.

2) Злокачественное перерождение эукариотических клеток, происходящее под воздействием различных факторов окружающей среды (онкогенные вирусы, канцерогены и др.) (**Онкотрансформация**).

Эксперименты с пневмококками Гриффита (1928 г.) и Эвери, Маклауда и Маккарти (1944 г.)

Невирулентная
R-форма



mouse lives

Вирулентная
S-форма



mouse dies

Инактивированная
S-форма



mouse lives

Смесь R-формы и
инактивированной
S-формы



mouse dies

Трансфекция (transfection) [лат. *trans* — сквозь, через, за и *inficere* — портить, заражать] — 1) в генетике бактерий — процесс введения в бактериальные клетки молекул фаговой ДНК с образованием полноценного вируса; 2) в генетике соматических клеток — процесс искусственного переноса генетической информации в эукариотические клетки с помощью чужеродной очищенной ДНК с использованием разнообразных приемов.

Трансгенез (transgenesis) [лат. *trans(ferre)* — переносить и греч. *gen(os)* — род, происхождение] — искусственный перенос чужеродных генов в зародышевые клетки животных (зиготы, сперматозоиды, эмбриональные стволовые клетки или ранние эмбрионы) или недифференцированные клетки растений (протопласты) с последующим получением из них нового организма (трансгенный организм), у которого эти экзогенные фрагменты ДНК присутствуют в составе генома всех типов клеток и передаются по наследству.

Искусственный перенос генов в целые организмы и клетки (трансфекция) – начальный этап

Бенуа (1957 г.) – утки

Б. Астауров (1958-1959 гг.) – тутовый шелкопряд

Гершензон (1958-1960 гг.) – дрозofiла (мутагенный эффект ДНК)

Майорка (1958 г.) – изолированная ДНК вируса полиомы и культура мутантных фибробластов

Шибальские (1965 г.) – мутантные фибробласты человека

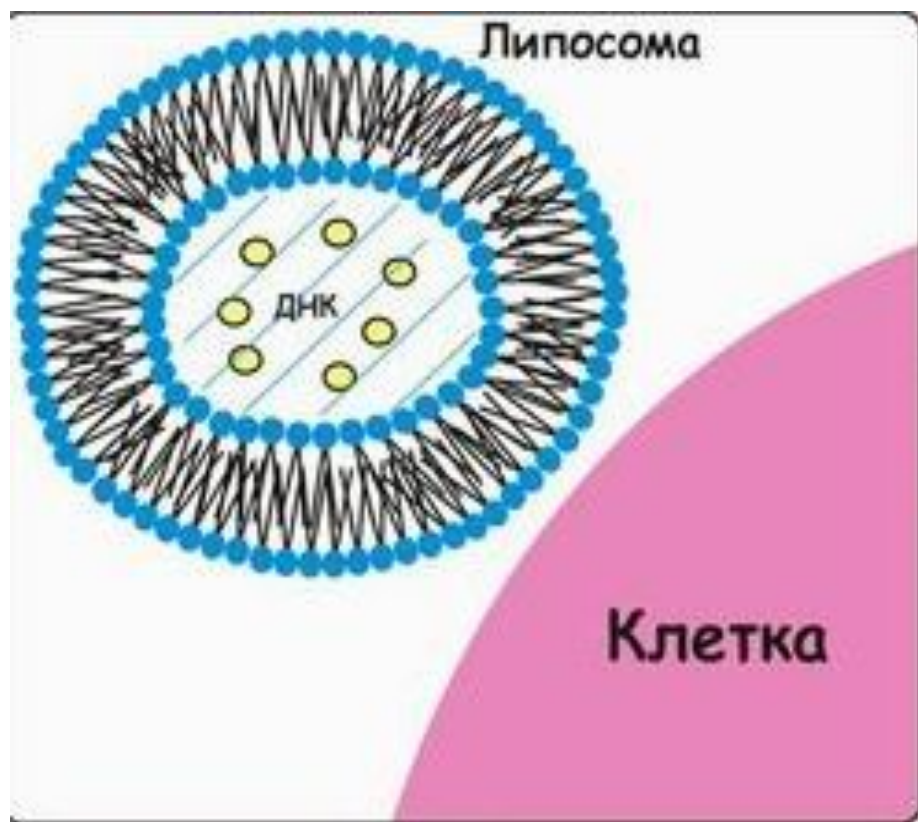
Мак-Брайд и Озер (1973 г.) – мутантные фибробласты мыши и хромосомы китайского хомячка.

Виглер (1979 г.) - котрансфекция

Методы, используемые для трансфекции эукариотических клеток

- **Кальций-фосфатный метод (Грехем, Ван дер Еб, 1973)**
- **Декстрановый метод**
- **ДМСО-метод**
- **Липосомный метод**
- **Липофектиновый метод**
- **Метод вирусных капсид**
- **Электропорация**
- **Бомбардирование частицами металлов**
- **Микроинъекции в ядра клеток**
- **Оптотрансфекция (2002)**
- **Импалефекция (МакНайт и др., 2004)**

Липофекция



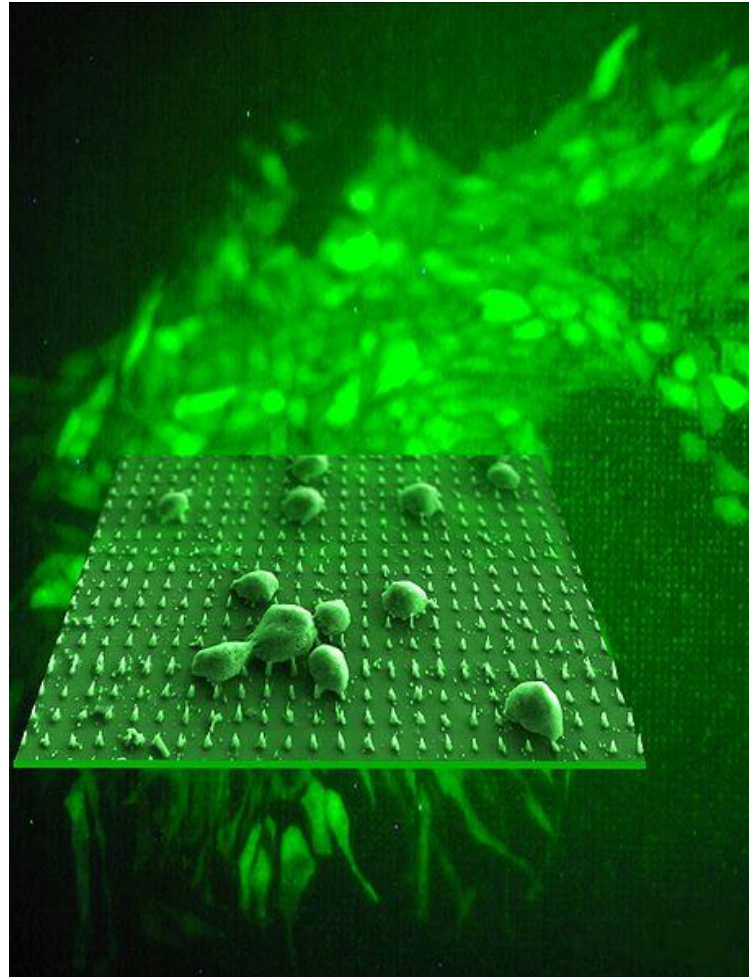
Электропорация



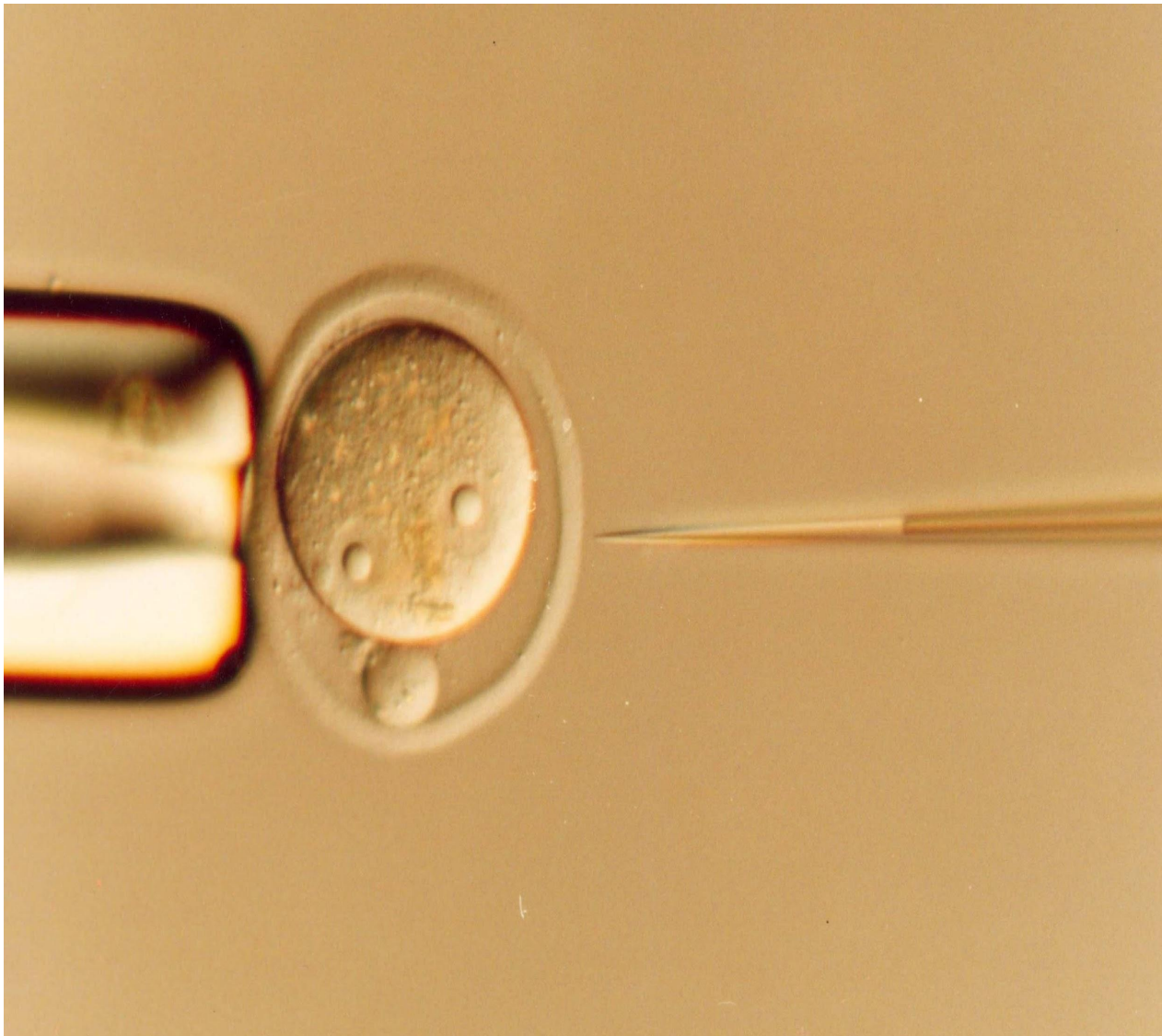
Баллистическая трансфекция клеток



Импалефекция – метод доставки генов с применением наноматериалов (углеродные нанотрубки и нановолокна).



Микроинъекция

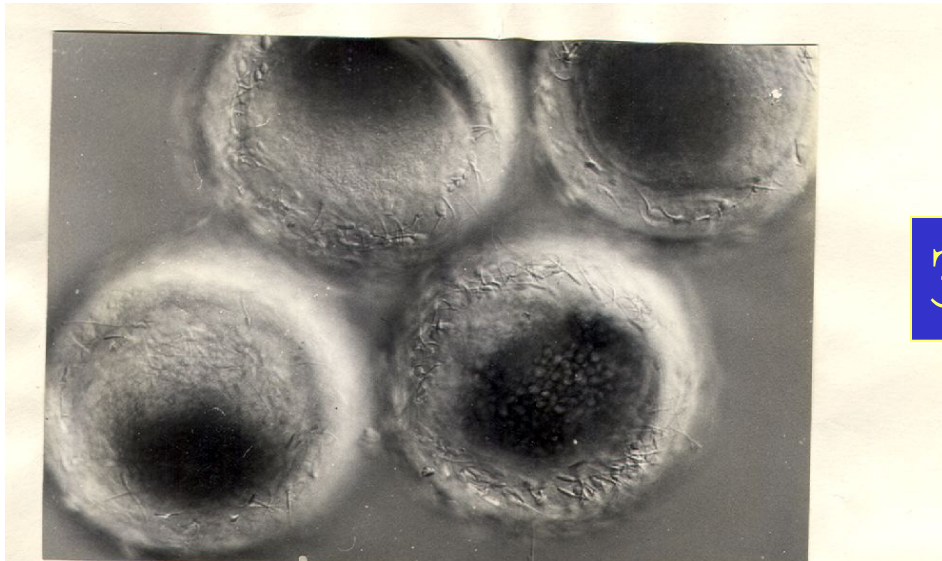


Перенос ранних зародышей от донора реципиенту

- **1890 г. – Уолтор Хип – первый успешный перенос ранних зародышей кролика**
- **1950 – Ченг – разработал эту процедуру для кроликов**
- **1956 – Мак Ларен – разработала процедуру переноса зародышей для мышей**

Культивирование эмбрионов *in vitro*

- **1958** – Мак Ларен и Бриггс – культивирование эмбрионов мыши со стадии 8 бластомеров до бластоцисты.
- **1965** – Бринстер – культивирование эмбрионов мыши от 2-х клеточной стадии до бластоцисты.

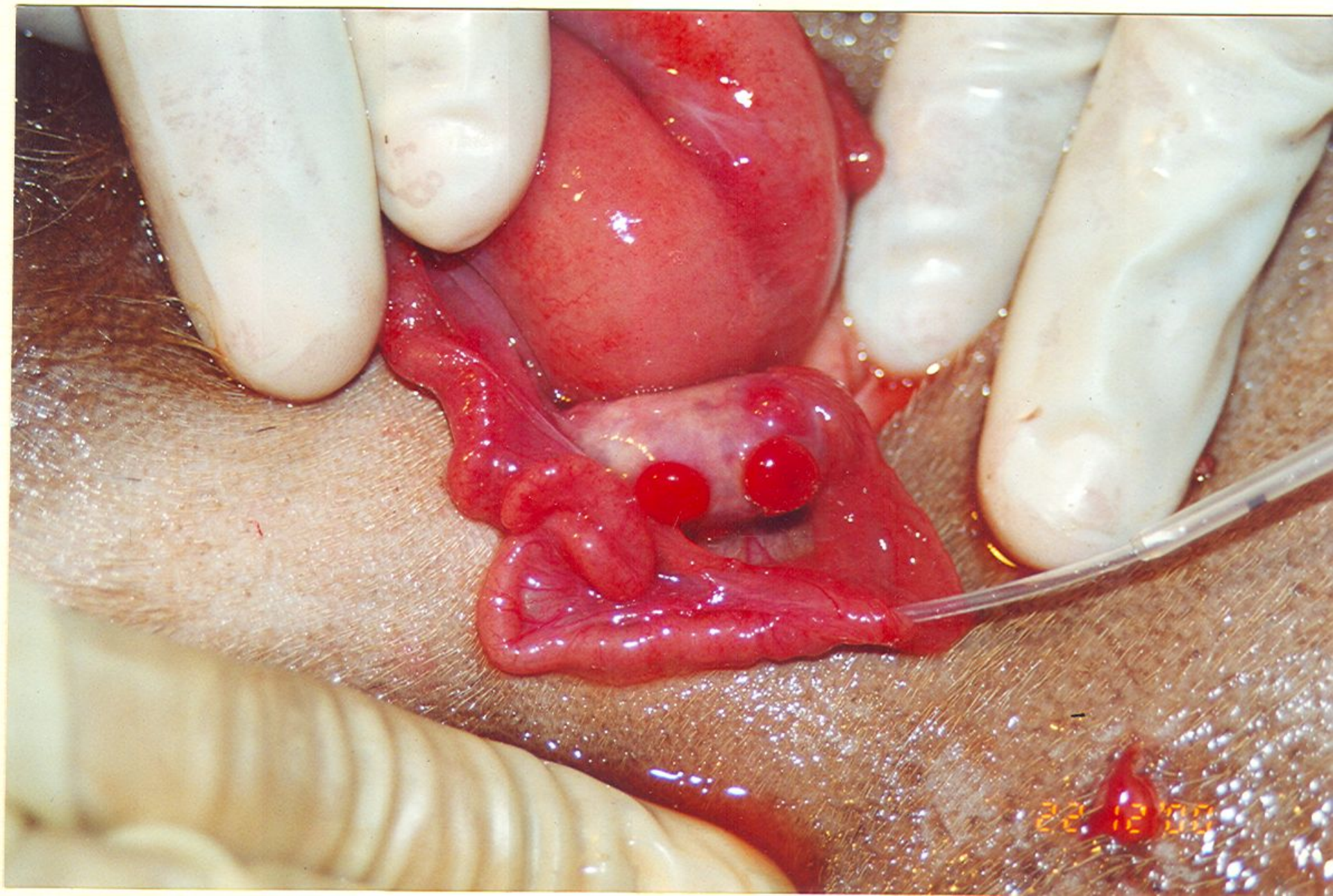


Зигота свиньи



Зигота человека

Перенос эмбрионов в воронку яйцевода свињи



Общая схема манипулирования с эмбрионами (на примере коровы)

1-й день – выделение яйцеклеток из фолликулов яичников шприцом с иглой (в каждом яичнике от 10 и более фолликулов). Созревание ооцитов (до утра) в среде с добавлением гормонов.

2-й день - отмывка сперматозоидов в градиенте Перколла (жизнеспособные при центрифугировании опускаются на дно), оплодотворение ооцитов в другой среде. По 10 штук в капле – 100 мкл (под минеральным маслом).

3-й день – утро – встряхивание в пробирке яйцеклеток на вортексе для освобождения от фолликулярных клеток, перенос в чистую среду (по несколько штук на каплю).

9-10-й день (это **6-7-й** день после оплодотворения) – дробление, морула, бластоциста. **Теперь возможны манипуляции с эмбрионами** (микроинъекция генов, разделение на части, перенос ядер, получение эмбриональных стволовых клеток, химер и т.д.) – на всех стадиях культивирования *in vitro*. Бластацисты вводят без наркоза в шейку матки.

Химера (chimera, chimaera) [греч. *Chimaira* — мифическое чудовище, имеющее голову льва, туловище козы и хвост дракона] — организм, состоящий из генетически неоднородных органов, тканей или клеток, которые происходят более, чем от одной оплодотворенной яйцеклетки. Термин «химера» применим к животному, полученному путем искусственного слияния эмбриональных клеток двух или более организмов, или к растению, у которого после прививки в месте срастания закладываются почки, в которых часть тканей принадлежит привою, а часть подвою. Впервые термин применил Г. Винклер (1907 г.) для форм растений, полученных в результате сращивания паслёна и томата.

Мозаик (mosaics) [франц. *mosaïque* — мозаика, пестрая смесь] — индивидум, возникший из единичной оплодотворенной яйцеклетки, от слияния одного яйца с одним сперматозоидом, но состоящий из клеток более чем одного генотипа. У мозаика генетически различные популяции возникают в ходе развития в результате таких процессов как соматические мутации, соматические рекомбинации, нерасхождение хромосом (спонтанное или индуцированное).

Виды химеризма

Первичный химеризм:

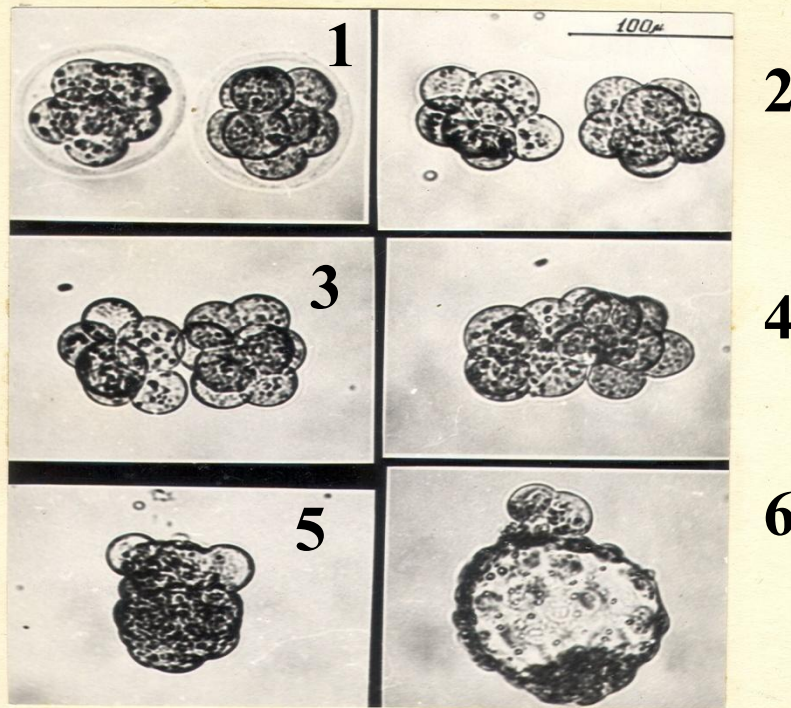
- искусственная комбинация клеток зародышей предимплантационных стадий,
- спонтанное оплодотворение сперматозоидами яйцеклетки и полярного тельца.

Вторичный химеризм:

- трансплантация органов,
- радиационные химеры,
- перенос клеток между матерью и плодом (фримартины).

Микрохимеризм:

- циркуляция клеток в крови матери и ребенка общих клеток

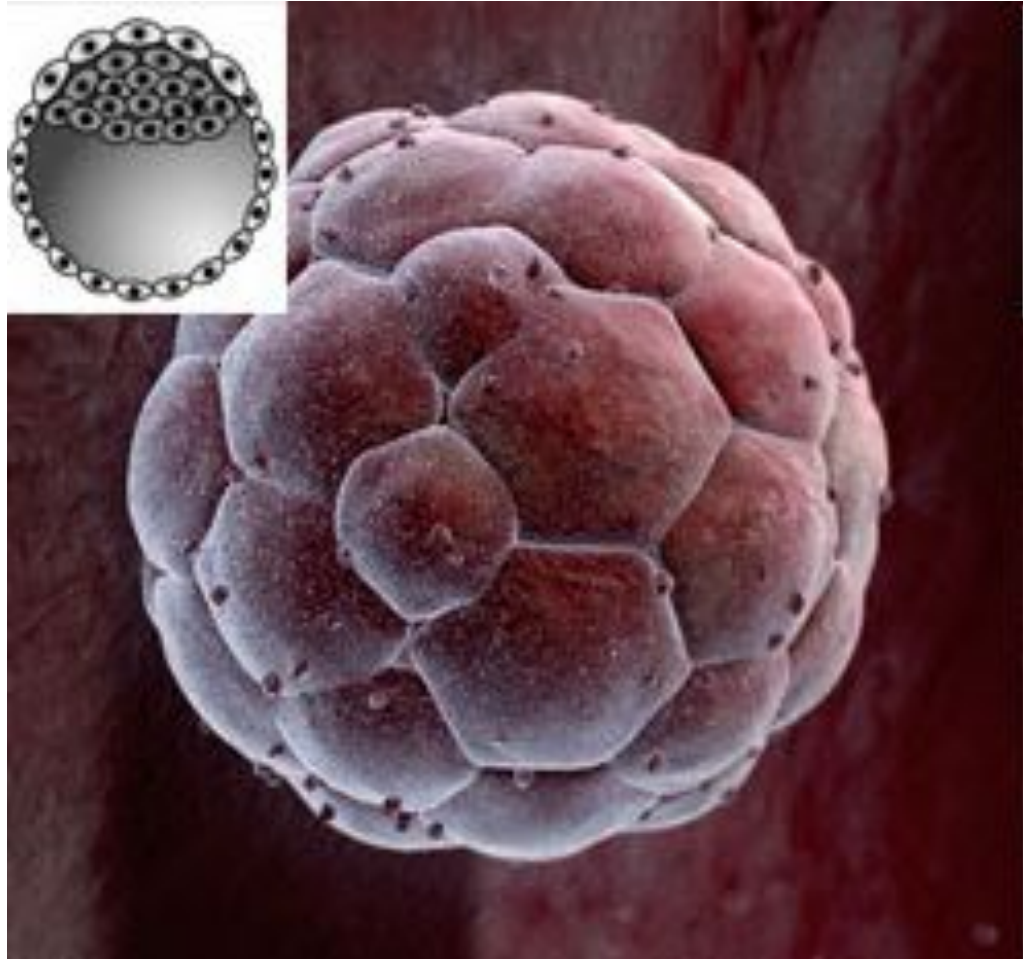


Агрегационные химеры

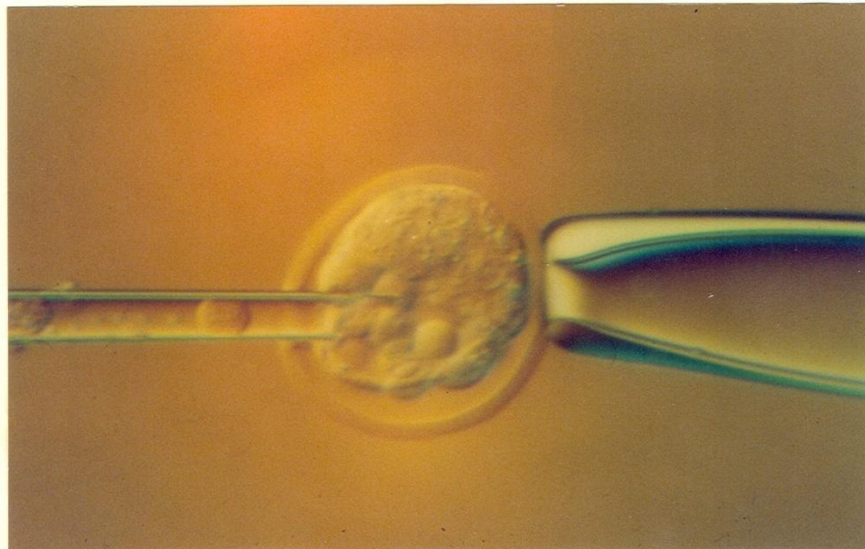
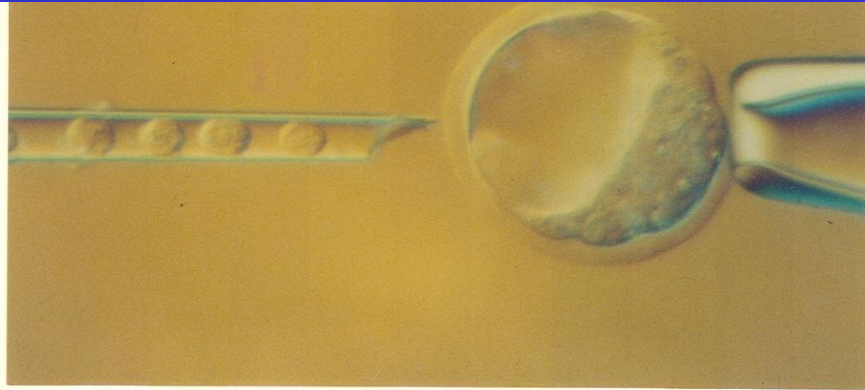
А. Тарковский, 1961,
Б. Минц, 1962

Ограничение: от 2-х клеточных до 28-ми клеточных зародышей.

Вид бластоцисты под электронным микроскопом



Инъекционные химеры (Гарднер, 1968)



Преимущество: возможно формирование химер из разных видов организмов



Овцекоза (1984 г.)

Fehilly, C. B. et al.



Химерные макаки как результат агрегации бластомеров

(Ш. Миталипов и др., 2012 г.)

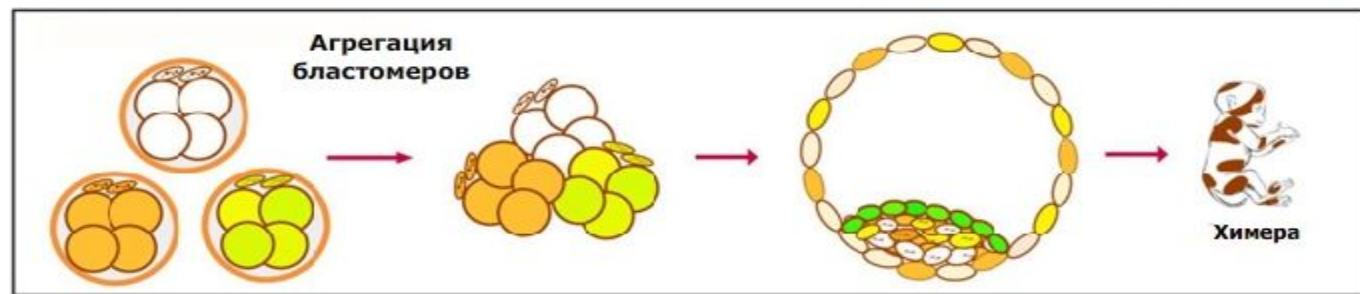
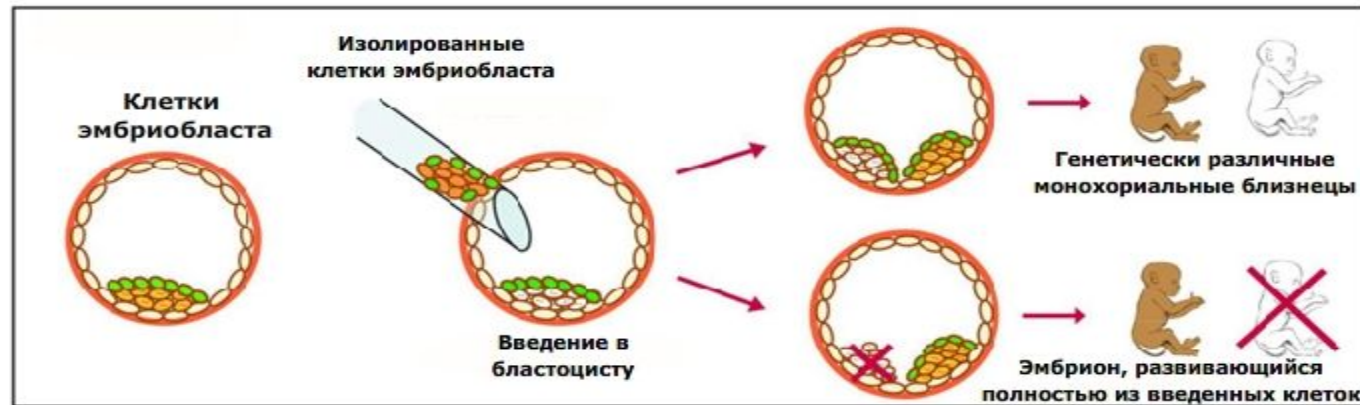
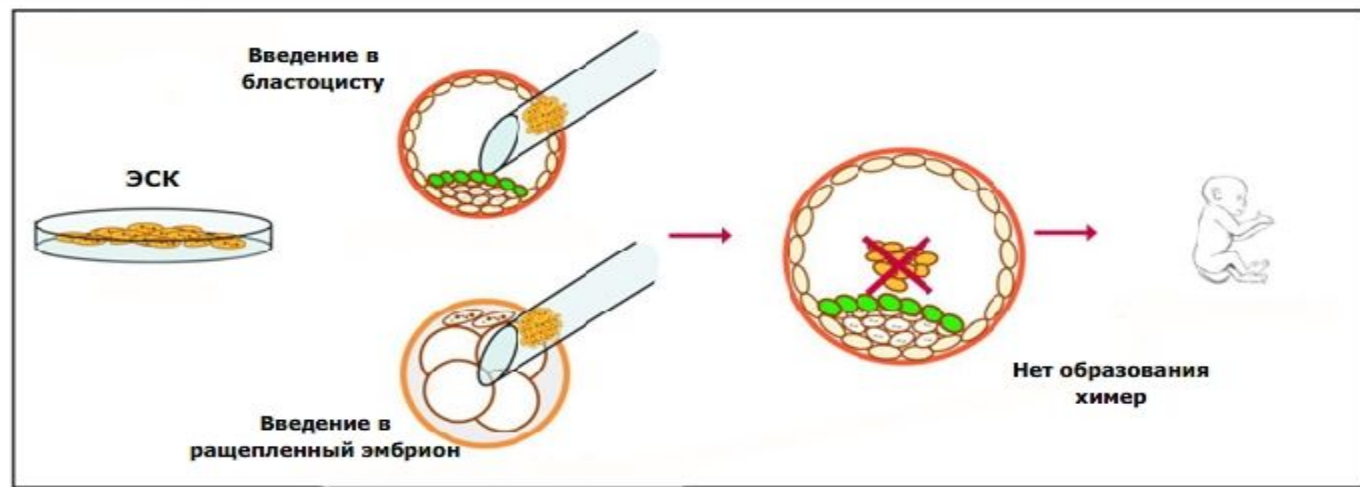


Roku

Hex

Chimero

Потомки 12-ти родителей

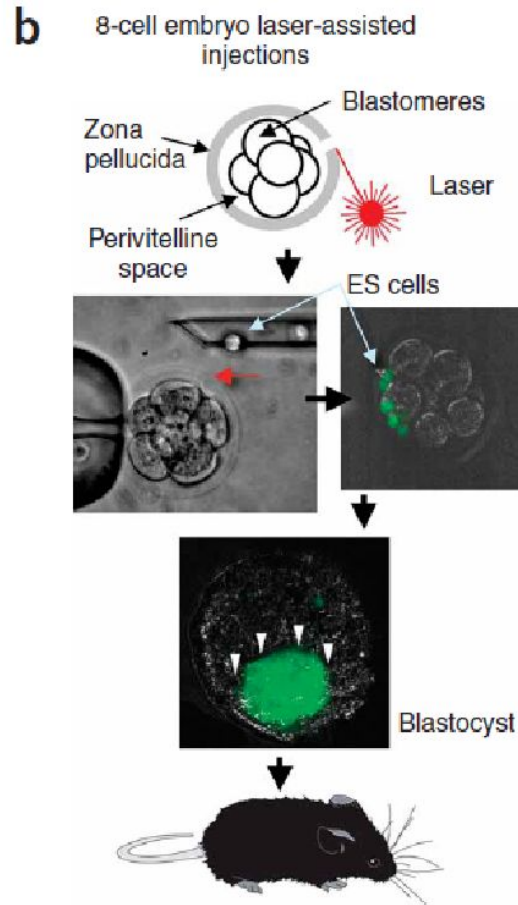
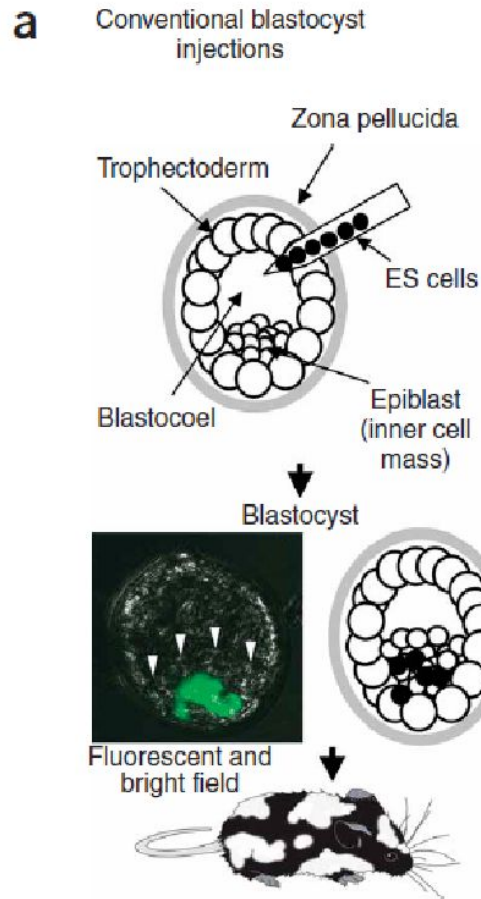


ВЫВОДЫ: ЭСК и ВКМ у приматов не могут образовывать химеры; это способны делать 3-6 делящихся эмбрионов

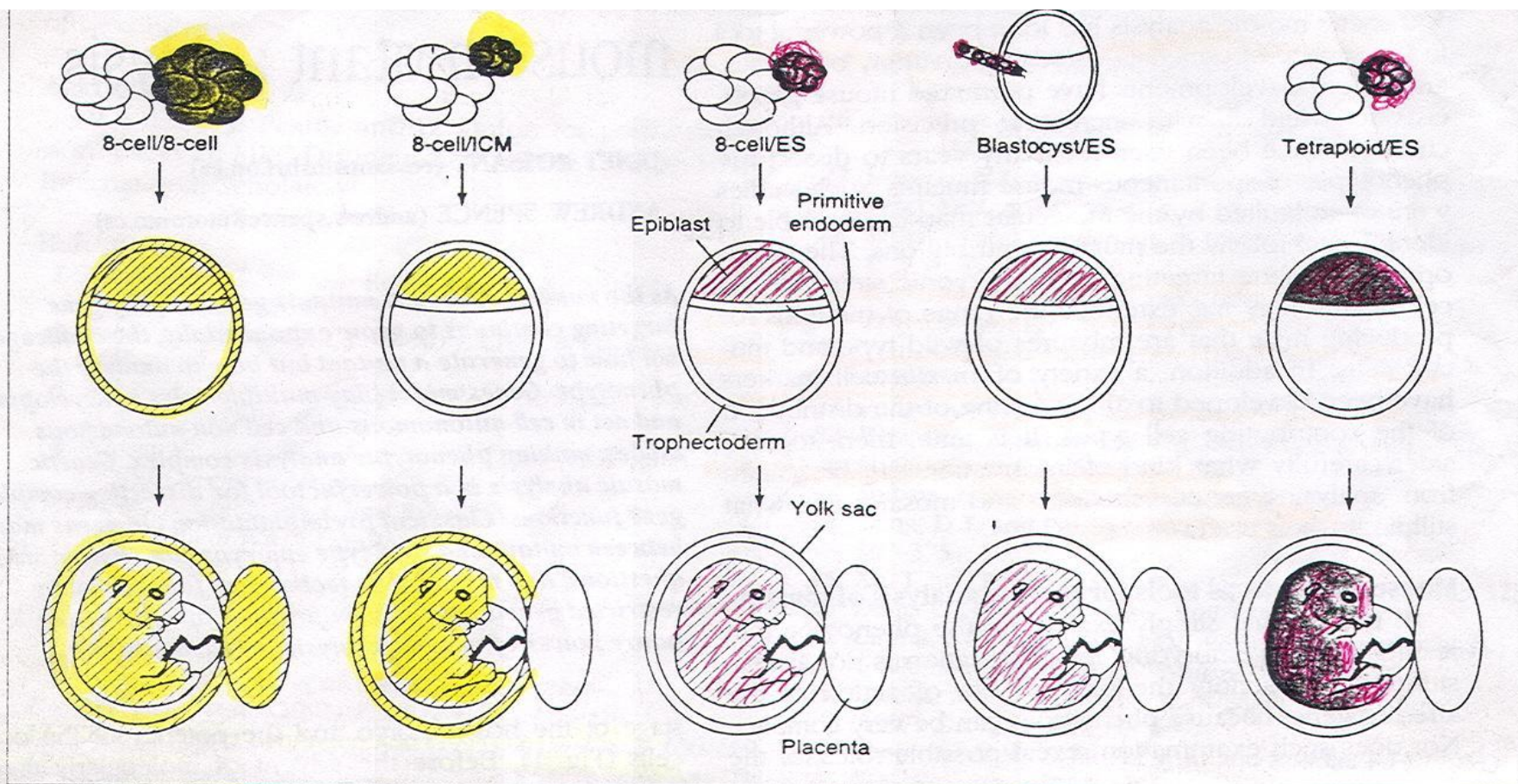
Главный вывод:

**Культиvированные *in vitro* эмбриональные
стволовые клетки не обладают полностью
свойствами стволовых клеток, существующих
в эмбрионах**

Новый вариант получения химер - оптотрансфекция



Распределение тканей в различных типах химер



Что можно выяснять с помощью метода создания химер?

Используя две клеточные популяции, можно проследить в онтогенезе за:

- происхождением и судьбой разных тканей;
- родословными клеток.

(Экспериментальная эмбриология)

- сотрудничеством и взаимодействием между собой генетически различных клеток при создании взрослого организма;
- роль внеядерной наследственности в развитии.

(Генетика развития).

- функционированием отдельных генов.

(Молекулярная генетика)

Примеры использования химер для решения проблем онтогенеза

- Тарковский: наличие в зачатке гонады клеток мужского пола предотвращают развитие овариальной ткани из клеток женского пола.**
- Многоядерные клетки – результат слияния одноядерных.**

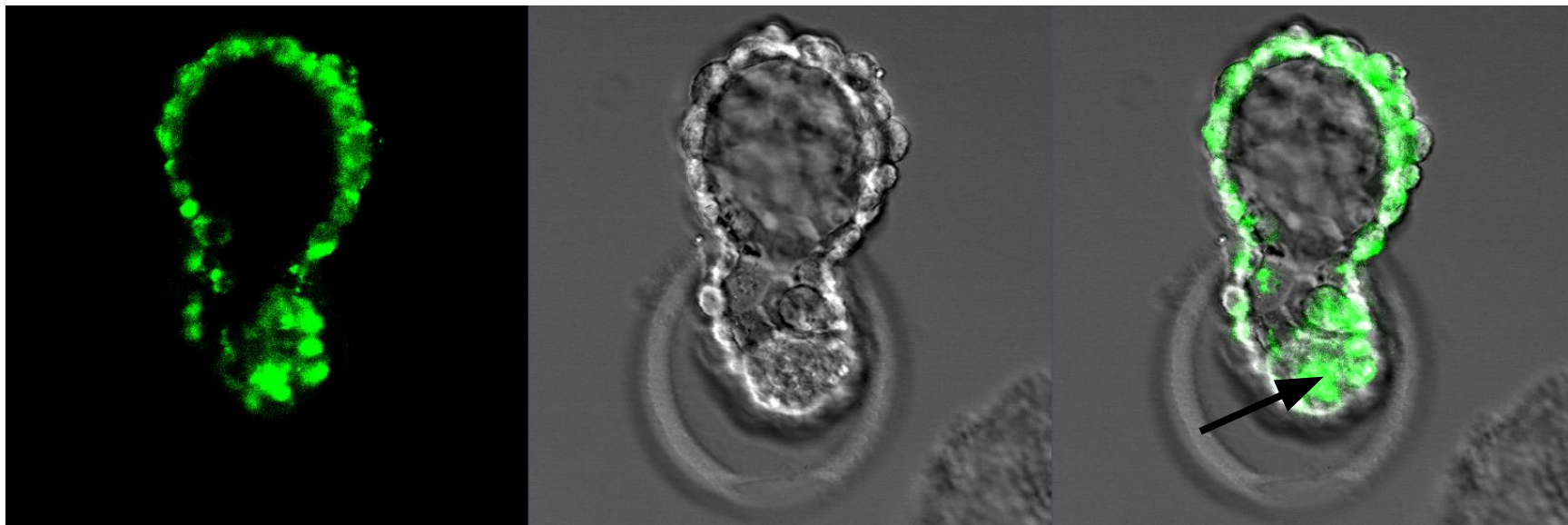
Стволовые клетки

Тотипотентность (totipotency) [лат. *totus* — весь, целый и *potentia* — сила] — способность клетки дифференцироваться в любой тип клеток организма, включая экстраэмбриональные (напр., зигота, клетки внутренней клеточной массы бластоцисты). При определенных условиях тотипотентная клетка способна дать начало созданию целого организма.

Плюрипотентность (pluripotency) [лат. *plures* — многие и *potentia* — сила, мощь] — способность клетки дифференцироваться во множество специализированных типов клеток, включая герминальную линию.

Мультипотентность (multipotency) [лат. *multum* — много и *potentia* — сила, мощь] — способность клетки дифференцироваться в разные типы зрелых клеток одного вида ткани; напр., обладающие мультипотентностью нервные стволовые клетки способны производить в организме три типа клеток: нейроны, астроциты и олигодендроциты.

- **Плюри- или тотипотентны эмбриональные стволовые клетки?**

А**Б****В**

А) Флуоресцирующие ЭСК клетки, включившиеся в трофобласт и ВМК после инъекции в морулу (оптотрансфекция); **Б)** та же бластоциста на просвет; **В)** наложение фотографий **(А)** и **(Б)** (стрелкой указано место локализации ВМК)