

Задача 14. Цвет и свет. 10 баллов

Часть I. Сияющие цветы. Каждый год в разных странах проходят выставки-конкурсы самых красивых и необычных цветов. Представьте себе, что Вы находитесь в команде селекционеров, участвующих в очередном конкурсе. Вы обязательно должны победить! Но что придумать? Черные и голубые розы, полосатые тюльпаны, махровые незабудки — все это уже давно придумано и получено. Поэтому Вы решаете создать уникальные растения со светящимися цветками или листьями.

1. Как с использованием генной инженерии создать растения со светящимися цветками или листьями, потомство которого также будет иметь светящиеся цветки/листья (1,5 балла)?
2. Приведите примеры живых организмов, которые могут светиться. Какие явления лежат в основе этого процесса (1 балл)?
3. Опишите устройство наноконструкции, которая может быть использована для получения светящихся цветков или листьев. Каким образом можно доставить эту конструкцию в клетки растения? Будет ли потомство такого растения иметь светящиеся цветки/листья? Ответ обоснуйте (1,5 балла).
4. Как на жизнедеятельности растения скажутся изменения, вызванные генно-инженерным вмешательством (0,5 балла)? Введением наноконструкции (0,5 балла)?
5. Как и для чего в настоящее время генная инженерия используется в сельском хозяйстве (1 балл)?

Часть II. Светящиеся животные.

Одним из самых распространенных подходов, используемых в нейробиологии для изучения внутри-и межклеточных процессов в нейронах, астроцитах и сосудах мозга, является окрашивание клеток при помощи введения специальных флуоресцентных зондов.

Особенностью этих молекул является то, что они флуоресцируют (светятся) при освещении лазерным светом определенной длины волны. При взаимодействии с определенными клеточными структурами, ионами или молекулами изменяется интенсивность флуоресценции зонда или длина волны флуоресценции. Несмотря на ряд достоинств флуоресцентных зондов (относительно простое использование, невысокая стоимость), существует и много недостатков. Например, многие зонды цитотоксичны и быстро выгорают, что не позволяет проводить длительные эксперименты. Кроме того, большинство зондов не являются строго специфичными, что оставляет неоднозначность при трактовке результатов. В связи с этим в исследованиях все чаще начали использовать генетически модифицированных мышей, в ДНК нейронов которых введен ген флуоресцирующего белка. Этот ген может быть исходно активным в геноме нейронов

или может активироваться при определенных условиях.

1. Какими должны быть флуоресцентные зонды, чтобы при нанесении на культуру клеток/нервную ткань/мозг они избирательно проникли (а) в цитоплазму клеток, (б) в митохондрии, (в) в ядро (1,5 балла)?
2. Каким требованиям должен отвечать флуоресцентный зонд, применяемый для исследования распределения Ca^{2+} в нейронах и определения концентрации Ca^{2+} (0,5 балла).
3. Приведите примеры, в каких исследованиях могут быть использованы генетически модифицированные мыши, в нейронах которых постоянно экспрессирован флуоресцентный белок? Для исследования каких процессов могут быть использованы мыши, в нейронах которых флуоресцентный белок экспрессируется только при определенных условиях? Примеры опишите максимально подробно (2 балла).

Ответ

Часть I.

1. Для того, чтобы потомство модифицированных растений также имело светящиеся органы, необходимо ввести ген, отвечающий за люминесценцию, в ДНК родительского растения. Для этого необходимо использовать конструкции, состоящие из гена, кодирующего флуоресцентный белок, и участка, ответственного за встраивание в ДНК растительной клетки-хозяина. Для подобных целей чаще всего используют вектор на основе плазмиды Ti агробактерии, способной встраивать куски ДНК в геном растительной клетки. При правильном встраивании гена флуоресцентный белок будет синтезироваться в листьях или лепестках растений и флуоресцировать при освещении светом с правильной длиной волны.
2. Организмы, обладающие биолюминесценцией, - это некоторые морские обитатели: бактерии, живущие на кожных выростах и складках глубоководных животных (кальмаров, рыб-удильщиков и т.д.), медузы, некоторые двустворчатые моллюски (*Pholas dactylus*); насекомые (*Pyrophorus sp.*). Биолюминесценция – это явление, при котором отдельные органы или клетки живых организмов светятся за счет собственных процессов, или процессов, протекающих в клетках их симбионтов. Флуоресценция может возникать за счет излучения кванта света флуоресцентными белками при освещении организма нужной длиной волны. Флуоресценция также может возникать при расщеплении субстрата – люциферина – при помощи фермента люциферазы.
3. Устройство наноконструкции может быть следующим: наночастицы серебра или золота,

конъюгированные с фрагментом ДНК, отвечающим за встраивание в ДНК клетки-хозяина и участком, кодирующим флуоресцентный белок. Введение наноконструкции может осуществляться, к примеру, методом электропорации. Возможно использование конструкции без гена, отвечающего за встраивание в геном хозяина. В этом случае в клетках растения флуоресцентный белок образовываться будет, но у потомства листья и лепестки будут обычными.

4. В идеале функционирование растений после генно-инженерной модификации или введения наноконструкции не должно изменяться. Тем не менее, возможны следующие “побочные действия”: при использовании плазмиды агробактерий с неудаленными генами бактерии, вызывающими синтез белков, трансформирующих клетки растения-хозяина, возможно перерождение растительных клеток и рост опухолей. Золотые или серебряные наночастицы из наноконструкций могут инициировать ряд неблагоприятных процессов. В частности, наночастицы могут образовывать крупные агрегаты в цитоплазме клеток и блокировать внутриклеточный транспорт органоидов и питательных веществ. Кроме того, они могут приводить к дисфункциям устьичных клеток, нарушая водный обмен. Наночастицы маленьких размеров (менее 5 нм), наиболее эффективные для доставки в клетки, могут выступать в качестве сайтов генерации супероксид-анион радикала O_2^- за счет переноса электрона на молекулу кислорода.
5. В сельском хозяйстве генная инженерия чаще всего используется для получения сортов растений, устойчивых к часто используемым пестицидам (например, ко глифосату). Кроме того, выводят (генетически модифицируют) растения для получения устойчивости к неблагоприятным условиям среды, действию паразитов-вредителей, а также для выведения более урожайных сортов, сортов с повышенным содержанием питательных веществ или витаминов и сортов с увеличенным временем хранения плодов. Например, у томатов в результате генно-инженерной модификации подавляется ген, отвечающий за синтез белка (фермента из класса пектиназа), вызывающий размягчение и разложение томатов вскоре после созревания. Полученные растения дают плоды (томаты), которые долго хранятся и не портятся

Часть II.

1. а. Используются сложные эфиры, которые легко проникают через плазматическую мембрану клеток, а в цитоплазме расщепляются клеточными эстеразами. Образующаяся молекула флуоресцентного зонда-кислоты после этого несет заряд и не может выйти из клетки. б.

Возможно несколько вариантов: молекула зонда (семейство зондов mito tracker) содержит хлор-

метильные радикалы, взаимодействующие с SH-группами клеточных белков. Внутренняя мембрана митохондрий содержит много белков с тиоловыми группами, поэтому указанные флуоресцентные зонды будут накапливаться преимущественно в митохондриях. Второй вариант – зонды, которые несут много групп с положительным зарядом. Поскольку трансмембранный потенциал на внутренней мембране работающих митохондрий отрицательный (-200 мВ), то положительно заряженные молекулы будут накапливаться в митохондриях по градиенту потенциала.

в. Для флуоресцентных исследований ядерных процессов в клетках в настоящее время используют конъюгаты флуоресцентных белков (GFP, CFP или RFP) с сигналом ядерной локализации.

2. Флуоресцентный зонд на ионы Ca^{2+} должен связываться только (или преимущественно) с ионами Ca^{2+} , а не другими катионами, интенсивность его флуоресценции или положение максимума флуоресценции должно меняться даже при незначительных изменениях концентрации ионов Ca^{2+} . Естественно, зонд должен накапливаться в нужном клеточном компартменте, быть нетоксичным, не вызывать фототоксичных эффектов и быть стабильным в течение максимально длительного времени наблюдения.

3. В данном случае возможно много вариантов ответа. Оценивается развернутость и аргументированность ответа. Мыши, в нейронах которых постоянно экспрессирован флуоресцентный белок, используются для получения детальных 3D изображений и карт участков мозга для изучения контактов между нейронами, глиальными клетками и сосудами. Кроме того, такие животные используются для визуализации изменения микроморфологии отростков нейронов (дендритных шипиков) в области синапсов при разных видах стимуляции, при гибели нейронов во время локальной гипоксии, инсульте и других индуцированных нейродегенеративных патологиях, для исследования миграции клеток микроглии и астроцитов в области повреждений и т.д. То есть все это – такие исследования, при которых важно видеть морфологию всех клеток в мозге в течение длительного эксперимента, избегая фотоповреждения клеток, разрушения флуоресцентного зонда и его “вытекания из клеток” (характерных для низкомолекулярных флуоресцентных зондов). Мыши, в нейронах которых флуоресцентный белок экспрессируется при определенных условиях (например, при активации определенных синапсов), используются для изучения процессов формирования памяти, для визуализации областей мозга, активирующихся или инактивирующихся при различных воздействиях и стимулах. Нобелевскую премию по химии в 2008 году получили Осаму Симомура, Мартин Чалфи и Роджер Тсьен (Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien) “за открытие и

разработку зеленого флуоресцентного белка”.