|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Vārds, Uzvārds** | **Katrīna Hauka** | | **Variants** | | **1** |
| **Stud.apl.numurs** | **kh09022** | **Datums** | | **26.06.2013.** | |

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

1-1 Kā iegūst izolētu apaugļotu olšūnu, kurā injicēt svešo DNS ?

Noteiktu laiku pēc pārošanās ar tēviņiem mātītes tiek apskatītas un pēc noteiktām pazīmēm tiek izvēlētas tās, kuras ir apaugļotas. Tās tiek eitanizētas un tām tiem izņemti olvadi, no kuriem tiek savāktas embriju piciņas, tās izskalojot vai secējot bufera vidē. Tad embriju piciņas atdala, pilinot hialouronidāzi (enzīmu) un ar mikropipešu palīdzību embrijus noskalo, atbrīvojot no visa liekā. Tagad tos var ievietot Petri trauciņā speciālā barotnē (ar BSA, antibiotikām, EDTA), uzturot noteiktu pH (pievienojot, piem., HEPES). **Eitanazija nav obligāta, var arī izskalot. -1**

1-2 Kādā DNS forma tiek izmantota transfekcijai ?

Var lietot dažādas formas DNS, bet, lai DNS integrētos hromosomā un tiktu pārnests no paaudzes uz paaudzi (kā tas ir nepieciešams šajā gadījumā), labāk izmantot lineāras formas DNS. Superspiralizēta DNS savukārt labāk noder pārejošai transfekcijai (t.i., introducētais DNS netiktu nodots nākamajām paaudzēm).

1-3 Kas ir vīrišķais pronukleuss ?

Vīrišķais pronukleuss ir spermatozoīda kodols pēc tam, kad tas ir iekļuvis olšūnā apaugļošanās laikā, bet pirms tam, kad tas ir saplūdis ar sievišķo pronukleusu. Tas ir šūnas kodols, kas satur haploīdu skaitu (vienu komplektu) hromosomu, kas rodas mejozes procesā.

1-4 Kāpēc ieteicams ievadīt svešo DNS vīrišķajā pronukleusā ?

Svešo DNS ieteicams ievadīt vīrišķajā pronukleusā, jo tā kodols ir lielāks, nekā sievišķais pronukleusa kodols. Tāpat vīrišķais pronukleuss atrodas tuvāk olšūnas virsmai un tāpēc ir vieglāk tajā ievadīt svešo DNS. **Koncentrācija -1**

1-5 Ko dara ar transficēto olšūnu pirms tās reimplantācijas aizvietotājmātē ?

Tās inkubē un var ļaut attīstīties divu šūnu stadijā (teiksim, atstājot uz nakti). Tādā veidā var arī pārliecināties, ka šūnas pēc injekcijas ir dzīvotspējīgas. Šūnas reimplantē aizvietotājmātītes dzemdē.

**Standartā iet tālāk par 2 šūnu stadiju -1**

1-6 Kā notiek reimplantācija aizvietotājmātes dzemdē ?

Mātīte ir jāsapāro ar neauglīgu tēviņu, lai tai izmainītos hormona līmeņi un jaunuzņemtā olšūna spētu izdzīvot mātītes dzemdē. Tad šai mātītei izraisa dziļu anestēziju, izņem olvadus un ar pipetes palīdzību tajos ievada ~20 embrijus. Pēc tam lēnām olvadus ievieto atpakaļ, brūci aiztaisa un ļauj mātītei atgūties. Mātītes dzemdē mazuļus ~20 dienas pēc tam.

1-7 Kā identificēt dzīvniekus, kas integrējuši genomā transgēno DNS ?

Kad dzīvnieki ir gana paaugušies, tiek veikta astes biopsija un izolēts DNS. Tad tiek identificēts transgēns. Izmanto Southern blotting, PĶR, FISH metodes. Identificēšanas process bieži nav pārāk viegls.

1-8 Vai transgēnais dzīvnieks ir ģenētiski homogēns (visas šūnas satur vienādu genoma struktūru) ?

Jā, izmantojot šo metodi, rezultātā dzīvniekam vajadzētu būt ģenētiski homogēnam, jo DNS tika ievietots pirms pronukleosu ģenētiskās informācijas saplūšanas un šūnu dalīšanās.

1-9 Vai transgēnais dzīvnieks ir homozigots ?

Nē, nebūs homozigots. Svešā DNS sekvence tika ievietota tikai vienā no pronukleosiem, kā rezultātā vienā no hromosomu komplektiem šīs alēles nebūs.

1-10 Kā saglabāt izveidoto transgēnu nākamajās paudzēs?

Sakrustojot transgēnās nultās paaudzes peli (F0) ar ne-transgēnu peli, iegūst F1 paaudzi, no kuriem puse būs heterozigotas peles. Tad F1 sakrusto savā starpā un iegūst homozigotas transgēnas peles.

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

**5**

**Visumā pareizi, bet nav precīzi par tēmu PĀRTIKAS KVALITĀTE . Piemēri – lielākoties no tehnoloģijas (-5)**

Transgēnie augi ir augi, kas ir izveidoti ar gēnu inženierijas metodēm – audzēšanas paņēmienu, kas izmanto rekombinantās DNS metodes, lai izveidotu augus ar jaunām īpašībām. Lielākajā daļā gadījumā mērķis ir ieviest jaunu īpašību, kas parasti sugai nav raksturīga. Viens no šādu modifikāciju mērķiem ir pārtikas kvalitātes paaugstināšana. Galvenās augu īpašības, kas uzlabotas, tos ģenētiski modificējot, ir aizsardzība pret slimībām, kukaiņiem, nezālēm, stresu, ražas uzlabošana, izturība pret ilgāku uzglabāšanu, labāka garša, krāsa, smarža u.c.

Galvenās metodes, ko izmanto transgēno augu izmantošanai, ir biolistiskā metode (daļiņu ierocis) vai *Agrobacetrium tumefaciens* veicināta transformācija.

Pirmais ģenētiski modificētais augs, ko ASV ļāva izmantot pārtikā, bija *FlavrSavr* tomāts (1994. gadā), kurš varēja tikt ilgāk uzglabāts veikalu plauktos. Tālāk sekoja *Bt kartupelis* (1995. gadā), kas ražoja dabiskos pesticīdus, rapsis ar uzlabotu eļļas sastāvu, sojas pupiņas ar rezistenci pret herbicīdu glifosfātu, ķirbis pret vīrusa infekcijām utt. Visbiežāk izmantoja sojas pupiņas, kukurūzu, rapsi un kokvilnu. Transgēno augu bums pārtikas kvalitātes uzlabošanai bija sācies. 2013. gadā ASV 85% no kukurūzas, 91% no sojas pupiņām un 88% no kokvilnas ir ģenētiski modificēti augi.

Augļi un dārzeņi ir viena no svarīgākajām eksporta precēm tropu valstīm. Mēs Latvijā saņemam tik daudz dārzeņus no dažādām eksotiskām valstīm, bet lielākoties (vismaz agrākos laikos) tie bija apstrādāti ar ķīmiskām vielām, lai pa ceļam tie nesabojātos un pietiktu laika, lai tos visus izpārdotu. Laiki mainās un tā, piemēram, papaija, kas nākusi no Havaju salām, 80% gadījumu būs ģenētiski modificēta, lai būtu izturīga pret vīrusiem. Viens no jaunākajiem sasniegumiem ir ābols (2012. gadā), kas ir izturīgs pret brūnēšanu, kas ir modificēts tā, ka ābols ražo mazāk polifenoloksidāzi – enzīmu, kas veicina brūnēšanu. Šāds ābols gan, laikam, tirgū vēl nonācis nav, bet drīzumā to varētu gaidīt ASV un Kanādā.

Ģenētiski modificētie augi, ko cilvēki lieto uzturā, protams, izraisa plašas spekulācijas par to, vai tie cilvēkam nav kaitīgi un kā tie ietekmē Dabas procesus ilgtermiņā. Vai, galu galā, šāda mērķēta iejaukšanās Dabas procesos ir vajadzīga? Lai nu kā, izmantojot jebkuru no augstākminētajām metodēm, zinātnieki spēj noteikt, vai ir notikušas nevēlamas gēnu izmaiņas, tādēļ var uzskatīt, ka šādā veidā izveidoti augi varētu būt cilvēkam daudz drošāki par tradicionāli audzētiem augiem. Tāpat – es nedomāju, ka augos esošie izmainītie gēni vispār varētu šķērsot mūsu zarnu traktu pilnā apmērā un kaut kādā veidā ievietoties mūsu pašu gēnos

**OK - 10**

**10**

**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” !**

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

Viens no galvenajiem gēnu terapijas mērķiem ir aizvietot defektīvo gēnu ar normālu alēli tā dabiskajā hromosomas atrašanās vietā. Tā kā parasti ir jāizmaina tikai neliela gēna daļa, tad ir nepieciešams iekļaut pilnas kodējošās un regulatorās sekvences. Līdz šim gēnu labošana to dabiskajā atrašanās vietā šķita praktiski neiespējama, jo nepieciešamās homologās rekombinācijas notika ar ļoti zemu efektivitāti. Cinka-pirksta nukleāzes (ang. val. *zinc-finger nuclease –* ZFN) spēj uzlabot efektivitāti, mērķa vietā izveidojot spraugu.

ZFN izraisītās spraugas var tikt izmantotas gēnu labošanā divos dažādos veidos: homologajās rekombinācijās (ang. val. *homologous recombinations -* HR) vai nehomologajās galu savienošanās (ang. val. *nonhomologous end joining –* NHEJ). NHEJ bieži ir neprecīzas, izveidojot lokalizētas insercijas un delēcijas, kas gan var būt pietiekami gadījumos, ja mērķis ir gēnu inaktivēt. Lai sasniegtu šāda veida sekvences aizvietošanu, reizē ar ZFN tiek nogādāta arī donora DNS, kas lielā mērā ir homologa mērķim, bet nes vēlamās sekvences izmaiņas. Kad HR izmanto donoru kā sagatavi, tad izmaiņas tiek ievietotas mērķī.

Attēlā b parādīta cinka-pirkstu nukleāzes (ang. val. *zinc-finger nuclease -* ZFN) saistīšanās un aktivitāte. Pamata ZFN sakārtojums relatīvi pret tā mērķa DNS (gaiši zilais stienītis) : katrs ZFN (ZFNa, ZFNb) sastāv no četriem cinka pirkstiem (parādīts ar mazajiem ovāliem, katrs savā krāsā, norādot, ka katrs no tiem saistās ar dažādiem DNS tripletiem). Katrs cinka pirkstu komplekts ir saistīts pie šķelšanas domēna (parādīts ar lielākiem ovāliem), kam ir jādimerizējas, lai šķeltu DNS. Izvēlētā mērķa gēna šķelšana var novest pie tā kodējošās sekvences izjaukšanas caur nehomologo galu savienošanos (ang. val. *nonhomologous end joining –* NHEJ). Kad reizē ar ZFN tiek ievadīts arī homologais DNS donors (tumši zilais stienītis), tas var tikt iekļauts mērķī ar homologajām rekombinācijām. Ja notiek šķelšana nevēlamās, nemērķētās vietās, tas var izraisīt šūnu toksicitāti, arī mutācijas (violetā krāsā). Viens no veidiem, kā ierobežot šādus delēcijas efektus, ir šķelšanas domēna dimēra interfeisa modificēšana, kā arī papildus pirkstu pievienošana, lai uzlabotu specifiskumu (zaļā krāsā).

Attēlā a parādīti trīs cinka pirksti, kas novietoti pusapaļā vai C-veida izkārtojumā. Katrs cinka pirksts ir veidots no anti-paralēlām beta-sloksnēm un alfa-spirāles, ko kopā saista cinka joni un hidrofobiskie atlikumi. Tie pievienojas pie DNS caur alfa-spirāles galu.

Kopumā cinka pirksta nukleāzes ir efektīvs līdzeklis eksperimentālām gēnu manipulācijām. Interesanti, ka ar šo metodi varētu būt iespējams izārstēt HIV/AIDS, kas izjauc CCR5 gēna darbību, kas ir viens no galvenajiem gēniem, kas iesaistīts šo slimību attīstībā. Tāpat ar šo metodi ir iespējams „izslēgt” alēli – ārstēt dominantās mutācijas heterzigotos indivīdos, izveidojot dubultķēdes spraugas iekš DNS. Tāpat ar cinka pirksta nukleāzēm var pārrakstīt alēles sekvences, ieslēdzot homologo rekombināciju sistēmu, lai salabotu dubultķēdes pārrāvumus, izmantojot papildus DNS fragmentu kā sagatavi. Vēl iespējama gēnu terapija, ievietojot terapeitiskos gēnus to dabiskajās atrašanās vietās u.c.

Protams, kā jau visam, arī šai metodei ir daži trūkumi. Ja cinka pirkstu domēni nav pietiekami specifiski tā mērķa vietai vai arī tie nemērķē uz unikālu saitu interesējošā genomā, tad var notikt šķelšana nepareizā vietā. Tā rezultātā radīsies šūnu toksicitāte un mutācijas (minēts jau iepriekš). Tāpat, protams, pastāv imunogēns efekts – imunoloģiska atbilde pret terapeitiskajiem aģentiem un šūnām, kurās tie ir aktīvi.

Izmantotā literatūra bez jau dotās publikācijas: <http://en.wikipedia.org/wiki/Zinc_finger_nuclease#Applications>