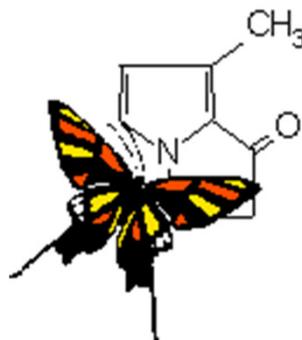


Лаборатория  
НГУ-Интел



# ЭПИГЕНЕТИКА

*Грин Инга Ростиславовна*



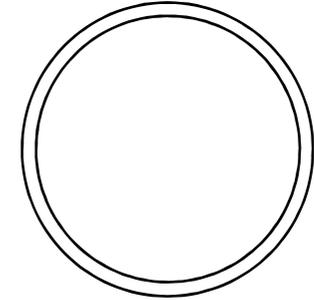
Мультимедийный курс для студентов – биологов Китайско-российского института.

## **Семинар 2. Методы исследования в эпигенетике**

# **Часть 1. Эпигенетические методы исследования на внутриклеточном уровне**

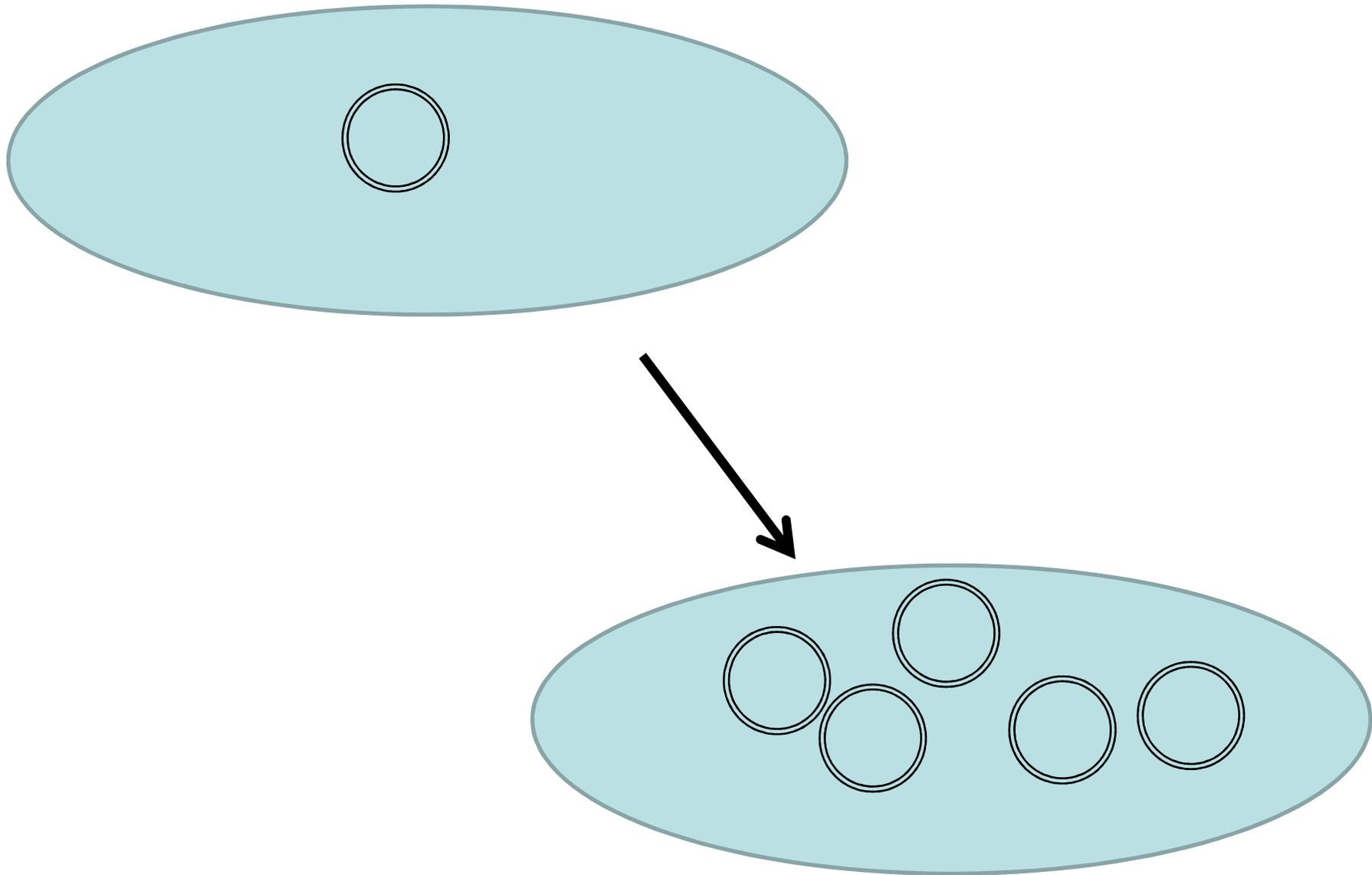
# Клонирование ДНК (DNA克隆)

## Плазмиды (质粒)

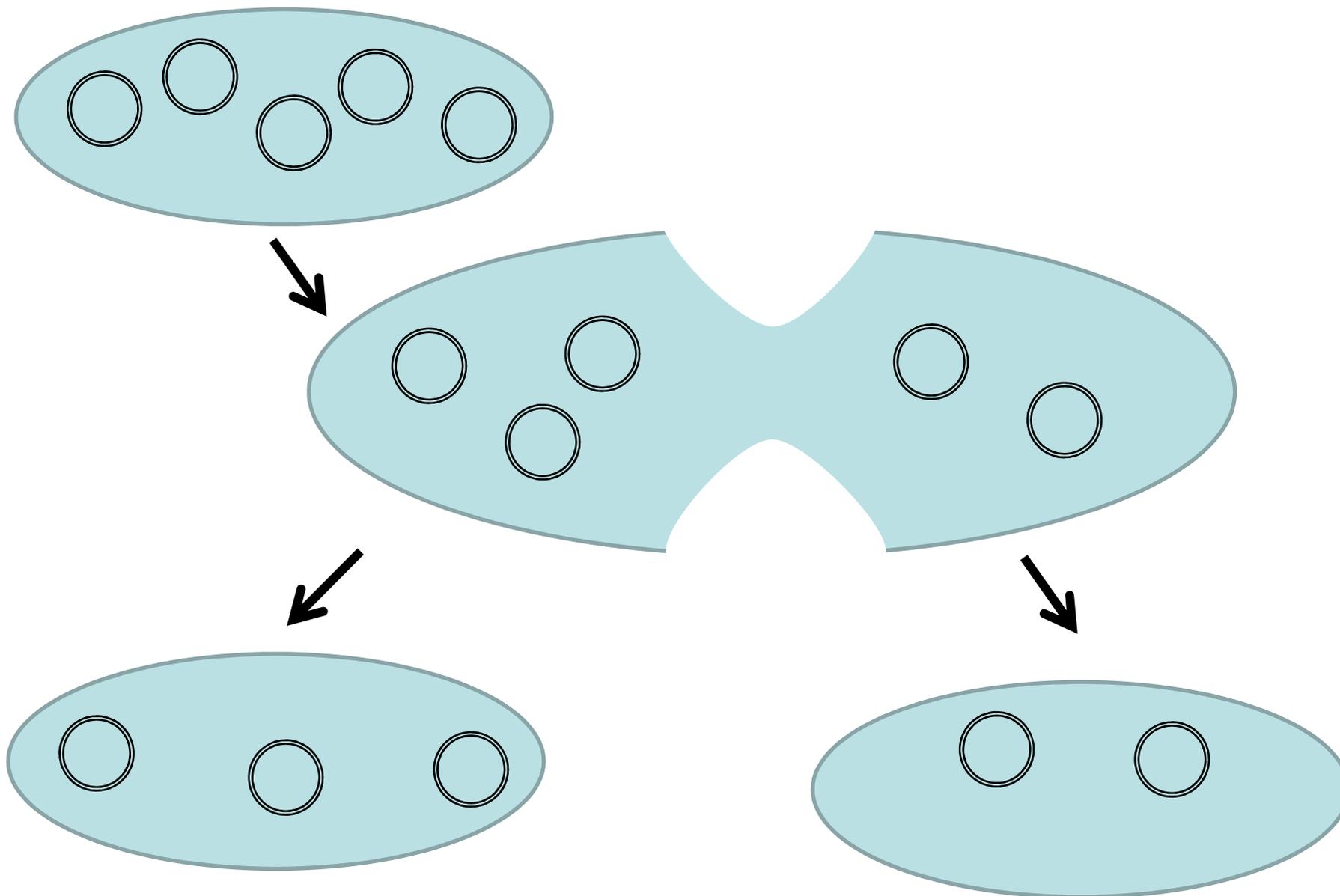


**Плазмида** – внехромосомный генетический элемент встречающийся во множестве видов бактерий. П. – это двухцепочечные замкнутые кольцевые молекулы ДНК размером от 1 до 200 тысяч пар оснований.

Плазмида может размножиться внутри бактерии.

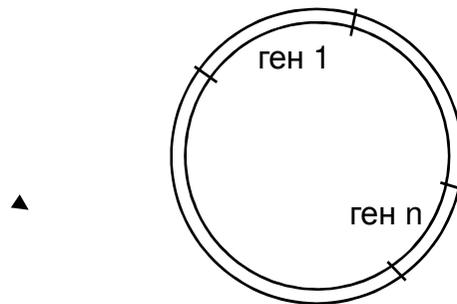


Когда бактерия делится (分), плазмиды попадают в обе клетки



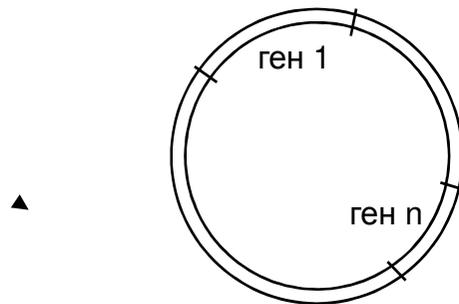
## Плазмиды содержат гены:

1. Устойчивости к антибиотикам (抗生素耐药性);
2. Сайты для ферментов рестрикции (核酸内切酶) и модификации (рестриктазы+метилазы).



## Плазмиды могут содержать:

1. Гены, кодирующие белок;
2. Гены, кодирующие РНК
3. Сайты ДНК (например, метилирование).



## Рестриктазы (эндонуклеазы 核酸内切酶 рестрикции)

– ферменты вносящие в ДНК двуцепочечный разрыв с образованием выступающих ‘липких’ концов. Разрыв вносится по определенным последовательностям-палиндромам.

HindIII      5' - **A**AGCTT-3'      *Haemophilus influenzae* Rd  
                 3' - **TTCGAA**-5'      геном закончен в 1995 г.

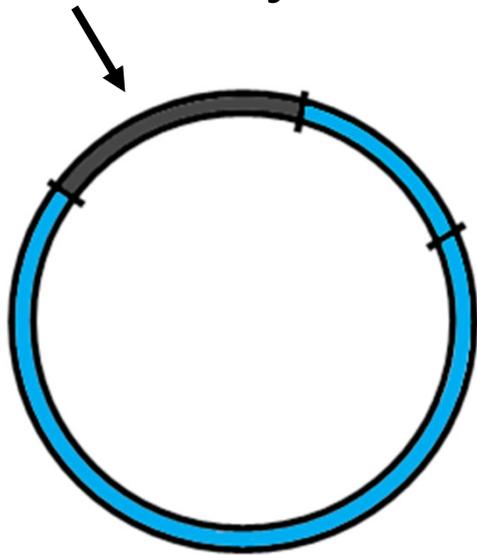
EcoRI                      **G**AATTC      *Escherichia coli*

BamHI                      **G**CATCC      *Bacillus amyloliquefaciens* H

PstI                              CTGCA**G**      *Providencia stuartii*

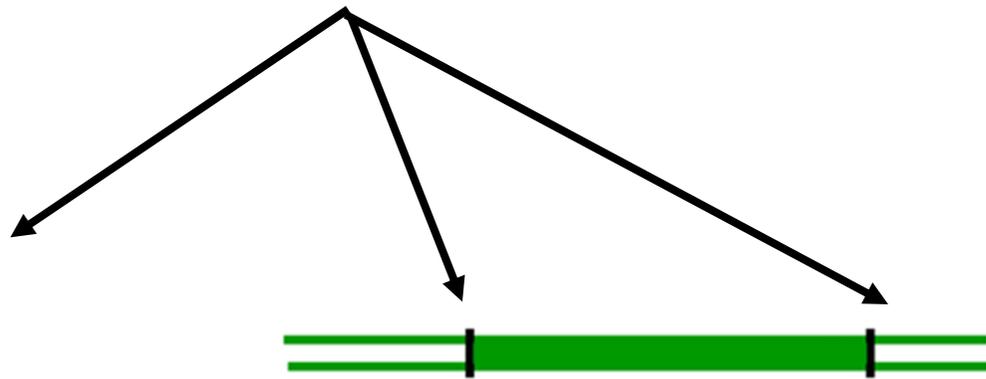
# Клонирование ДНК

Ген устойчивости  
к антибиотику А



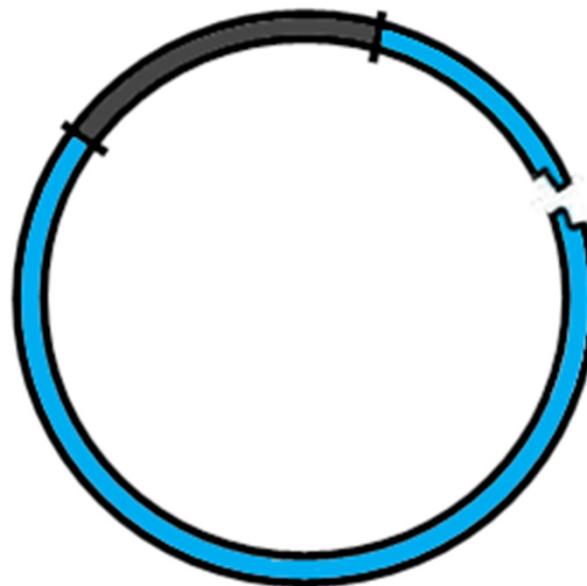
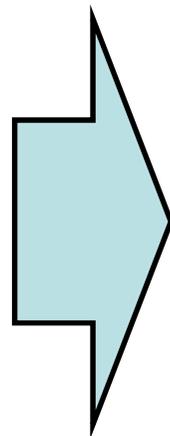
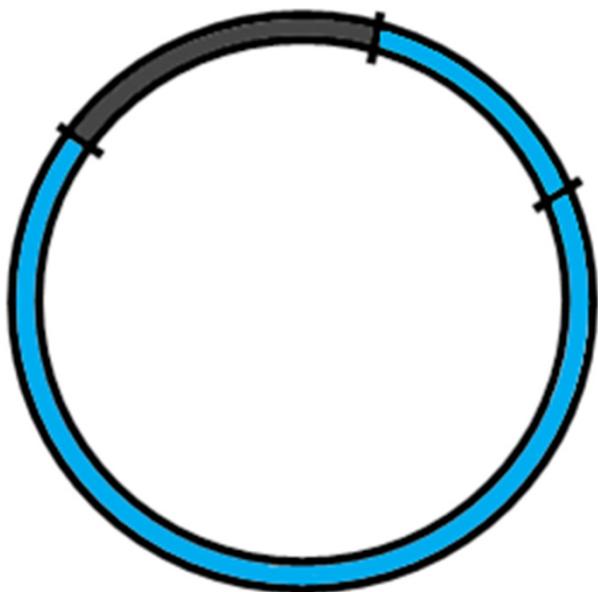
Плазмида

Сайты для EcoRI

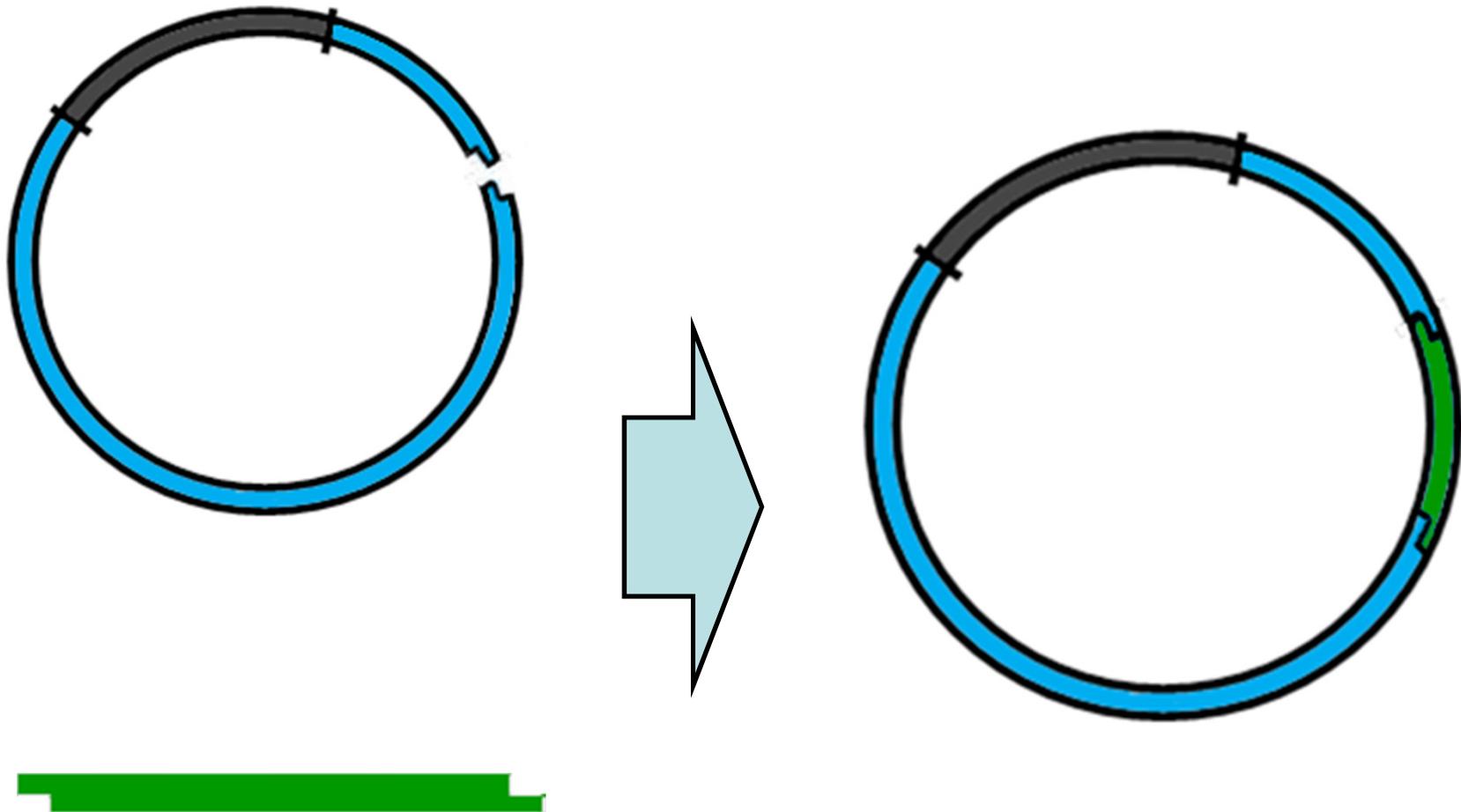


ДНК с геном X

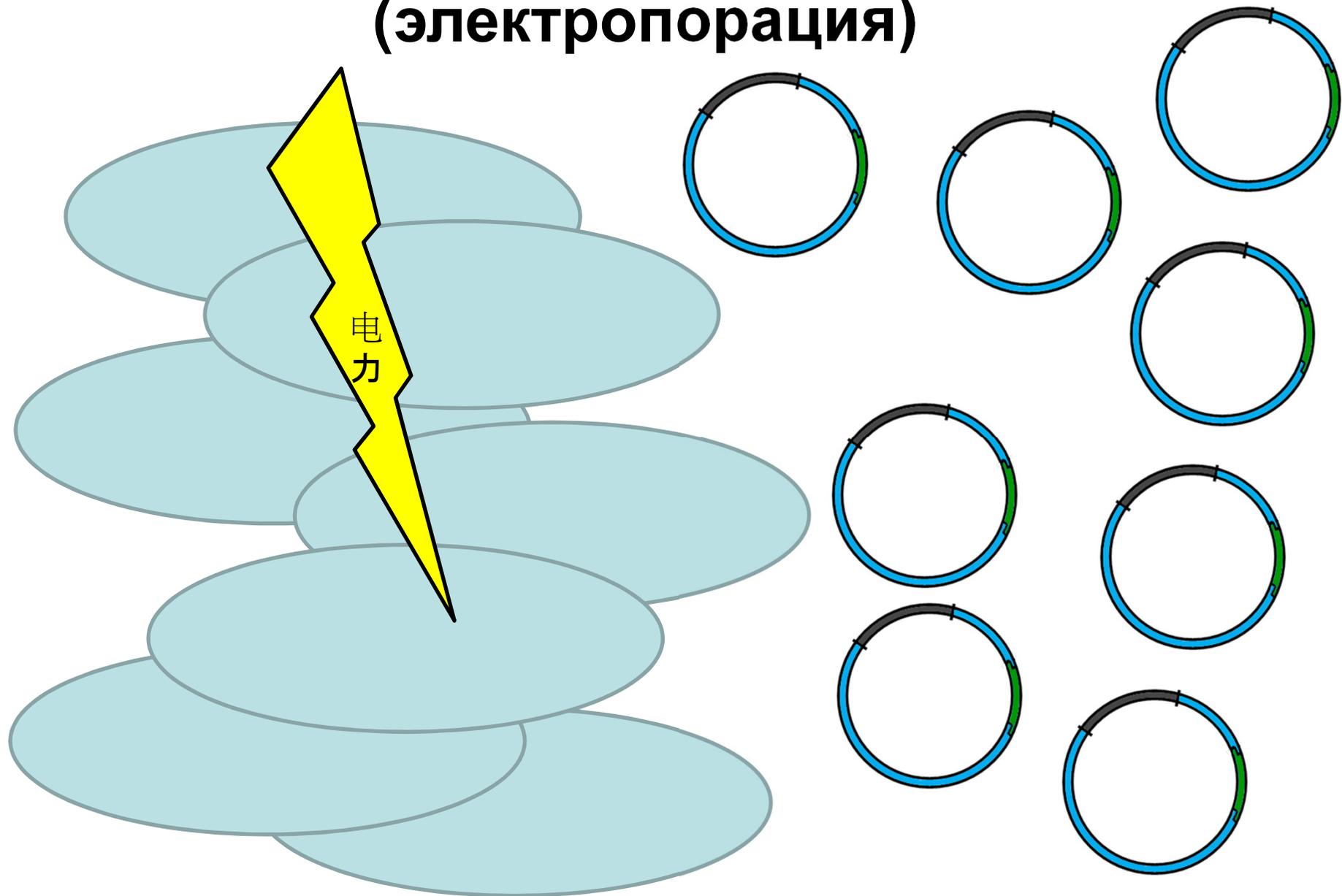
# Гидролиз ДНК с помощью EcoRI



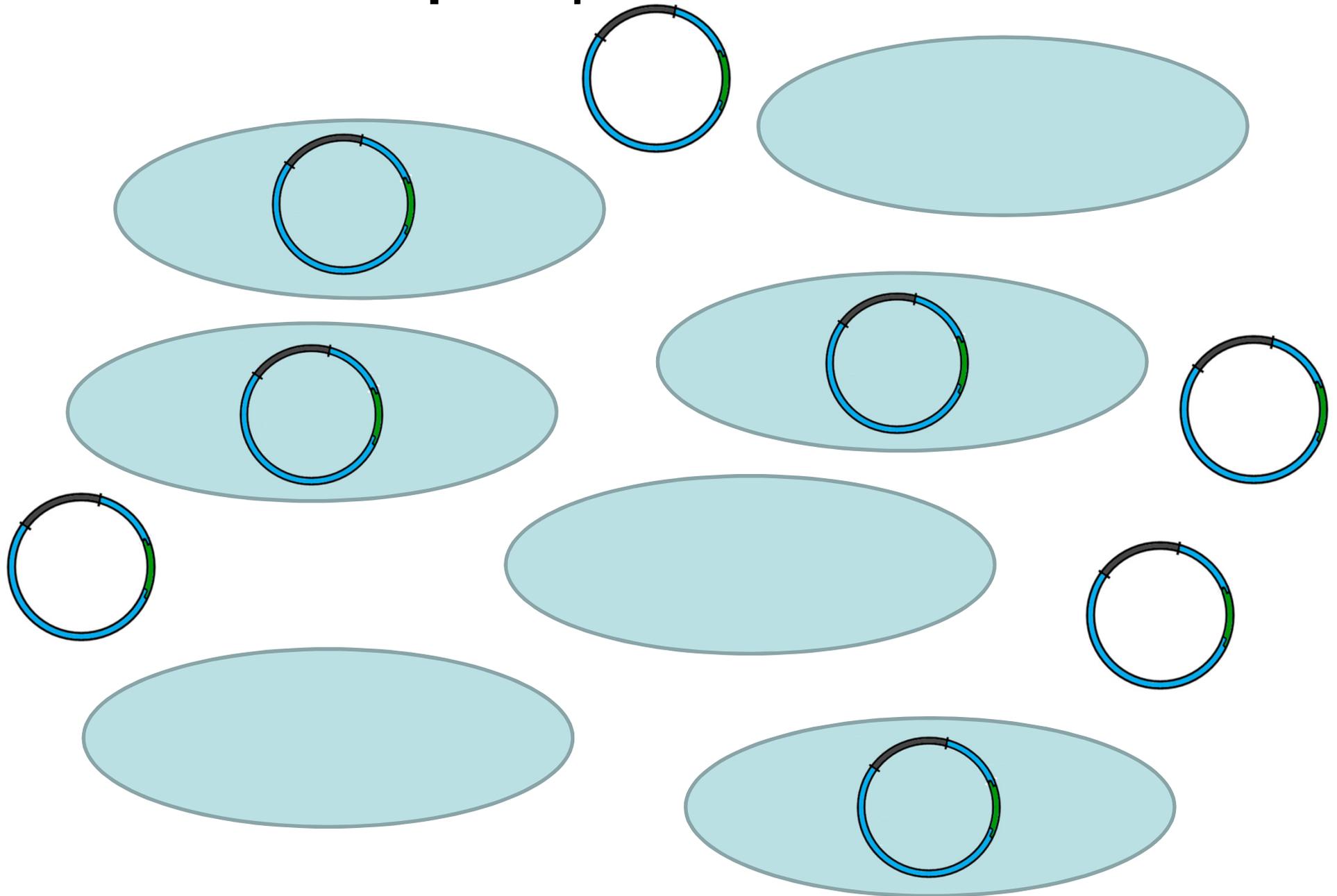
# Сшивка ДНК лигазой



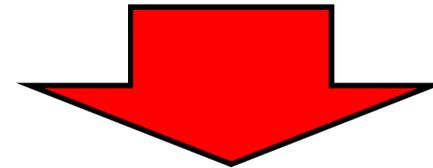
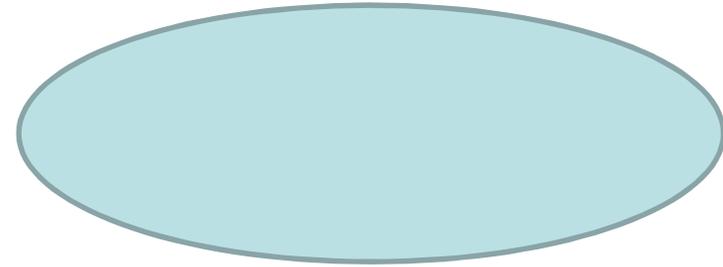
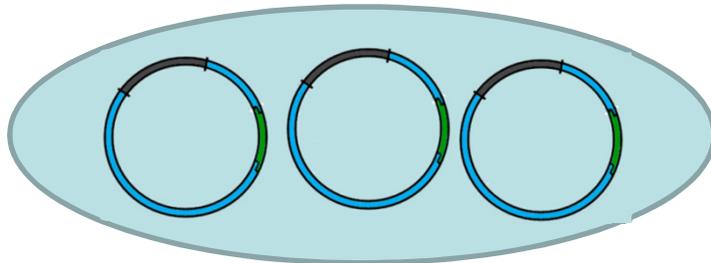
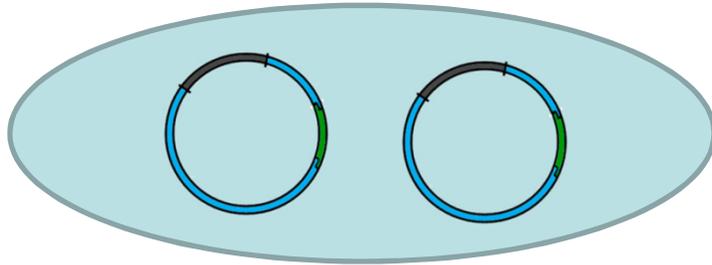
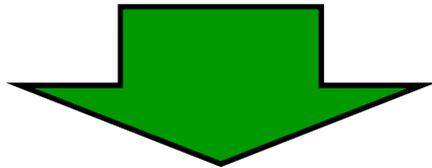
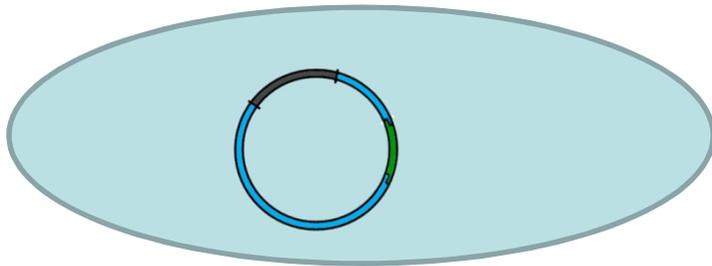
# Трансформация клеток E.coli (электропорация)



# Электropорация клеток E.coli



# Высев клеток E.coli на среду с антибиотиком

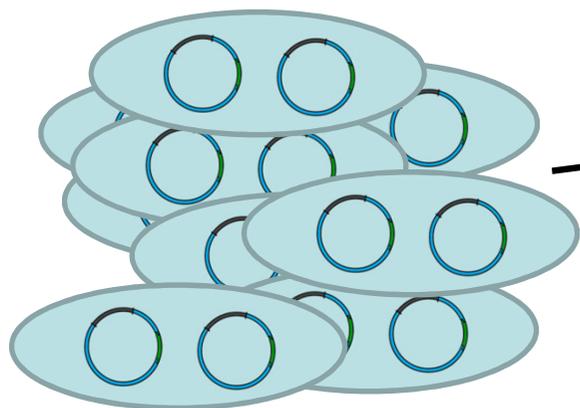
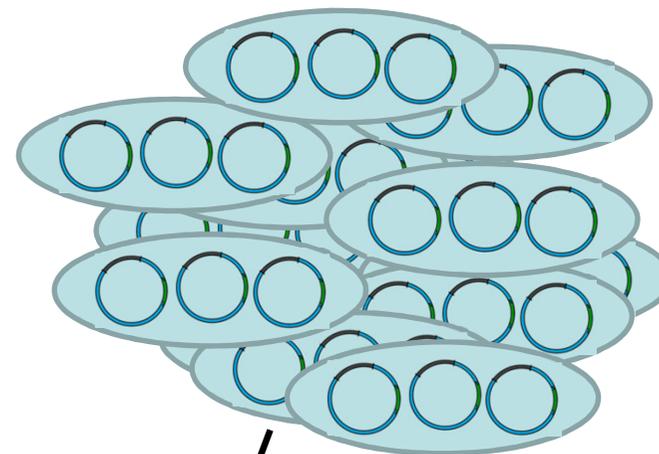


НЕТ деления

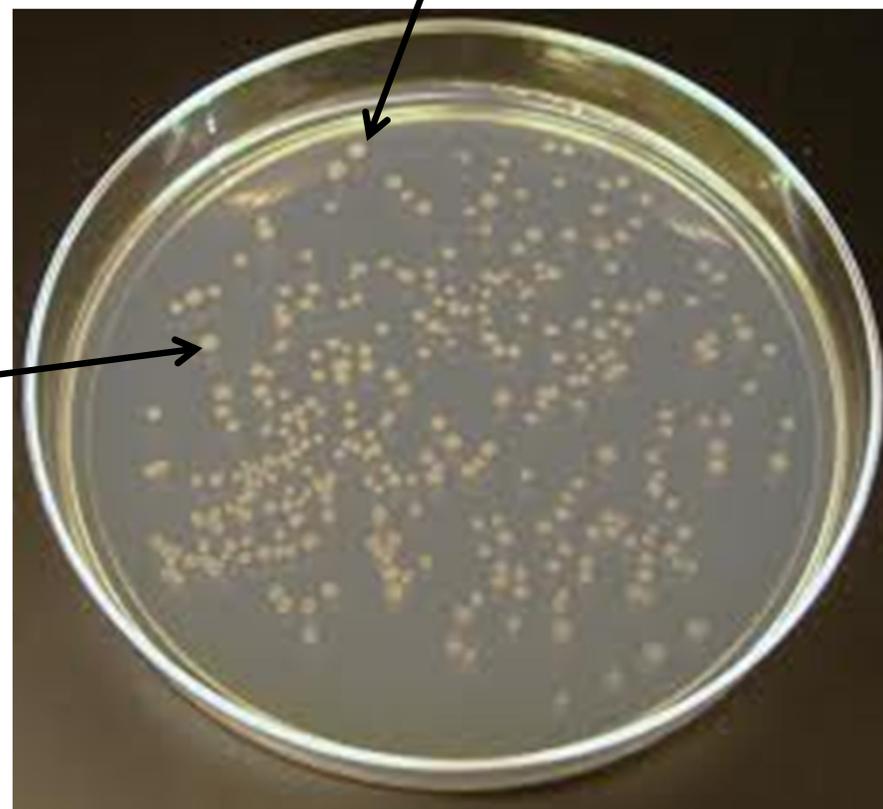
# Чашка Петри



## Клон 1



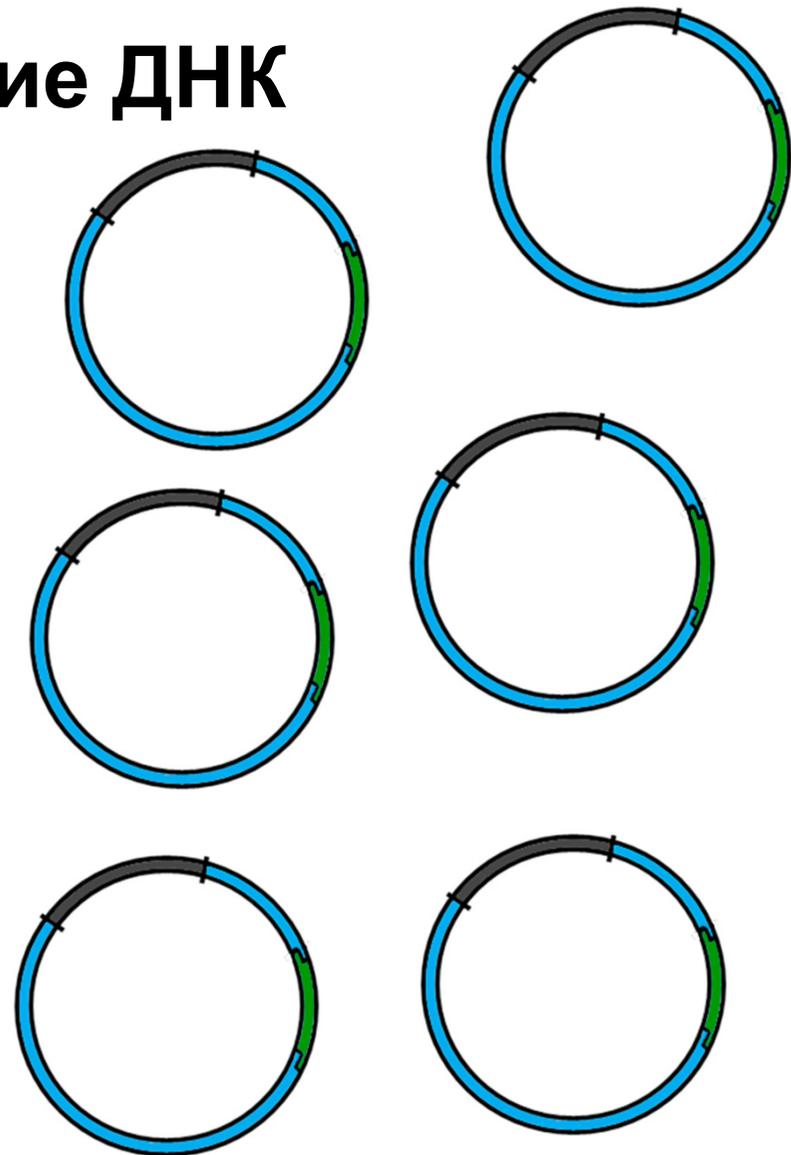
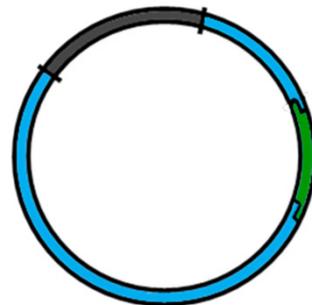
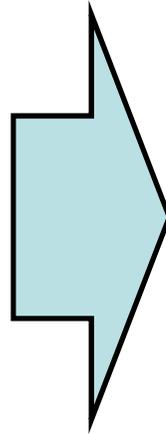
## Клон 2



# Клонирование ДНК

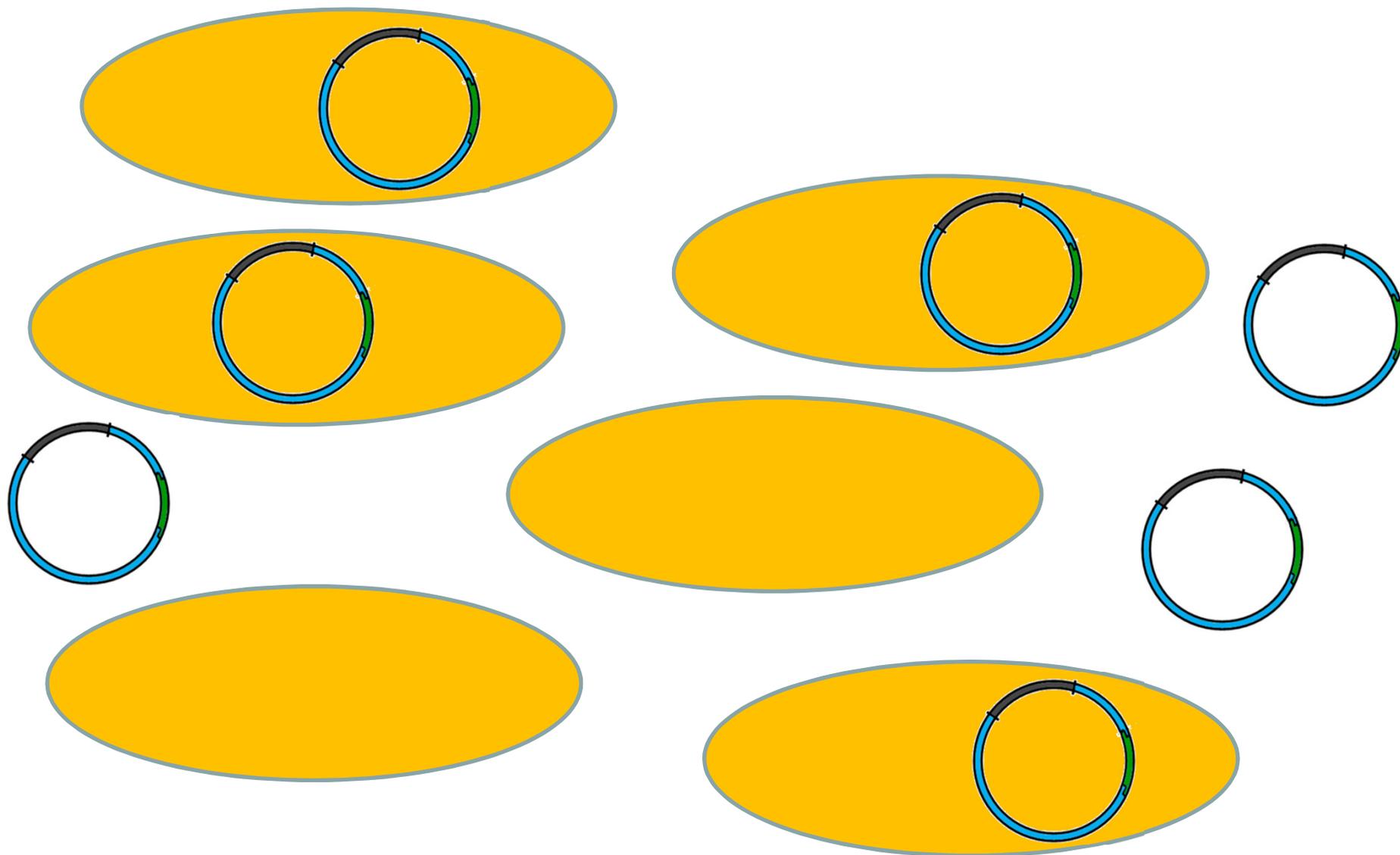


ДНК с геном X



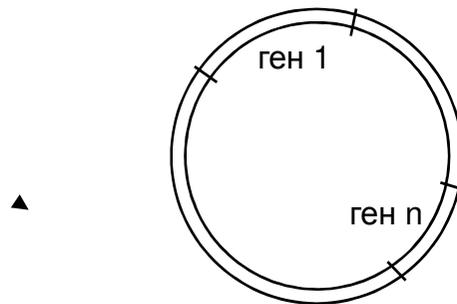
Очень много копий

# Трансфекция эукариотических клеток

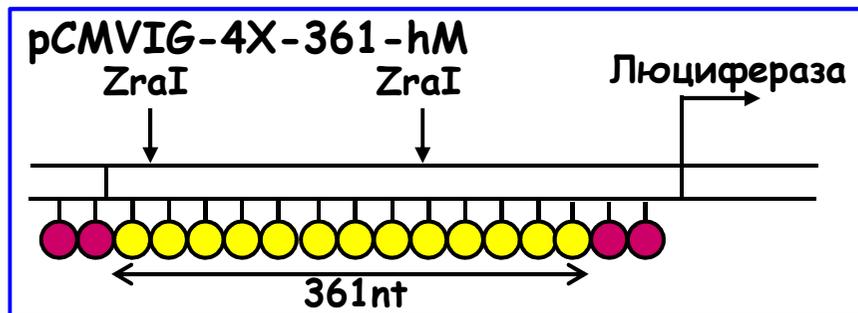
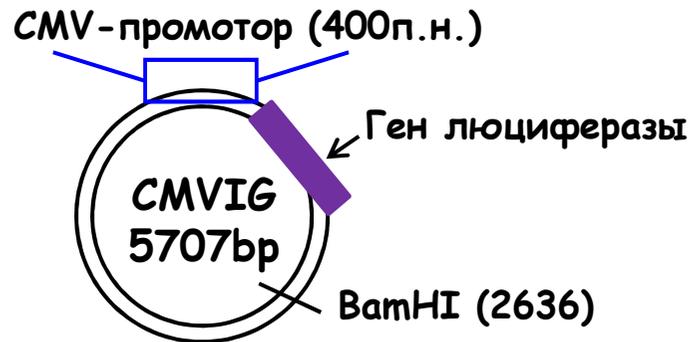


## Плазмиды могут содержать:

1. Гены, кодирующие белок;
2. Гены, кодирующие РНК (микро РНК, малые интерферирующие РНК)
3. Сайты ДНК (например, метилированные).



# Роль Репарации Гетеродуплексов в активном деметилировании ДНК CMV-промотора



● = U, T или hmU

● = 5mC

hM = полуметилированный CMV-промотор

Активность люциферазы в клетках эукариот:

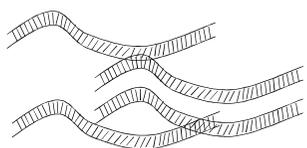
Клетки мышинных эмбриональных фибробластов	WT	MSH2 <sup>-/-</sup>
pCMVIG-4U-361-hM	-	-
pCMVIG-4T-361-hM	29	-
pCMVIG-4hmU-361-hM	16	-

- **Grin I, Ishchenko A.A.** An interplay of the base excision repair and mismatch repair pathways in active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 3.[Epub ahead of print]

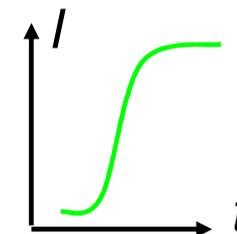
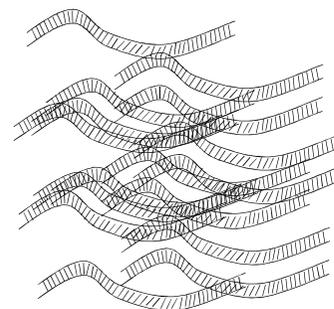
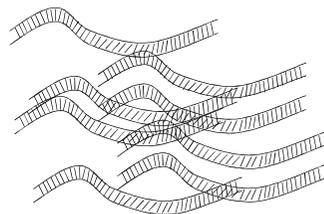
# **Методы анализа микроРНК**

# Методы анализа микроРНК: цифровая ПЦР

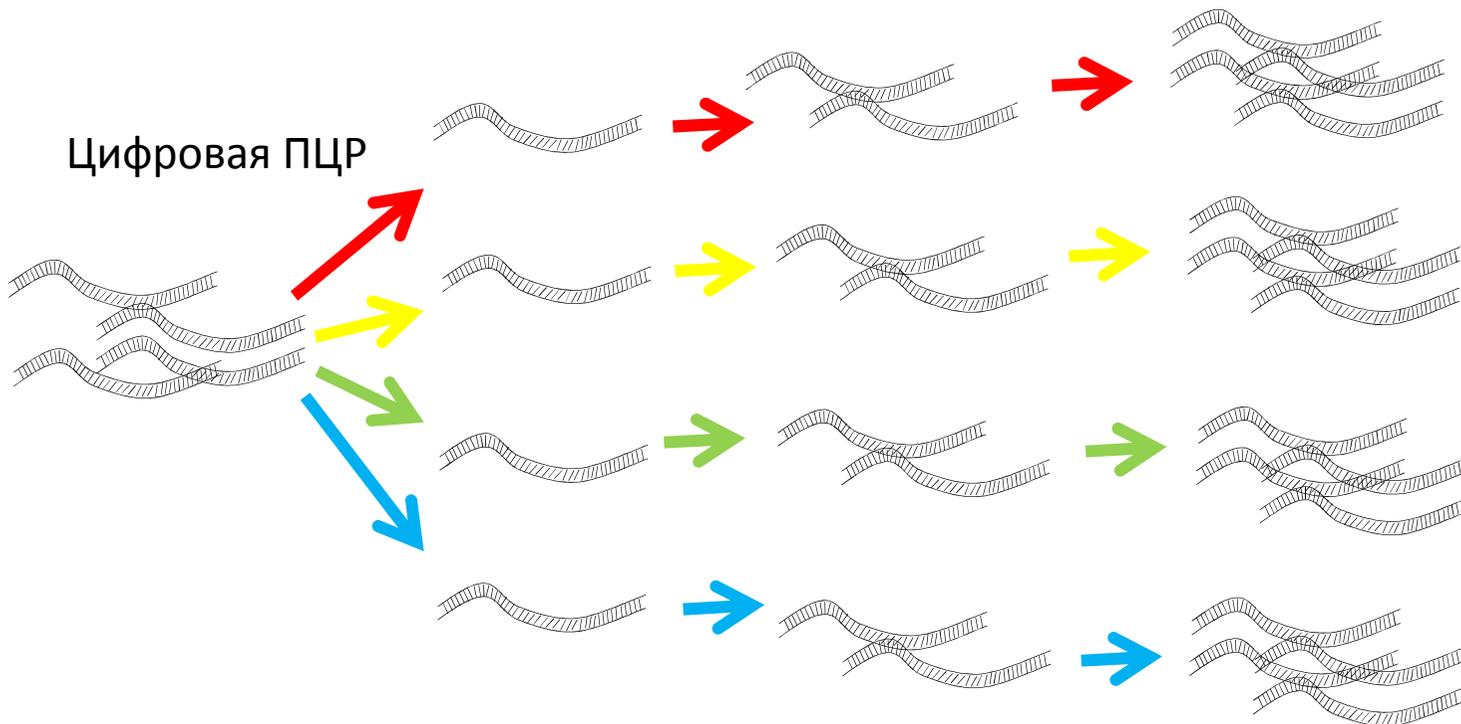
Количественный анализ с детекцией по конечной точке!  
Аmplification каждой молекулы ДНК, изначально присутствующей в пробе, регистрируется независимо



Обычная ПЦР в реальном времени

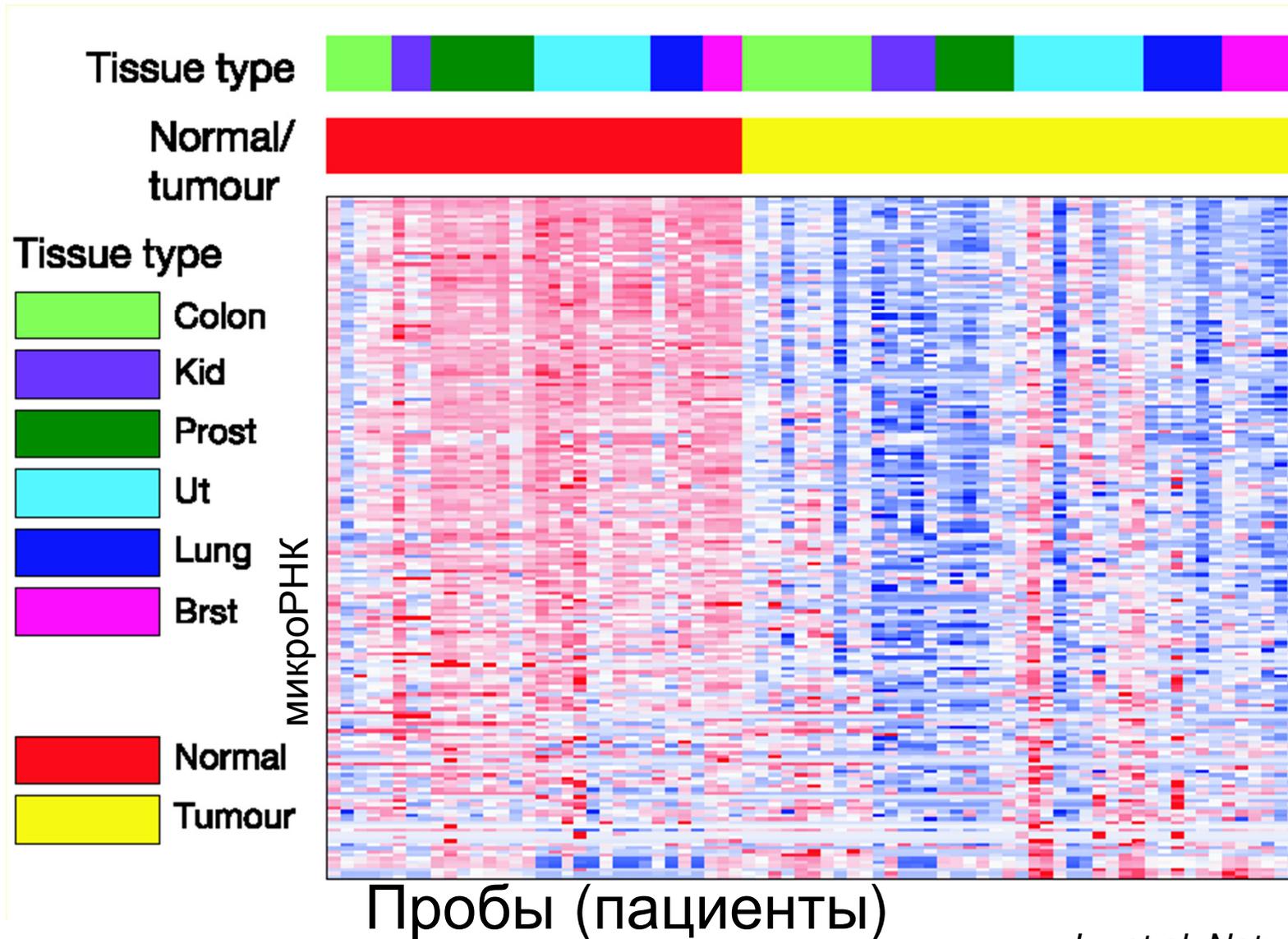


Цифровая ПЦР



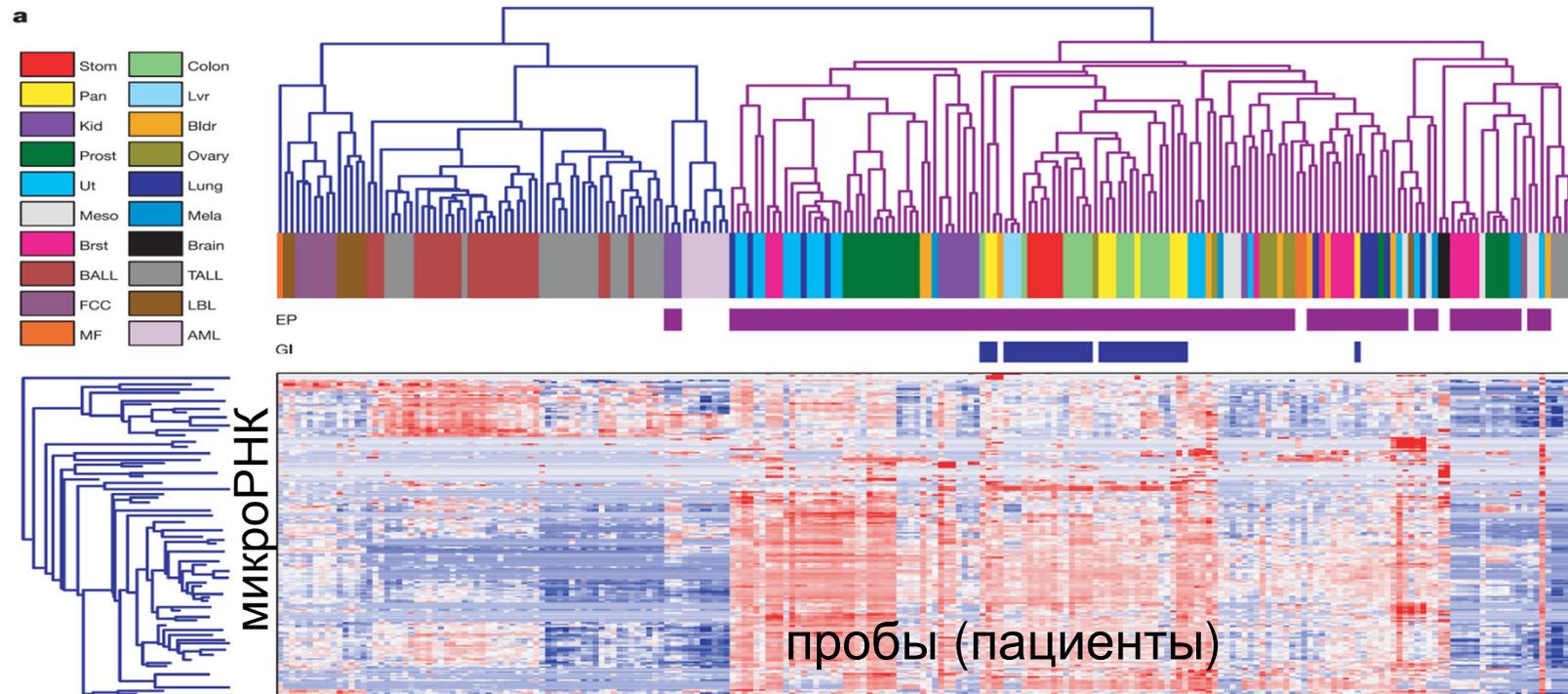
# Профилирование микроРНК позволяет классифицировать раковые опухоли

профили микроРНК заметно отличаются для опухолей и прилежащих нормальных тканей

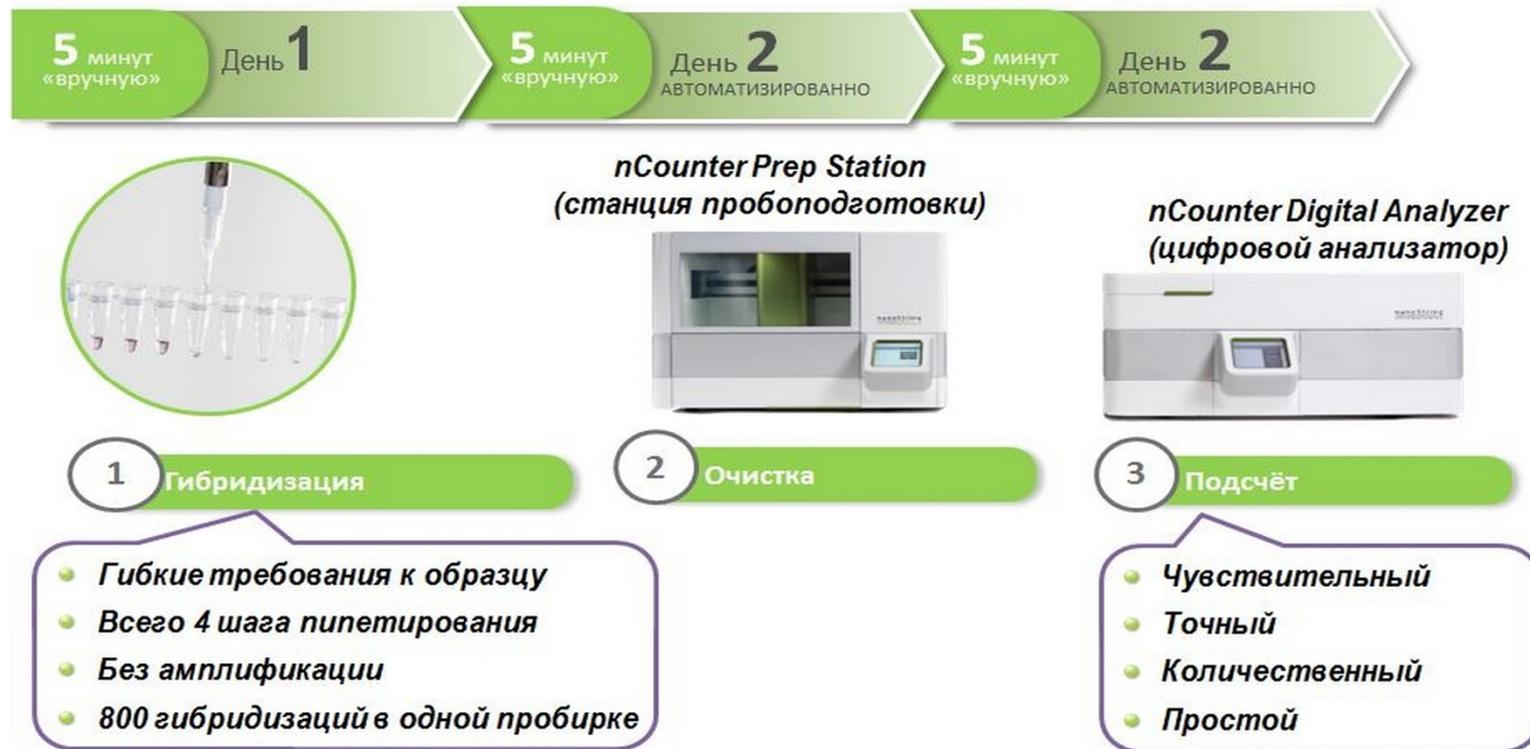


# Профилирование микроРНК позволяет классифицировать раковые опухоли (пример из одной из пилотных статей)

- 334 образца опухолей разных органов человека
- проанализирован массив из 217 микроРНК
- показаны различия в уровнях микроРНК, дискриминирующие тип опухоли
- отличия в основном заключались в снижении уровня тех или иных микроРНК
- дискриминация опухолей по ткани происхождения при помощи анализа профилей микроРНК оказалась более эффективной, чем аналогичная дискриминация при помощи профилей мРНК



# NanoString nCounter – гибридная чиповая платформа для количественного анализа нуклеиновых кислот



Одновременный анализ 12 образцов

Одновременный количественный анализ сотен молекулярных маркеров

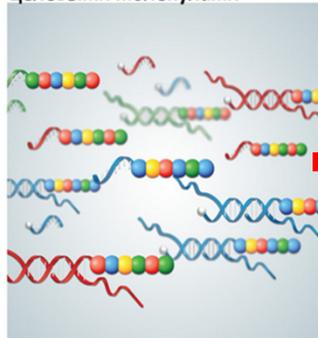
Минимум ручного труда

Требования к количеству, но не качеству препарата РНК (короткие участки гибридизации)

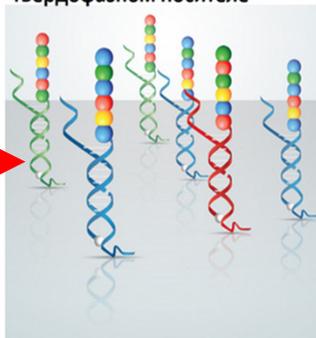
В России в настоящее время установлены две станции: в МНИИ педиатрии и детской хирургии и ФНКЦ им. Д. Рогачева (Москва)

# NanoString nCounter – гибридная чиповая платформа для количественного анализа нуклеиновых кислот, в т.ч. микроРНК

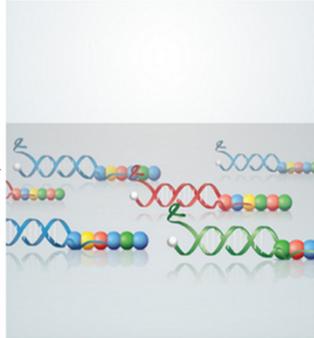
Гибридизация зондов с целевыми молекулами



Фиксация молекулярных комплексов на твердофазном носителе

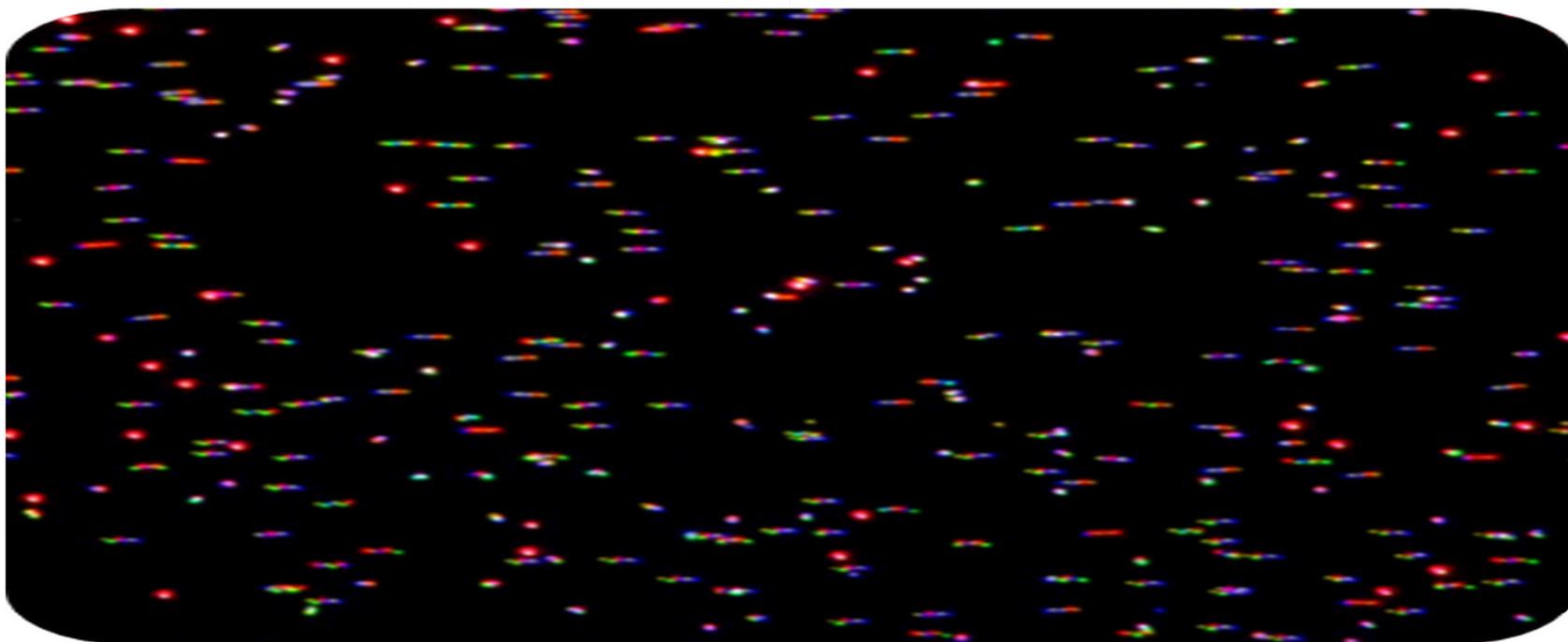


Ориентация молекулярных комплексов в электромагнитном поле



Подсчёт и идентификация меток

Barcode	Counts	Identity
	3	XLSA
	2	FOX5
	1	INSULIN



# **Методы поиска регуляторных элементов**

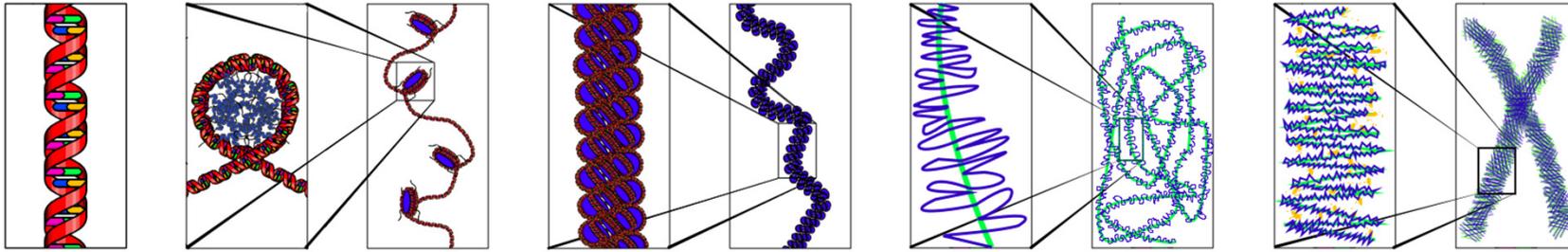
## Можно исследовать:

1) Расположение ядерного скелета или ядерного матрикса (*nuclear matrix*). Это опорная структура ядра клетки.

2) Участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу (англ. S/MAR — Matrix/Scaffold Attachment Regions), служат для заякоривания петель хроматина на белках ядерного матрикса.

3) Локализация инсуляторов и регуляторов  
Инсуляторы — представляют собой сайты связывания особых, инсуляторных белков для блокирования сигналов взаимодействия между энхансером и промотором, если находятся между ними.

4) Расположение гистонов и белков, формирующих сложную разветвленную сеть, сообщающуюся с ядерной ламиной (аннотация хроматина).

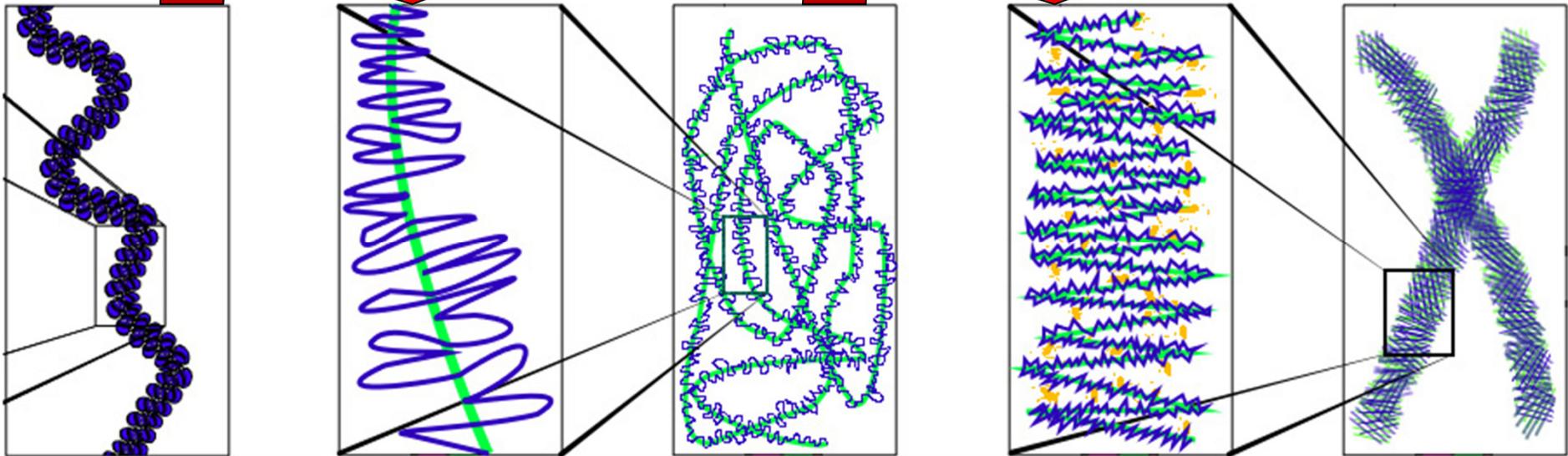


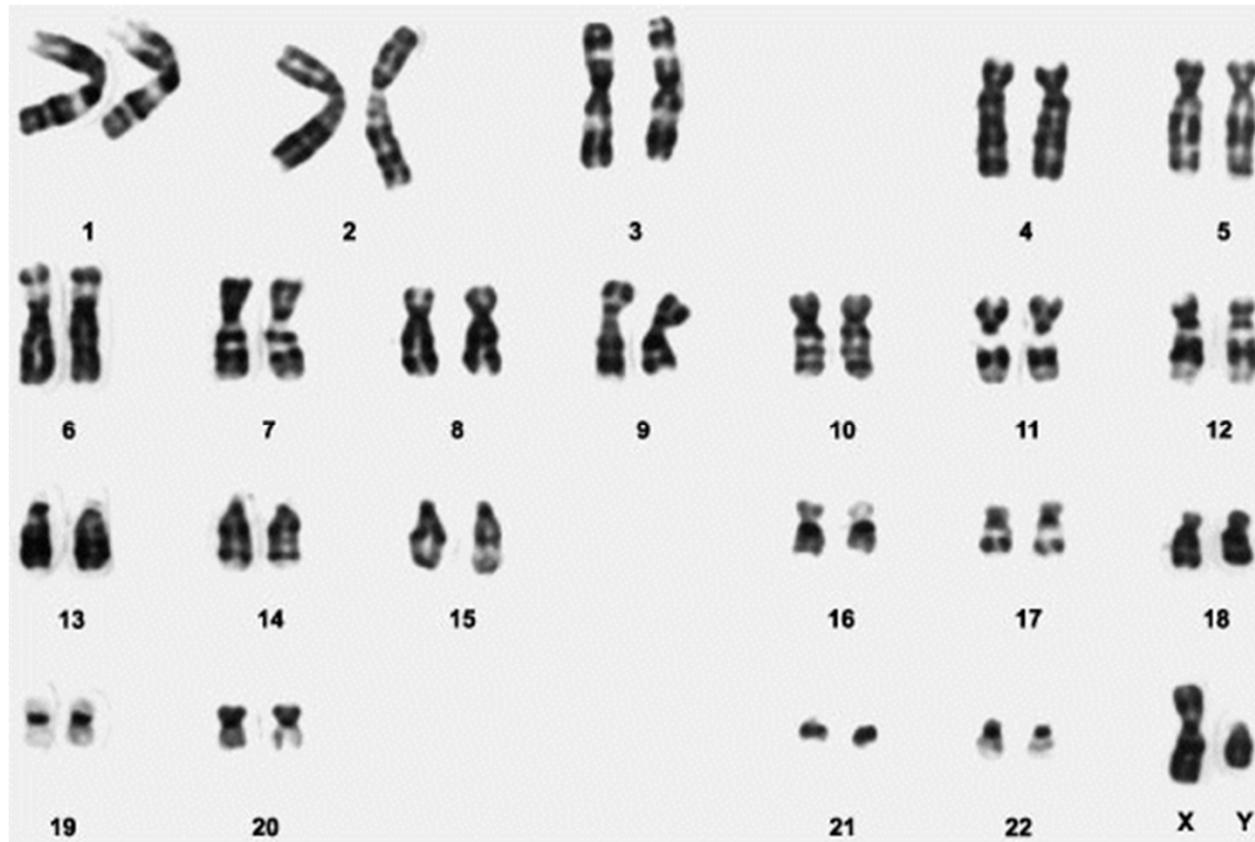
Активный хроматин  
(интерфаза)

Метафазная хромосома  
(деление клетки)

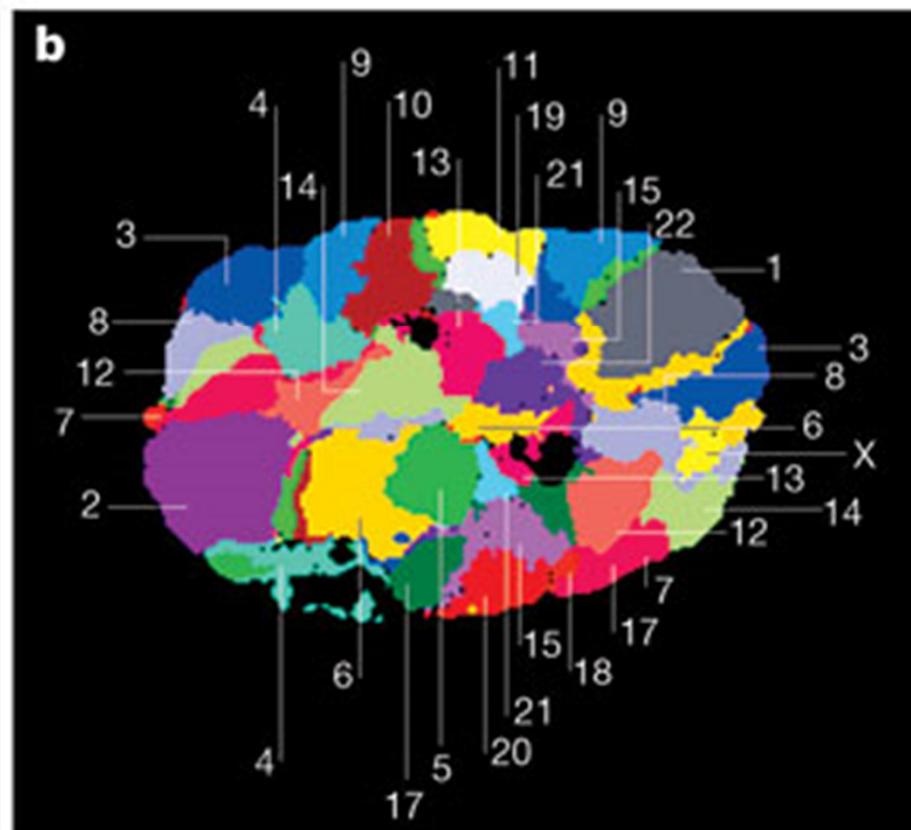
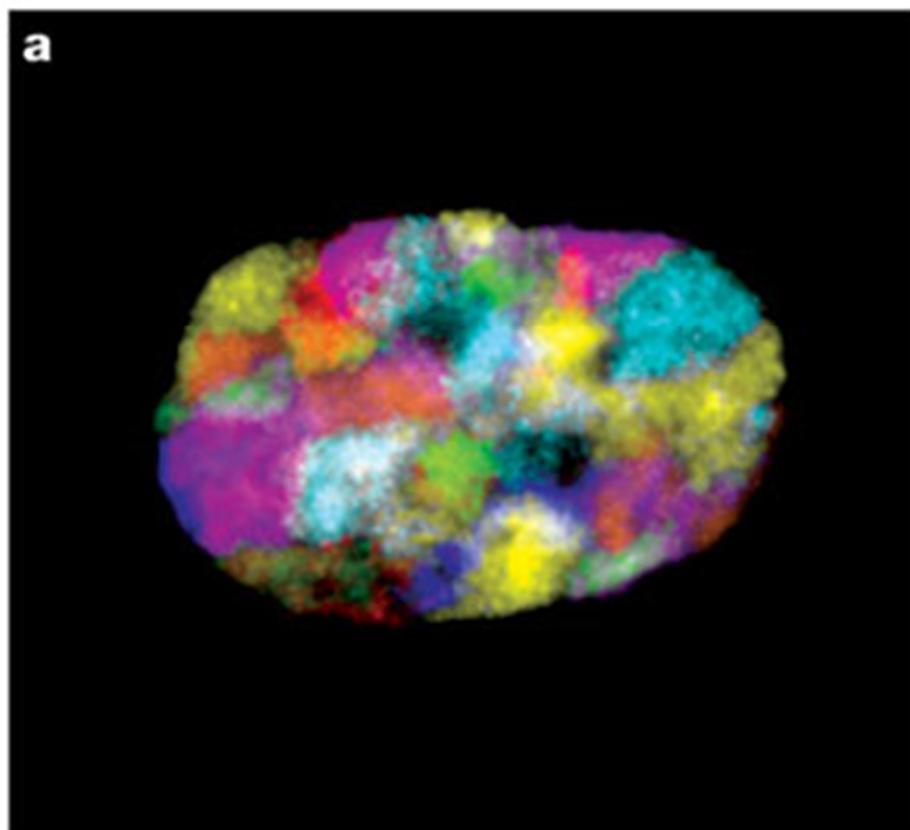
Белки ядерного матрикса

Белки ядерного матрикса





- Гены – участки ДНК
- ДНК образует комплексы с белками и формирует хромосомы
- Каждая хромосома представлена 2-мя копиями – отцовской и материнской
- Т.о. каждый ген также представлен 2-мя копиями (аллелями) – отцовской и материнской



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | **Genetics**

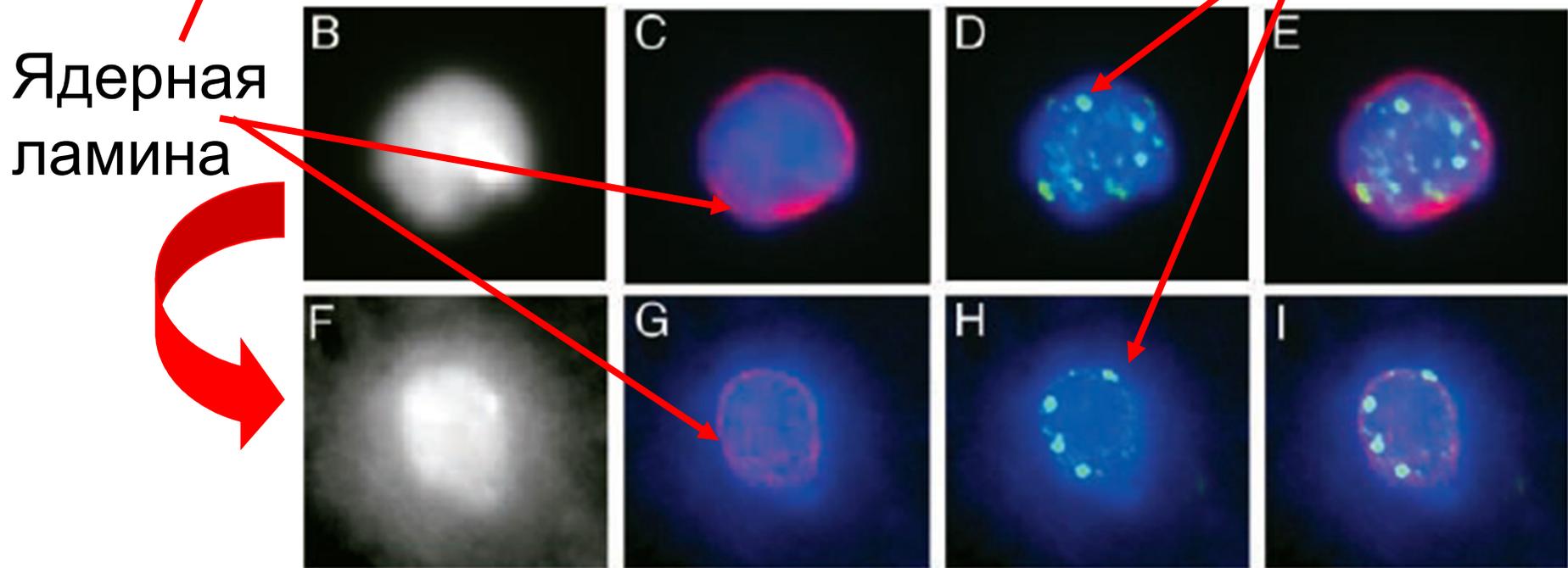
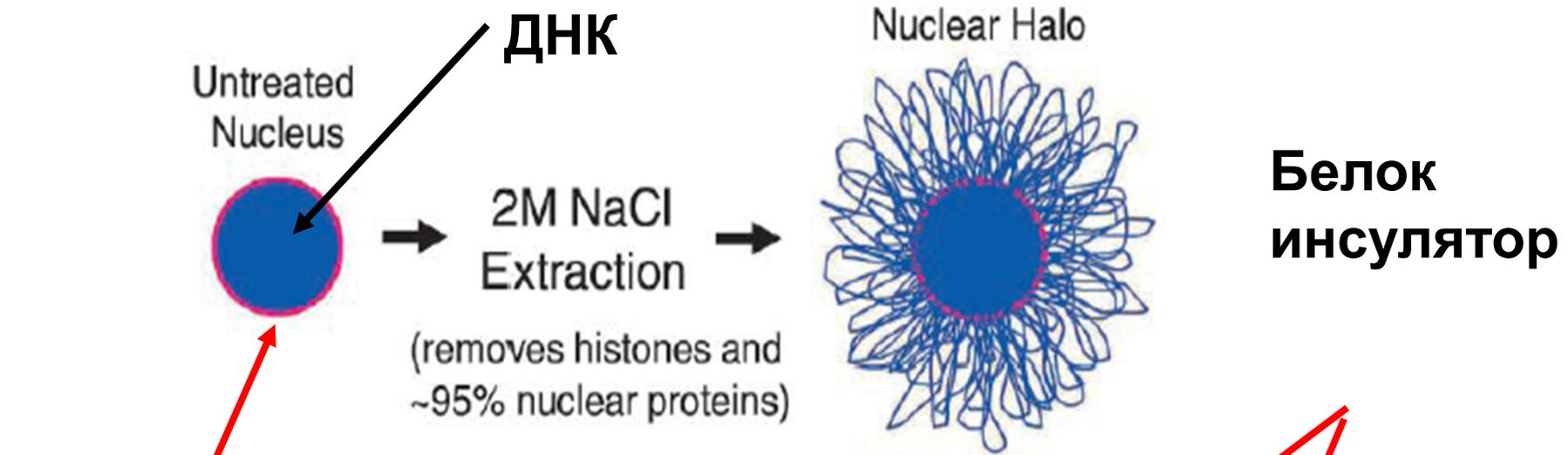
## **Можно исследовать:**

**1) Расположение ядерного скелета или ядерного матрикса (*nuclear matrix*). Это опорная структура ядра клетки.**

**2) Участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу (англ. S/MAR — Matrix/Scaffold Attachment Regions), служат для заякоривания петель хроматина на белках ядерного матрикса.**

**3) Локализацию инсуляторов и регуляторов**  
**Инсуляторы — представляют собой сайты связывания особых, инсуляторных белков для блокирования сигналов взаимодействия между энхансером и промотором, если находятся между ними.**

**4) Расположение гистонов и белков, формирующих сложную разветвленную сеть, сообщающуюся с ядерной ламиной (аннотация хроматина).**



# Встройка инсулятора (gypsy) приводит к тому, что одна петля разбивается на две

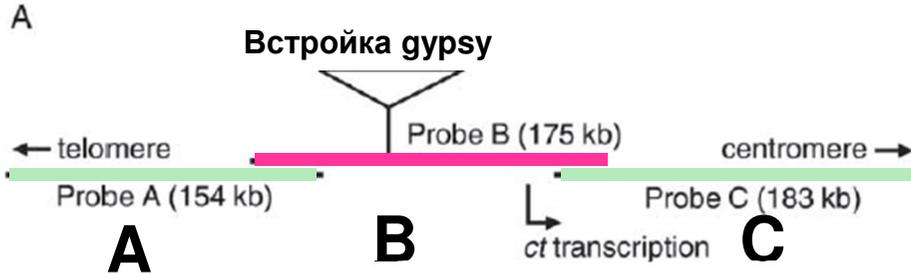
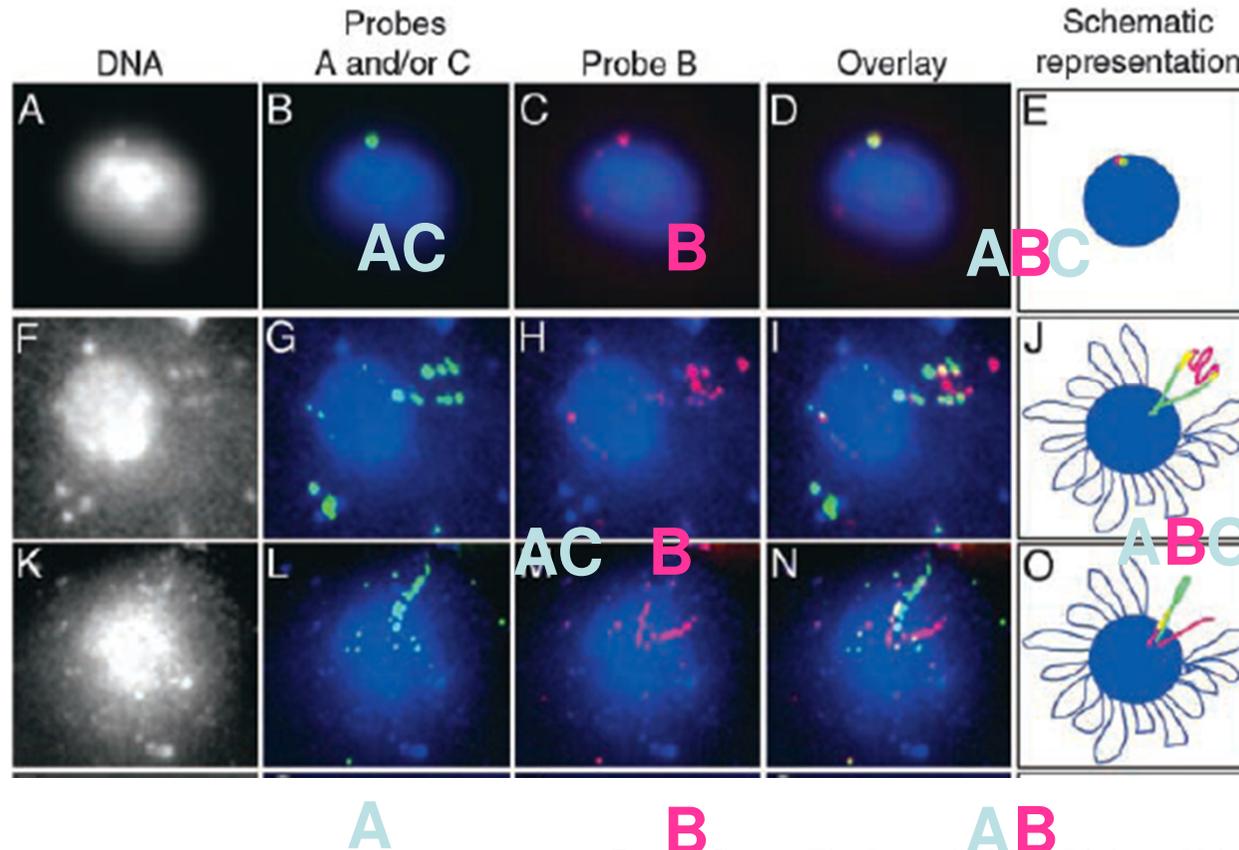


Схема расположения зондов для гибридизации

2M NaCl

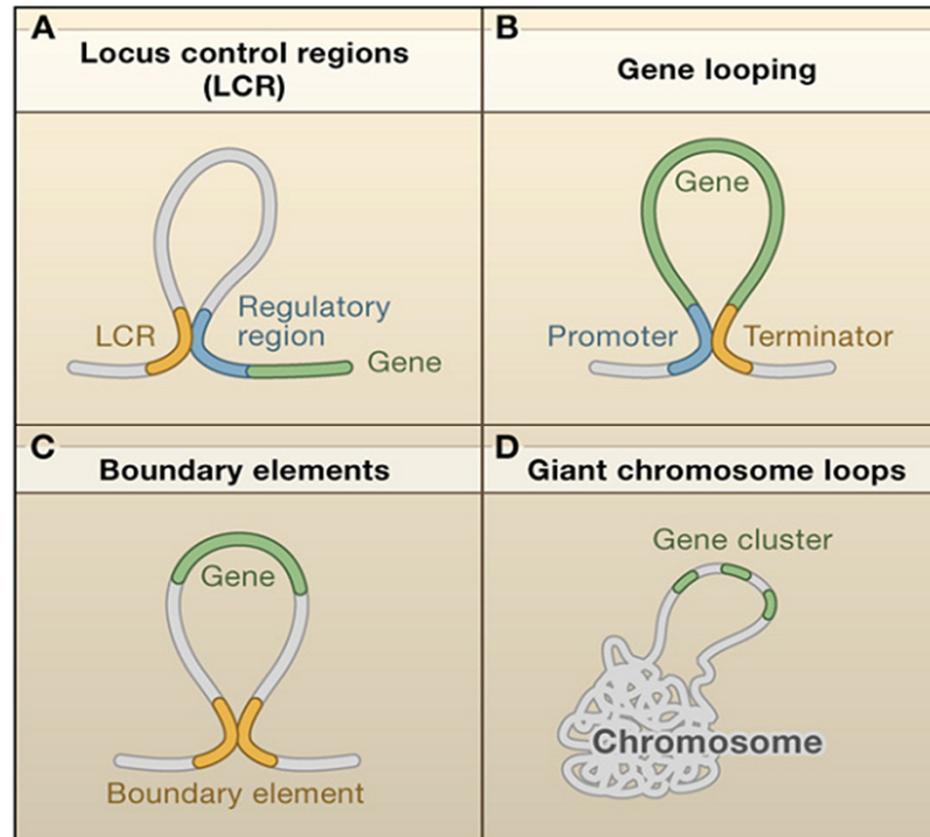
Дикий тип

Встройка gypsy

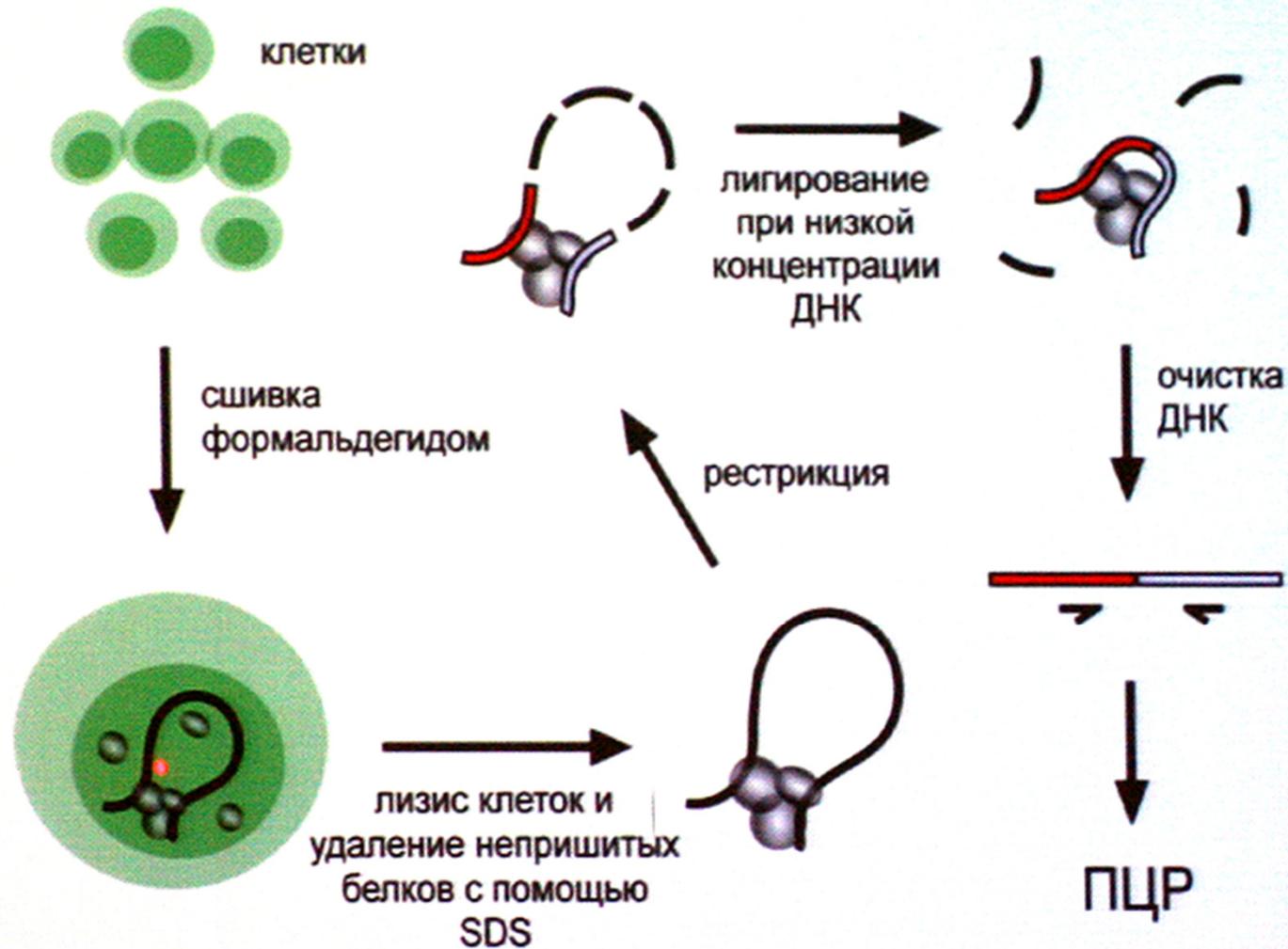


# Как образуются петли?

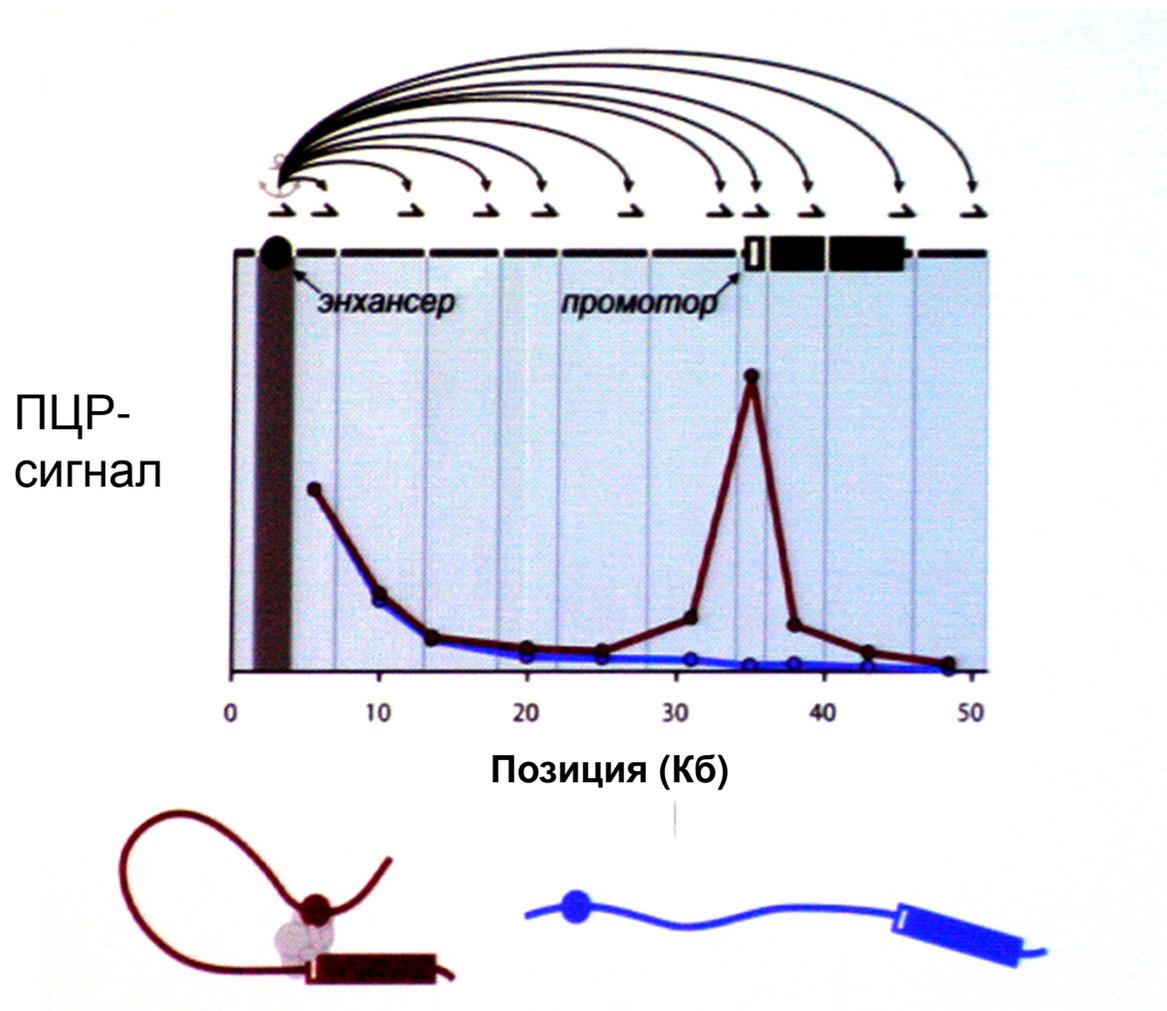
- Взаимодействие белков на различных регуляторных элементах
- Прикрепление к «подложке» (ядерной ламине, ядерному матриксу)
- Выпетливание из плотного хроматинового домена

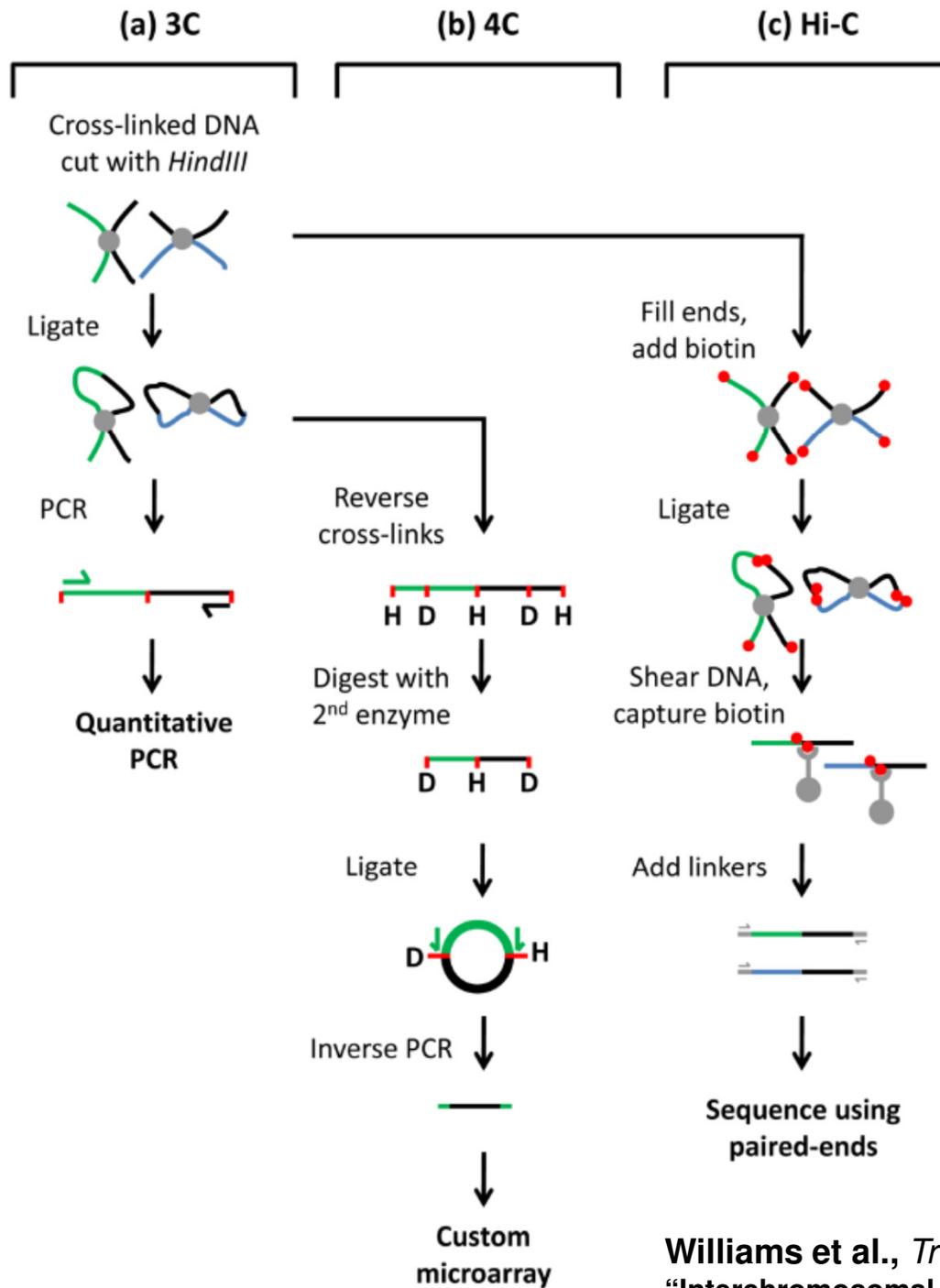


**МЕТОД 3С – chromatin conformation capture позволяет картировать сближенные друг с другом участки ДНК и искать новые регуляторные элементы**



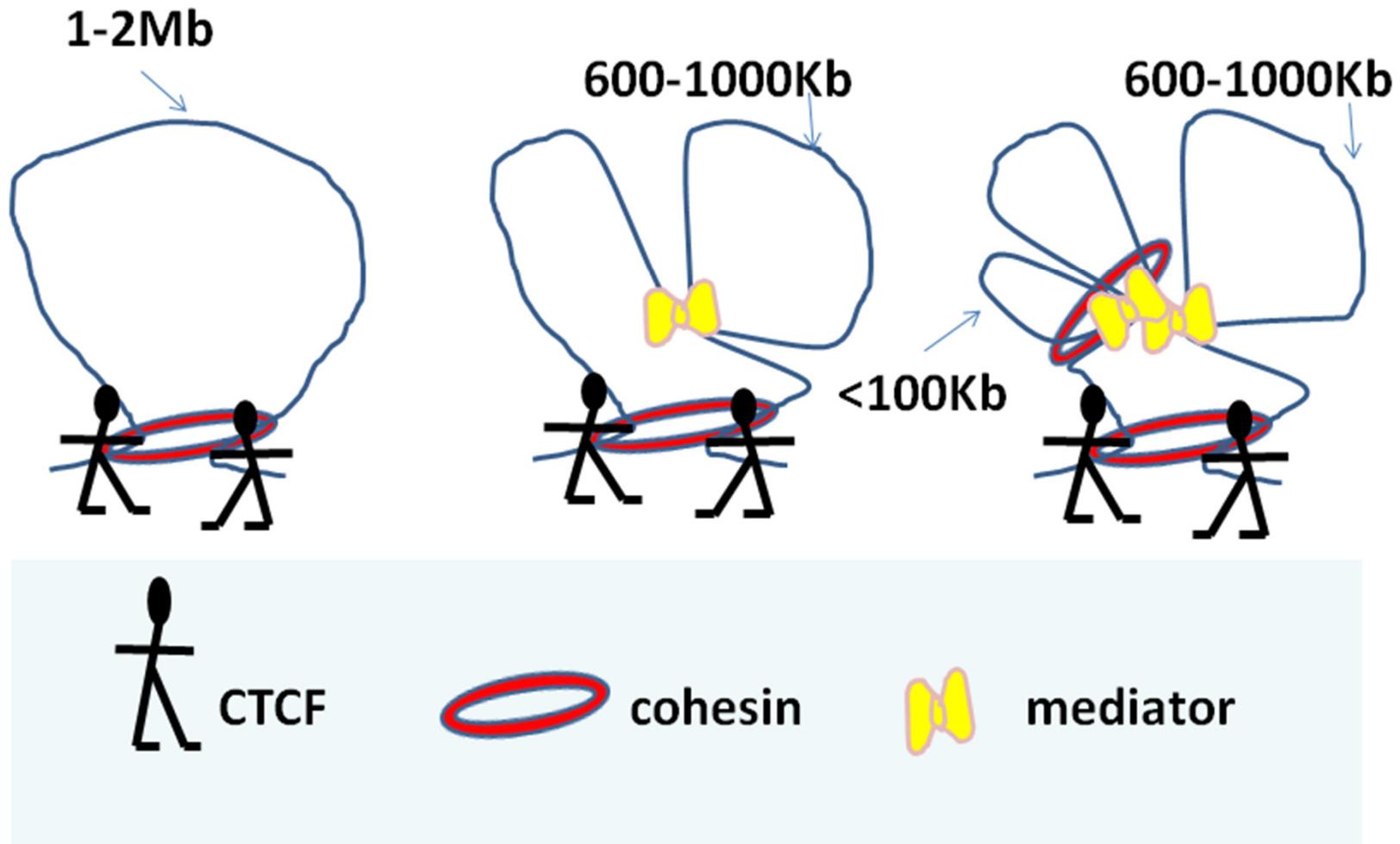
## Представление и интерпретация данных 3С-анализа



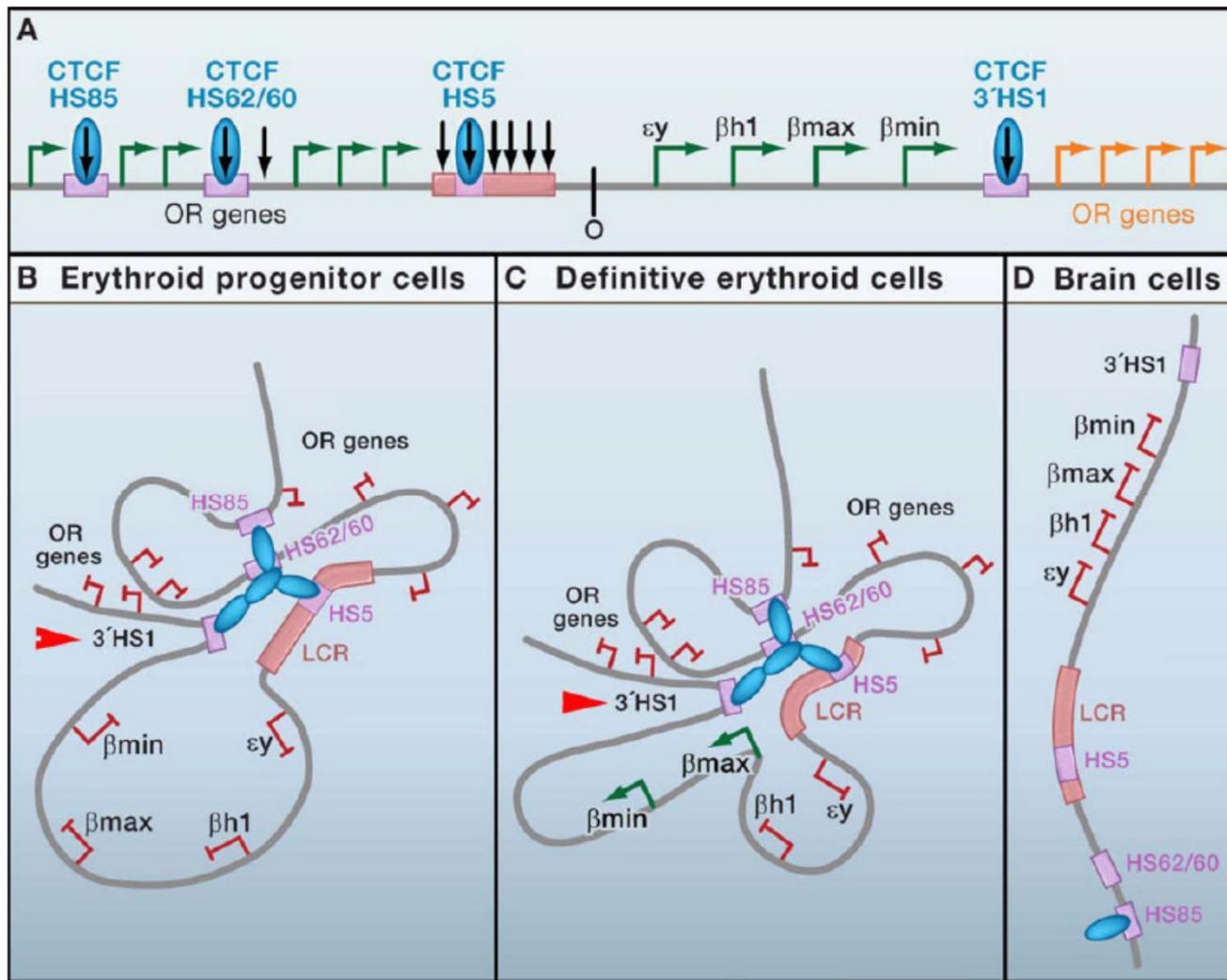


Williams et al., *Trends Genet.* 2010; 26(4): 188–197.  
 “Interchromosomal association and gene regulation in *trans*”

## Топологические домены (TAD) у млекопитающих



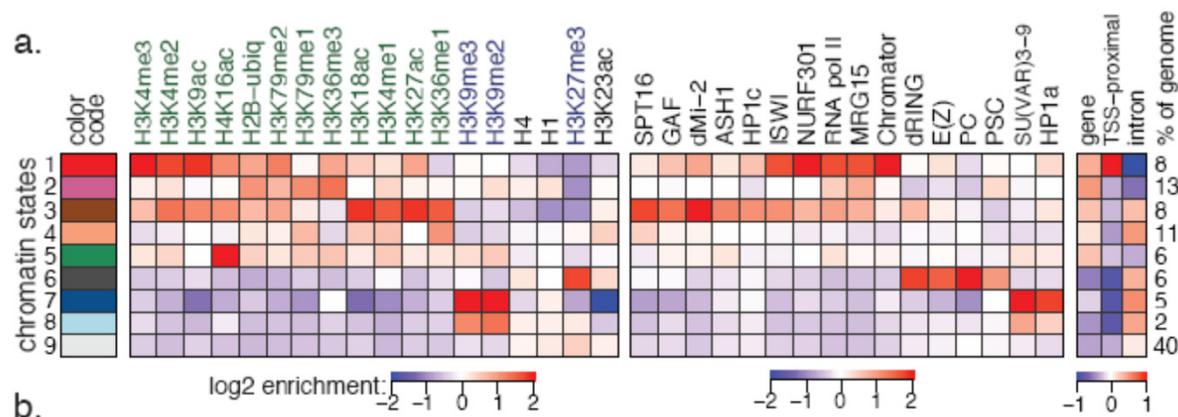
**Специфические для разных клеточных типов внутрихромосомные взаимодействия в бета-глобиновом локусе мыши, обусловленные CTCF.**



## **Можно исследовать:**

- 1) Расположение ядерного скелета или ядерного матрикса (*nuclear matrix*). Это опорная структура ядра клетки.**
- 2) Участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу (англ. S/MAR — Matrix/Scaffold Attachment Regions), служат для заякоривания петель хроматина на белках ядерного матрикса.**
- 3) Локализацию инсуляторов и регуляторов**  
**Инсуляторы — представляют собой сайты связывания особых, инсуляторных белков для блокирования сигналов взаимодействия между энхансером и промотором, если находятся между ними.**
- 4) Расположение гистонов и белков, формирующих сложную разветвленную сеть, сообщающуюся с ядерной ламиной (аннотация хроматина).**

# Аннотация хроматина генома *Drosophila melanogaster* (BG3 клетки)



Данные ENCODE проекта

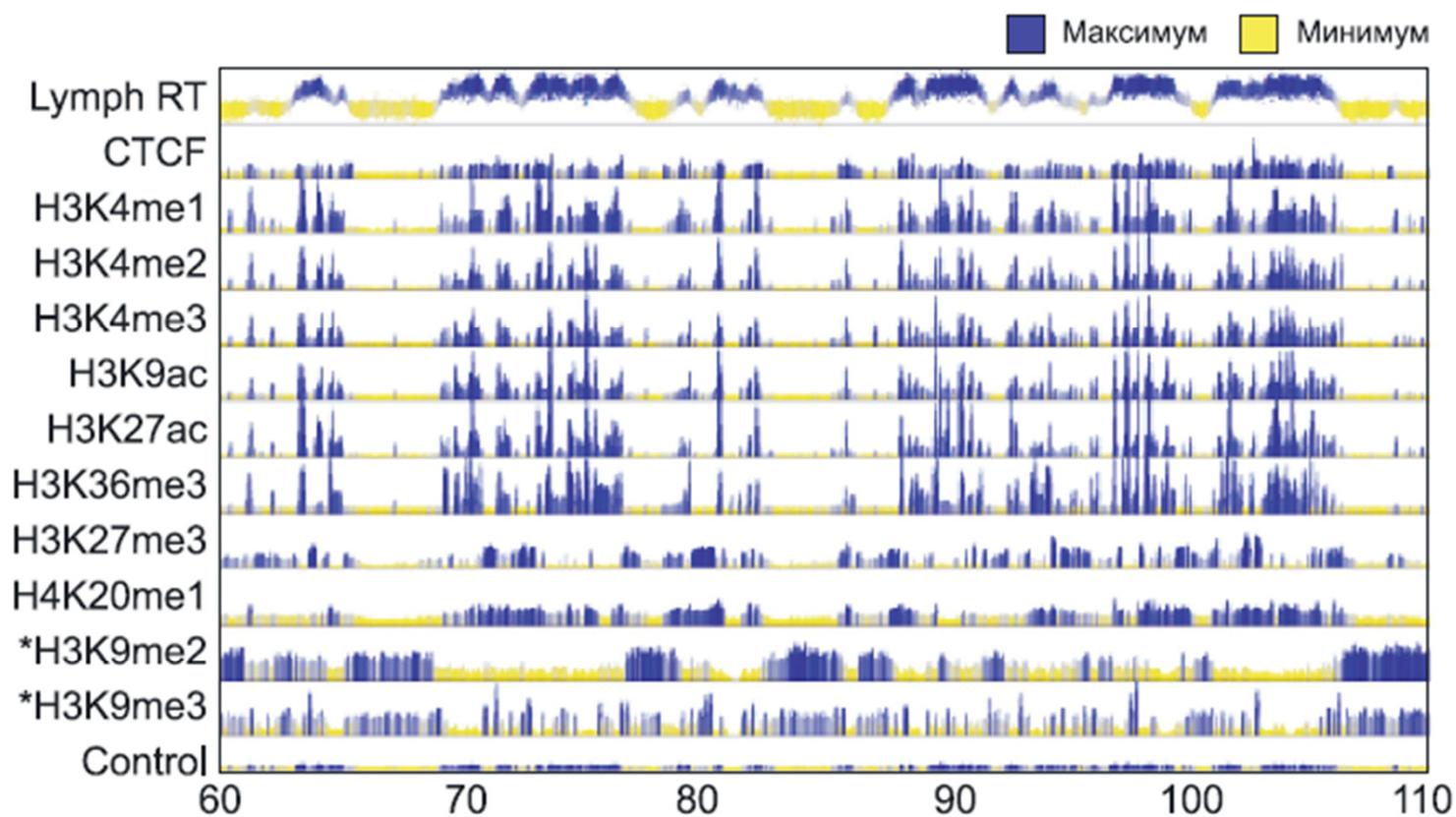
## 9 состояний хроматина (Kharchenko et al., 2011):

### Активный хроматин

- промотор/TSS
- транскрипция
- энхансер
- интрон
- активный ген

### Репрессированный хроматин

- Polycomb репрессия
- центромерный регион
- рассеянный регион
- неактивное расстояние между генов



**Рис. 5.13.** Профиль репликации (верхний ряд) и особенности хроматина в участке хромосомы 10 из лимфобластов человека размером 50 м.п.н. (по [Ryba et al., 2010]).

## **Часть2. Эпигенетические методы исследования на уровне организма**

# Модельные организмы 模式生物

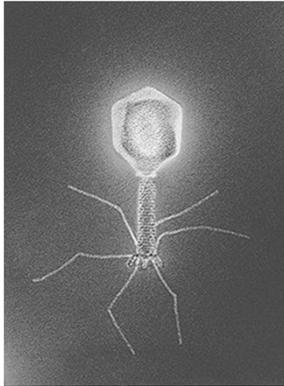
**Модельные организмы** — организмы, используемые в качестве моделей для изучения свойств, процессов или явлений живой природы.

# Модельные организмы

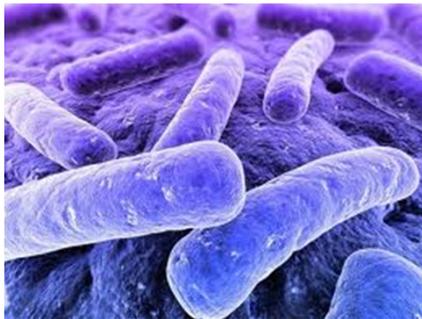
Модельные организмы изучаются, так как есть надежда, что открытые при их изучении закономерности окажутся свойственны и другим организмам, в том числе и **человеку**.

Часто модельные организмы используются в тех случаях, когда проведение соответствующих исследований на человеке невозможно по техническим или этическим причинам.

# Прокариоты (原核生物)



Вирусы  
病毒



Бактерии  
菌

# Эукариоты 真核生物



Растения  
植被



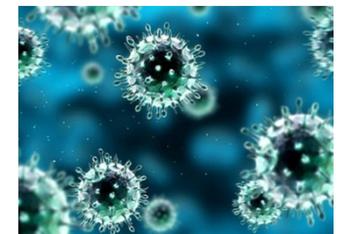
Грибы  
蘑菇



Животные 动物



Вирусы  
病毒



1) В качестве модельных выбирают обычно организмы, которых легко содержать и разводить в лабораторных условиях.

2) У которых быстрая смена поколений и есть возможность генетических манипуляций (наличие инбредных линий).

3) Положение на филогенетическом древе: например, макак-резус является важным модельным организмом для медицинских исследований из-за своего относительно близкого родства с человеком.

4) Наличие полностью секвенированного и расшифрованного генома. Особенности генома: рыба-фугу *Fugu rubripes* была выбрана в качестве модели для изучения генома благодаря его малым размерам.

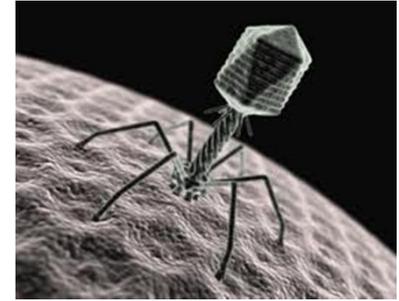
5) Экономическая значимость.

Прокариоты:

Вирусы:

Бактериофаг лямбда ( $\lambda$ ) – молекулярная генетика

Фаг  $\phi$ 174 – молекулярная генетика



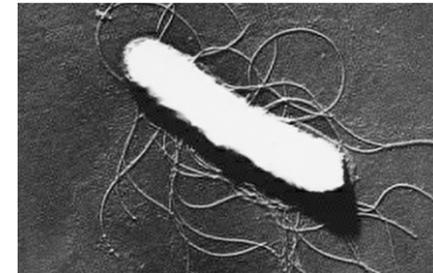
Бактерии:

*Bacillus subtilis* – изучение спор, жгутиков

*Escherichia coli* (*E. coli*)

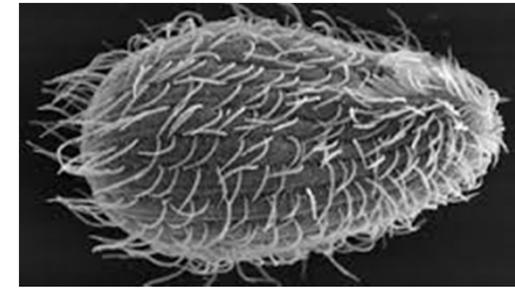
*Mycoplasma genitalium* – минимальный геном

*Salmonella typhimurium* – патогенное действие



Эукариоты:

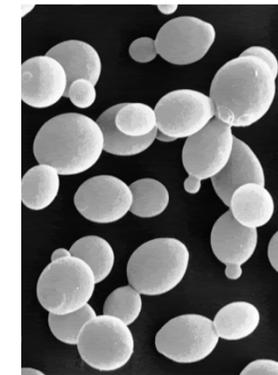
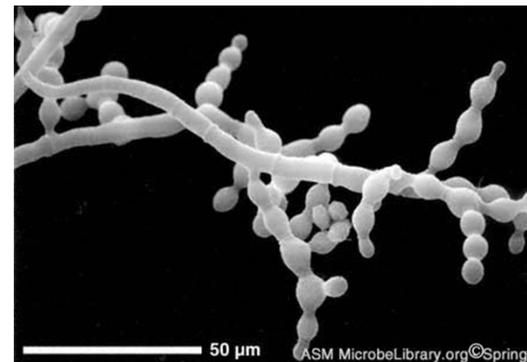
Одноклеточные:



*Chlamydomonas reinhardtii* – фотосинтез

*Tetrahymena thermophila* – молекулярная генетика

Грибы:



*Neurospora crassa* – метаболизм

*Saccharomyces cerevisiae* – клеточный цикл

Растения:

*Arabidopsis thaliana* – генетика, биохимия

*Zea mays* (кукуруза) – цитогенетика

*Oryza sativa* (рис) - экономика



**Животные:**

Беспозвоночные:

*Caenorhabditis elegans* – генетика и развитие

*Drosophila melanogaster* – генетика и развитие



# Позвоночные:

*Takifugu rubripes* – геном

*Danio rerio* – развитие

*Xenopus laevis* – развитие

*Gallus gallus* – эмбриология



## Позвоночные:

*Mus musculus* – медицина, трансгенез

*Rattus norvegicus* – физиология

*Felis domesticus* – изучение нервной системы

*Macaca mulatta* – инфекционные болезни



