|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Vārds, Uzvārds** | **Lilite Sadovska** | **Variants** | **1** |
| **Stud.apl.numurs**  | **Ls09364** | **Datums** | **10.05.2013** |

**1.Raksturojot transgēno peļu iegūšanu ar olšūnas mikroinjekcijas metodi, lūdzu, paskaidrojiet,**

1. kā iegūst izolētu apaugļotu olšūnu, kurā injicēt svešo DNS ?

Apaugļotu olšūnu var iegūt ar divām metodēm.

Pirmo metodi plaši izmanto tieši transgēnu peļu iegūšanai. Pēc mikroinjekcijas no peles izņem nesen apaugļotus vienšūnas embrijus. Šim nolūkam izmanto mikromanipulatorus un īpaši aprīkotu mikroskopu. Ar speciālu pipeti un vakuuma palīdzību embriju fiksē, un tās pronukleusā ar kapilāru adatu ievada klonējamo DNS. Pēc tam embrijus pārnes aizvietotājmātēs, kuras tos iznēsā. 1 – 4 % no injicētajiem embrijiem dod transgēnus pēcnācējus.

Otrajā metodē no blastocista (dažas dienas pēc apaugļošanas) iegūst embrionālās cilmes šūnas. Tās var audzēt neierobežoti ilgi laboratorijā un tās nezaudē spēju augt un diferencēties par jebkuru dzīvnieka audu tipu, veidot veselu jaunu dzīvnieku. Embrionālās cilmes šūnas *in vitro* transformē ar svešajiem gēniem un ar mikroinjekciju ievada citā blastocistā. Aizstājējmātes iznēsā dzīvniekus, kurus veido divu dažādu tipu šūnas, transgēnās un parastās. Ja transgēnās embrionālās cilmes šūnas ir veidojušas dzīvnieku spermatozoīdu vai olšūnu priekštečus – šādu dzīvnieku pēcteči visi būs transgēni.

1. kādā DNS forma tiek izmantota transfekcijai ?

Vārds transfekcija ir veidots no diviem vārdiem *trans-*  un *infekcija*. Tranficēt var ģenētisko materiālu (piemēram, superspiralizētas plazmīdas DNS var siRNS konstrukti) vai pat proteīnus (piemēram, antivielas). Dzīvnieka šūnu transfekcijai parasti tiek atvērtas pagaidu poras jeb „caurumiņi”, pa kurām materiāls tiek uzņemts šūnās. To veic ar kalcija fosfātu, elektroporāciju, vai samaisot katjoniskus lipīdus ar vajadzīgo materiālu, veidojot liposomas, kas var savienoties ar šūnas membrānu un tādējādi nokļūt šūnas iekšienē. Tomēr transfekcija var rezultēt ar negaidītu mērķšūnu morfoloģiju vai pat abnormalitātēm.

1. kas ir vīrišķais pronukleuss ?

Tas ir haploīds kodols (ar vienu hromosomu komplektu), kas olšūnā nonāk no vīrišķās dzimumšūnas – spermatozoīda. Tātad olšūnā tieši pēc apaugļošanas ir divi pronukleusi, kas katrs nāk no viena no vecākiem un katrs nes vienu hromosomu komplektu. Drīz pēc apaugļošanās pronukleusi saplūst.

1. kāpēc ieteicams ievadīt svešo DNS vīrišķajā pronukleusā ?

Tāpēc, ka ja ievada vīrišķajā pronukleusā, tad ir lielāka iespēja, ka nepieciešamais gēns tiks ekspresēts pēcnācējos. Kā arī tāpēc, ka tieši vīrišķā pronukleusa apvalks ir tas, kurš izšķīst, bet sievišķā tiek saglabāts, un tātad tam ir vieglāk veikt injekcijas kā arī tas nerada bojājumus.

1. ko dara ar transficēto olšūnu pirms tās reimplantācijas aizvietotājmātē ?

Kad ir notikusi pronukleusu saplūšana un izveidojusies diploīda šūna, jāļauj tai mitozes ceļā vienreiz dalīties, veidojot 2 šūnu embriju, un tikai tad to ievada atpakaļ aizvietotājmātītē.

1. kā notiek reimplantācija aizvietotājmātes dzemdē ?

Aizvietotājmātīte ir jāsagatavo – tā ir jāsapāro ar peļu tēviņu, kam ir veikta vasektomija (tas ir neauglīgs), lai mātīte kļūtu „pseidopregnant” (*it kā stāvoklī*) – mainās peles hormonu līmeņi un tas padara tās dzemdi uzņēmīgu pret apaugļoto olšūnu, tātad tā tur varēs augt un attīstīties. Tad embriju implantē mātītes dzemdē, un cer, ka viss tālāk izdosies kā plānots un izveidosies transgēni mazuļi.

1. kā identificēt dzīvniekus, kas integrējuši genomā transgēno DNS ?

Tas ir atkarīgs no tā, kāds gēns ir ticis ievadīts. Daļu var noteikt pavisam vienkārši – pēc mazuļu fenotipa. Daļu nosaka ar *Southern blotting,* PCR, FISH.

1. vai transgēnais dzīvnieks ir ģenētiski homogēns (visas šūnas satur vienādu genoma struktūru) ?

Ja tiek izmantota mikroinjekcijas metode pronukleusā, tad transgēnajam dzīvniekam vajadzētu būt ģenētiski homogēnam, jo tika ietekmēts viss ģenētiskais materiāls. Tas var nebūt homogēns, ja ievietotais inserts ir „nepakļāvīgs” un tiek spontāni izmests no genoma.

Izmantojot embrionālo cilmes šūnu metodi, kurā transgēnā šūna tiek ievadīta, kad jau ir izveidojusies blastocista, dzīvnieks nebūs ģenētiski homogēns.

1. vai transgēnais dzīvnieks ir homozigots ?

Transgēnais dzīvnieks nebūs homozigots, jo vēlamā DNS sekvence tika insertēta tikai vienā no pronukleusiem – tātad no otra hromosomu komplekta šāda alēle nenāks.

1. kā saglabāt izveidoto transgēnu nākamajās paaudzēs?

Lai saglabātu transgēnu dzīvnieku, veic transgēno dzīvnieku krustošanu savā starpā, ideālajā gadījumā, līdz izveidojas homozigoti īpatņi. Tā kā sākotnēji veidojas heterozigotas peles, jāņem viens heterozigots tēviņš un viena heterozigota mātīte, tie jāpāro un 1 no 4 (pēc Mendeļa) pēcnācējiem būs homozigots.

**2. Raksturojiet transgēno augu īpašības, kuras veidotas pārtikas kvalitātes paaugstināšanai, miniet eksistējošus vai iespējamus piemērus !**

Transgēni augi parasti tiek veidoti, lai uzlabotu jau esošo augu īpašības, visbiežāk tā ir izturība pret dažādiem kaitēkļiem, garšas kvalitātes uzlabojumi, uzturvērtības uzlabojumi, ražas palielināšana. Visbiežāk izmantotās metodes augu ģenētiskajai modifikācijai ir biolītiskā metode un *Agrobacterium tumefaciens* atkarīgā transformācija. Sākotnēji visas darbības ar auga genomu, protams, notiek laboratorijās, bet kad tiek iegūts nepieciešamais transgēns, augus sāk pavairot, to sēklas izolē un izmanto pārtikā izmantojamu augu audzēšanai.

Ģenētiski modificēti tiek ļoti daudzi augi, uzlabojot dažādas to īpašības, taču pasaulē visvairāk modificēta tiek tieši soja, sava plašā pielietojuma dēļ – sojas eļļā tiek paaugstināts oleīnskābes saturs, tiek palielināts proteīnu daudzums sojas pupiņās utt. Tāpat ļoti bieži tiek ģenētiski modificēta kukurūza – lielākā daļa no ASV pieejamās kukurūzas ir ĢMO, to izmanto cietes iegūšanai. Iespējams, tas ir viens no ļoti svarīgiem iemesliem, kāpēc Eiropas Savienībā, kur uz ĢMO skatās ļoti aizdomīgi, joprojām izmanto kartupeļu cieti nevis kukurūzas – tā netiek tik bieži modificēta. Tomēr augu ģenētiskajai modificēšanai ir vēl ļoti daudz piemēru: tiek veidoti kvieši ar palielinātu folskābes daudzumu, kas ir vitamīns B9, kas ir ļoti nozīmīgs daudzās organisma funkcijās. Rīsiem tiek paaugstināts provitamīna A daudzums, kas ir ļoti būtisks organisma attīstībā – gan kauliem, gan ādai, gan matiem. Arī tomātos tiek palielināts vitamīnu daudzums. Rapšu eļļā tiek paaugstināts laurīnskābes daudzums, kas dabiski lielos daudzumos ir sastopama kokosriekstu un lauru eļļā, bet to iegūšana ir krietni dārgāka nekā rapšu. Laurīnskābe uzlabo organisma imūnsistēmu. Kartupeļus ģenētiski modificē retāk, kā piemēram, kukurūzu, taču arī tajos tiek uzlabots cietes sastāvs.

Ņemot vērā, ka mūsdienu cilvēki ir diezgan alerģiski, un alerģijas pret kādiem konkrētiem alergēniem ir ļoti lielai populācijas daļai, tiek veidoti arī ģenētiski modificēti augi ar samazinātu kaut kā daudzumu – piemēram, zemesrieksti ar samazinātu alergēnu daudzumu, arī citi biežāk pārtikā izmantojamie rieksti.

Noslēgumā tikai gribētos secināt, ka patiesībā ļoti daudzi ģenētiski uzlabotie augi tiešām arī tiek uzlaboti, vai nu „izslēdzot” kaut ko lieku, vai „pieliekot” kaut ko vēlamu klāt, bet pasaules vai, pareizāk sakot, sabiedrības nostāja pret ģenētiski modificētiem augiem, arī dzīvniekiem, lielākoties ir ļoti kritiska, sevišķi Eiropas savienībā. Manuprāt, vajadzētu uzlabot sabiedrības informētību, kā arī veikt daudz dažādus pētījumus, kas noteiktu ģenētiski modificēto organismu ietekmi uz cilvēka veselību un ekosistēmu, un pieliktu punktu visādām baumām.

**3. Izmantojot attēlā parādītās shēmas un informāciju no apskata *D. Carroll*, *Zinc-finger nucleases as gene therapy agents*, *Gene Therapy* 15, 1463–1468, 2008 (grozā), raksturojiet “zinka pirkstu nukleāzes” metodes izmantošanas principus genoma *in vivo* “rediģēšanai” !**

|  |  |
| --- | --- |
| a | **b** |

Pirmajā (a) attēlā parādīta cinka pirkstu saistīšanās ar DNS dubultspirāli. Otrajā attēlā (b) parādīta ZFN saistīšanās un aktivitāte. Katrs ZFN (ZFNa un ZFNb) sastāv no četriem “cinka pirkstiem” (mazie ovālie, krāsainie), kas katrs saistās pie atšķirīga DNS tripleta. Katrs “cinka pirksts” vēl saistās pie šķelšanās domēna (lielais dzeltenais), kam, lai šķeltu DNS, nepieciešams dimerizēties – tātad tiek nodrošināts austāks šķeļamās sekvences specifiskums, jo tiek izmantoti vairāki „cinka pirksti”, jāsavienojas ZFNa ar ZFNb. Mērķgēna šķelšana ar šo ZFN var izmainīt gēna kodējošo sekvenci (tātad var apklusināt nevajadzīgu gēnu), ko izraisa nepareiza DNS reparācija ar nehomologo galu savienošanu un, ja šķelšana notiek nepareizā vietā, šūnā var veidoties toksiskums un mutaģenēze, un šūna var iet bojā. Kad šķelšana notikusi pareizā vietā un nav notikusi nehomologo galu savienošanās, tiek pievienota donora DNS (tumši zilā) ar homologiem galiem un tiek savienota ar ZFN sašķelto DNS; tās apvienojas ar homologās rekombinācijas palīdzību. Lai pēc iespējas novērstu jebkādas nepareizas šķelšanas, toksicitāti un nepareizas savienošanās, var tikt pievienoti papildus “cinka pirksti” (tā ka vienu ZFN veido 5 vai vairāk pirksti) kā arī var modificēt šķelšanas domēnus.

Ar šādu pieeju ir iespējams nomainīt defektīvas alēles, kas izraisa, piemēram, kādu slimību, un aizvietot tās ar normālām, turklāt vēl saglabājot lokalizāciju hromosomās, kas ir ļoti nozīmīga gēnu ekspresijai un regulācijai. Kā arī, ja tiek saglabāta gēna atrašanās vieta, ir iespējams aizvietot tikai sekvences defektīvo posmu, nav jāmēģina hromosomā integrēt viss gēns, par pamatu var izmantot jau esošo, kas ir ļoti liels pluss salīdzinot ar, piemēram, vīrusu vektoriem, jo ar tiem nevar mērķēt uz konkrētu hromosomas vietu, tie tiek integrēti jebkur. Kā arī vēl viens liels pluss šādai metodei ir tāds, ka lokalizējot pareizajā hromosomas vietā, gēns visticamāk netiks ar laiku izmests vai apklusināts, kā tas parasti notiek ar vīrusu vektoros ienestajiem gēniem.

Kā interesantu piemēru es atradu Sangamo Biosciences, Inc. pētījumu par CD4+ T šūnu modificēšanu ar ZFN, kurā gan DNS netiek šķelta, bet gan tiek inaktivēts CCR5 receptors un CD4+ T šūnām, pie tā piesaistoties cinka pirkstiem (attēlā redzams, Perez et al. 2008). Šādas jau modificētas šūnas ievadot ar HIV slimiem dzīvniekiem, izdodas uzlabot imūnsistēmas stāvokli un atbildes, kā arī klonālās selekcijas rezultātā organismā šādas CCR5-inaktivētas CD4+T šūnas savairojas un palīdz cīnīties ar infekciju – darbības mehānisms ir līdzīgs kā CCR5-delta32 mutācijai, kas pasargā daļu cilvēku no HIV uzņēmības, taču šeit tiek izmainītas tikai T šūnas un citas organisma šūnas netiek mainītas, tātad netiek palielināta C hepatīta uzņēmība. (Jo, kā zināms, CCR5-delta32 mutācija ir saistāma ar paaugstinātu risku uzņemt HCV).

Atsauce:

Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. Elena E Perez, Jianbin Wang, Jeffrey C Miller, Yann Jouvenot, Kenneth A Kim, Olga Liu, Nathaniel Wang, Gary Lee, Victor V Bartsevich, Ya-Li Lee, Dmitry Y Guschin, Igor Rupniewski, Adam J Waite, Carmine Carpenito, Richard G Carroll, Jordan S Orange, Fyodor D Urnov, Edward J Rebar, Dale Ando, Philip D Gregory, James L Riley, Michael C Holmes & Carl H June. *Nature Biotechnology* **26**, 808 - 816 (2008)