|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Vārds, Uzvārds** | **Lilite Sadovska** | **Variants** | **1** |
| **Stud.apl.numurs**  | **Ls09364** | **Datums** | **12.06.2013** |

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

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

Šo metodi plaši izmanto transgēnu peļu iegūšanai. Apaugļotu olšūnu DNS mikroinjekcijai iegūst no peļu mātītes, kas ir apaugļota. Lai palielinātu olšūnu daudzumu un kvalitāti, pelēm parasti dod gonadotrofīnus, kas izraisa superovulāciju. Apaugļotās olšūnas iegūst pēc tikko apaugļotas peles olvada disekcijas. Lai apaugļotajai olšūnai ievadītu nepieciešamo DNS sekvenci, izmanto īpašus mikromanipulatorus un mikroskopu. Ar speciālu pipeti un vakuuma palīdzību embriju fiksē un tā pronukleusā ar kapilāru adatu ievada klonējamo DNS. Pēc tam embrijus pārnes aizvietotājmātītēs, kuras tos iznēsā. 10-40% no injicētajiem embrijiem dod transgēnus pēcnācējus.

1. **kādā DNS forma tiek izmantota transfekcijai ?**

Tranficēt var ģenētisko materiālu (piemēram, superspiralizētas plazmīdas DNS var siRNS konstrukti) vai pat proteīnus (piemēram, antivielas). Visbiežāk tramsfekcijai izmanto lineāru DNS. 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. Otrs iemesls ir tāds, ka vīrišķais pronukleuss ir lielāks kā sievišķais un parasti atrodas tuvāk oocīta virsmai.

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, kas parasti notiek, ja to inkubē +37°C pa nakti, un tikai tad to ievada aizvietotājmātītē. Var apaugļoto olšūnu arī uzreiz ievadīt aizvietotājmātītē, taču pirms tam jāpārliecinās, ka vienšūnas embrijs nav gājis bojā mikroinjekcijas laikā.

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 paudzēs?**

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. Pēcāk, lai veidotu stabilu transgēnu līniju, ieteicams vēl krustot homozigotos pēcnācējus.

**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. Tomēr tiek uzlabots ne tikai augu sastāvs ar dažādiem proteīniem, ogļhidrātiem, vitamīniem, bet augi tiek padarīti arī patīkamāki lietošanai, piemēram, vīnogas bez kauliņiem, kas jau tagad ir iemantojušas popularitāti patērētāju vidū, jo tās ir vieglāk ēdamas, tāpat zinātnieki pašlaik veido arī citus augļus, kuru baudīšanai vairs netraucētu sēkliņas.

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. Modificēti tiek ne tikai tie augi, ko cilvēki uzņem pārtikā, bet arī tādi, kas tiek doti dzīvniekiem. Interesants piemērs šķita zāles un sēklas, ko baro aitām, ar paaugstinātu sēra saturošo aminoskābju daudzumu, kas uzlabo aitu vilnas augšanu. Līdz ar to, tiek iegūta vairāk un kvalitatīvāka aitas vilna neko nemainot pašā dzīvniekā, bet gan tā uzturā.

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” !**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

Cinka pirkstu nukleāzes ir mākslīgi restrikcijas enzīmi, kas veidoti no cinka pirkstu DNS saistīšanās domēna un DNS šķelšanas domēna. Cinka pirksti var tikt ģenētiski izveidoti (modificēti), lai tie tiktu mērķēti uz specifiskām DNS sekvencēm pat ļoti sarežģītos genomos. Pirmajā (a) attēlā parādīta cinka pirkstu saistīšanās ar DNS dubultspirāli, kas parāda pašu cinka pirkstu augsto specifiskumu pret noteiktu „ieprogrammētu” DNS sekvenci. 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” saistās pie šķelšanās domēna (lielais dzeltenais), parasti šādos ZFNs, par šķelšanas domēnu izmanto nespecifisko II tipa restrikcijas endonukleāzes FokI šķelšanas domēnu, kam, lai šķeltu DNS, nepieciešams dimerizēties. Tātad šķeļamās sekvences specifiskums tiek nodrošināts ar šiem cinka pirkstiem un pie katras endonukleāzies tiek pievienoti vairāki „cinka pirksti”, kas nodrošina augstāku specifiskumu, un, lai šķelšanās notiktu, jāsavienojas ZFNa ar ZFNb. Standarta ZFNs šķelšanās domēnam cinka pirkstu domēni pievienojas ar C-galu, un, lai notiktu šķelšanās domēnu dimerizēšanās un DNS šķelšana, katrai ZFN jāsaistās ar savu DNS dubultspirāles pavedienu (pretējām DNS ķēdēm).

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)