

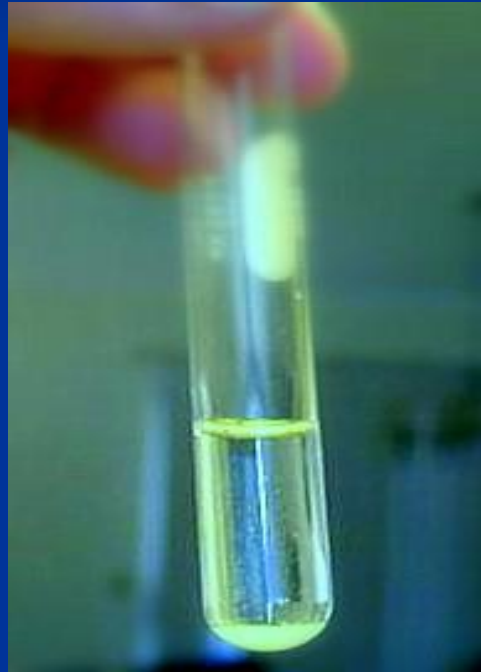
Инновационный подход к получению Wnt-лигандов.

Николаева Ксения
Магистрант МГУ(ПФ)

Институт белка РАН, группа генетики развития

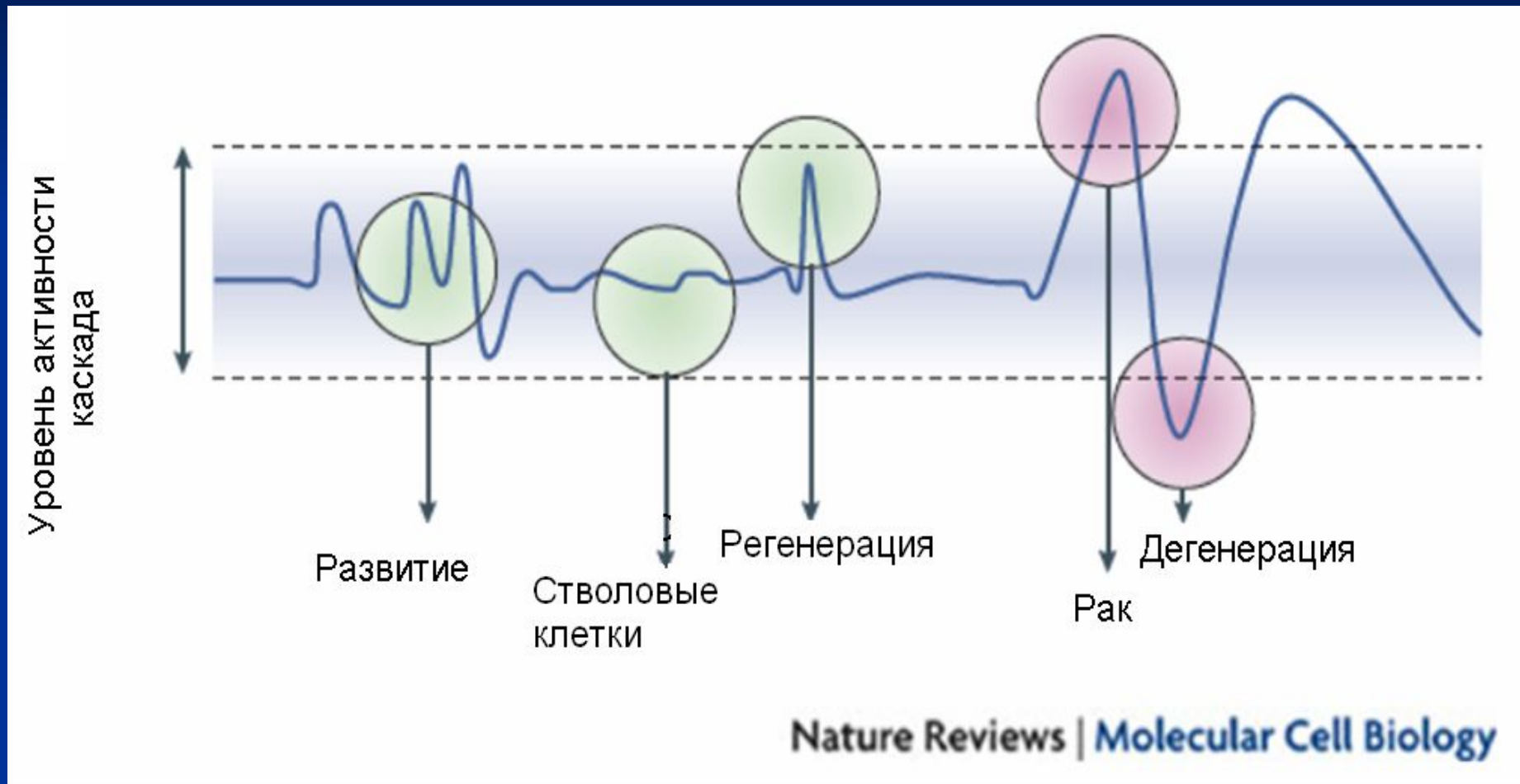
Цель

Создание технологии снижающей стоимость производства Wnt3a-лиганда.



Введение

Белки семейства Wnt являются лигандами Wnt/Frizzled сигнального каскада

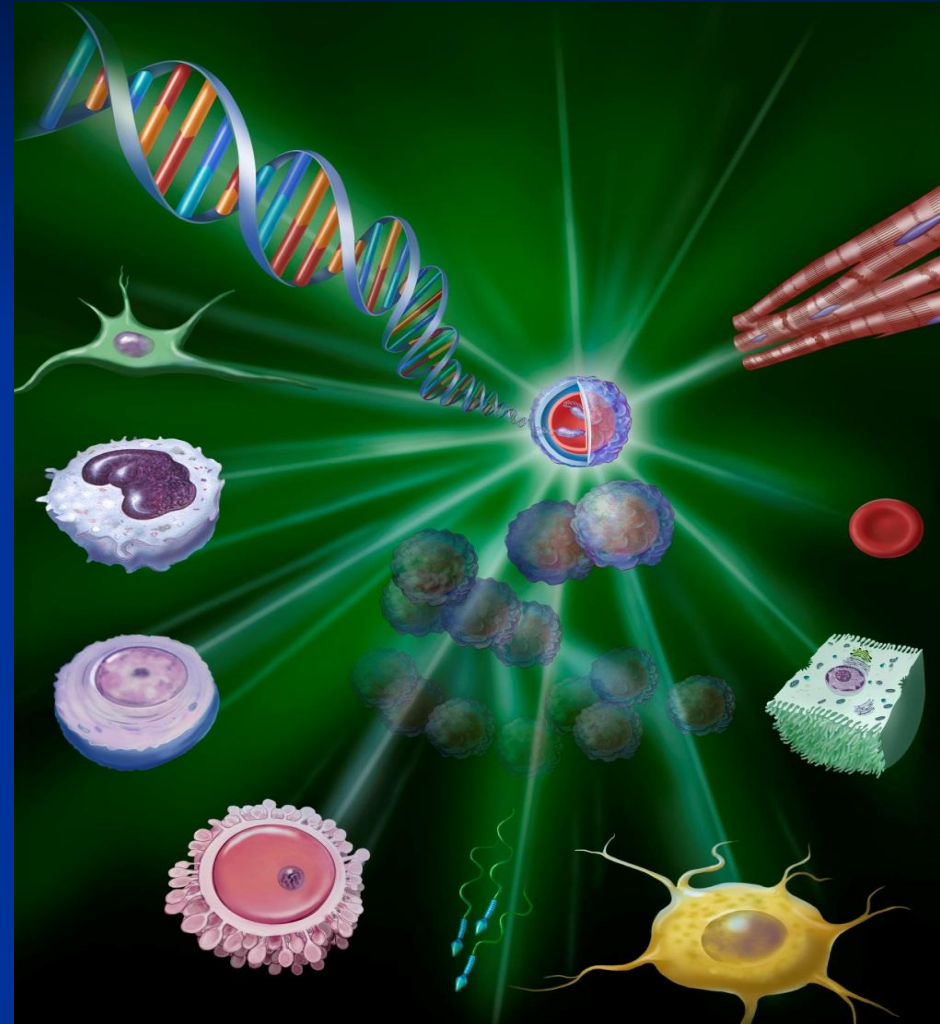


Наиболее изученным из них является Wnt3a-лиганд.

Wnt3a

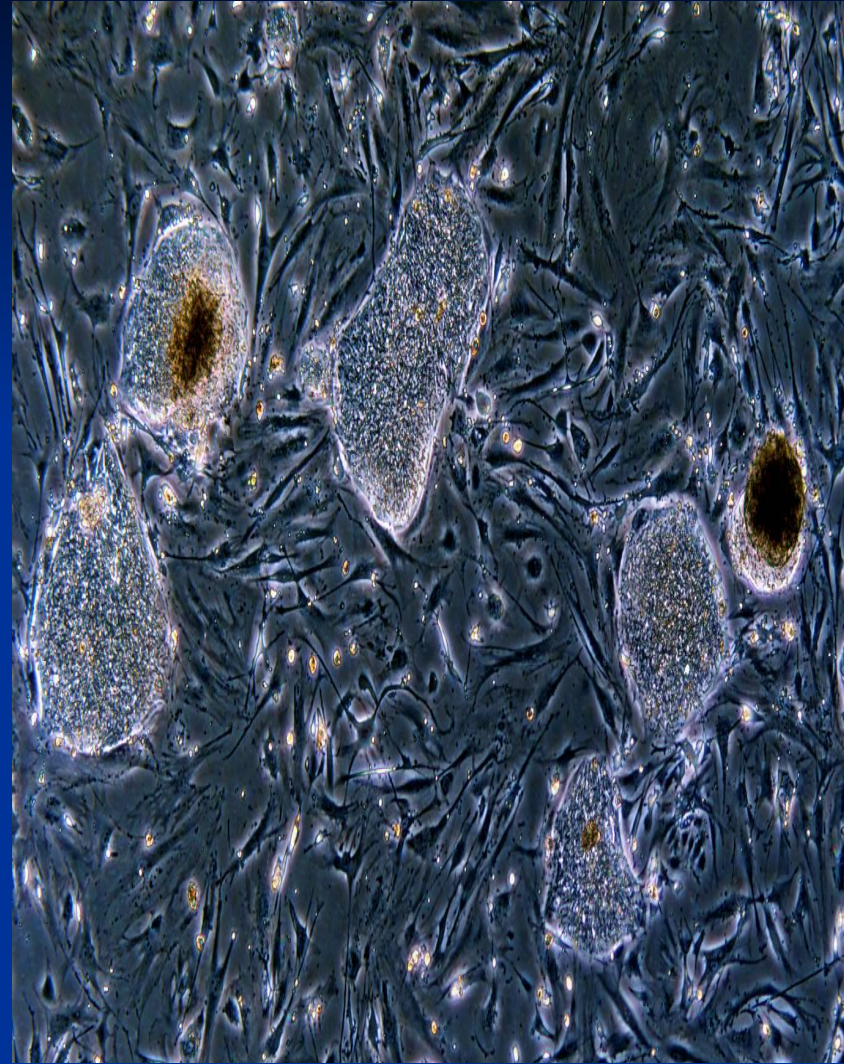
Wnt3a-лиганд- фактор роста, участвующий в клеточной пролиферации и дифференциации. Он применяется в регенерационной медицине и как агент для выращивания стволовых клеток.

В ходе экспериментов нашей лаборатории было предположено и доказано, что белок P0 стимулирует выработку Wnt3a-лиганда.



Технология культивирования стволовых клеток на фидерном слое из мышинных фибробластов не позволяет вследствие иммунных реакций использовать клетки для введения в организм больного человека.

Бесфидерное культивирование стволовых клеток позволяет избежать многих негативных эффектов. Необходимым компонентом данной технологии является Wnt3a-лиганд.



Стволовые клетки человека растущие на фидерном слое фибробластов мыши.

Трудности получения.

Wnt-лиганды гидрофобны и плохо растворимы. Их получение с помощью бактериальных клеток невозможно вследствие сложных путей секреции и модификаций (липидных и углеводных).

Эукариотические клетки выделяют Wnt-лиганды в очень малых количествах, в результате чего их получение чрезвычайно дорого.

Почему оптимизация производства Wnt-лигандов актуальна?

Стоимость 1 мкг Wnt3a-лиганда	около	100\$
Необходимая концентрация Wnt3a		100 нг/мл
Стоимость Wnt3a для 1 мл культуры		10\$
Стоимость Wnt3a для 1 л культуры		10 000\$

На сегодня в России :

Лицензии Росздравнадзора на осуществление забора и хранения клеточного материала (Банк стволовых клеток) имеют 10 учреждений:

- 1. ОАО "Институт Стволовых Клеток Человека" (Гемабанк)- Москва**
2. ООО "Флора-мед" - Москва
3. ООО "Желдормфармтранс" (ассоциация "Мера-Мед") - Москва
4. ГУЗ Москвы "Банк стволовых клеток департамента здравоохранения г. Москвы"
5. ГУ Институт хирургии им. А.В. Вишневского РАМН - Москва
6. ООО "Криоцентр" - Москва
7. ГУП "Поволжский банк гемопоэтических клеток" - Самара
8. ЗАО "РеМеТэкс" - Москва
- 9. ООО "Бьюти Плаза" - Москва**
10. ООО "Транс-Технологии" Санкт-Петербург.

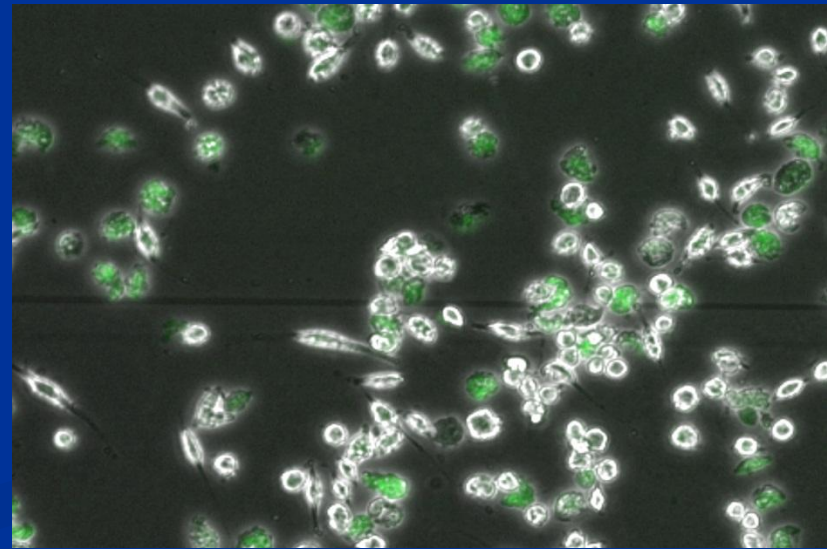
Enamine, Ltd – Киев, Украина

Разработка

Создание клеточной культуры с повышенной экспрессией гена P0 для получения Wnt3a-лиганда с меньшими финансовыми затратами.

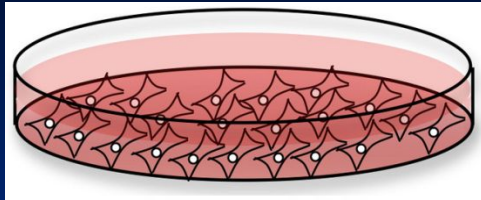
Система была проверена на клетках мышинных фибробластов линии L.

Получены предварительные результаты.

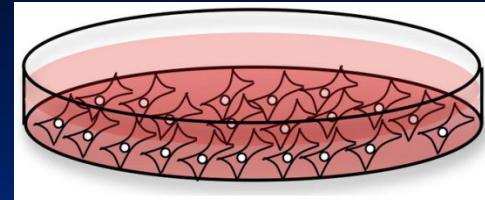


Клетки мышинных фибробластов линии L.

Методика

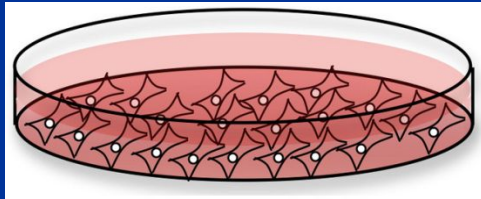


Клетки экспрессирующие Wnt3a

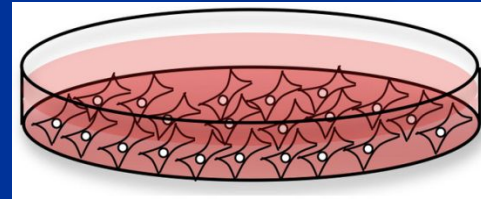


Клетки гиперэкспрессирующие Wnt3a и P0

Перенос среды содержащей Wnt3a



Выращивание клеток, интенсивность флуоресценции которых связана с содержанием Wnt3a в среде.



Измерение флуоресценции клеток

Содержание Wnt3a в среде.

День1	День1	День1	День2	День2	День2	День3	День3	День3	
L-клетки	Wnt3a	Wnt3a+P0	L-клетки	Wnt3a+P0	Wnt3a+P0	L-клетки	Wnt3a	Wnt3a+P0	маркер



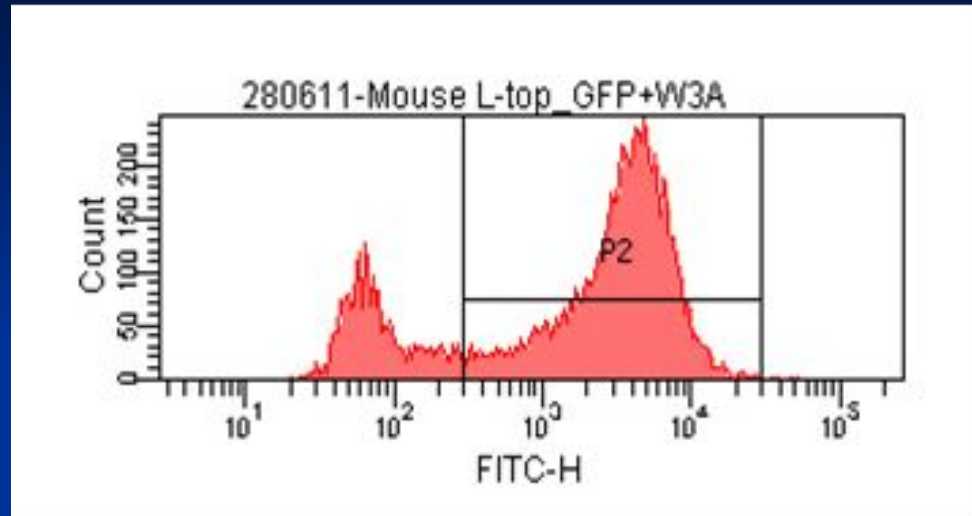
L-клетки- контроль.

Wnt3a-клетки, гиперэкспрессирующие дополнительный ген Wnt3a.

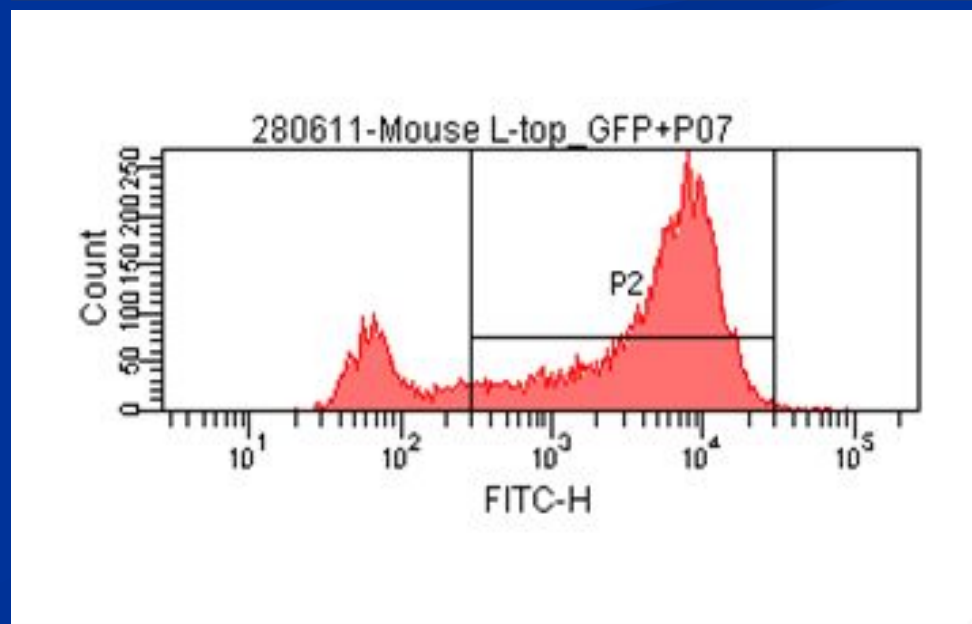
Wnt3a+P0-клетки гиперэкспрессирующие дополнительные гены Wnt3a и P0.

Интенсивность флуоресценции клеток. (активность Wnt3a)

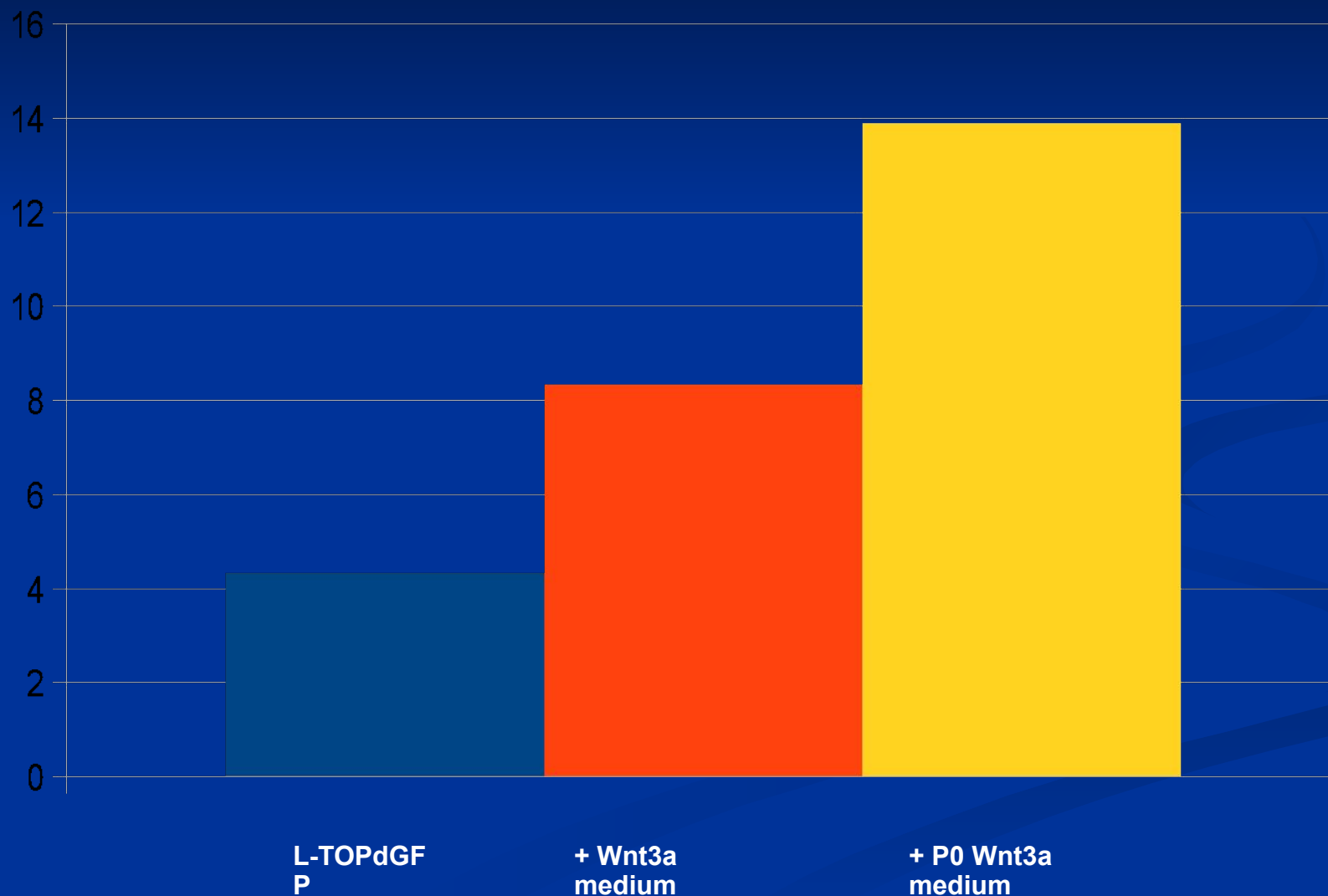
Стимуляция средой,
полученной от клеток
гиперэкспрессирующих
Wnt3a



Стимуляция средой,
полученной от клеток
гиперэкспрессирующих
Wnt3a+P0



Сравнительная активность флуоресценции репортерных TOPdGFP-L клеток при стимуляции их средой.



Перспективы

- 1) Достичь большей экспрессии P0, и как следствие добиться повышения производства и активности Wnt3a-лиганда;
- 2) Оптимизировать методы выделения и очистки Wnt3a-лиганда.
- 3) Масштабировать все процессы.

Группа генетики развития

