

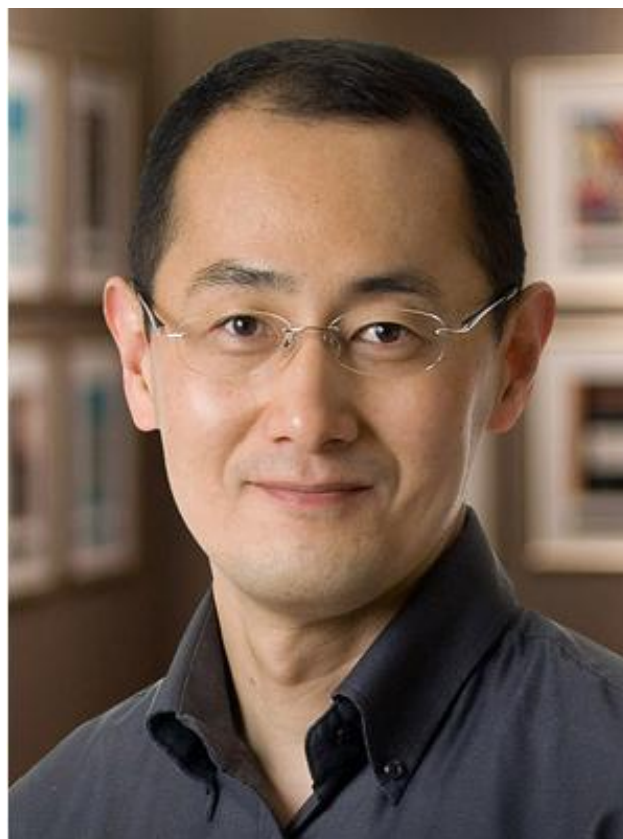
НАСЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ К РЕПРОГРАММИРОВАНИЮ В ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Новосибирский государственный университет
Институт цитологии и генетики СО РАН
лаборатория генетики развития

Юнусова А.
Научный руководитель
к.б.н., Баттулин Н. Р.

Репрограммирование генома соматических клеток

Нобелевская премия по физиологии или медицине 2012 г.

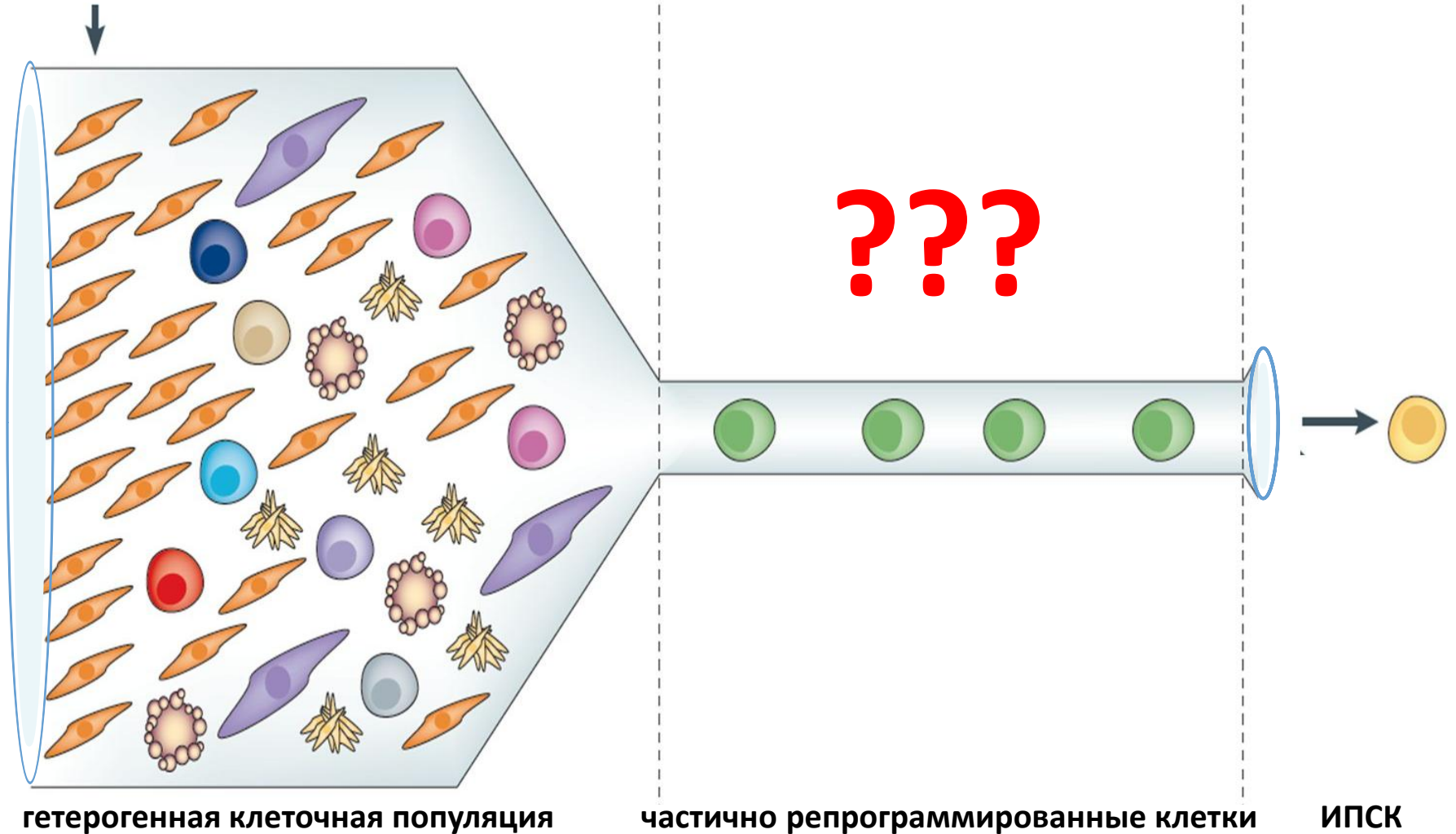


Синья Яманака

Механизмы репрограммирования



Трансдукция вирусами
с репрограммирующими факторами





Фундаментальный вопрос

- **Возможна ли передача способности к репрограммированию от материнских клеток дочерним?**

Цель работы

- **Создание эффективной системы маркирования клеток с помощью ДНК-баркода**
- **Оценка возможности наследования способности к репрограммированию от материнских клеток дочерним**



Задачи

- Создание набора лентивирусных векторов для получения ИПСК с возможностью временного контроля экспрессии репрограммирующих факторов.
- Создание ДНК-баркодированных лентивирусных векторов путем введения искусственно синтезированной последовательности случайных нуклеотидов (ДНК-баркода) в вектор.
- Получение колоний ИПСК из маркированных ДНК-баркодом фибробластов мыши.



Метод ДНК-баркодирования

- **ДНК-баркод** – искусственно синтезированная последовательность нуклеотидов, содержащая N вырожденных позиций

- **N = 4** → 256 комбинаций
- **N = 30** → 10^{18} комбинаций

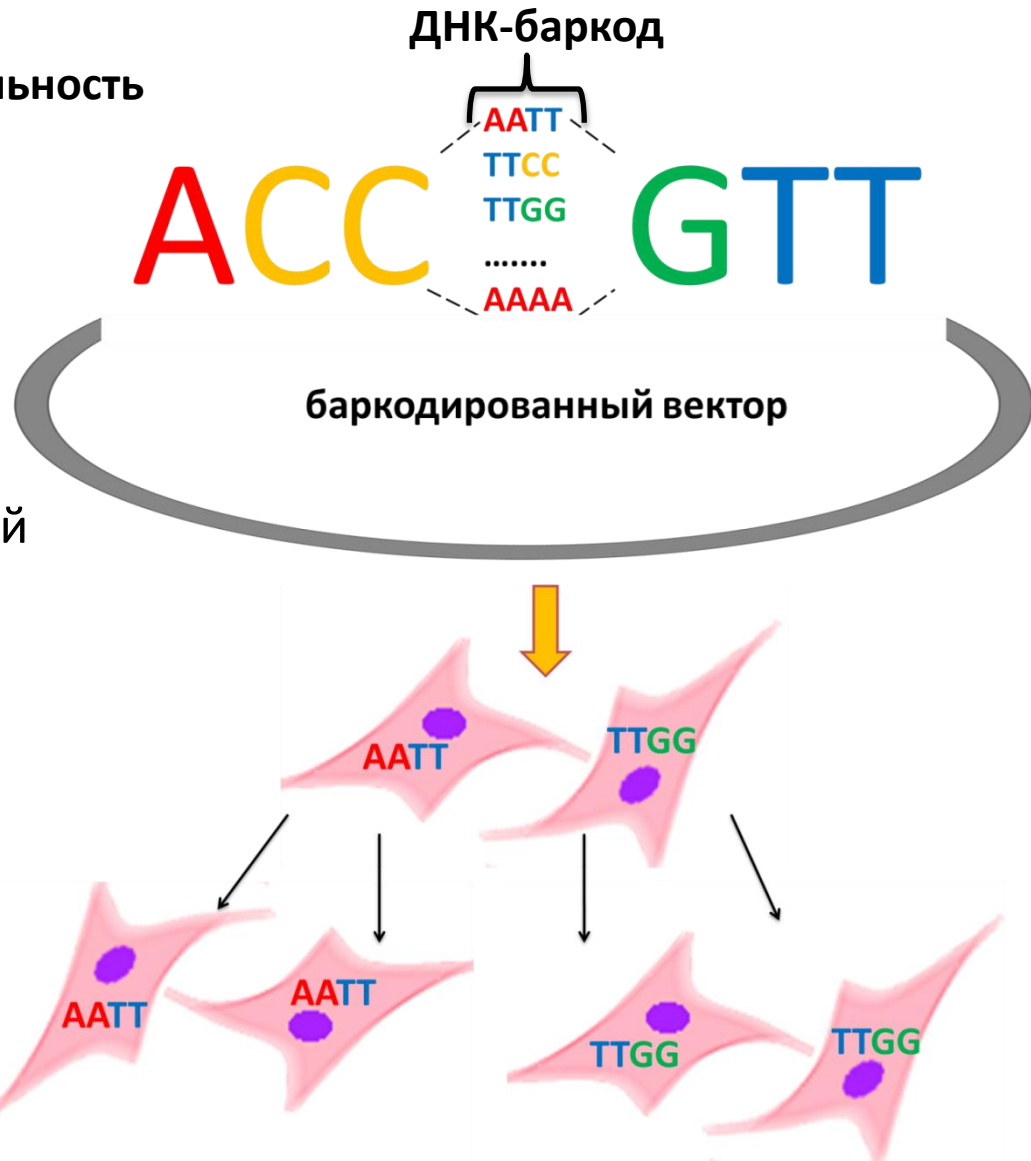
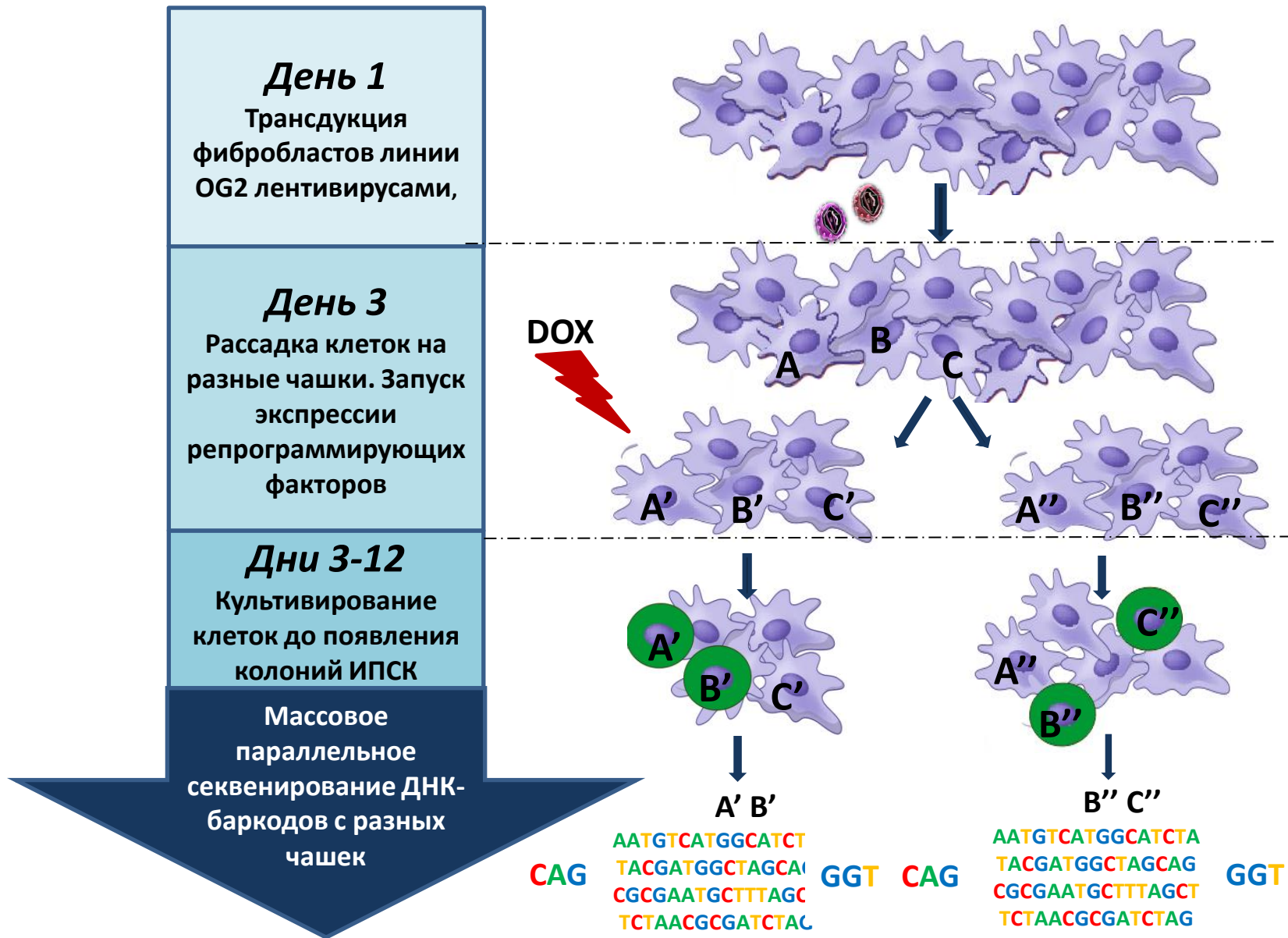


Схема эксперимента

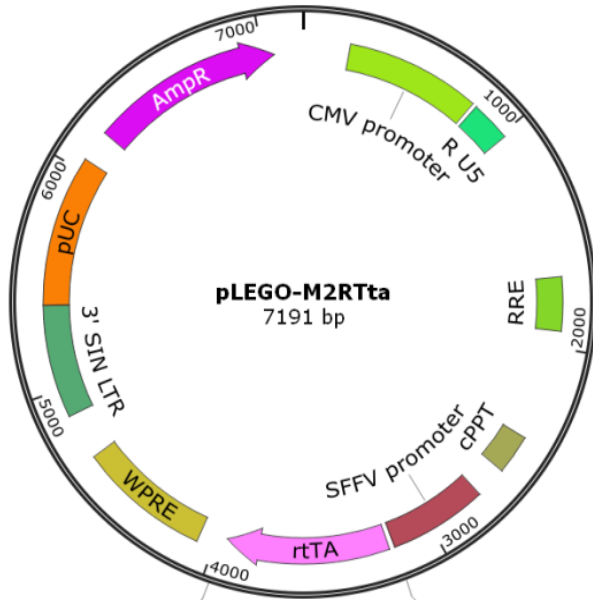


Конструирование лентивирусных векторов для получения ИПС клеток

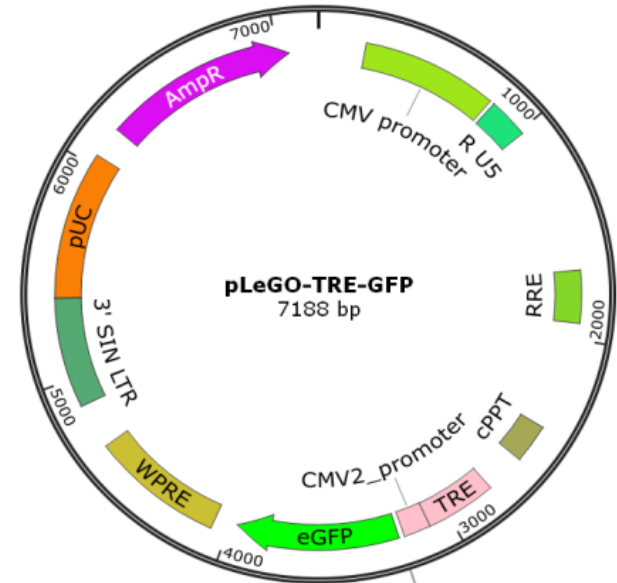
Система векторов
второго поколения



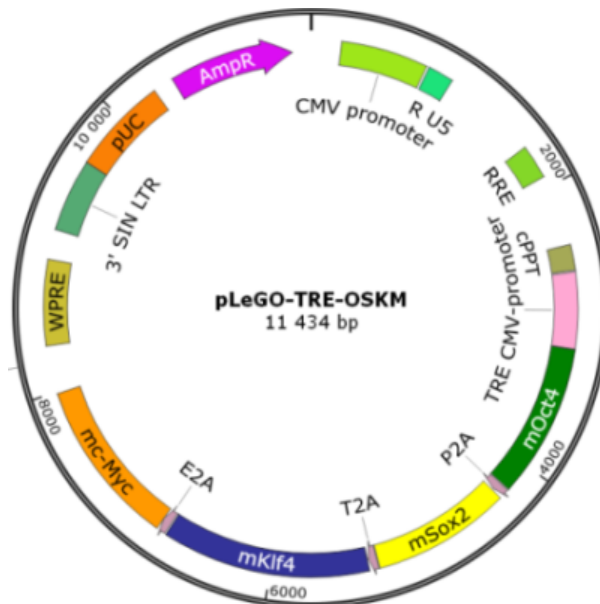
Система векторов
третьего поколения



лентивирусный вектор,
несущий ген трансаактиватора

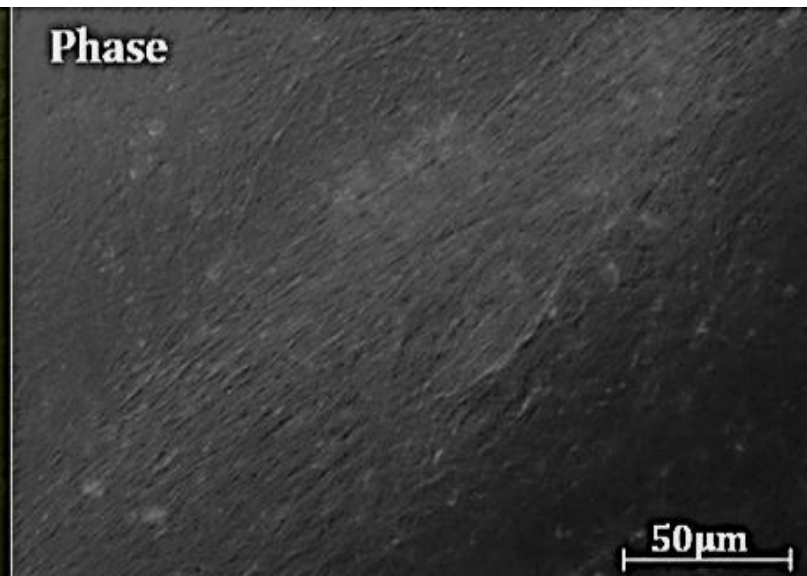
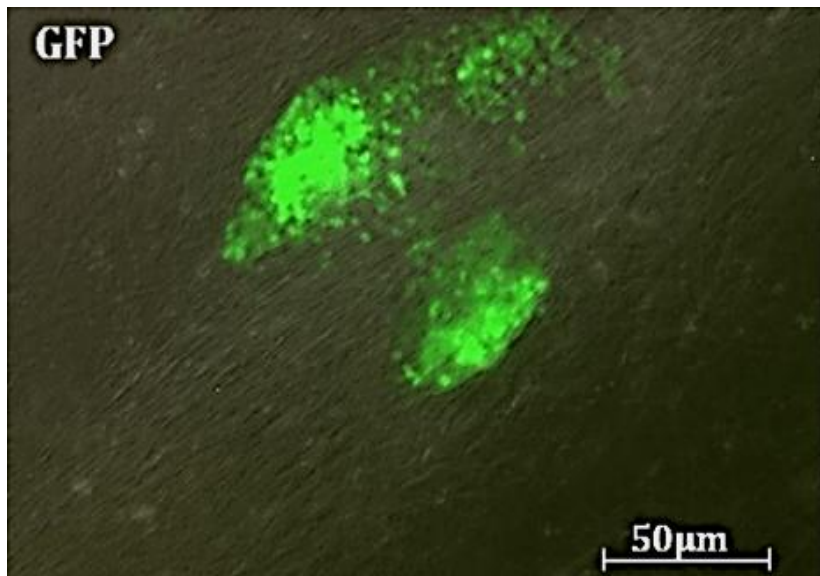
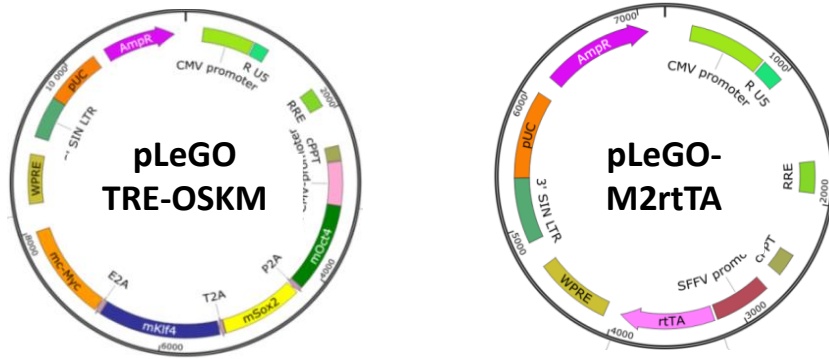


лентивирусный вектор, несущий
ген GFP



лентивирусный вектор с генами
репрограммирующих факторов

Анализ функциональности лентивирусных конструкций



Колония ИПСК, полученная из фибробластов мыши

Получение баркодированных лентивирусов

EcoRI

M13 forward primer

NNNNNNNNNNNNNNNN

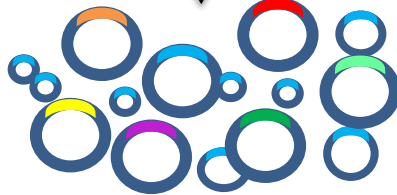
M13 reverse primer

PciI

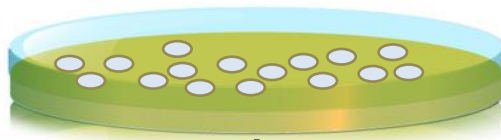


План А - Получение баркодированных лентивирусов на основе библиотеки баркодированных плазмид, наработанных в бактериях

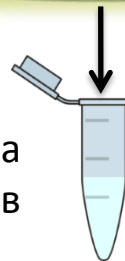
продукты лигазной реакции



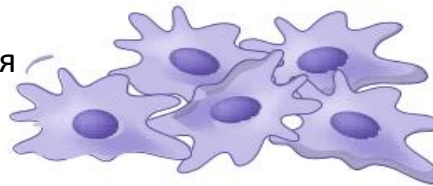
трансформация **A**



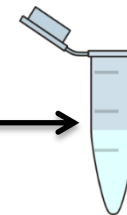
плазмидная библиотека баркодированных векторов



трансфекция



клетки линии Phoenix



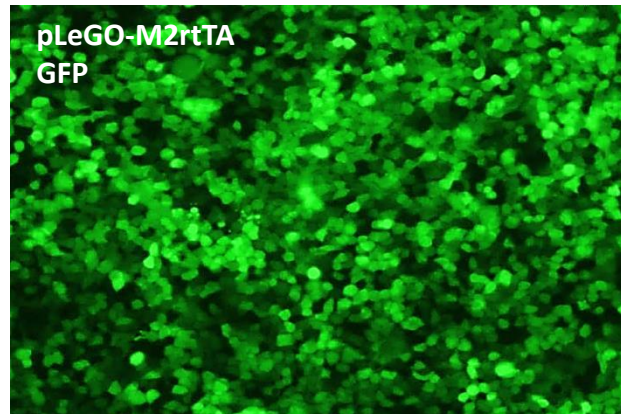
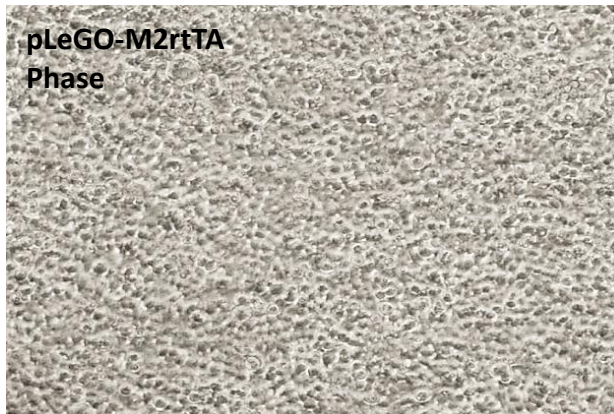
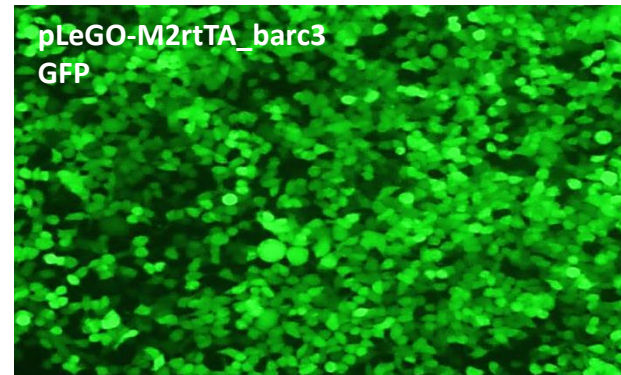
смесь баркодированных вирусов

Получение баркодированных лентивирусов

План А

- Получена плазмидная библиотека баркодированных векторов, насчитывающая 8^{10^4} вариантов индивидуальных ДНК-баркодов

Разная представленность ДНК-баркодов



Культуры клеток линии Phoenix, трансдуцированные лентивирусами LeGO-M2rtTA_barcode и LeGO-M2rtTA (контроль)



Получение баркодированных лентивирусов

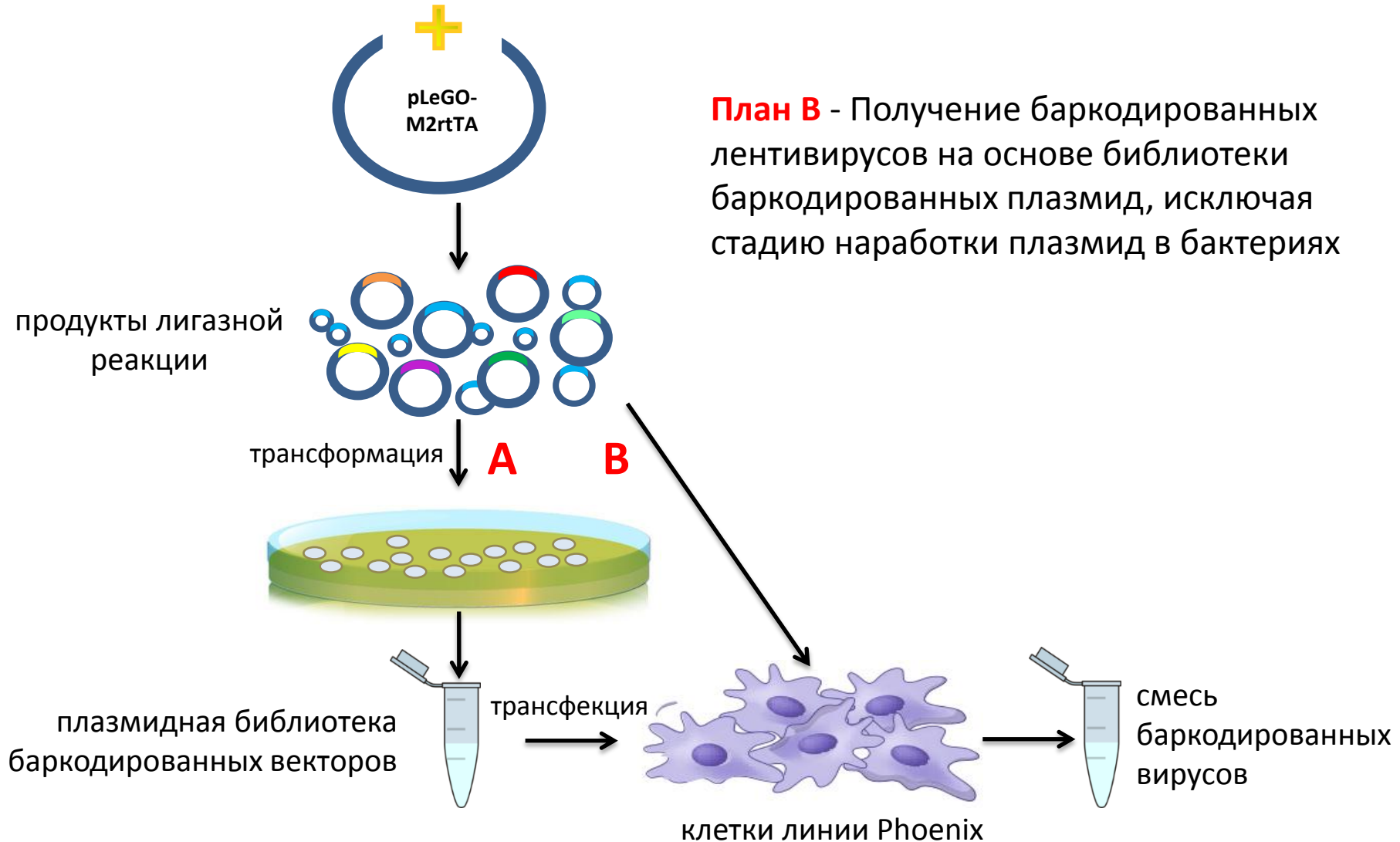
EcoRI

M13 forward primer

NNNNNNNNNNNNNNNN

M13 reverse primer

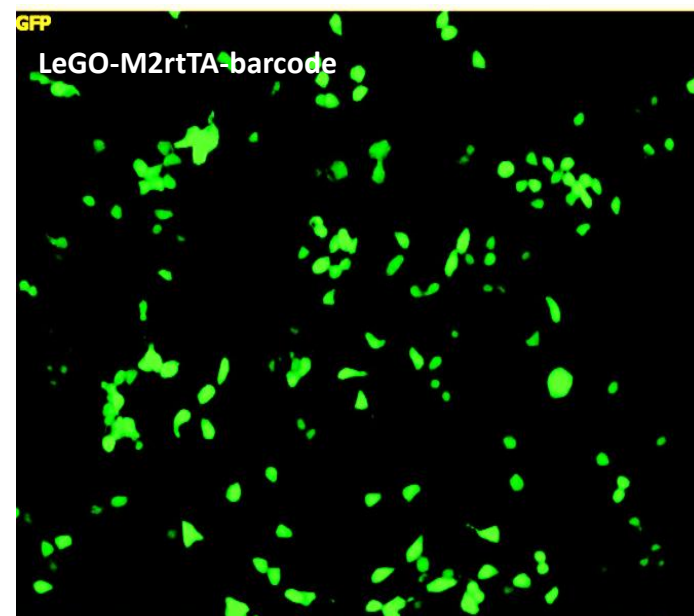
PciI



Получение баркодированных лентивирусов

План В

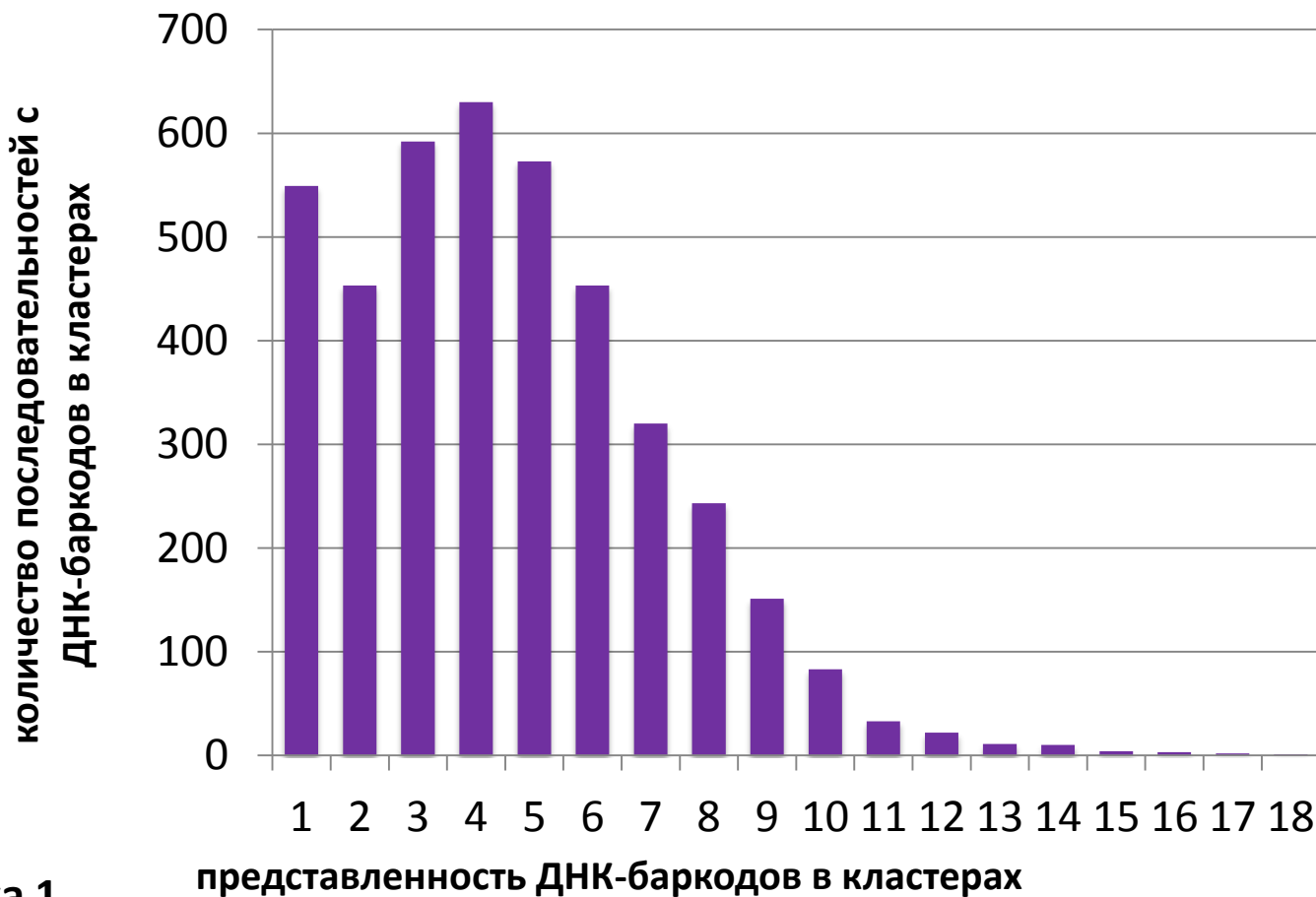
- Представленность ДНК-баркодов одинаковая
- Разнообразие ДНК-баркодов достаточно для проведения эксперимента.
- Реальное разнообразие ДНК-баркодов можно оценить только с помощью массового параллельного секвенирования



Культура клеток линии Phoenix, трансдуцированная лентивирусными конструкциями LeGO-TRE-GFP и LeGO-M2rtTA-barcode

Оценка разнообразия ДНК-баркодов с помощью массового параллельного секвенирования на платформе Ion Torrent

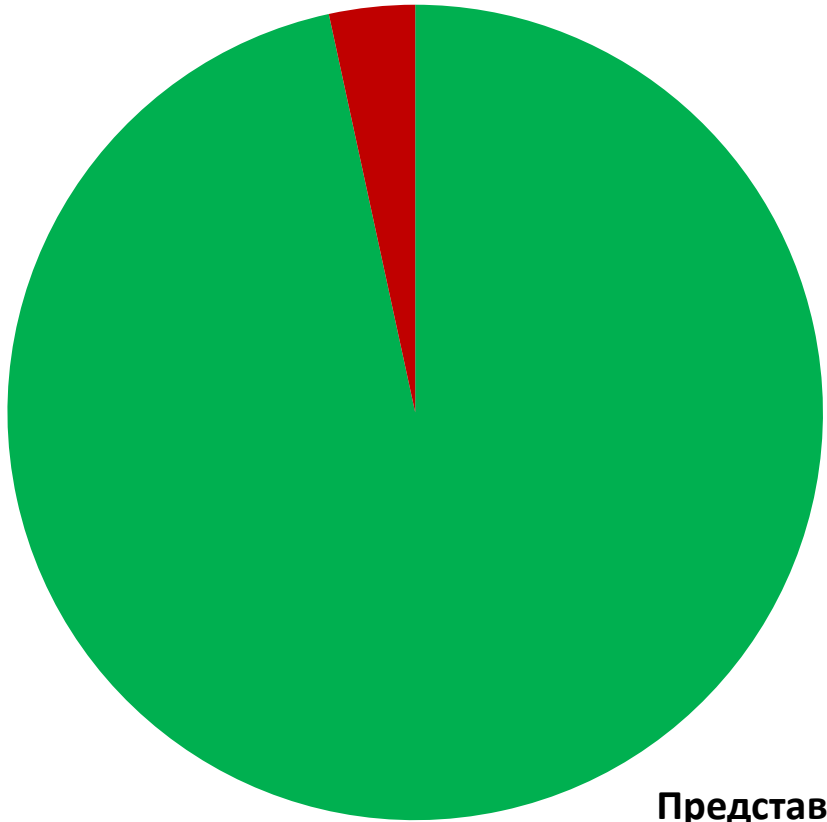
- **18800** последовательностей с ДНК-баркодом → **4133** кластера
- Реальное разнообразие ДНК-баркодов в образце составляет как минимум **$4,4 \cdot 10^4$**





Подбор параметров биоинформационной обработки результатов секвенирования

- Массовое параллельное секвенирование библиотеки, представленной одним вариантом ДНК-баркода



■ 19947 последовательностей - один кластер (96,6%)

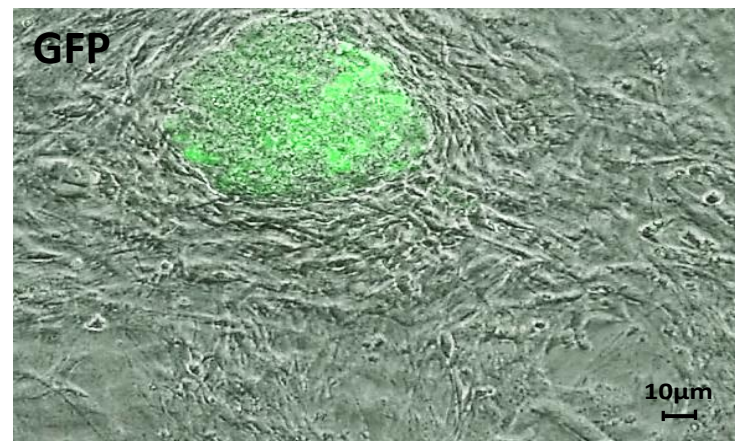
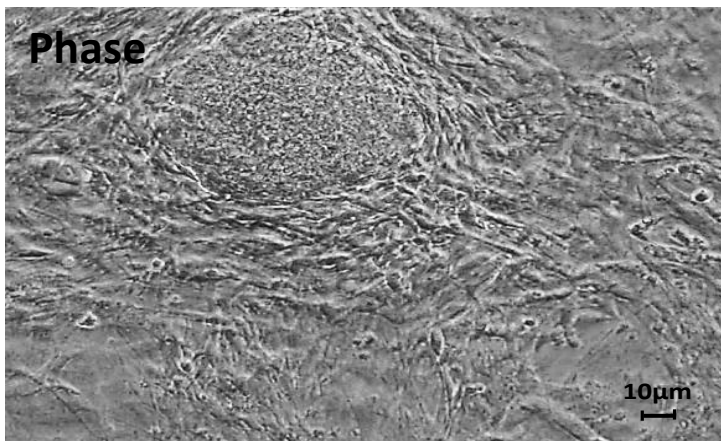
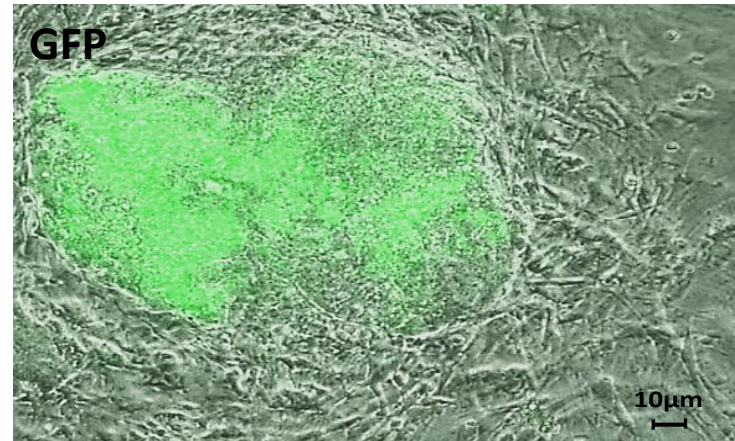
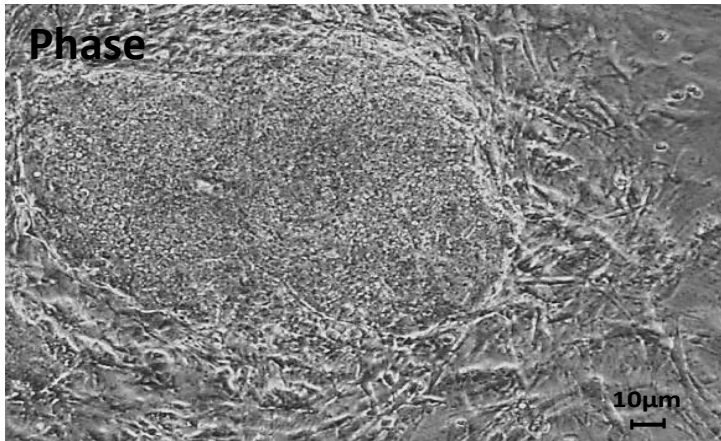
■ 699 последовательностей - 591 кластер

Представленность ДНК-баркодов в библиотеке

Индукция плюрипотентности в маркированных эмбриональных фибробластах мыши



- LeGO-TRE-OSKM
- LeGO-M2rtTA
- LeGO-M2rtTA-barcode



Колонии ИПСК, полученные из фибробластов мыши, трансдуцированных лентивирусными векторами LeGO-TRE-OSKM, LeGO -M2rtTA и LeGO-M2rtTA-barcode



Выводы

- На основе лентивирусного вектора pLeGO-G2 созданы векторы pLeGO-M2rtTA, кодирующий трансактиватор, и pLeGO-TRE-OSKM, содержащий гены транскрипционных факторов, необходимых для репрограммирования генома соматических клеток
- Репрограммирующая способность векторов pLeGO-M2rtTA и pLeGO-TRE-OSKM доказана в экспериментах по индукции плюрипотентности в эмбриональных фибробластах мыши
- Разработан метод маркирования клеток с помощью лентивирусов, несущих ДНК-баркод, исключая стадию наработки лентивирусных векторов в бактериях



Выводы

- Разнообразие ДНК-баркодов в препарате лентивирусов pLeGO-M2rtTA-barcode, полученного с помощью разработанного нами метода, охарактеризовано путем массового параллельного секвенирования и составляет более $4,4 \cdot 10^4$ разных ДНК-баркодов, что достаточно для маркирования экспериментальной популяции фибробластов.
- В результате использования созданных векторов pLeGO-M2rtTA и pLeGO-TRE-OSKM, в сочетании с баркодированными лентивирусами получено 300 колоний ИПСК, пригодных для дальнейшего исследования передачи способности фибробластов к репрограммированию.



**Ваши
вопросы!!!**

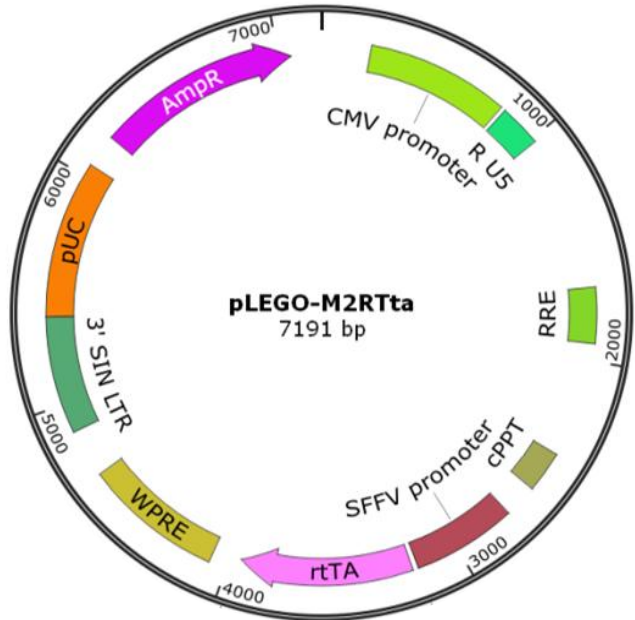
СЛАЙДЫ ПОСЛЕ



Cell Selector («однорукий бандит»)

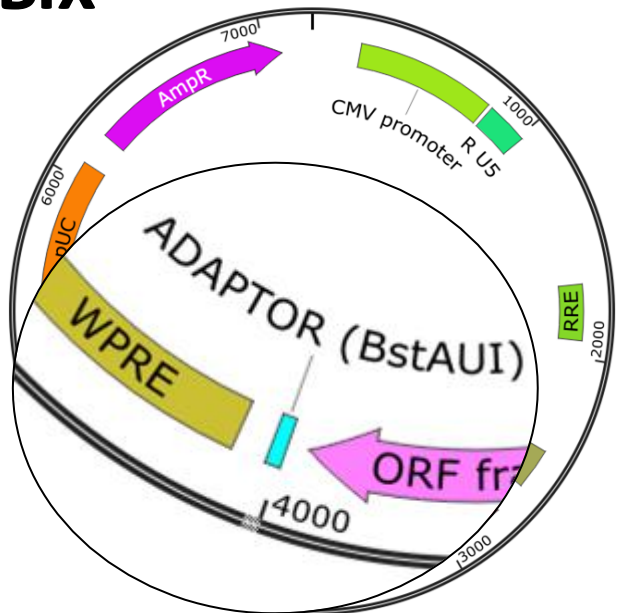


Получение ДНК-баркодированных лентивирусных векторов



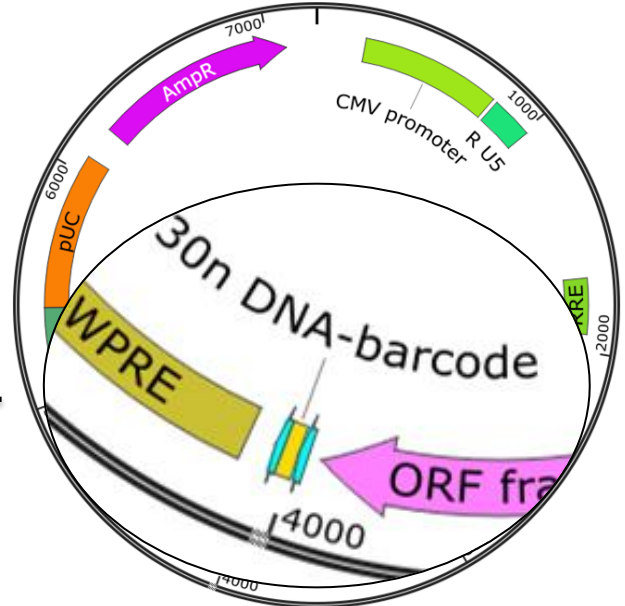
Адаптер
BstAUI

EcoRI PciI

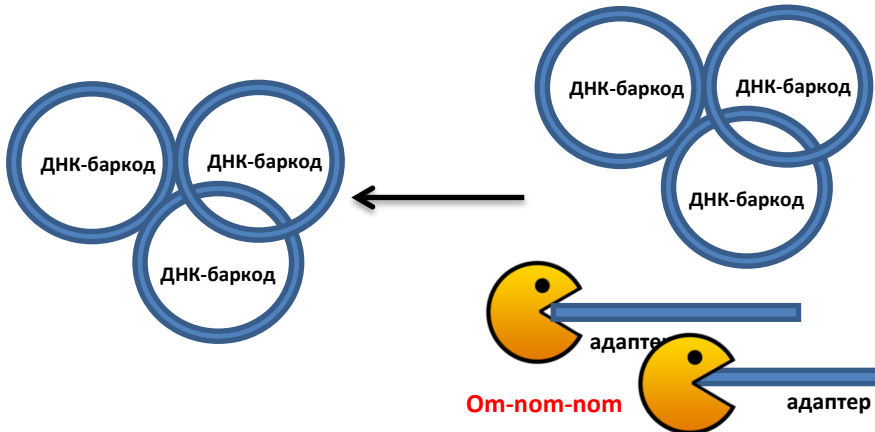


M13 ДНК-баркод M13

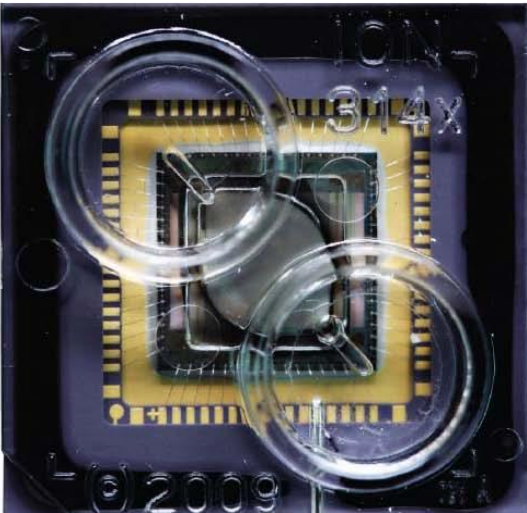
EcoRI PciI



BstAUI
нуклеаза



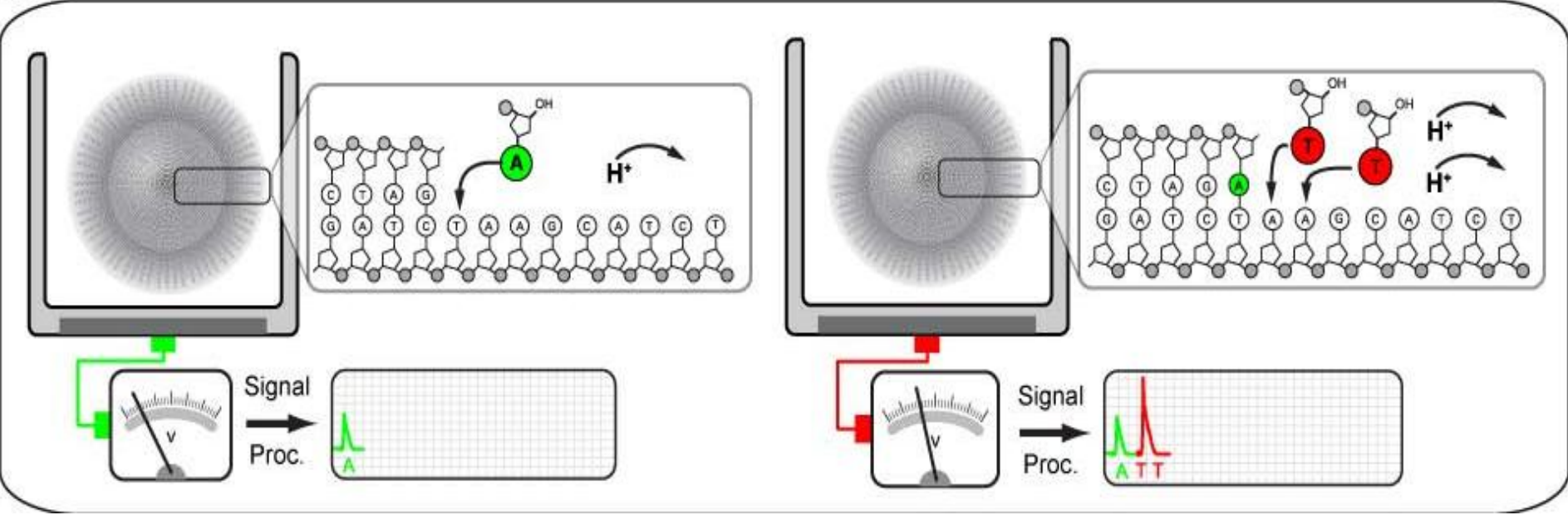
Секвенирование на платформе Ion Torrent



• Тип микрочипа	314	316	318
• Ячейки (в мил.)	1.2	6.2	11.1
• Основания (в Mb)	>10	>100	>1000

Присоединение комплиментарного нуклеотида - высвобождение H⁺ и локальное изменение pH (0.02 единицы на одно основание)

и.



Праймеры для амплификации и секвенирования библиотек

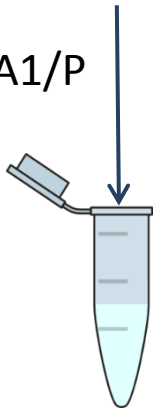
Праймер А, комплементарный секвенирующему праймеру, содержит **персональный идентификатор ID** – уникальную последовательность из 7 нуклеотидов.

Праймер Р – последовательность, необходимую для гибридизации на микросферах.

- `CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TAAGGAG AACGATGTGCAGGAAACAGCTATGACC – A1`
- `CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CTAAGGT AACGATGTGCAGGAAACAGCTATGACC – A2`
- `CCTCTSTATGGGCAGTCGGTGAT ATGCTCCCCGGGTAACTAAG – P`

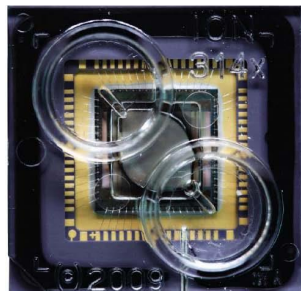
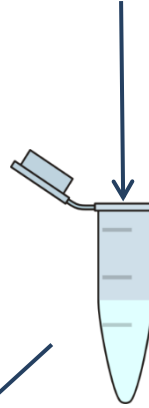
Библиотека 1

A1/P



Библиотека 2

A2/P1



Программа обработки первичных данных Ion Torrent осуществляет распределение прочитанных последовательностей а разные библиотеки по ID

массовое параллельное секвенирование

Оценка реального разнообразия ДНК-баркодов в препарате лентивирусов

N Количество ДНК-баркодов на момент заражения вирусами



37N Количество ДНК-баркодов на момент анализа разнообразия



1/400 Объем образца геномной ДНК, взятый в анализ

ДНК-баркод в образце – количество изюминок в булочке

$$P_k(\lambda) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda} \quad \text{– Закон Пуассона}$$

$$P_n(\lambda) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda} = \frac{\left(\frac{V_0}{N}\right)^n}{n!} e^{-N \frac{V_0}{N}}$$

P(0) – 0,91165

P(1) – 0,08433

P(37) – 3,7x10⁻⁸²



Разнообразие ДНК-баркодов оценено лишь на 8,835%