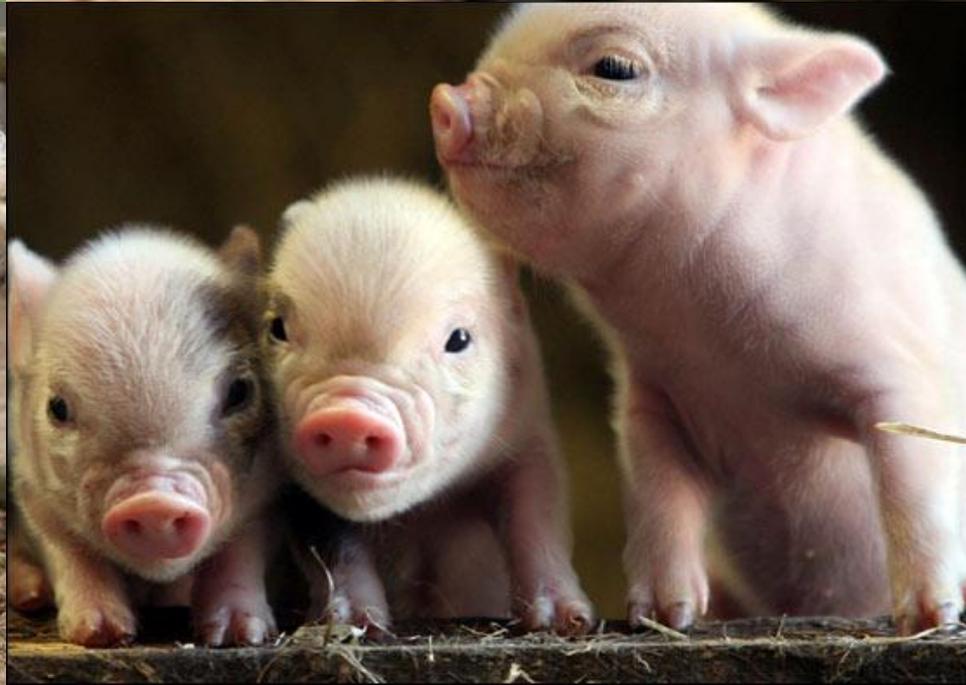


Оцените перспективы технологии клонирования (перенос ядра соматической клетки) в медицине.

Трансгенез

Всё началось с
селекции...











Селекция имеет свои ограничения





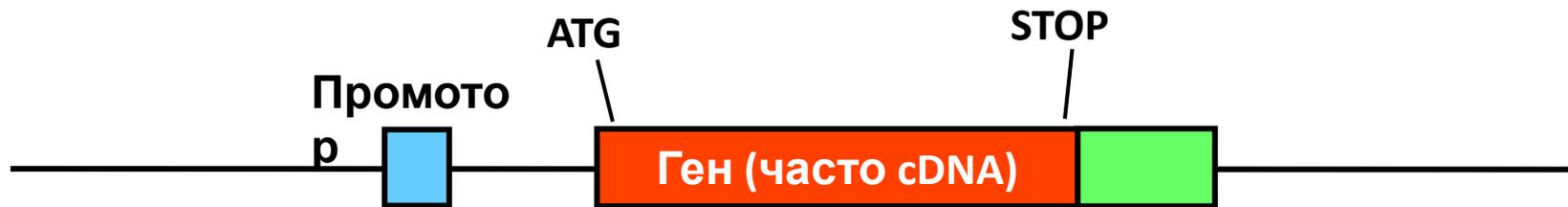


They also have an increased ability to convert food into lean muscle, rather than fat - something that could revolutionise the future of beef production.



Из чего состоит трансген?

минимальная комплектация

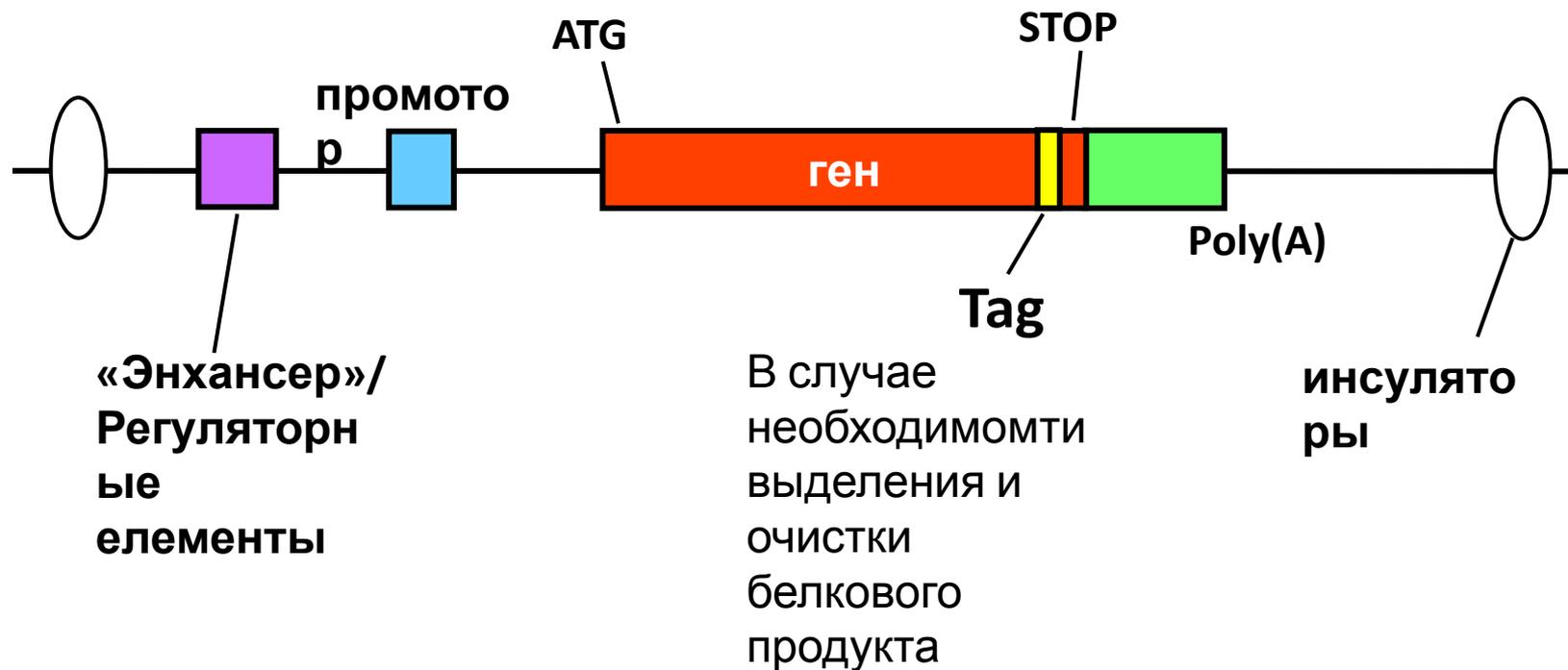


Сигнал полиаденилирования
Poly(A)/
Отвечает за стабильность
транскрипта



Из чего состоит трансген?

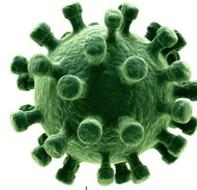
стандартная комплектация



Из чего состоит трансген? Комплектация люкс

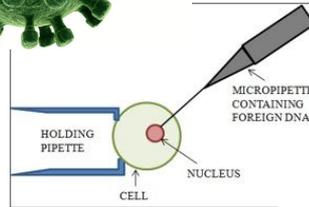


Gene Delivery into Mammalian Cells:



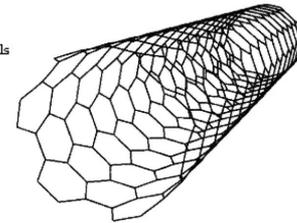
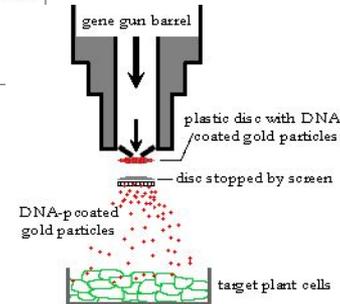
Biological methods

- Recombinant Viruses



Mechanical Methods

- Microinjection
- Particle Bombardment
- Single-Walled Carbon Nanotubes



Physical Methods

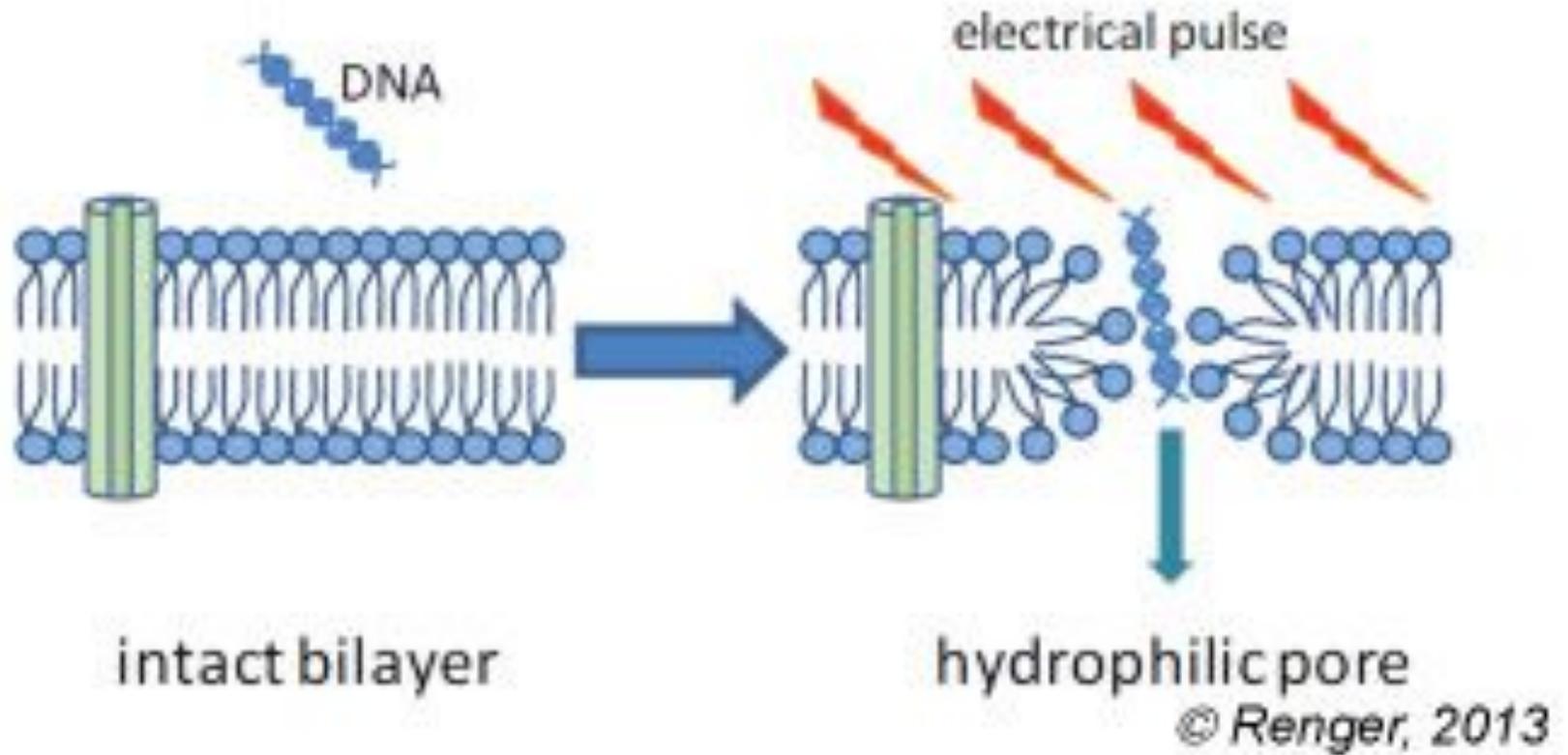
- Electroporation Techniques
- Laser-Beam-Mediated DNA Delivery

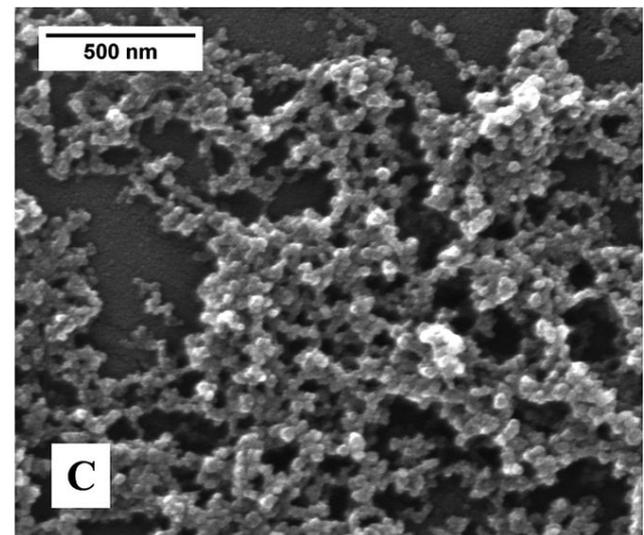
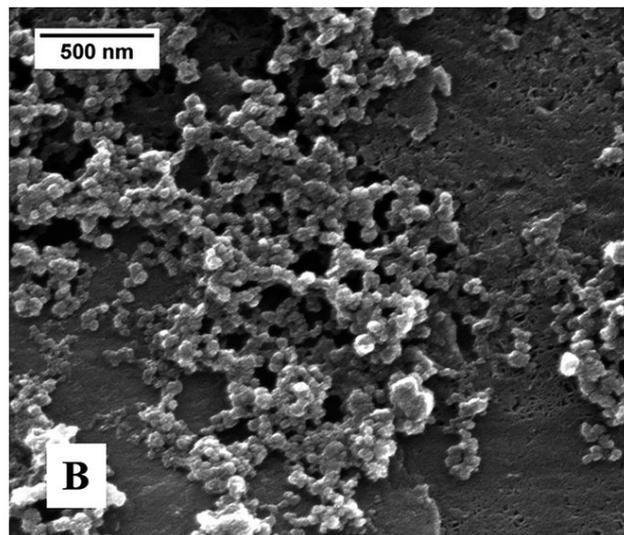
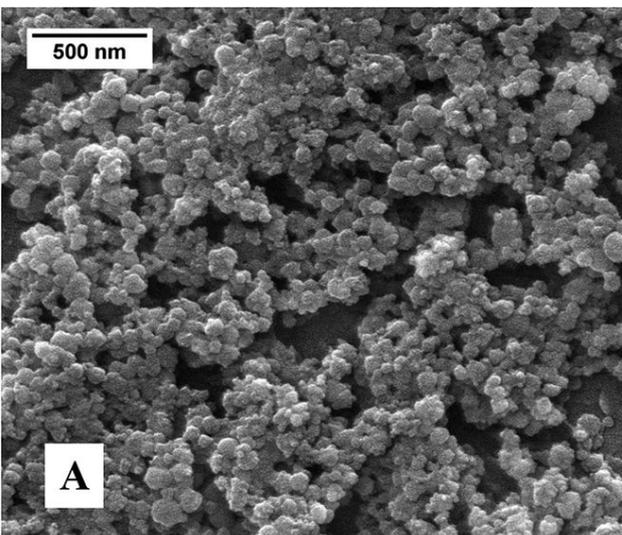


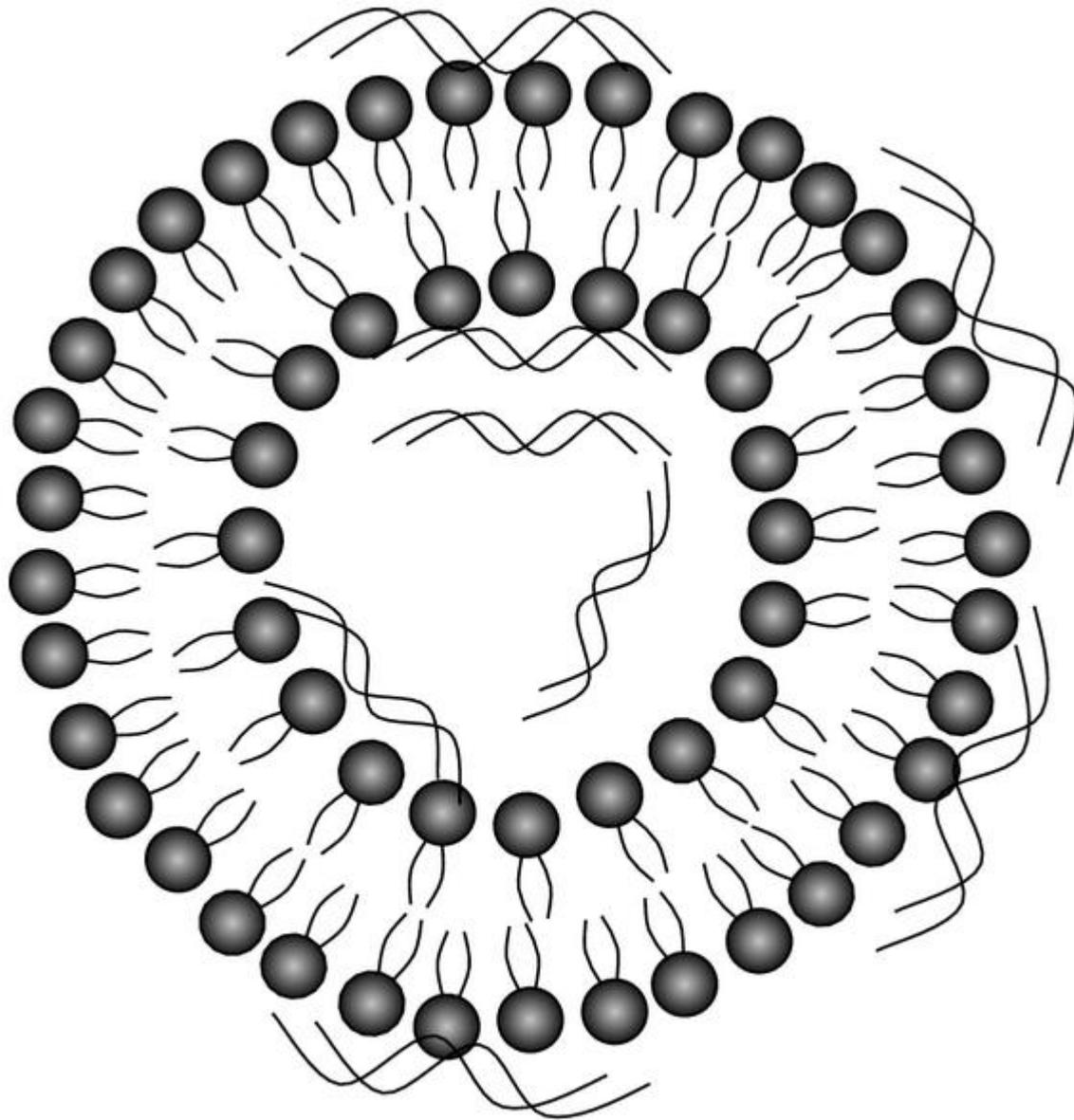
Chemical Methods

- Calcium phosphate method
- Liposomes
- Polymers polyethylenimines (PEIs)

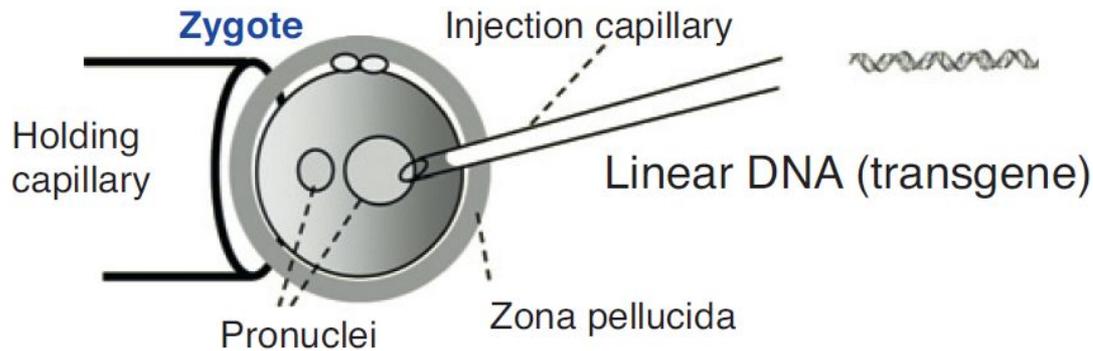
DNA electroporation





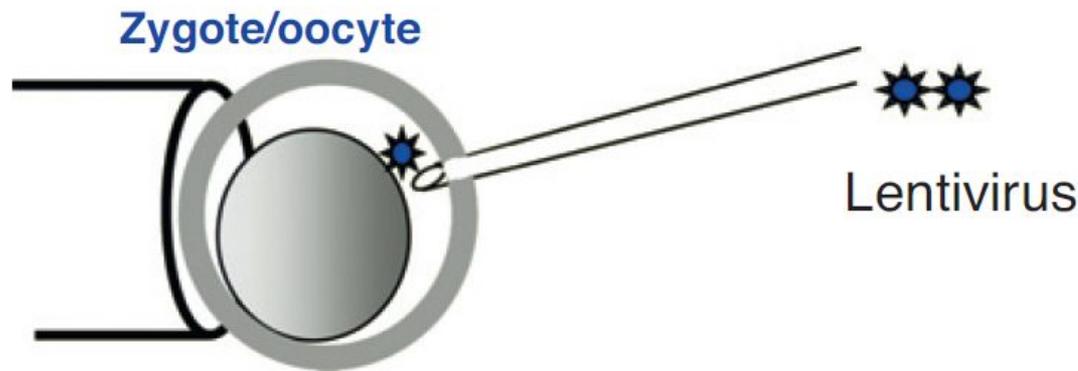


DNA-liposome



Пронуклеарная
микроинъекция

Эффективность 1-5 %



Лентивирусная инфекция
Эффективность до 90 %,
Но часто много интеграций,
причем в активные гены. В
следующем поколении часто
трансен
инактивируется

Oocyte



“DNA loaded” spermatozoon

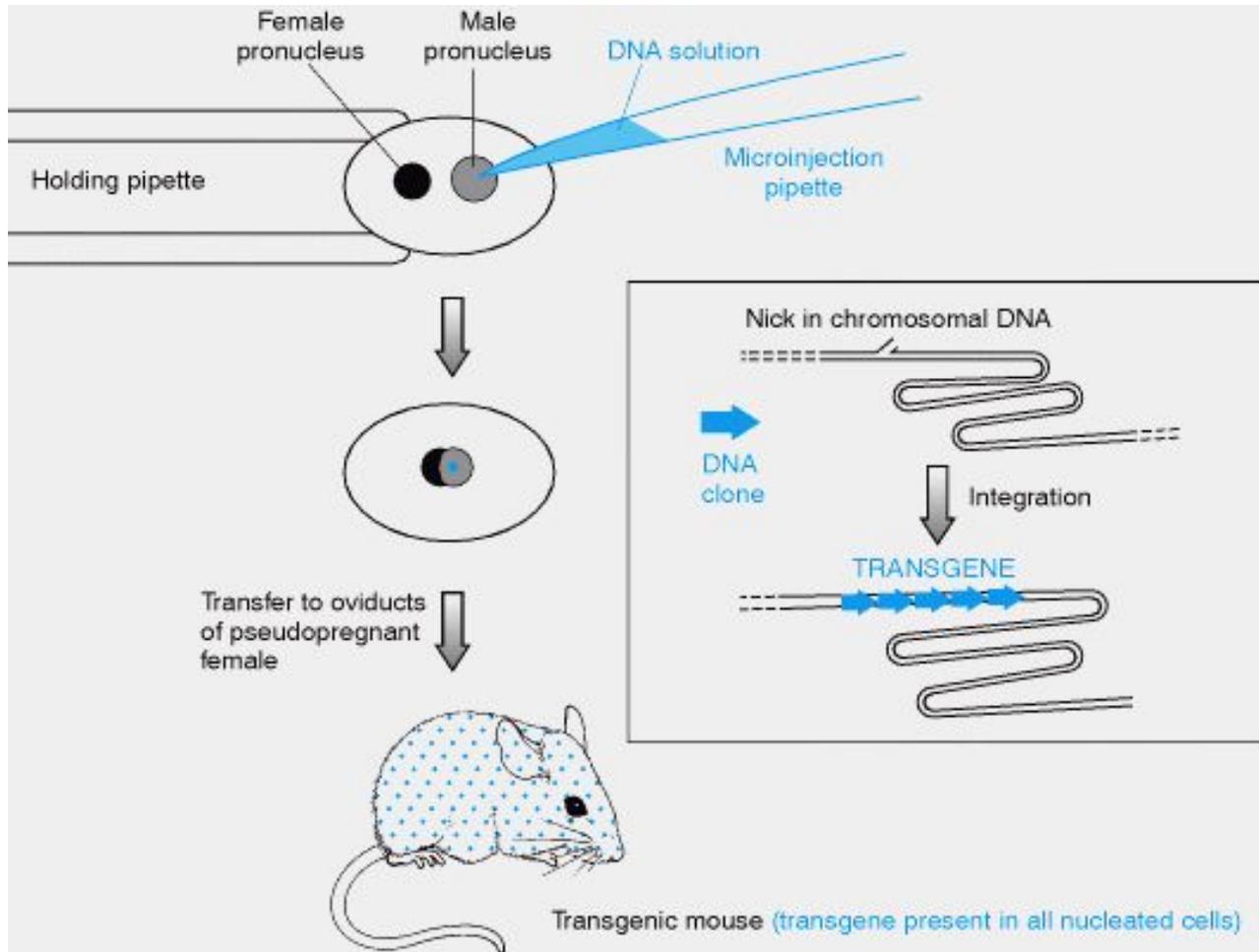
Сперматозоид в качестве
вектора доставки

Эффективность около 1-5 %

Толщина
волоса

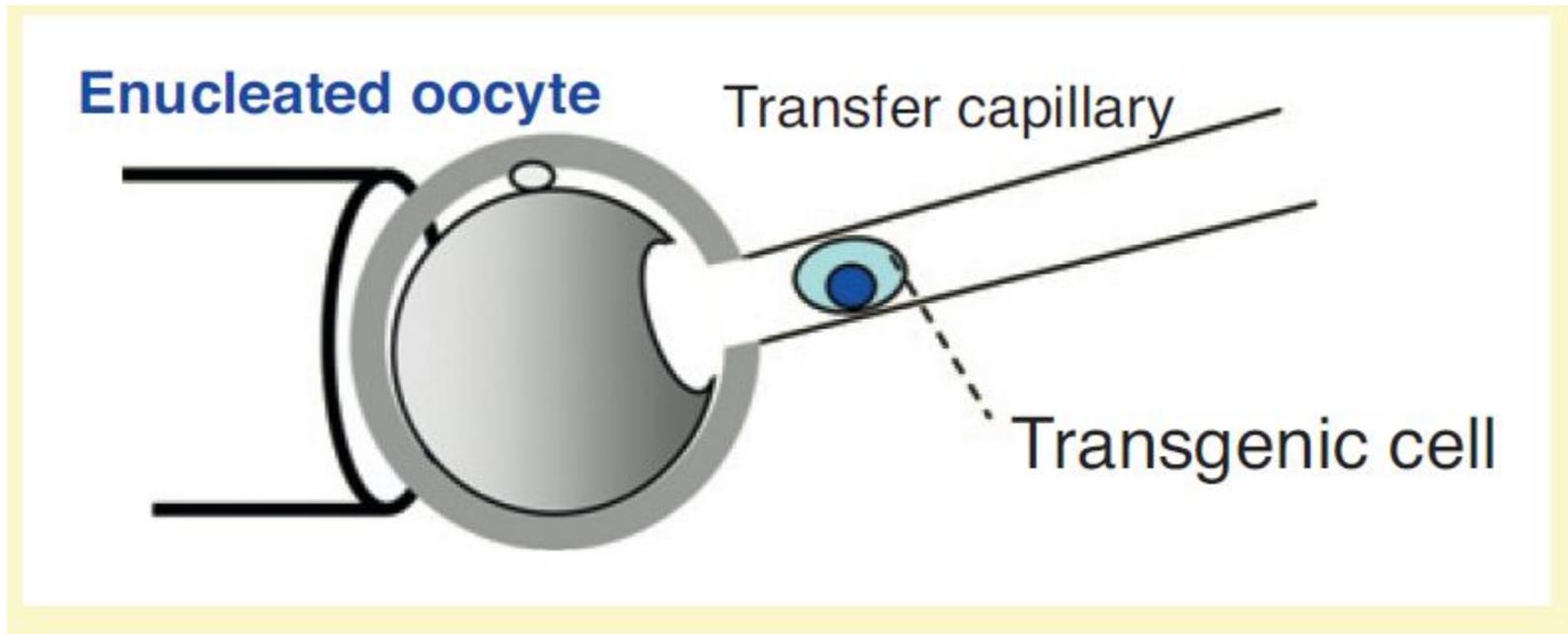


Пронуклеарная микроинъекция приводит к встройке тандемного повтора из трансгенов в непредсказуемый локус генома



Клонирование

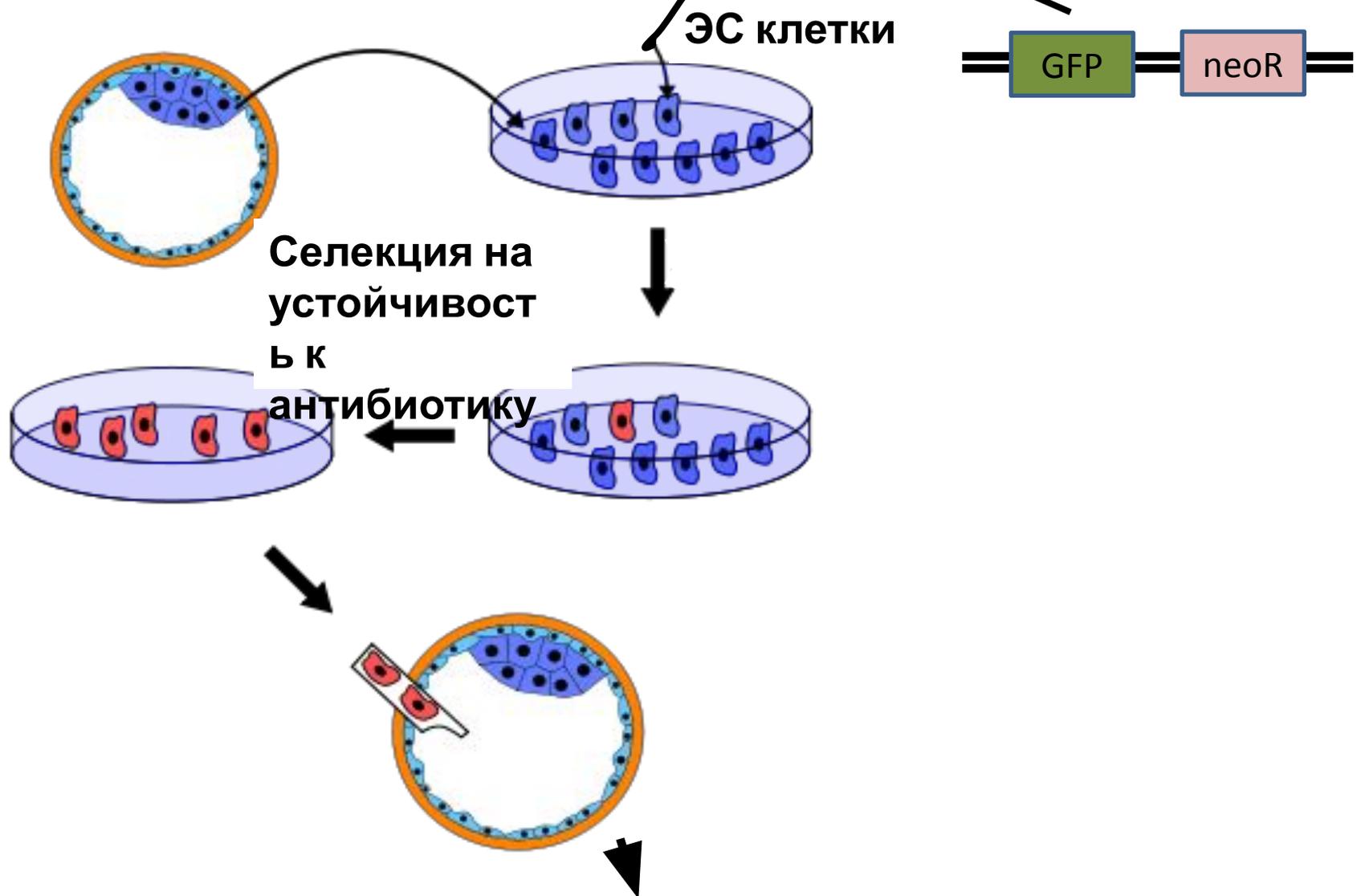
В качестве доноров ядер используется культура трансгенных клеток



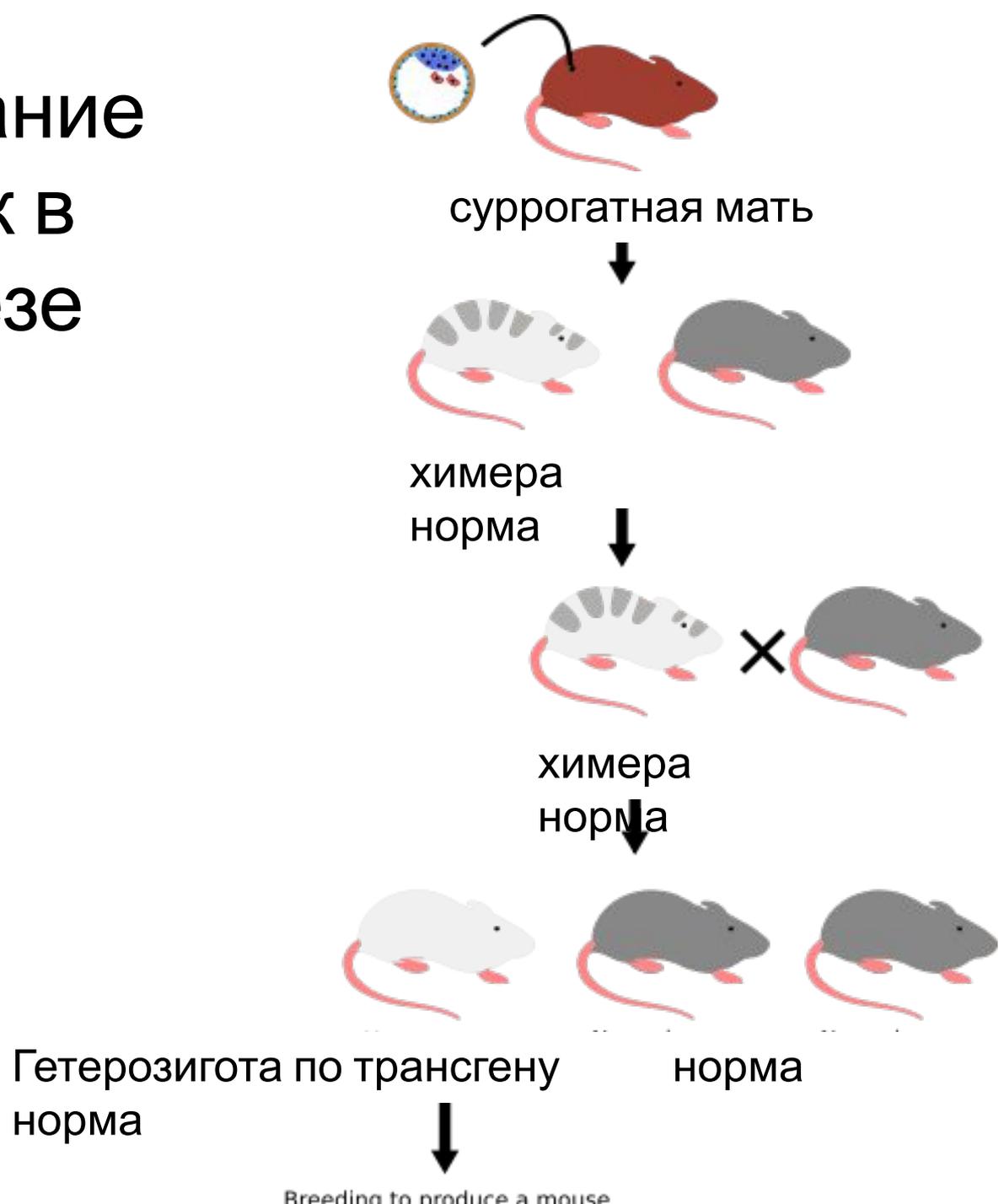
Эффективность трансгенеза – 100%!
(все родившиеся животные будут трансгенными)

Искусственному отбору тысячи лет, почему первое трансгенное животное появилось только в 1974?

Использование ЭС клеток в трансгенезе

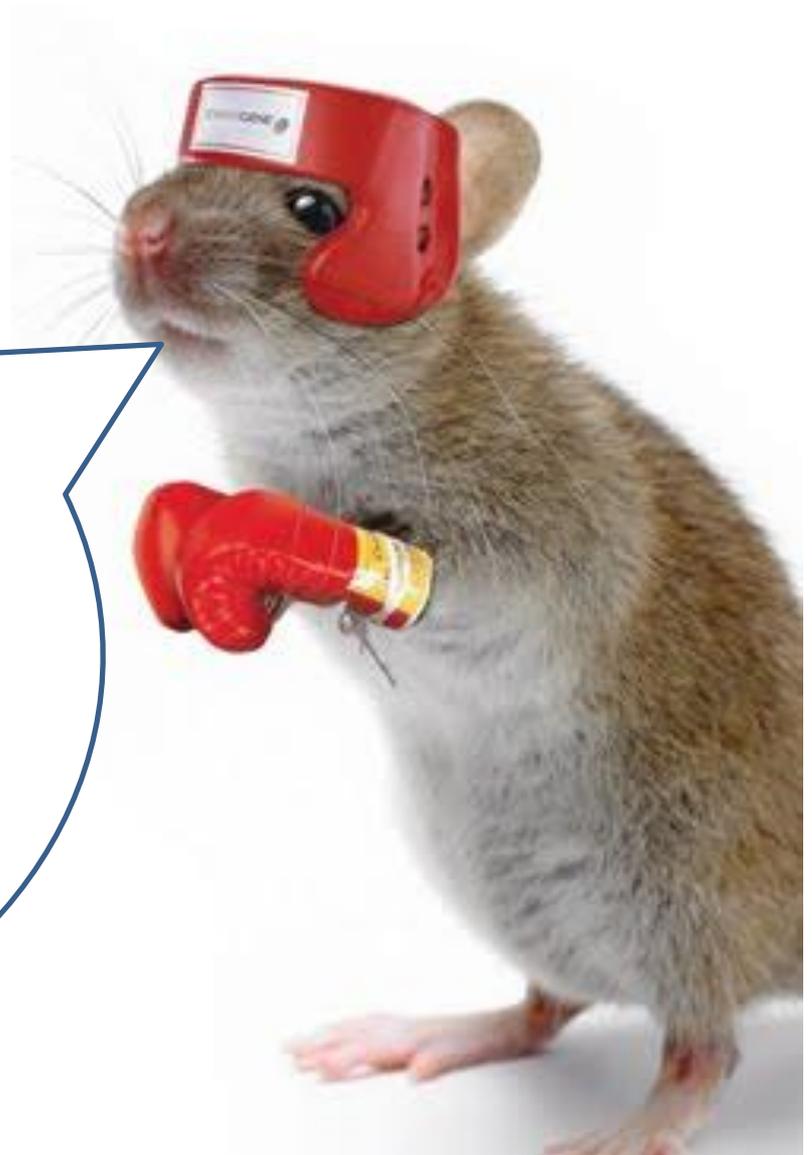


Использование ЭС клеток в транспозировании



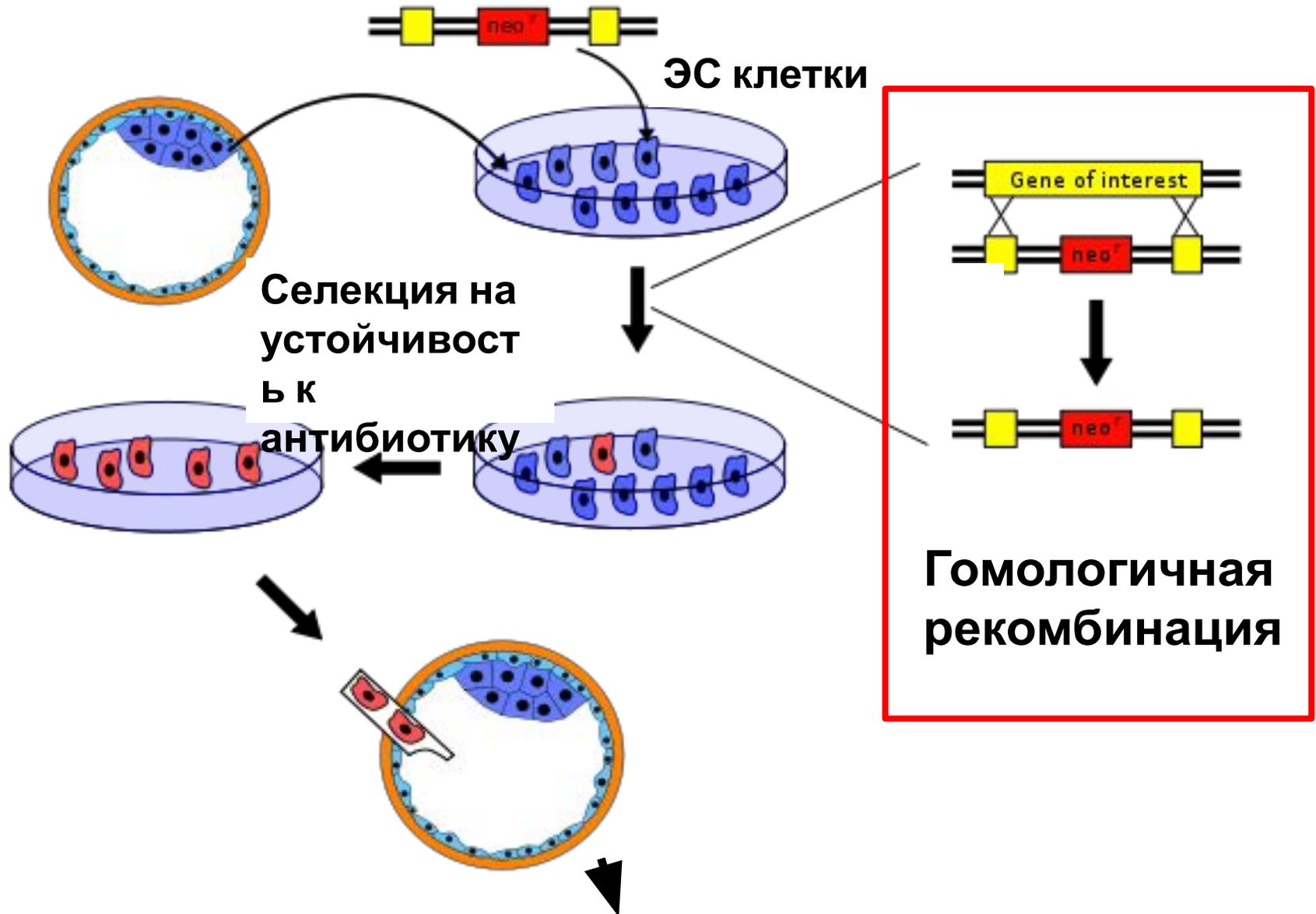
Генный нокаут (knockout)

это метод молекулярной генетики, позволяющий удалить полностью или сделать неработоспособными определенные гены.

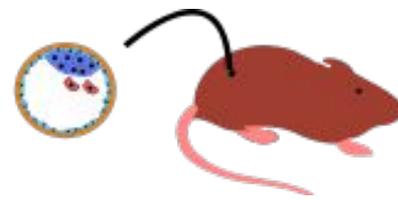


Генный нокаут (knockout)

принципиальная схема



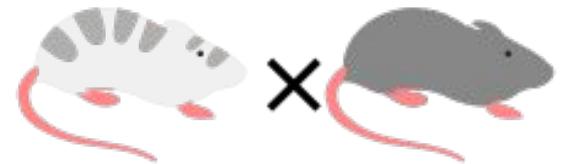
Генный нокаут (knockout)



суррогатная мать



химера
норма



химера
норма



Гетерозигота по нокауту
норма

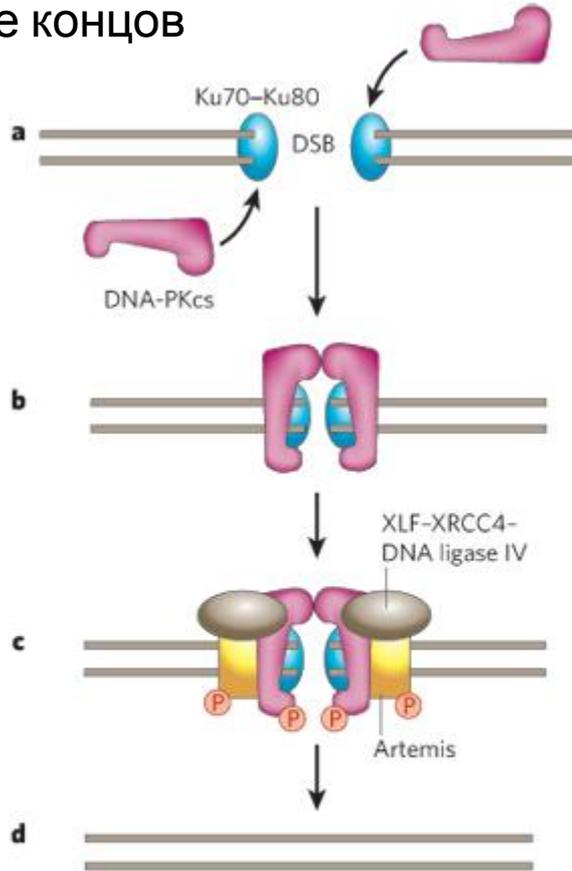
норма

Breeding to produce a mouse

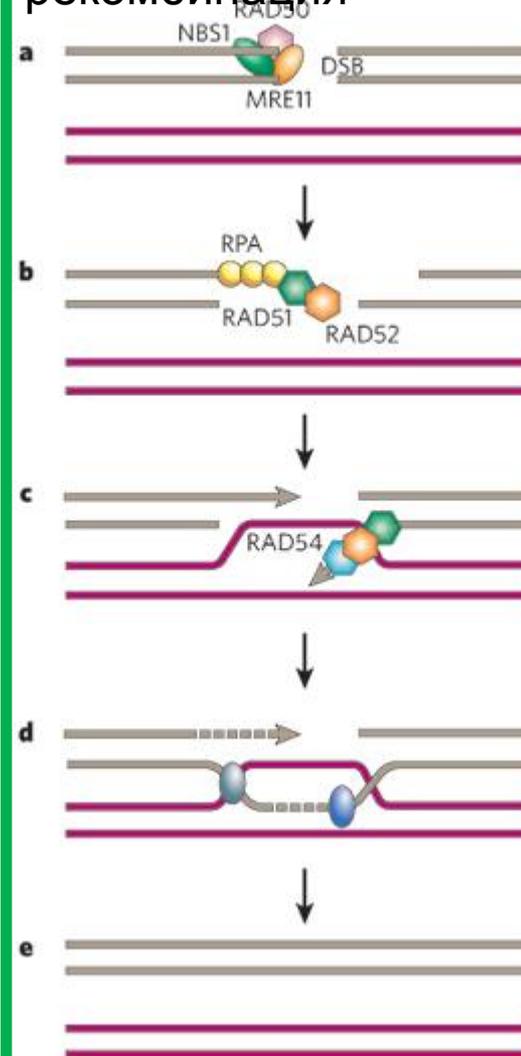
Почему чужеродная ДНК
вообще встраивается в
геном?

Два основных пути репарации двухцепочечных разрывов ДНК у эукариот

Негомологичное соединение концов



Гомологичная рекомбинация



Два основных пути репарации двухцепочечных разрывов ДНК у эукариот

Негомологичное
соединение концов

VS

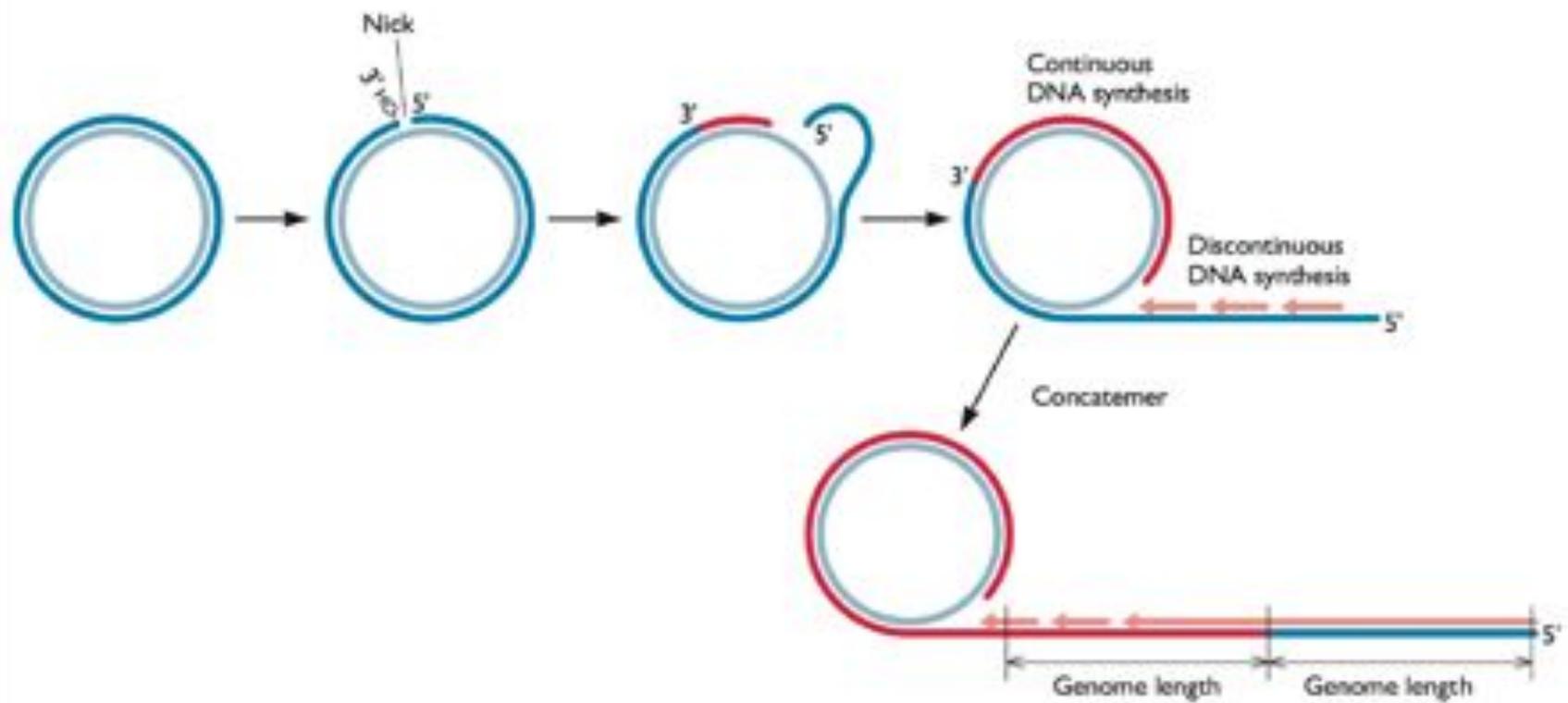
Гомологичная
рекомбинация

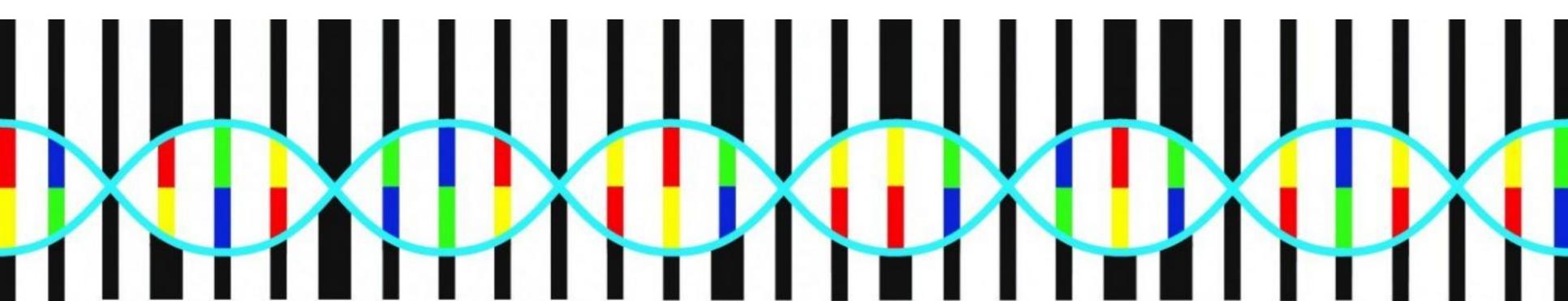
конкуренция за связывание с разрывом

белков системы «Негомологичного соединения концов» в клетке больше, поэтому они чаще выигрывают эту битву. В итоге на одно событие гомологичной рекомбинации приходится 1000 - 10000 событий «Негомологичного соединения концов». Увы.



Rolling circle replication



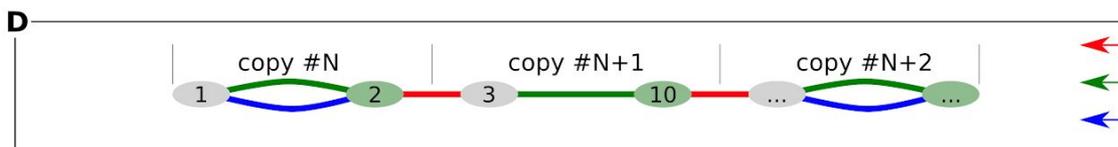
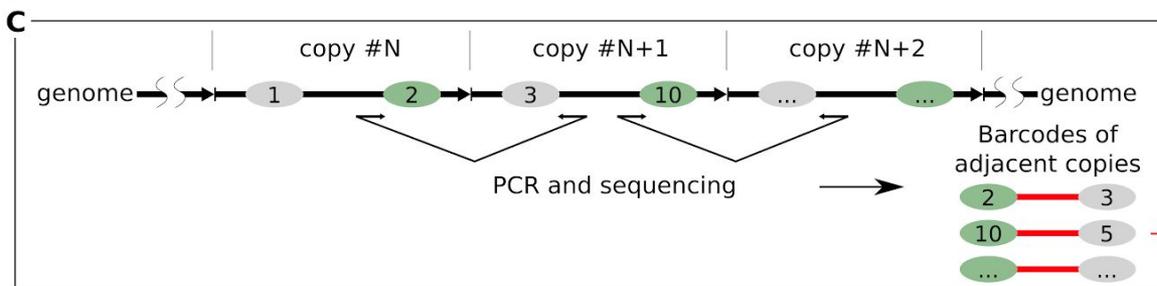
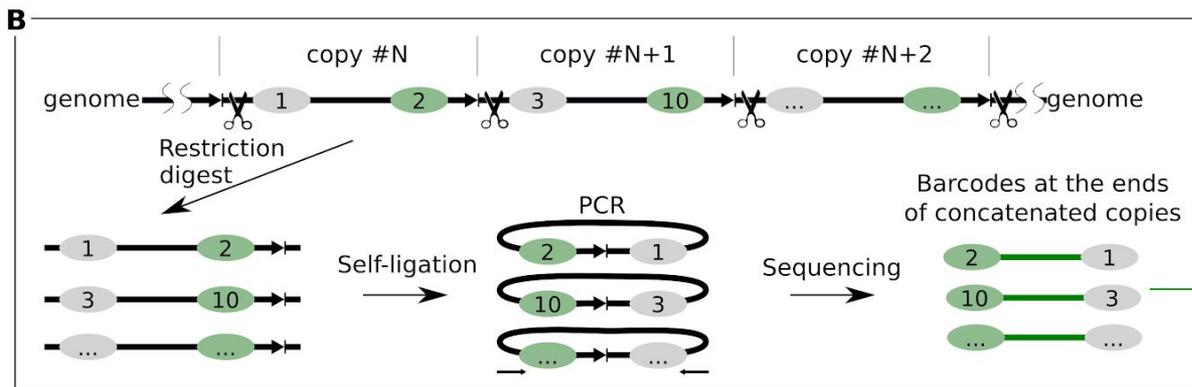
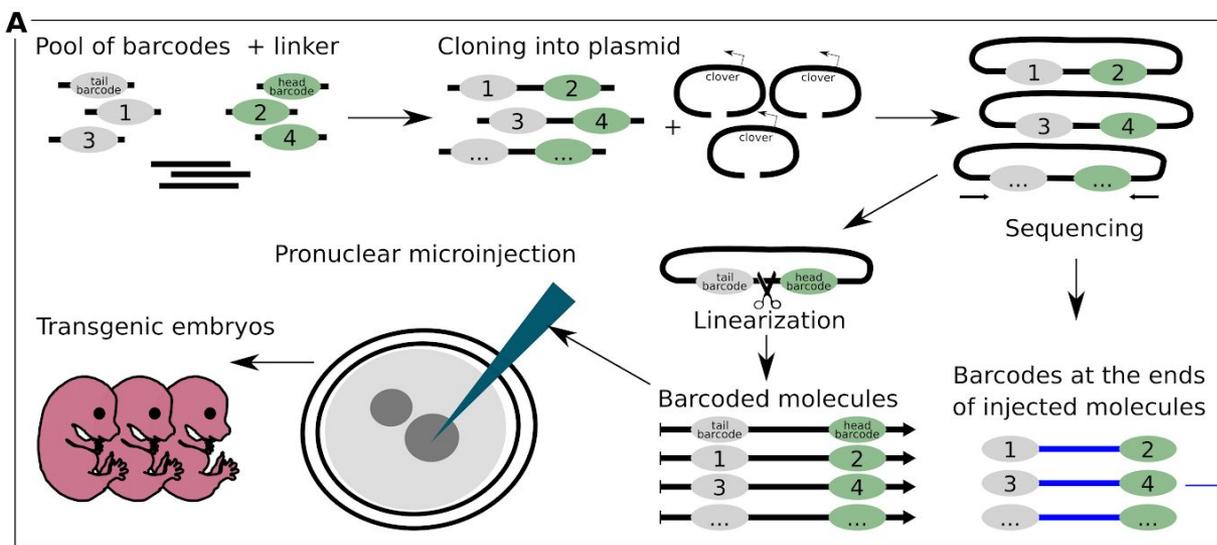


DNA BARCODING





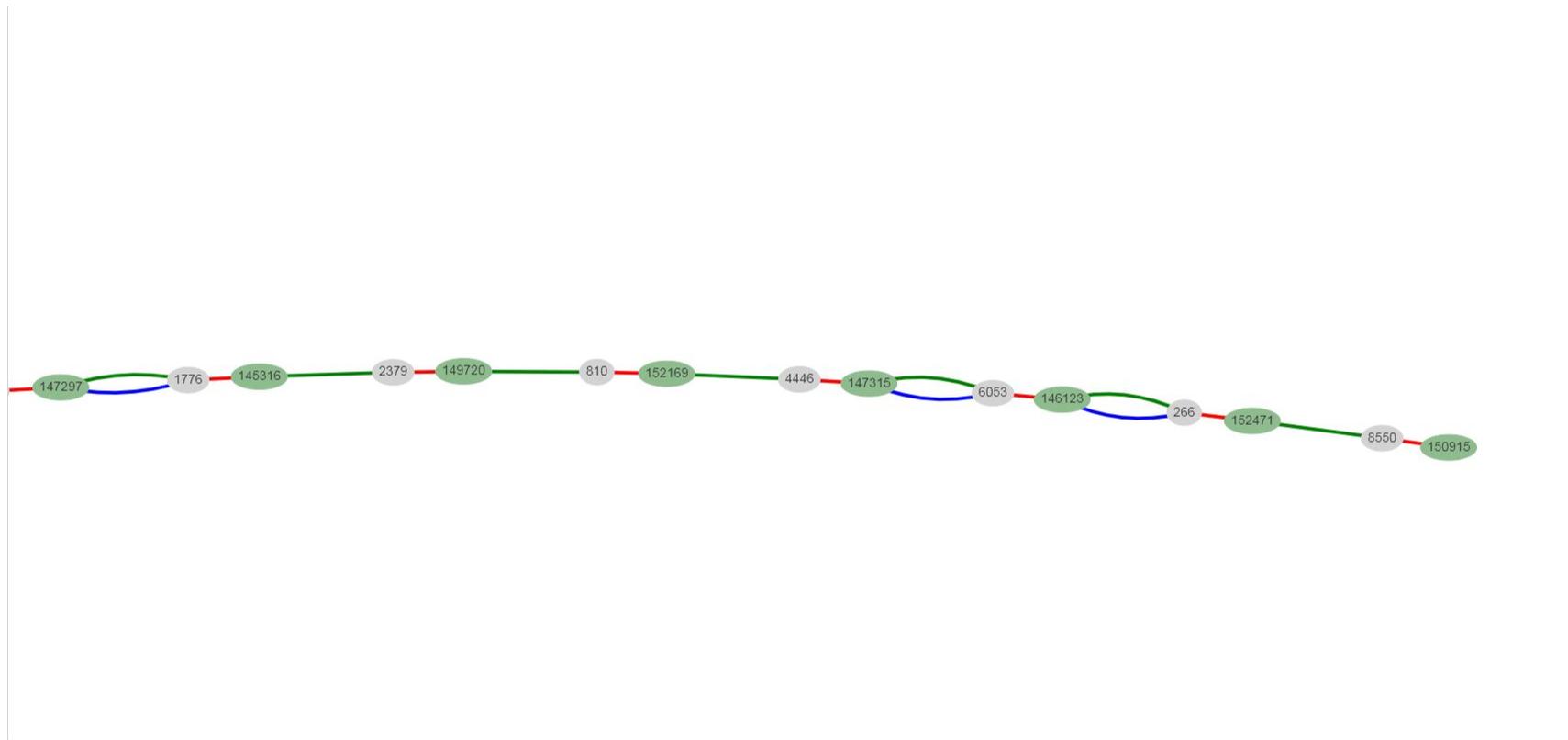
Давай. Вошли и вышли, приключение
на 20 минут.

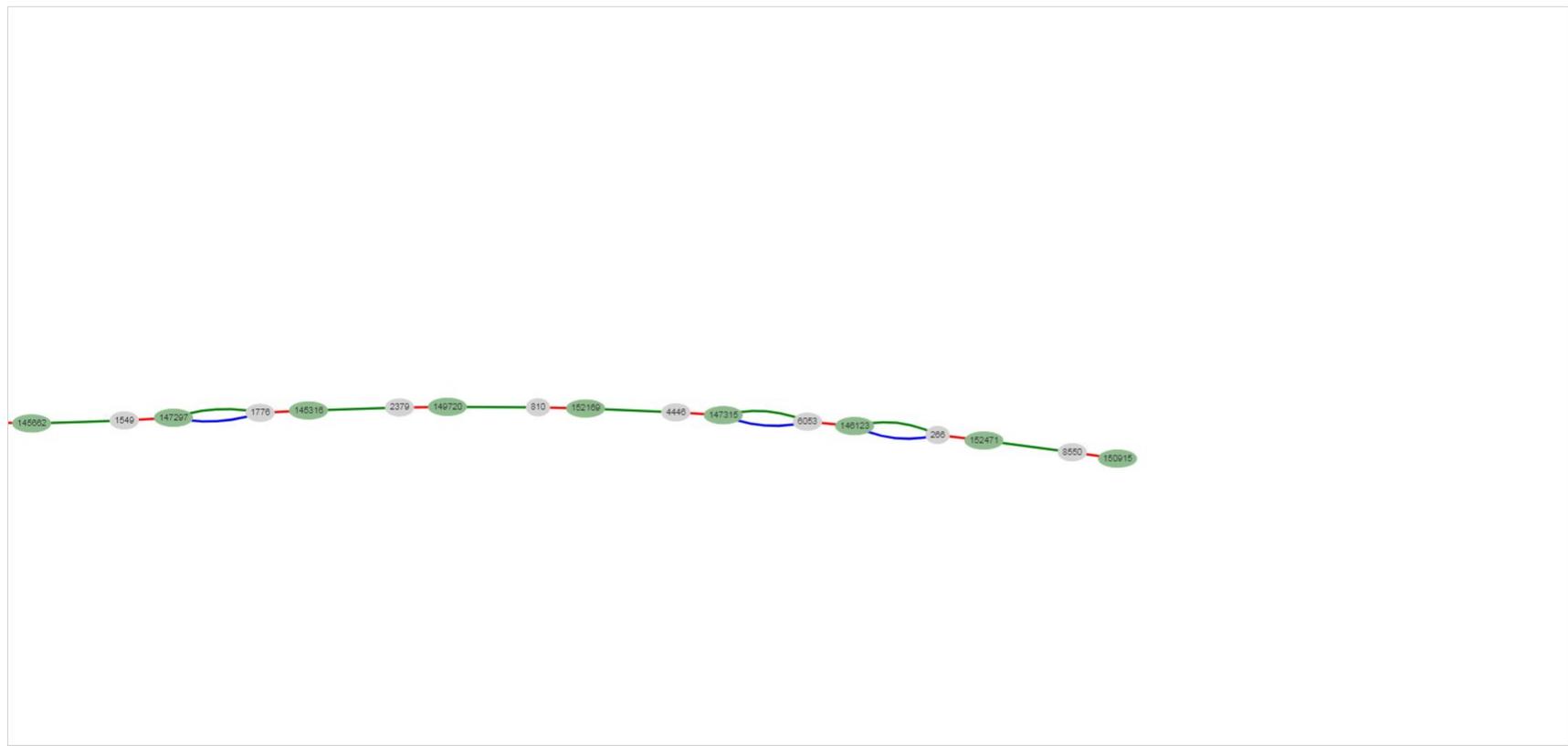




VS





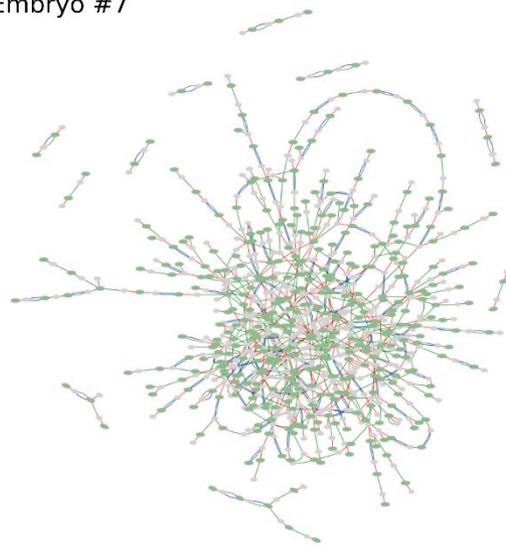




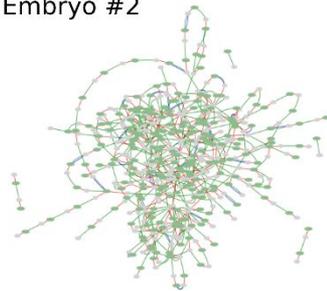




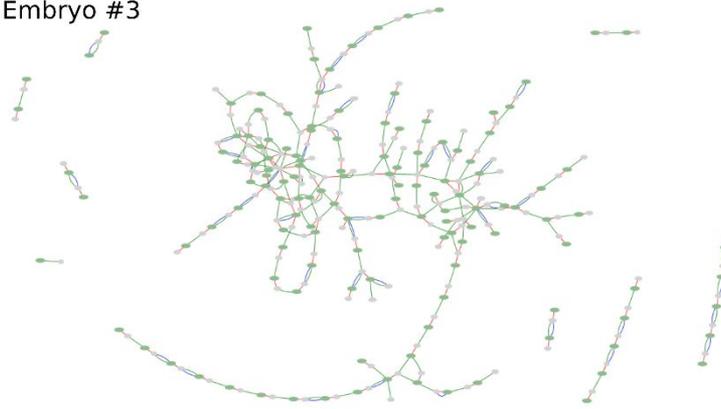
Embryo #7

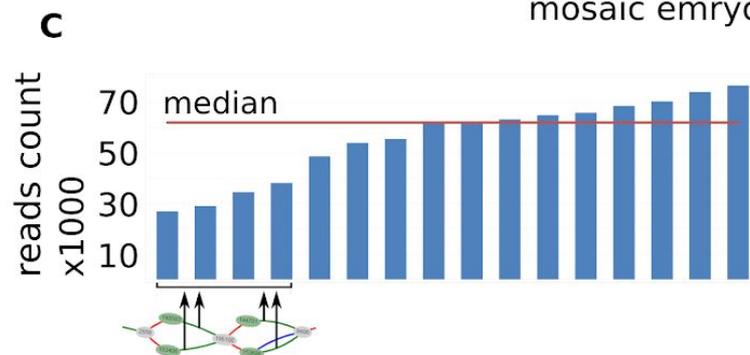
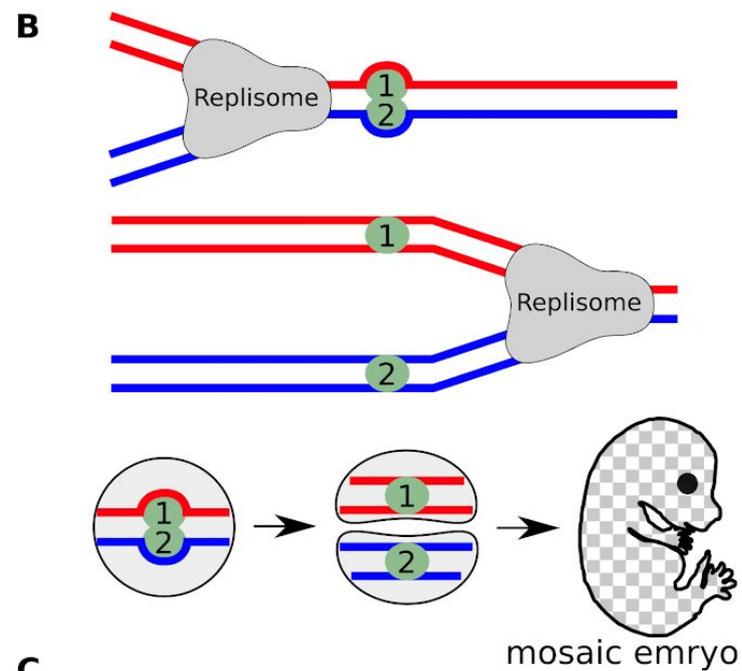
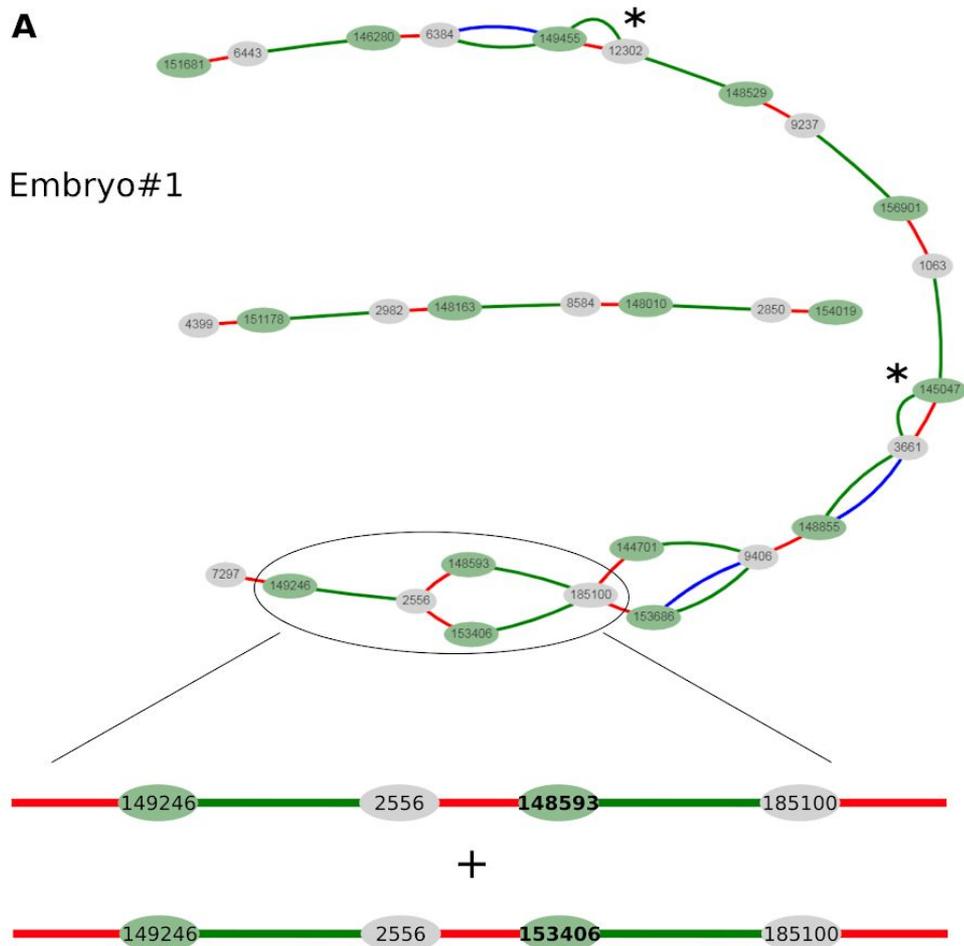


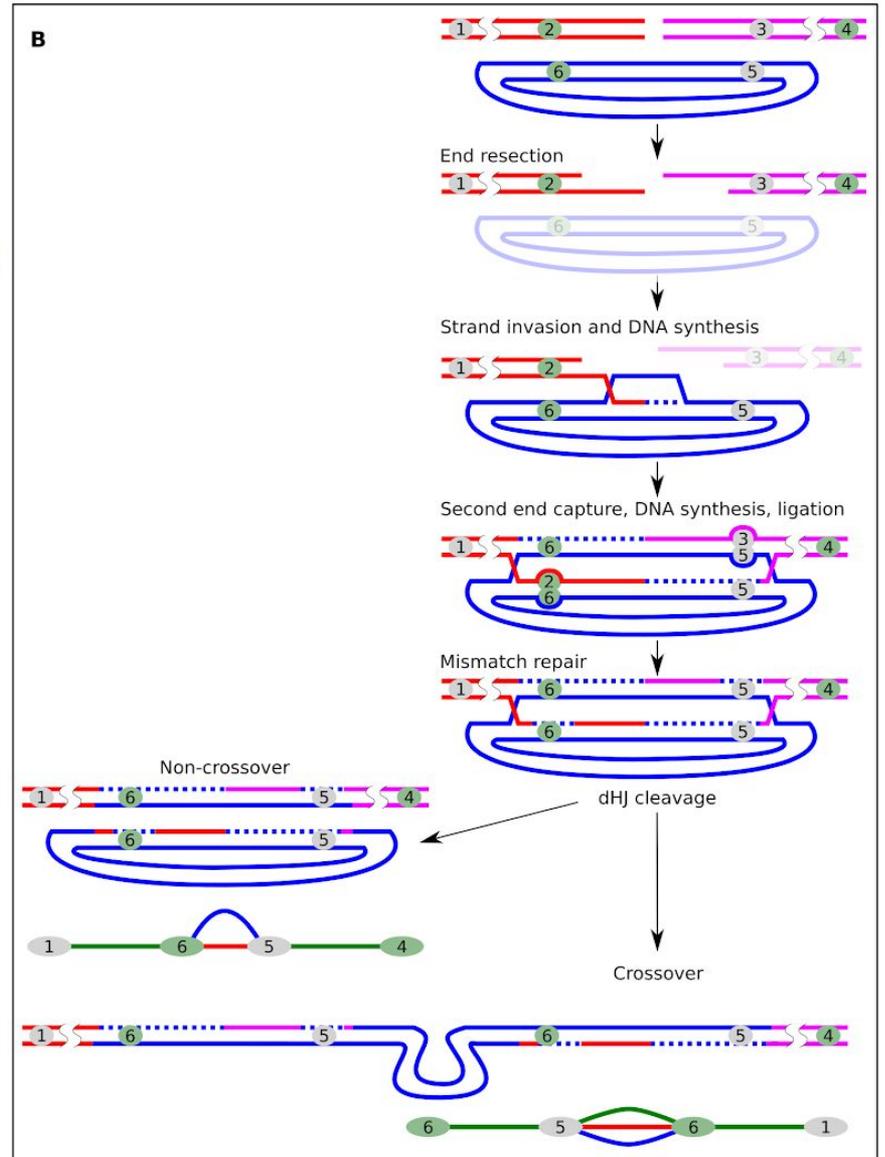
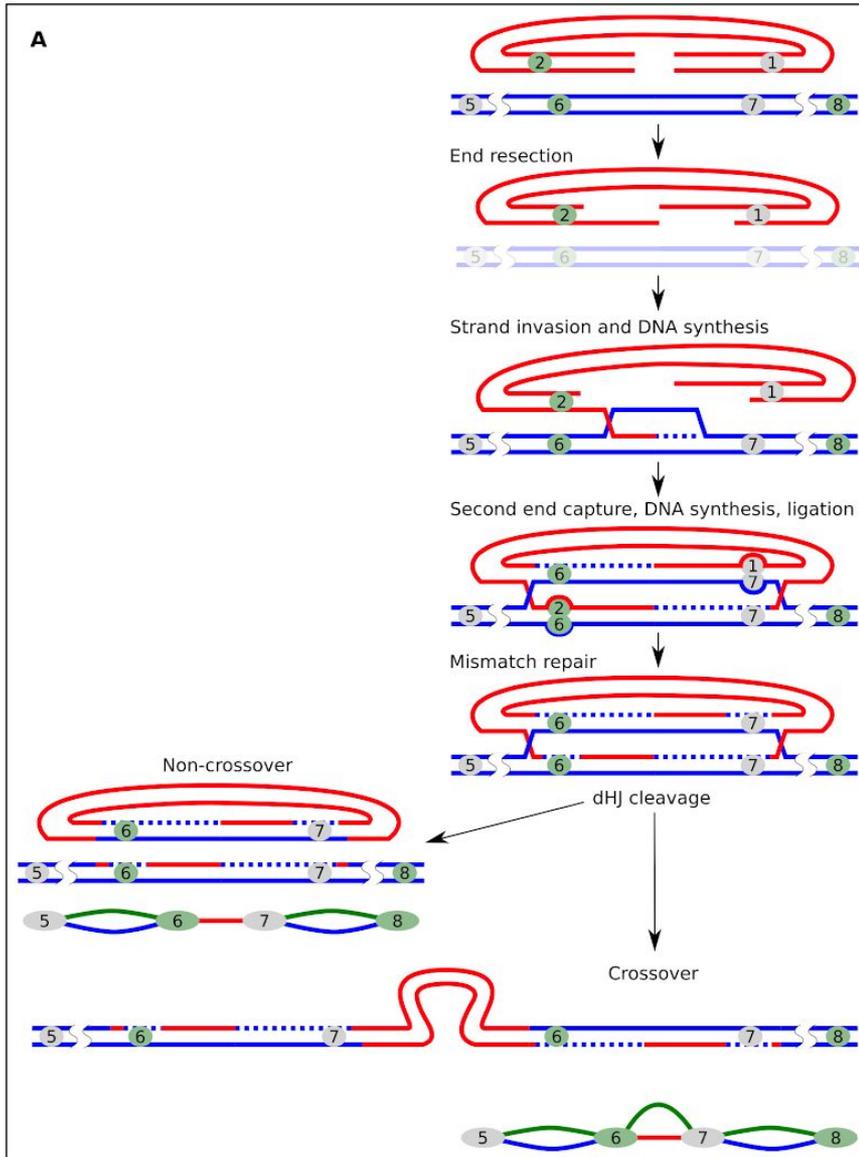
Embryo #2



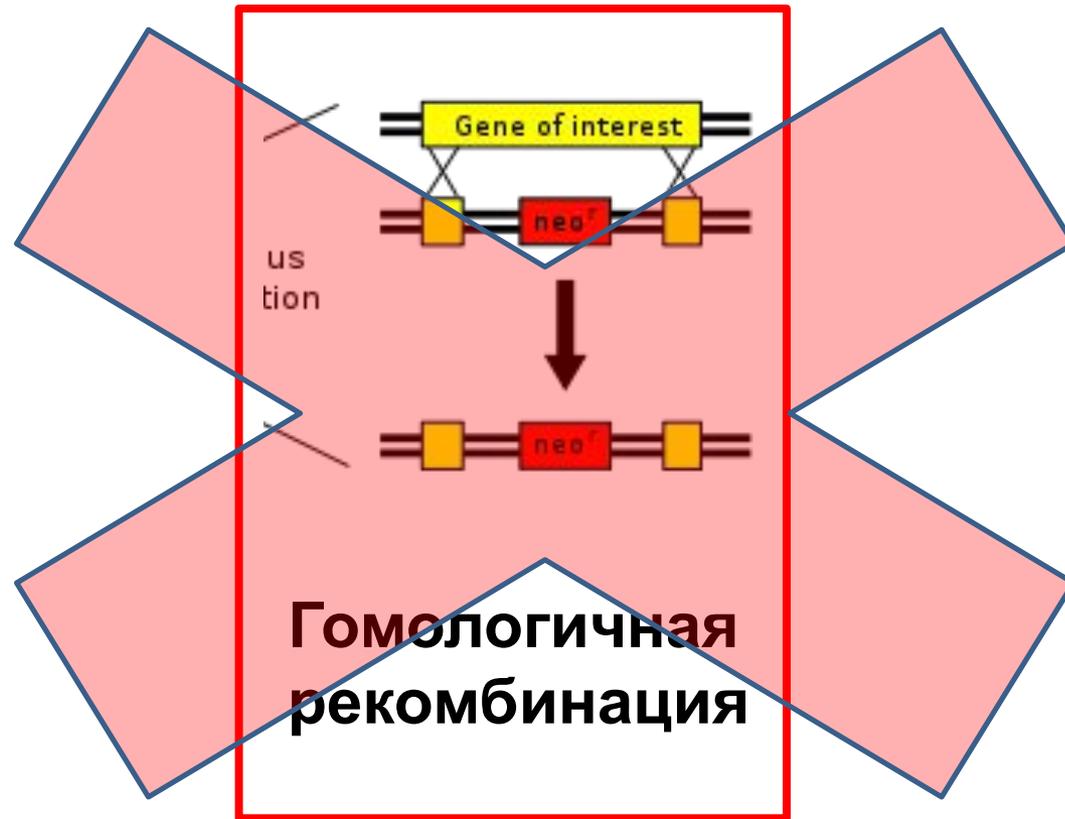
Embryo #3







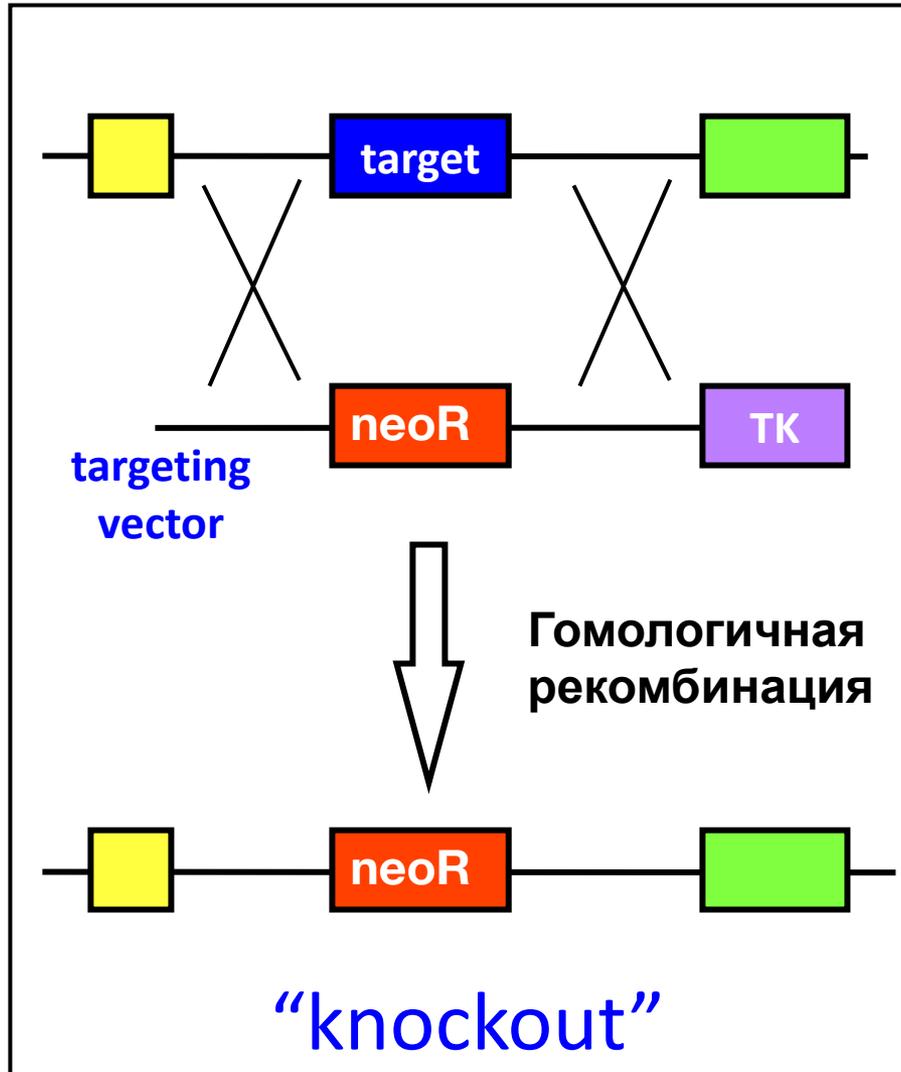
Генный нокаут (knockout) реальная схема



Системы положительной селекции по резистентности к антибиотику не достаточно

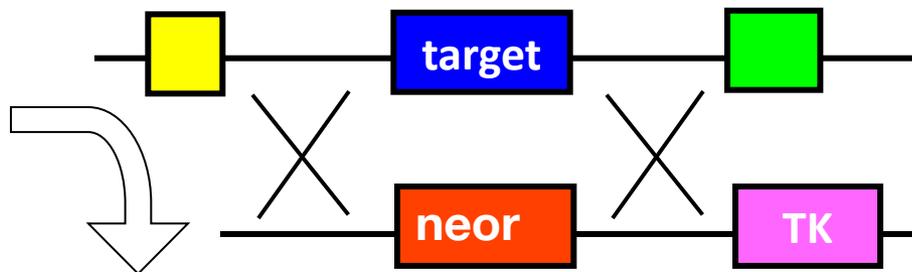
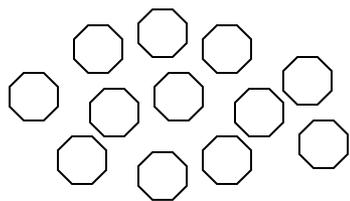
Генный нокаут (knockout)

реальная схема



- ген тимидин киназы
вируса герпеса

ЭС
клетки



Случайная
инсерция
трансгена

Не
рекомбинантные
клетки

Knockout клетки

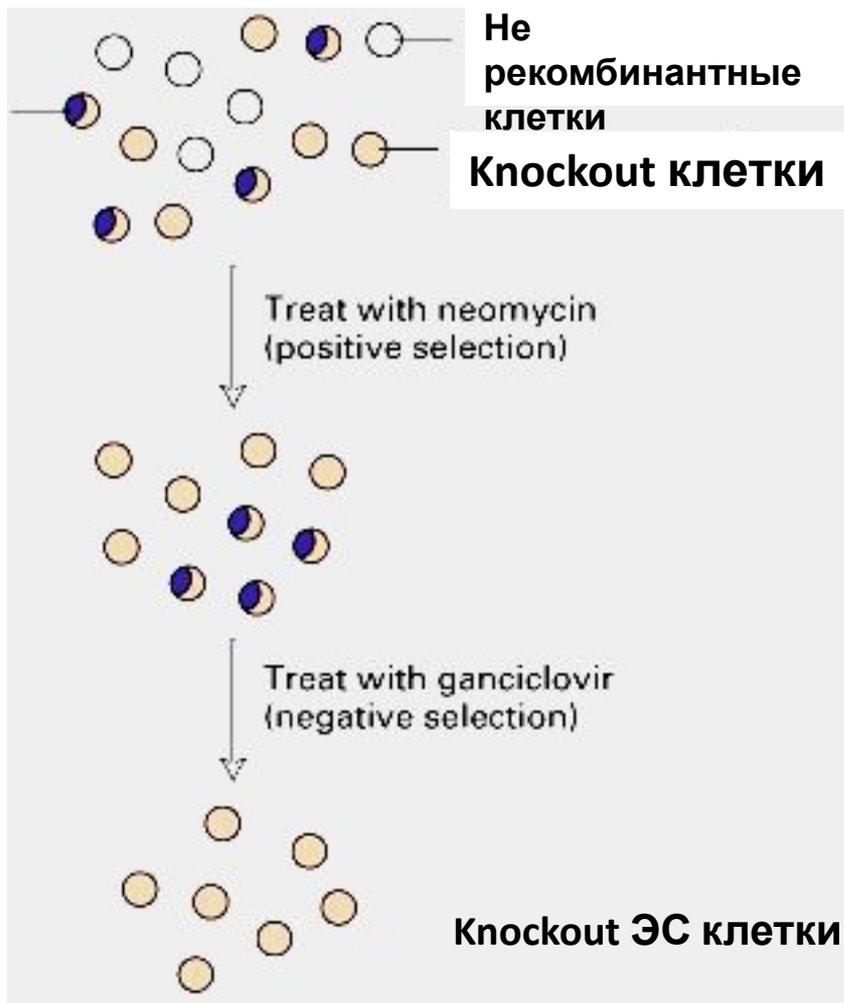
+ Селекция на
устойчивость к
антибиотику

Treat with neomycin
(positive selection)

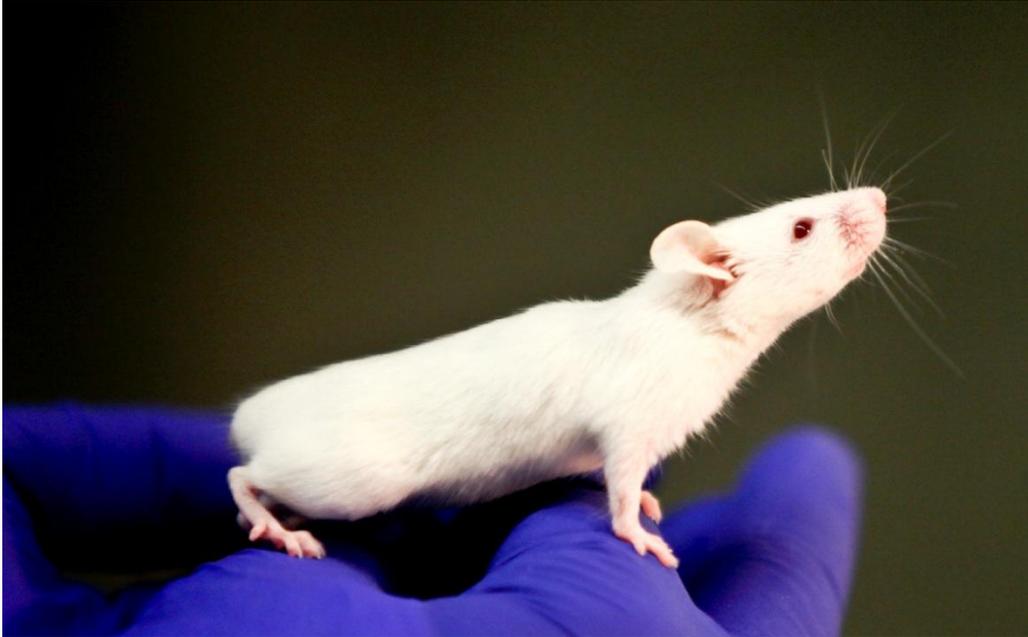
- Селекция на
устойчивость к
ганцикловиру

Treat with ganciclovir
(negative selection)

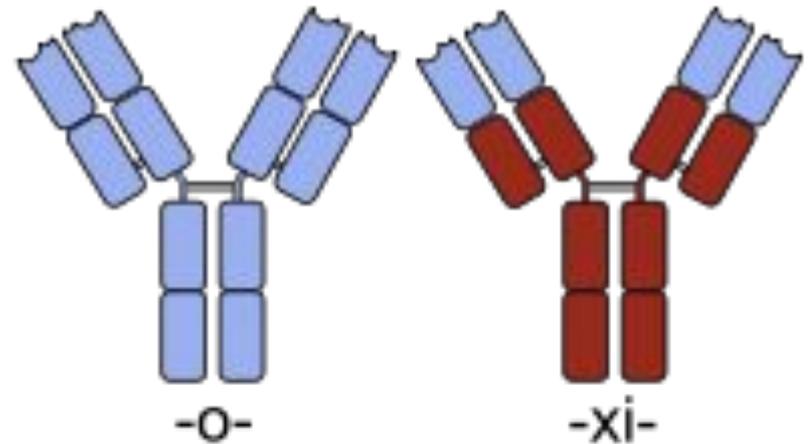
Knockout ЭС клетки



Gene targeting применение

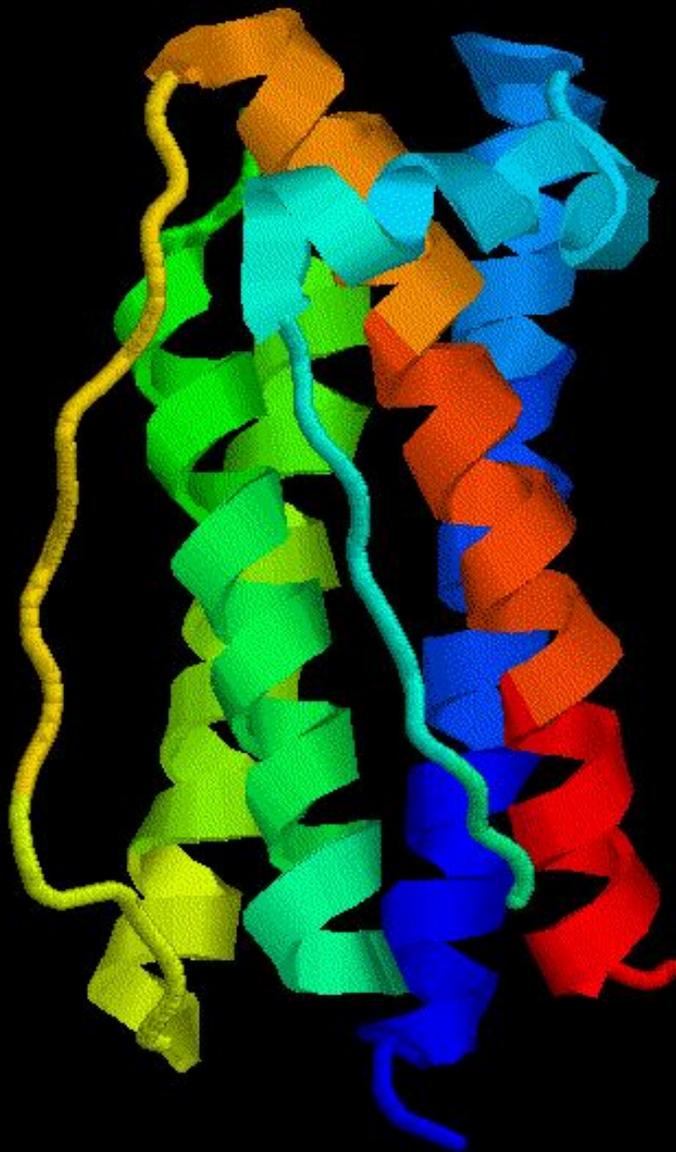


Гуманизация мышей с целью получения человеческих антител в будущем может спасти миллионы жизней!



Гранулоцит-колониестимулирующий фактор

Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor







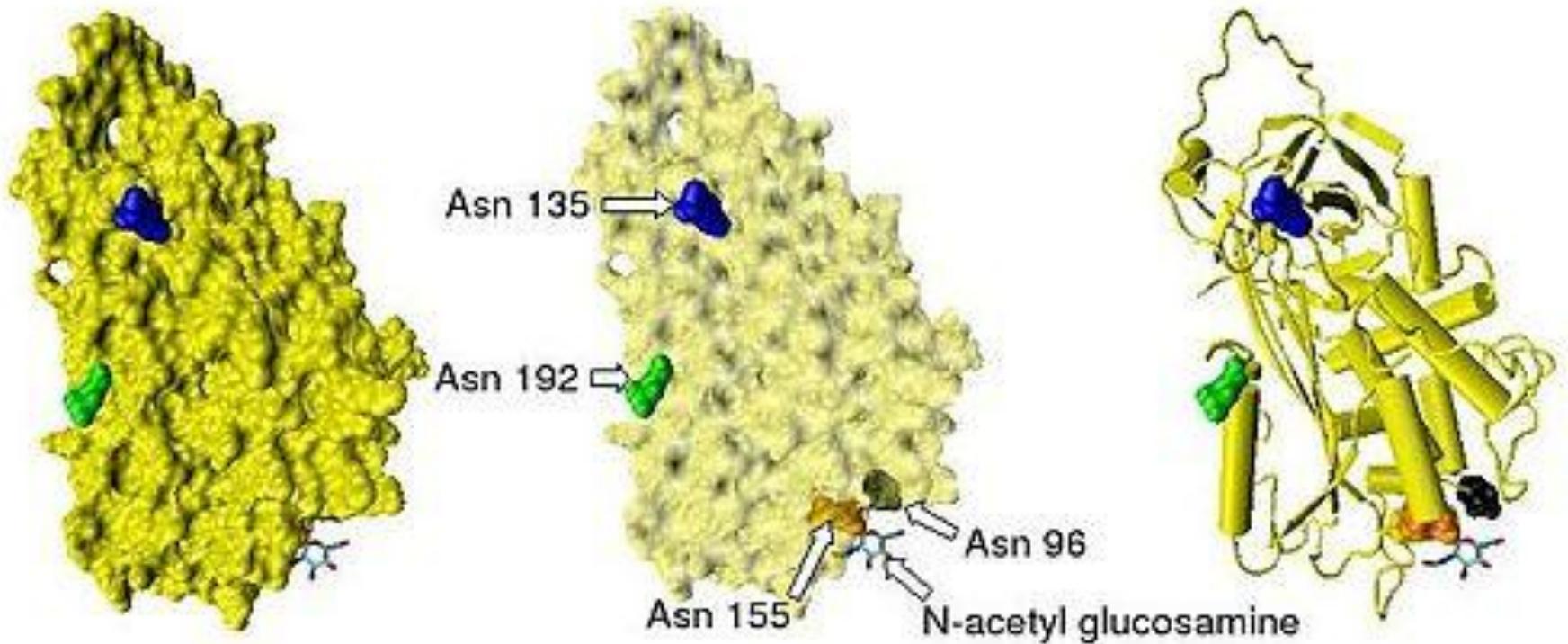




Nephila clavipes



Антитромбин АТryn

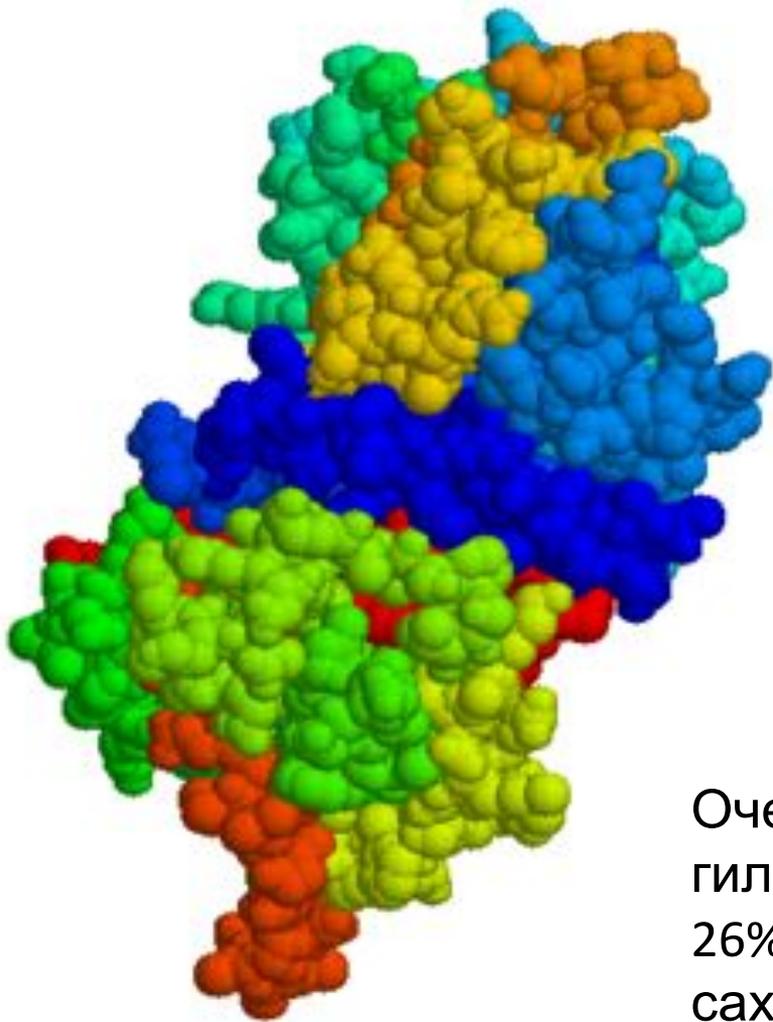


ATryn



1 коза = 90000
ДОНОРОВ





C1-ингибитор системы комплемента

Недостаток приводит к развитию наследственного ангионевротического отёка

This disorder affects approximately one in 10,000–50,000 people

Очень сильно
гликозилирован примерно
26% массы приходится на
сахара



Таблица 1. Перечень белков, получаемых из молока трансгенных животных, отобранных для создания терапевтических препаратов (Niemann and Kues, 2007; Kues and Niemann, 2011)

Препарат	Компания	Биореактор	Стадия подготовки препарата
Atryn (рекомбинантный антитромбин III человека)	GTC Biotherapeutics	Коза	Европа: Одобрено EMEA США: одобрено FDA
Ингибитор С-1-эстеразы	Pharming	Кролик	Фаза 3
ММ-093 (Альфа-фетопротеин)	Merrimack and GTC Biotherapeutics	Коза	Фаза 2
Альфа-глюкозидаза	Pharming	Кролик	Сша: Фаза 3, Европа: одобрено EMEA.
Гормон роста человека	BioSidus	Корова	Преклинические испытания
Альбумин	GTC Biotherapeutics	Корова	Преклинические испытания
Фибриноген	Pharming	Корова	Преклинические испытания
Коллаген	Pharming	Корова	Преклинические испытания
Лактоферин	Pharming	Корова	Преклинические испытания
Альфа-1 Антитрипсин	GTC Biotherapeutics	Коза	Преклинические испытания
Малярийная вакцина	GTC Biotherapeutics	Коза	Преклинические испытания
Моноклональные антитела CD 137	GTC Biotherapeutics	Коза	Преклинические

Зелёная мясная муха (*Lucilia sericata*)



a

DR4



EF-PDGF



b

DR4: 3' Insertion:
TTAATGATACAAAAACAATAATCC

EF-PDGF: 3' Insertion:
TTAAAATATTTTGGGAATCATCAT

c

DR4



EF-PDGF

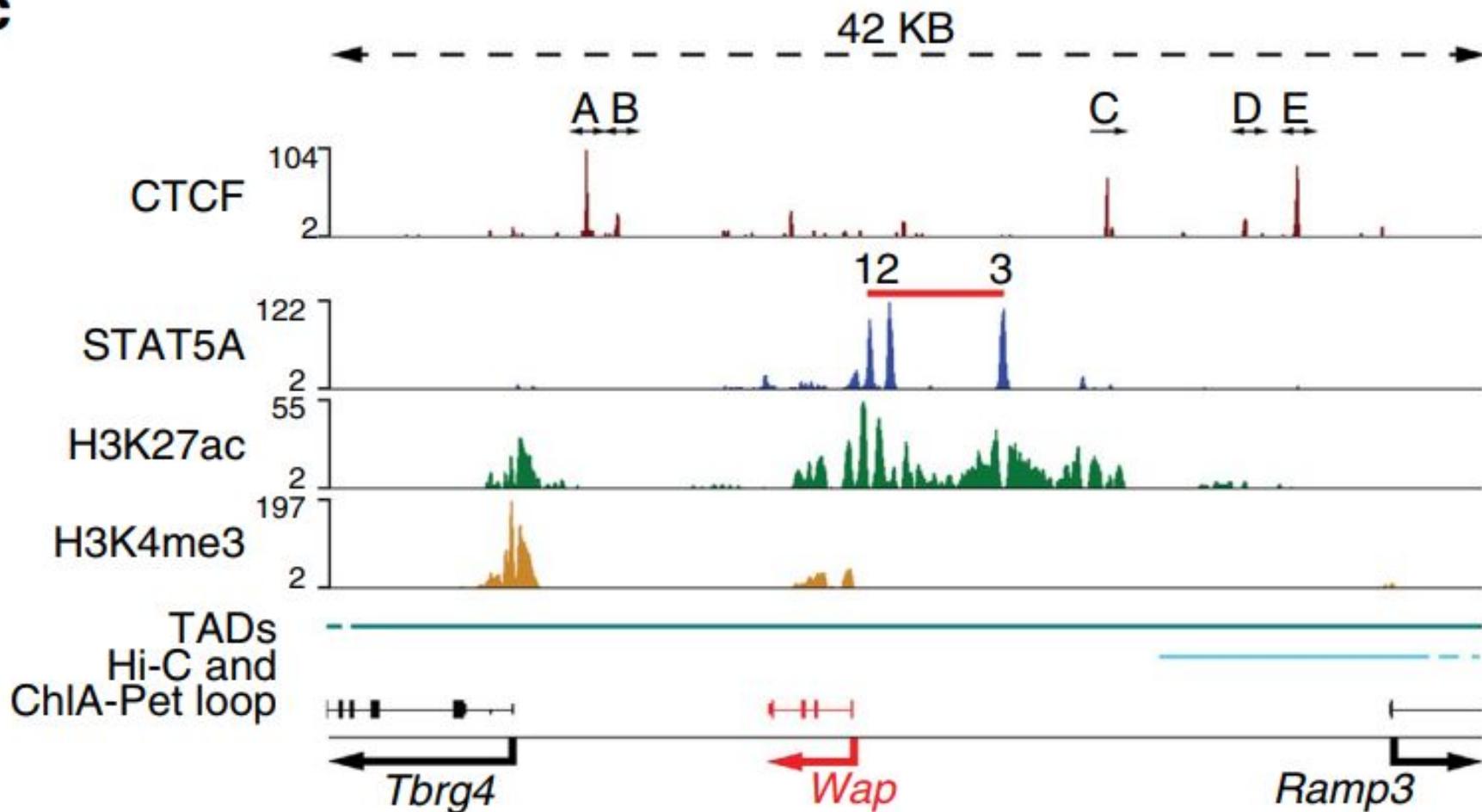


DR4 + EF-PDGF



Активность генов тонко контролируется удаленными энхансерами

C



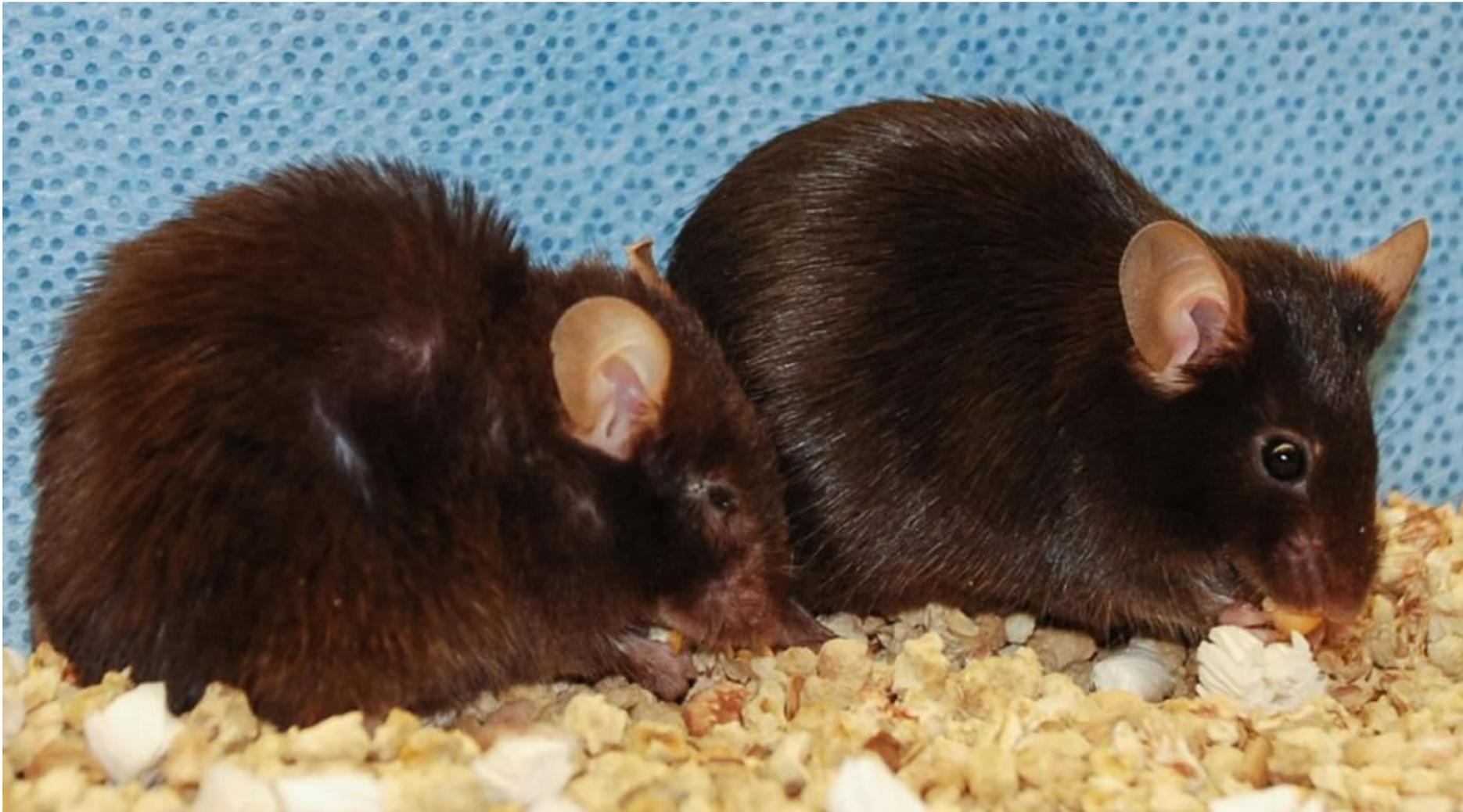
PEPCK-C^{mus} mice were created by introducing the cDNA for the enzyme (phosphoenolpyruvate carboxykinase), linked to the human α -skeletal actin gene promoter

Back Mouse: Wild Type

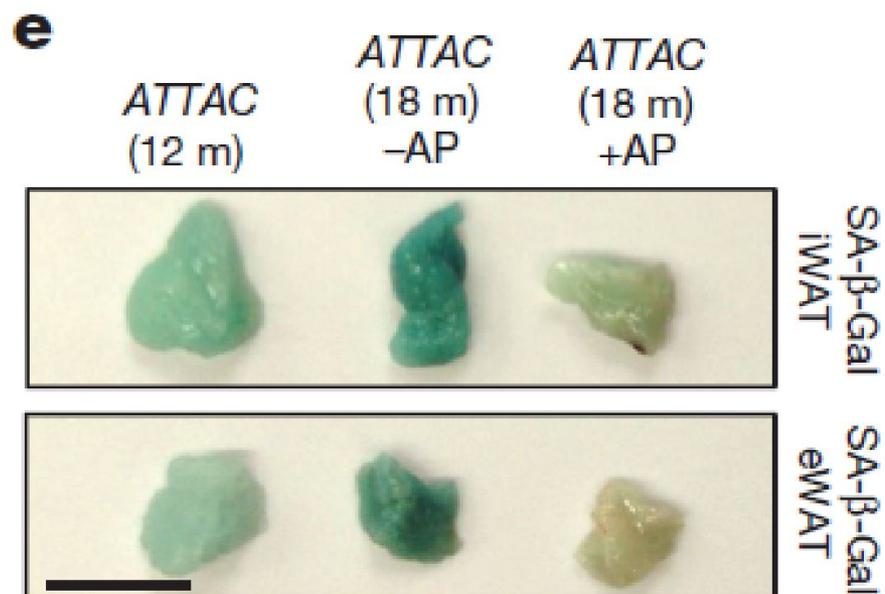
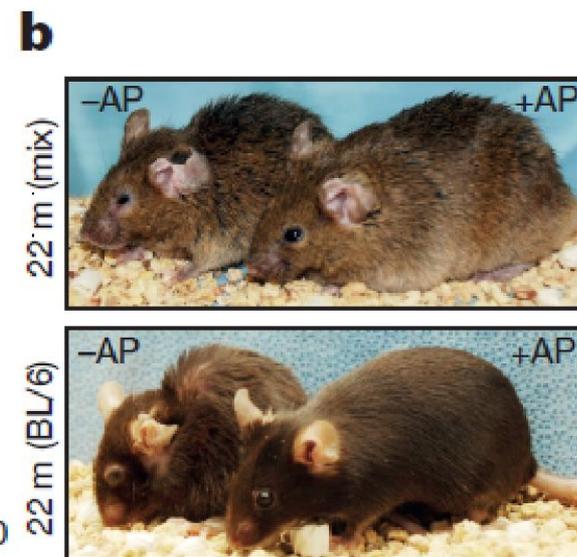
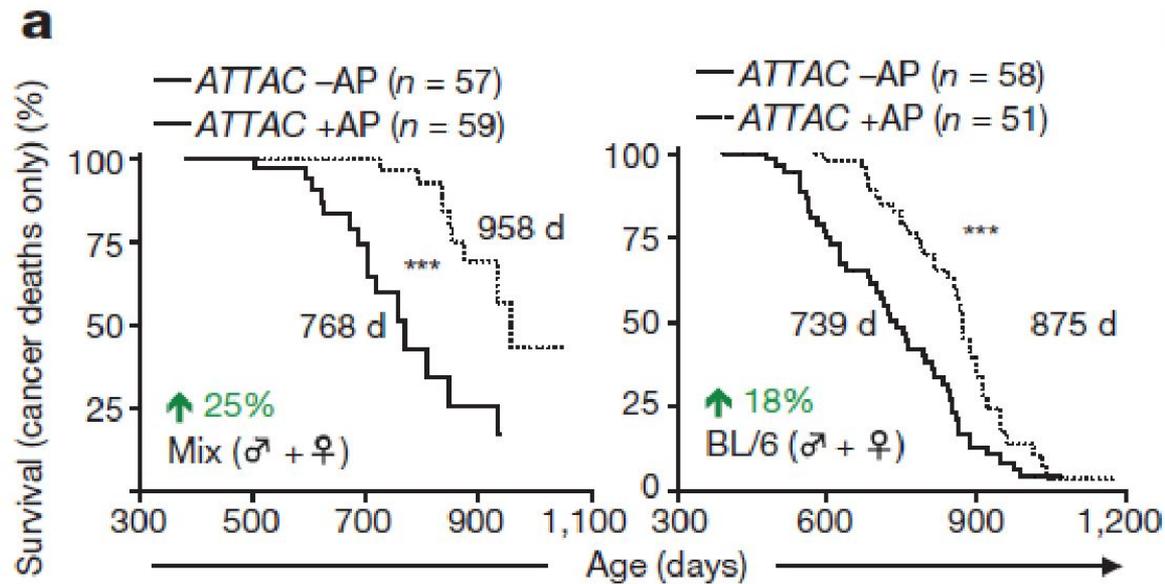
Front Mouse: PEPCK-C^{mus}



Speed: 20 m/min



INK-ATTAC, a transgenic mouse model that expresses the FK506-binding protein–caspase 8 (FKBP–Casp8) fusion protein and green fluorescent protein (GFP) under the control of a minimal Ink4a (also known as Ink4a/Arf or Cdkn2a) promoter fragment transcriptionally active in senescent cells. Upon administration of AP20187 (AP), a dimerizer that activates FKBP-fused Casp8 (ref. 4).



Wild type



'Serpentized'



Трансгенный лосось

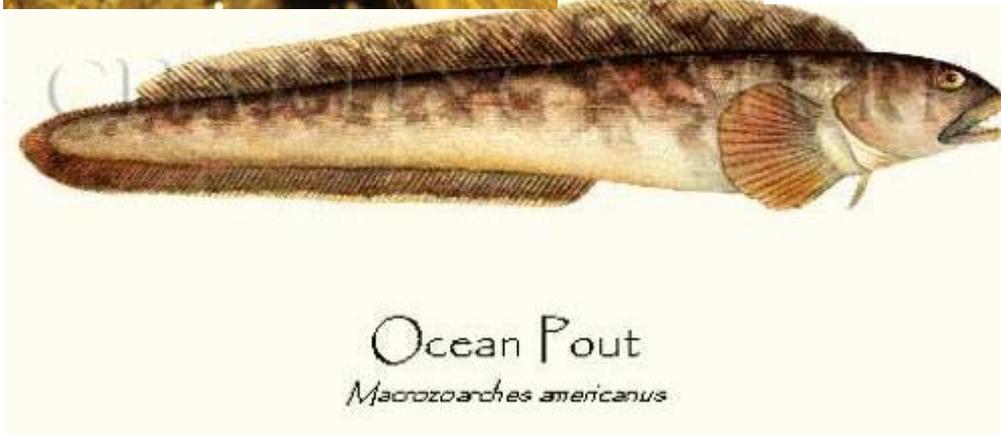
рыбы в возрасте 18
месяцев



рыбы в возрасте 36
месяцев



Где взять нужные гены?



Американская
бельдюга



Чавыч
а

промотор гена антифриз-
белка

ген гомона роста

COUNTERTHINK "FISHING FOR GM SALMON"

Трансгенный
лосось
одной рыбы
хватить на целый
месяц...

если сможете его
поймать!

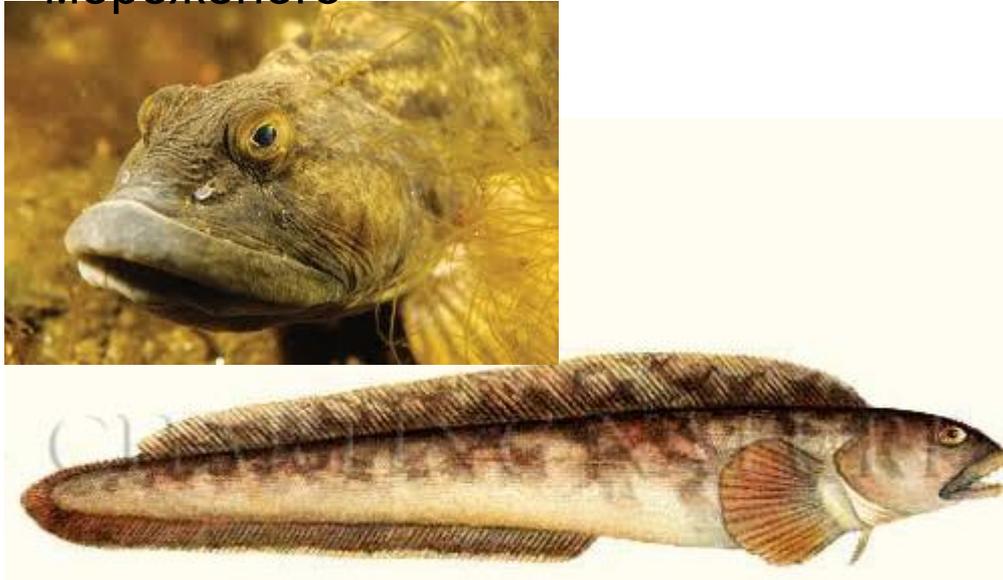




+ Гормо
н
роста



Как генная инженерия помогла в производстве некалорийного мороженого



ген антифриз-
белка



антифриз-белок



Трансгенез в медицине: производство гормонов



Инсулин

Раньше:

- источник поджелудочная железа коровы или свиньи
- 100г инсулина из 1т поджелудочной железы

Сейчас:

- из 1000 л культуральной среды 200 г гормона



Гипофизарная карликовость

Соматотропин

Раньше:

- источник – трупный материал
- 4-6 мг из одного трупа
- препарата не хватало на всех
- мог содержать вирусы

Сейчас:

- Все проблемы решены 😊

Стратегии активного трансгеноза

CRE/loxP система интеграции фага P1

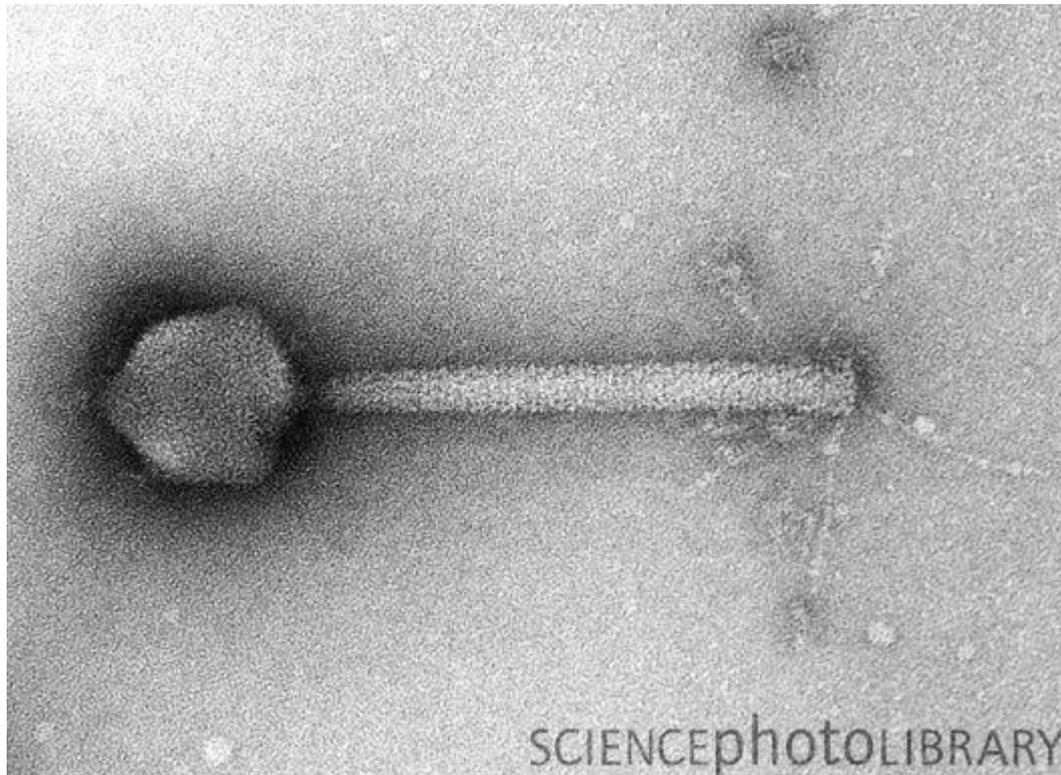


Схема IoxP сайта



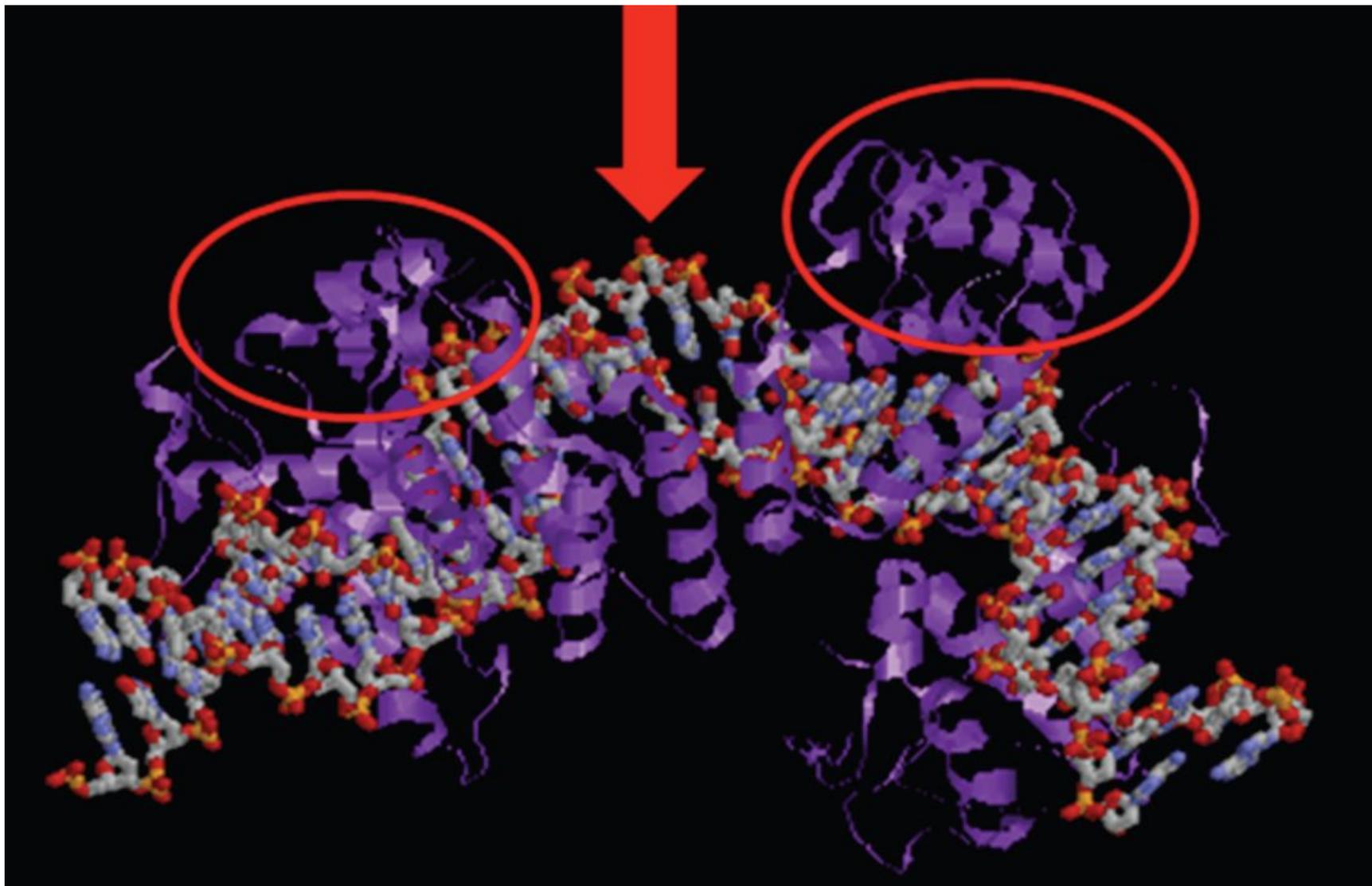
**34 bp: 8-bp последовательность фланкирована
13-bp инвертированными повторами**

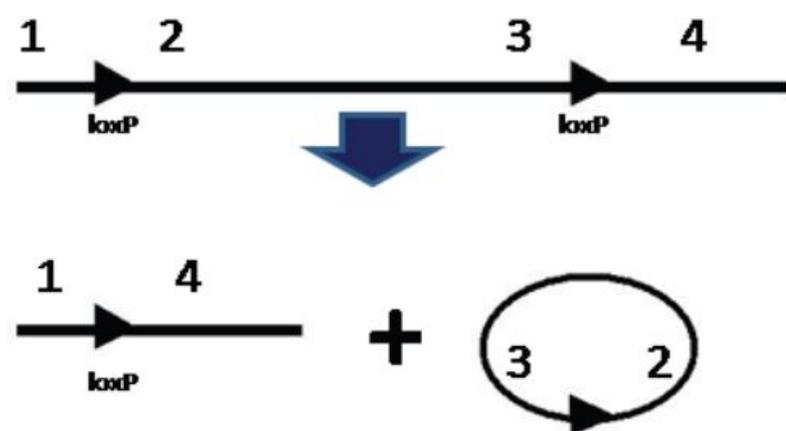
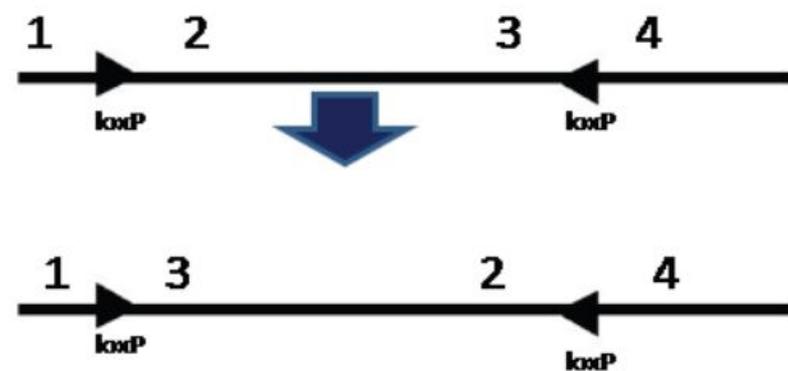
Left 13bp repeat 8bp spacer Right 13bp repeat

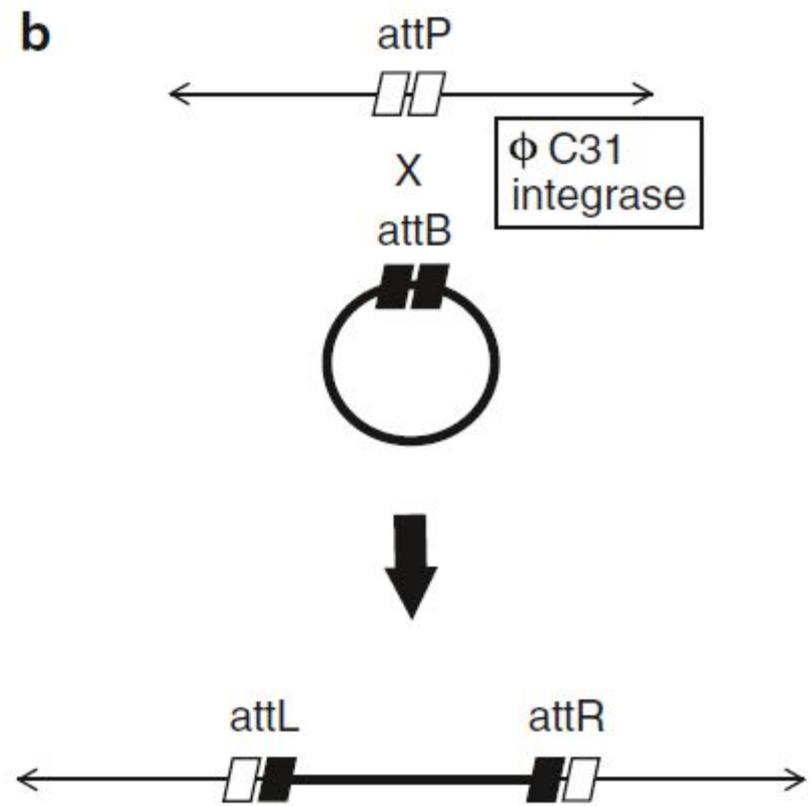
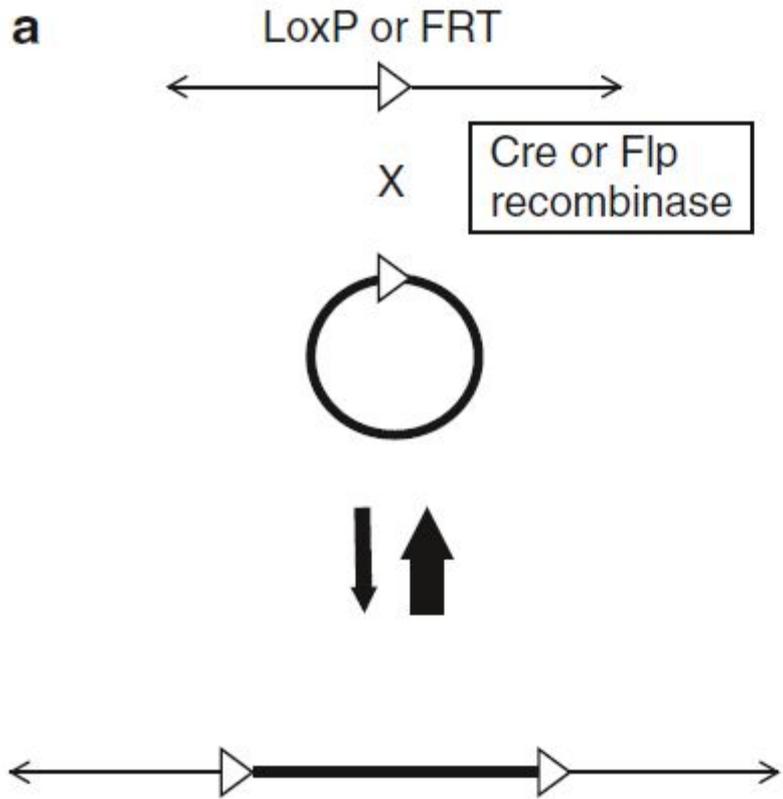
5'-ATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTAT-3'
3'-TATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATA-5'

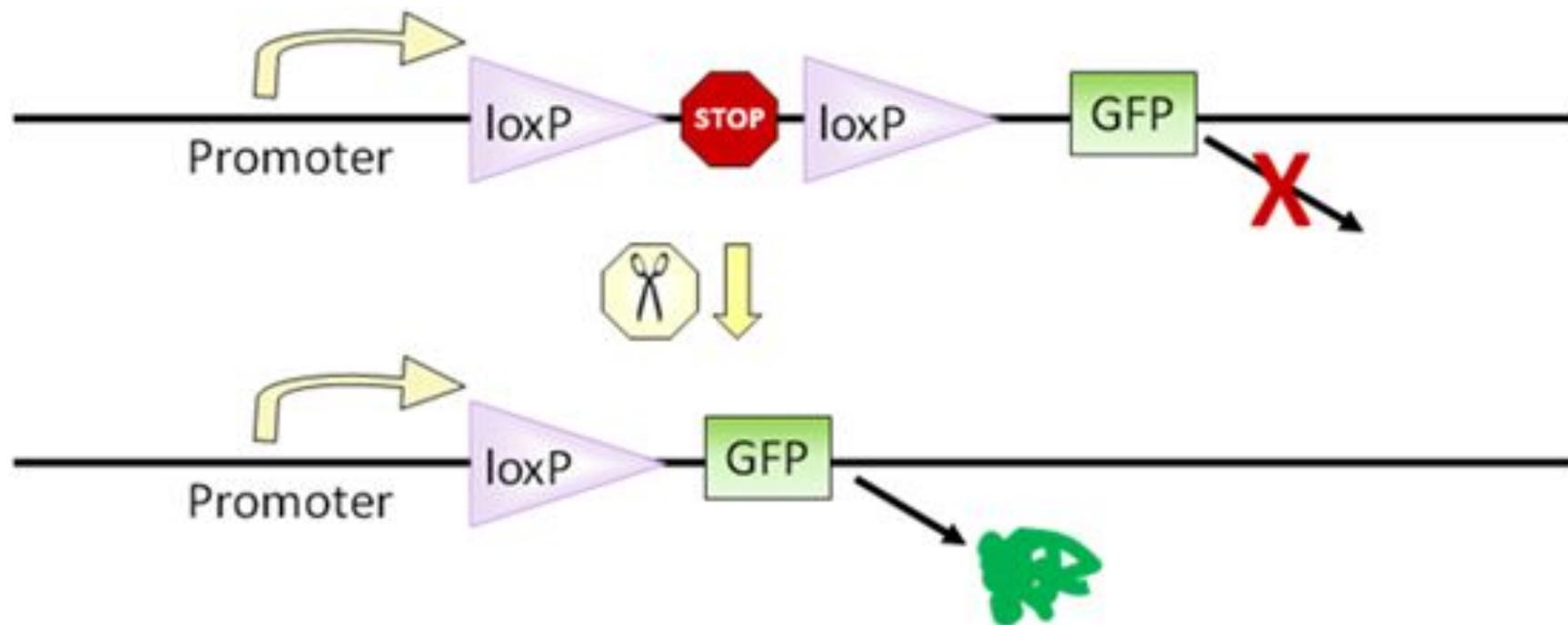
←----->

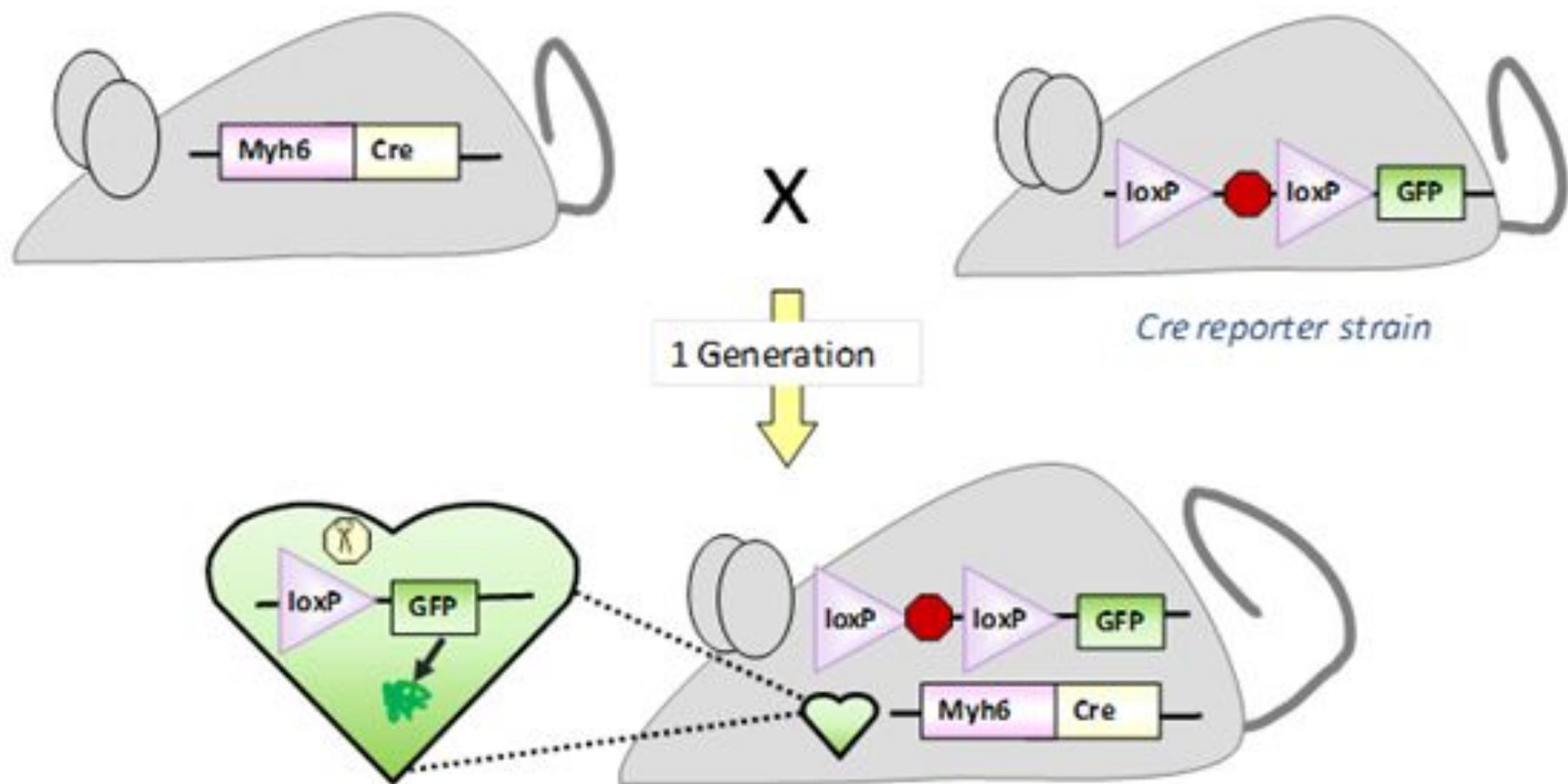




A**DNA Excision****B****DNA Inversion**

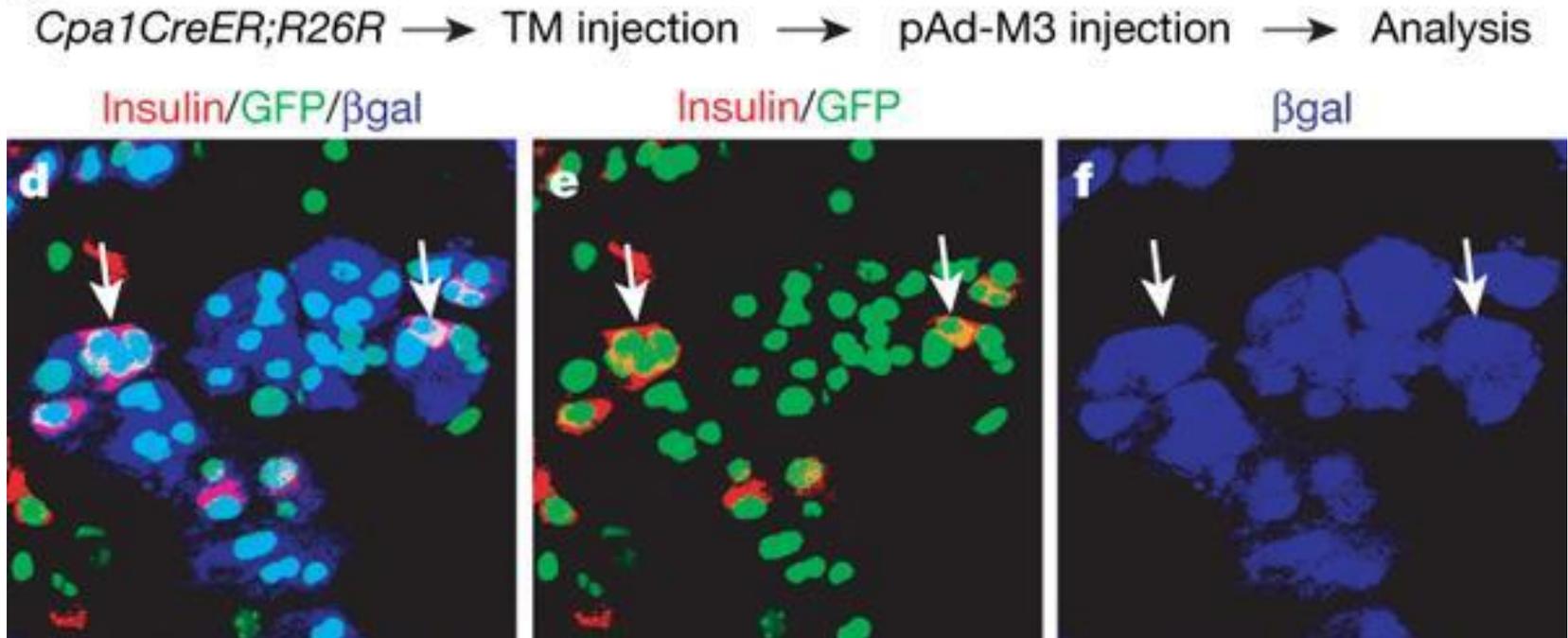






GFP fluorescence confirms Cre activity in expected tissues

Induced new b-cells originate from differentiated exocrine cells.



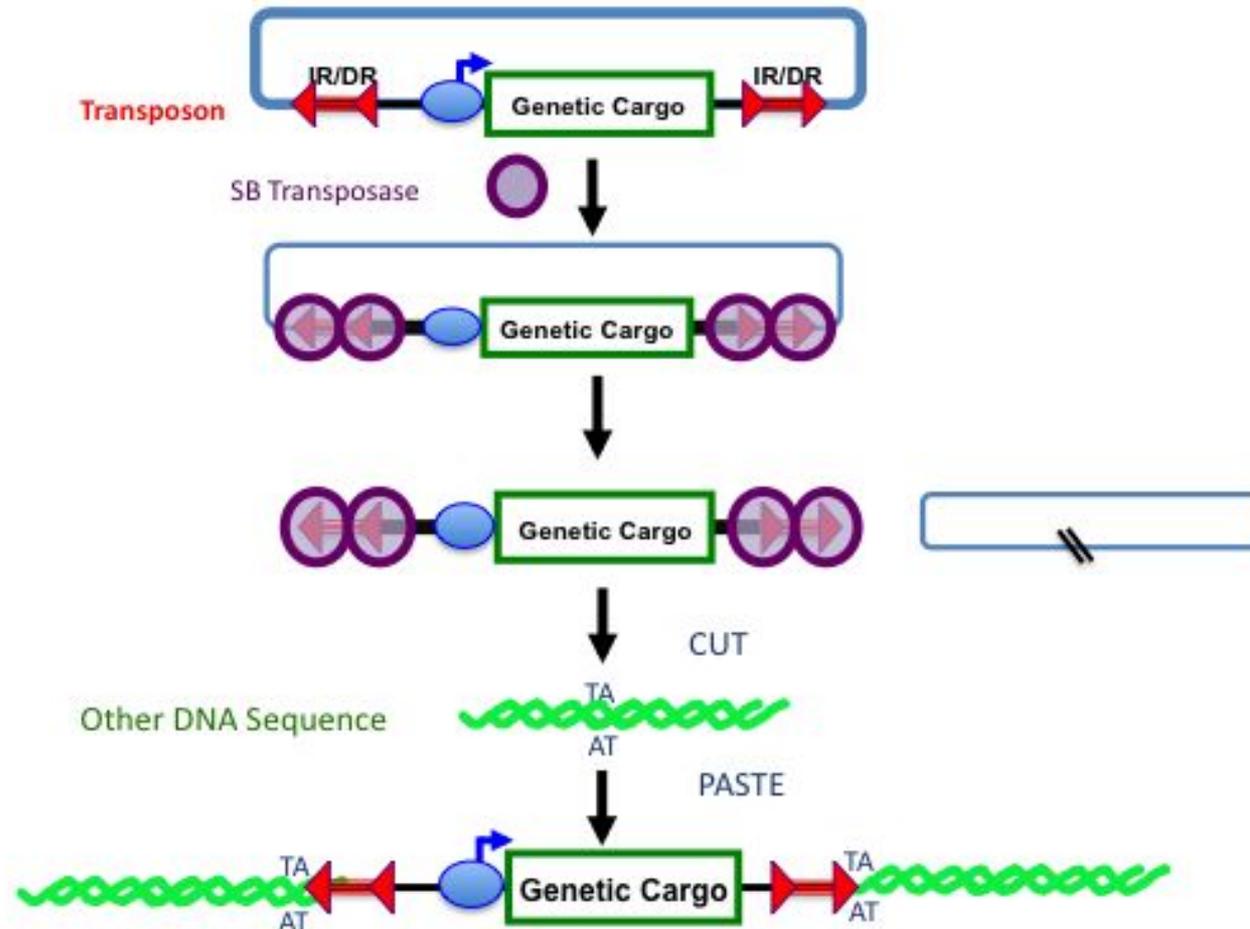
Q Zhou *et al. Nature* **000**, 1-6 (2008) doi:10.1038/nature07314

nature

Транспозон спящая красавица (*Sleeping Beauty*)

НЕ ОСТАВЛЯЕТ «СЛЕДОВ»

Mechanism of Transposition





Sleeping Beauty
transposon system



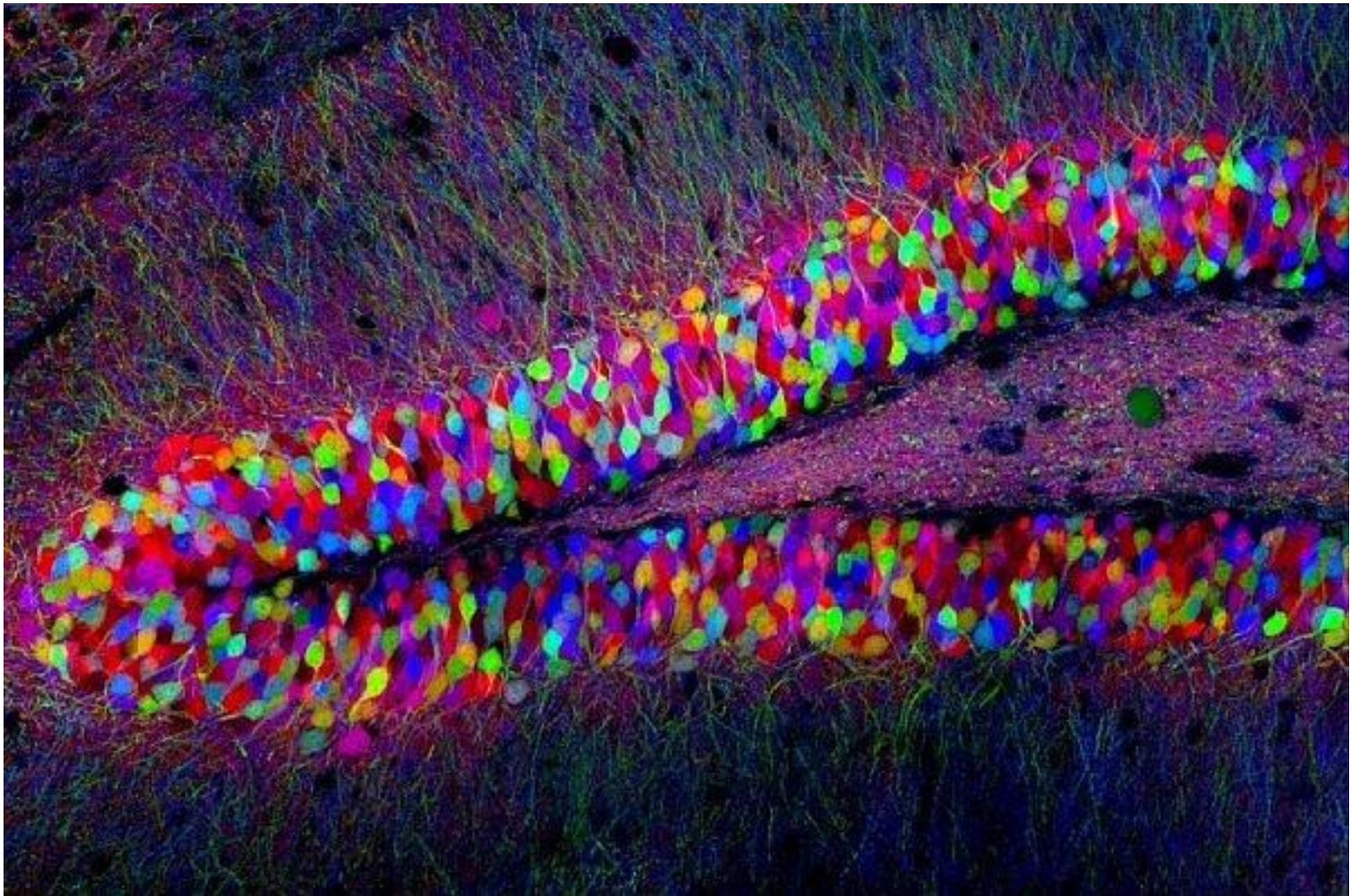
Frog Prince transposon
system

Транспозон леопардовой лягушки
Rana pipiens





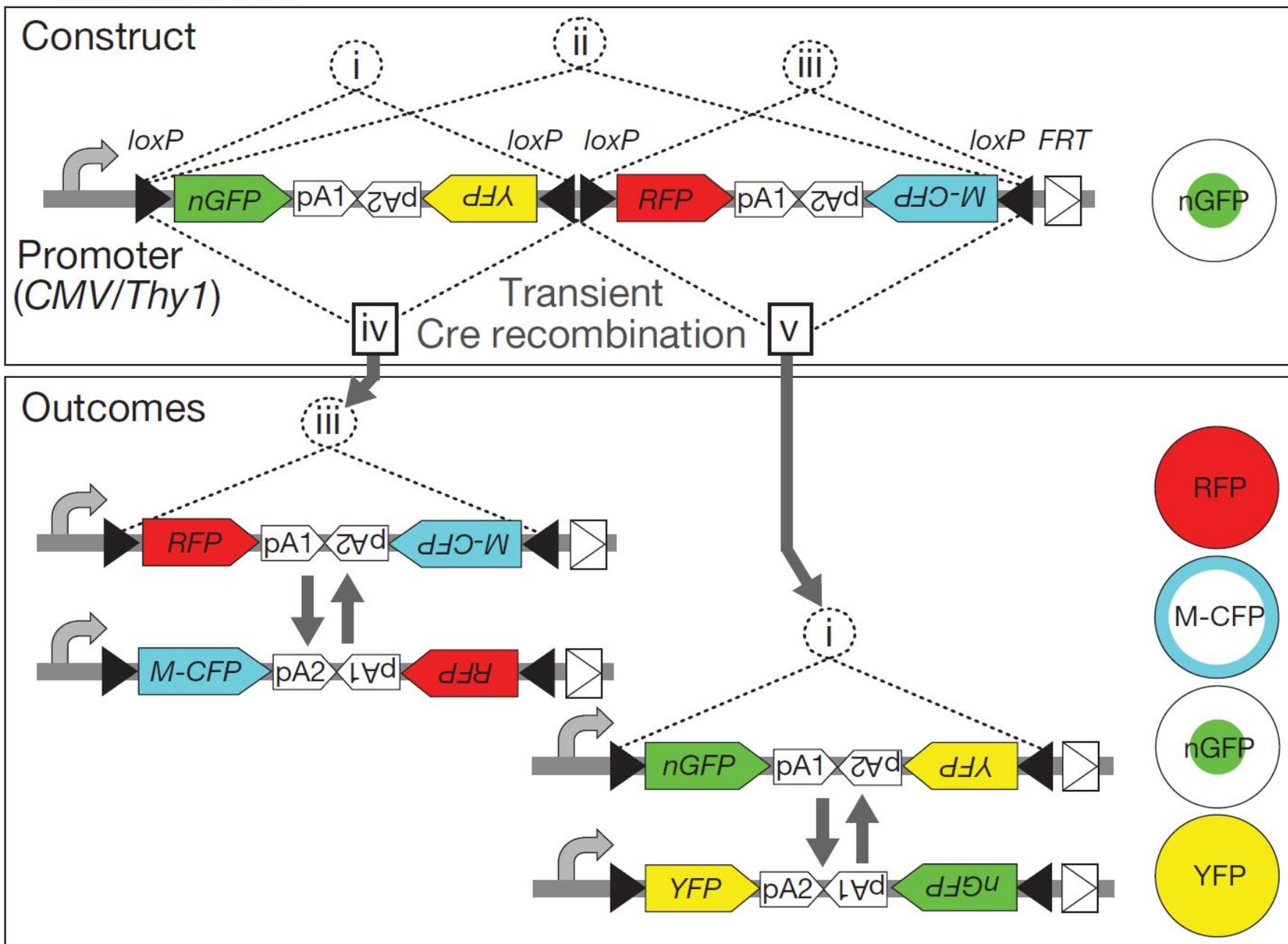
Brainbow мыши



Из чего состоит трансген? Комплектация люкс

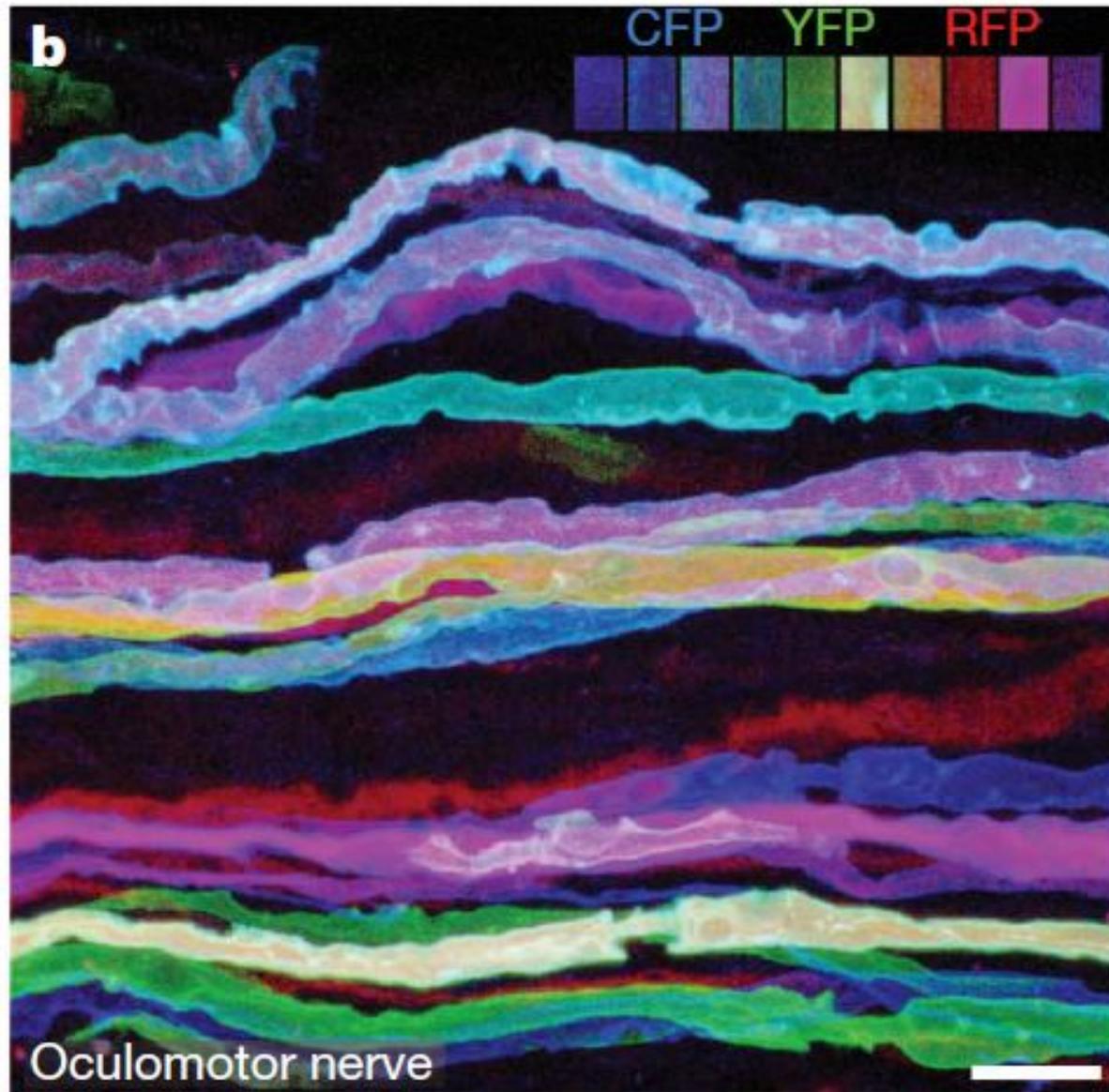


c Brainbow-2.1

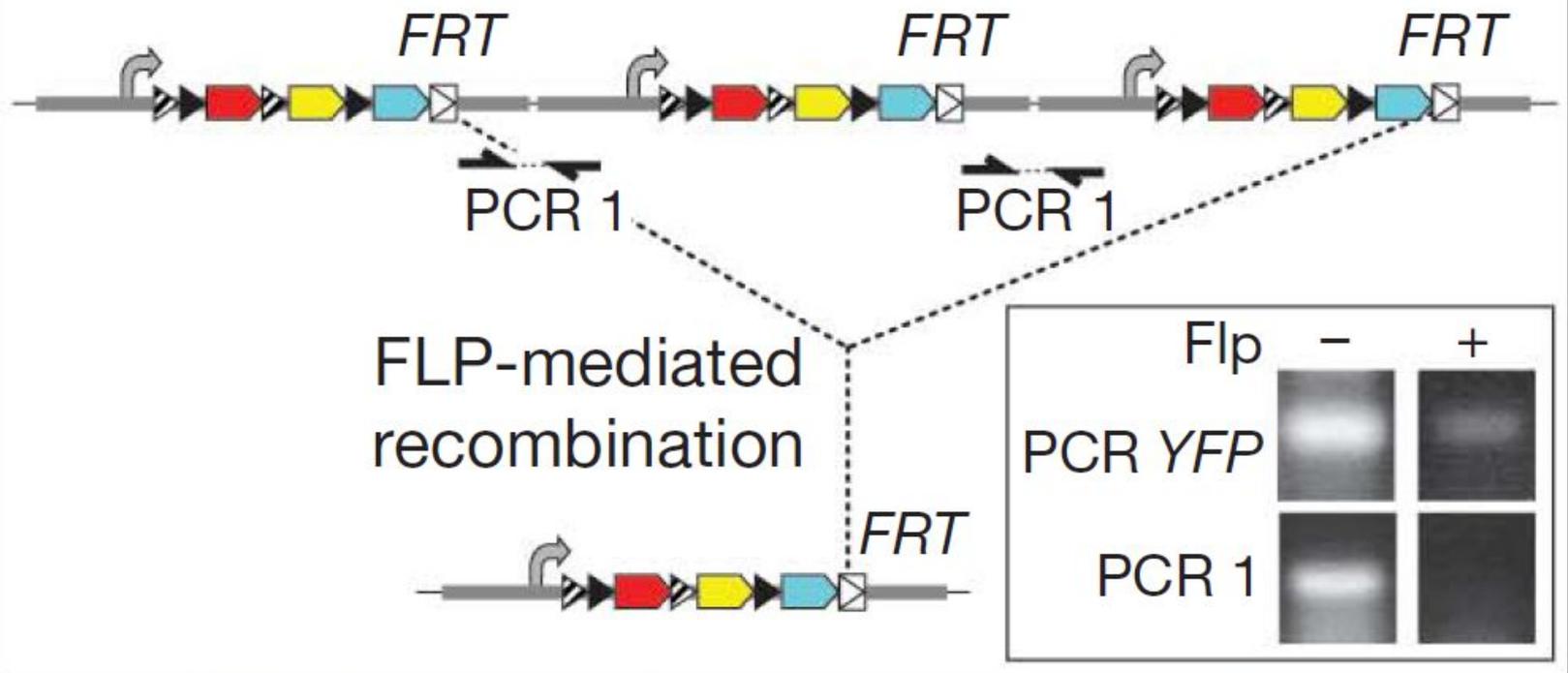


a XFP combinations

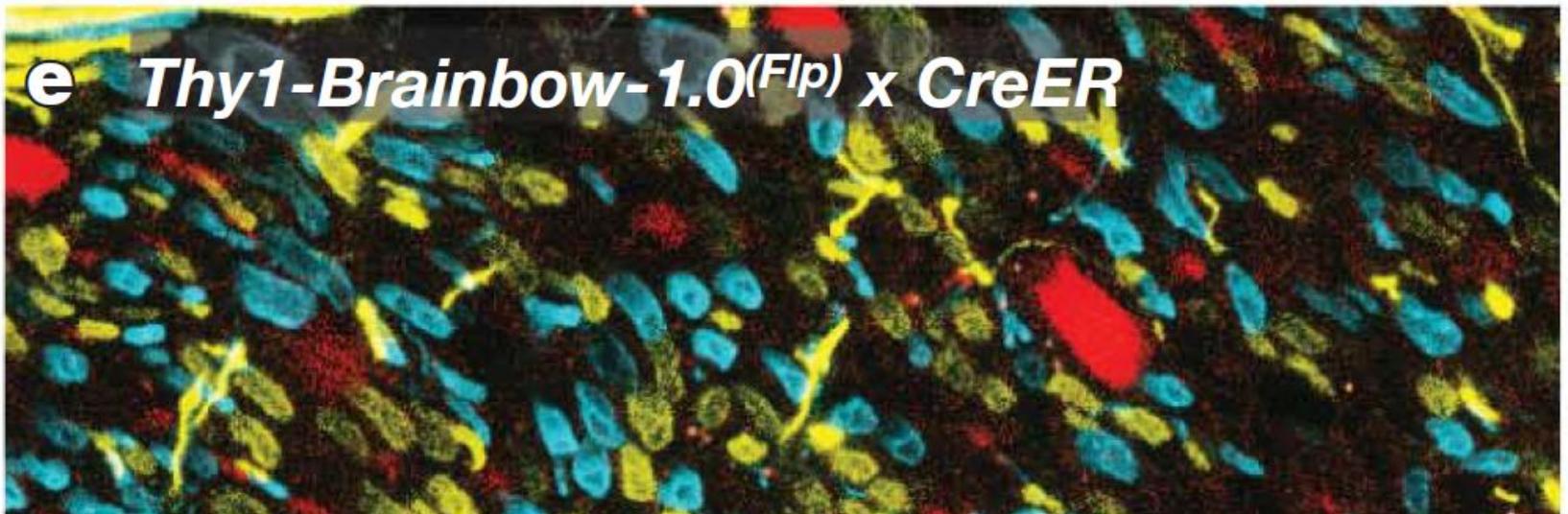
Outcome for each copy			Resulting colour
1	2	3	
C	C	C	Blue
C	C	Y	Light blue
C	Y	Y	Blue-green
Y	Y	Y	Green
Y	Y	R	Light green
Y	R	R	Orange
R	R	R	Red
R	R	C	Magenta
R	C	C	Purple
R	C	Y	Grey



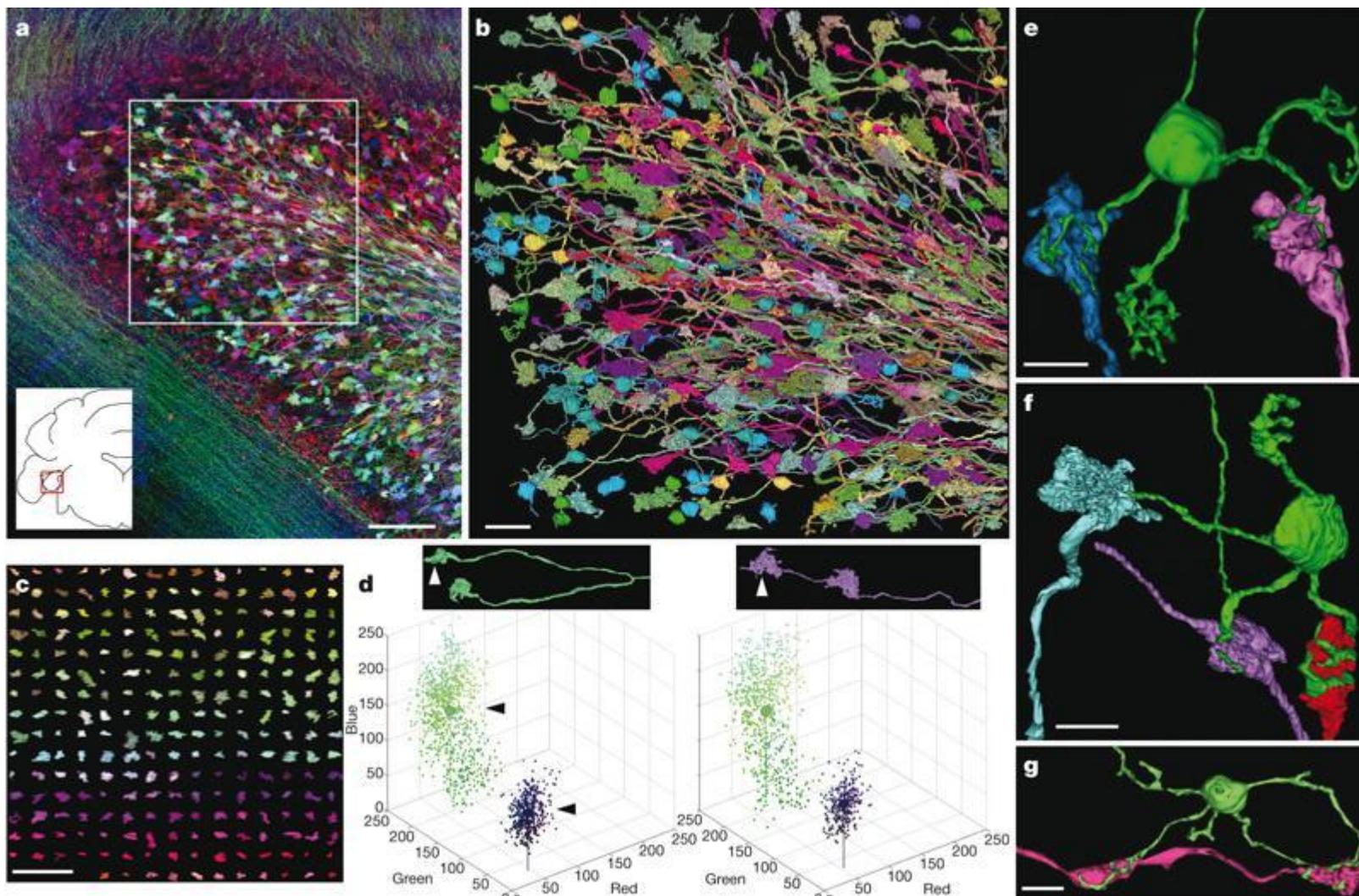
d Copy number reduction



e *Thy1-Brainbow-1.0^(Flp) x CreER*

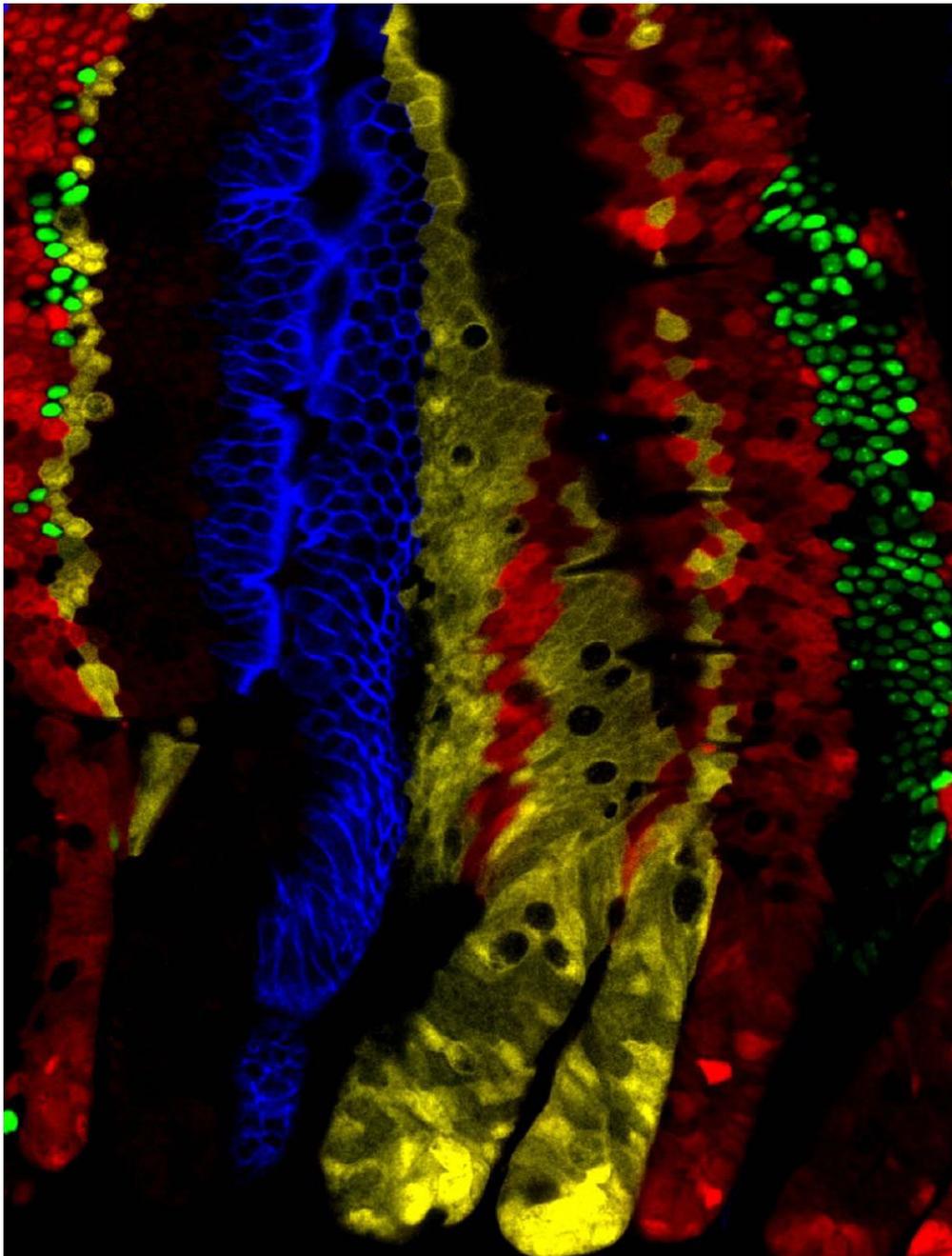


Трёхмерная реконструкция отдельных клеток



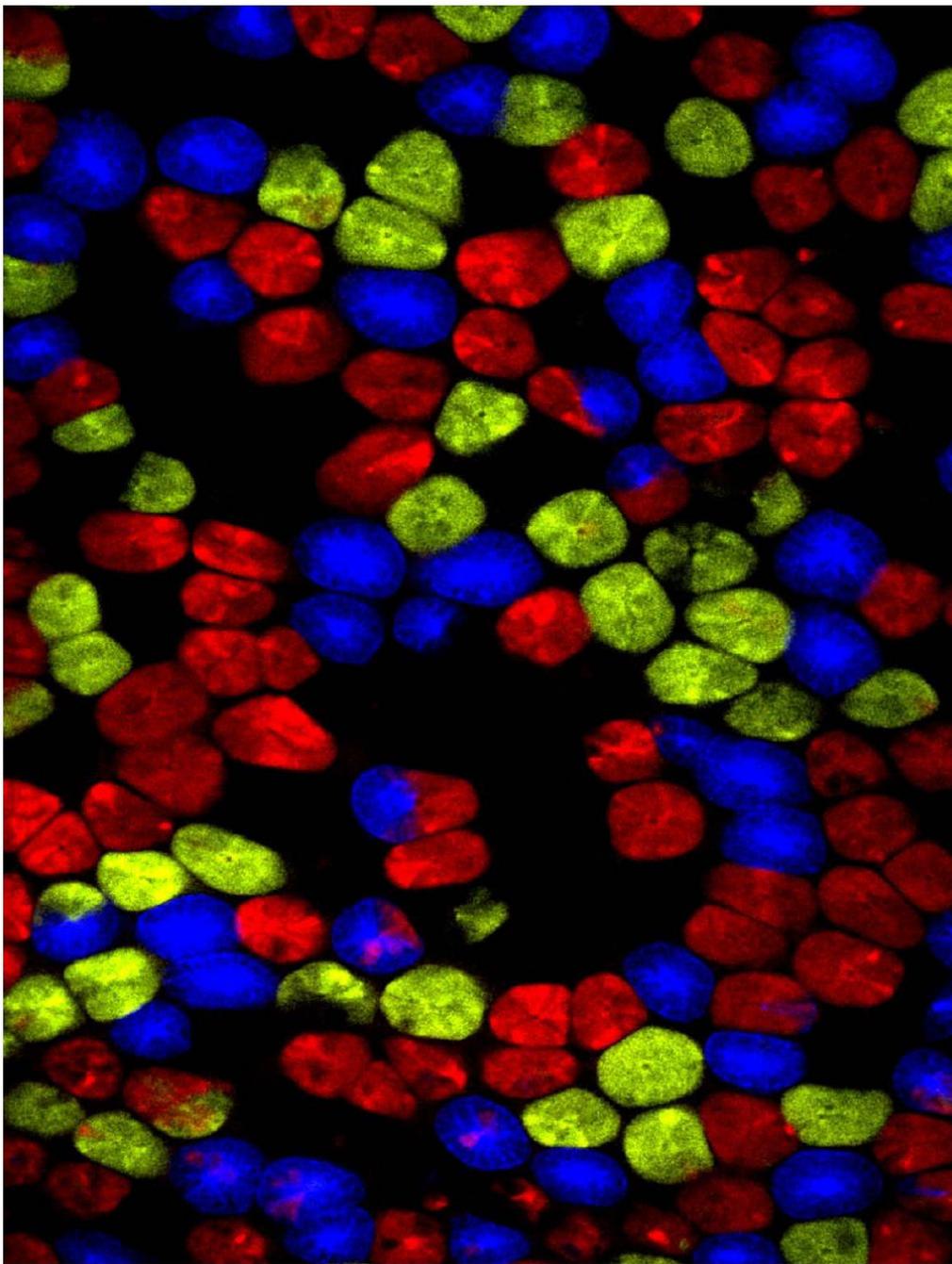
Картина Джексона Полока, авангардный
экспрессионизм



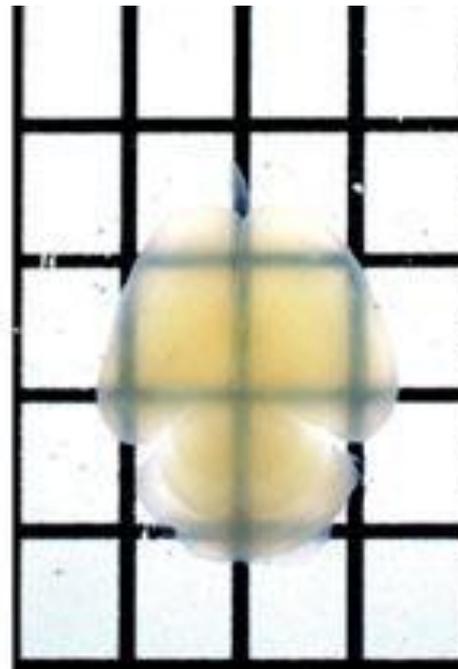
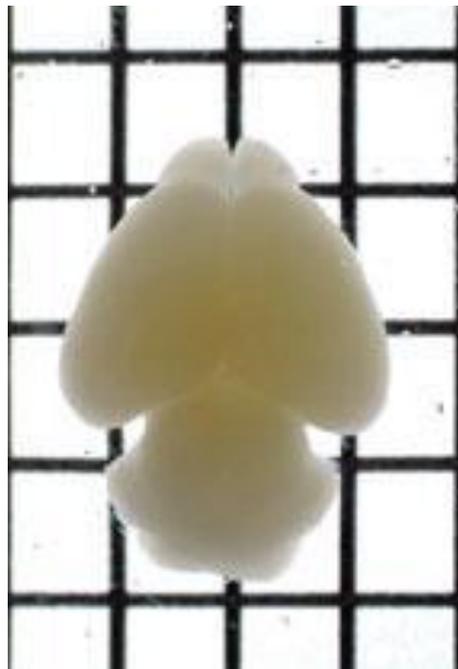


Крипты тонкого кишечника
у мышей, несущих конструкцию
конфети

Ворсинки тонкого кишечника
у мышей, несущих конструкцию
конфети

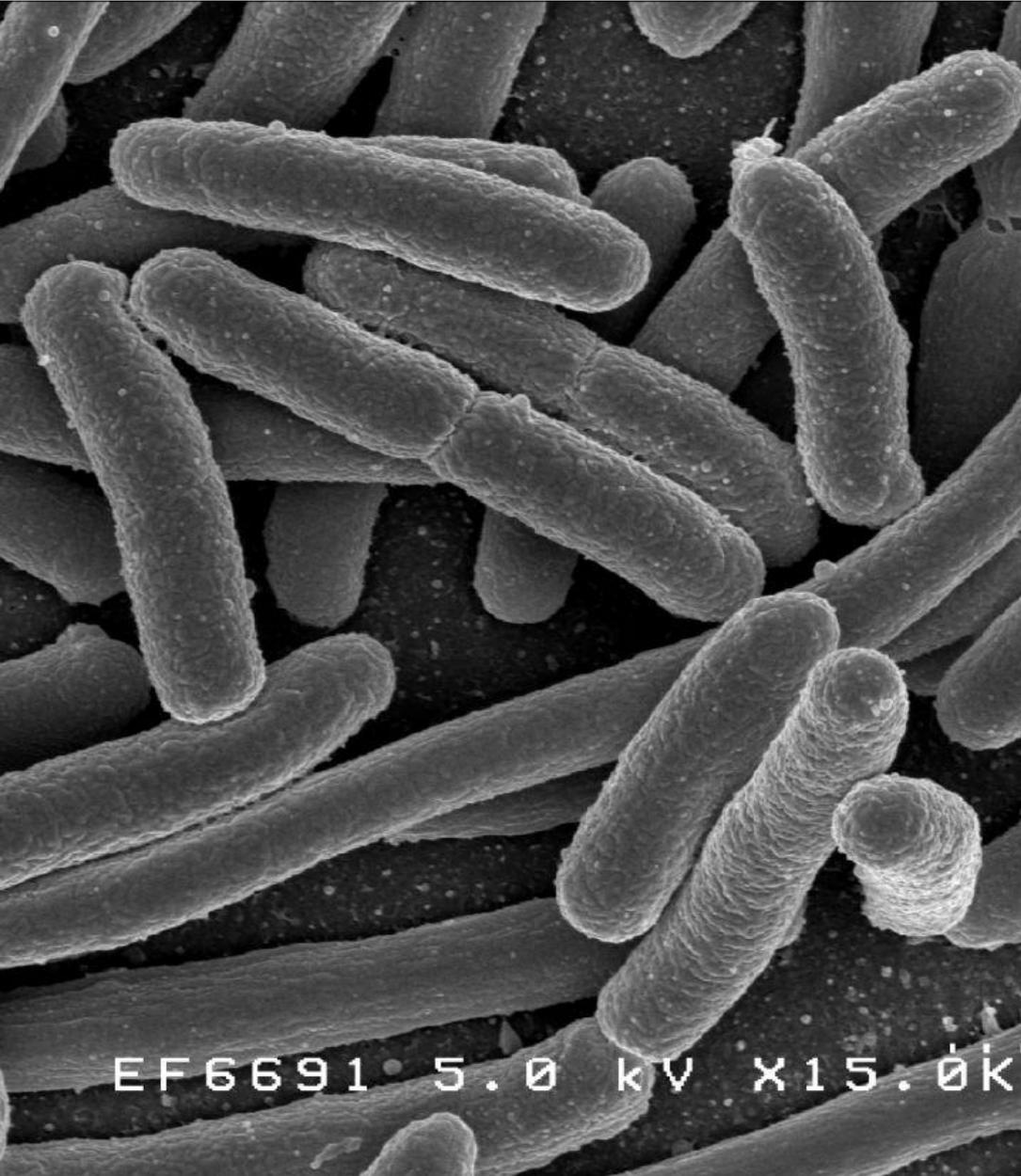


CLARITY (Clear, Lipid-exchanged, Anatomically Rigid, Imaging/immunostaining compatible, Tissue hYdrogel)



Organic vs GMO





Вспышка пищевых
отравлений в Европе в
2011 году

Пострадало 3950 человек
53 человека погибли
у 800 диагностирован
гемолитический
уремический синдром,
вплоть до отказа почек



Пажитни
к



PREPUBLICATION COPY

Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects

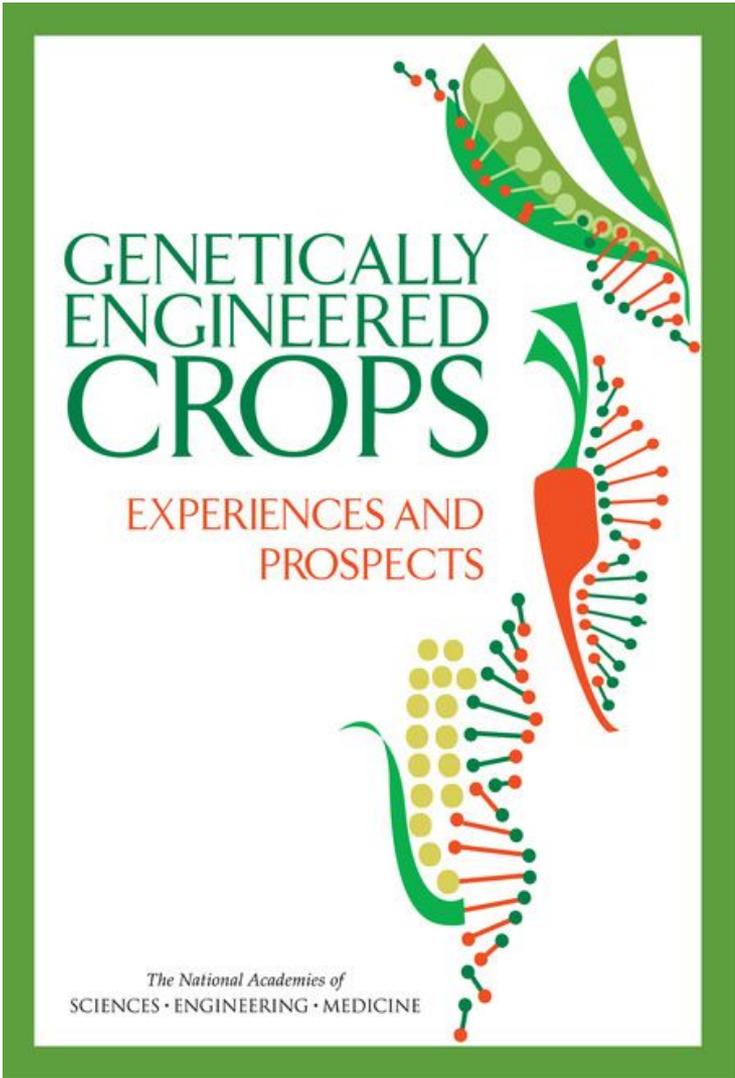
Committee on Genetically Engineered Crops:
Past Experience and Future Prospects

Board on Agriculture and Natural Resources

Division on Earth and Life Studies

The National Academies of
SCIENCES • ENGINEERING • MEDICINE

THE NATIONAL ACADEMIES PRESS
Washington, DC
www.nap.edu



Исследование по кормлению ГМ кормом на трех поколениях. Исследовано 630 взрослых крыс и 2837 крысят.

Никаких негативных эффектов не обнаружено

[\[Assessment of the impact of GMO of plant origin on rat progeny development in 3 generations\].](#)

NV Tyshko, VM Zhminchenko, VA Pashorina... - Voprosy pitaniia, 2010