

Генетика развития

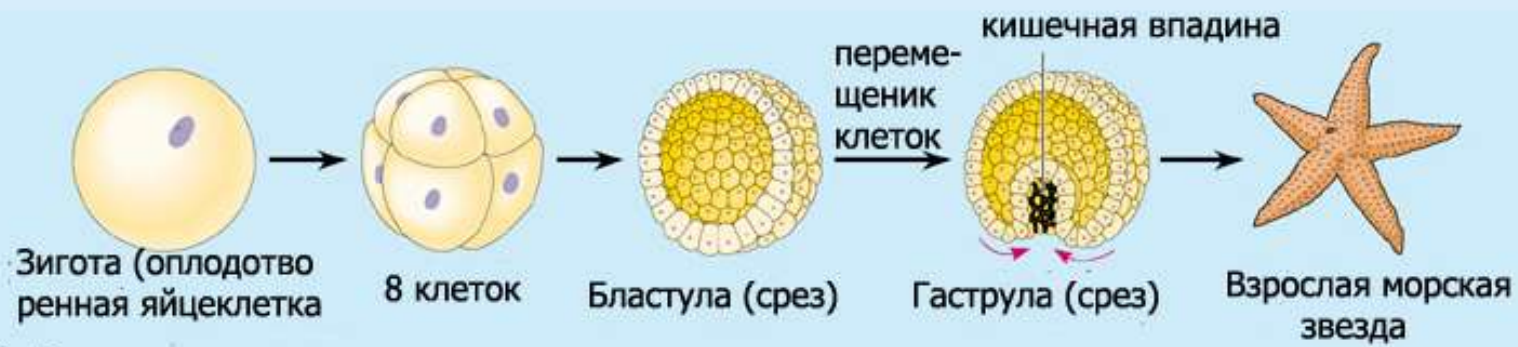
Ежова Татьяна Анатольевна - кафедра генетики МГУ

Генетика развития - самый сложный и интересный раздел генетики, который использует самый широкий арсенал методов - мутанты, химерные организмы, трансгенные организмы. С помощью трансгенных технологий генетик может выключить отдельные гены («накаутировать» их) или, наоборот усилить их работу, может следить за всеми особенностями работы генов - определить где и когда они работают.

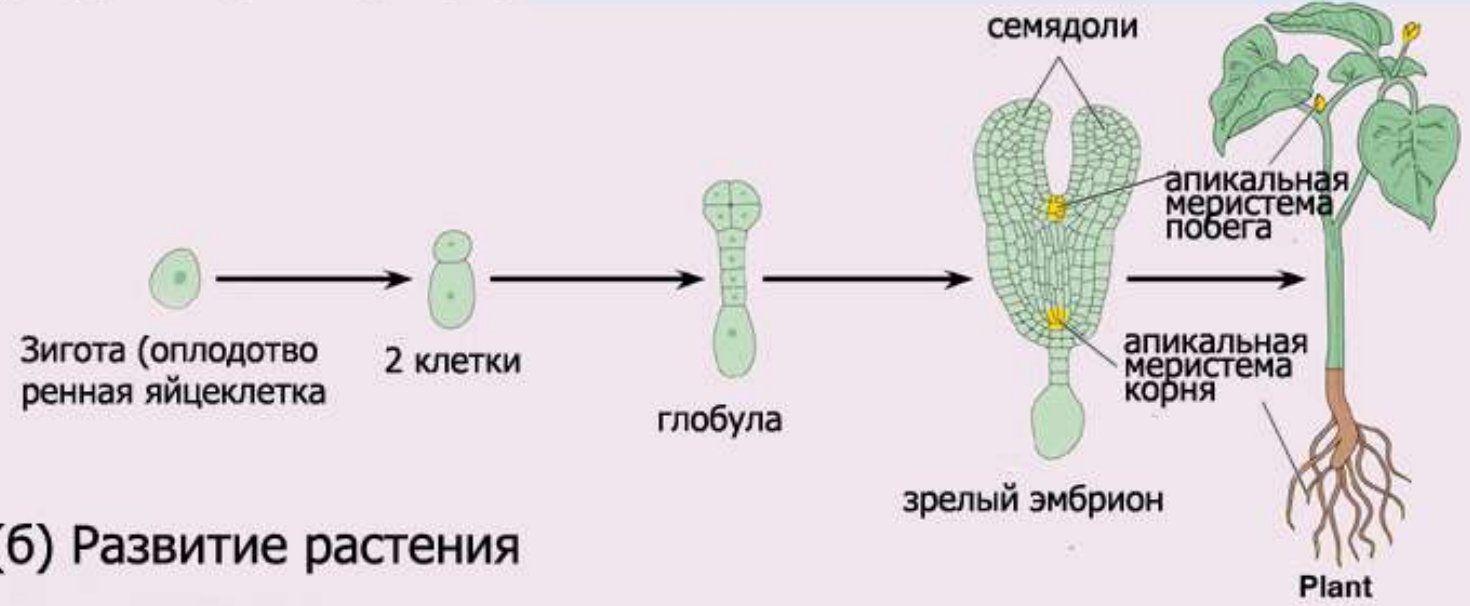
ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Как генетики получают мутантов и за что их любят
2. Как гены создают разные типы тканей и органов
3. Как важно не помешать реализации генетических программ развития
4. Зачем нам нужно знать о генах, управляющих развитием

Главная задача генетики развития - изучение генетических механизмов, контролирующих образование из зиготы сложного организма, состоящего из сотен различных типов клеток и десятков органов

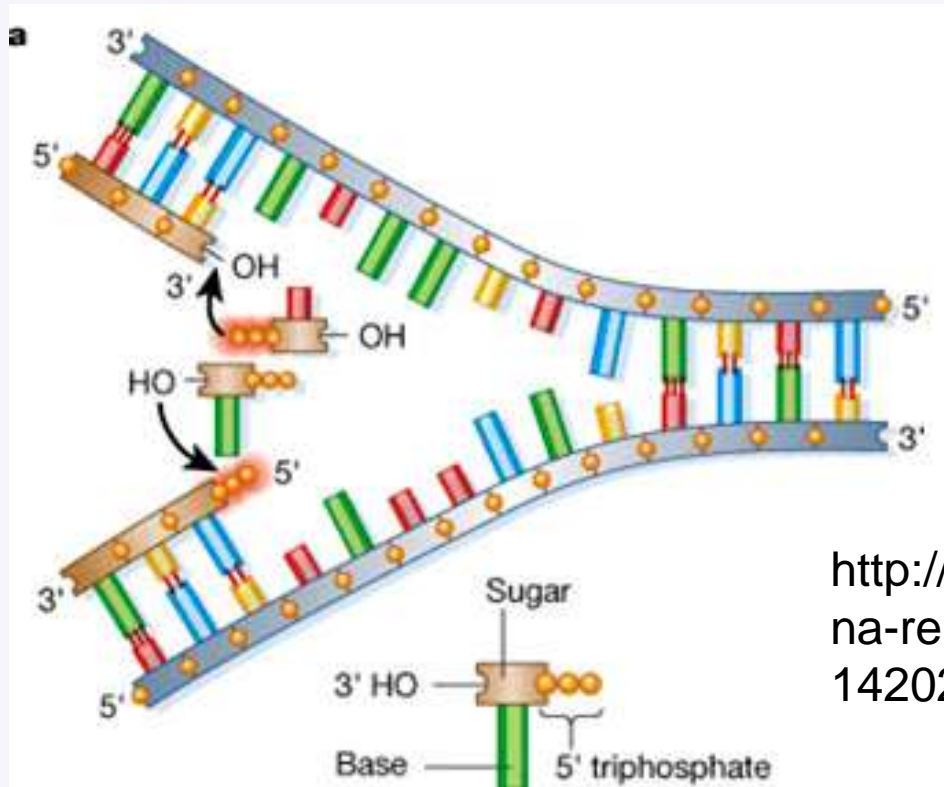


(а) Развитие животного



(б) Развитие растения

Набор генов в клетках разных тканей - один и тот же, т.к. молекулы ДНК копируются при делении очень ТОЧНО



<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-replication-and-checkpoint-control-in-s-14202419>

Репликация ДНК на основании комплементарности обеспечивает передачу генетической информации дочерним клеткам

Дж. Гёрдон, 1962 - первый опыт по клонированию животных



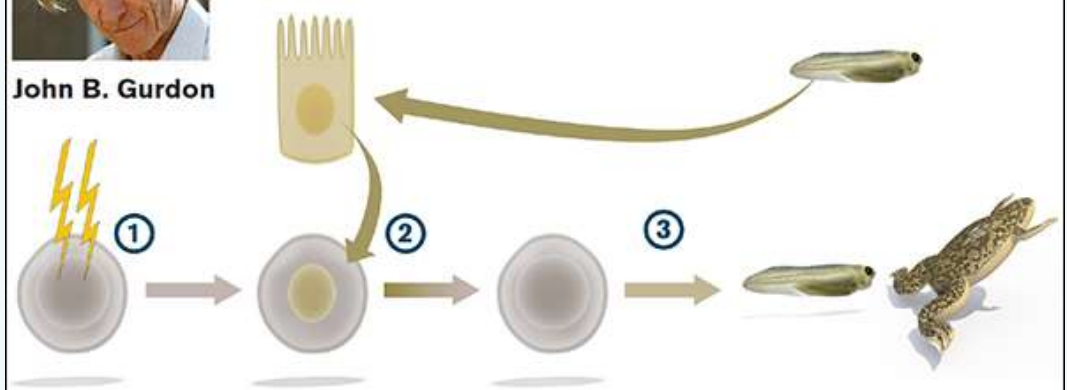
Wild-type donor of enucleated eggs

Albino parents of nucleus donor



John B. Gurdon

ядро из клетки кишечника



 The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

http://www.nature.com/nm/journal/v15/n10/fig_tab/nm1009-1141_F1.html



Профессор Ян Вильмут с Долли

(прожила всего 6 лет)



Я. Вильмут (Wilmut) в 1997г из 250 зигот получил 1 овечку Долли

Рис. 3. Принцип получения клона млекопитающих, использованный в опытах Яна Вильмута. Цитоплазма яйцеклетки и клетки донора окрашены в разный цвет

Клоны



1952



1996



1997



1998



2000



2001



2002



2003



2007



**Растения
используют
клонирование как
способ
вегетативного
размножения**



Соматические эмбрионы

1939 год Томас Морган:
«Дифференцировка - результат
дифференциальной активности
(экспрессии) генов» (гипотеза)



The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 1933 г



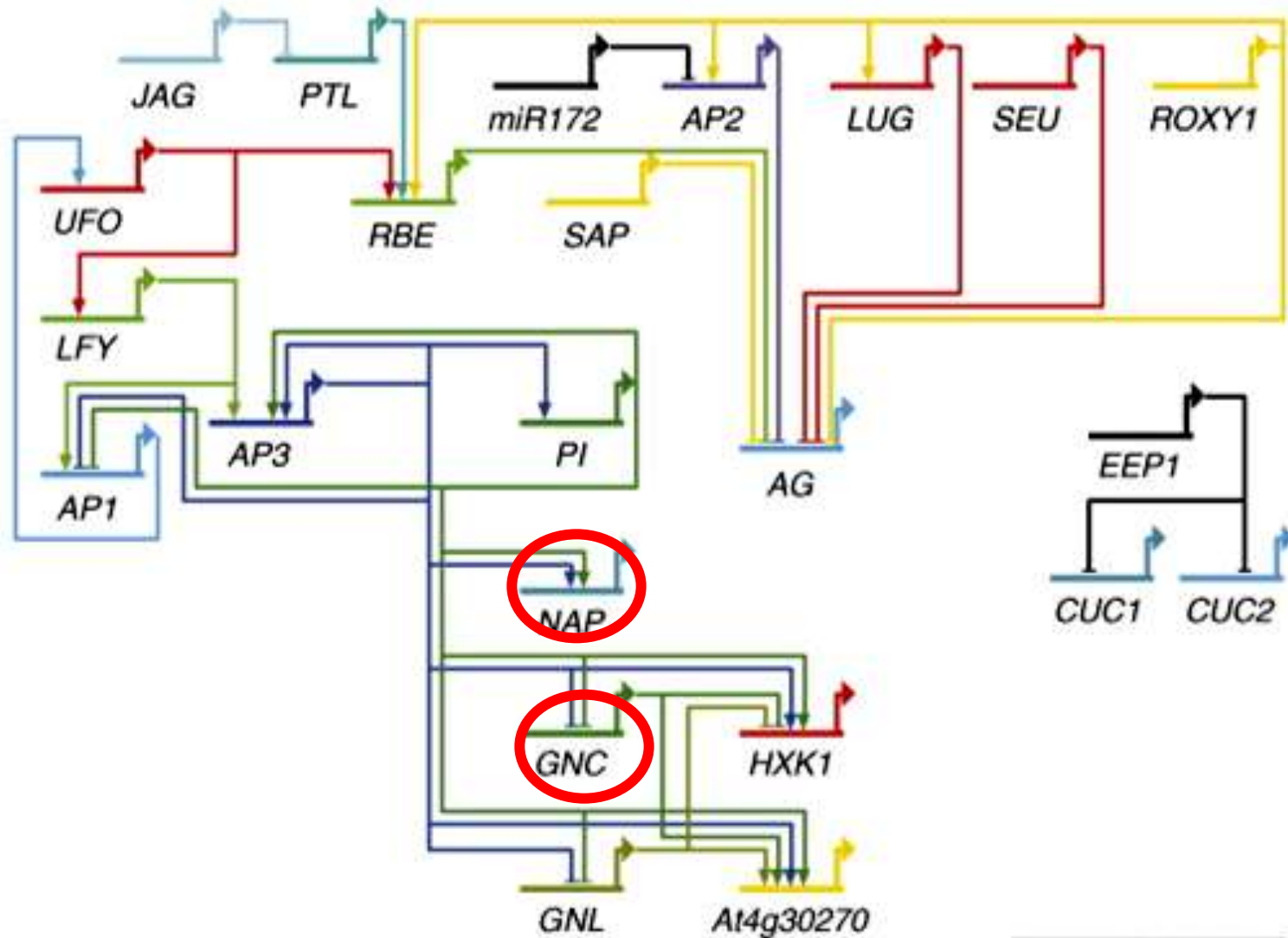
В разных типах специализированных клеток
функционируют разные группы генов.

В специализированных клетках работает ~ 10%
генов, а 90% - молчат.

Главные задачи генетики развития:

- 1) Найти гены, работа которых ведет клетки по пути той или иной дифференцировки
- 2) Изучить механизмы, которые включают и выключают эти гены в нужный момент и в нужном месте
- 3) Понять, как взаимодействуют гены, каков порядок их работы, характер (торможение или активация) и сила их связи
- 4) Создать схему генетического контроля развития ткани или органа (генную сеть)

Генная сеть, контролирующая развитие лепестка у арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*)



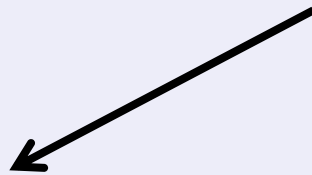
TRENDS in Plant Science

Irish V.F. **The *Arabidopsis* petal: a model for plant organogenesis**

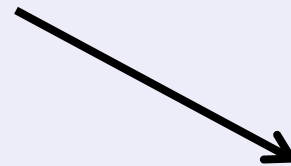
(2008) *Trends in Plant Science*, 13 (8), pp. 430-436.

Выявление генов, работа которых ведет клетки по пути той или иной дифференцировки – главная задача, без которой нельзя выполнить и остальные.

Выявить интересующие гены можно с помощью **получения мутантов или трансгенных линий с выключенными генами**



По изменению фенотипа можно понять, какова функция гена в норме (в растениях или животных дикого типа)



Ген, маркированный мутацией, можно найти в геноме и понять, что делает в клетке его продукт (белок)

Мутации позволяют найти гены, управляющие развитием



Анализ фенотипа мутантов позволяет установить функцию гена. Например, ясно, что ген, который не работает у голенького мутантного мышонка, у мышат дикого типа отвечает за развитие волосяных фолликул

academicdepartments.musc.edu

Ген, который не работает у мутантной плодовой мушки (слева), регулирует развитие глаз у мух дикого типа.

Именно на основе анализа мутантов мы узнаем о генах и их функции в организме животных и растений



www.ralf-dahm.com

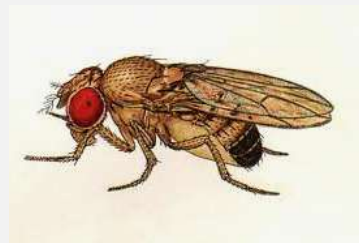
Мутации легче получать у модельных объектов

Модельные объекты генетики:

Небольшой геном / Высокая плодовитость / Короткий жизненный цикл / Возможность поддержания в лабораторных условиях

Модельные беспозвоночные животные:

плодовая мушка



D. melanogaster

нематода



C. elegans

Arabidopsis thaliana

Позвоночные животные:

зебровая рыбка



Danio rerio

мышь



Mus musculus

Модельное растение: арабидопсис



Получение мутаций:

- химические мутагены (радиация)
- мобильные элементы
- инсерции векторных молекул в геном при трансформации (трансгенные технологии)

В.В. Сахаров



**1932 г – открытие
химических мутагенов**

1946 г – открытие супермутагенов (этиленимин)

МЕОЦ

МОСКОВСКИЙ КЛУБ "ТВОРЧЕСКИЕ ВСТРЕЧИ"



3 сентября 19.00 зал "Амфитеатр"

Удивительный фильм
о знаменитом ученом-генетике,
воине и гражданине

Иосифе Рапопорте



**«БАТЯНЯ
РАПОПОРТ»**

В вечере принимает
участие его сын —
Роальд Рапопорт

ВЕДУЩИЙ – ЗАСЛУЖЕННЫЙ ДЕЯТЕЛЬ ИСКУССТВ РОССИИ,
РЕЖИССЕР, ПОЭТ **Г.КАНТОР**

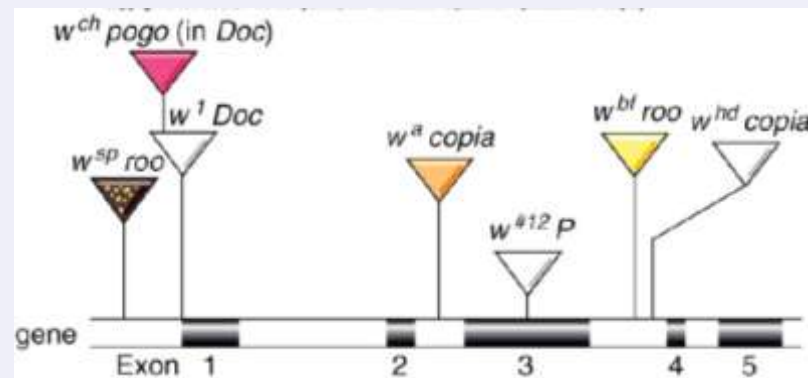
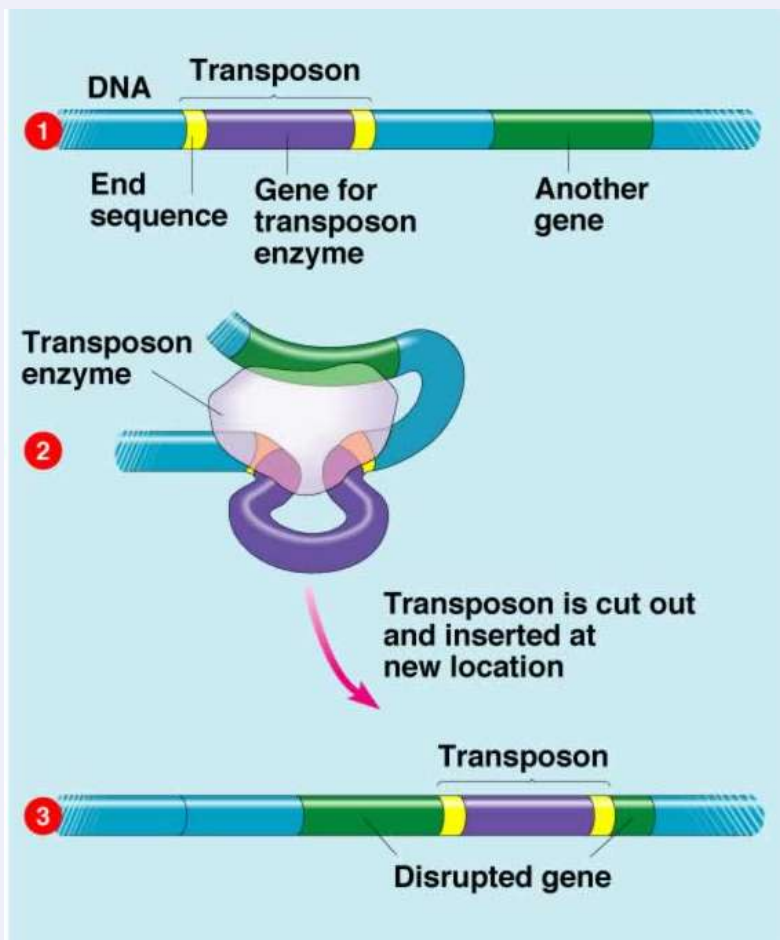
Бесплатные пригласительные билеты можно получить в МЕОЦ.
Справки и заказ билетов по телефону: (495) 645-50-00 или на сайте mjcc.ru



**Химические
мутагены
активируют
перемещения
транспозонов.
Петунья М1
поколения
(работа
А.В.Широковой,
ИБР РАН)**



МЭ передвигаются по геному, используя фермент (транспозазу), который кодируется самим МЭ и вырезает МЭ из состава генома.

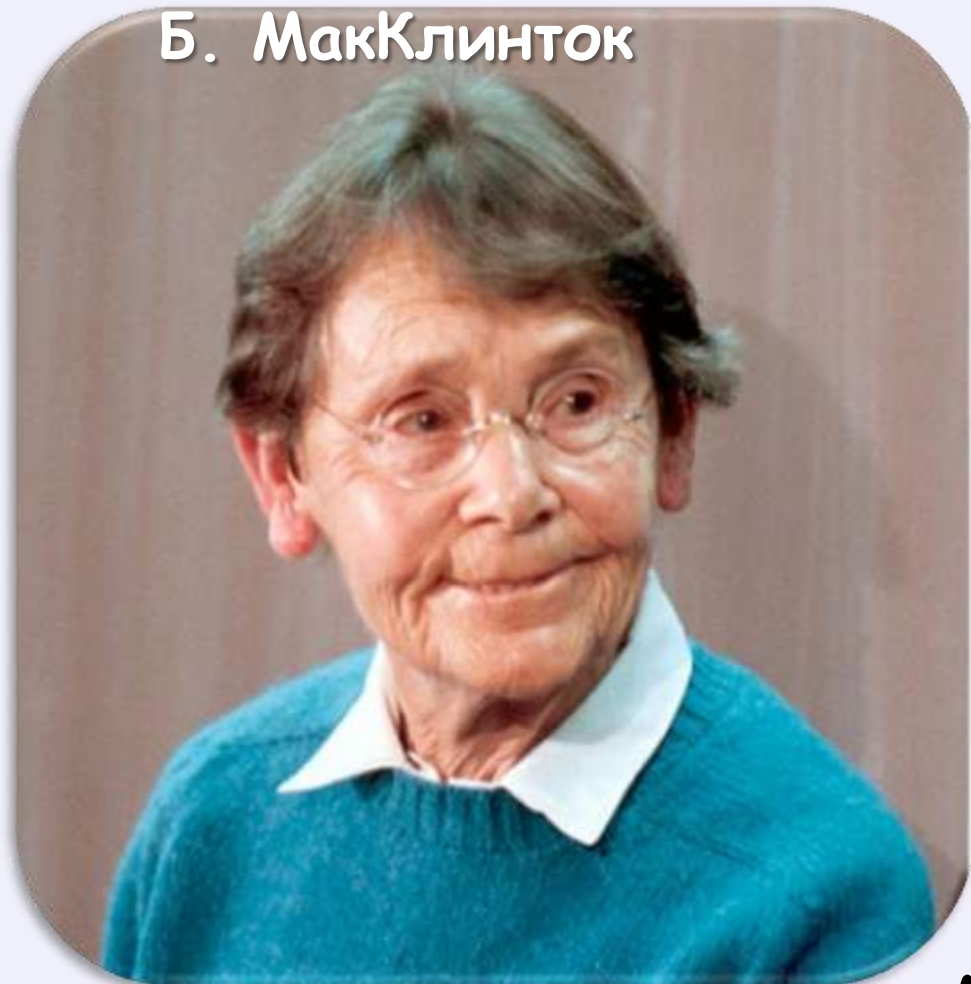


Спонтанные мутации часто вызваны инсерциями МЭ

<http://www.chrisdellavedova.com/2008/01/29/science-tuesday-one-cells-junk-is-another-cells-treasure/>

Мобильные элементы (МЭ) существуют в геномах большинства растений и животных. Многие мутации - результат инсерции МЭ. Такие мутации не стабильны.

Б. МакКлинток



Передвижения эндогенных МЭ по геному невозможно контролировать



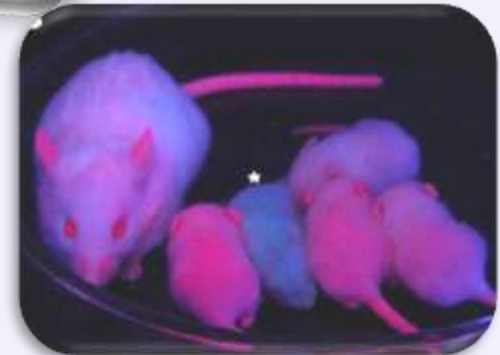
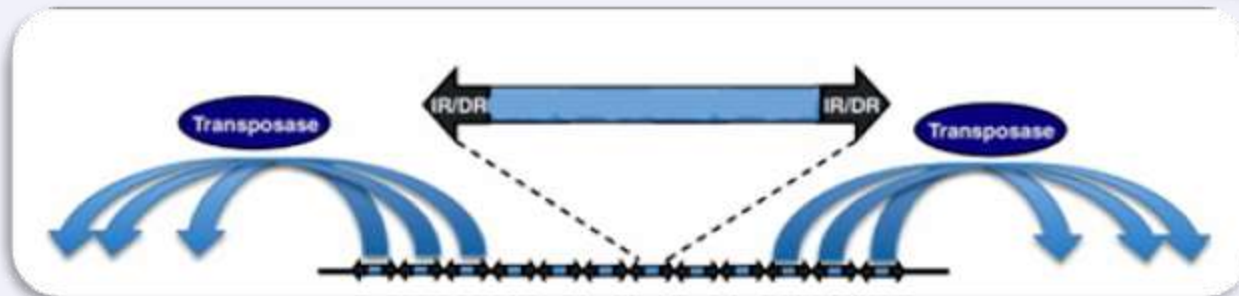
The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 1983 г

Индукцированный транспозонный мутагенез у трансгенных животных

Транспозоны лососевых рыб семейства *Tc1/Mariner* активны в геноме рыб и мыши, а их искусственная модификация *Sleeping Beauty (SB)* - и в геноме человека.

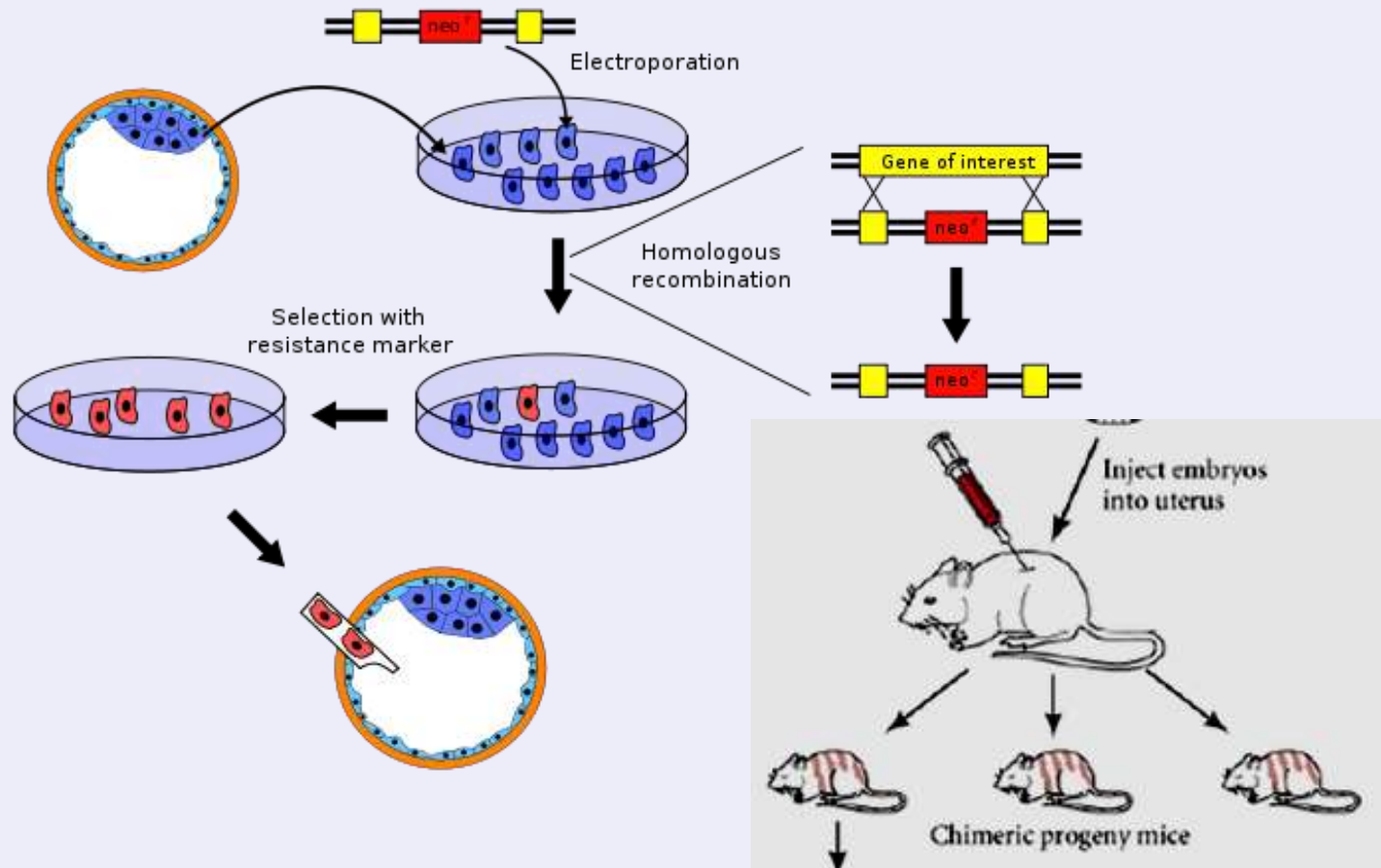
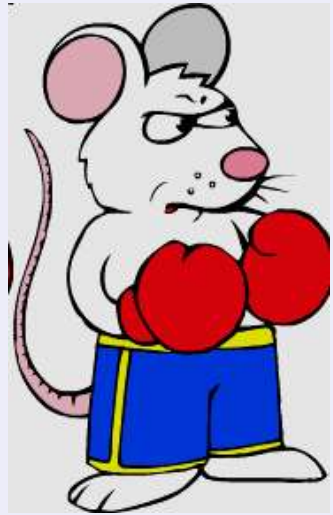
PiggyBac - активен в геноме > 10 видов насекомых, планарий, мыши, человека (культура клеток).

Капустная пяденица - хозяйка *PiggyBac*



"Генный нокаут"

выключение **определенного гена** путем целенаправленного внесения изменений в его нуклеотидную последовательность



Марио Капекки, Оливер Смитис, Мартин Эванс. За открытие принципов введения генных модификаций у мышей с использованием ЭСК



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007

Гомеозисные мутанты арабидопсис



Мутация гена
В-класса

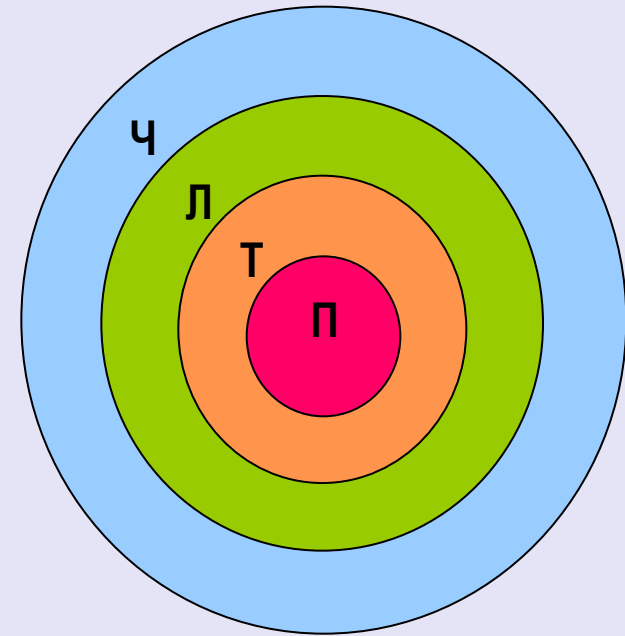
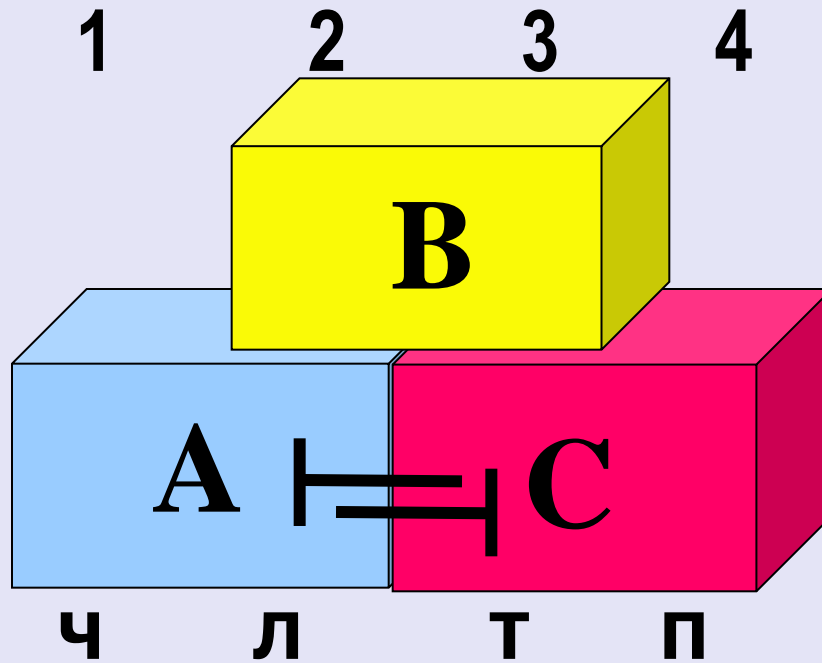


Мутация гена
А-класса



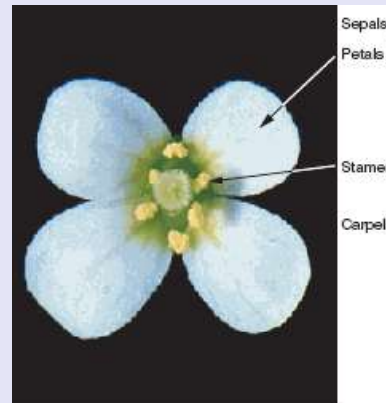
Мутация гена
С-класса

ABC-модель развития органов цветка (Coe, Meyerowitz, 1991)



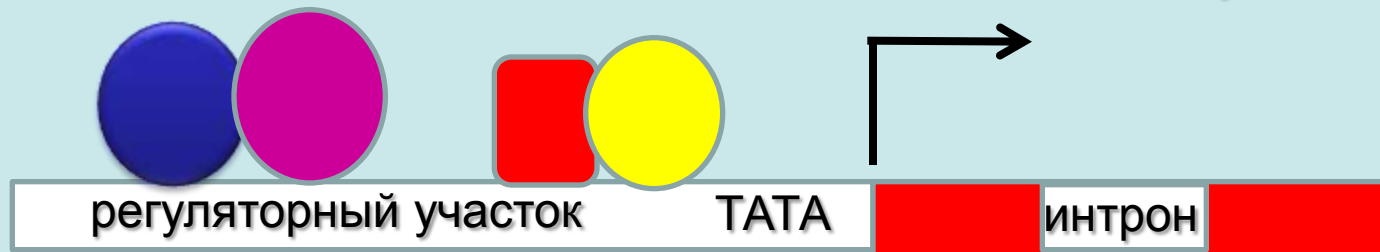
A. thaliana
A AP1, AP2
B AP3, PI
C AG

A. majus
 SQUA, FIM
 DEF, GLO
 PLE

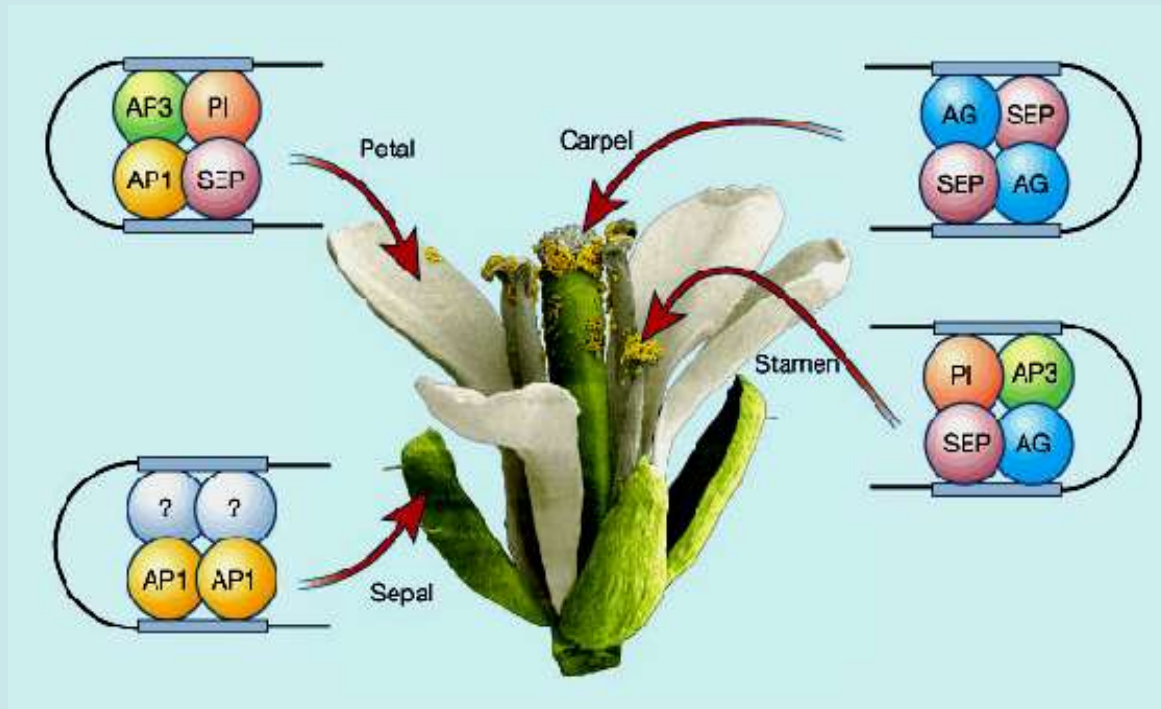


**Перекрывание
 доменов экспрессии
 гомеозисных генов в
 примордии цветка**

Гены ABC-классов кодируют транскрипционные белки MADS - семейства)



**ABCE-
модель
(квартет)**



Белки SEP выступают в роли «цемента»,
необходимого для стабилизации комплекса

(Honma et al., 2001)

Фолиарная (классическая) теория морфогенеза цветка Иоганна Вольфганга Гете:



1749 - 1832

Цветок - видоизмененный побег с укороченными междоузлиями.

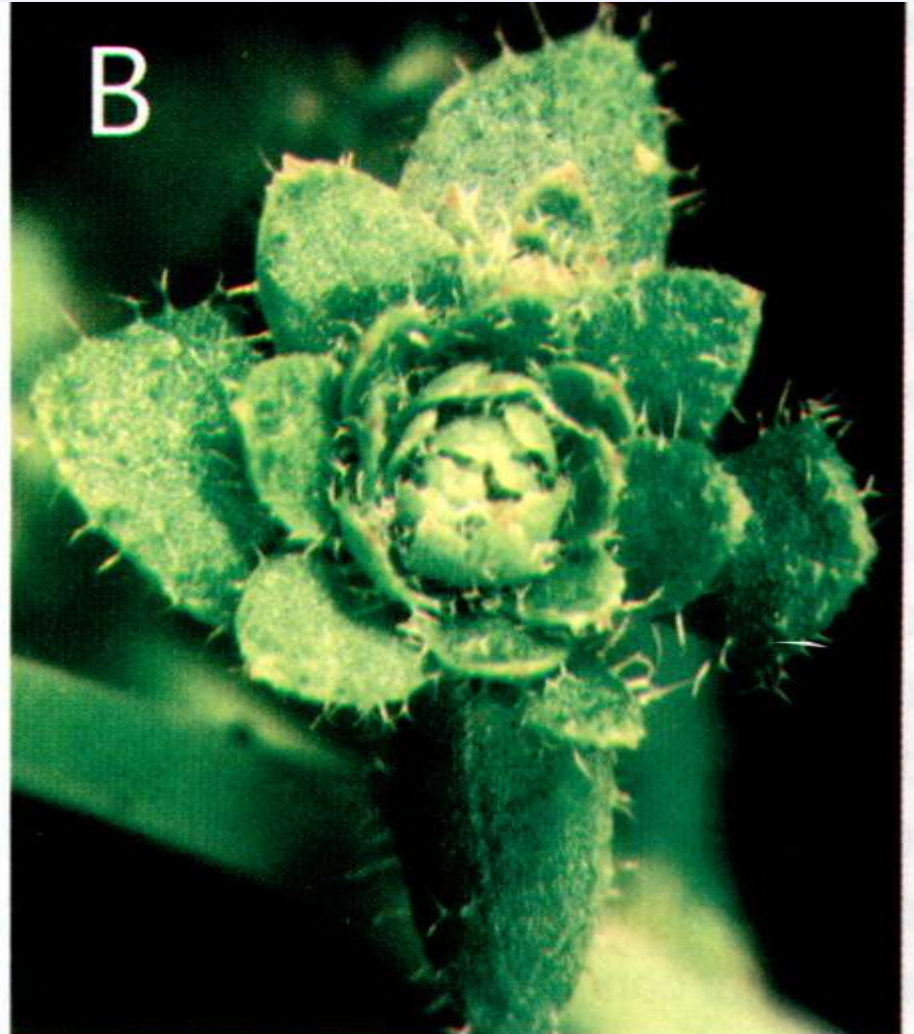
Органы цветка - преобразованные листья.

1790г. «Опыт о метаморфозе растений»

1810г. «Учение о цветке»

Дикий тип

ap1 ap3 ag



Фенотип тройного мутанта – убедительное свидетельство в пользу фоллиарной теории морфогенеза цветка Гете

Несмотря на разнообразие
структуры цветка, его развитие
у разных видов
контролируется
консервативными
гомеозисными генами



Arabis



Matthiola



Syringa



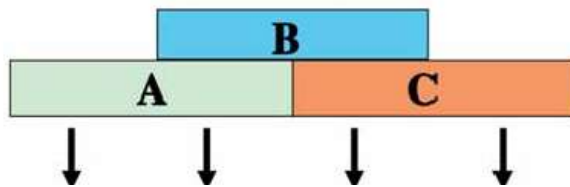
Anthirrhinum



Trillium

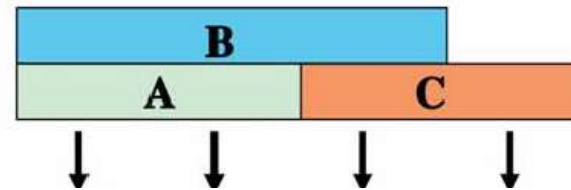
Различия структуры - результат изменения особенностей экспрессии консервативных регуляторных генов

Генетическая модель развития цветка



Чашелист. Лепестки Тычинки Плодолистики

Классический вариант экспрессии генов В-класса



Лепестковидные Тычинки Плодолистики
органы

Измененный вариант экспрессии генов В-класса

Гомеозисные мутации найдены и у дрозофилы

Муха
дикого типа



<http://www.tmd.ac.jp/artsci/biol/textlife/fruitfly.jpg>

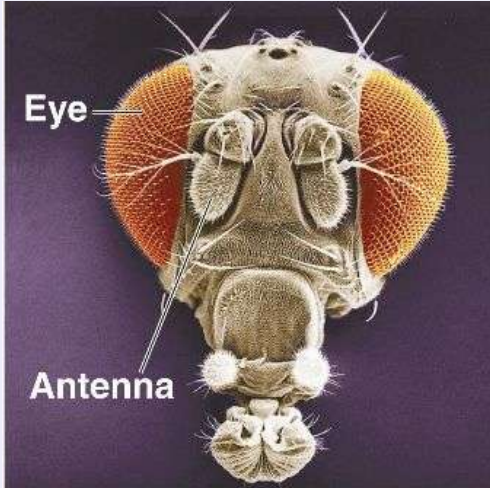
Мутант
bithorax



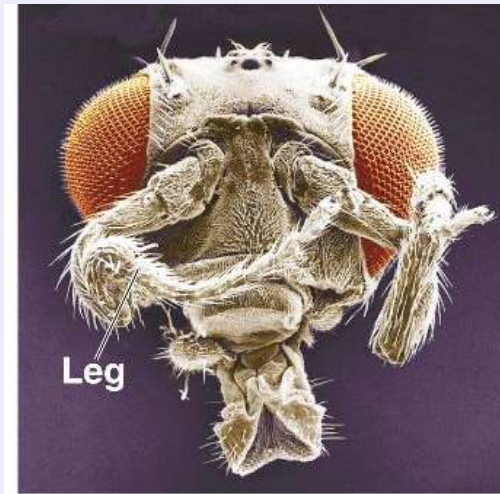
http://www.mun.ca/biology/scarr/Bithorax_Drosophila.html

Кэлвин Бриджес 1915

антенна → нога (доминантная мутация *antennapedia*)



Wild type



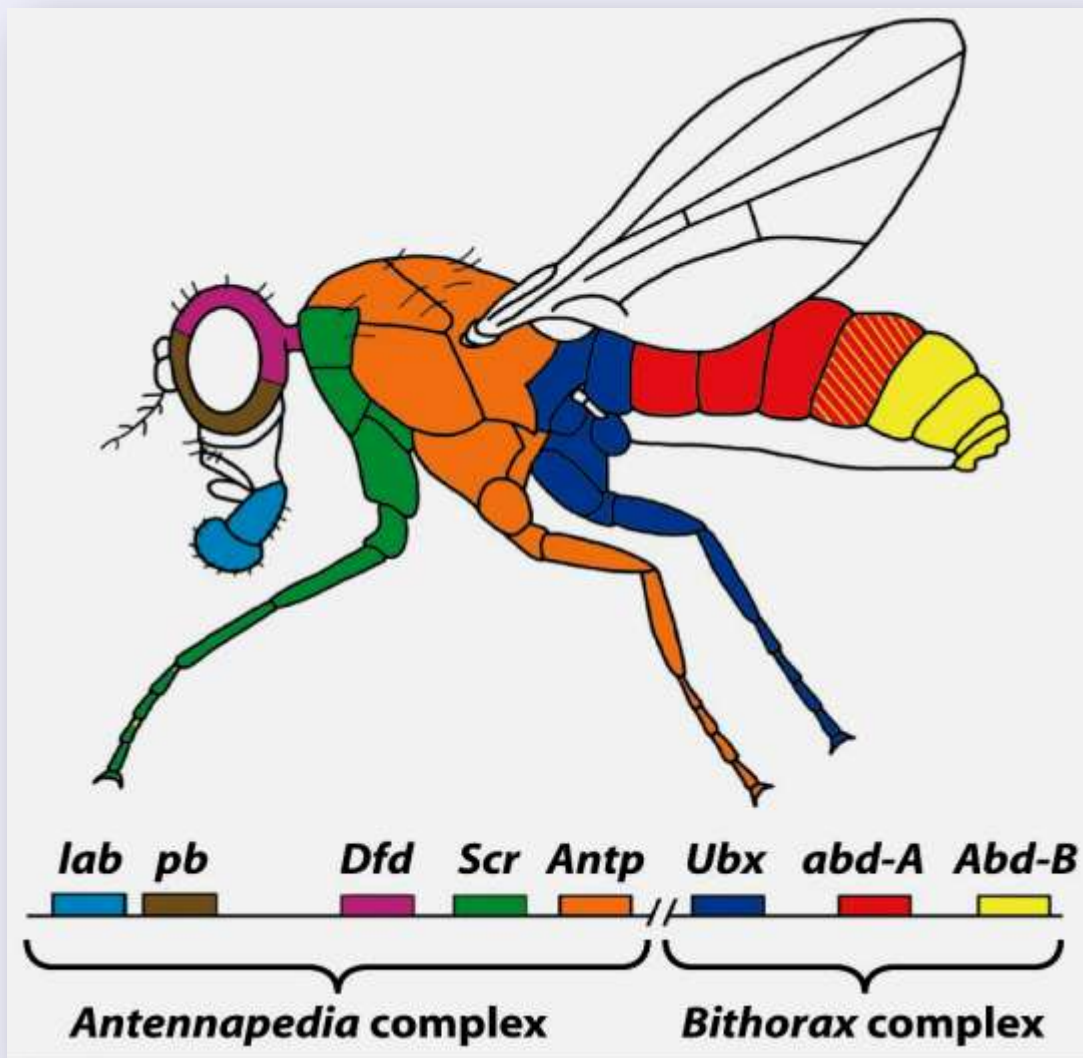
Mutant

трансформация передних разделов в задние из-за того, что у этого мутанта ген *АНТР* экспрессируется в голове, а не груди

<http://udel.edu/~mcdonald/statprobability.html>

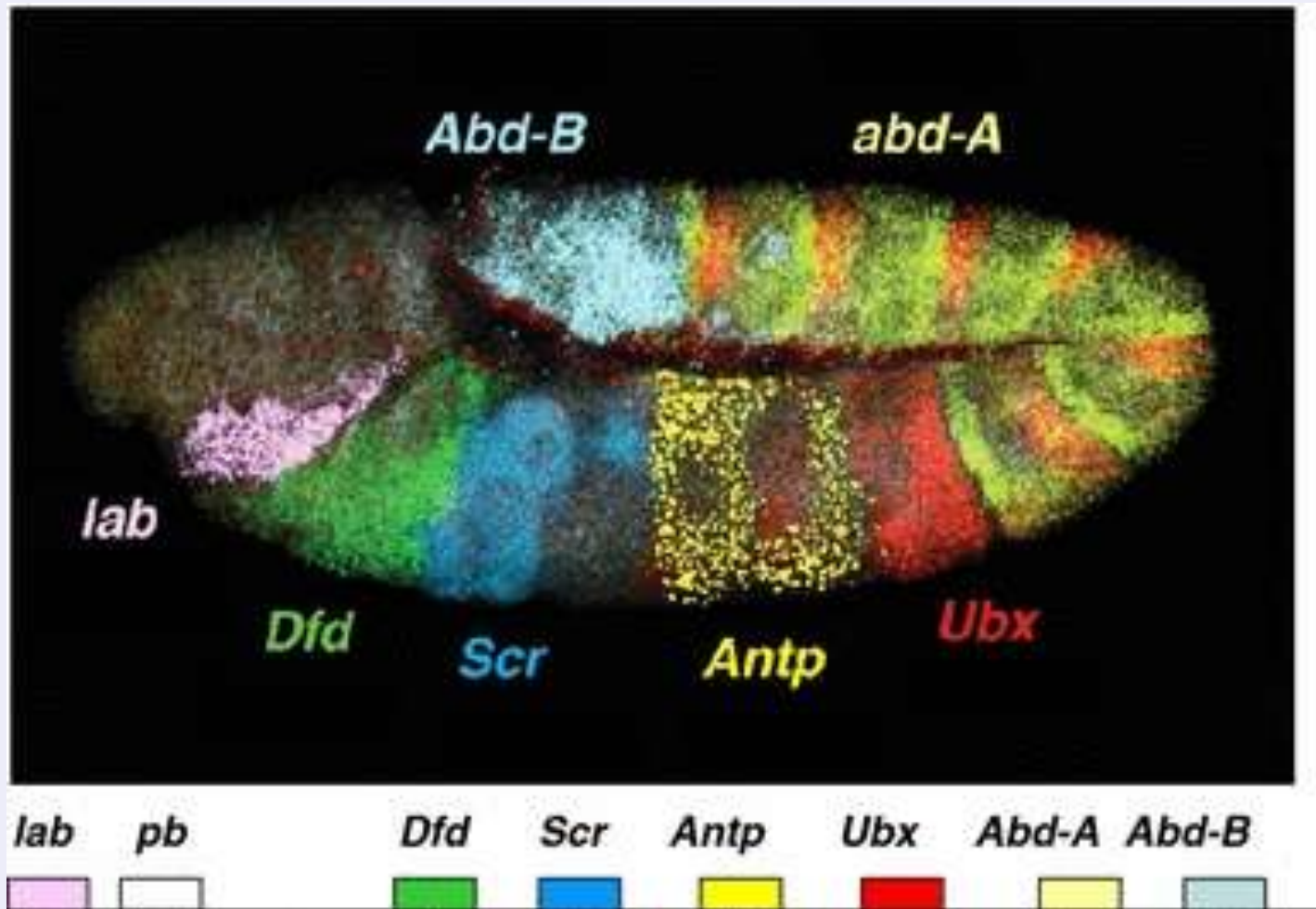
<http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000uIWWuDlze2s>

Одинаков порядок расположения генов на хромосоме 3 и порядок расположения контролируемых ими органов на теле будущей мухи



http://www.bio.miami.edu/dana/pix/Hox_drosophila.jpg

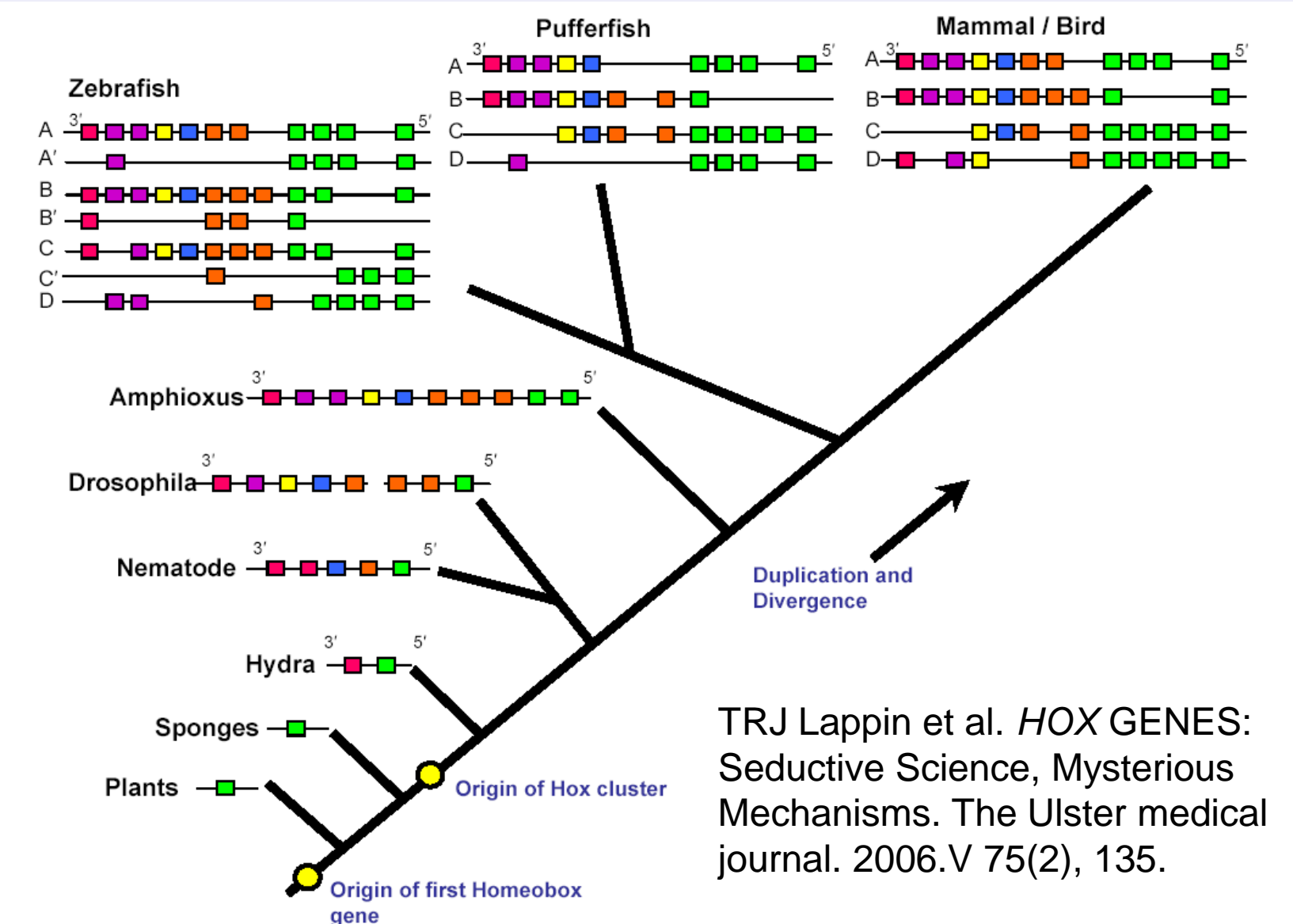
Расположение доменов экспрессии в эмбрионе мухи коллинеарно расположению генов на хромосоме 3



Confocal image of septuple in situ hybridization exhibiting the spatial expression of Hox gene transcripts in a developing *Drosophila* embryo: lab labial, Dfd deformed, Scr sex combs reduced, Antp antennapedia, Ubx ultrabithorax, Abd-A abdominal-A, Abd-B abdominal-B. from [183Lemons D, McGinnis W (2006) Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 313:1918–1922]

A.E. Osbourn, B. Field. *Cell Mol Life Sci.* 2009 December; 66(23): 3755–3775.

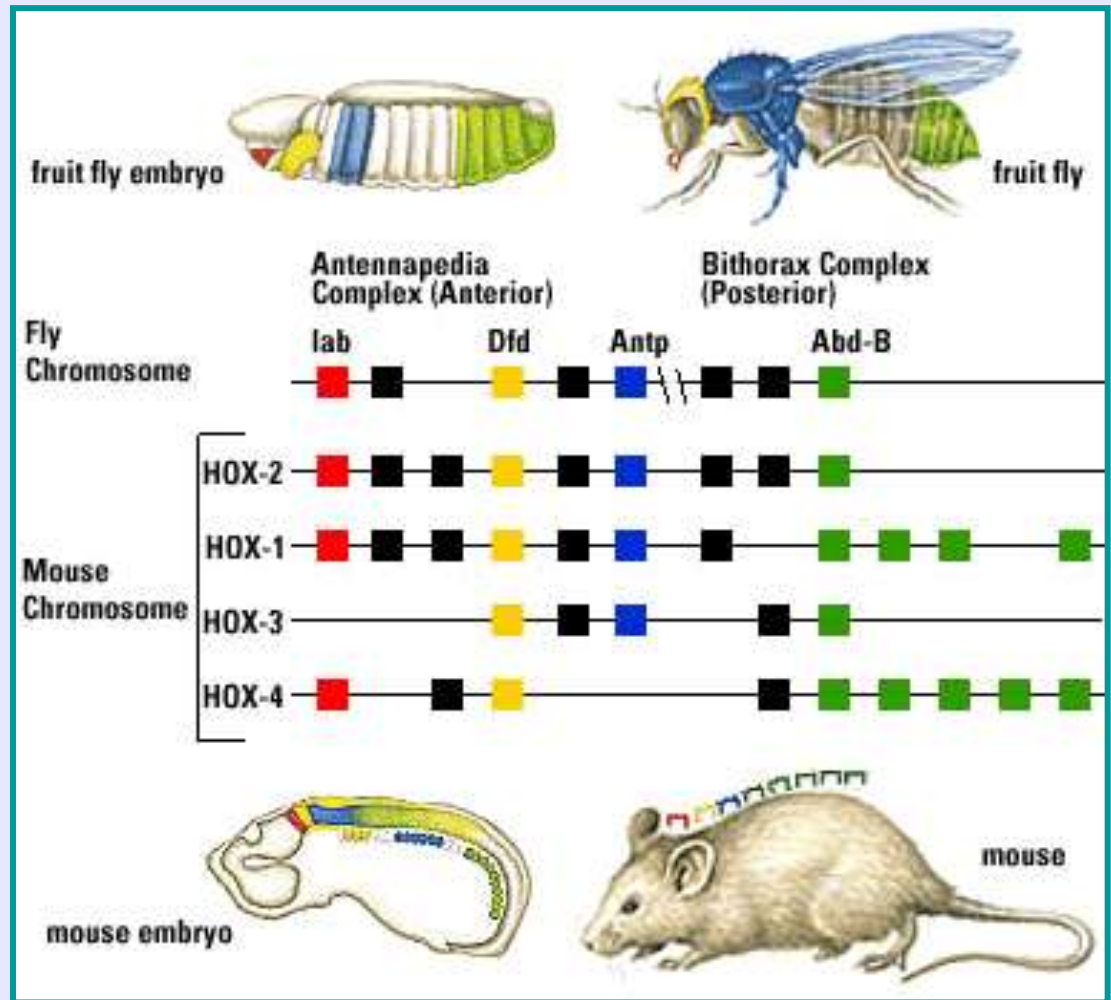
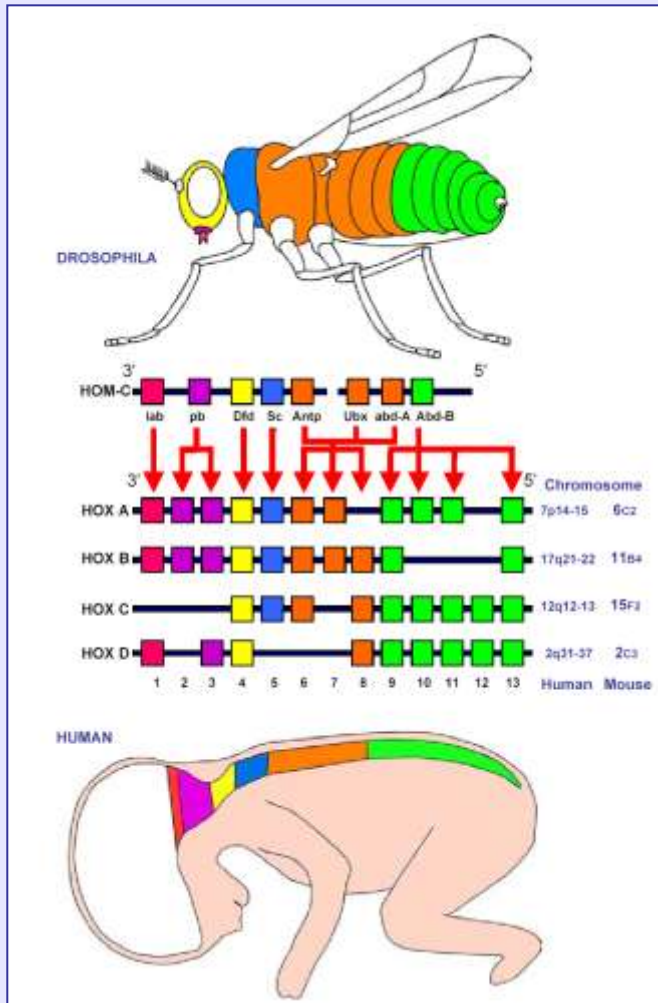
Нох-гены найдены у всех исследованных организмов (в геномах губок, гидры, пиявок, нематод, амфибий, рыб, млекопитающих).



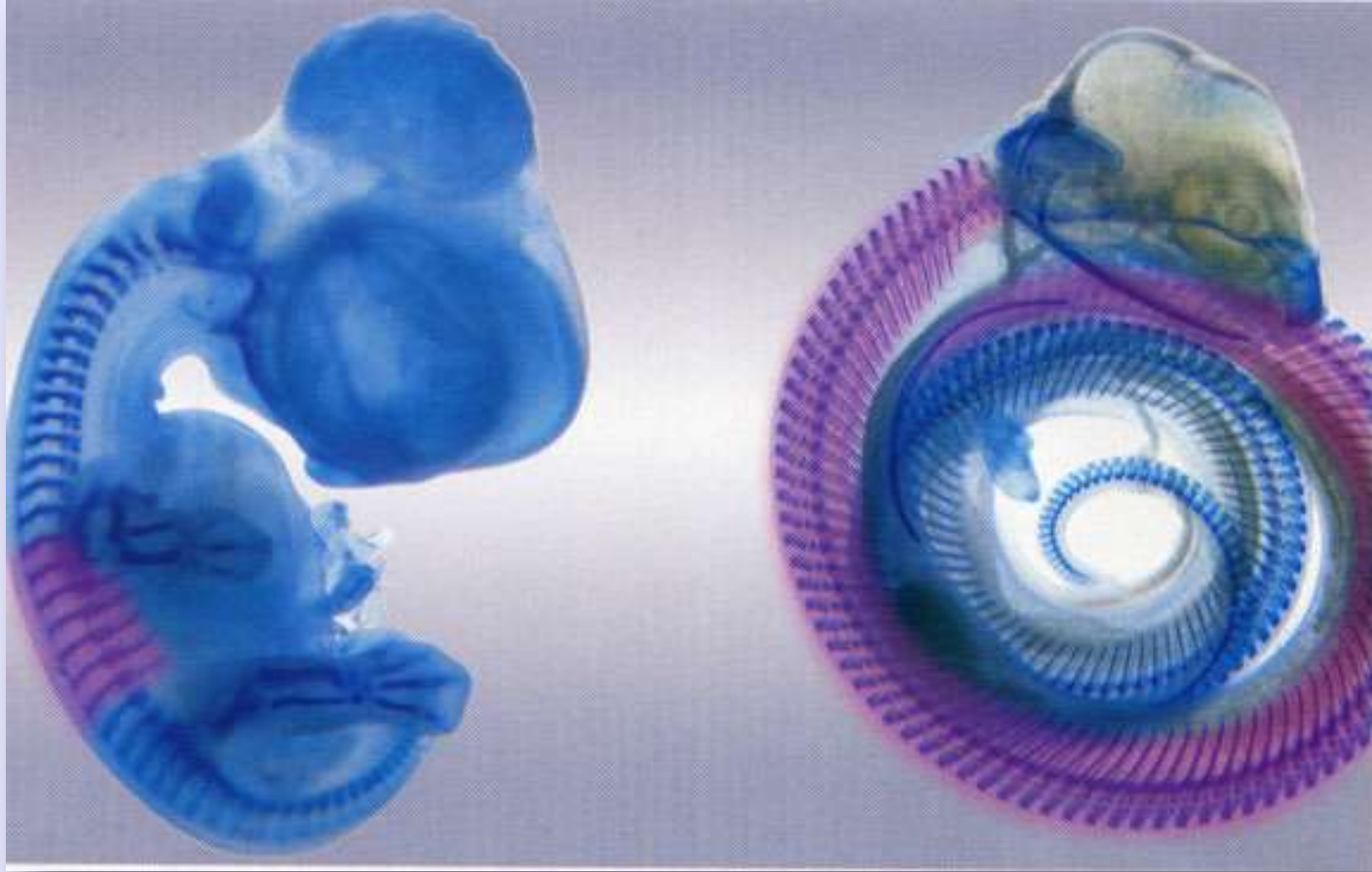
TRJ Lappin et al. *HOX GENES: Seductive Science, Mysterious Mechanisms*. The Ulster medical journal. 2006.V 75(2), 135.

Это древние гены, появившиеся >1000 млн лет назад. Усложнение строения организмов сопровождалось дубликацией и дивергенцией их функции

Консервативные гомеозисные гены животных размечают разные участки тела в эмбриогенезе разных видов животных

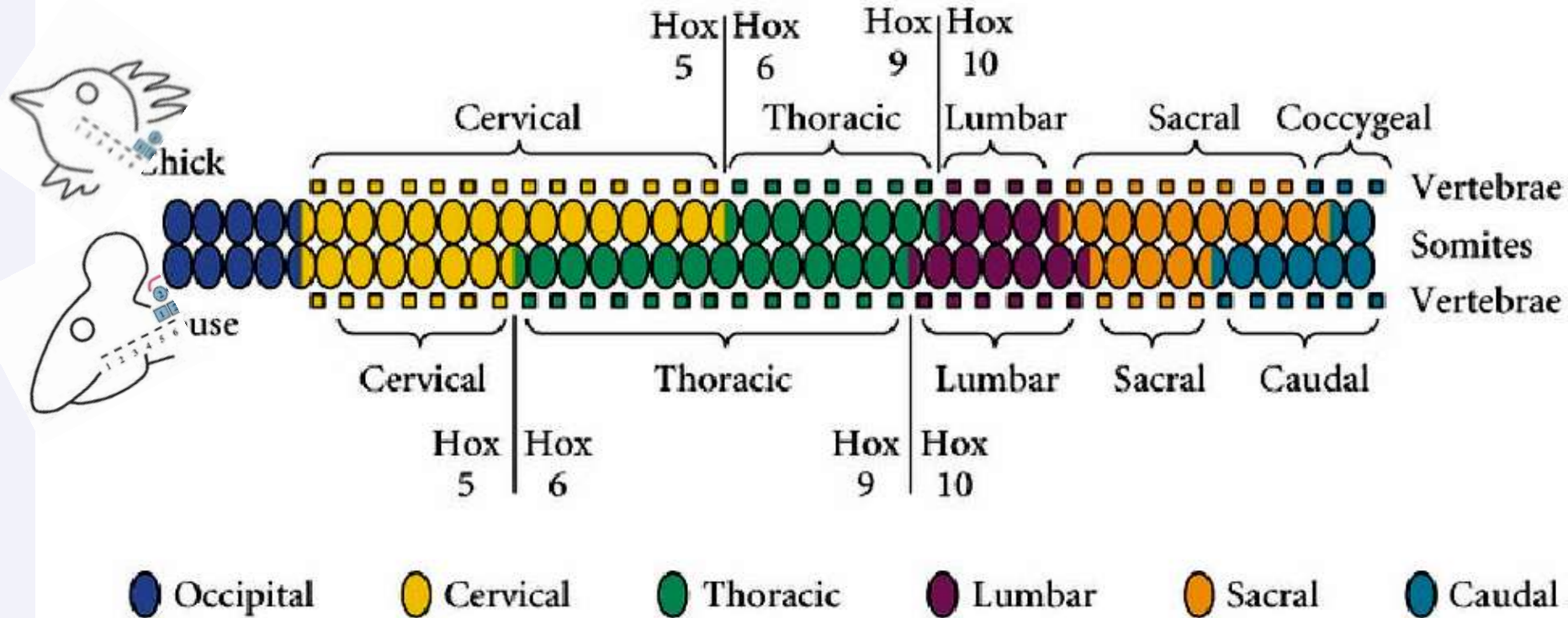


Ген *Нох с-6* контролирует образование грудного отдела позвоночника



У курицы ген *Нохс-6* отвечает за образование 7 грудных позвонков, образующих ребра. У змеи домен его экспрессии начинается от головы и простирается до клоаки → тело змеи = сплошная грудь.

<http://www.naturalhistorymag.com/features/061488/the-origins-of-form?page=4>



Сравнение экспрессии Нох-генов в курином и мышинном эмбрионе выявляют различия в протяженности **(но не порядке!)** доменов экспрессии некоторых генов. Так, ген Нох 5 в длинной шейной области курицы экспрессировался в > чем 13 сомитах, а у мыши - в 6-7 сомитах. **Т.е. НОХ-гены действительно детерминируют разные отделы тела эмбриона вдоль передне-задней оси!**

Гомеобоксные НОХ-гены считаются «краеугольным камнем» процессов развития у животных.

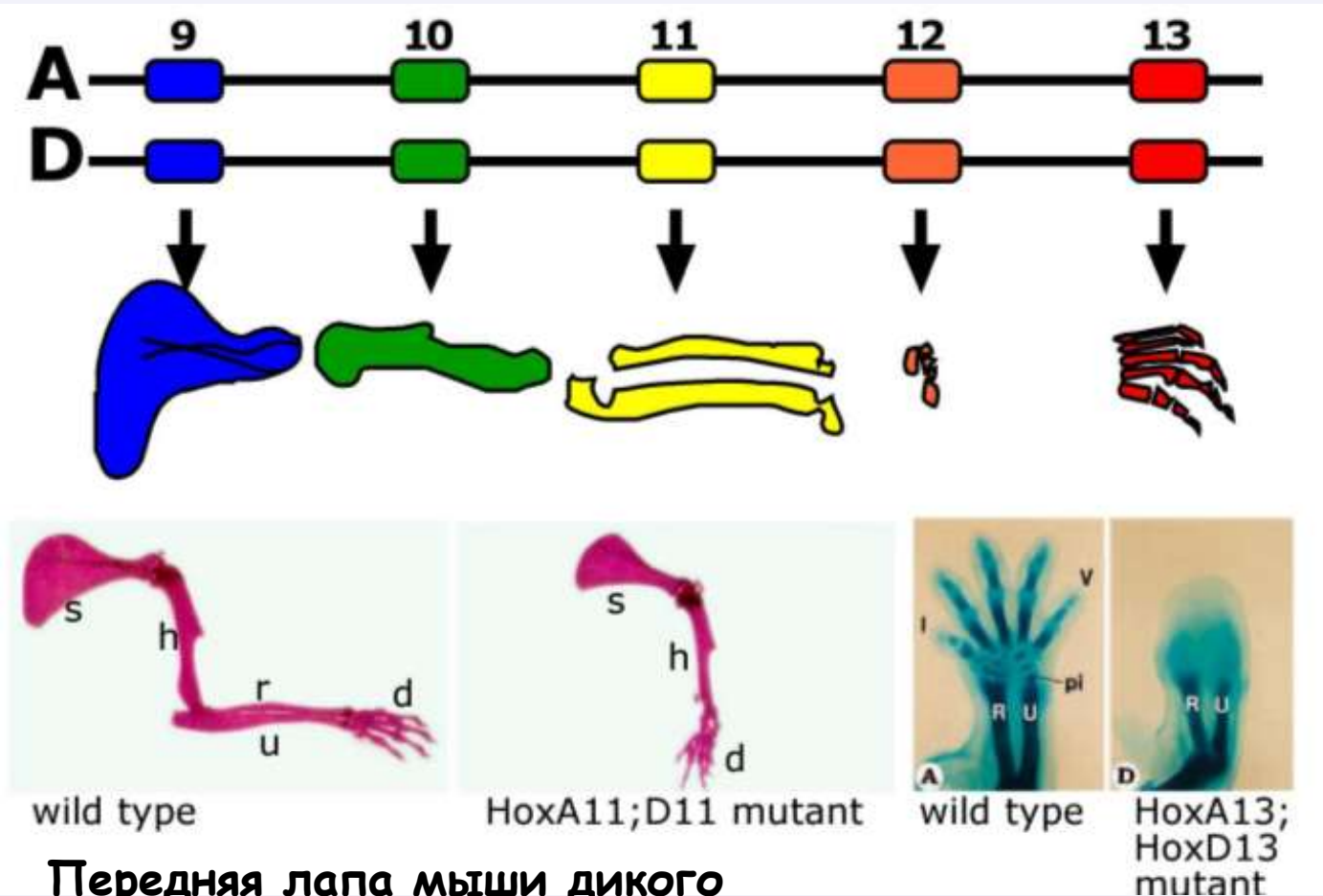


The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 1995 г

Эдвард Льюис, Кристиа Нюсляйн-Фольхард и Эрик Вишаус за открытия, касающиеся генетического контроля на ранней стадии эмбрионального развития

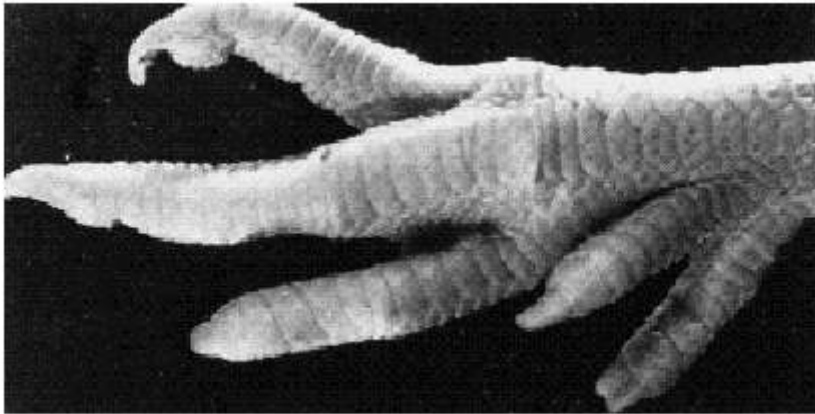
НОХ-гены включаются в онтогенезе несколько раз. Они не только размечают участки тела вдоль передне-задней оси, но играют важную роль в развитии многих органов

HOX- гены кластеров A и D размечают разные участки конечностей. О их роли в этом процессе свидетельствует фенотип мутантов (дефекты скелета конечностей)

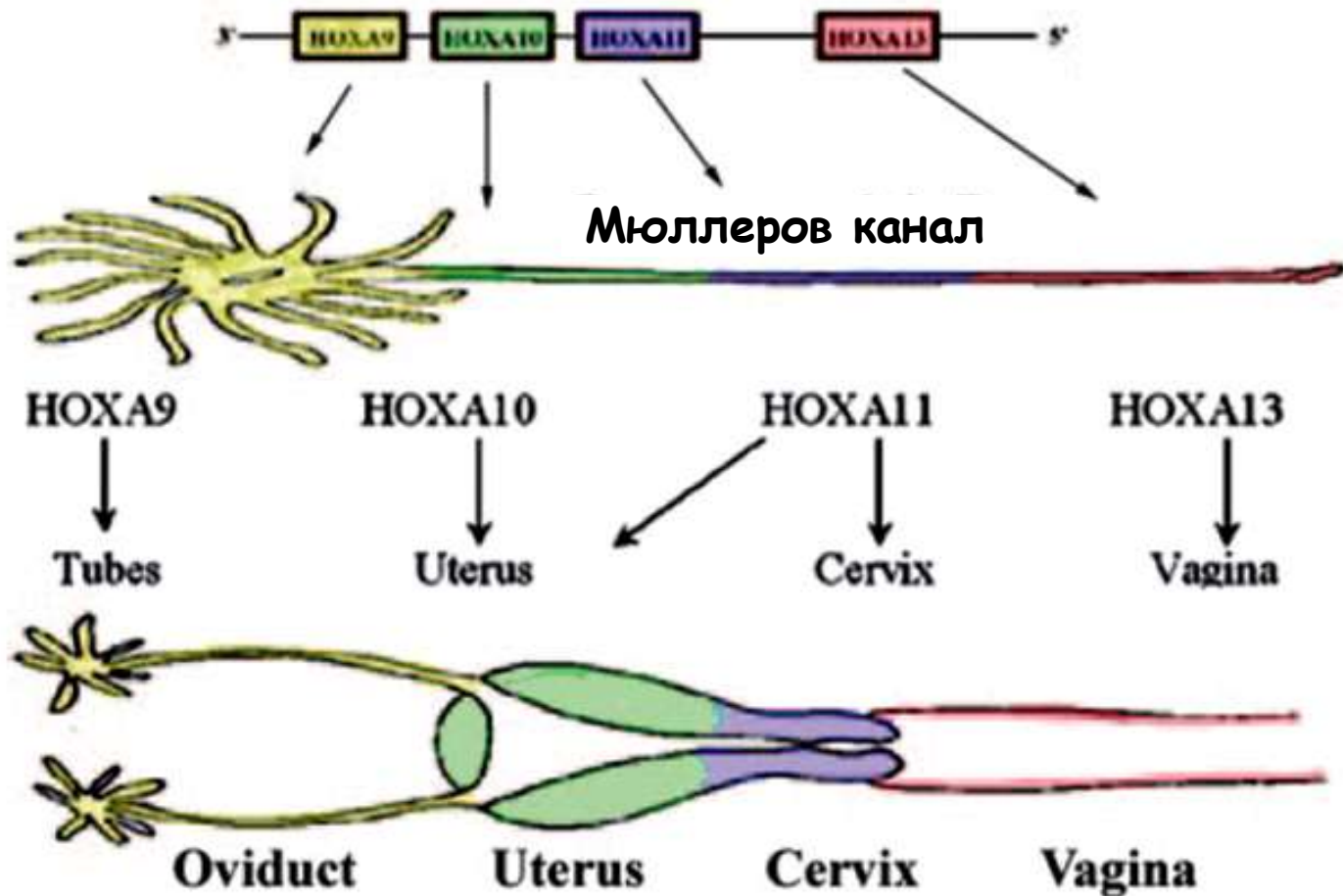


Передняя лапа мыши дикого типа и двойного мутанта HOXA11 + HOXD11 (одиночные = дикий тип).

Мутации полидактилии выявлены у разных организмов. Фенотипическое сходство связано с мутациями в ортологичных HOX-генах.



Домены экспрессии генов HOXA9, HOXA10, HOXA11, и HOXA13 на разных этапах развития репродуктивной системы женщин

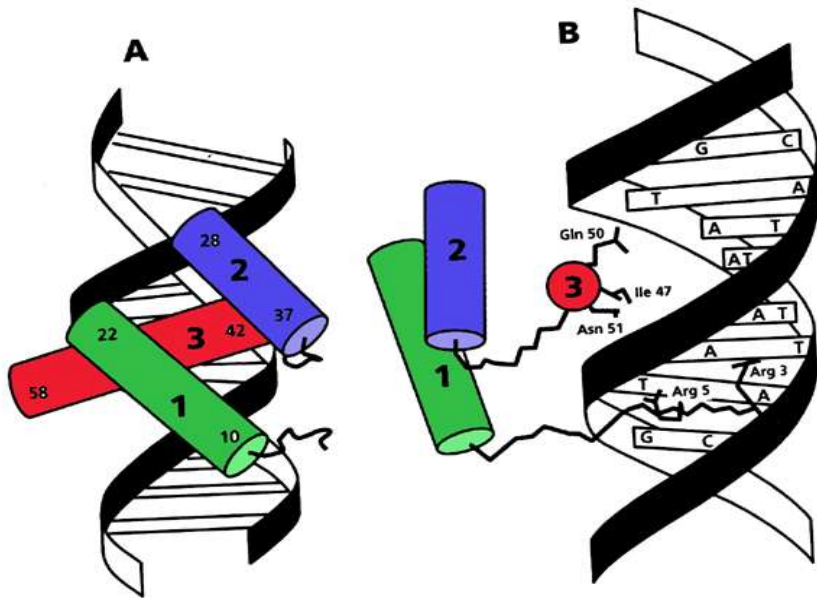


Видна коллинеарность доменов экспрессии HOX-генов в развивающейся репродуктивной системе и места их локализации на хромосоме

Все гомеозисные гены кодируют белки с высоко консервативным **гомеодоменом**. Сами гены назвали гомеобокс-содержащими или **НОХ-генами**



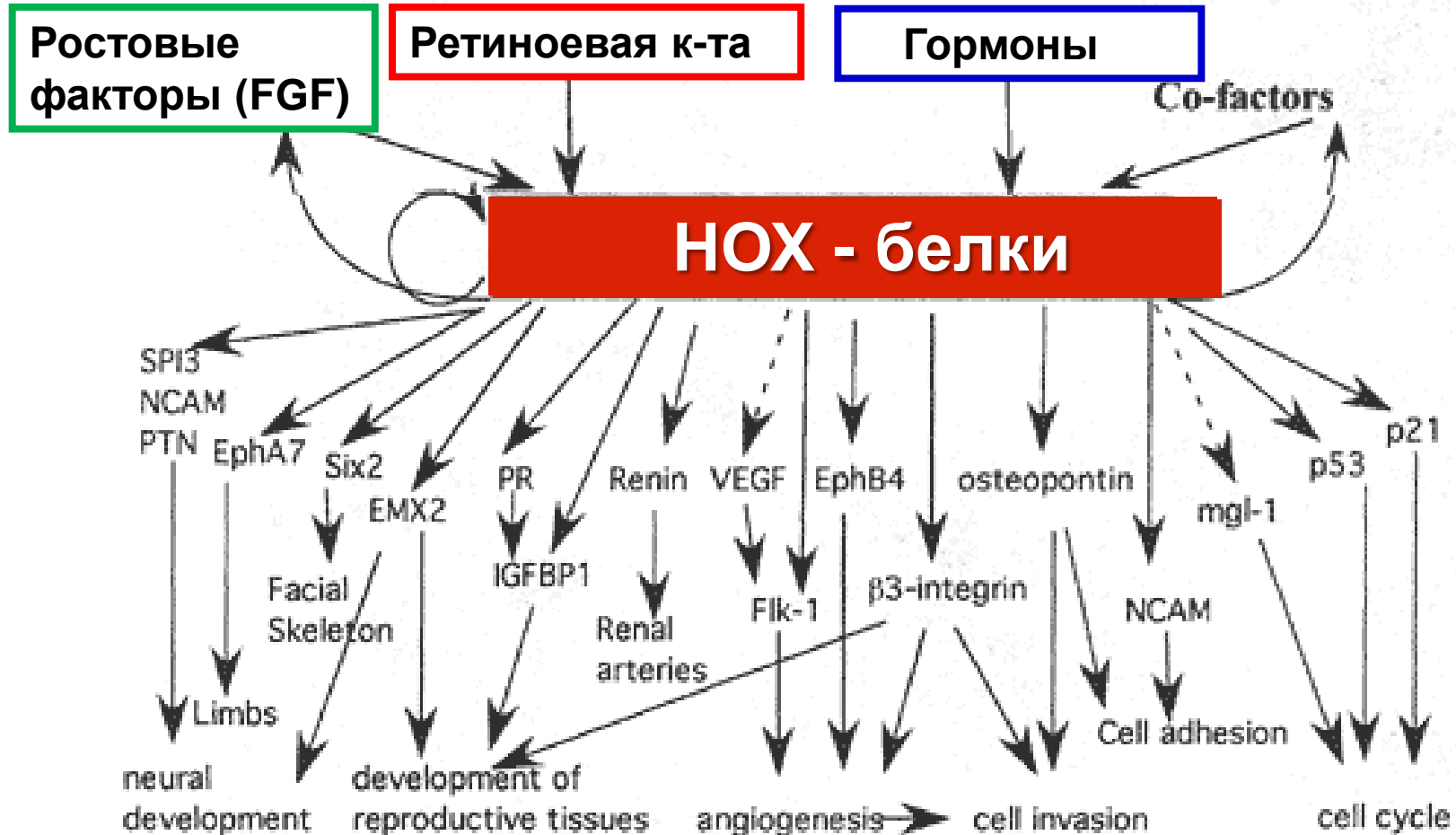
Гомеодомен - ДНК - комплекс



Гомеобоксные гены беспозвоночных (дрозофилы) иногда обозначают как **НОМ**, а позвоночных - **НОХ**- гены

НОХ-гены включают сотни генов - мишеней

Как регулируется работа самих НОХ-генов?

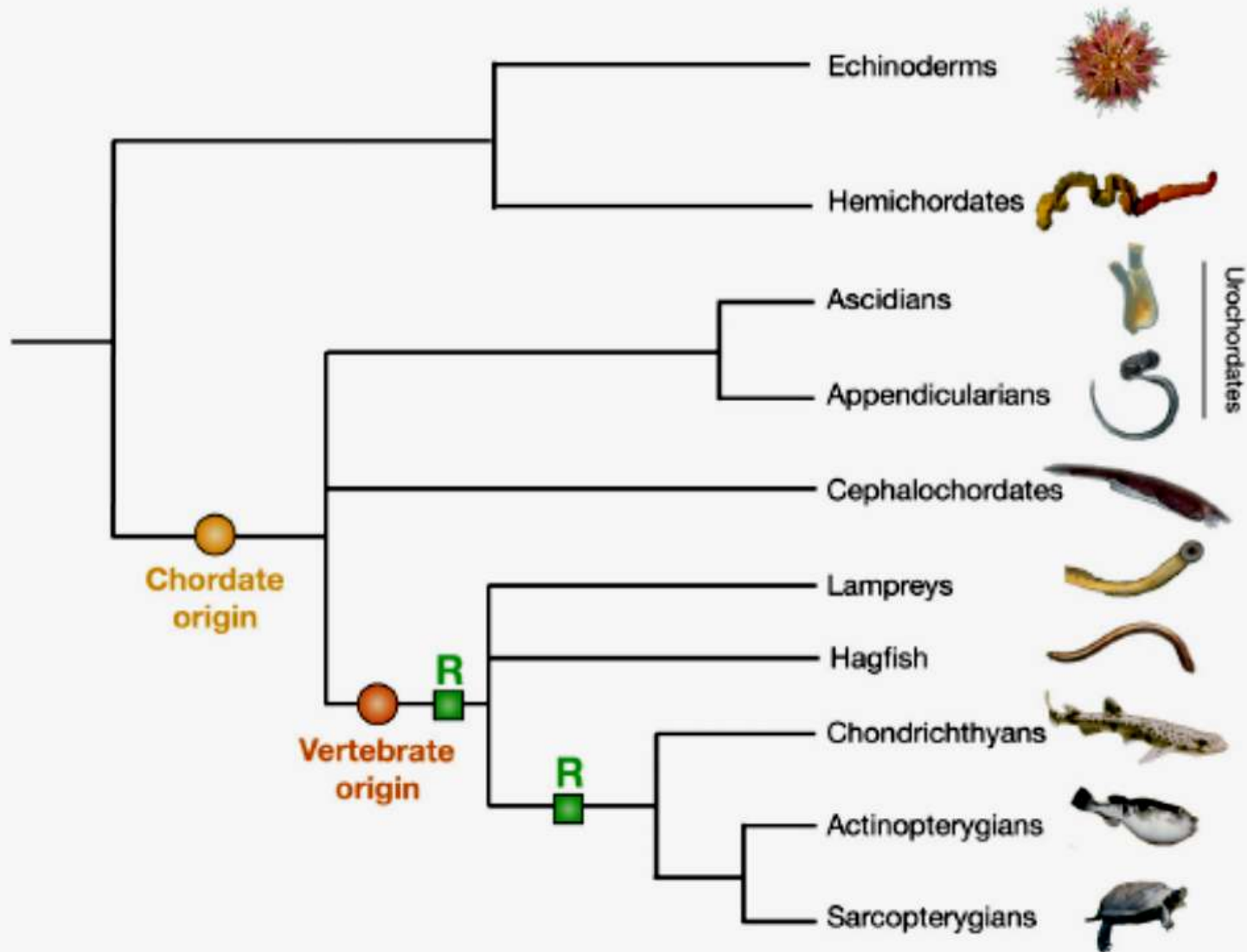


Органогенез/ дифференцировка

Миграция/ адгезия кл.

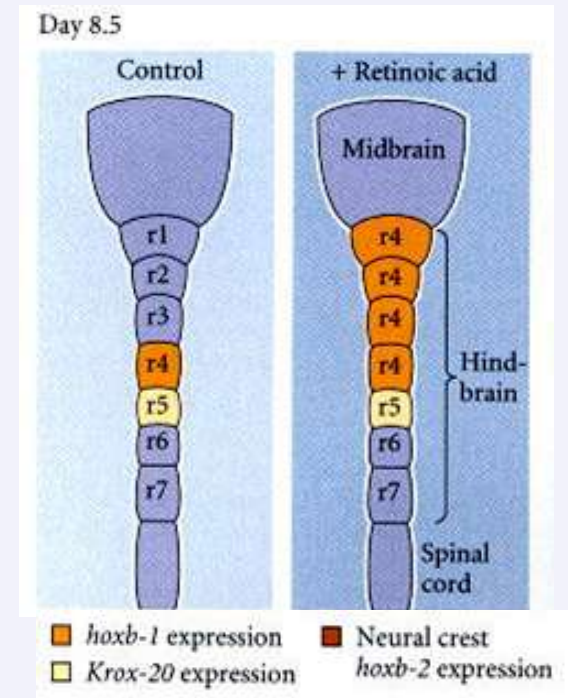
Деления кл.

У хордовых и позвоночных в регуляции экспрессии генов важную роль играет ретиноевая кислота (производное от витамина А)



Обработка эмбрионов РК вызывает замещение средних отделов спинного мозга задними отделами.

При очень высоких концентрациях наблюдалось недоразвитие задних отделов эмбриона. Это связано с регуляцией РК-экспрессии НОХ-генов.

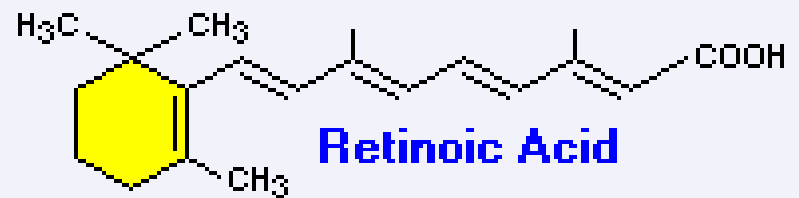
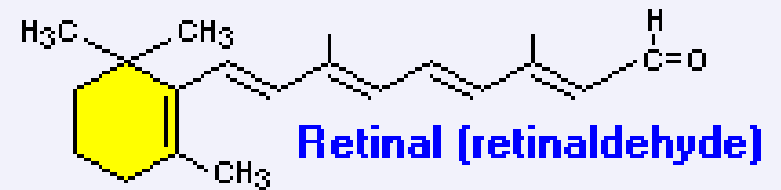
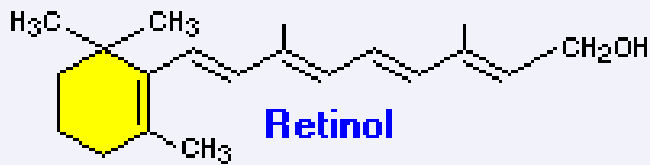


Изменение особенностей экспрессии НОХ-генов мышцы после обработки РК (как при доминантных мутациях)

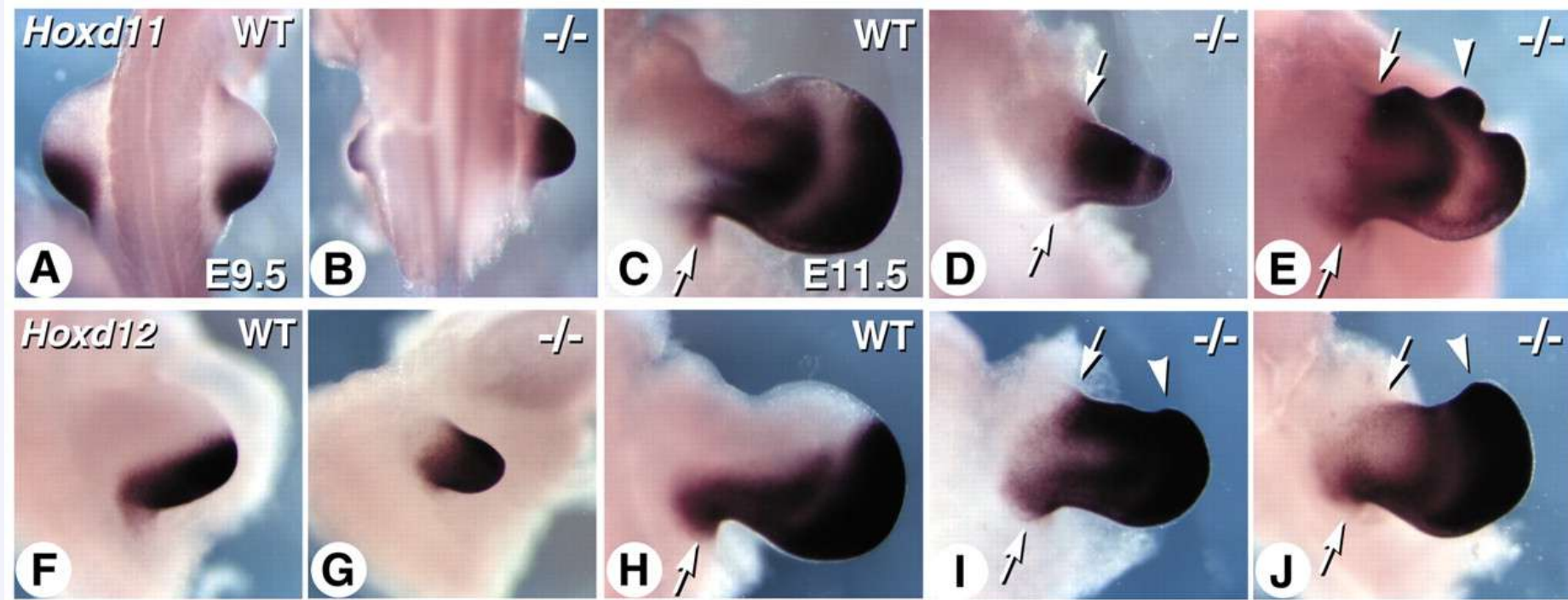
Синтез ретиноевой кислоты

ЭТАНОЛ

АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА



Алкоголь через РК влияет на экспрессию очень многих генов, которые важны как на самых ранних этапах эмбриогенеза, так и на стадии гаструляции и органогенеза (например, на развитие конечностей)

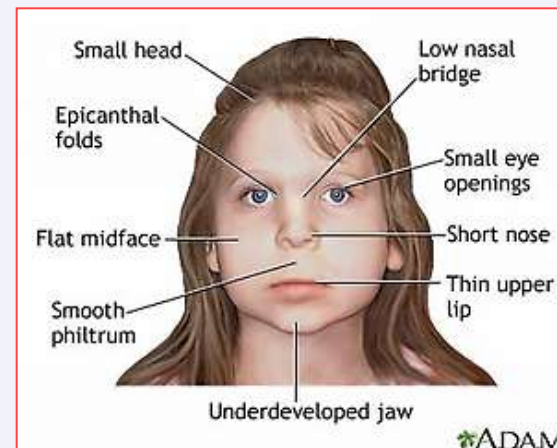


Нарушение экспрессии генов *Hoxd11* (A-E) и *Hoxd12* (F-J) при нарушении образования РК.

Karen Niederreither *Development* 129, 3563-3574 (2002)

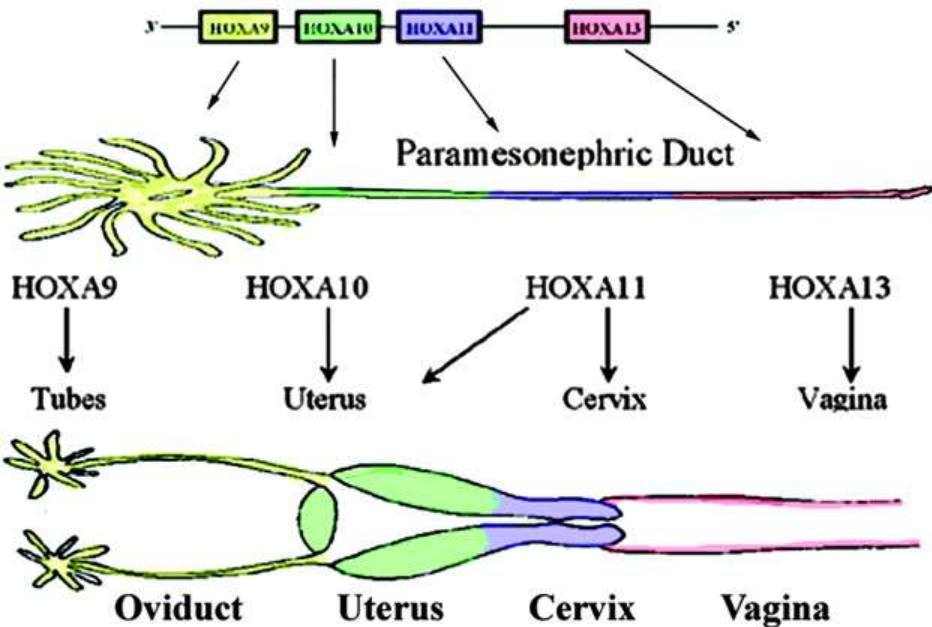
Эти данные объясняют, почему употребление алкоголя во время беременности ведет к выраженным аномалиям у новорожденных, которые получили название **эмбрионального алкогольного синдрома** (Fetal Alcohol Syndrome - FAS).

Алкоголь через РК влияет на экспрессию многих НОХ-генов, которые важны не только на самых ранних этапах эмбриогенеза, но и на стадии гаструляции и органогенеза

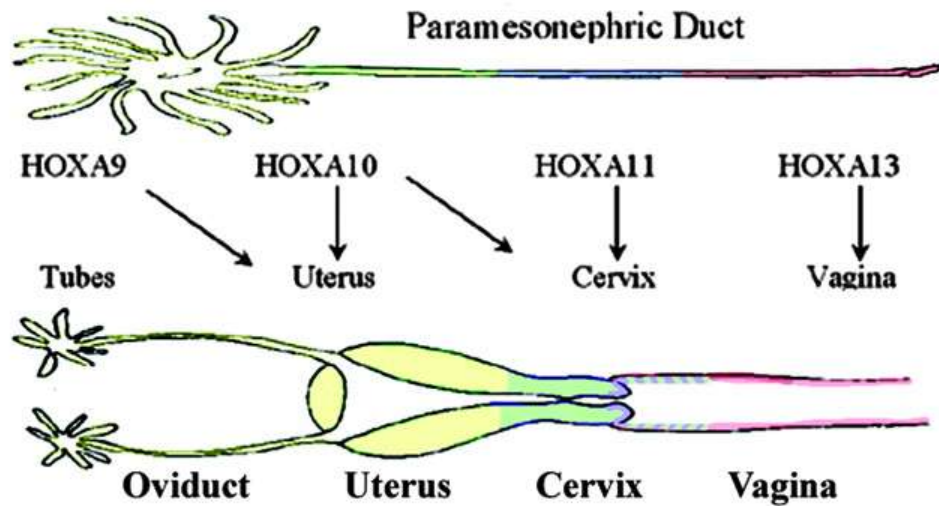


Важную роль в регуляции экспрессии HOX-генов играют гормоны - в первую очередь - эстрадиол (эстроген), прогестерон, тестостерон

HOX Code of the Developing Mullerian System



Alteration of the HOX Code by DES



Внутриматочные инъекции синтетического эстрогена DES (Diethylstilbestrol) приводили к смешению доменов экспрессии HOX-генов к заднему концу и вызывали стерильность

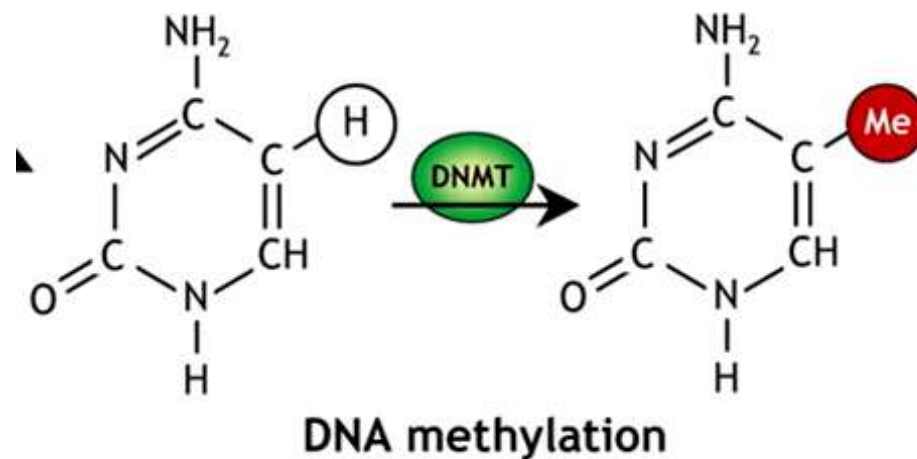
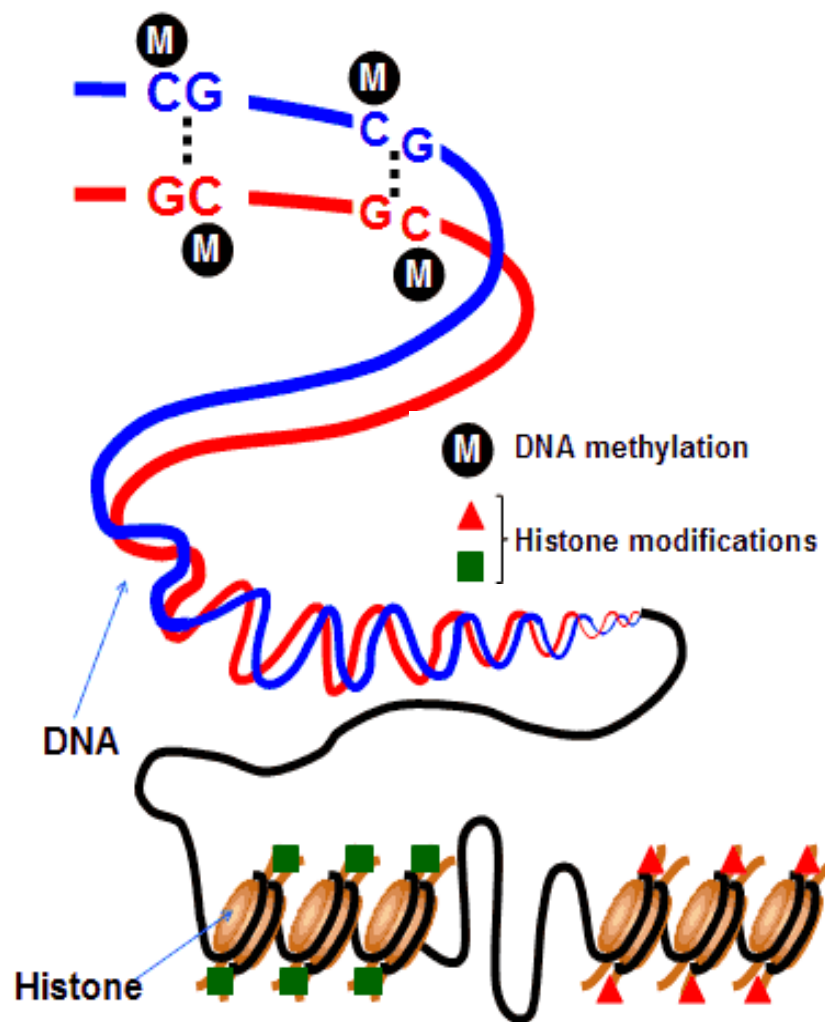
Изменения экспрессии регуляторных генов, контролирующих развитие, приводят к нарушению развития (уродства). Однако эти нарушения, как правило, не наследуются, т.к. не связаны с мутациями (**модификации**)

Однако есть и особый тип модификаций, которые могут передаваться через деления клеток и даже сохраняться потомками.

Это **эпигенетические изменения** (эпи - над), т.е. длительно сохраняющиеся изменения экспрессии генов, не связанные с изменениями последовательностей ДНК и РНК.

Именно эти механизмы используются для того, чтобы вызвать молчание 90% генов в каждом типе специализированных клеток.

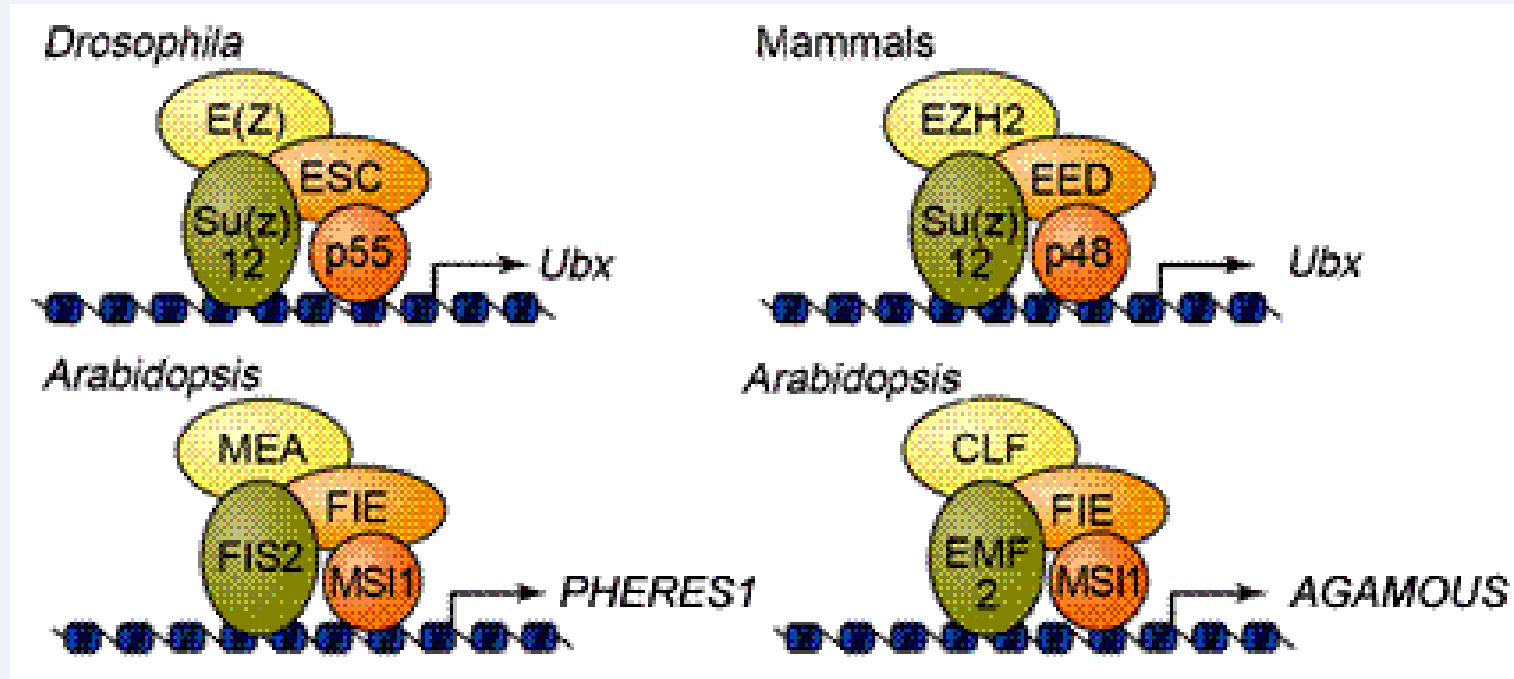
Эпигенетические изменения связаны главным образом с процессами метилирования ДНК и гистоновых белков, которое осуществляется специальными ферментами



Это взаимосвязанные процессы.

Ферменты работают в составе сложных белковых комплексов

Белковые комплексы Polycomb, метилирующие гистоны



- подавляют транскрипцию генов, изменяя структуру хроматина (белок Su(z) обладает гистон-метилтрансферазной активностью).
- их мишенями у животных являются HOX-гены, а у растений - HOX и MADS

Hennig et al. MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. Trends Cell Bio 295-302. 2005, 15 (6): 295-302.

Главное отличие эпигенетических механизмов регуляции работы генов от других механизмов, которые используются в регуляции развития, заключается в долговременности их действия, что создает впечатление закрепления изменений на уровне генетического кода.

Эпигенетические механизмы объясняют многие удивительные феномены.

Кастовая структура общественных насекомых также связана с эпигенетическими механизмами

У пчел матка (царица), нянька и сборщица меда имеют одинаковый генотип, но разный эпигенотип, что связано с характером кормления

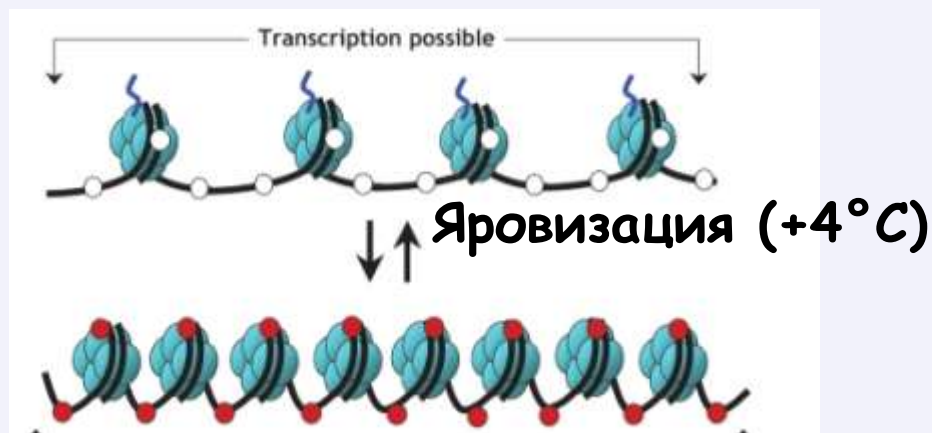


Холодовое воздействие также может вызвать эпигенетическое замолкание генов в растениях

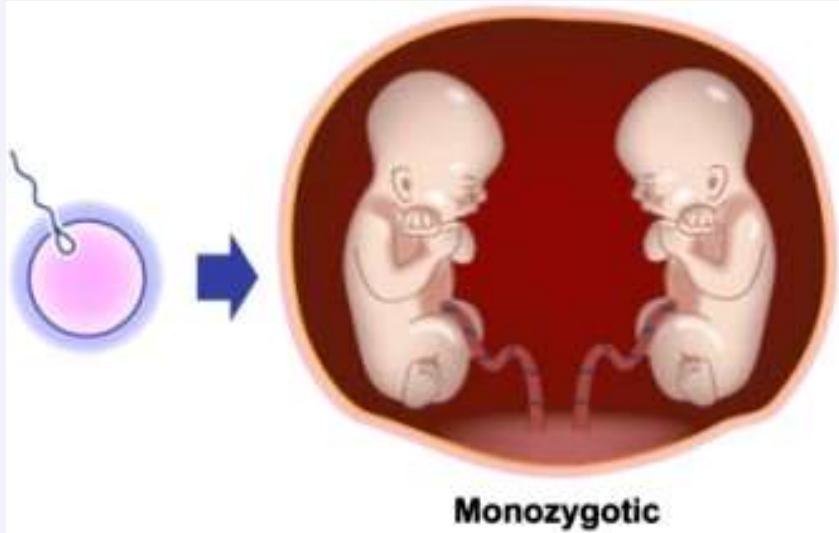
Brassica oleracea

Растение 2-х-летней капусты, которое не яровизировалась 5 лет. Оно не цветет, т.к. активен ген *FLC* - репрессор цветения

Растение того же вида после яровизации цветет, т.к. холод вызывает эпигенетическое замолкание *FLC* (метилирование гистонов и ДНК вызывает компактизацию хроматина).



Внешняя среда вступает в диалог с геномом уже во время внутриутробного развития

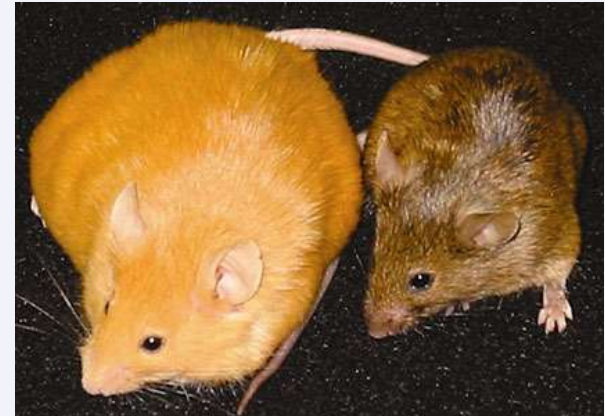


Монозиготные близнецы имеют одинаковый генотип, но у каждого есть своя пуповина и плацента. Микроусловия разные → различие эпигенетических меток (это механизм адаптации к условиям среды).

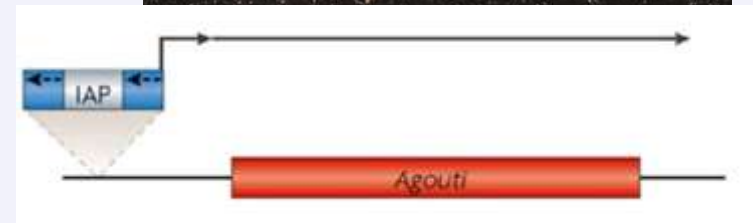
Именно эпигенетическими изменениями объясняют те различия между монозиготными близнецами, которые изредка все же встречаются, несмотря на то, что они имеют одинаковый генотип (их эпигенотип может отличаться!).

Влияние рациона матери на эпигенотип

Мыши с аномально высокой активностью гена *Agouti* имеют желтую окраску, склонны к ожирению, диабету и раку (наследование доминантное)



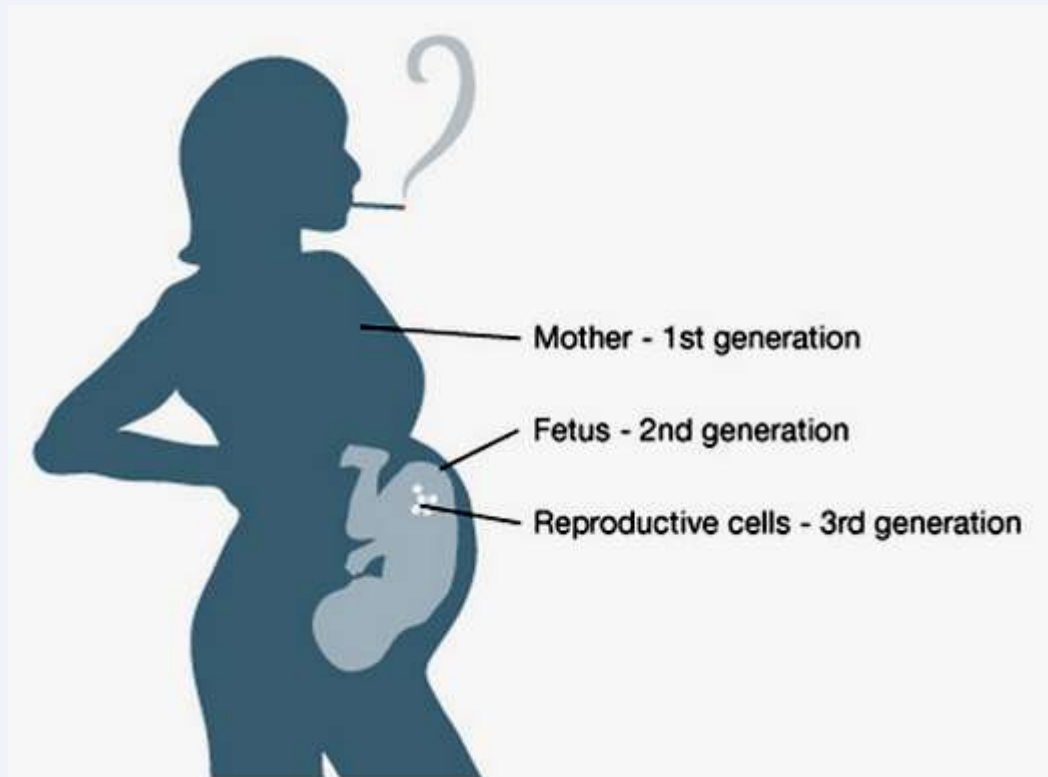
B12, B9, метионин (доноры метильных групп)



sciencewatch.com

Т.е. изменение материнского рациона выключило дефектный ген, несмотря на то, что ни одна буква в «наследственной инструкции» не была переписана.

Вредные привычки и неправильный рацион может влиять на эпигенотип будущих детей и даже внуков

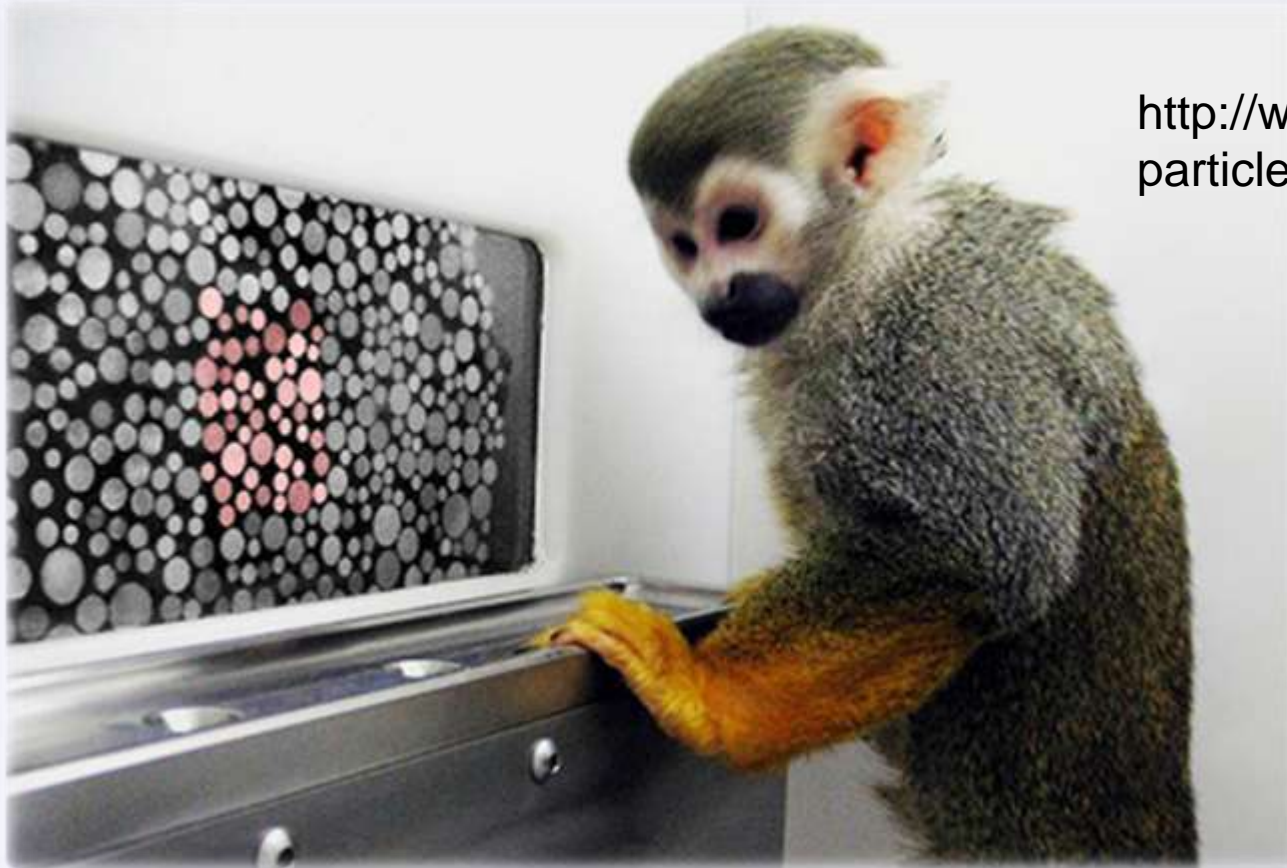


Внешняя среда вступает в диалог с геномом уже во время внутриутробного развития. Поэтому наш образ жизни может помешать реализации генетических программ развития у детей и внуков

Практическое значение исследований генетики развития

1. Управление развитием растений и животных (создание ТО с нужными свойствами)
2. Создание сортов растений и пород животных с ценными аллелями генов (отслеживание их передачи потомству в сложных скрещиваниях)
3. Профилактика заболеваний
4. Диагностика заболеваний
5. Разработка методов генотерапии

ГЕНОТЕРАПИЯ - будущее медицины



<http://www.membrana.ru/particle/14141>

С ПОМОЩЬЮ ГЕНОТЕРАПИИ ОТ ДАЛЬТОНИЗМА БЫЛИ ВЫЛЕЧЕНЫ ОБЕЗЬЯНКИ (2009). В область сетчатки взрослых животных с помощью вируса им был введен фрагмент человеческой ДНК, **кодирующей L-опсин (недостающий рецептор света)**. Эффект - через 16 недель, > 2 лет.

K.Mancuso et al. Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates // *Nature*. Advance online publication 16 September 2009.

ГЕНОТЕРАПИЯ - будущее медицины



Вылечены мышки с генетическим дефектом обоняния - нарушение в работе чувствительных волосков - цилий на поверхности обонятельных нейронов (волоски «отлавливают» молекулы летучих веществ)

Ученые наносили раствор с частицами ретровируса с нормальной копией гена *IFT88* на обонятельный эпителий мышей в течение 3-х дней. Через 10 дней мыши стали ощущать запахи, через 14 дней обоняние восстановилось полностью и мыши поправились на 60%.

McIntyre et al. Gene therapy rescues cilia defects and restores olfactory function in a mammalian ciliopathy model. Nature Medicine 2012. V18, P 1423-1428.