

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

ТРАНСГЕНЕЗ. ЖИВОТНЫЕ.

Лекция 7



Словарь



Зигота – тотипотентная диплоидная клетка, образующаяся в результате оплодотворения (слияния яйцеклетки и сперматозоида)

Бластоциста – зародышевый пузырек, ранняя (преимплантационная) стадия развития зародыша млекопитающих (в том числе человека)

Что означает термин «трансгенные животные»?



1

- Животные, полученные путем микроинъекции чужеродной ДНК в зиготу, т.е. несущие чужеродный ген в составе своего генома

2

- Животные, созданные при помощи эмбриональных стволовых клеток

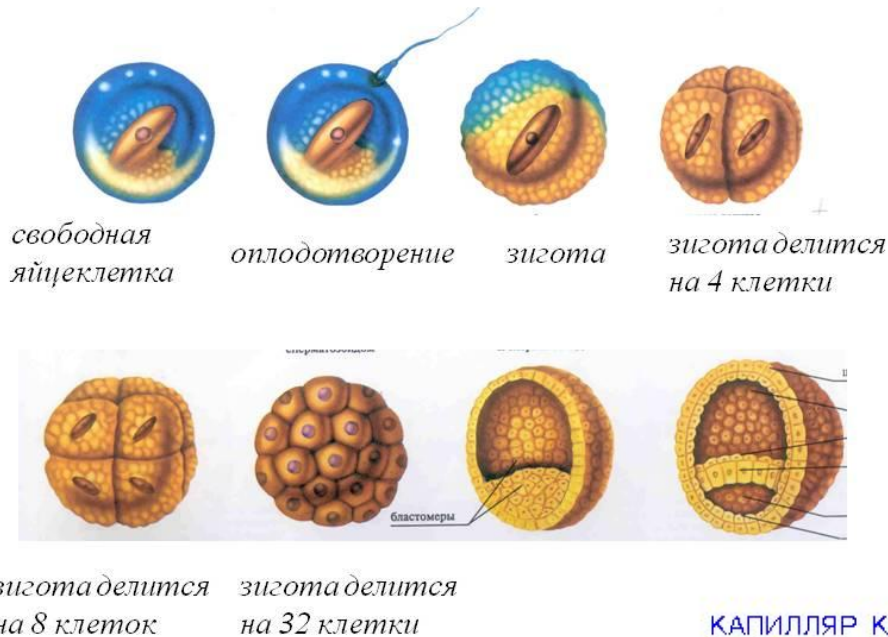
3

- Животные с выключенными генами (нокауты)

4

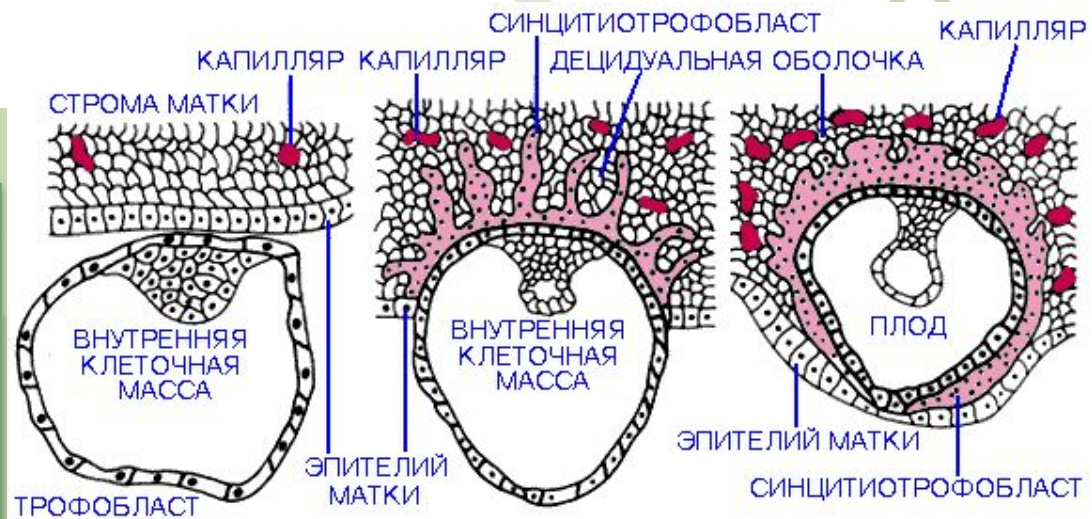
- Животные, подвергнутые соматической трансфекции (трансген введен был непосредственно в определенный орган или ткань взрослого организма)

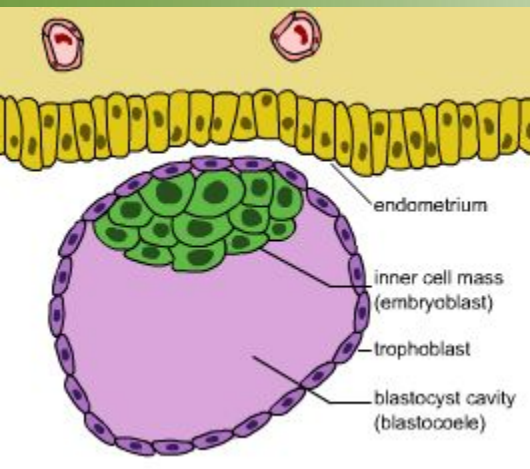
Оплодотворение яйцеклетки и образование зародыша



Синцитиотрофобласт – выполняет функцию всасывания питательных веществ из крови матери, вырабатывает ферменты, способствующие внедрению ворсин хориона в ткани матки

Трофобласт – наружный клеточный слой бластоцисты млекопитающих, принимает участие в имплантации и формировании плаценты





1. Оплодотворенная яйцеклетка (зигота)

2. Зигота делится надвое

3-4. Митотическое деление продолжается

5. Через 5-6 дней образуется бластоциста

6. Внутреннюю часть бластоцисты (ВКМ) помещают на питательную среду для получения стволовых клеток

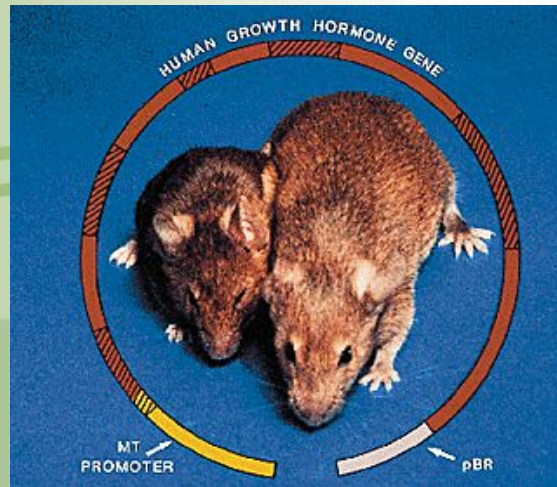
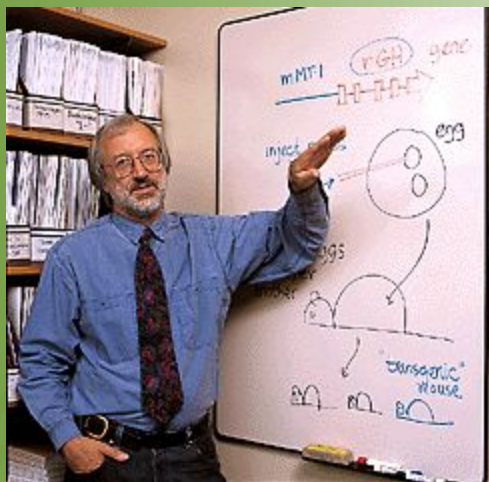


Этапы получения трансгенных ЖИВОТНЫХ

(до принятия решения об интродукции)

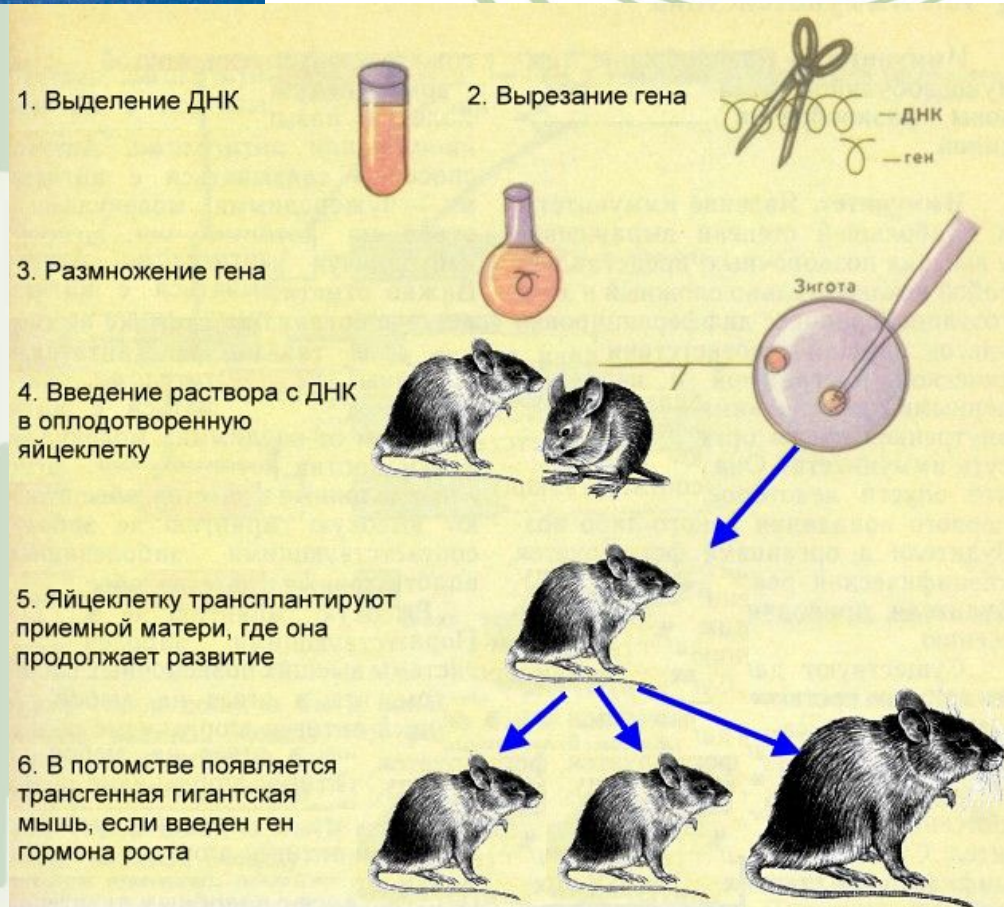


1. Создание и амплификация гДНК (кассета экспрессии+вектор)
2. Выбор и подготовка клеток-реципиентов для трансформации
3. Встраивание трансгена в геном клетки-реципиента
4. Отбор трансгенных организмов
5. Отбор трансгенных организмов, образующих трансгенные гаметы
6. Получение чистых линий
7. Оценка экспрессии гена



Металлотионеин - белок, способный связывать двухвалентные металлы. Регулирует концентрацию в клетке микроэлементов (цинк и медь).

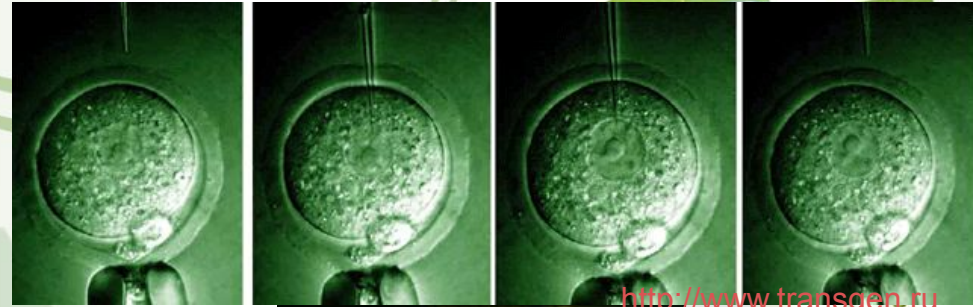
В 1982 году Р.Д.Пальмитер с коллегами опубликовали фотографию, на которой рядом сидели две мыши. Одна из них была трансгенной, в ее ДНК встроили ген гормона роста крысы, другая была обычной мышкой.



Схемы получения трансгенных ЖИВОТНЫХ

Микроинъекция в зиготу

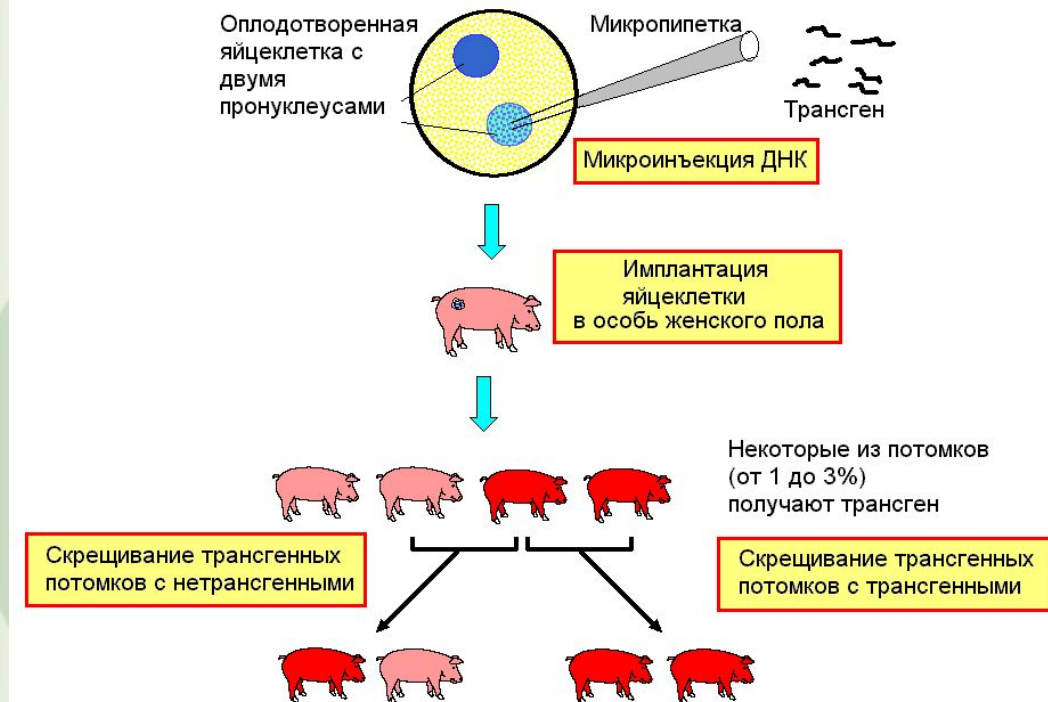
микроинъекция чужеродной ДНК в оплодотворенную яйцеклетку (зиготу)



<http://www.transgen.ru>



1. Создание и клонирование кассеты экспрессии составе вектора клонируется в *E. Coli*
2. Получение одноклеточных зигот
3. Выделение гДНК, переводение в линейную форму, инъектирование в пронуклеус зиготы.
4. пересадка эмбрионов самкам-реципиентам
5. отбор трансгенных животных, продуцирующих трансгенные гаметы

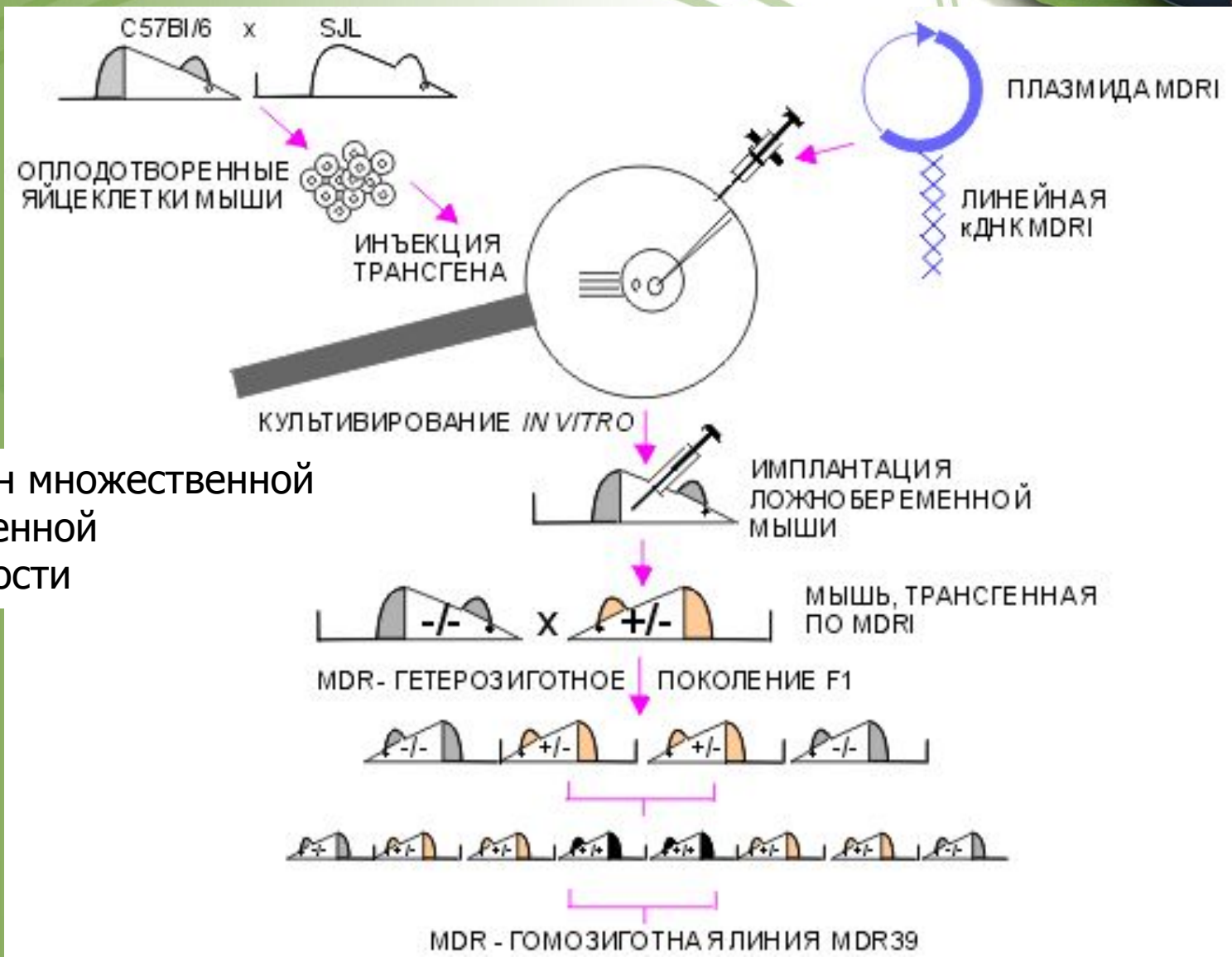


Основные проблемы

1. встроился ли трансген в геном?
2. несут ли трансген гаметы?
3. экспрессируется ли трансген?



Схема введения генов и установления гомозиготной линии мышей с помощью микроинъекций



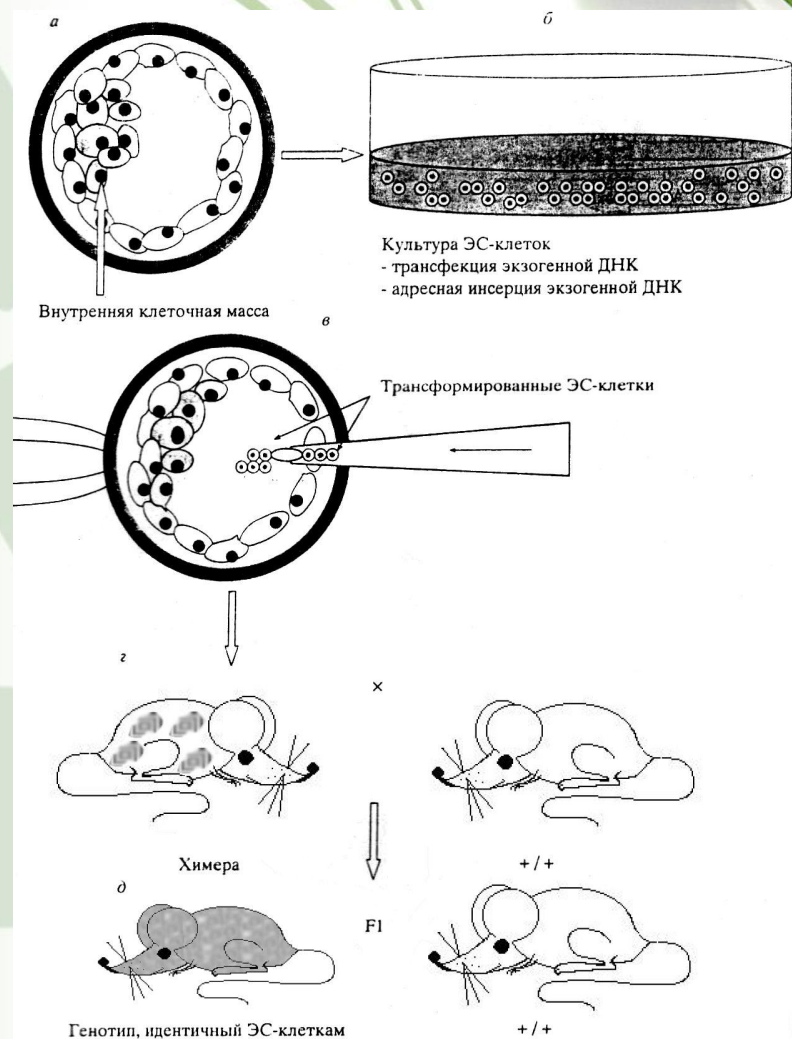
MDR1- ген множественной лекарственной устойчивости

Схемы получения трансгенных животных

Реконструкция эмбрионов с использованием ЭСК (эмбриональных стволовых клеток)

микроинъекция чужеродной ДНК в ЭСК

1. Получение культуры ЭСК
2. Введение в ЭСК гДНК с селективных маркером (с помощью ретровирусов, электропорации, липосом)
3. Получение бластоцист для микроинъекции
4. Конструирование химерных эмбрионов
5. Пересадка эмбрионов самкам-реципиентам
6. отбор трансгенных животных, продуцирующих трансгенные гаметы



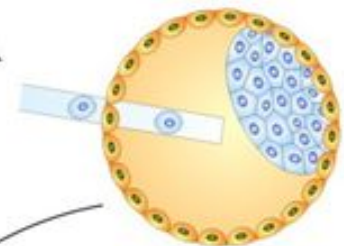
Инъекция в бластоцисту



<http://www.stemcells.ox.ac.uk>



Genetic manipulation of ES cells
(knock in, knock out, transgene)



ES cells injected into blastocyst



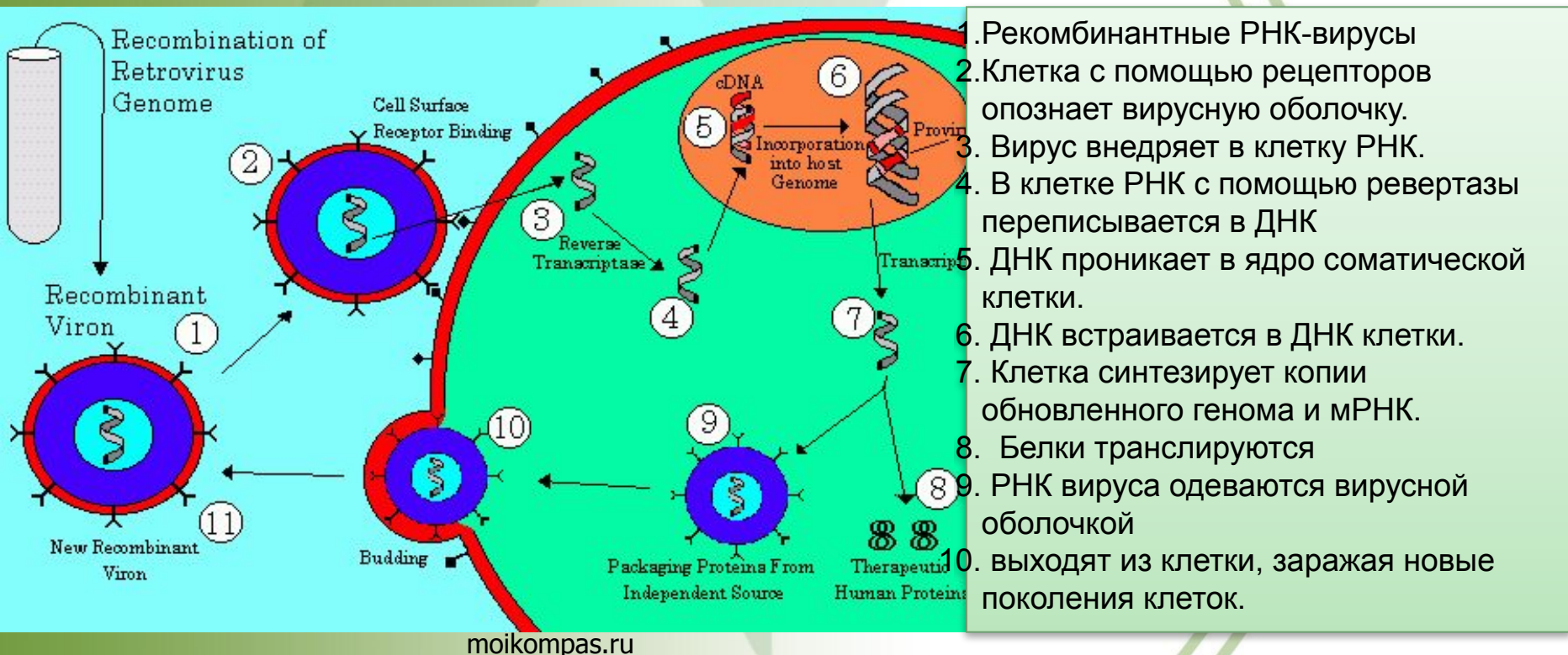
Chimeric animal (germline transmission)

<http://www.tankonyvtar.hu/>

Способы введения днк в культивируемые клетки животных



Перенос генов с помощью вирусов
(Эффективные векторы созданы на основе ретровирусов, вирусов SV40, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вируса осповакцины, вируса герпеса и др.)



Структура экспрессирующего вектора рKSV-10 для трансгеноза животных

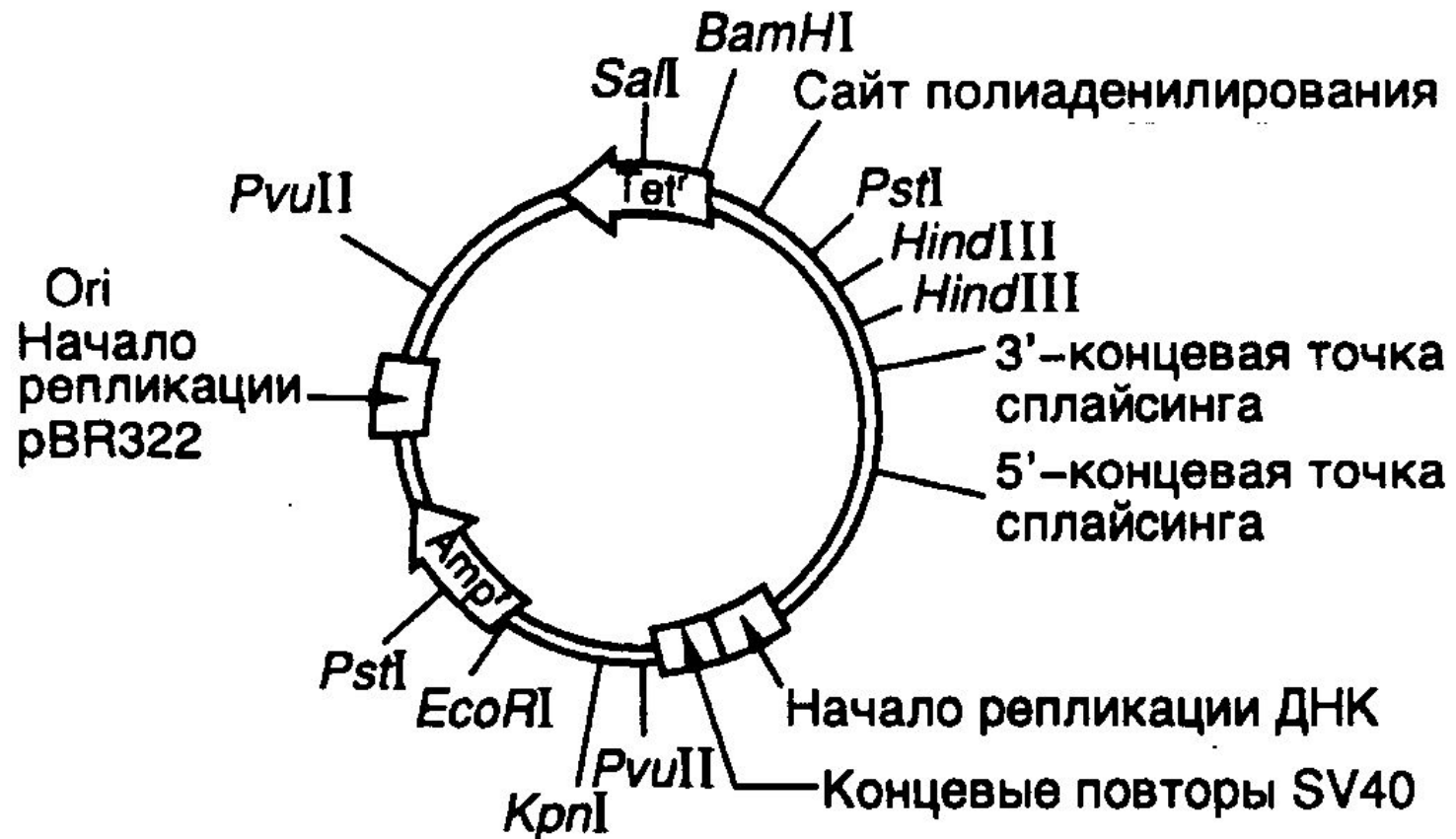
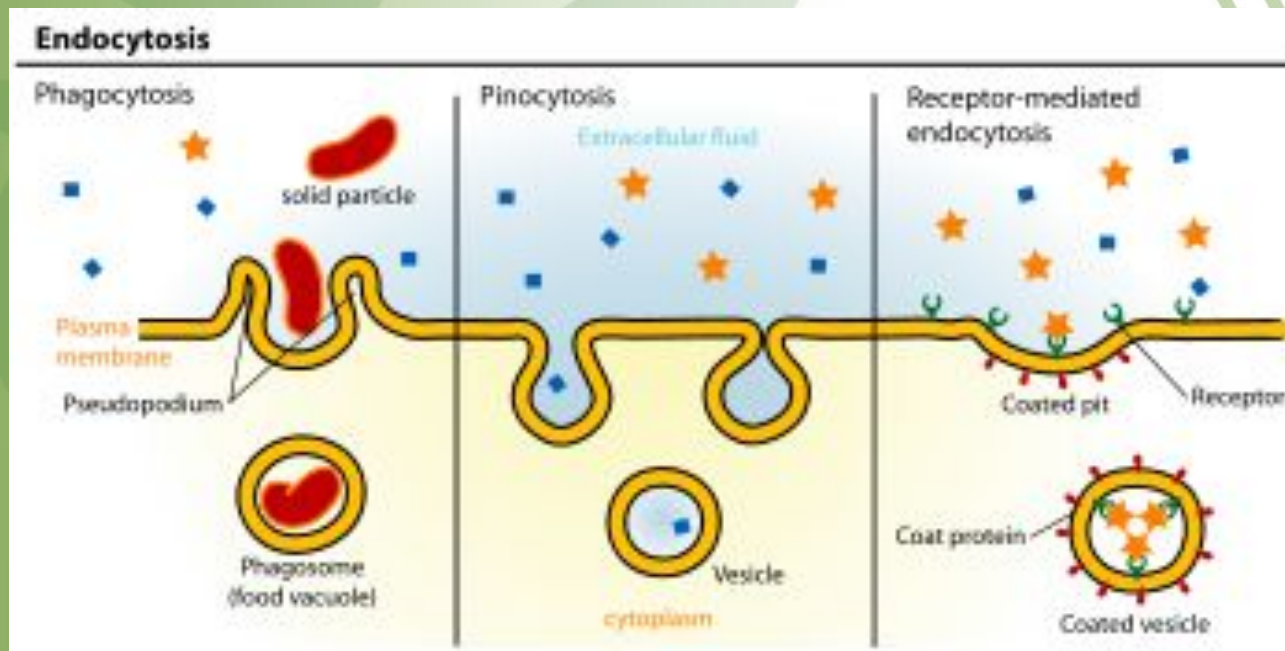


рисунок из книги Л.И. Патрушева Экспрессия генов, 2004

Способы введения днк в культивируемые клетки животных



Перенос генов, опосредованный клеточными рецепторами основан на интернализации рецепторов в процессе эндоцитоза

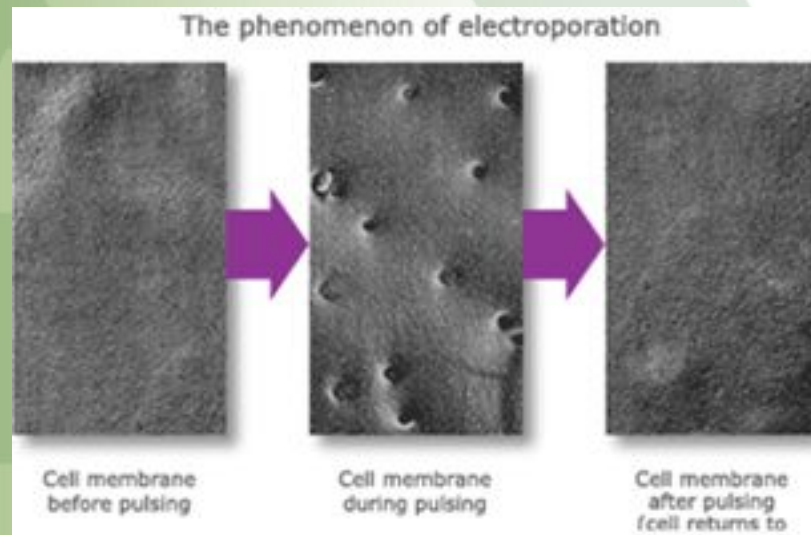


Способы введения днк в культивируемые клетки животных



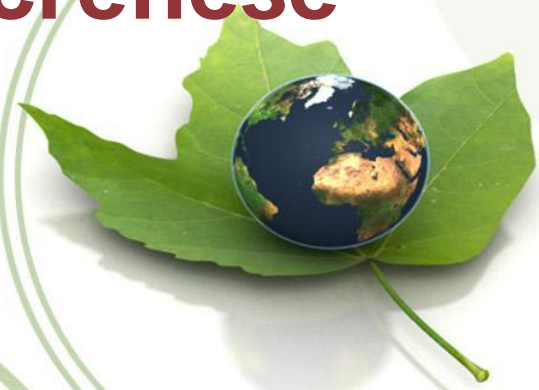
Электропорация.

Кратковременное (10 мксек-100 мсек) воздействие электрическим полем высокой напряженности (50-1500 В/см), вызывает локальное нарушение целостности мембран с образованием микропор (диаметр 20-120 нм), через которые заряженные молекулы, в том числе и ДНК, как линейная, так и суперскрученная, проникают внутрь клеток



Основные стратегии в трансгенезе животных.

Внедрение в практику.

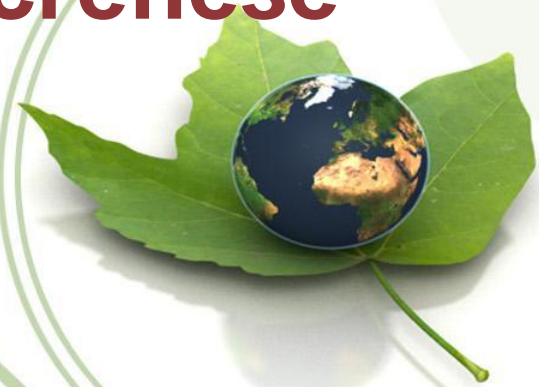


- Создание новых животных, с улучшенными качественными и количественными характеристиками

(лосось с трансгеном гормона роста)

Основные стратегии в трансгенезе животных.

Внедрение в практику.



- Создание новых животноводческих пород, дающих продукты с повышенным содержанием некоторых компонентов

(например, в Великобритании существует стадо коров, молоко которых подходит для приготовления сыра чеддер).

Основные стратегии в трансгенезе животных.

Внедрение в практику.

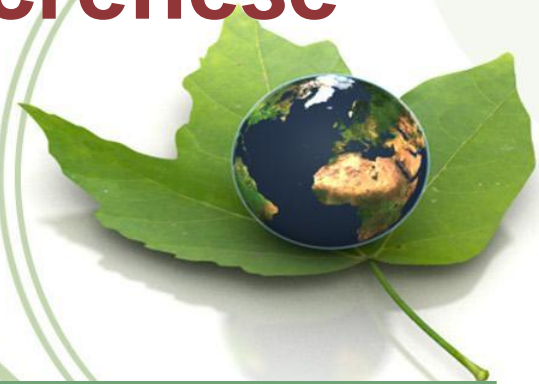


- Создание животных, способных продуцировать несвойственные их виду белки

(например, сообщалось о получении свиней, способных продуцировать интерферон человека).

Основные стратегии в трансгенезе животных.

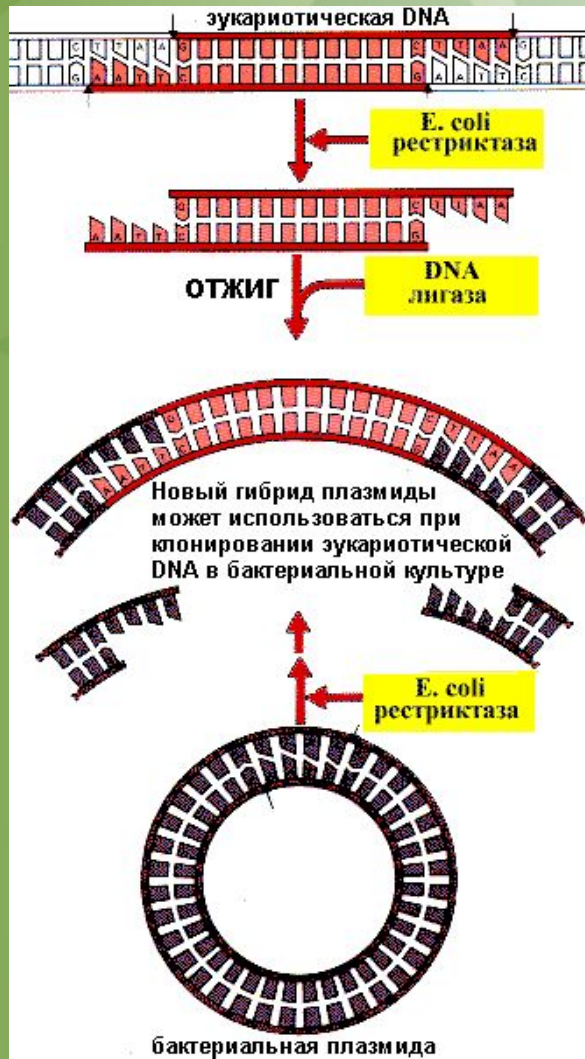
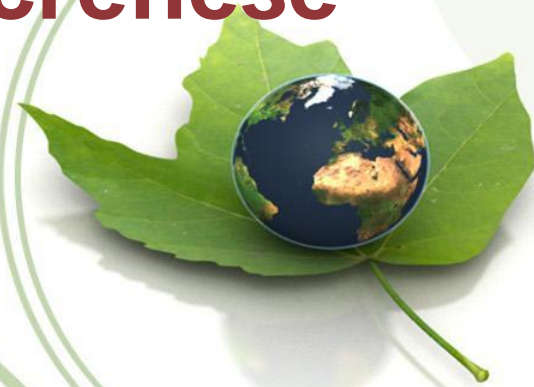
Внедрение в практику.



- Создание трансгенных животных, являющихся донорами при трансплантациях органов.
(например, из стволовых эмбриональных клеток животных вырастили глаза и уши лягушки).

Основные стратегии в трансгенезе животных.

Внедрение в практику.



- **Получение геномных библиотек** – полное собрание генома человека, распределенное по отдельным «томам» рекомбинантных молекул плазмид или фаговых частиц «в суперобложке» бактерии *E.coli*.

Схема получения геномной библиотеки. Метод дробовика



1

- в бактериофаг λ встраивают фрагмент ДНК человека в 15-20 т.п.н., полученный методом рестрикции, фаг реплицируют в клетках *E.coli*

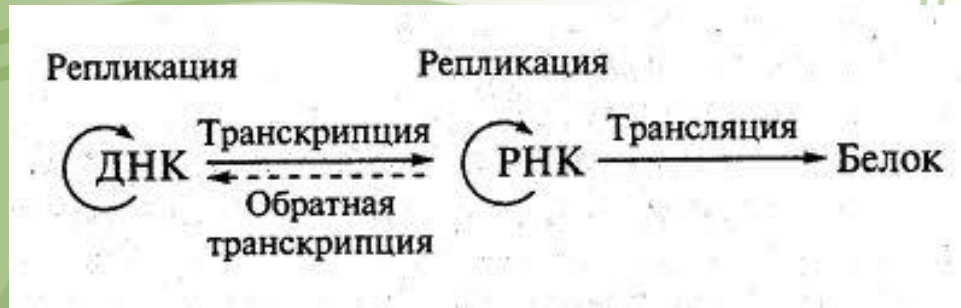
2

- *E.coli*, зараженные фагом, высевают на питательную среду. Неинфицированные клетки растут, образуя “газон”, а инфицированные – лизируются с образованием пятна лизиса, или бляшки, содержащей множество копий фага с одним фрагментом ДНК человека.

3

- с помощью ДНК-зонда отбирают бляшки с нужным фрагментом ДНК и размножают в *E.coli*.

Схема получения библиотеки кДНК



1

- на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы синтезируют комплементарной нити ДНК

2

- с помощью ДНК-полимеразы досинтезируют комплементарную цепь ДНК

3

- ДНК встраивают в плазмиды и вводят в клетки бактерий

ДНК-зонды

ДНК-зонд (англ. DNA probe) – фрагмент ДНК, меченный тем или иным образом и использующийся для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК. Позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.

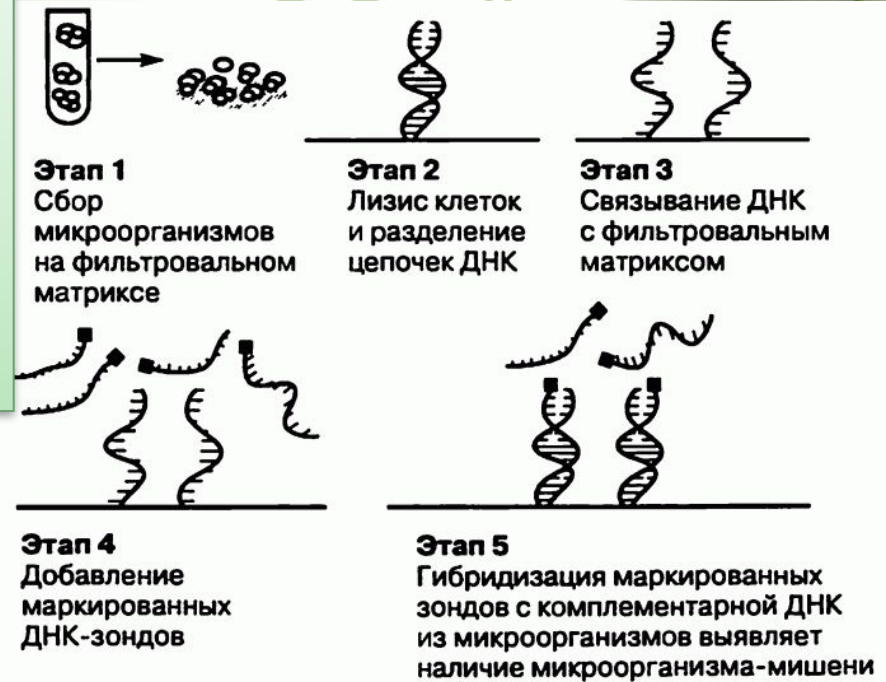
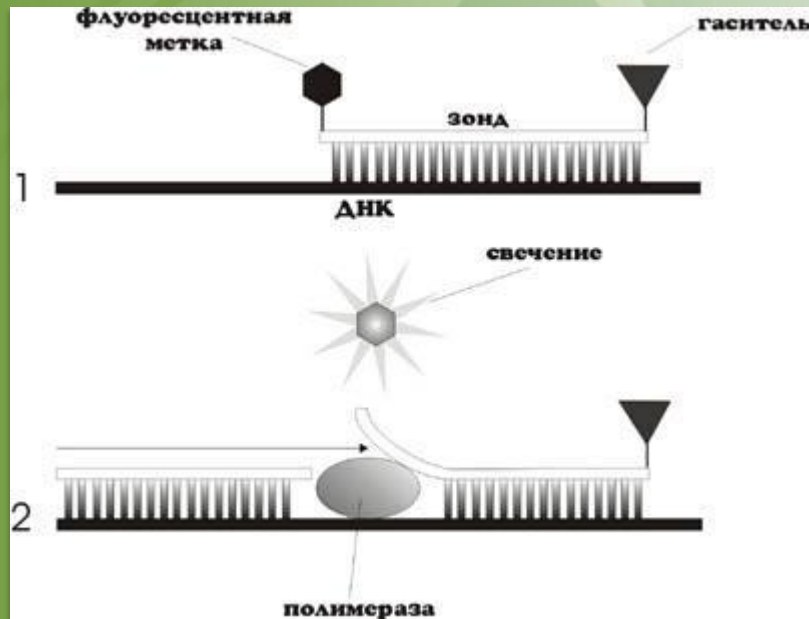


Рис. 8.4. Тест ДНК–ДНК-гибридизации

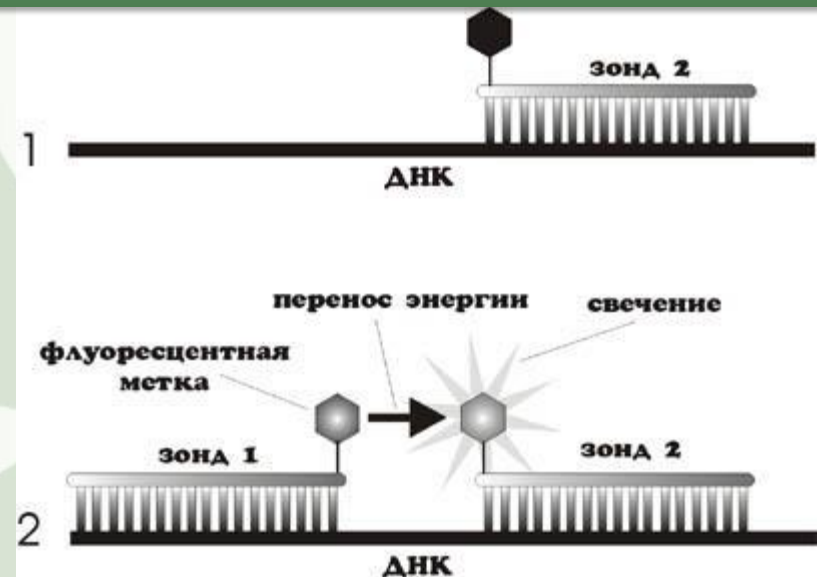
ДНК-зонды.

Зонды с комплементарными концевыми последовательностями (molecular beacons)



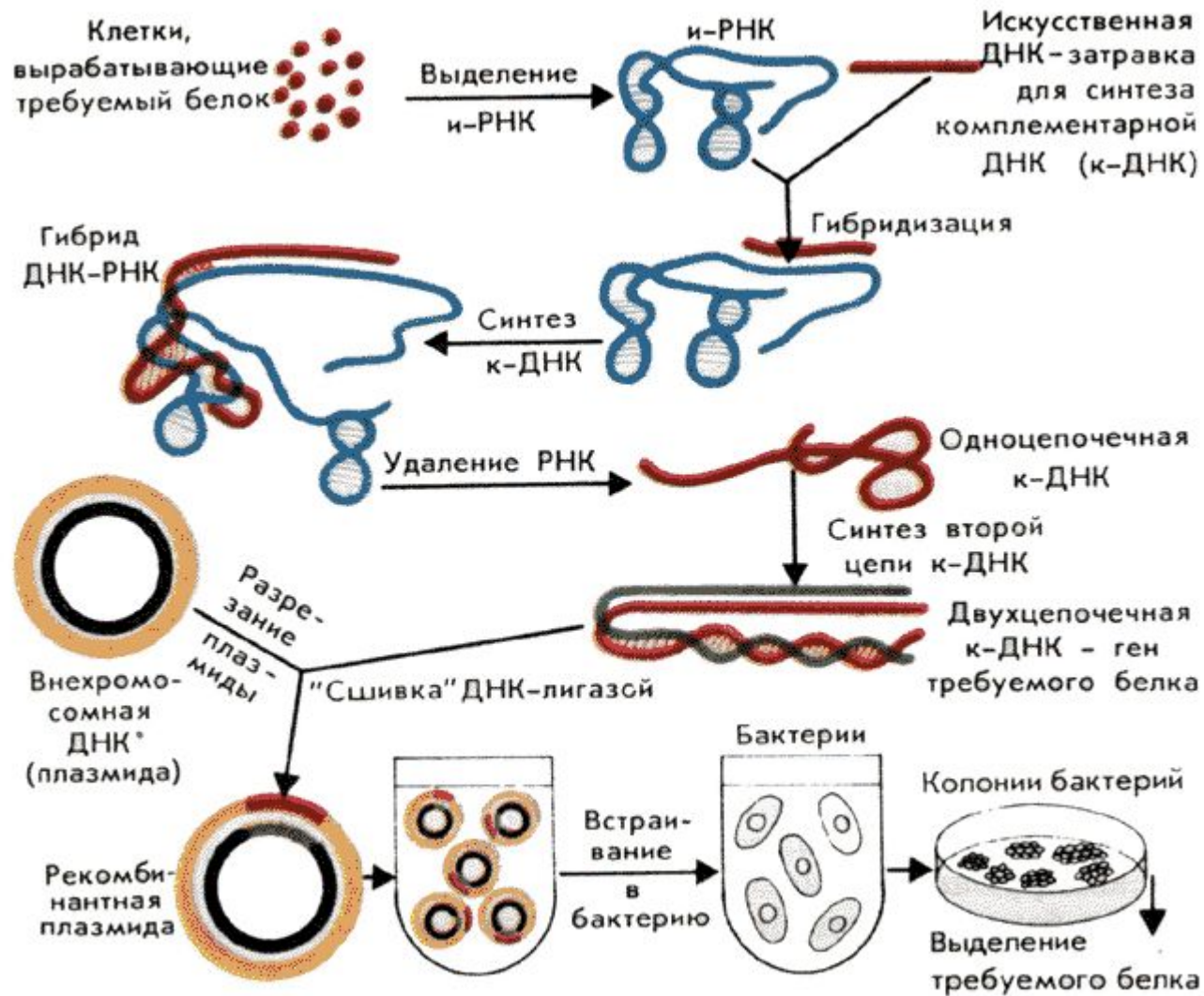
Концевые последовательности зонда комплементарны и образуют шпильки, что гасит свечение. Зонды, которые отжигаются на матрицу, разворачиваются, и флуоресцентная метка и гаситель расходятся в разные стороны - увеличивается свечение.

Зонды с резонансным переносом энергии (LightCycler assay)



Принцип метода в переносе энергии от одного флуорофора (на 3' конце первого зонда), ко второму флуорофору (на 5' конце второго зонда). При связывании зондов с ДНК матрицей испускаемое первым флуорофором излучение передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором.

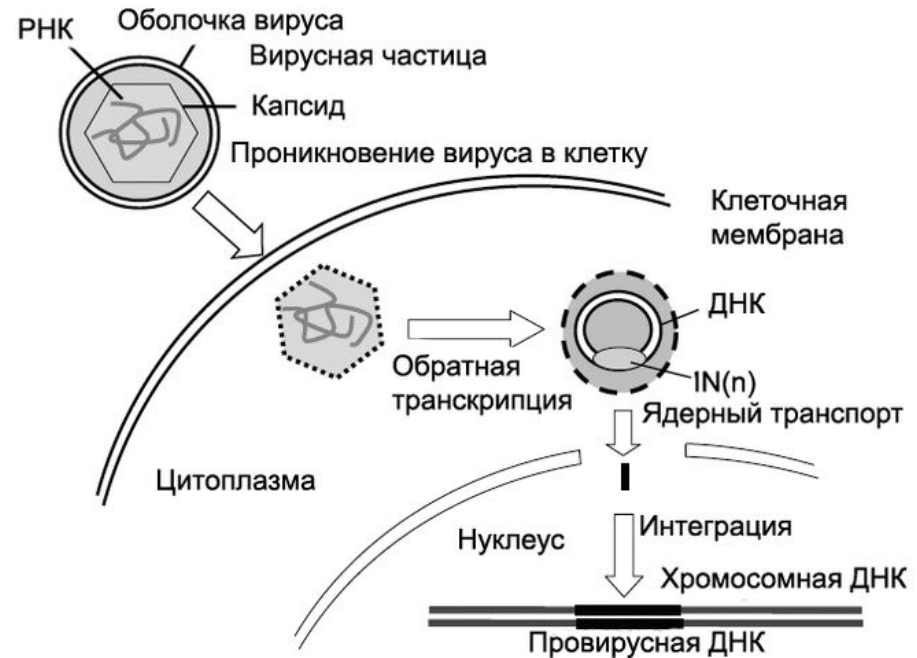
Схема получения кДНК.



Генная терапия

**в генной терапии наследственных болезней
применяют векторные системы на основе:**

- лентивирусов
- аденовирусов
- аденоассоциированных вирусов
- ортопоксвирусов
- герпесвирусов
- РНК-вирусов, не относящихся к ретровирусам



Сравнение свойств генотерапевтических векторных систем



Векторные системы	Ретровирусные	Лентивирусные	Аденовирусные	Вирус герпеса первого типа	Адено-ассоциированный вирус
Максимальный размер вставки, т.п.о.	7-7,5	7-7,5	До 30	30 - 150 т.п.о	3,5-4,0
Схема доставки генов	Ex vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo	In vivo	Ex/in vivo
Интеграция с ДНК реципиента	Возможна	Возможна	Невозможна	Невозможна	Возможна/ Невозможна
Продолжительность экспрессии in vivo	Короткая	Продолжительная	Короткая	Короткая	Продолжительная
Стабильность	Хорошая	Не проверялась	Хорошая	Нестабилен	Хорошая
Иммунологические проблемы	Незначительны	Незначительны	Серьезны	Незначительны	Неизвестны
Проблемы безопасности	Инсерционный мутагенез?	Инсерционный мутагенез?	Воспалительный ответ, токсичность	Незначительны для ампликонов	Воспалительный ответ, токсичность

Словарь



Таргетинг (target - мишень) – изменение генов за счет гомологичной рекомбинации последовательностей, находящихся в хромосоме, с искусственно введенными в клетку последовательностями ДНК

Упаковывающая клетка – линия клеток, созданная для продуцирования (упаковки) вирусных частиц, не содержащих инфекционных нуклеиновых кислот.

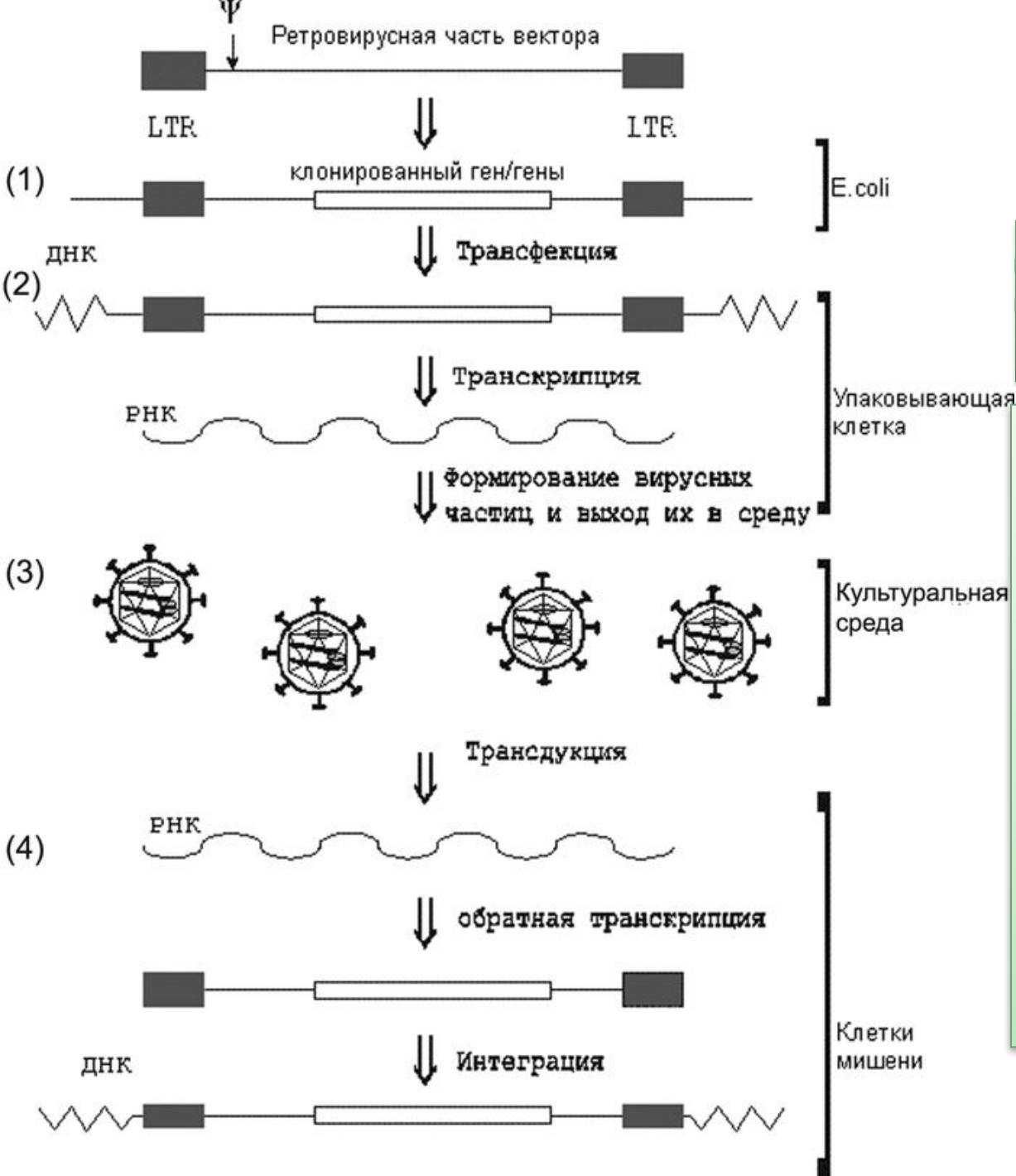


Схема переноса генов с использованием ретровирусных векторов

1. Клонирование гена в ДНК ретровирусного вектора в клетках *E. coli*.
2. Перенос ДНК ретровирусного вектора в упаковывающие клетки.
3. Формирование ретровирусных частиц и их выход в культу ральную среду.
4. Трансдукция гена в составе ретровирусного вектора в клетки-мишени.

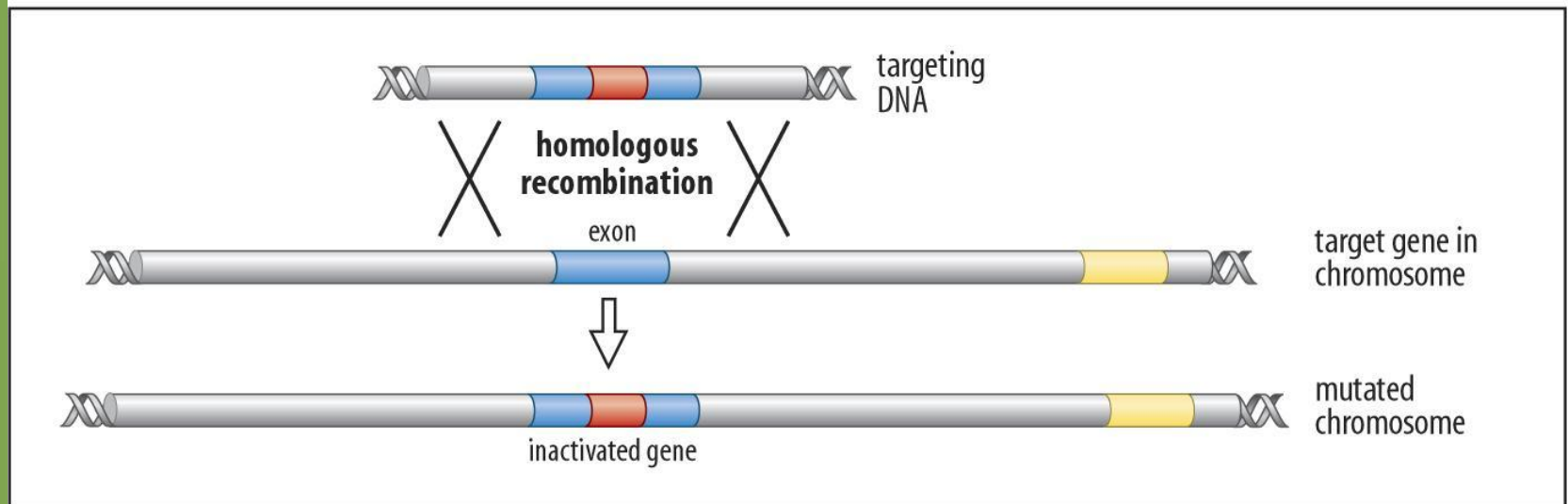
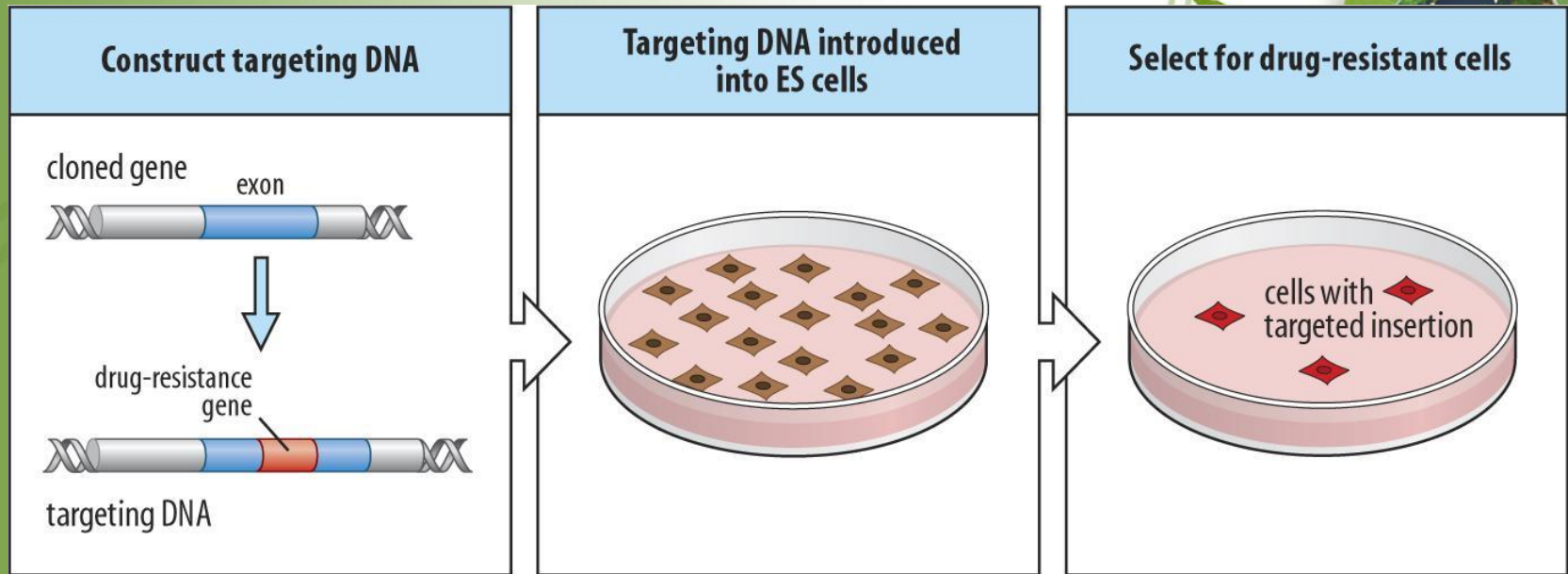
Методы модификации вирусов



физический таргетинг – покрытие вирусной частицы специальной оболочкой, изменяющей ее природный тропизм и делающей ее неузнаваемой для иммунной системы человека

генетическая модификация вируса – модификация белков оболочки вектора

транскрипционный таргетинг – введение в трансген-экспрессирующую кассету специфических для данных тканей промоторных последовательностей.

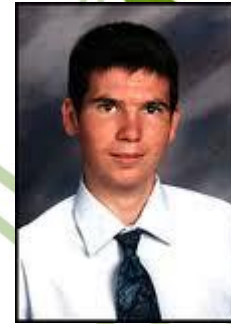


Успехи и неудачи генной терапии



David Phillip Vetter
21.09.1971, - 22.02.1984

Первая успешная попытка лечения тяжелого обычно несовместимого с жизнью наследственного иммунологического заболевания, вызванного дефектом в гене, кодирующем фермент аденозиндезаминазу, была осуществлена в 1990 г. В. Андерсеном с соавт.



Джесси Гелзингер

17 сентября 2000 г. в Университете Пенсильвании умер 17 летний Джесси Гелзингер, которого пытались вылечить от наследственного заболевания печени недостаточность орнитинтранскарбомилазы (OTCD). Он умер из-за гиперреакции иммунной системы на ввод в печень генно-инженерного аденовируса. Смерть наступила вследствие острого респираторного синдрома и выхода из строя множества органов.