Лекция 3

Паратрансгеноз (paratransgenesis)

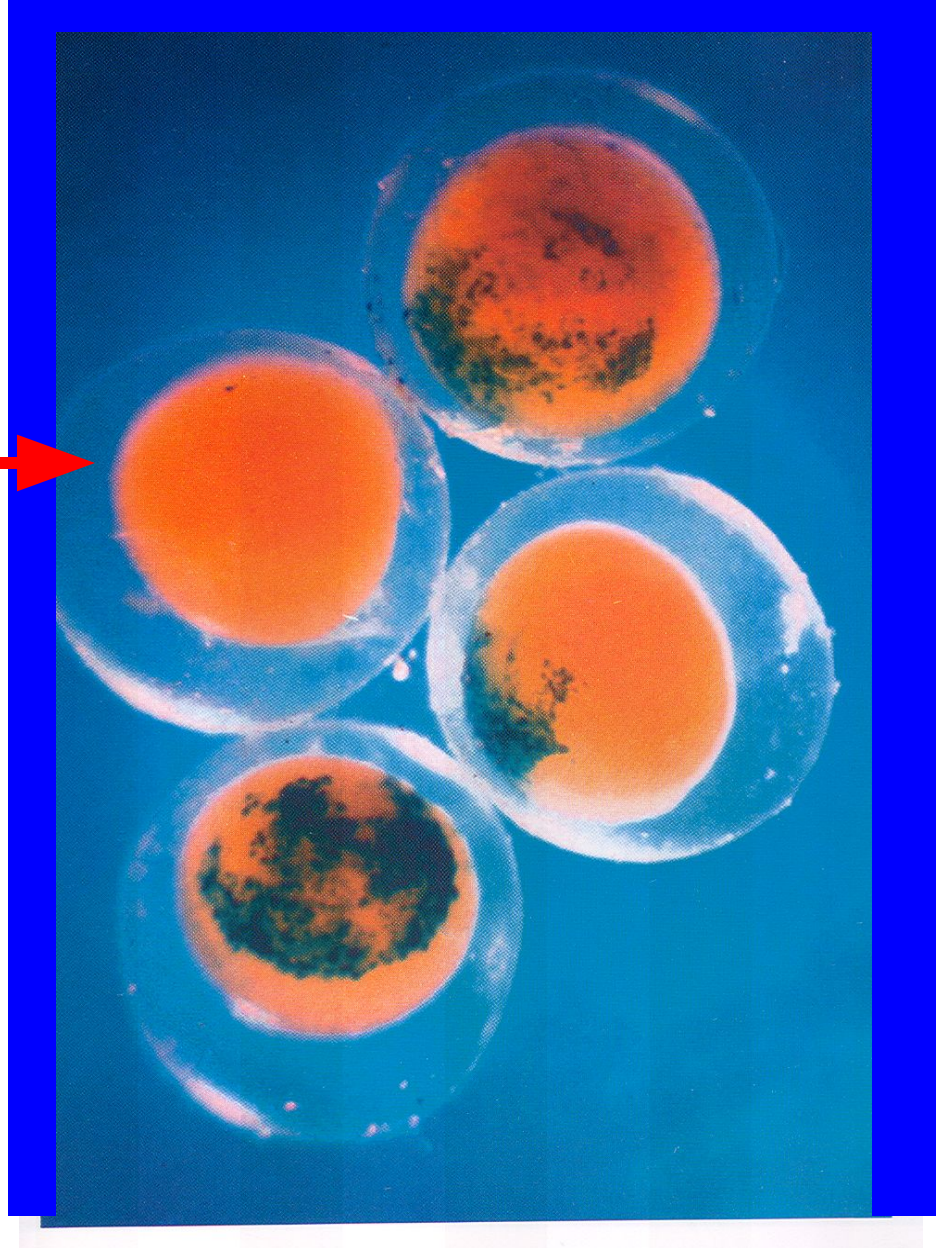
[лат. *para* — возле, при, вне, *trans(ferre)* — переносить и греч. *genesis* — происхождение] — метод переноса экзогенного генетического материала в целые организмы с помощью бактерий-симбионтов или вирусов-симбионтов. П. направлен на подавление патогена в переносчиках инфекций, приводящих к различным заболеваниям. Напр., с помощью генетически модифицированной бактерии *Sodalis* были получены мухи це-це, устойчивые к инфекции трипаносомами, которые являются возбудителями малярии.

Метод предложен Ч. Бирдом с соавт. в 1993 г.

Структура вектора, используемого для изучения регуляции генов

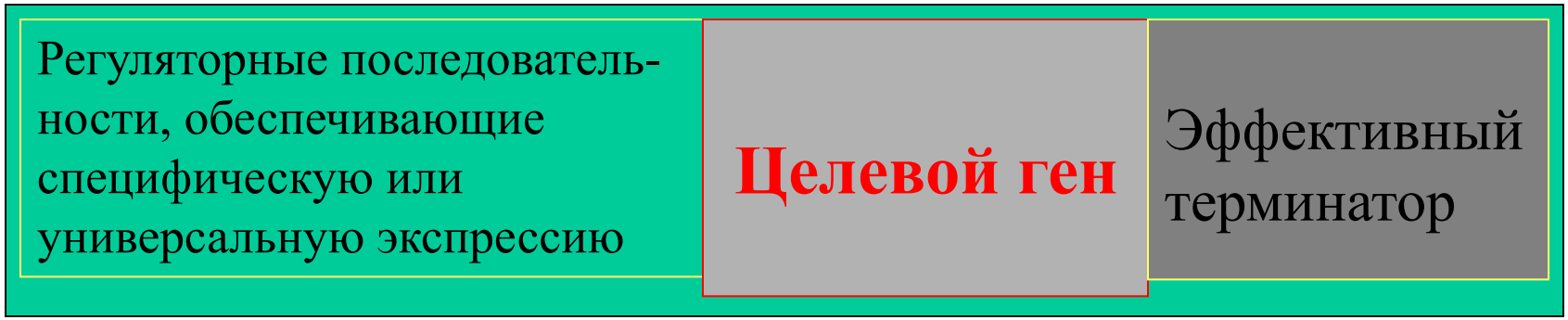
Энхансер целевого гена	Промотор целевого гена	**Репортерный ген** **(люцифераза, бета-галактозидаза, термостабильная щелочная фосфатаза, цветные белки)**	Терминатор целевого гена

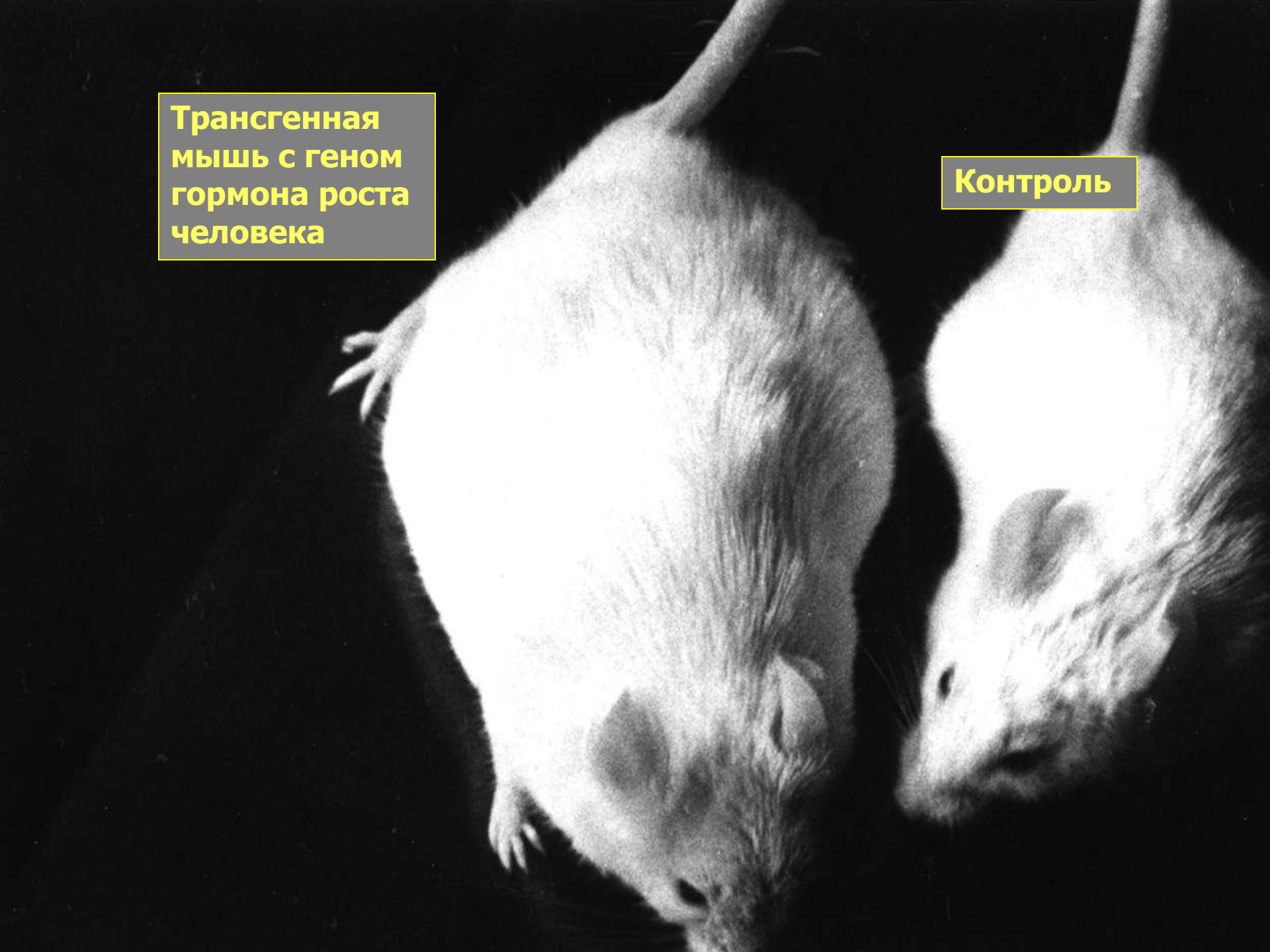
Контроль



Экспрессия трансгена у эмбрионов вьюна с геном CMV-lacZ через сутки после оплодотворения (окраска X-gal)

Структура вектора, используемого для изучения фенотипических эффектов генов




Трансгенная мышь с геном гормона роста человека
Контроль

Другие яркие примеры:

-Трансгенная «супермышь» с геном фосфоэнолпируват-карбоксилиназы (участвует в обмене глюкозы) –пробегает без остановки более 5 км (2008 г.)

- Трансгенная мышь с геном Fra-1 (серин-треониновая фосфатаза, защищает клетки от свободных радикалов) - «супердетоксицирующая» модель. Повышенное производство Fra-1 в печени защищает этот орган от разрушения повышенным дозами различных лекарствами, например, парацетамола (2013 г.)

Варианты конструкций, используемых для трансгеноза

Для изучения функций генов

Универсальные промоторы: MT, SV40, CMV, RSV

Индуцируемые промоторы: LTR MMTV - дексаметазон, MT – цинк, Tet - тетрациклин, AlcR – газ, содержащий ацетальдегид.

Тканеспецифические промоторы: глобиновый (кровь), ApoE (печень), иммуноглобулиновый (лимфоциты), тирозингидроксилазный (мозг)

Стадиеспецифические промоторы: альфа1-коллагеновый (на 9-ый день развития), альфа1-кристаллиновый (на 13-тый день развития)

Для изучения регуляции экспрессии генов

Гены-репортеры: lacZ, GFP, RFP, люцефераза

Для целенаправленного синтеза белка

Тканеспецифические промоторы: бета-лактоглобулина (молоко), бета-казеиновый (молоко), глобиновый (кровь).

Тканеспецифическая транскрипция трансгенов

СТРУКТУРА ТРАНСГЕНОВ			ЭКСПРЕССИЯ		
			ПРОДУКТ	ОРГАН	
5'-фланкирующ. ПС гена	Кодирующая область гена	3'-фланкирующ. ПС		ожидаемый	реальный
0.4	0.8	0.8	хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	Глаз (линза)	Глаз (линза)
αA-кристаллина мыши	CAT	SV40			
2.2	11	3.7	трансферрин	печень	печень, почки
трансферрина курицы	трансферрина курицы				
0.2	2.0		гормон роста	Панкреатич. железа	Панкреатич. железа
Эластазы крысы	Гормона роста человека				
0.7	2.7		Т-антиген	Панкреатичес. железа	Панкреатич. железа
Инсулина II крысы	Т-антигена SV40				
2.0	5.0	7.5	иммуноглобулин	Селезенка (В-клетки)	Селезенка (В-клетки)
k-иммуноглобулина мыши	k-иммуноглобулина мыши				

Стадиеспецифическая экспрессия трансгенов

СТРУКТУРА ТРАНСГЕНОВ			ЭКСПРЕССИЯ		
5'-фланкирующ. ПС гена	Кодирующая область гена	3'-фланкирующ. ПС	ПРОДУКТ	ОРГСТАДИЯ	
				ожидаемая	реальная
0.4	1.0	0.8	хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	Начало у эмбрионов 12,5 дня и далее	Начало у эмбрионов 12,5 дня и далее
αA-кристаллина мыши	CAT	SV40			
2.0	1.0		-//-	Начало у эмбрионов 8,5 дня и далее	Начало у эмбрионов 8,5 дня и далее
αI-коллагеновый мыши	CAT	SV40			
0.05	2.0	1.7	β-глобин	Начало у эмбрионов I2 дня и далее	Начало у эмбрионов II-I4 дня и далее
β-глобина человека	β-глобина человека	β-глобина человека			
7	5.5		мини-фетопротеиновая мРНК	Начало перед рождением и завершение вскоре п.р.	У эмбрионов 18-ого дня и до 14 дня после рождения
α-фетопротеина мыши	мини-фетопротеина мыши	SV40			

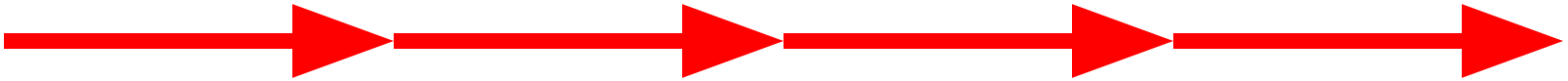
Измененная ткнеспецифичность экспрессии трансгенов

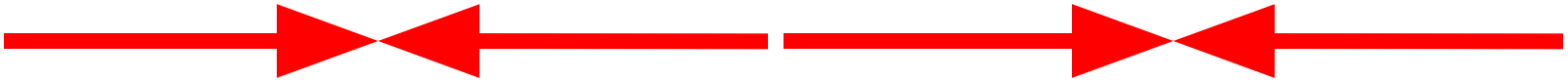
СТРУКТУРА ТРАНСГЕНОВ			ЭКСПРЕССИЯ		
5'-фланкирующ. ПС гена	Кодирующая область гена	3'-фланкирующ. ПС	ПРОДУКТ	ОЖИДАЕМЫЙ ОРГАН	НАБЛЮДАЕМЫЙ ОРГАН
0.4-1.8	2.0	3.0			
МТ мыши	гормона роста крысы	гормона роста крысы	гормон роста	Гл. обр. печень	Ограниченный набор нейронов
0.8	0.45	0.6			
МТ мыши	Соматостатина крысы	гормона роста человека	Соматостатин	Гл. обр. печень	Аденогипофиз (гонадотропные клетки)
2.3	2.0	0.5			
LTR MMTV	ТК HSV	ТК HSV	Тимидинкиназа	Молочная железа	Молочная железа, семенники, яичник
10.7	2.0	19.0			
фаг λ	β-глобина кролика	фаг λ	β-глобин	Эритроидные ткани	Скелетные мышцы, семенники

Механизмы трансгеноза

Схема расположения трансгенов в местах интеграции с геномом

Голова-хвост





Голова-голова

Наши данные: S-фаза,

Репликаторы генома

Эффект инсерции трансгена на структуру хозяйской ДНК

Трансген	Характер изменений в местах интеграции трансгена
MMTV - myc	Делеция 1kb ДНК
Ген гормона роста человека	Делеции до 10kb и/или перестройки
LTR RSV-ген хлорамфениколацетилтрансферазы	Хромосомная транслокация
MT мыши - TK HSV	Дупликация 5kb ДНК
β-глобиновый ген кролика	Делеция 18 kb ДНК
LTR RSV - TK HSV	Крупная делеция ДНК

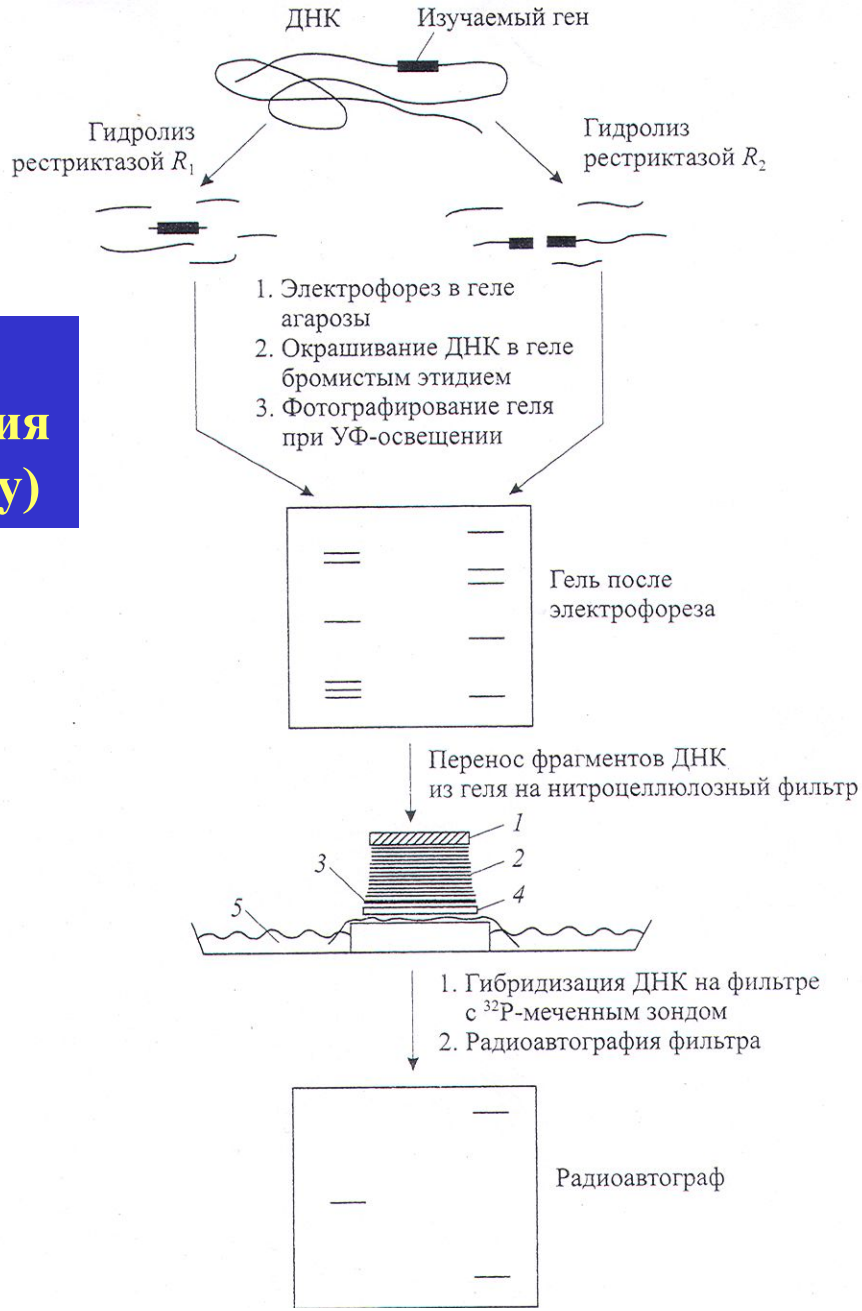
Изменения в структуре трансгенов в F0-поколении трансгенных мышей

Вводимая ДНК	Характер изменений трансгенов
SV40-ТК ген HSV	Делеции, перестройки
Ген интерферона человека	Инверсия ?
Вирус гепатита В человека	Частичная делеция
Ген гормона роста человека	Перестройки
2/3 гена актина крысы – 3′-конец гена глобина человека	Перестройки
LTR RSV-ТК HSV	Инверсия ?

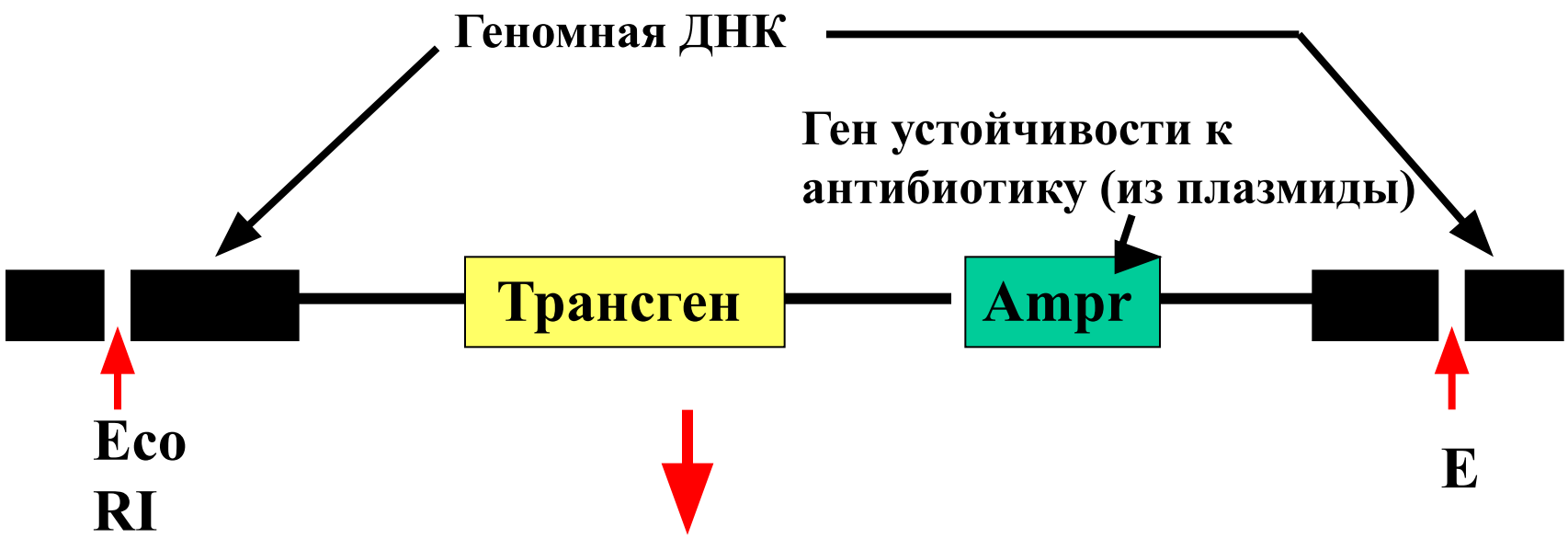
Перестройка структуры трансгена при передаче по наследству

Transfered DNA	Structural changes
Rabbit β-globin gene	Rearrangements
Human insulin gene	Partial deletion
Simian adenovirus (SA7) DNA	Rearrangements
Rabbit actin + human globin	Amplification or/ and deletions
Human elastase + growth hormone	Modification of tandem arrangement
SV40 + cDNA OTC	Deletion of 5'- and 3'-ends
v-myc	Amplification
pSV2-gpt-gE1A	Deletion of inverted copy

Блот-гибридизация (по Саузерну)



«Спасение плазмиды»



Трансформация клеток *E. coli*

Отбор бактериального клона на среде с антибиотиком

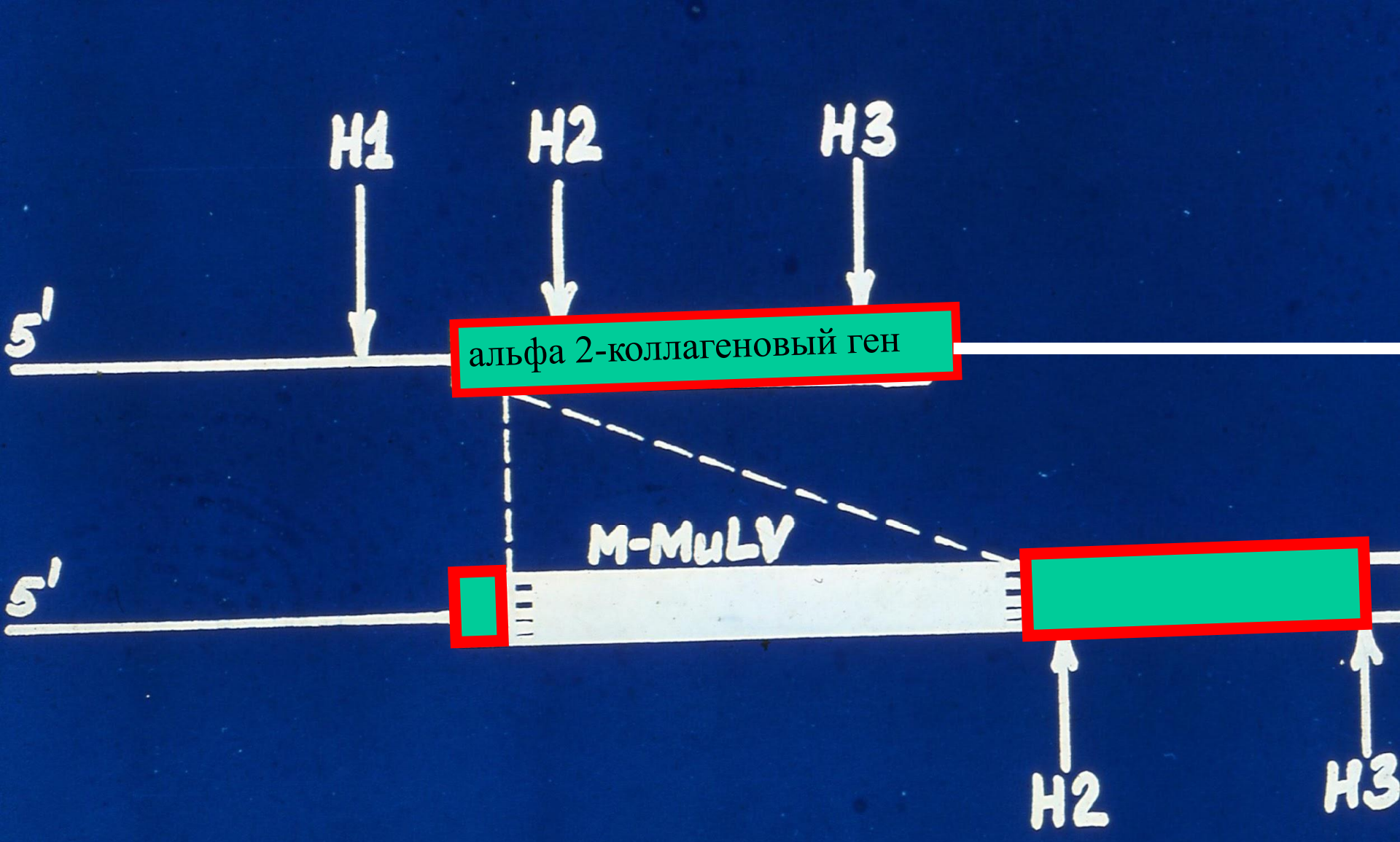
Секвенирование «спасенного» фрагмента

Инсерционные мутации в «классических» локусах у трансгенных мышей

Локус	Фенотип
dystonia	Слабость мышц
hotfoot	Нарушение поведения
hairless	Дезорганизация волосяных фолликул
twitcher	Тремор
extra toes	Аномальный морфогенез
limb deformity	Нарушение развития конечностей

Инсерционные мутации у трансгенных мышей в ранее неизвестных локусах

Локус	Фенотип
Wocko	Аномальное развитие вестибул. системы
motor neuron disease 2	Дегенерация моторных нейронов
RB3	Остановка развития на 5 день
Cola-1	Гибель на 12-ый день развития
MMov-34	Гибель во время имплантации



Линия мышей Mov-13

(гомозиготы погибают на 12-ые сутки развития)

Трансгеноз и сельскохозяйственные животные

Трансгенные с/х животные с измененными свойствами

Трансген	Промотор	Животное	Новое свойство
Гормон роста	МТ	Свинья	Ускоренный рост тела
Инсулинподобный фактор роста	Кератин	Овца	Ускоренный рост волос
Фитаза	Амилаза	Свинья	Пониженное содержание фосфора в навозе
Антисенс-РНК ЦМВ	Кролик	Устойчивость к вирусу к вирусу лейкоза	вируса лейкоза КРС
Нокаут гена приона	-	Овца	Устойчивость к вирусу скрепи
CD59/hDAF/hMCP	ЦМВ	Свинья	Улучшение ксенотрансплантации
β- и к-казеины	Казеин	Корова	Улучшение свойств молок
siРНК к β-лактоглобулину	тРНК	Корова	Гипоаллергенное молоко

Трансгенные животные – биореакторы

Трансген	Промотор	Животное
Фактор крови IX	α- лактоглобулина	Овца
Фактор крови VIII	α- лактоглобулина	Овца
Лактоферрин	α-казеина	Корова
Активатор плазминогена	белка сыворотки	Коза
α1-антитрипсин	β-лактоглобулина	Овца
Интерлейкин 2	β-казеина	Кролик
Антитромбин III	β-казеина	Овца
α-глюкозидаза	S1-казеина	Кролик
Белок С	WAP	Свинья
Альбумин	WAP	Овца
Фибриноген	β-лактоглобулина	Овца
α-фетопротеин	β-казеин	Коза
ГМСФ	*β*-казеин	Коза

"Фарминг" - фармакологическая фабрика на ферме

ПОДСЧИТАНО:

- Белок С - предотвращает образование тромбов и необходим при инфаркте, инсульте, тромбофлебите и т. д. Продуктивная корова дает в год 10 тонн молока. Если с помощью трансгеноза концентрация белка С в молоке будет составлять 2 г/л, а эффективность очистки - 50%, то стадо из десятка коров обеспечит этим лекарством всех нуждающихся.

- «Фактора Кристмаса» (F-IX) - белка, который запускает каскадный механизм свертывания крови (по $40 тыс. за грамм). Еще один фактор свертывания крови, F-VIII, в пересчете на грамм обойдется в $2,9 млн.! Обеспечить каждым из этих белков всех гемофиликов земли может всего десяток трансгенных буренок.

Опасны ли генетически модифицированные продукты?

1. Не следует пугаться слов «генетически модифицированный» – все живое в природе постоянно подвергается изменениям такого рода. Человек, в данном случае, просто выступает в качестве «руководителя» и «ускорителя» – остается только уповать на его разумность.

2. Чужеродные гены **из пищи** ни при каких условиях не могут быть встроенными в геном организма и привести к мутациям.

3. Аллергия и другие возможные побочные эффекты не подтверждены экспериментально, они скорее могут быть вызваны немодифицированными продуктами питания.

4. Существует более строгий контроль на использование генетически модифицированной пищи, чем обычной.

Официальное заключение

По данным AAAS (2012 г.), Европейский Союз потратил на исследования биобезопасности ГМ-организмов более 500 миллионов евро, и основной вывод, изложенный в последнем докладе ЕС, гласит: "биотехнология, и в частности, генетическая модификация сама по себе не более рискованна, чем обычные методы селекции растений".

Заключение сделано по результатам 130 исследовательских проектов, выполняемых на протяжении 25 лет 500 независимыми группами ученых.

Официальное заключение

По данным AAAS (2012 г.), Европейский Союз потратил на исследования биобезопасности ГМ-организмов более 300 миллионов евро, и основной вывод, изложенный в последнем докладе ЕС, гласит: "биотехнология, и в частности, генетическая модификация сама по себе не более рискованна, чем обычные методы селекции растений". Заключение сделано по результатам 130 исследовательских проектов, выполняемых на протяжении 25 лет 500 независимыми группами ученых.