

Inżynieria genetyczna INGE5

Michał Mikula

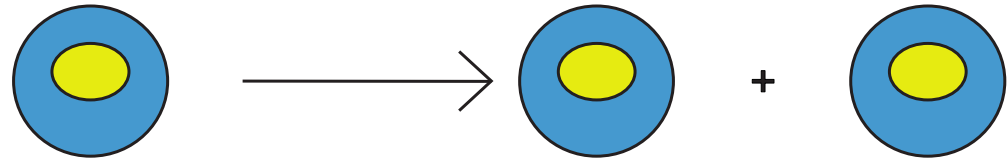
Zakład Genetyki
Centrum Onkologii-Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie

email: mikula.michal@gmail.com

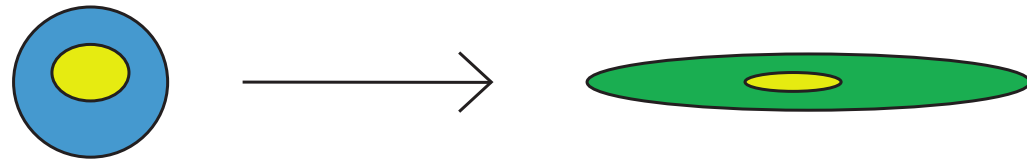
<http://www.ire.pw.edu.pl/~trubel/dydaktyka/inge/>

Los komórek

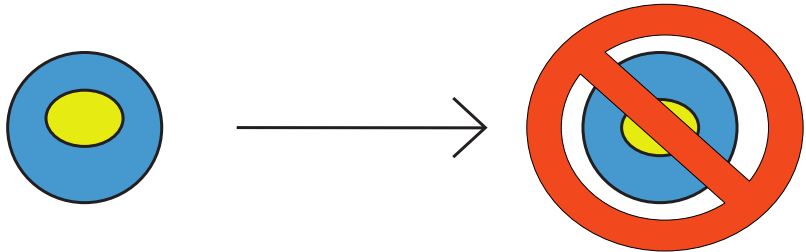
- ▶ **Podział komórkowy – Mitoza**
(dwie identyczne potomne komórki)



- ▶ **Różnicowanie komórek –**
zmiana struktury i specjalizacja
komórek do pełnienia określonych
funkcji



- ▶ **Programowana śmierć komórki**
- apoptoza

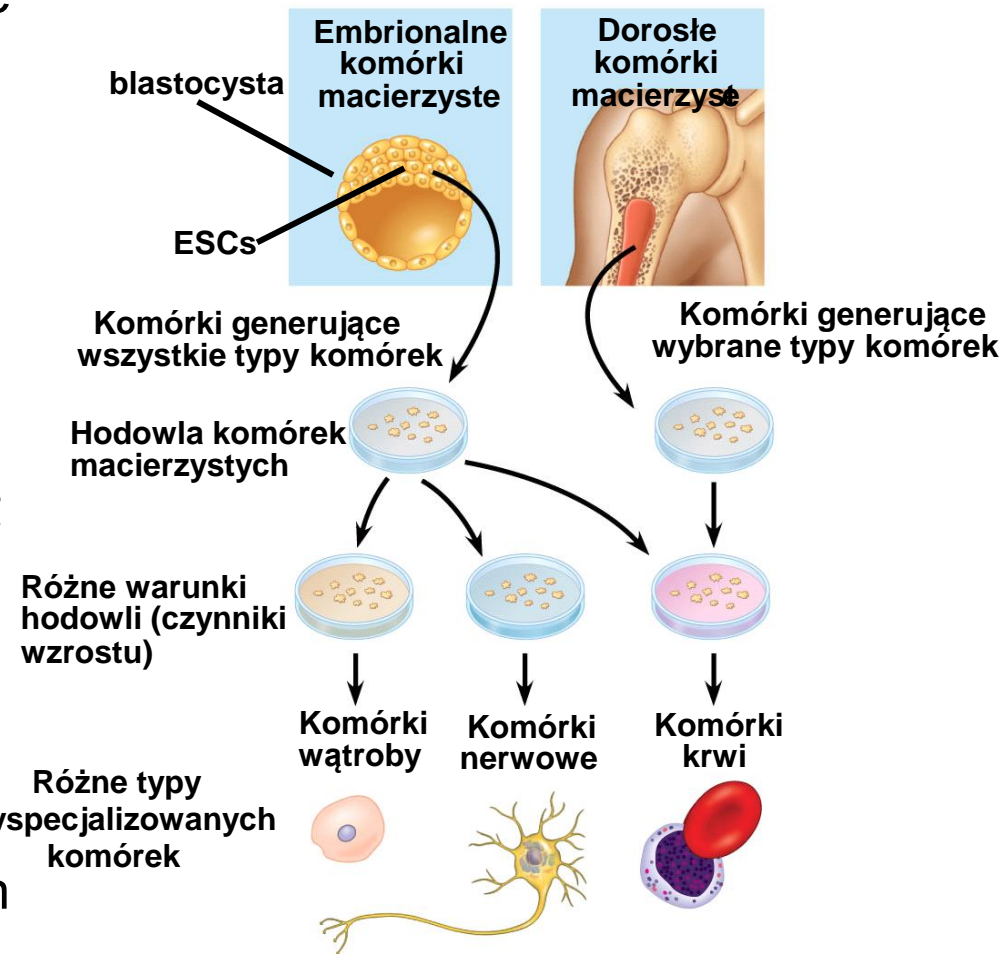


Komórki macierzyste

► **Komórka macierzysta** (ang. *stem cell*) – komórka zdolna do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów i różnicowania do innych typów komórek

► **Embrionalne komórki macierzyste** (*embryonic stem cells* **ESCs**) - komórki izolowane na wczesnym etapie embriogenezy gdy zarodek jest w formie **blastocysty**

► **Dorosłe komórki macierzyste** - znajdujące w tkankach dorosłych organizmów, gdzie zasiedlają **niszę** chroniącą je oraz utrzymującą ich stan i potencjał do różnicowania



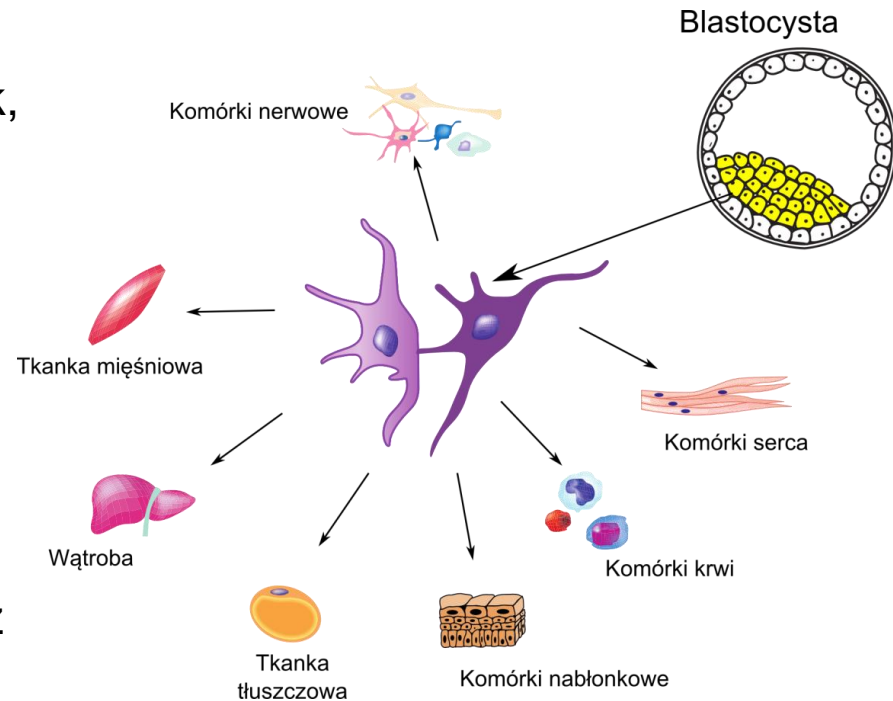
Komórki macierzyste

►Ze względu na zdolność do różnicowania komórki macierzyste dzieli się na:

►**totipotentne** – takie, które mogą ulec zróżnicowaniu do każdego typu komórek, w tym komórek tworzących łożysko

►**pluripotentne** – takie, które mogą dać początek każdemu typowi komórek dorosłego organizmu z wyjątkiem komórek łożyska

►**multipotentne** – takie, które mogą dać początek kilku różnym typom komórek, z reguły o podobnych właściwościach



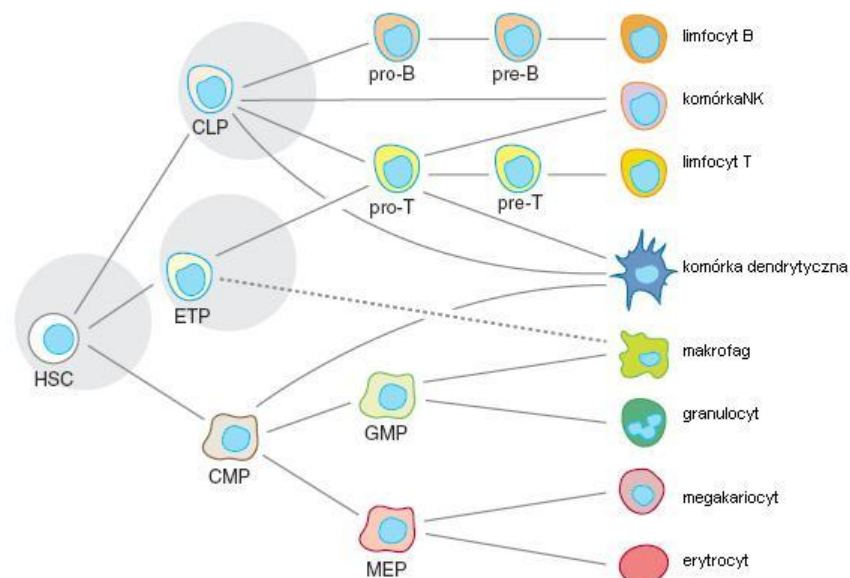
Dorosłe komórki macierzyste – gdzie ich szukać

► **Komórka macierzysta** (ang. *stem cell*) – komórka zdolna do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów i różnicowania do innych typów komórek

► **Hematopoetyczne komórki macierzyste** (HSCs) generują różne typy wyspecjalizowanych komórek krwi i układu odpornościowego

► HSCs używane są w przeszczepach szpiku w terapii nowotworowej białaczek

► Źródłem HSCs to transplantacji jest szpik kostny pobierany z kości długich, krew obwodowa oraz krew pępowinowa



- HSC (z ang. hemapoietic stem cells) - komórki macierzyste hematopoezy;
- CLP (z ang. common lymphocyte progenitor) - wspólne komórki progenitorowe limfoidalne;
- CMP (z ang. common myeloid progenitor) - wspólne komórki progenitorowe linii mieloidalnej i granulocytarnej;
- ETP (z ang. early T-lineage progenitor) - wczesne komórki progenitorowe limfocytów T;
- GMP (z ang. granulocyte and monocyte progenitor) - komórki progenitorowe granulocytów i monocytów;
- MEP (z ang. megakaryocyte/erythrocyte progenitors) - komórki progenitorowe megakariocytów i erytrocytów.

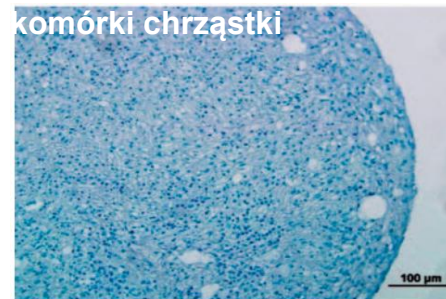
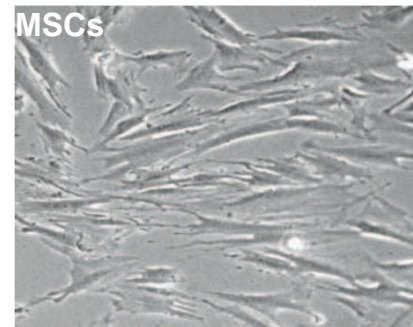
Dorosłe komórki macierzyste – gdzie ich szukać

► **Komórka macierzysta** (ang. *stem cell*) – komórka zdolna do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów i różnicowania do innych typów komórek

► **Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs)** rezydują w szpiku kostnym i różnicują do tkanek takich jak kości, chrząstka, mięśnie, więzadła, ścięgna oraz tkanka tłuszczowa

► **MSCs** reprezentują populację komórek macierzystych idealną w terapii przeszczepów – dość łatwo je wyizolować, podtrzymywać w hodowli w warunkach laboratoryjnych i wyróżnicować do pożądanego typu komórek

► Wymienione cechy decydują, że MSCs znajdują zastosowanie w **autologicznych** transplantacjach, gdzie własne komórki pacjenta są używane do zamiany uszkodzonych



Dorosłe komórki macierzyste – gdzie ich szukać

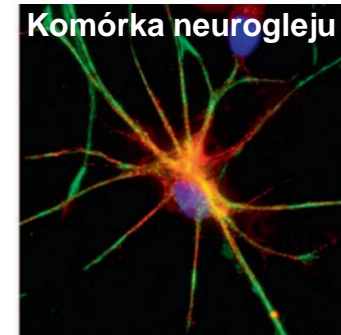
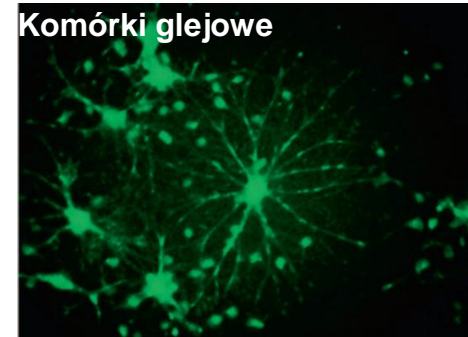
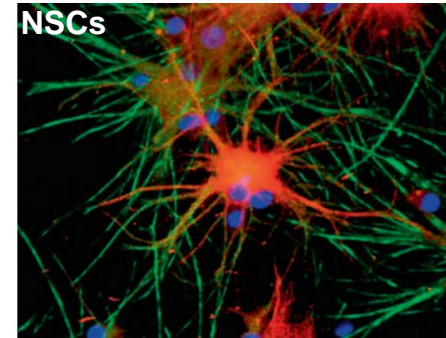
► **Komórka macierzysta** (ang. *stem cell*) – komórka zdolna do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów i różnicowania do innych typów komórek

► **Neuronalne komórki macierzyste (NSCs)** wyizolowane po raz pierwszy w 1992 z mózgu myszy i z powodzeniem hodowane w warunkach laboratoryjnych

► Identyfikacja NSCs zakwestionowała dogmat o „braku nowopowstających neuronów” w mózgu i dała impuls do badań nad regeneracją komórek mózgu

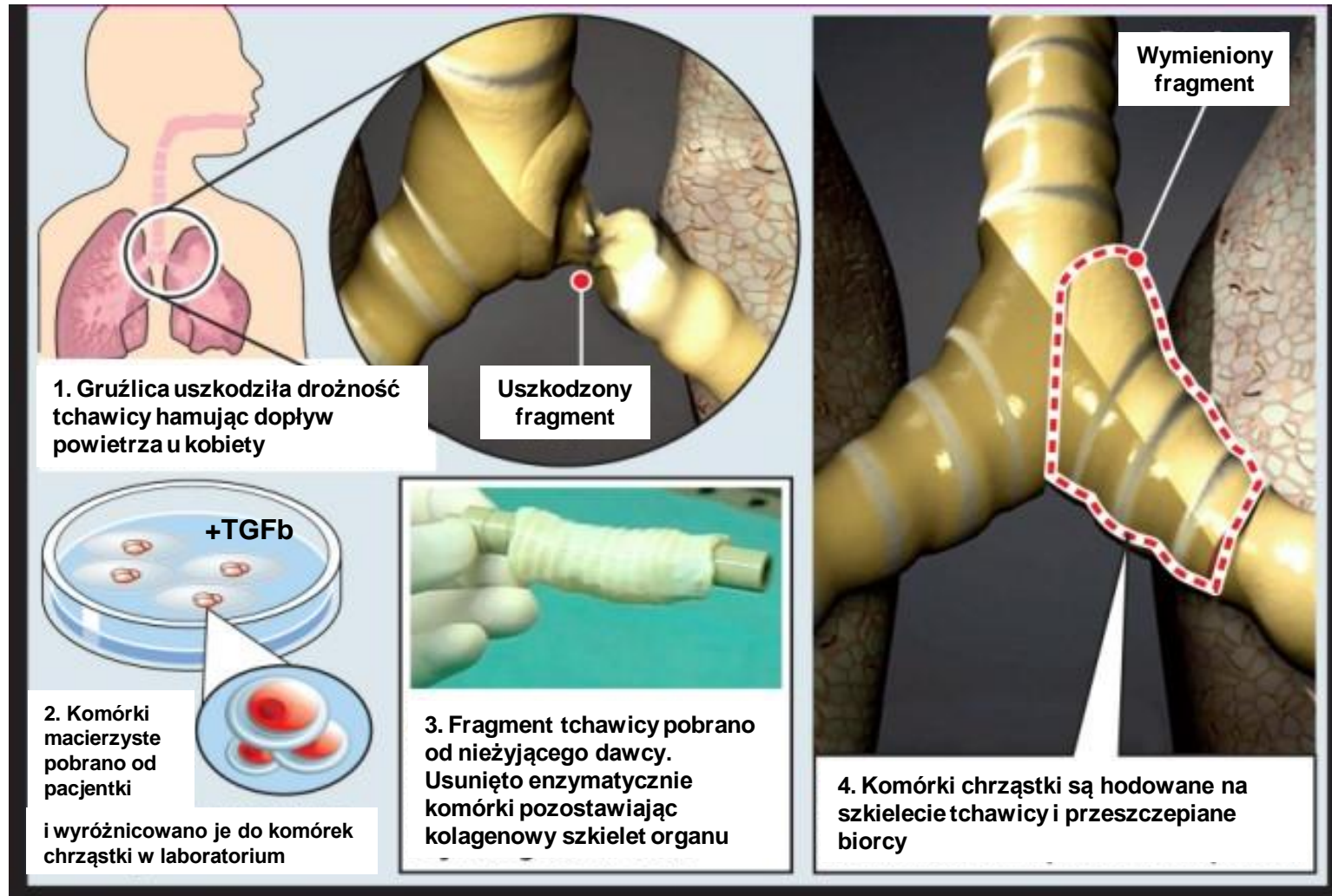
► NSCs różnicują do neuronów, astrocytów i oligodendrocytów, które wytwarzają **otoczkę mielinową**, bogatą w tłuszcze substancję, otaczającą wypustki neuronów i warunkującą prawidłowe przekazywanie impulsów elektrycznych

► Uszkodzenie otoczki mielinowej w konsekwencji prowadzi do rozpadu tkanki nerwowej i choroby zwanej **stwardnieniem rozsianym**



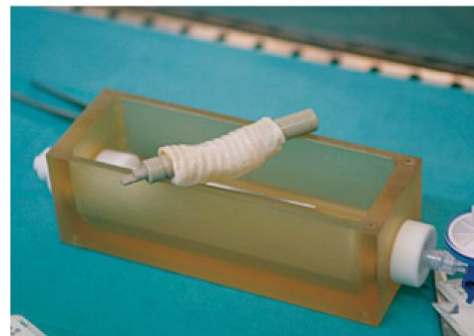
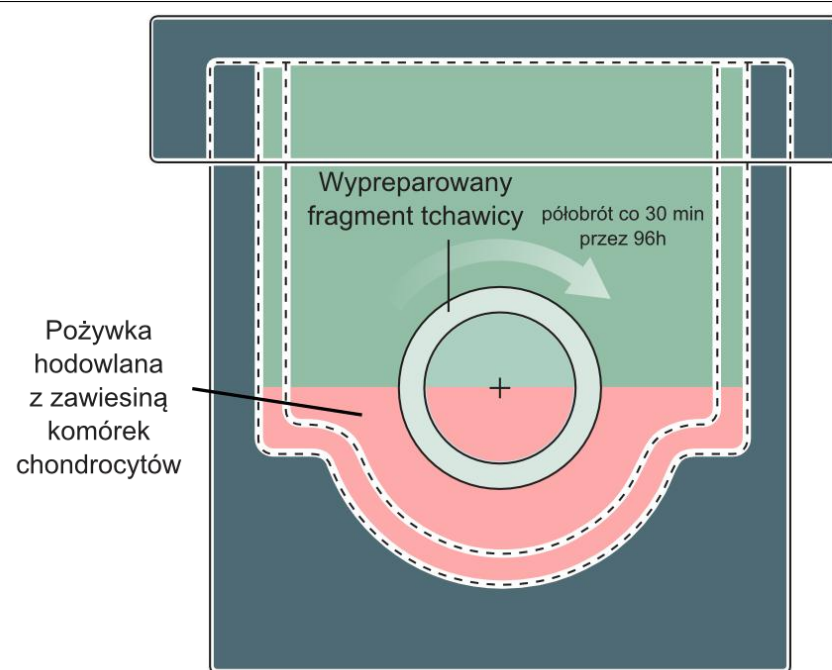
Komórki macierzyste – pierwszy przeszczep organu

► W **2008** po raz pierwszy przeszczepiono organ wyhodowany z własnych komórek macierzystych pacjenta



Komórki macierzyste – pierwszy przeszczep organu

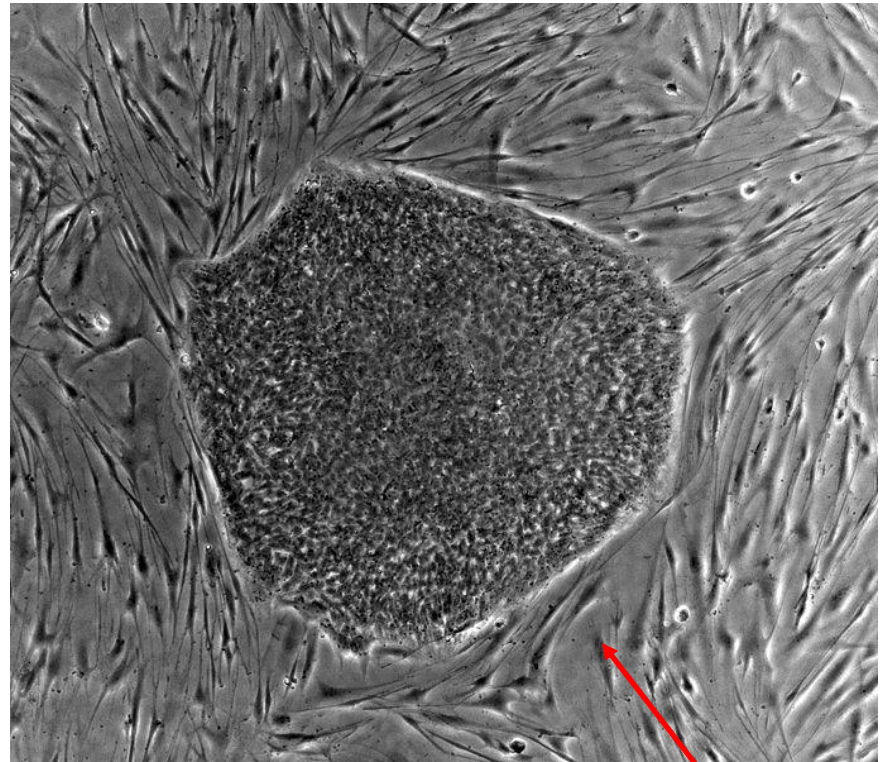
- ▶ W **2008** po raz pierwszy przeszczepiono organ wyhodowany z własnych komórek macierzystych pacjenta
- ▶ Rycina przedstawia budowę bioreaktora zastosowanego w terapii



Blastocysta



Komórka embrionalna



fibroblasty

- ▶ Sferyczny kształt komórki
- ▶ Duże jądro, rozluźniona chromatyna

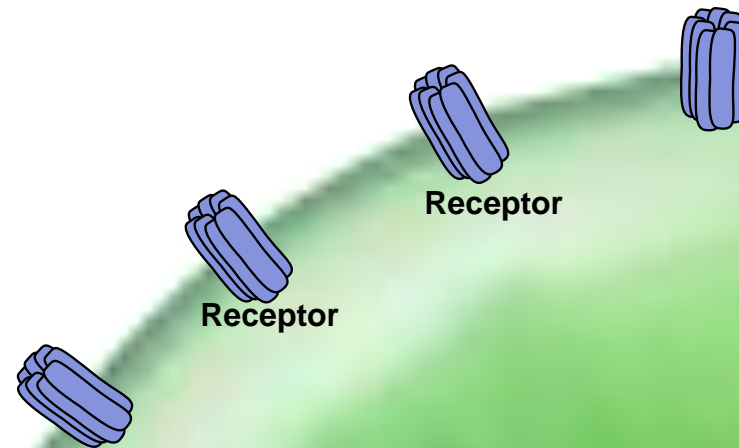
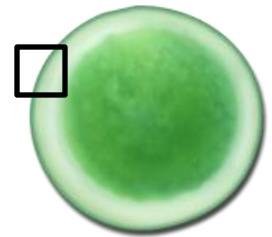
Komórki macierzyste – metody rozpoznawania - FACS

► Komórki macierzyste posiadają charakterystyczne **białka receptorowe** na powierzchni błony komórkowej

► Dają one możliwość selektywnego wiązania do białek sygnałowych

► Białka te mogą posłużyć jako **markery**, które umożliwią wyizolowanie frakcji komórek macierzystych z heterogennej formacji komórek

Komórka macierzysta

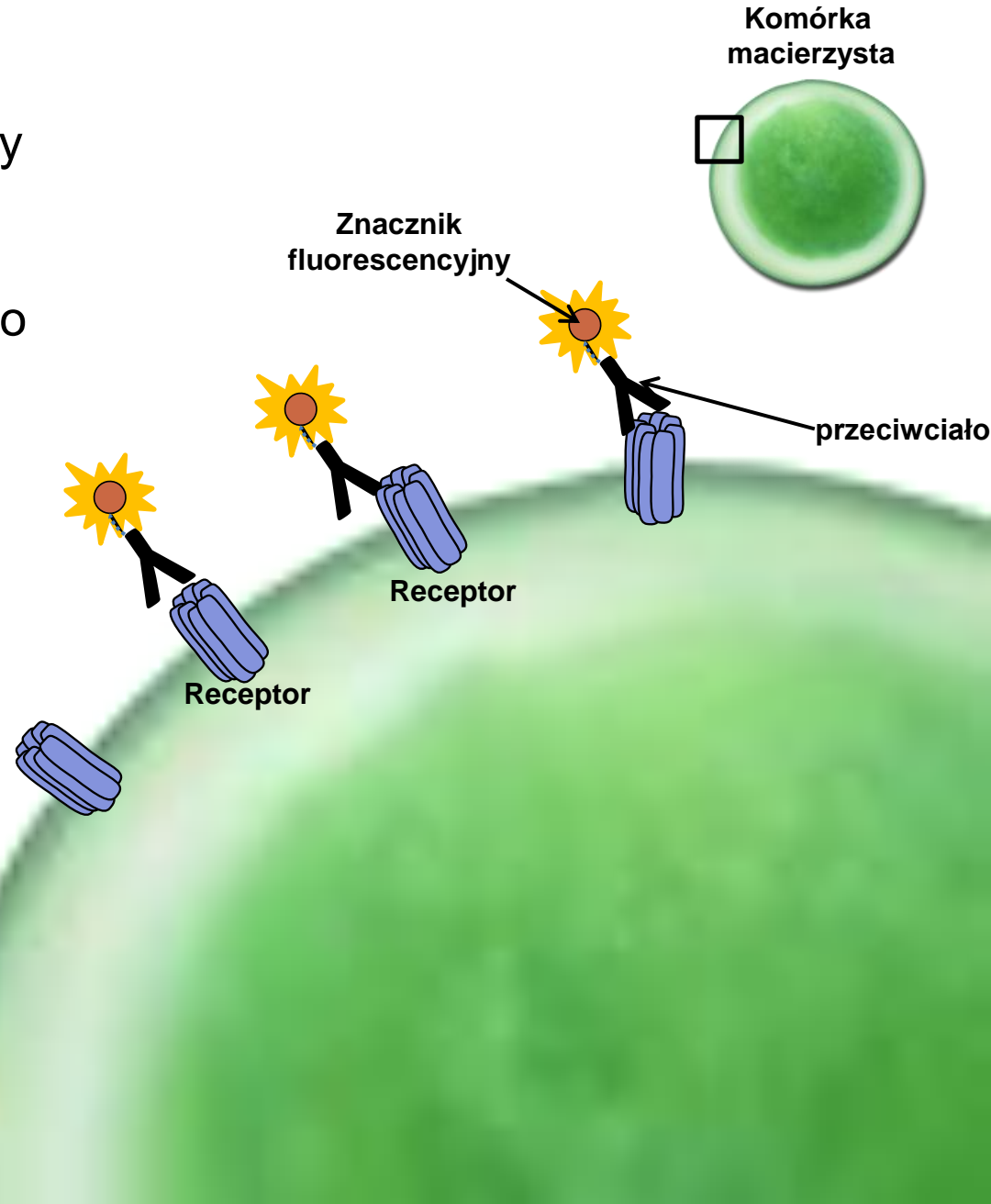


Komórki macierzyste – metody rozpoznawania - FACS

► Komórki macierzyste posiadają charakterystyczne **białka receptorowe** na powierzchni błony komórkowej

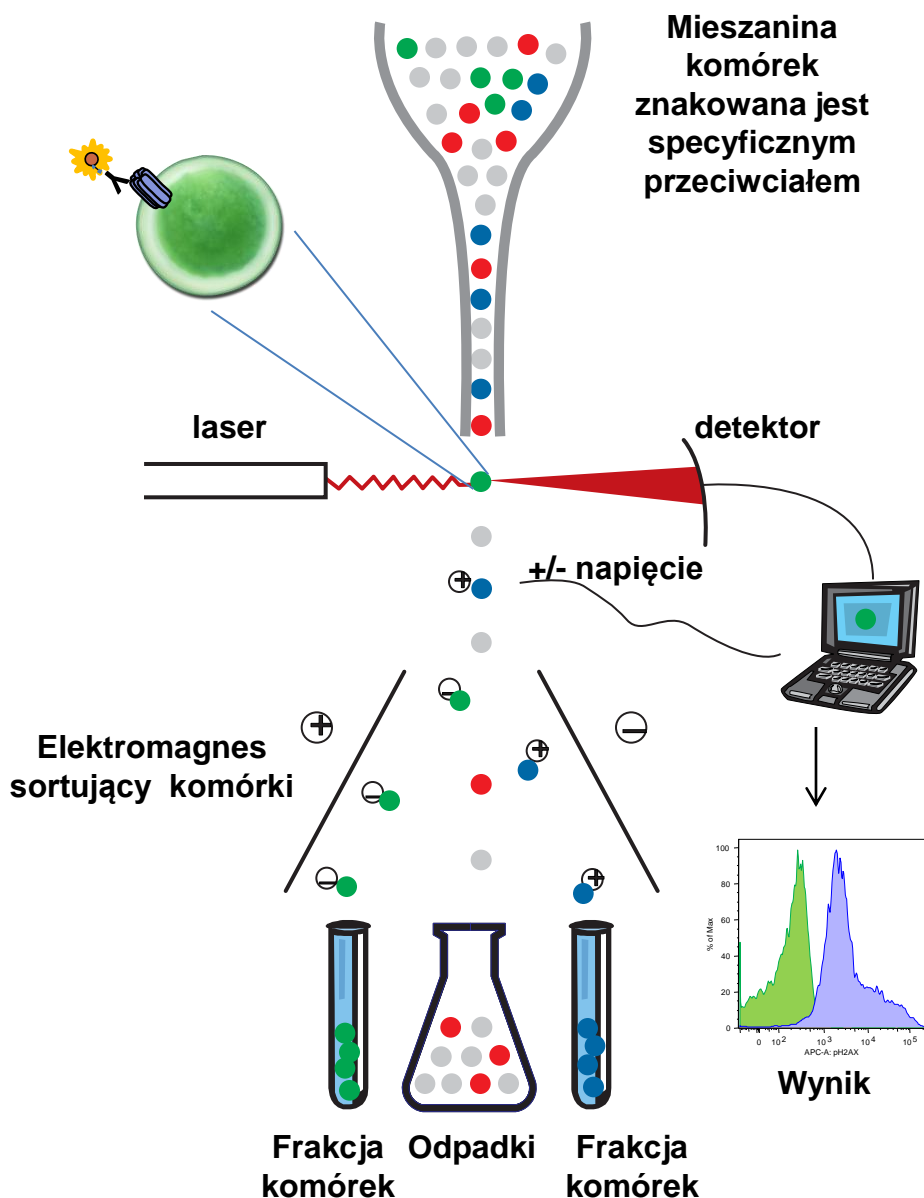
► Dają one możliwość selektywnego wiązania do białek sygnałowych

► Białka te mogą posłużyć jako **markery**, które umożliwią wyizolowanie frakcji komórek macierzystych z heterogennej formacji komórek



Komórki macierzyste – metody rozpoznawania - FACS

- ▶ **Sortowanie komórek aktywowane fluorescencją** (*ang.* Fluorescence activated cell sorting - FACS) jest techniką umożliwiającą jednoczesny pomiar wielu fizycznych i chemicznych cech pojedynczej komórki
- ▶ Odpowiednio przetworzone informacje z FACS pozwalają ocenić w sposób statystyczny parametry strukturalne zbiorów komórek lub intensywność fluorescencji dołączonych przeciwciał
- ▶ Wynik w postaci histogramów opisuje cechy komórek w badanej próbce



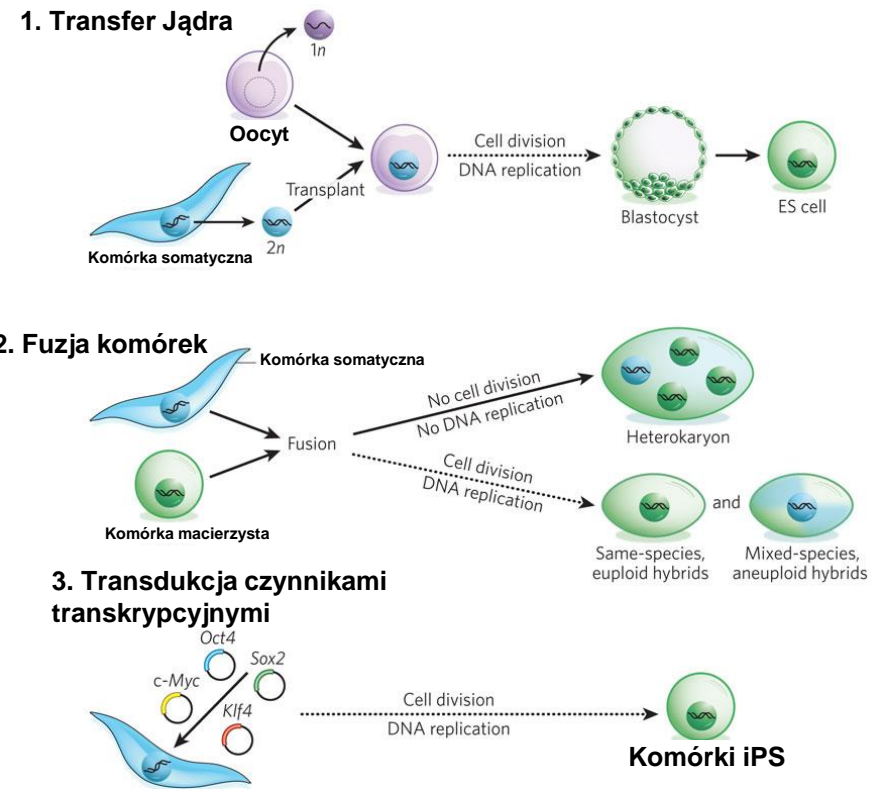
Reprogramowalność jądrowe

► **Reprogramowalność jądrowe** – proces biologiczny, w którym zachodzi przeprogramowanie **chromatyny jądrowej** dorosłej komórki **do stanu pluripotencjalnego**, co umożliwia zmianę losu rozwojowego komórki i wyróżnicowanie jej do innego typu wyspecjalizowanej komórki

► **Transfer jądra** – chromatyna jądrowa dorosłej komórki podlega reprogramowaniu po transferze do oocyta, z którego usunięto jądro

► **Fuzja komórek** – chromatyna jądrowa jest przeprogramowywana przez czynniki obecne w cytoplazmie komórki macierzystej

► **Transdukcja czynnikami transkrypcyjnymi** – dorosłe komórki skóry rosnące na szalkach traktowano plazmidem DNA kodującym macierzyste czynniki transkrypcyjne. Produkty ekspresji genów z plazmidów przetransformowały dorosłe komórki do komórek zwanych **indukowanymi komórkami macierzystymi** ang. *induced pluripotent stem (iPS) cells*



Reprogramowalność jądrowa – klonowanie terapeutyczne

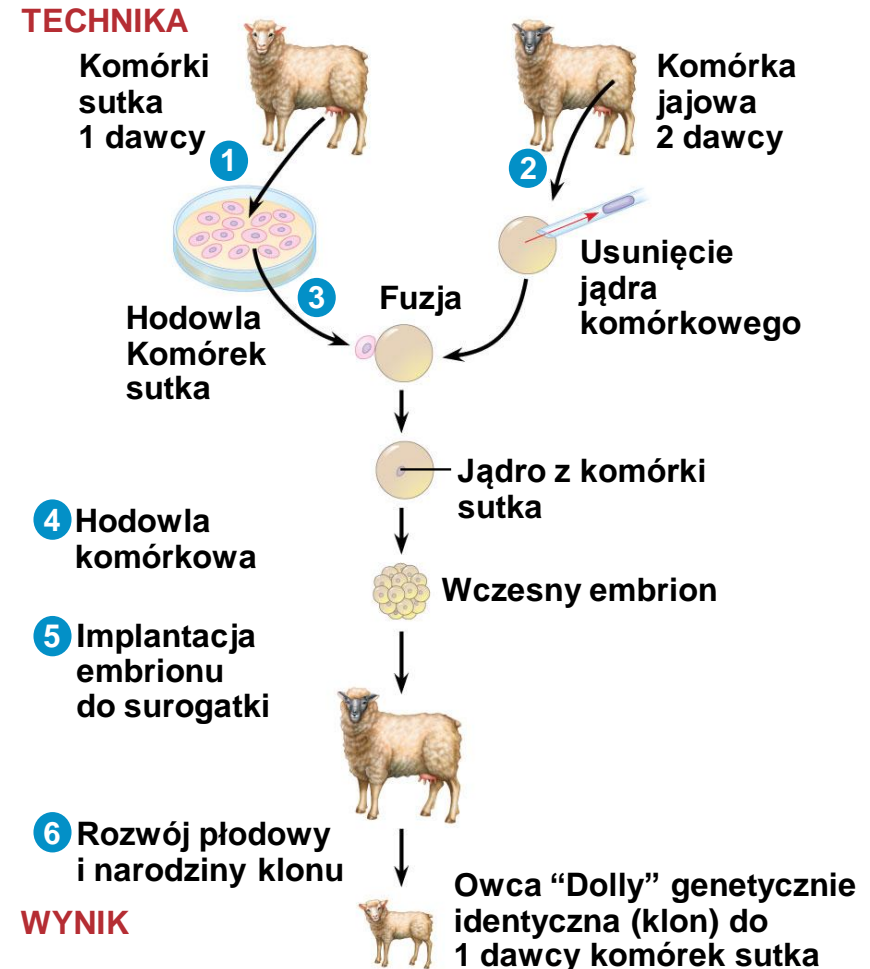
► **Transfer jądra** – chromatyna jądrowa dorosłej komórki podlega reprogramowaniu po transferze do oocyta, z którego usunięto jądro. Proces nazywany jest również **klonowaniem terapeutycznym** gdy ograniczy się do etapu embrionu lub **klonowaniem reprodukcyjnym** gdy dojdzie do implantacji w macicy, rozwoju i narodzin



Reprogramowalność jąder – klonowanie terapeutyczne

► **Transfer jądra** – chromatyna jądrowa dorosłej komórki podlega reprogramowaniu po transferze do oocyty, z którego usunięto jądro. Proces nazywany jest również **klonowaniem terapeutycznym** gdy ograniczy się do etapu embrionu lub **klonowaniem reprodukcyjnym** gdy dojdzie do implantacji w macicy, rozwoju i narodzin

► W 1997 ogłoszono narodziny owcy Dolly sklonowanej techniką transferu jądra z wyróżniczowanych komórek sutka



Reprogramowalność jąder – klonowanie terapeutyczne

► **Transfer jądra** – chromatyna jądrowa dorosłej komórki podlega reprogramowaniu po transferze do oocyta, z którego usunięto jądro. Proces nazywany jest również **klonowaniem terapeutycznym** gdy ograniczy się do etapu embrionu lub **klonowaniem reprodukcyjnym** gdy dojdzie do implantacji w macicy, rozwoju i narodzin

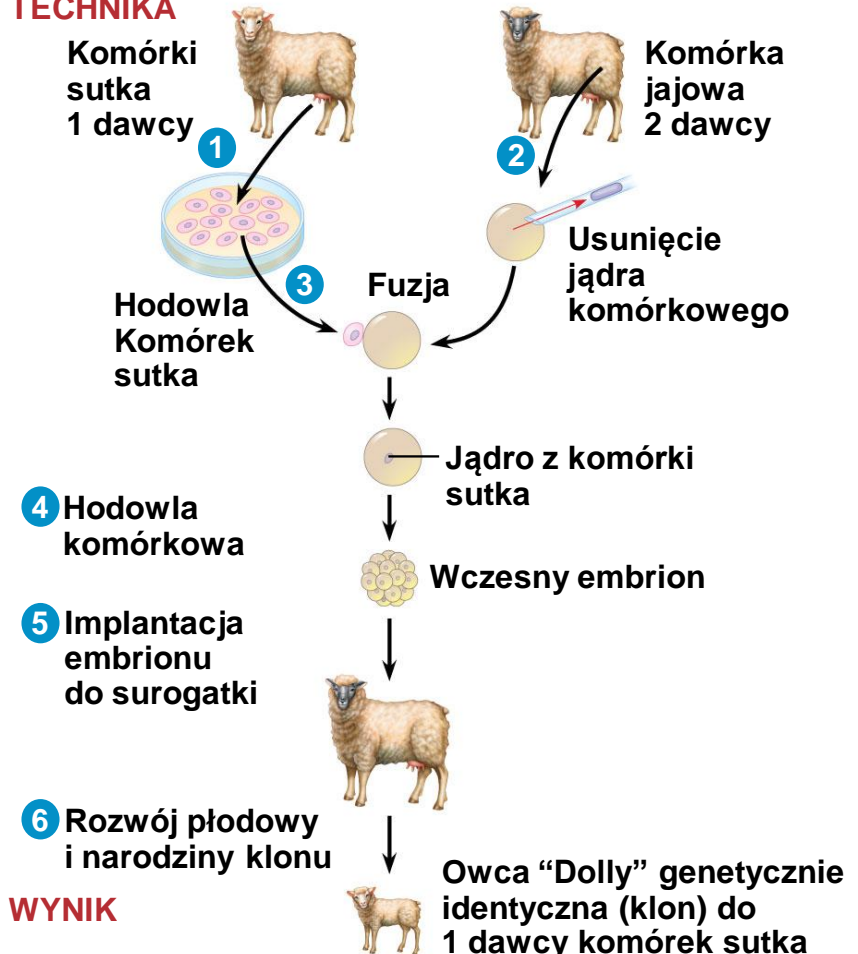
► W 1997 ogłoszono narodziny owcy Dolly sklonowanej techniką transferu jądra z wyróżniczanych komórek sutka

► Przedwczesna śmierć Dolly w 2003 oraz zdiagnozowane zapalenie stawów doprowadziły do spekulacji, że jej komórki nie były tak „zdrowe” jak normalnych owiec co spowodowane było niepełnym przeprogramowaniem informacji jądrowej

► W latach 1997 -2007 sklonowano 17 innych gatunków ssaków

► Klonowanie reprodukcyjne jest ciągle procesem niewydajnym

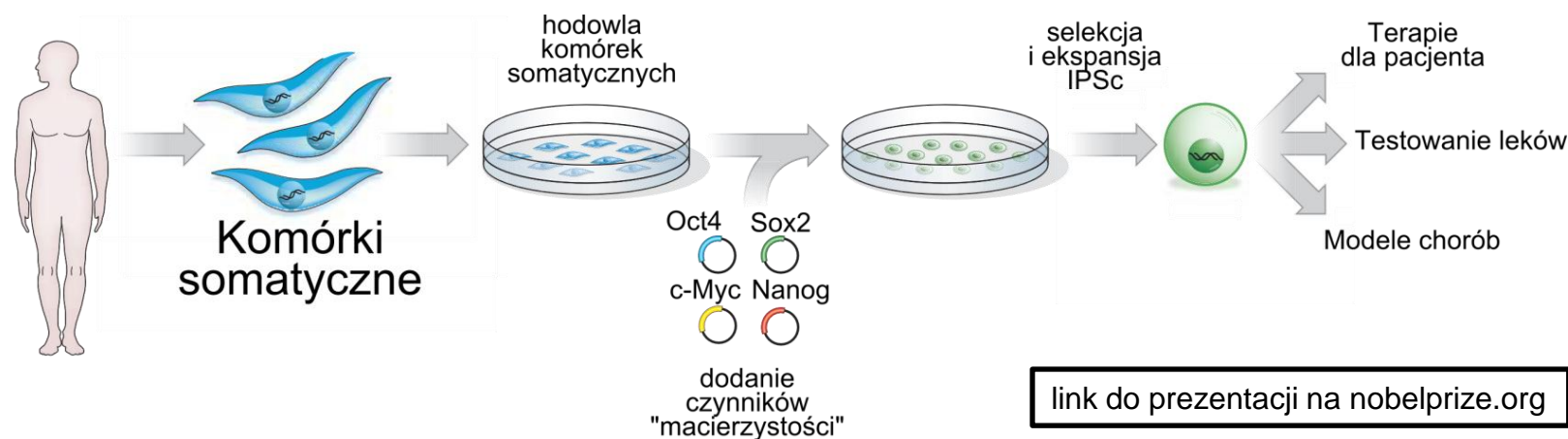
TECHNIKA



Indukowane komórki macierzyste

► Komórki macierzyste posiadają charakterystyczne **wzory ekspresji genów**, regulowanych przez specyficzne czynniki transkrypcyjne np. **Oct4, Sox2, c-Myc, Nanog** i inne

► W **2006** naukowcy używając **techniki rekombinowanego DNA** dokonali transformacji komórek skóry plazmidami kodującymi białka „macierzystości”



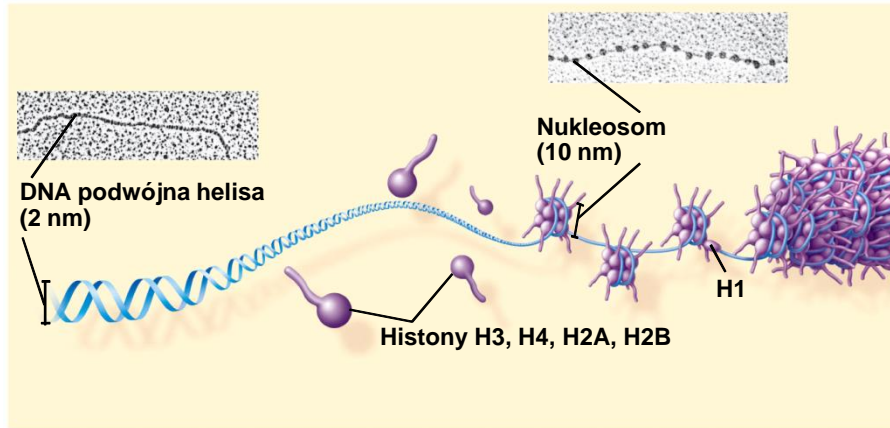
► Uzyskano **indukowane komórki macierzyste** – komórki posiadające wszelkie cechy embrionalnych komórek macierzystych

► W związku z kontrowersjami dotyczącymi użycia komórek macierzystych izolowanych z embrionów odkrycie prostej metody indukcji komórek macierzystych z dojrzałych komórek somatycznych uznano za przełom naukowy, który doprowadzi do rutynowego zastosowania iPSc w terapii regeneracyjnej

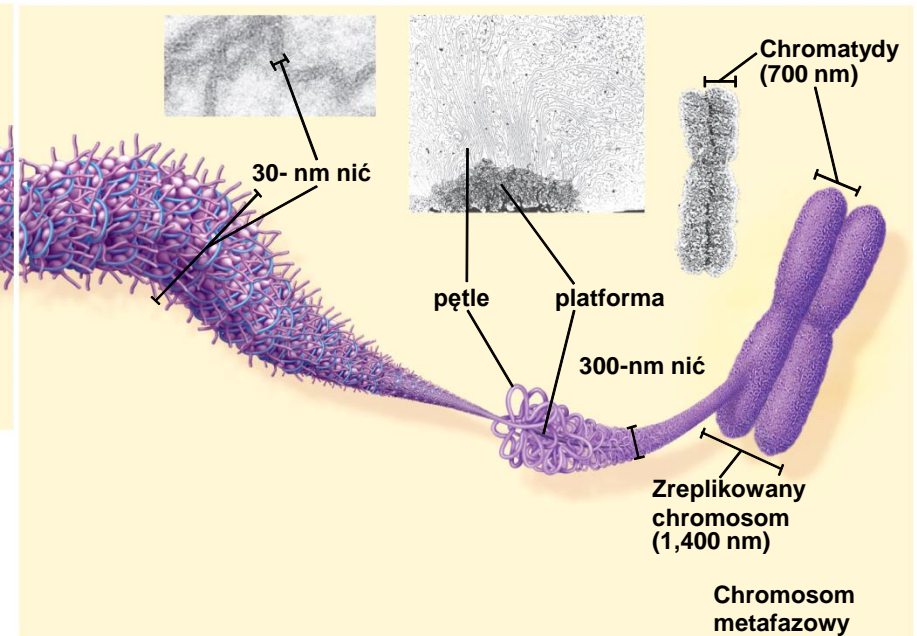
► Nagroda Nobla **2012** w dziedzinie medycyna i fizjologia dla **Shinya Yamanaki** za iPSc

Reprogramowanie wymaga zmian w chromatynie

► Chromosomy eukariotyczne zbudowane są z **kompleksu DNA i białek** zwanej **chromatyną**, która podlega kondensacji w trakcie podziału komórkowego



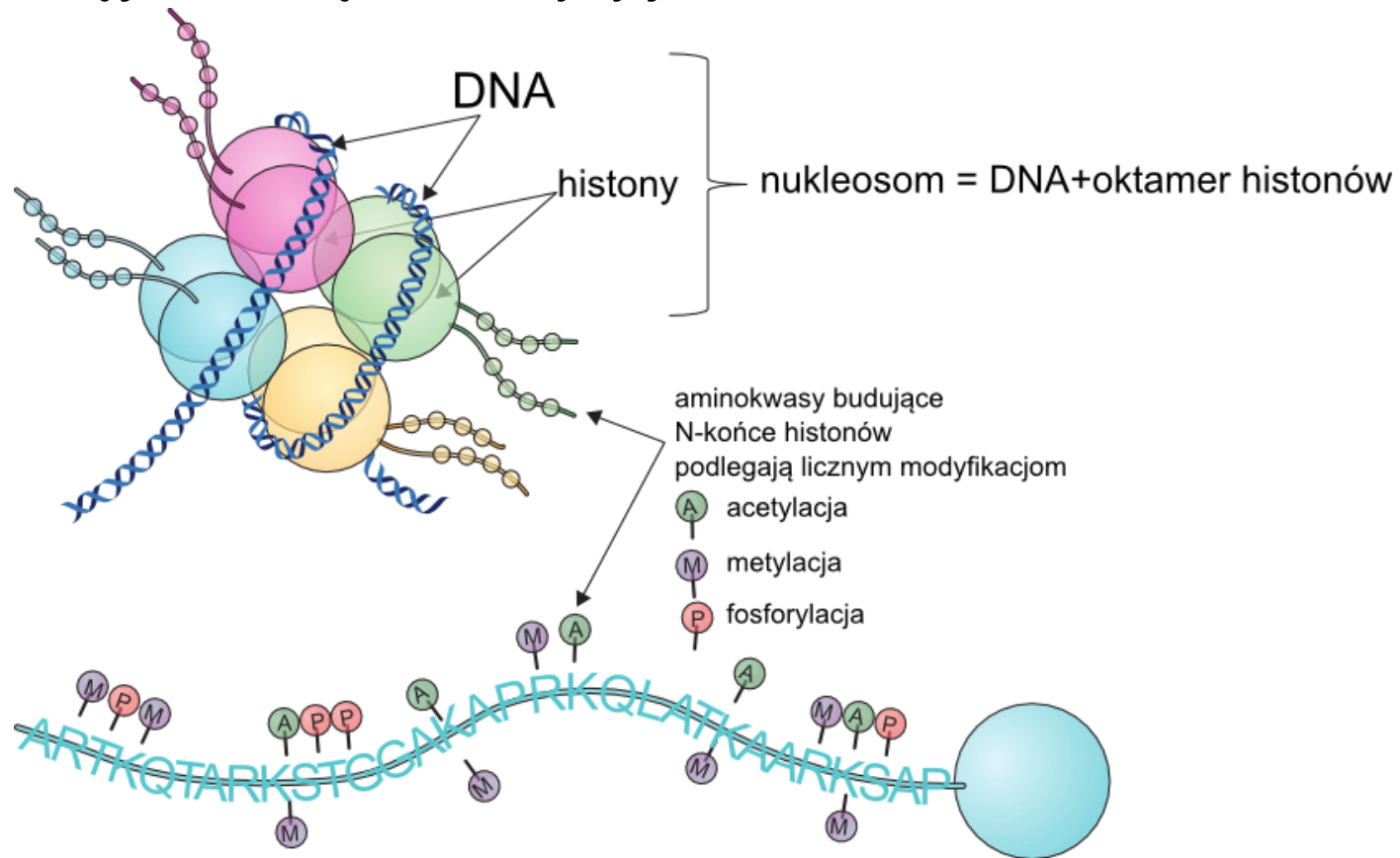
© 2011 Pearson Education, Inc.



© 2011 Pearson Education, Inc.

Reprogramowanie wymaga zmian w chromatynie

► Podstawową jednostką chromatyny jest **nukleosom**

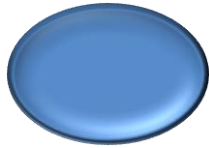
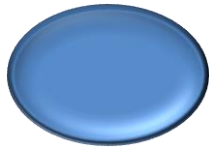


► Białka chromatyny modyfikują histony dodając specyficzne grupy funkcyjne do aminokwasów – tego typu modyfikacja jest przykładem **zmiany epigenetycznej**, a więc takiej, która **koduje i wyzwala informację** niezależną od pierwotnej sekwencji DNA

► Inny rodzaj modyfikacji epigenetycznej to **metylacja cytozyn w DNA**

Reprogramowanie wymaga zmian w chromatynie

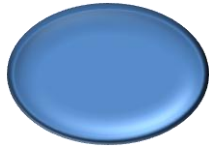
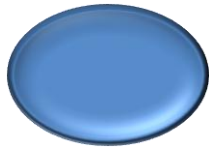
- Modyfikacja epigenetyczna może doprowadzić do zmiany ekspresji genów i zmienić los komórki



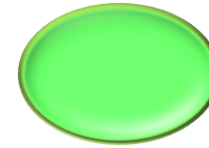
Genetycznie
identyczne
komórki

Reprogramowanie wymaga zmian w chromatynie

- Modyfikacja epigenetyczna może doprowadzić do zmiany ekspresji genów i zmienić los komórki



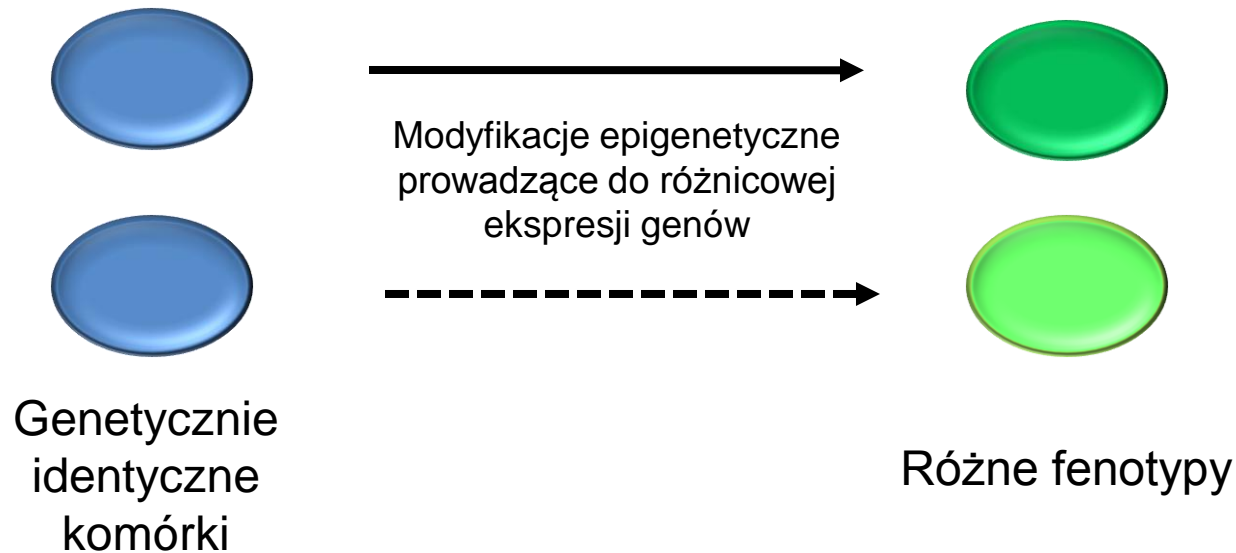
Genetycznie
identyczne
komórki



Różne fenotypy

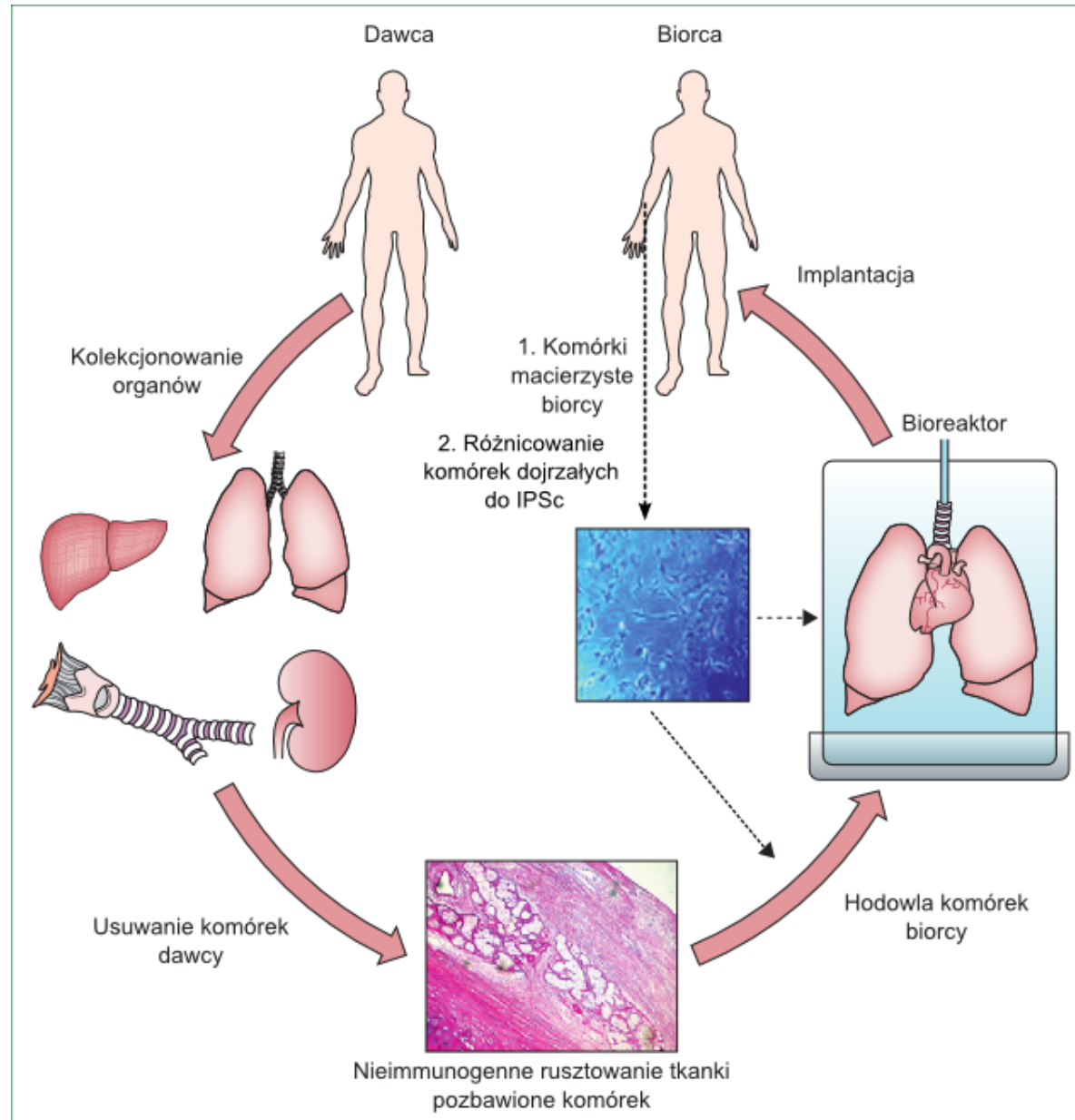
Reprogramowanie wymaga zmian w chromatynie

- Modyfikacja epigenetyczna może doprowadzić do zmiany ekspresji genów i zmienić los komórki



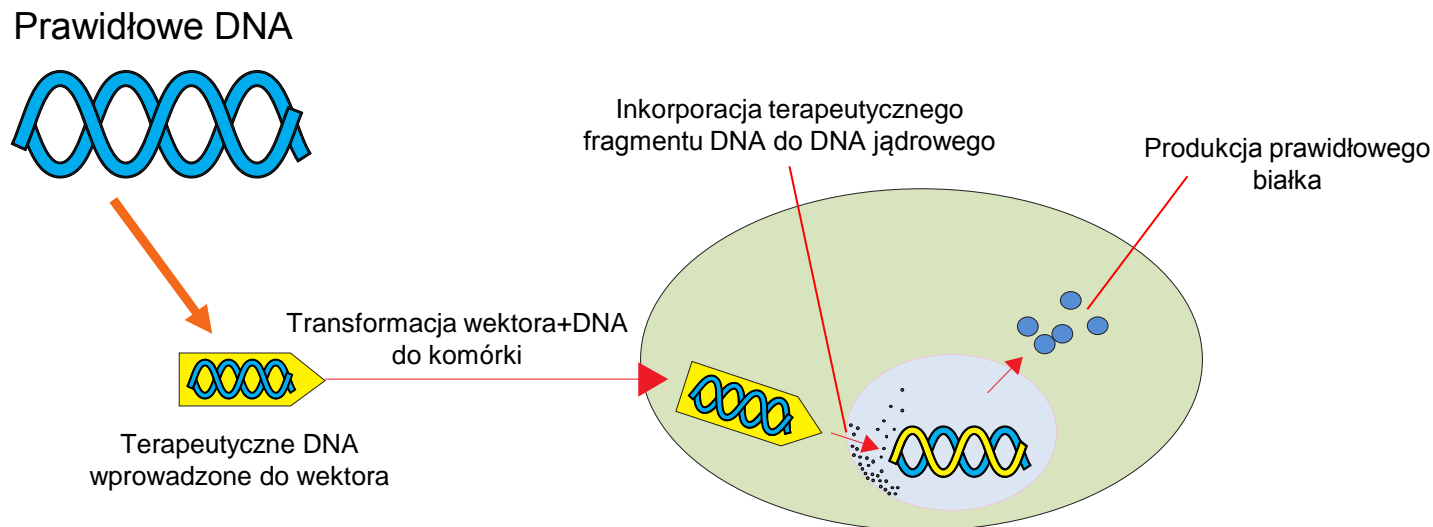
- Epigenetyka opisuje zjawiska dzięki którym genetycznie identyczne komórki w różny sposób wyrażają geny wywołując różnice fenotypowe

Komórki macierzyste – zastosowanie w transplantacji organów



Terapia genowa

- ▶ Jednym z osiągnięć technologii rekombinowanego DNA jest identyfikacja genów, w których mutacje są przyczyną chorób genetycznych

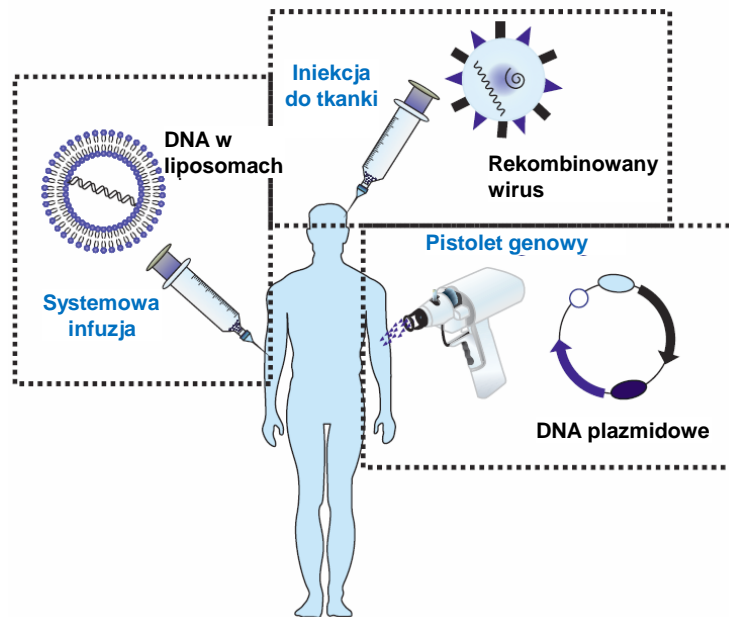


- ▶ **Terapia genowa** - leczenie polegające na wprowadzeniu obcych kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) do komórek. Charakter lub informacja genetyczna zawarte we wprowadzonym DNA lub RNA powinny wywierać efekt terapeutyczny.
- ▶ Terapia genowa ma potencjał leczenia chorób wynikających z defektu pojedynczych genów
- ▶ Do dostarczenia kwasów nukleinowych używane są wektory (Wirusy DNA, retrowirusy, liposomy)

Terapia genowa – dwa podejścia terapeutyczne

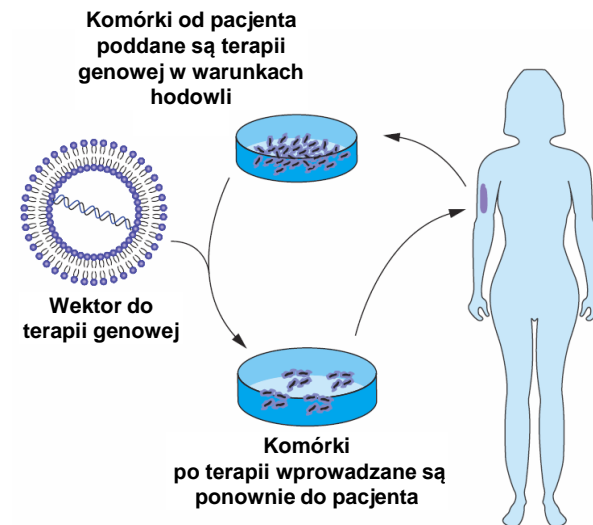
► Istnieją dwa główne sposoby dostarczania kwasów nukleinowych

In vivo



► System dostarczania kwasów nukleinowych specyficznemu celuje w wybrane komórki, które mają być poddane terapii

Ex vivo



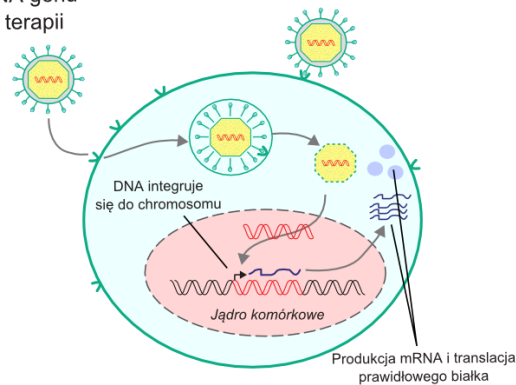
► Chore komórki są pobierane i poddane terapii w laboratorium po czym już jako zdrowe są wszczepiane do pacjenta

Terapia genowa – wybór wektorów

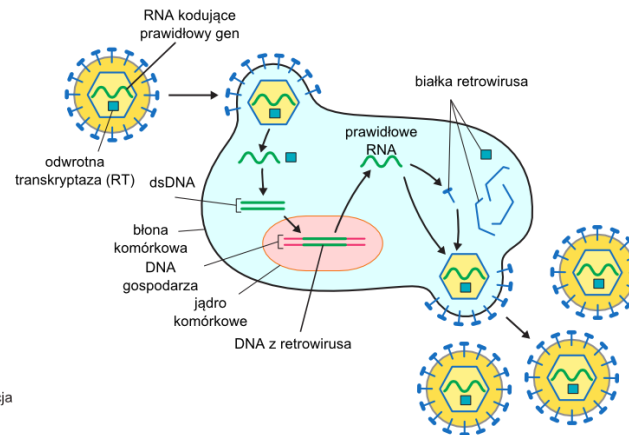
► Wybór wektora do terapii genowej wymaga posiadania wiedzy biologicznej o mechanizmie odpowiedzialnym za chorobę

Adenowirusy DNA

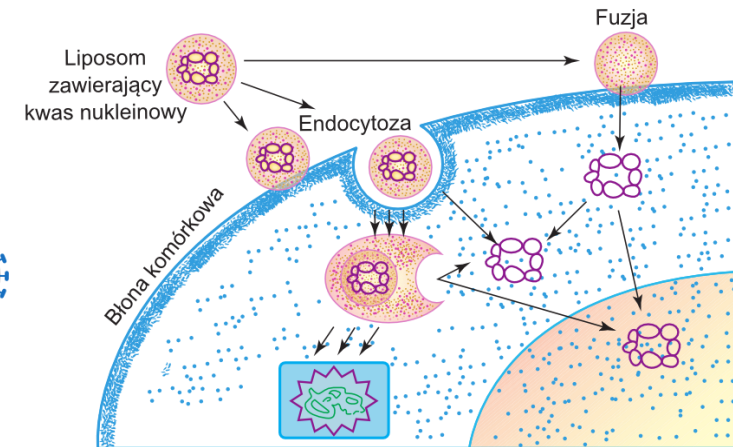
Adenowirus
z DNA genu
do terapii



Retrowirusy



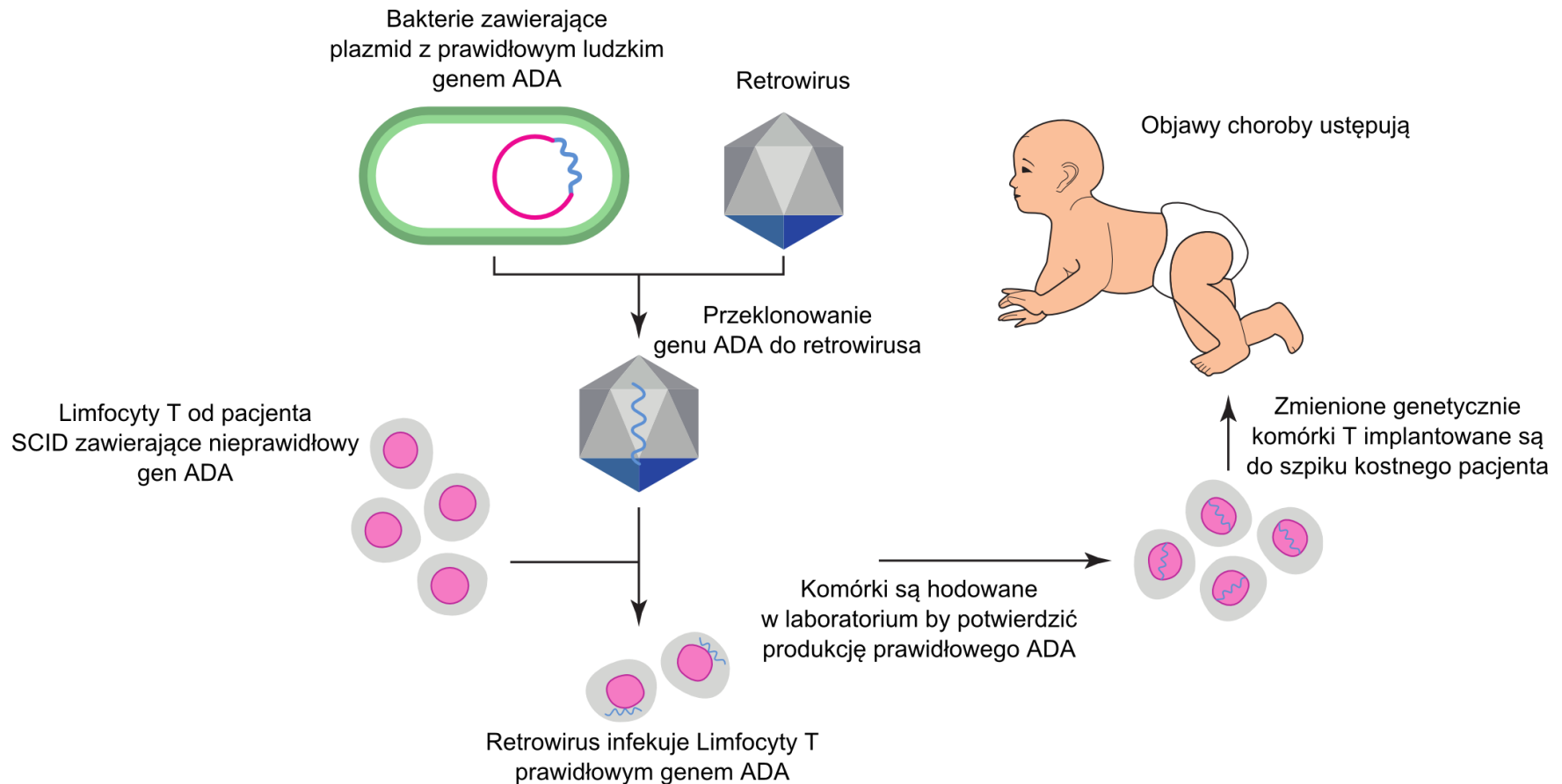
Liposomy



► Powodzenie terapii często wymaga aby wprowadzony gen terapeutyczny był wyrażany do białka przez długi czas. Osiąga się to przez **integrację** genu do genomu wykorzystując fakt, że wektory wirusowe i retrowirusowe posiadają sekwencje umożliwiające włączenie obcego DNA do genomu. Dzielące się komórki przekazują potomnym komórkom ten gen i produkują prawidłowe białko.

Terapia genowa – przykłady skutecznych terapii

- ▶ **Ciężki złożony niedobór odporności** (zespół SCID ang. *severe combined immunodeficiency disease*), wywoływana przez mutację w genie kodującym **deaminazę adenozynty** (ADA). ADA produkowana jest w limfocytach T i degradowuje kwasy nukleinowe.
- ▶ Chorzy cierpią z powodu nawracających infekcji o podłożu wirusowym, grzybiczym oraz bakteryjnym; obserwuje się u nich także opóźnienie rozwoju fizycznego.

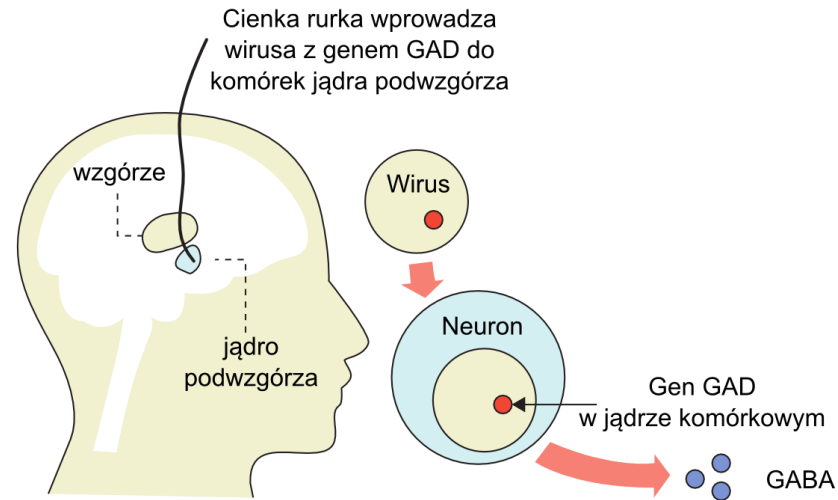
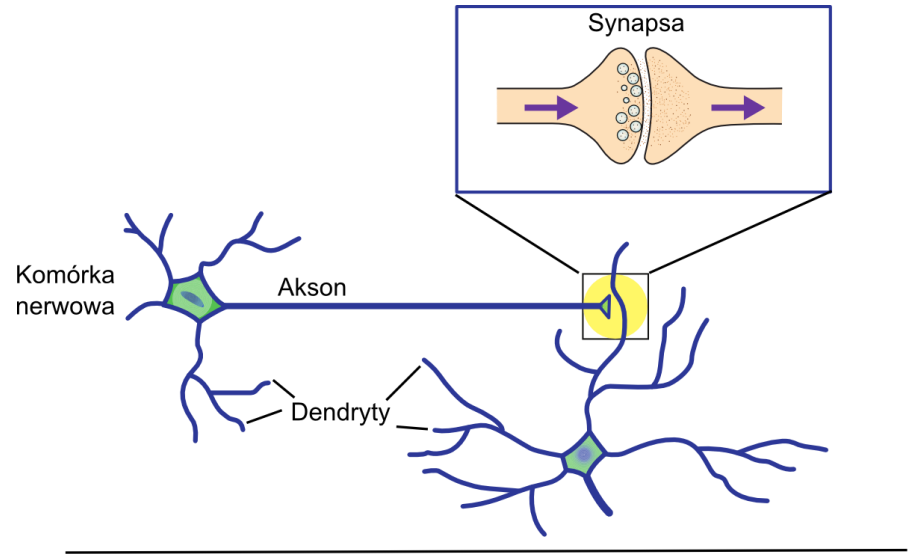


Terapia genowa – przykłady skutecznych terapii

► **Choroba Parkinsona** – niedobór dopaminy, kluczowego neuroprzekaźnika w mózgu. Pojawia się **nadczynność nerwów w jądrze podwzgórza** w mózgu prowadząca do dalszego spadku poziomu dopaminy

► Neuroprzekaźniki propagują sygnały nerwowe w otwartych przestrzeniach pomiędzy dwoma sąsiednimi neuronami zwanymi **synapsami**

► Gen **dekarboksylaza kwasu glutaminowego (GAD)** produkuje **kwas gamma-aminomasłowy (GABA)**, neuroprzekaźnik, który naturalnie hamuje nadczynność nerwów w jądrze podwzgórza w mózgu



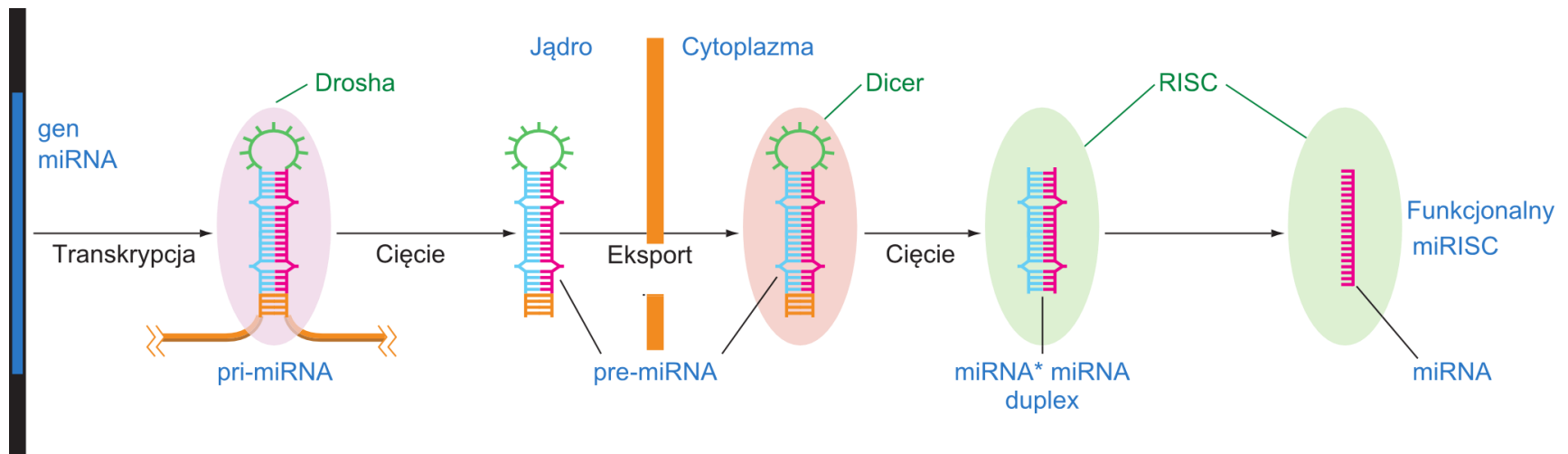
Terapia genowa – interferencyjne RNA (iRNA)

- ▶ **Interferencja RNA – naturalne zjawisko wyciszania albo wyłączenia ekspresji genu** przez dwuniciowy RNA (dsRNA) o sekwencji komplementarnej do DNA wyłączanego genu
- ▶ Krótkie 21 – 30 pz RNA
- ▶ Micro-RNA (**miRNA**) oraz krótkie interferujące RNA *small interfering* (**siRNA**)
- ▶ Wyłączenie może się odbywać przez
 - ▶ degradację mRNA
 - ▶ blokowanie translacji mRNA
- ▶ Zjawisko iRNA zostało zaadoptowane do wielu aplikacji w badaniach podstawowych i biotechnologii. Technologia iRNA ma również duży potencjał terapeutyczny – **hamowanie ekspresji niepożądanych genów**
- ▶ Za odkrycie zjawiska interferencji RNA amerykańscy naukowcy Andrew Fire i Craig Mello otrzymali w 2006 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii.

Terapia genowa – interferencyjne RNA (iRNA) - miRNA

►Powstawanie miRNA

- Kompleks białek **Drosha** wycina trzon miRNA z pierwotnego transkryptu miRNA (pri-miRNA) i powstają pre-miRNA o długości ~ 70 pz
- RNAza **Dicer** przetwarza pre-miRNA do dojrzałego duplexu miRNA
- Pojedyncza nić miRNA jest włączana do kompleksu białek – powstaje **RISC**
ang. *miRNA-induced silencing complex*



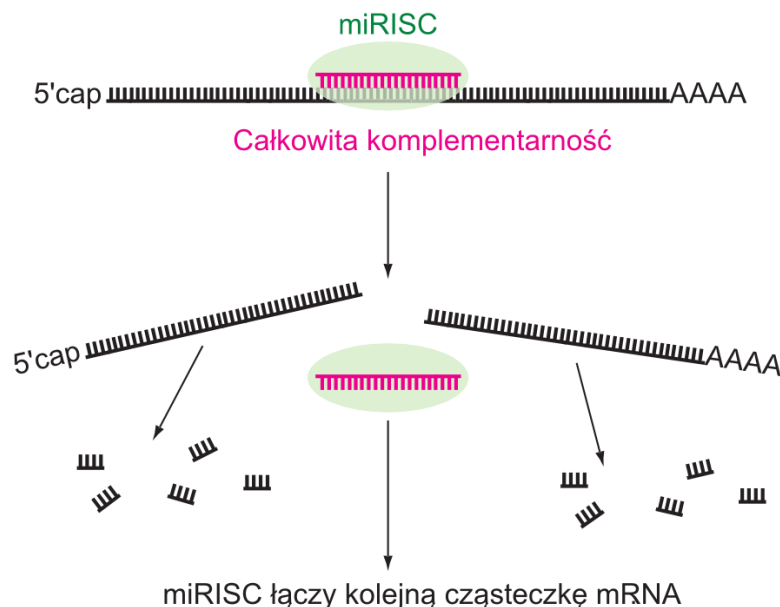
Terapia genowa – interferencyjne RNA (iRNA) - miRNA

► **Działanie miRNA** – dwa sposoby obniżania ekspresji genów przez rozpoznawanie sekwencji w części 3' mRNA. U człowieka zidentyfikowano >1600 genów miRNA

Gdy komplementarność jest całkowita

- Docelowe mRNA podlega degradacji

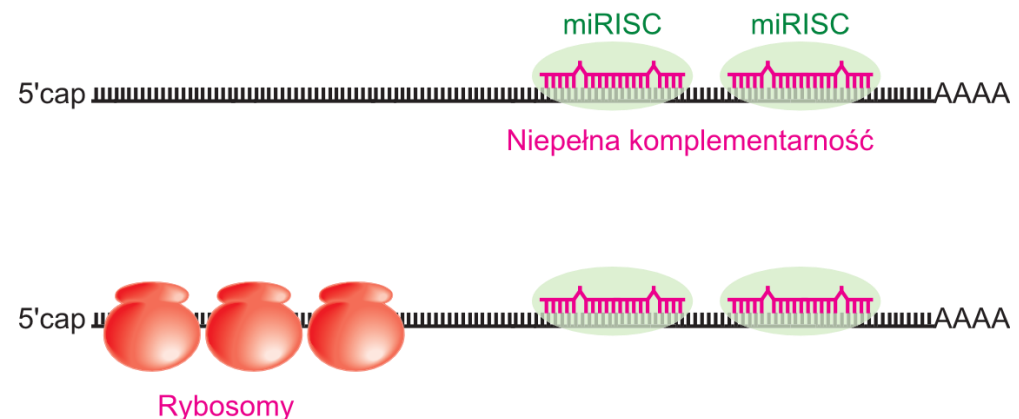
1. Cięcie mRNA



Gdy komplementarność jest niepełna

- Zahamowanie translacji docelowego mRNA

2. Represja translacji



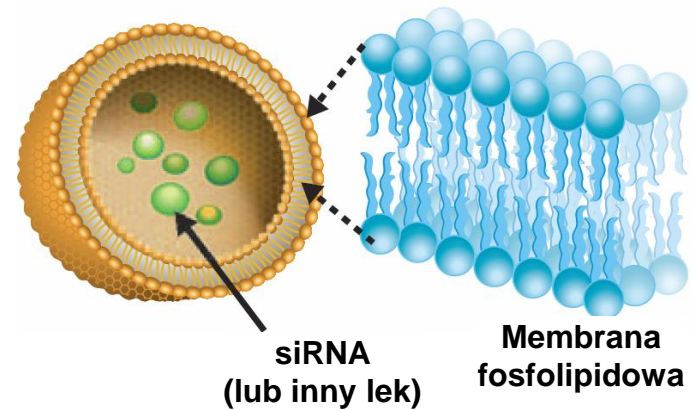
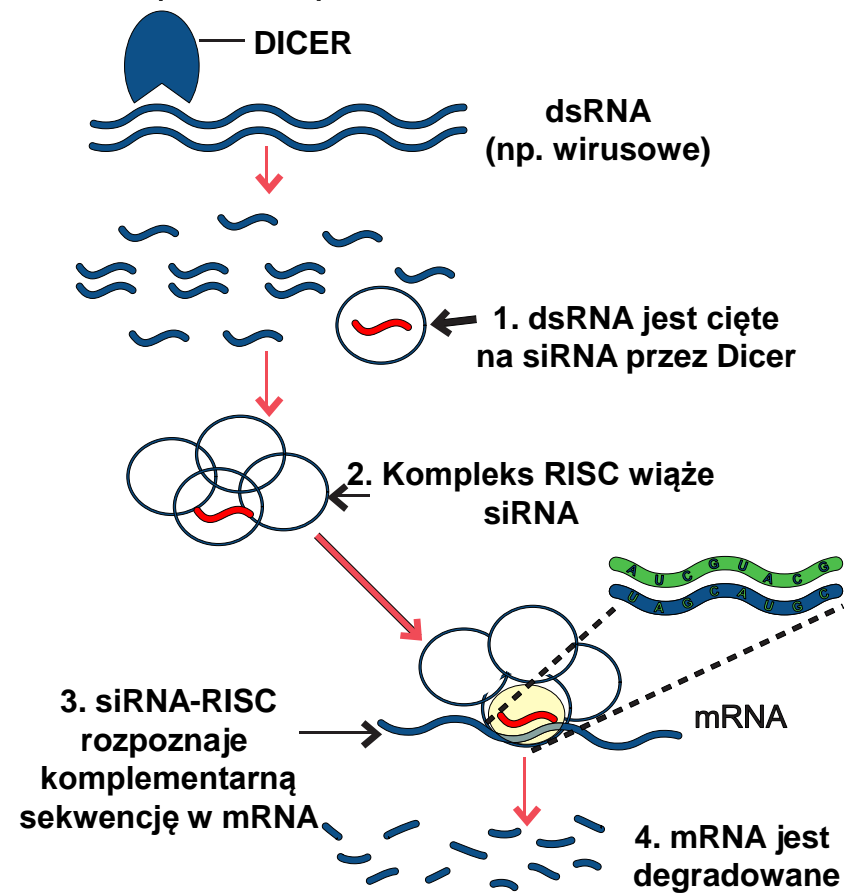
Terapia genowa – interferencyjne RNA (iRNA) - **siRNA**

► **Działanie siRNA** – odkryte u roślin, które wykorzystują system interferencji do ochrony przed wirusami RNA

► siRNA są przydatnym narzędziem do selektywnego **wyciszania genów** w celu np. badania funkcji genu przez obserwację fenotypu molekularnego komórek

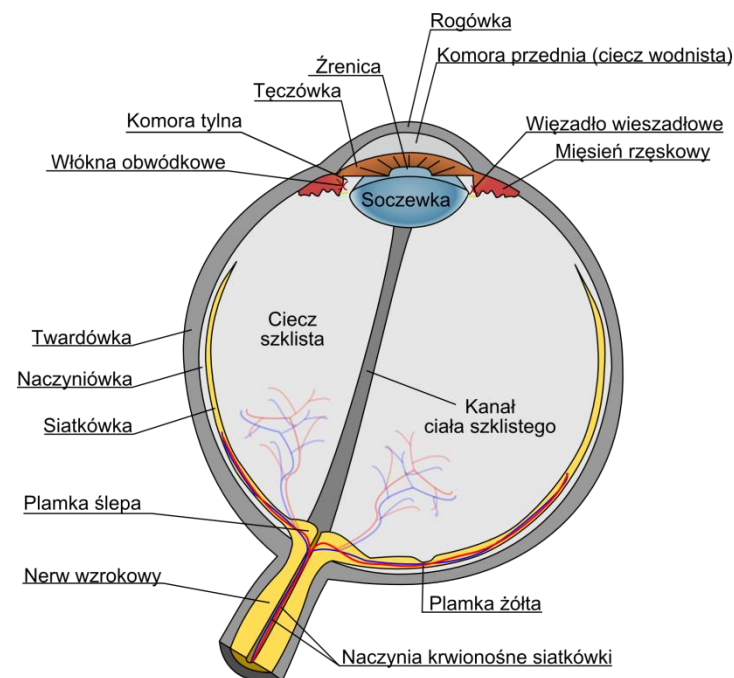
► siRNA są używane do terapii chorób, w których dochodzi do nieprawidłowej i niepożądanej ekspresji danego białka

► Ich przydatność wynika ze stosunkowo łatwego i taniego sposobu syntezy i dostarczania z użyciem **liposomów**



Terapia genowa – interferencyjne RNA (iRNA) - siRNA

- Obserwowany jest niski poziom efektów ubocznych terapii z siRNA w porównaniu do tych z użyciem wirusów
- Przykładem skutecznej terapii jest podawanie cząsteczek siRNA skierowanych do mRNA **VEGF** u pacjentów z **zanikiem plamki żółtej**
- Uważa się, że **powstawanie nowych nieprawidłowych naczyń krwionośnych w siatkówce** odgrywa główną rolę w rozwoju choroby i jest ona **stymulowana przez VEGF** (czynnika wzrostu śródbłónka naczyń)
- Niekontrolowany rozrost naczyń wywołuje opuchliznę i stan zapalny pogłębiający problem z widzeniem
- W I fazie prób klinicznych 25% pacjentów, którym podano siRNA, doznało poprawy, a u pozostałych nie zaobserwowano pogorszenia widzenia



Normalne widzenie



Zanik plamki żółtej



Źródło: National Eye Institute

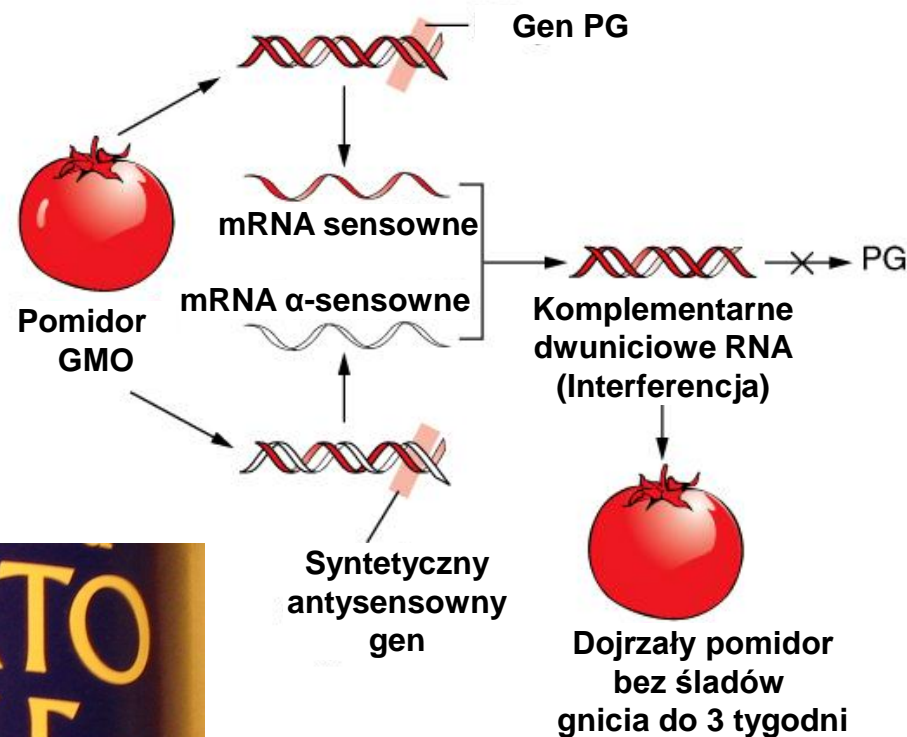
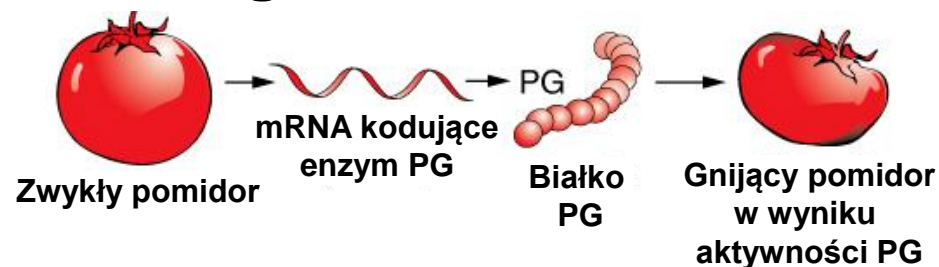
Interferencyjne RNA (iRNA) - biotechnologia

► **Flavr Savr** (wymawiany "flavor saver")

– pomidor GMO, pierwsze warzywo dopuszczone do konsumpcji.

Produkowane w latach 1994-1998.

► Uzyskane poprzez wprowadzenie **antysensownego genu**, którego produkt interferował i powstrzymywał produkcję enzymu – **poligalakturonazy (PG)**. Enzym rozkłada pektynę w ścianie komórkowej zmiękcza tkankę, podczas dojrzewania, starzenia i psucia się owocu



INGE – Wykład 4 i 5 – podsumowanie

