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

Трансгенез

Всё началось с селекции…

388

Селекция имеет свои ограничения

AWNews
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

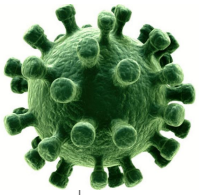
«Энхансер»/ Регуляторн ые елементы

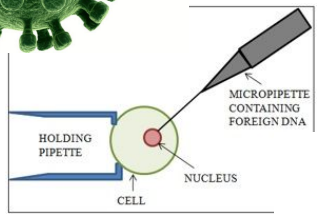
В случае необходимомти выделения и очистки белкового продукта

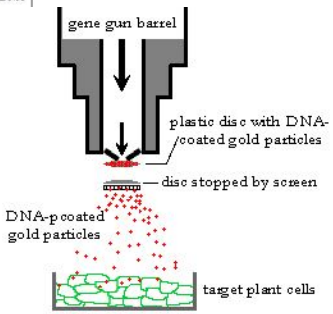
инсулято ры

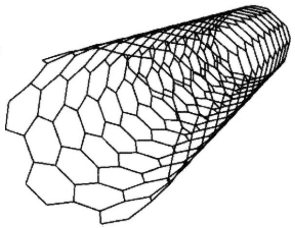
Из чего состоит трансген? Комплектация люкс

Gene Delivery into Mammalian Cells:









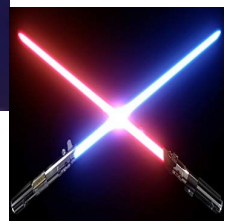
Biological methods

- Recombinant Viruses

Mechanical Methods

- Microinjection
- Particle Bombardment
- Single-Walled Carbon Nanotubes

Physical Methods

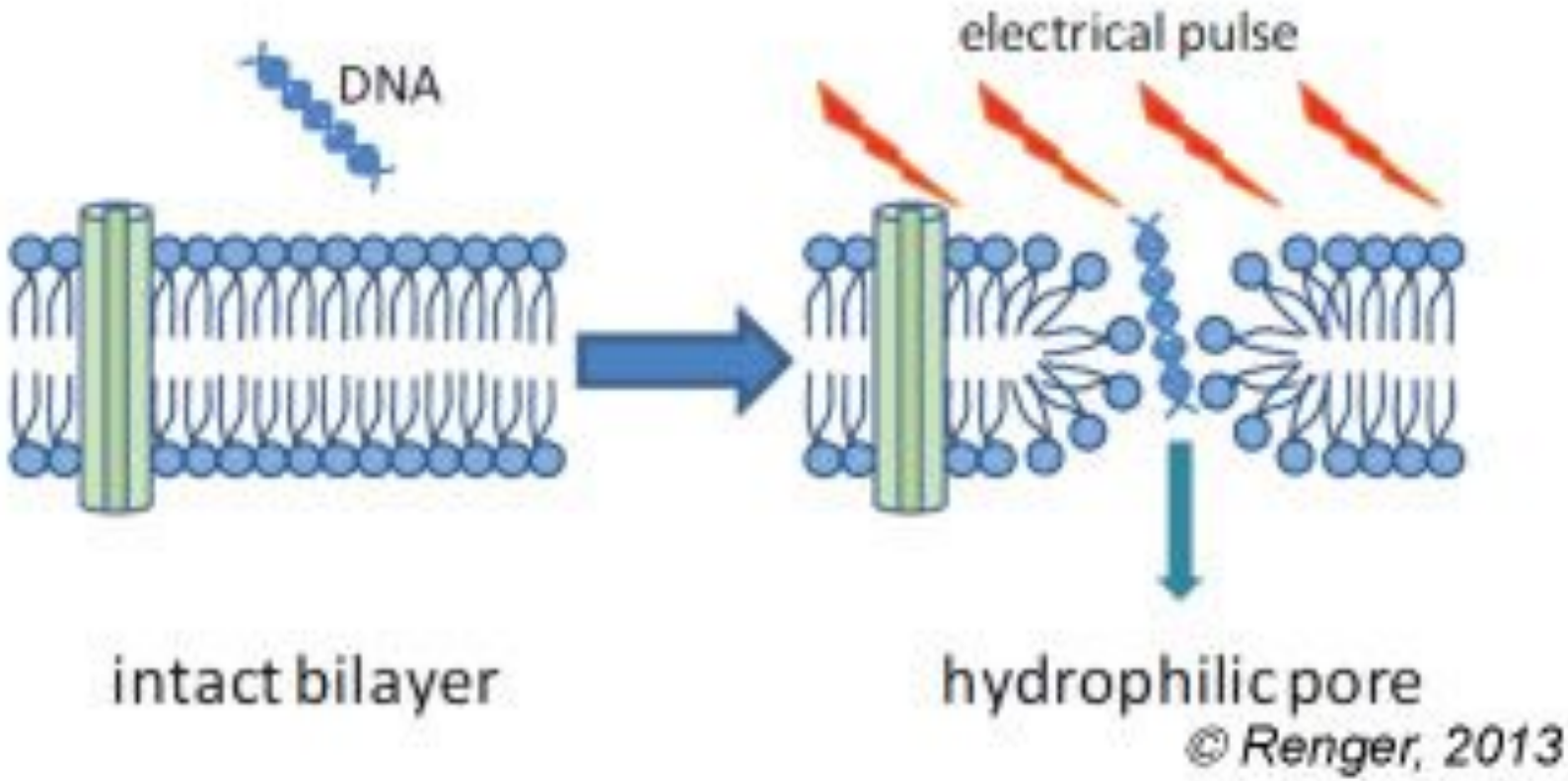


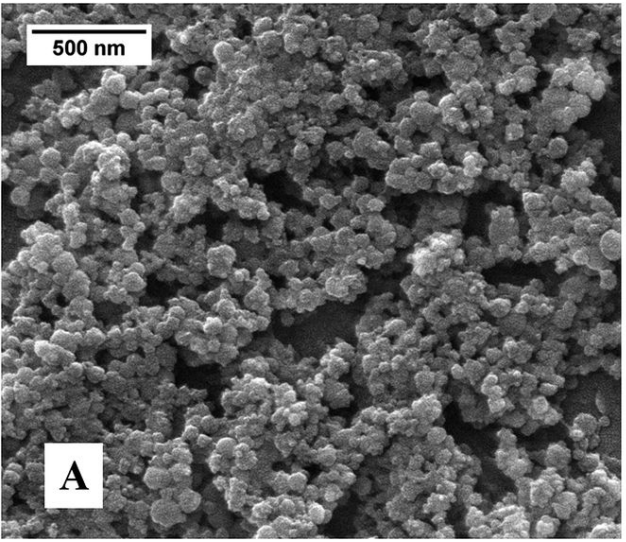
- Electroporation Techniques
- Laser-Beam-Mediated DNA Delivery

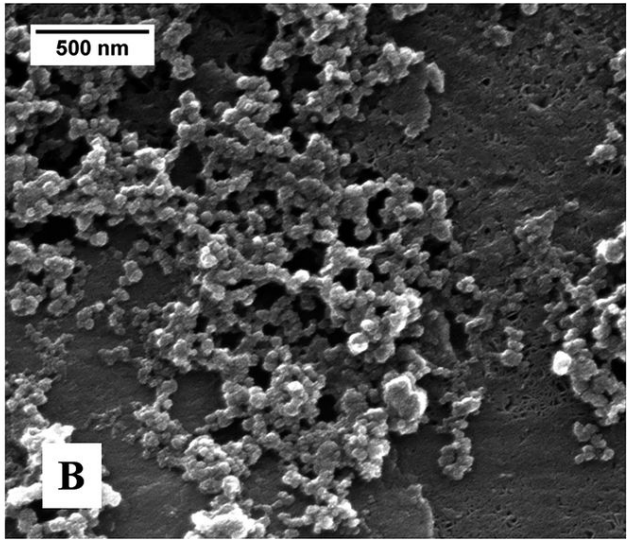
Chemical Methods

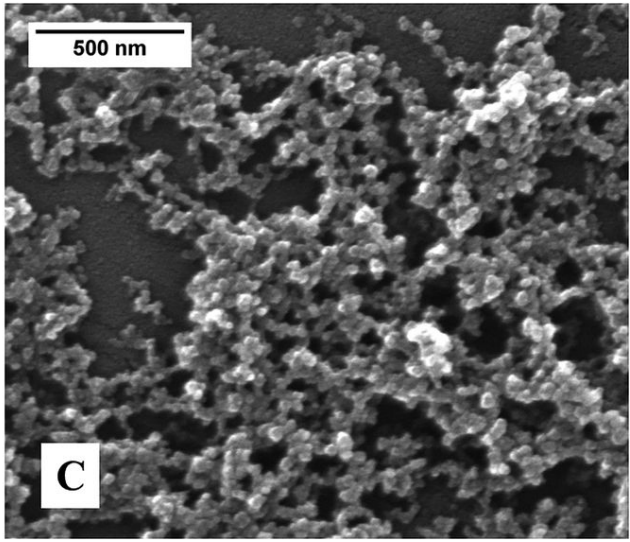
- Calcium phosphate method
- Liposomes
- Polymers polyethylenimines (PEIs)

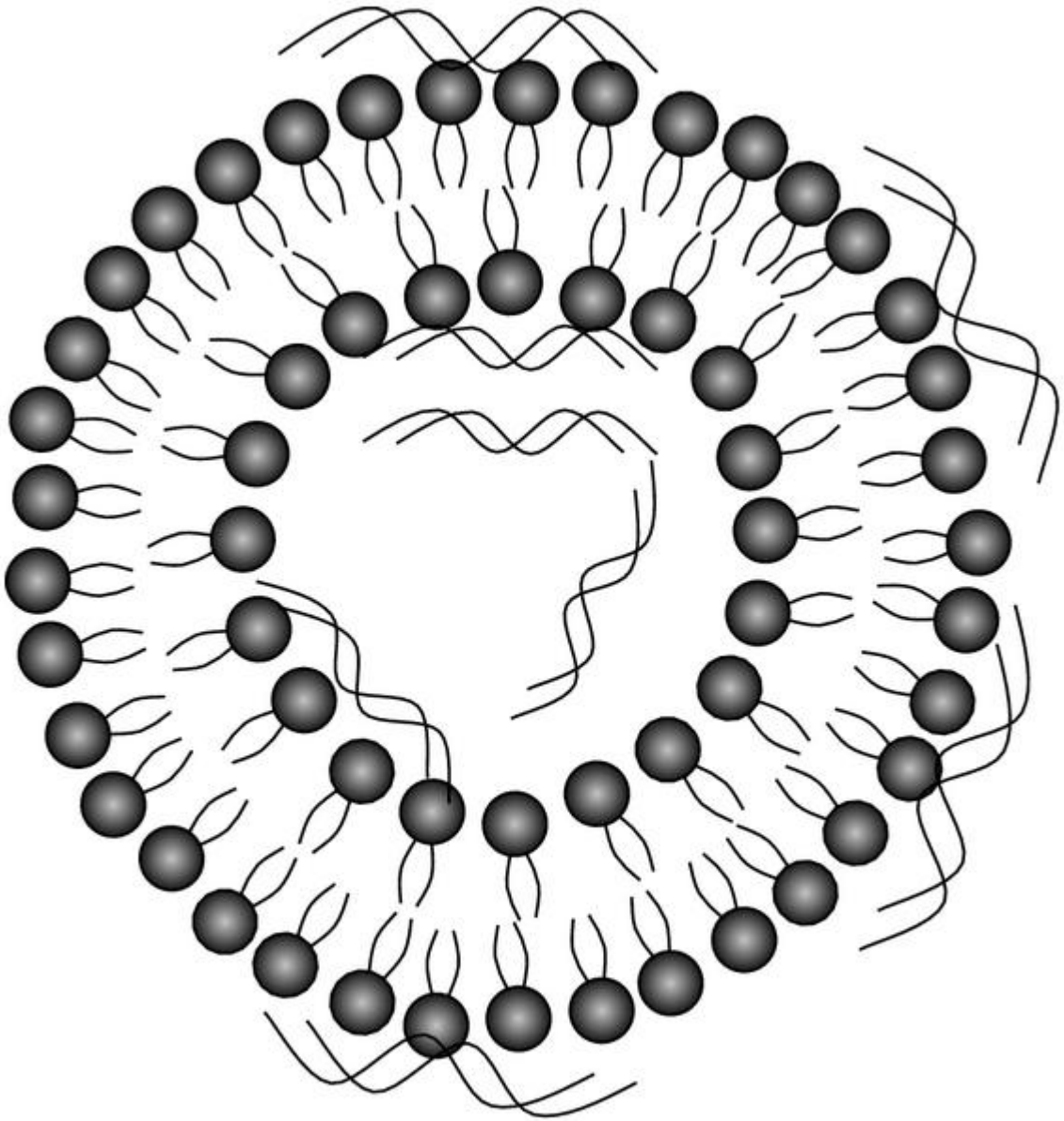
DNA electroporation



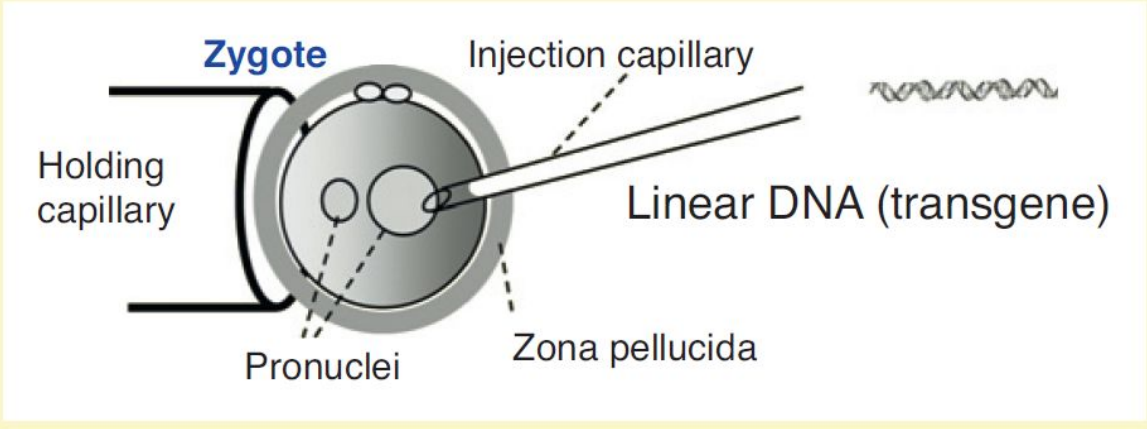

500 nm
A


500 nm
B


500 nm
C

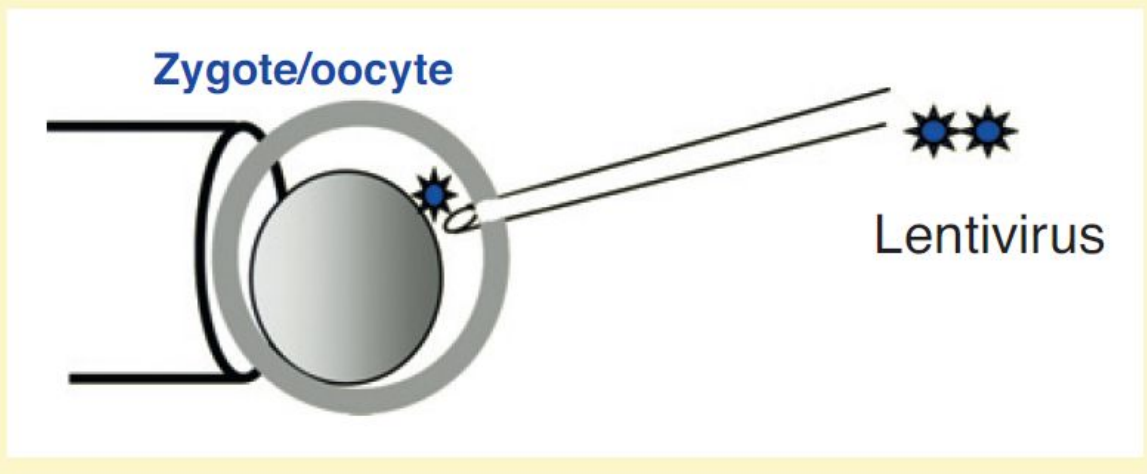


DNA-liposome

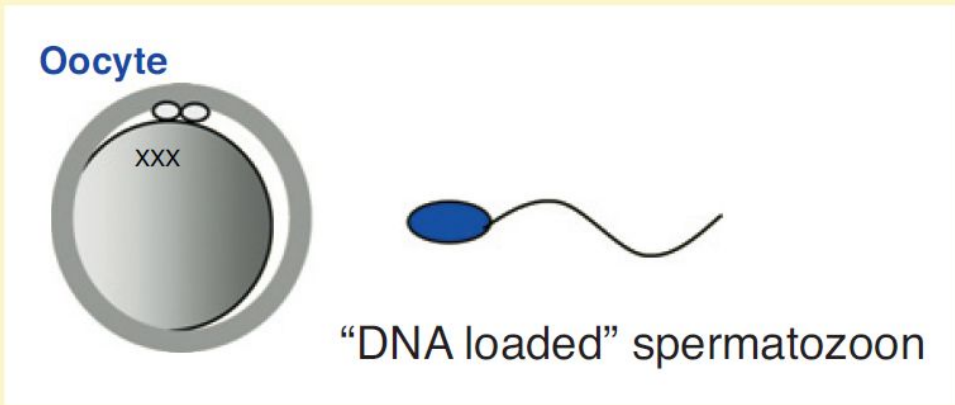


Пронуклеарная микроинъекция

Эффективность 1-5 %



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

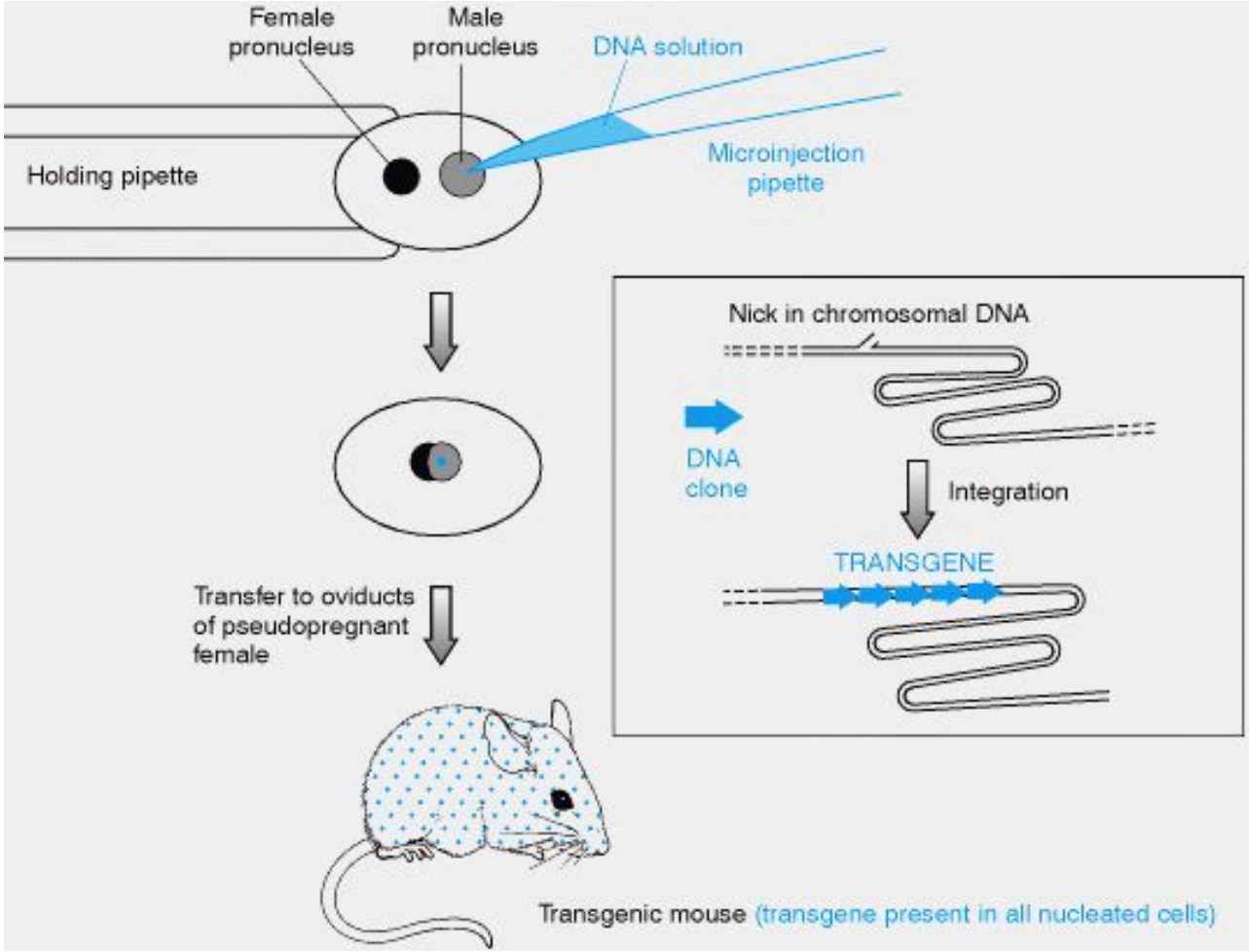


Сперматозоид в качестве вектора доставки

Эффективность около 1-5 %

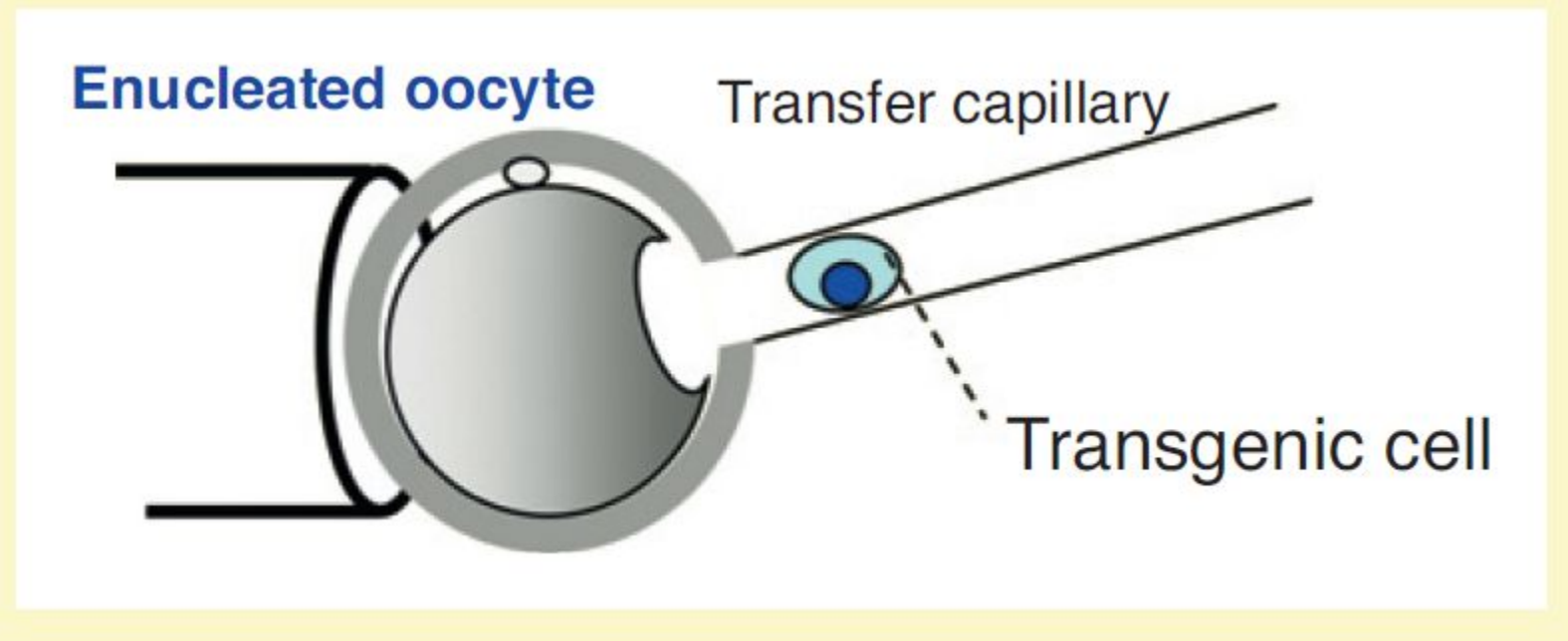
Толщина
волоса

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



Клонирование

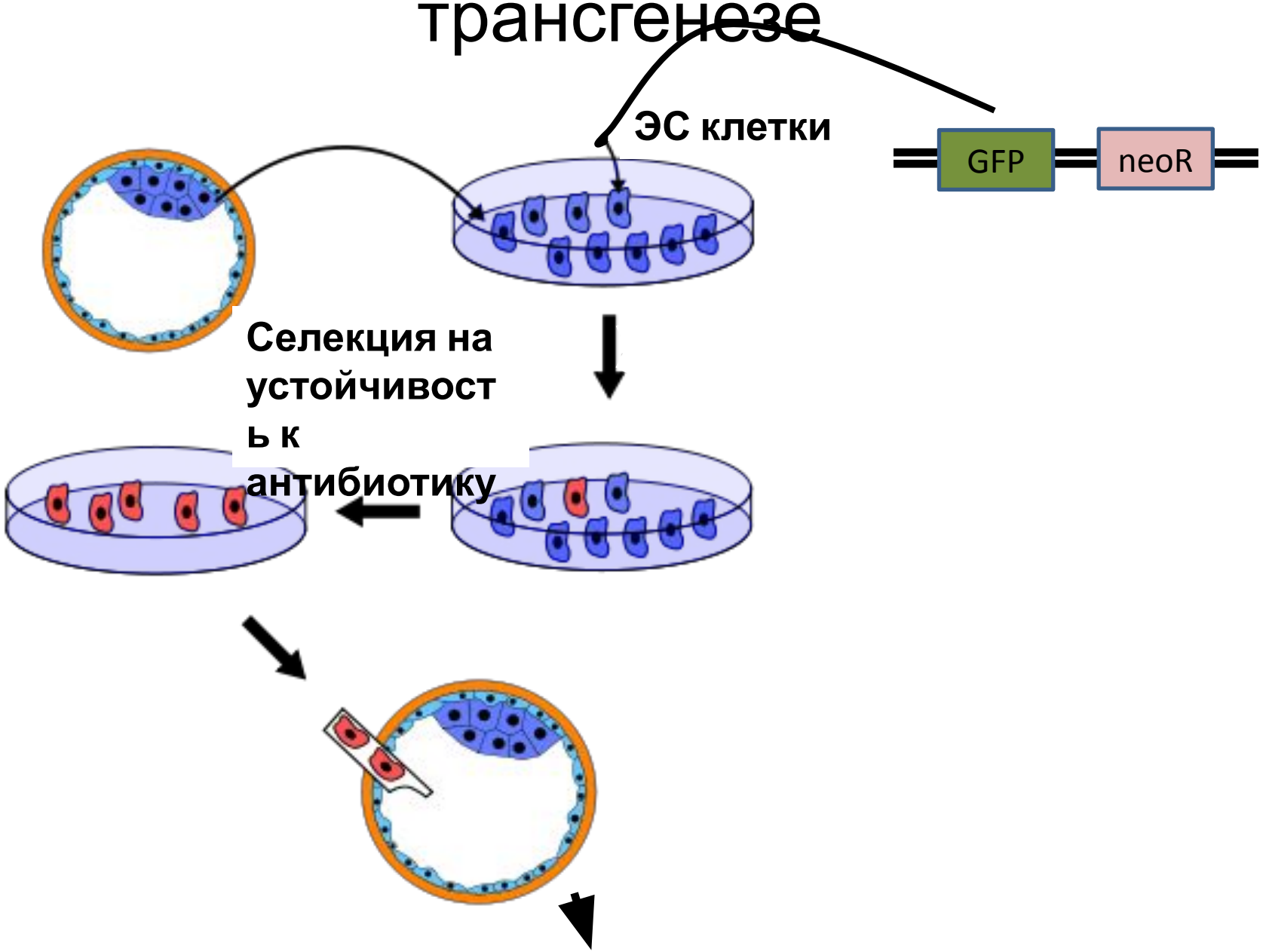
В качестве доноров ядер используется культура трансгенных клеток



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 трансгенезе

суррогатная мать

химера
норма

химера
норма

Гетерозигота по трансгену норма

норма

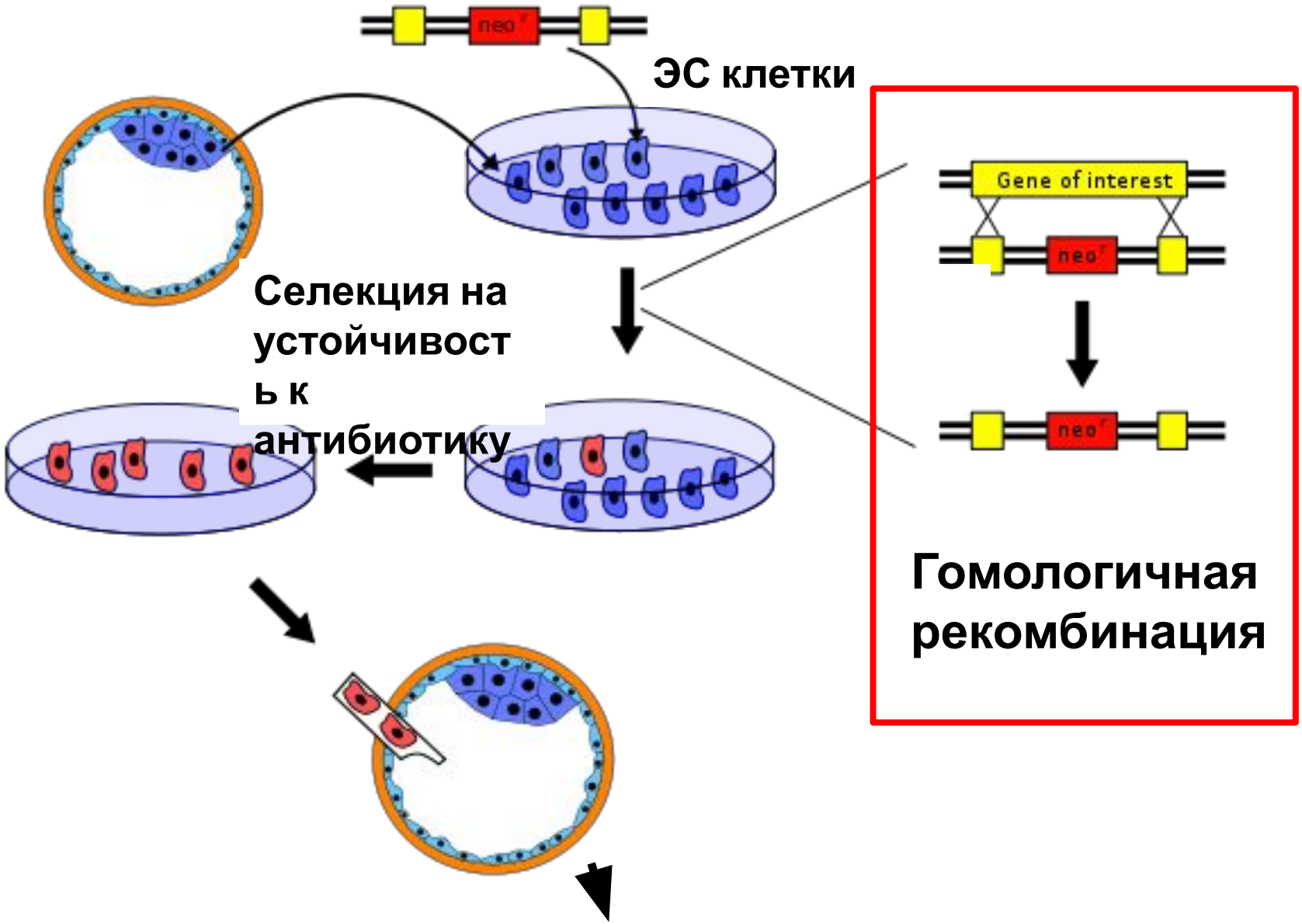
Breeding to produce a mouse

Генный нокаут (knockout)

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

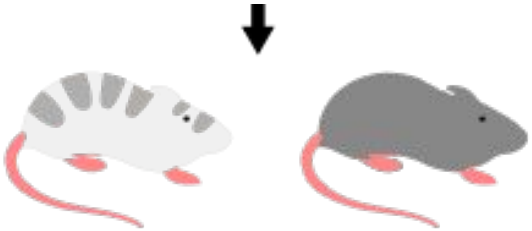
Генный нокаут (knockout)

принципиальная схема



Генный нокаут (knockout)

суррогатная мать



химера
норма

химера
норма

Гетерозигота по нокауту
норма

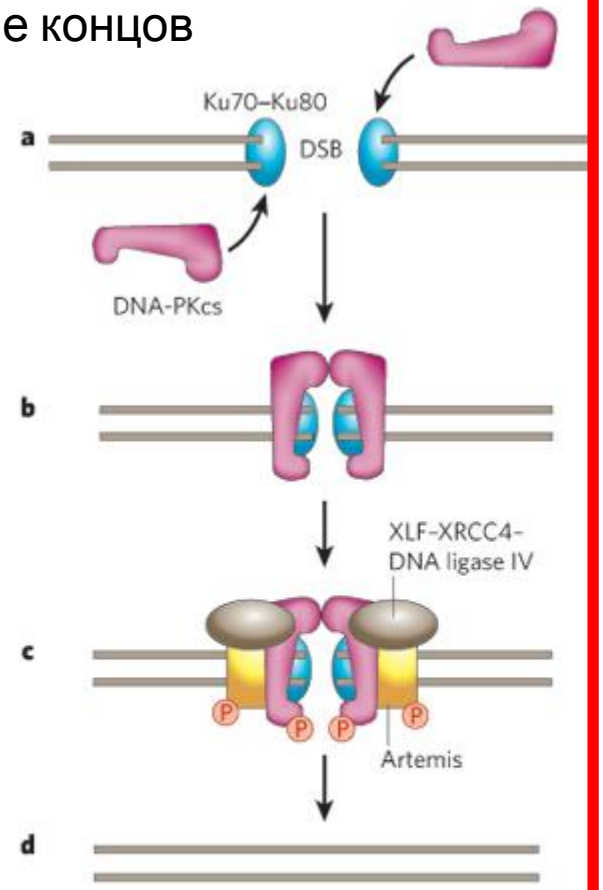
норма

Breeding to produce a mouse

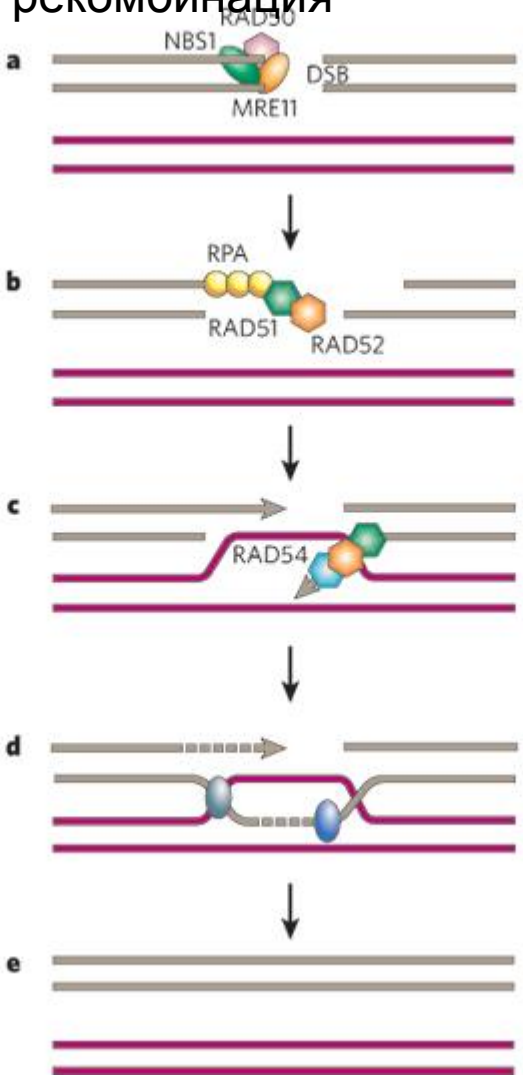
Почему чужеродная ДНК вообще встраивается в геном?

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

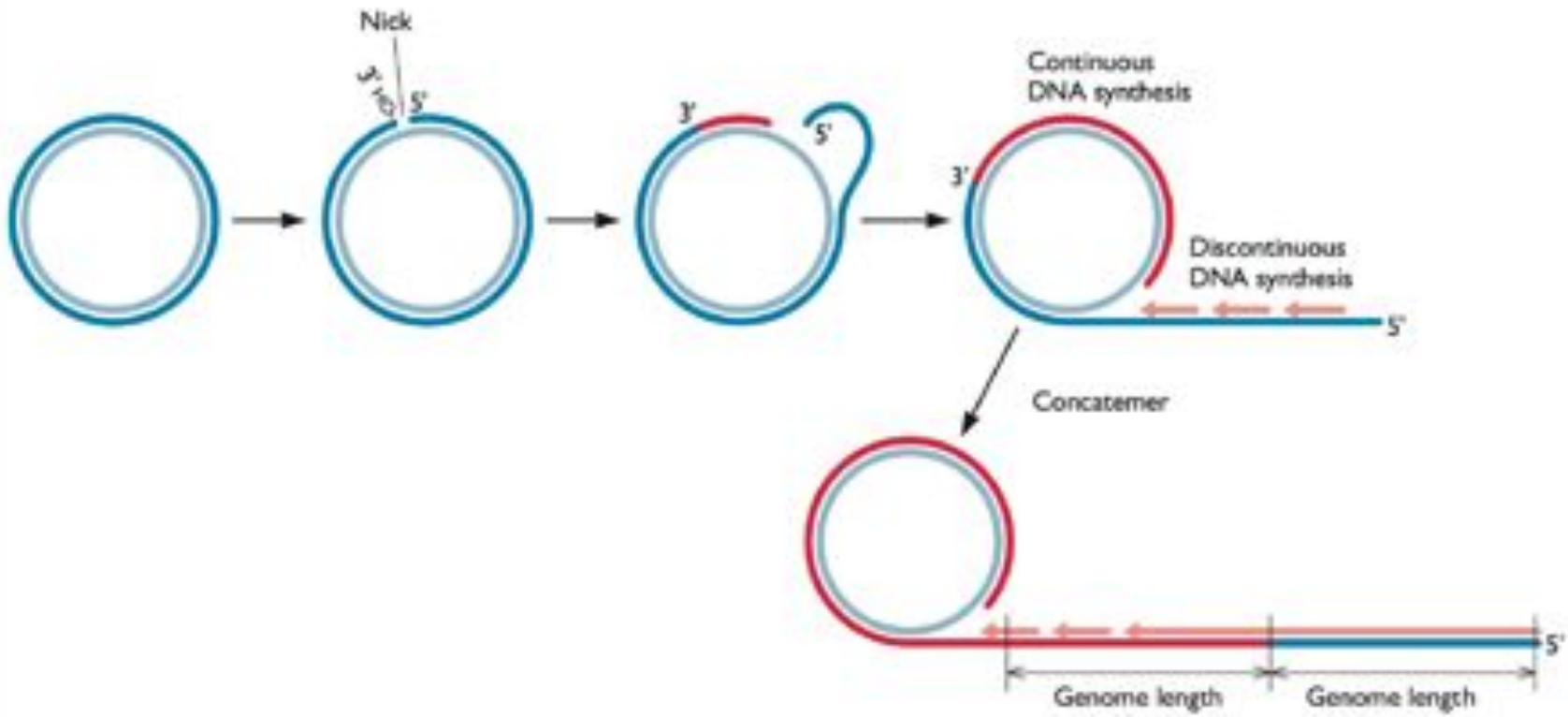
Гомологичная рекомбинация

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.

chromosome
chromosome

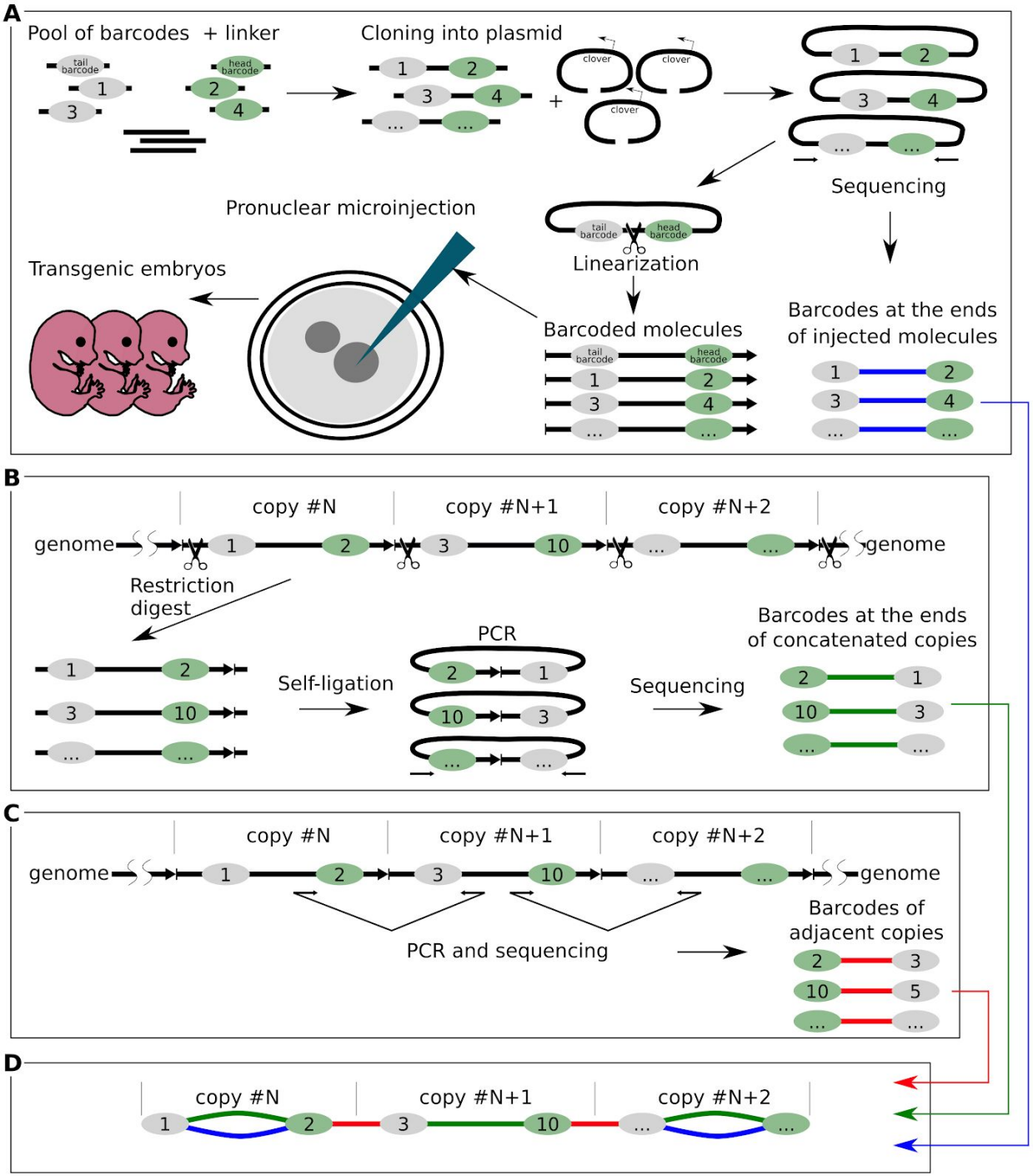
Rolling circle replication



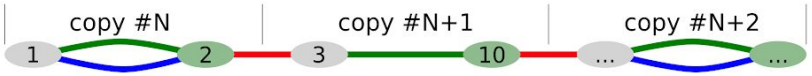
©2009 ASM Press

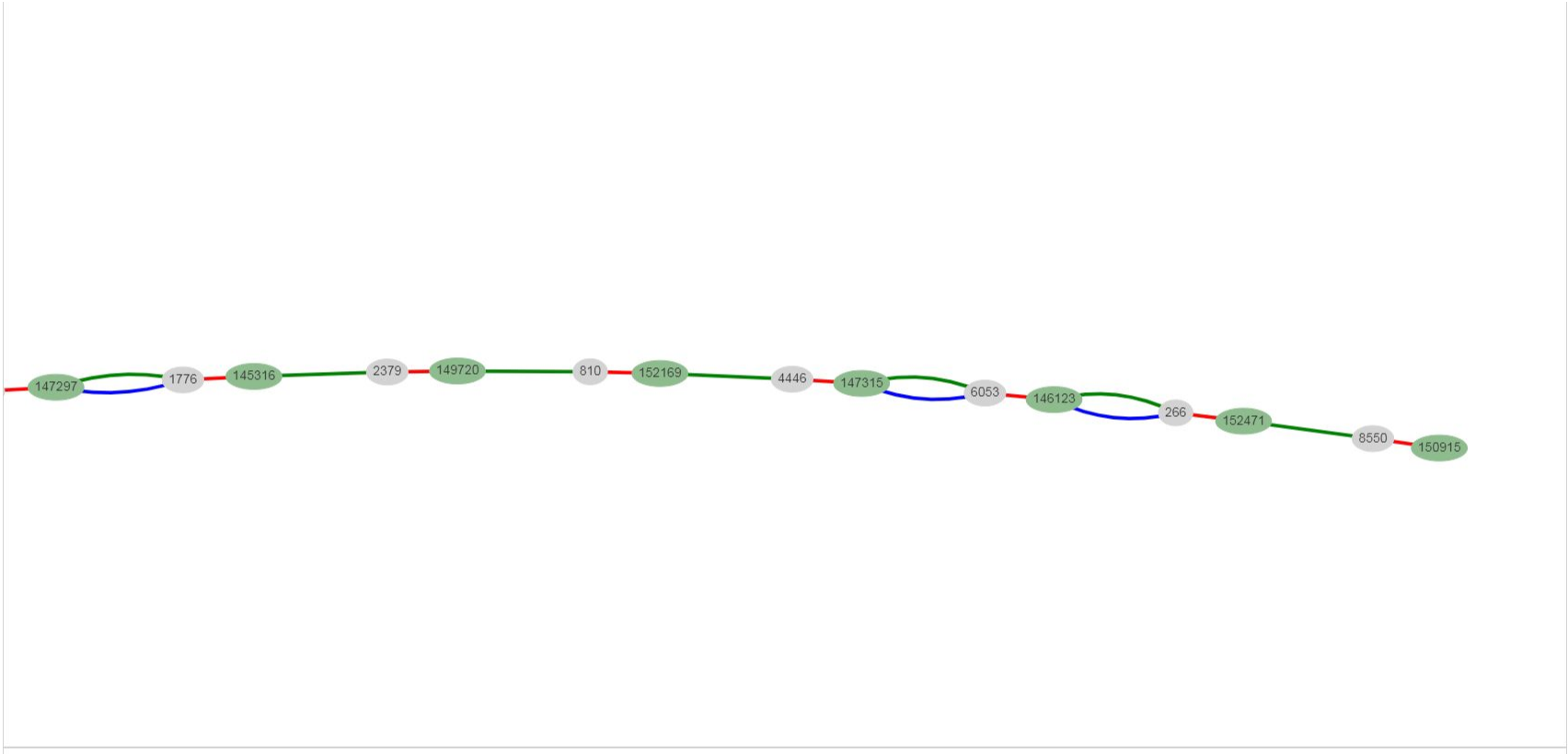
DNA BARCODING

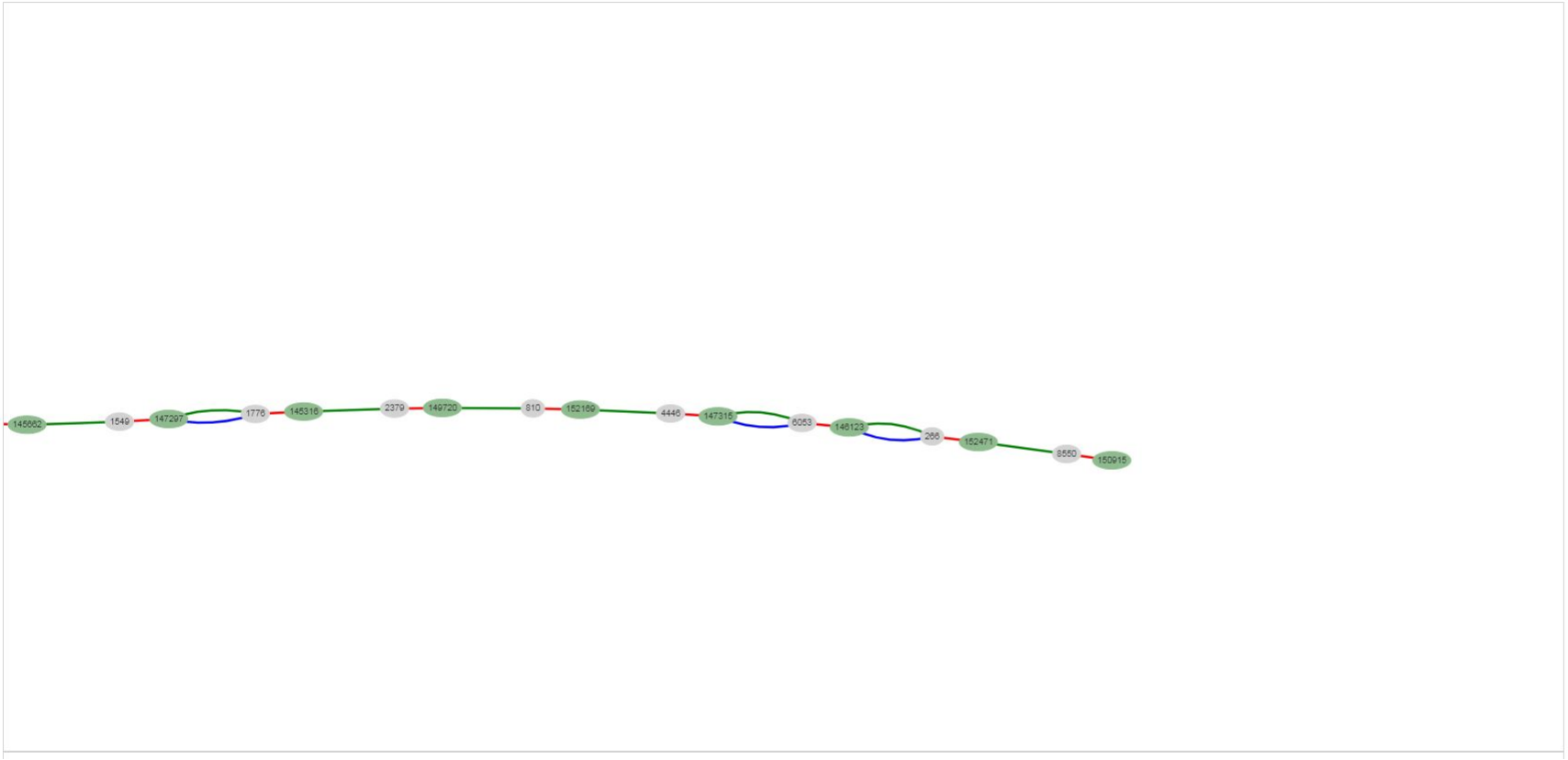
Давай. Вошли и вышли, приключение
на 20 минут.

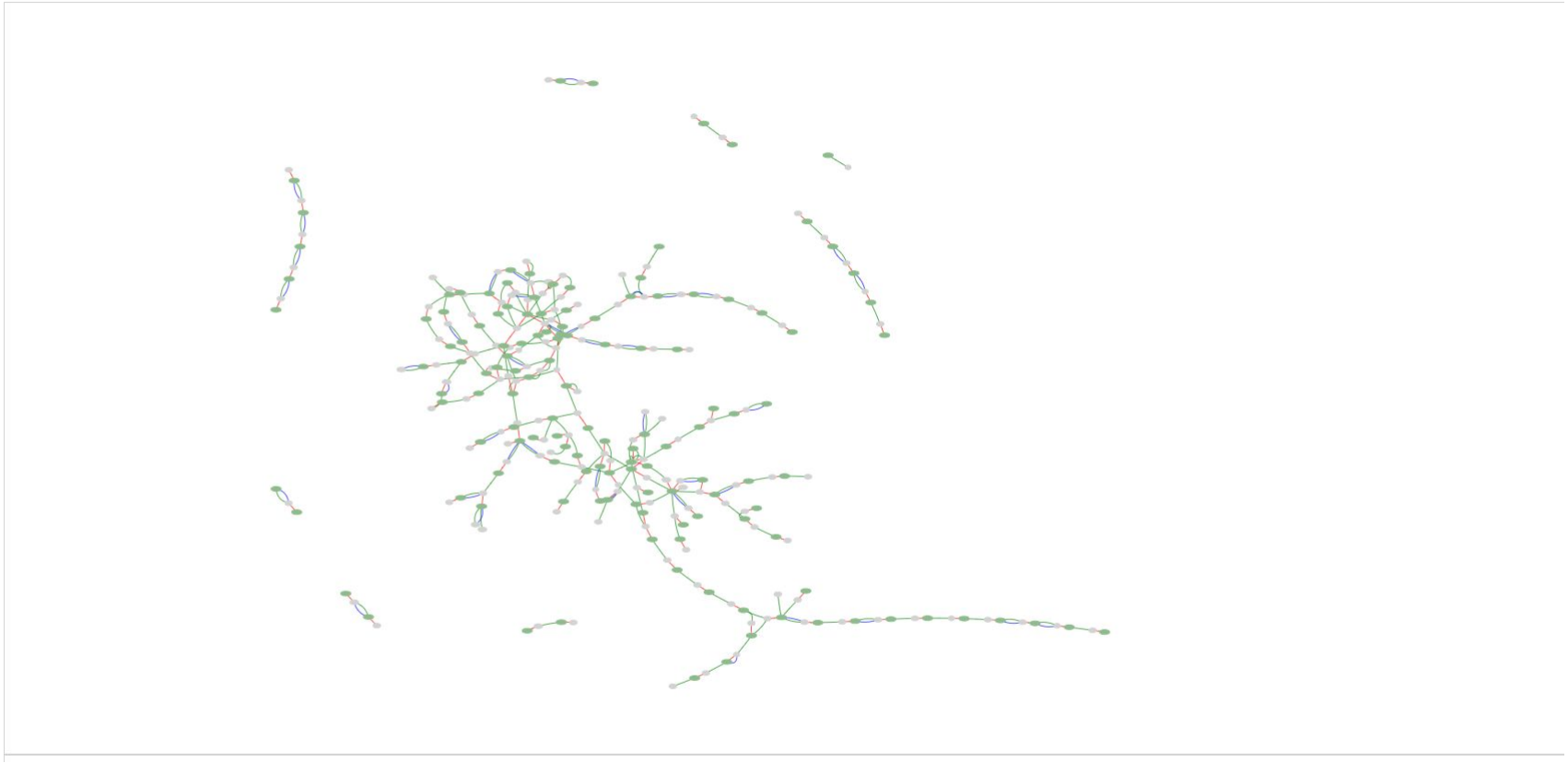

A
Pool of barcodes + linker
tail barcode
head barcode
Cloning into plasmid
clover
Sequencing
Linearization
Pronuclear microinjection
Transgenic embryos
Barcoded molecules
Barcodes at the ends of injected molecules
B
copy #N
copy #N+1
copy #N+2
genome
Restriction digest
Self-ligation
PCR
Sequencing
Barcodes at the ends of concatenated copies
C
PCR and sequencing
Barcodes of adjacent copies
D

VS

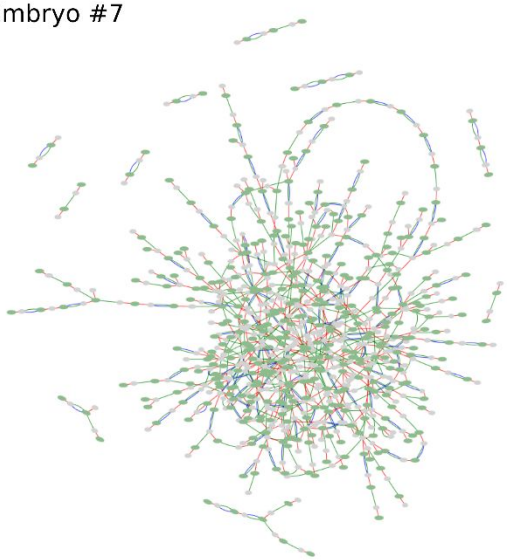



147297
1776
145316
2379
149720
810
152169
4446
147315
6053
146123
266
152471
8550
150915

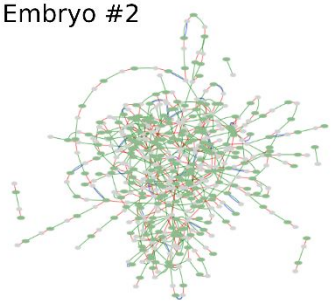

145662
1549
147297
1776
145316
2379
149720
810
152159
4446
147316
6053
146123
266
152471
8550
150915



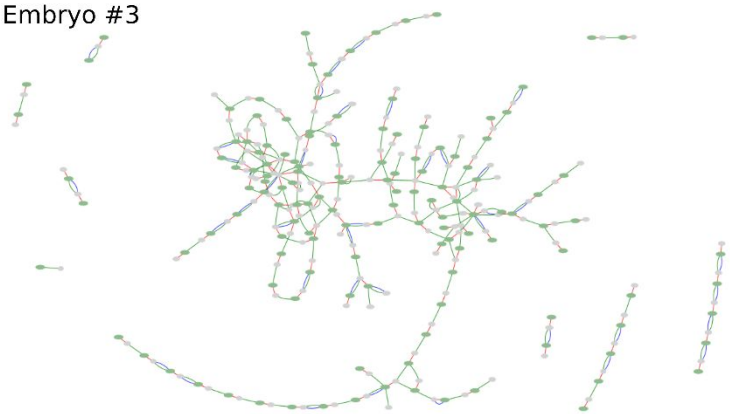
Embryo #7

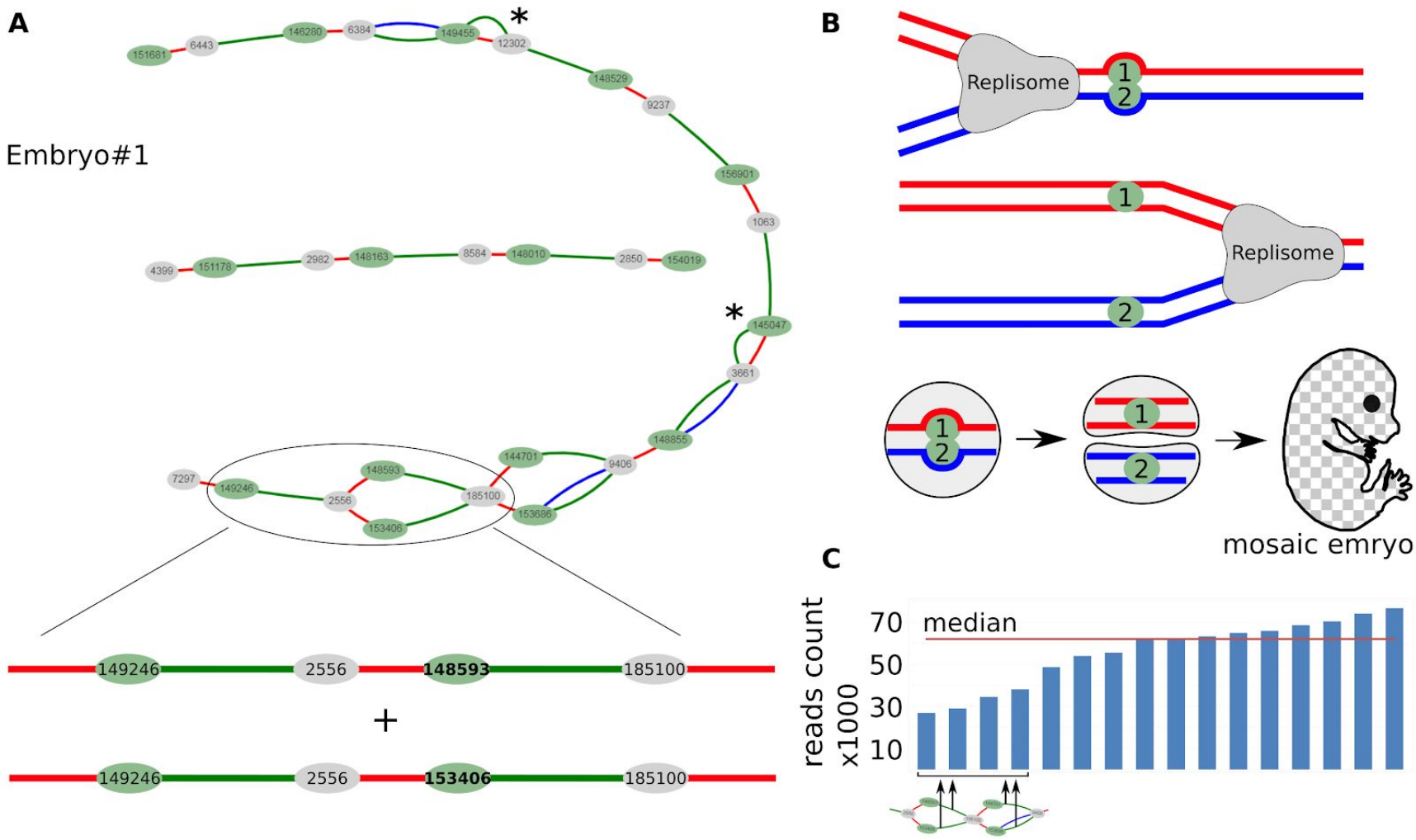


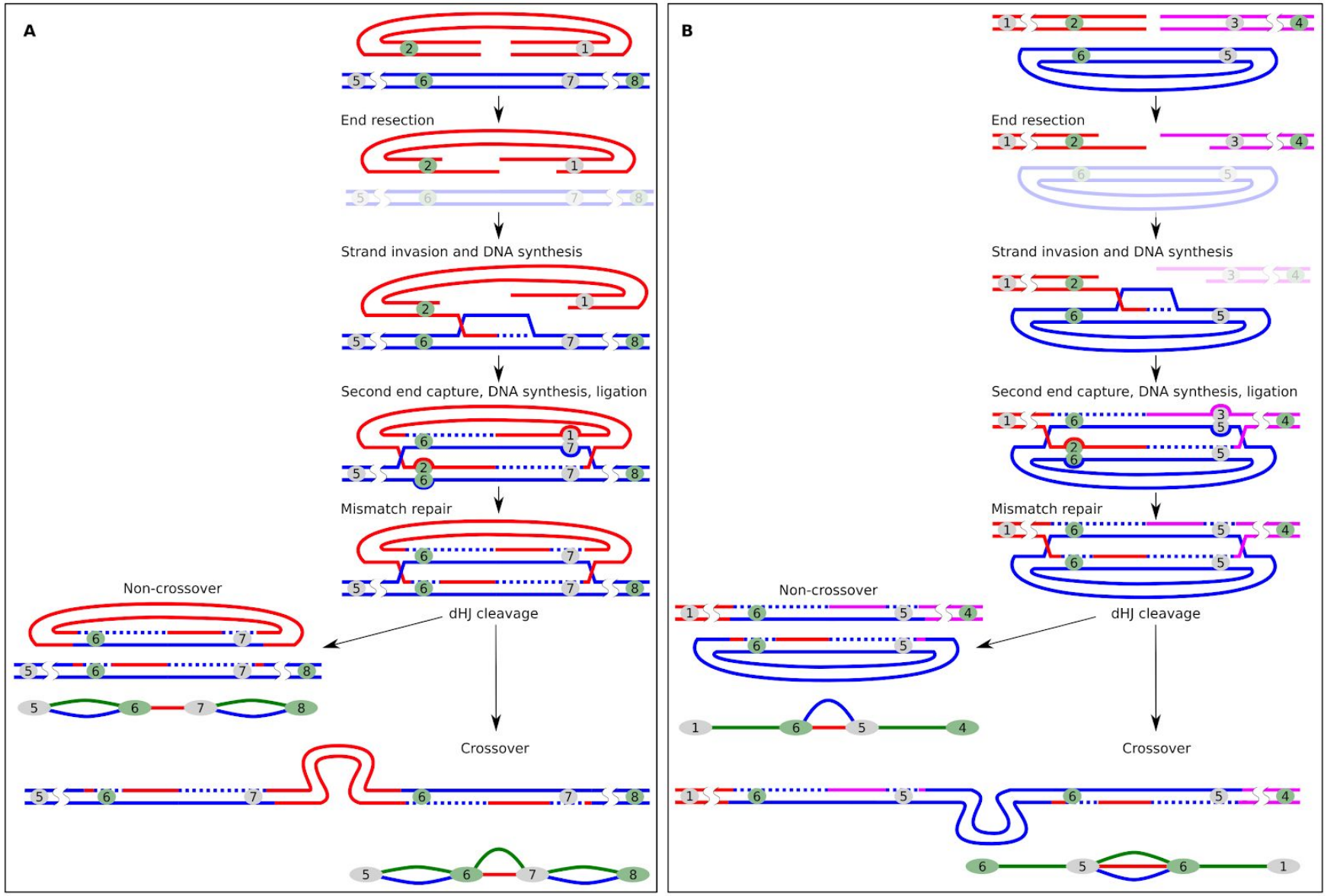
Embryo #2



Embryo #3

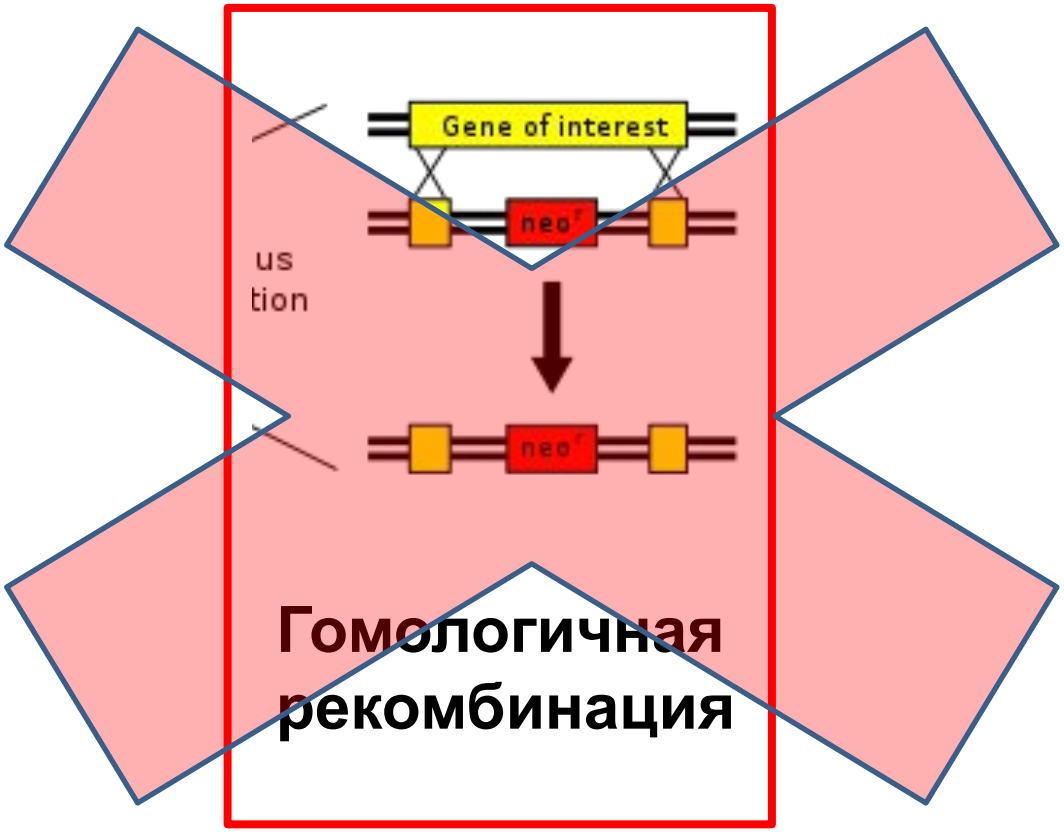



A
Embryo#1
151681
6443
146280
6384
149455
12302
148529
9237
156901
1063
145047
3661
148855
9406
144701
153686
185100
153406
148593
2556
149246
7297
154019
2850
148010
8584
148163
2982
151178
4399
149246
2556
148593
185100
+
149246
2556
153406
185100
B
Replisome
1
2
Replisome
1
2
1
2
1
2
mosaic emryo
C
reads count
x1000
70
50
30
10
median


A
End resection
Strand invasion and DNA synthesis
Second end capture, DNA synthesis, ligation
Mismatch repair
dHJ cleavage
Non-crossover
Crossover
B
End resection
Strand invasion and DNA synthesis
Second end capture, DNA synthesis, ligation
Mismatch repair
dHJ cleavage
Non-crossover
Crossover

Генный нокаут (knockout)

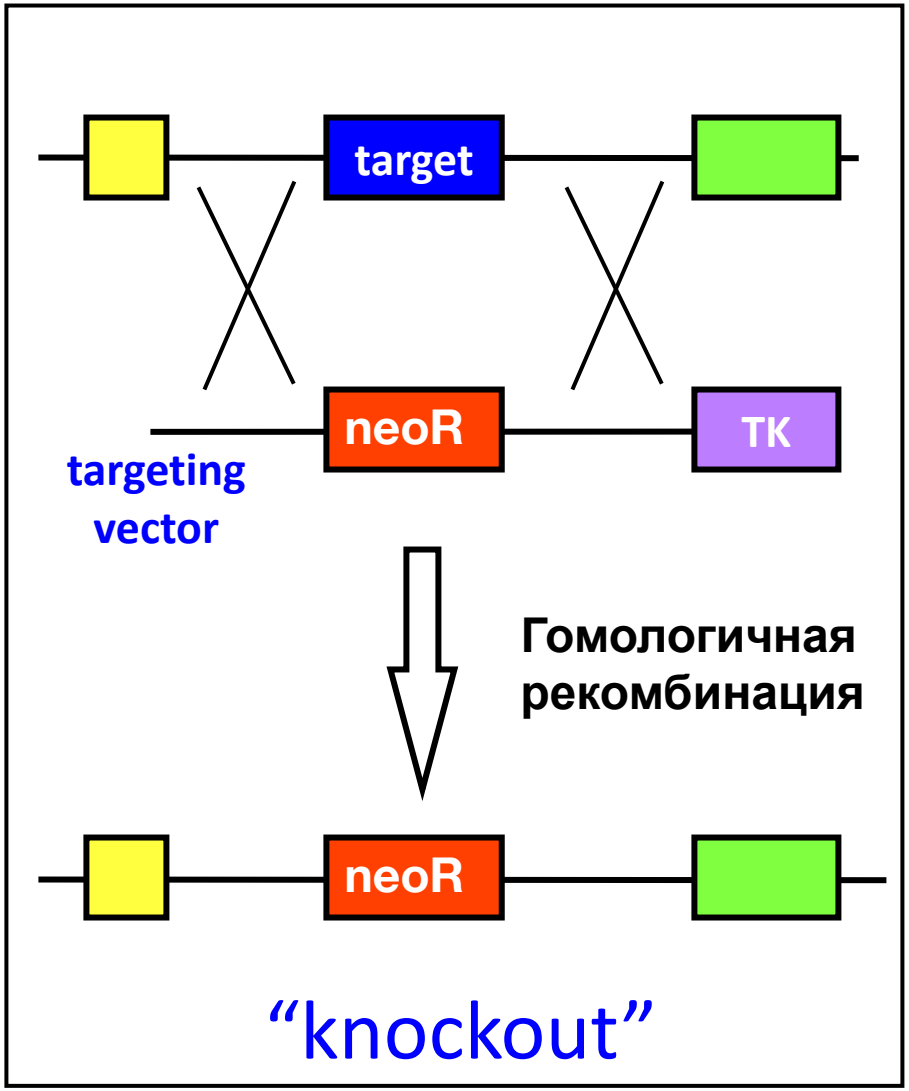
реальная схема



Системы положительной селекции по резистентности к антибиотику не достаточно

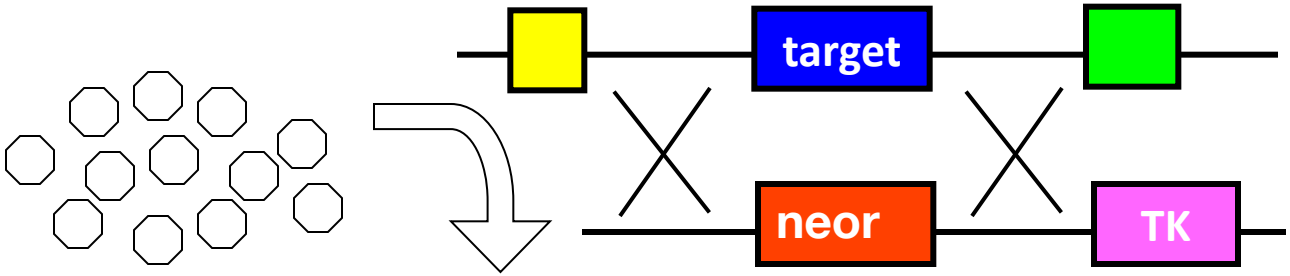
Генный нокаут (knockout)

реальная схема

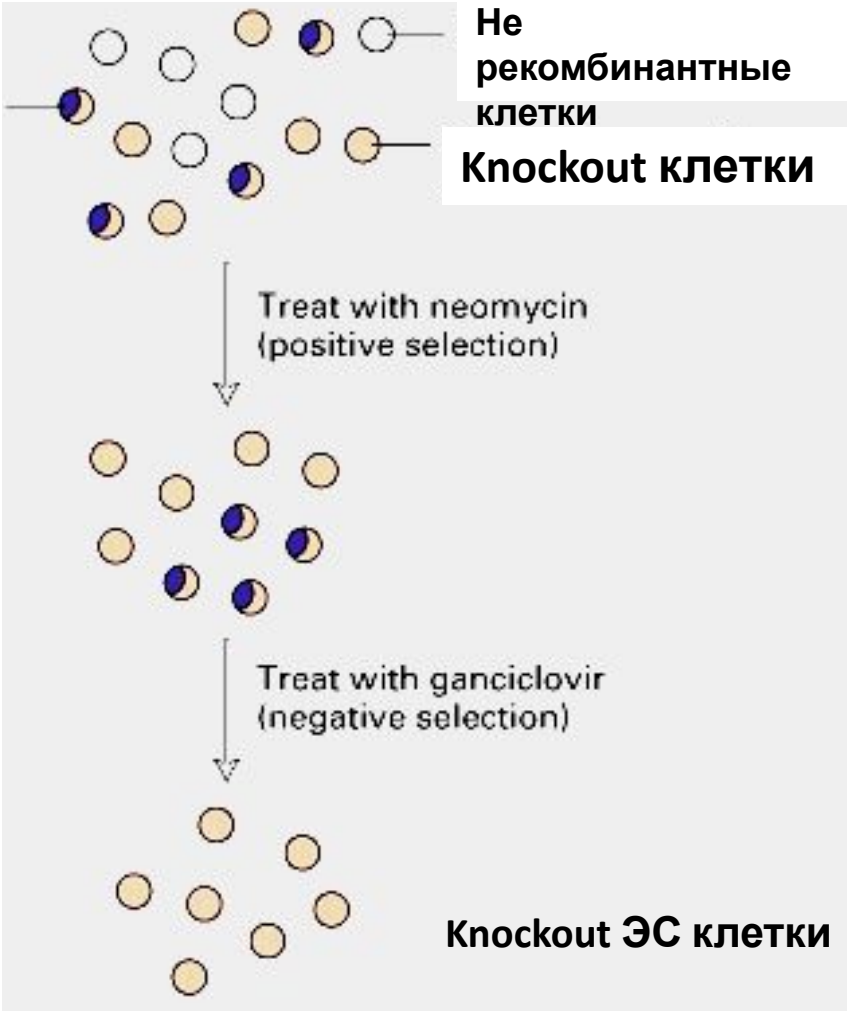


- ген тимидин киназы вируса герпеса

ЭС клетки



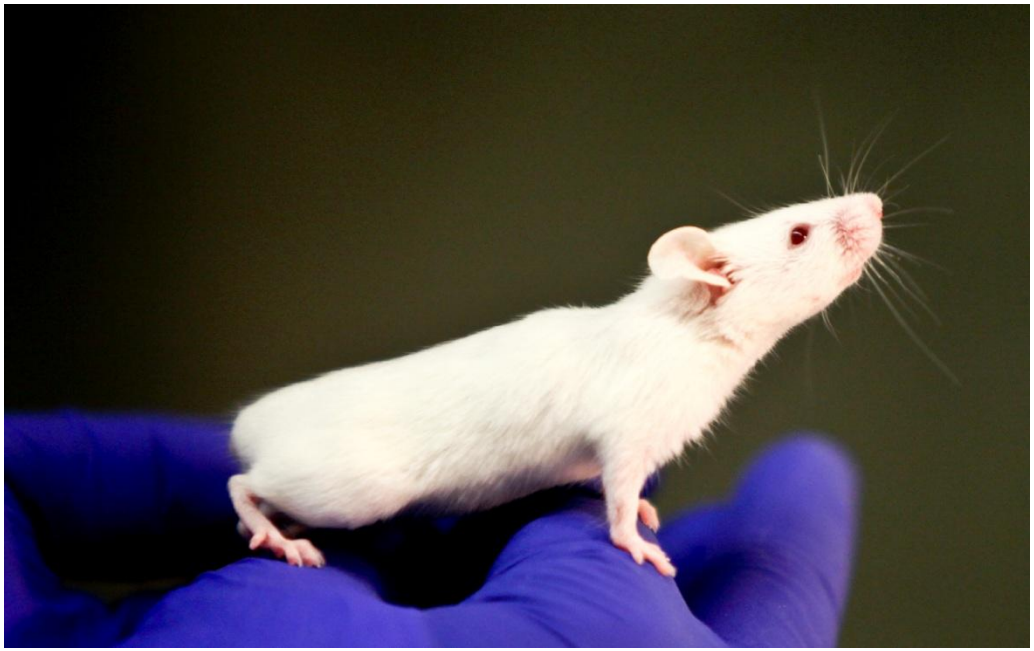
Случайная инсерция трансгена



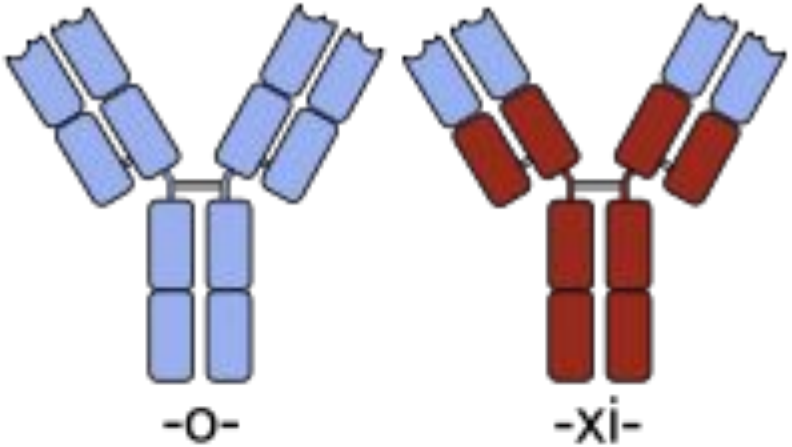
+ Селекция на устойчивость к антибиотику

- Селекция на устойчивость к ганцикловиру

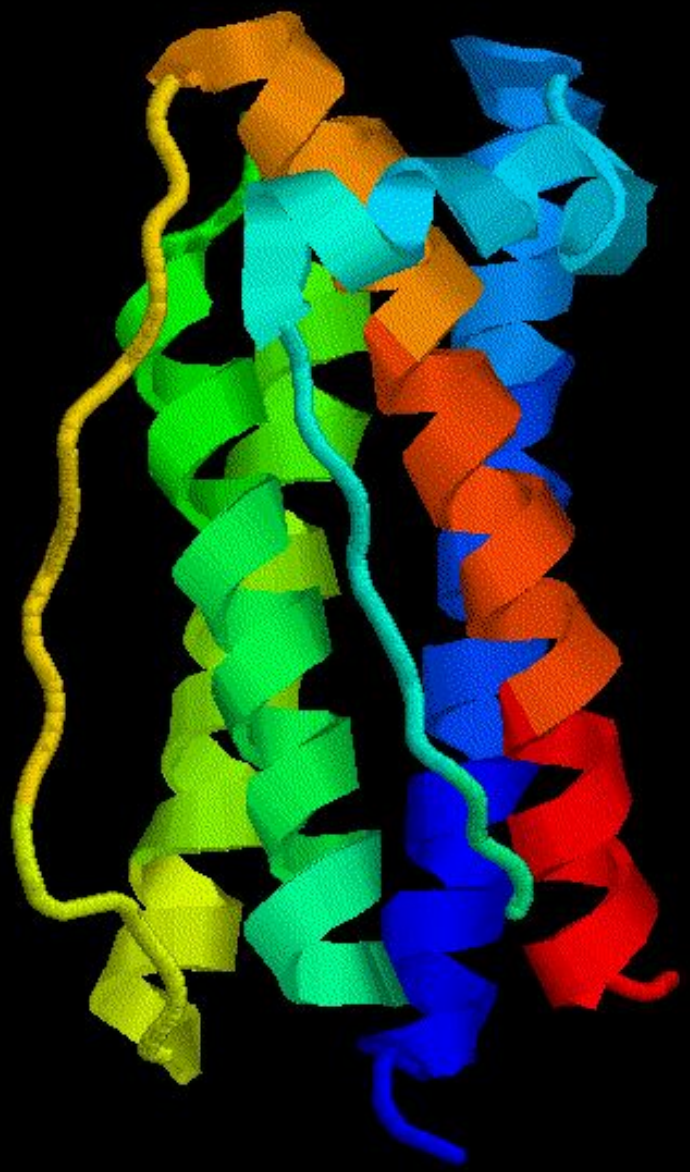
Gene targeting
применение



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

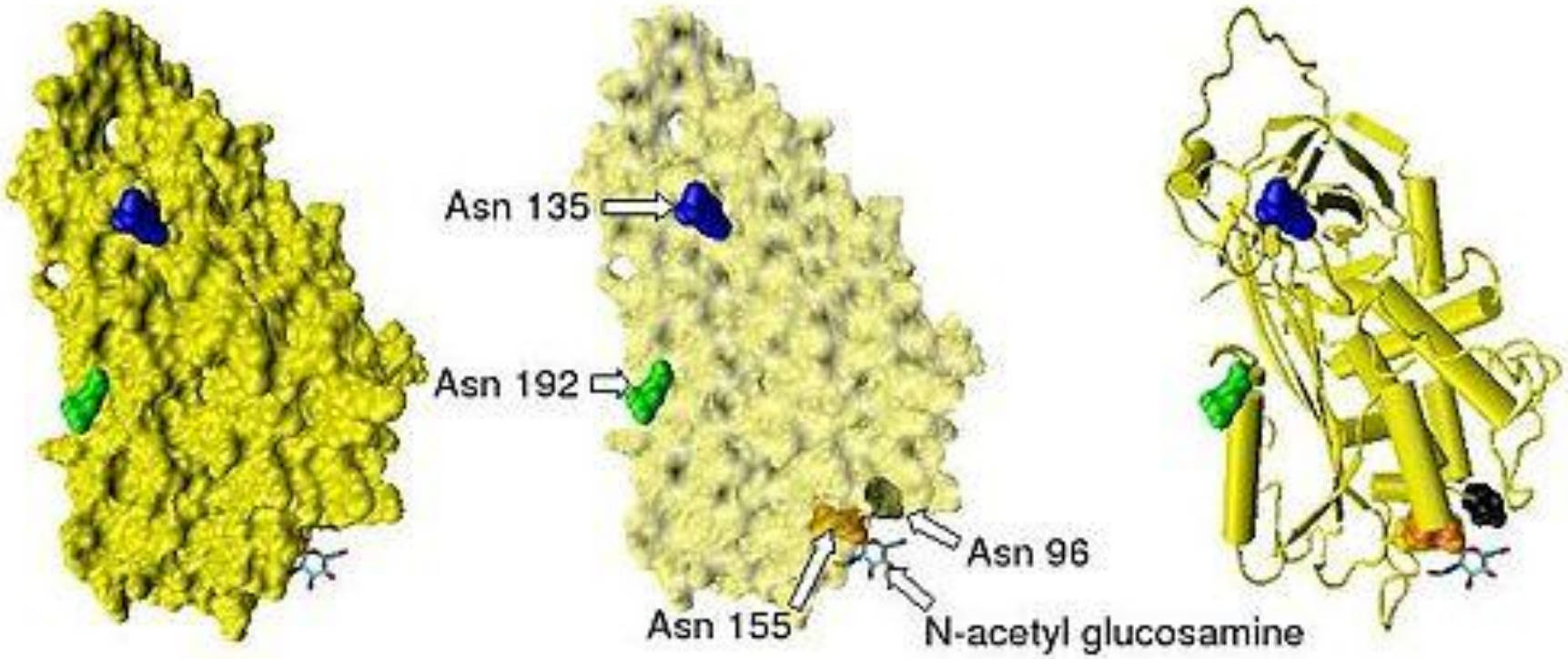


Гранулоцит-колониестимулирующий фактор
Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor

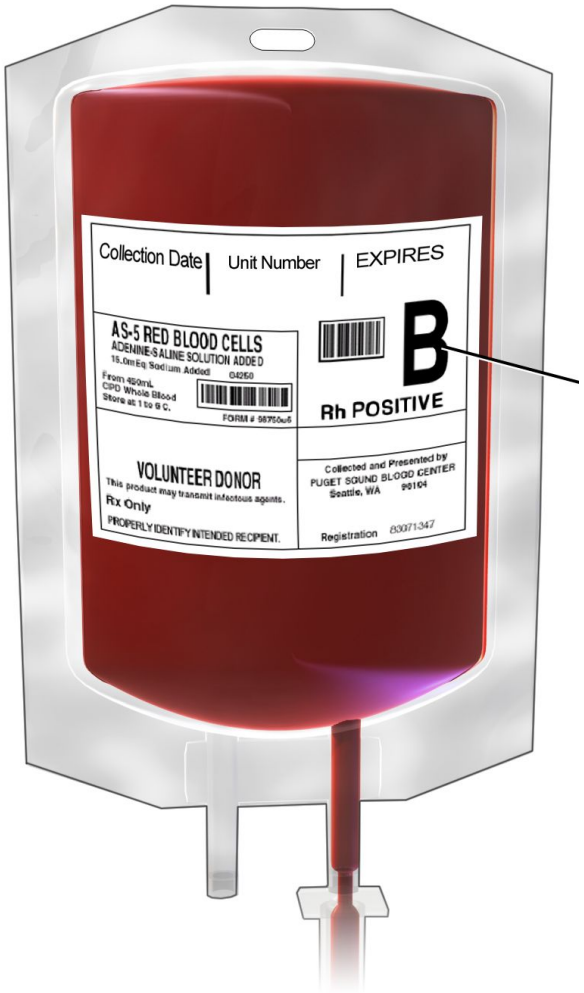


Nephila clavipes

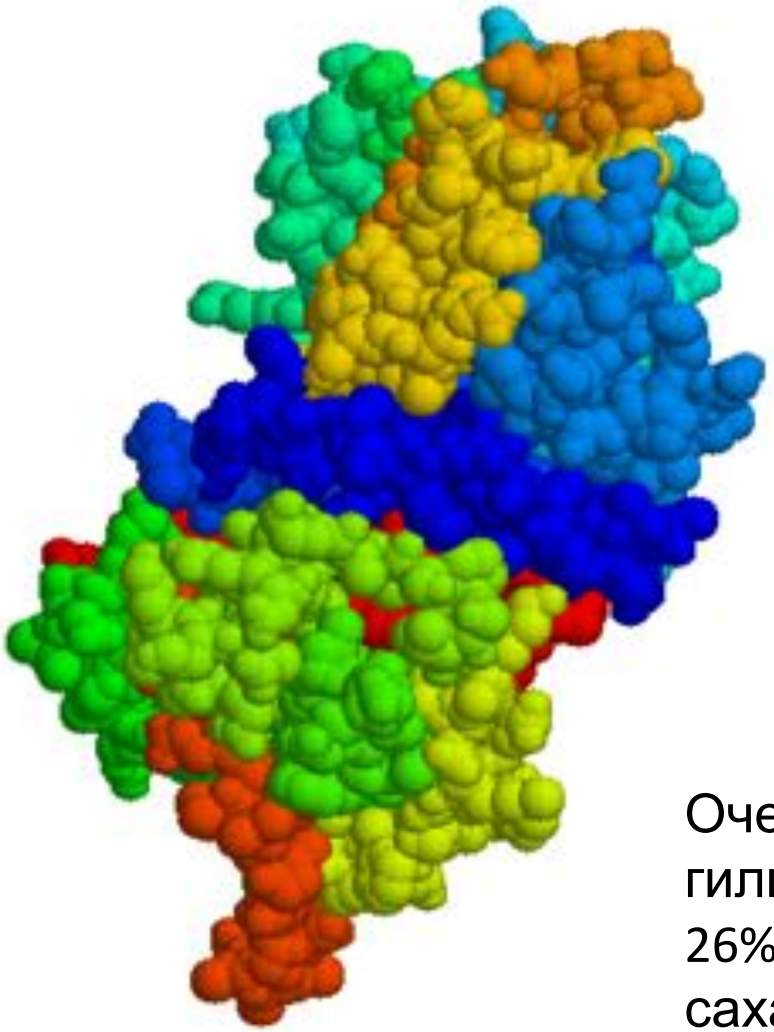
Антитромбин ATryn



ATryn



1 коза = 90000 доноров



С1-ингибитор системы комплемента

Недостаток приводит к развитию наследственного ангионевротического отёка

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

Очень сильно гиликозилирован 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

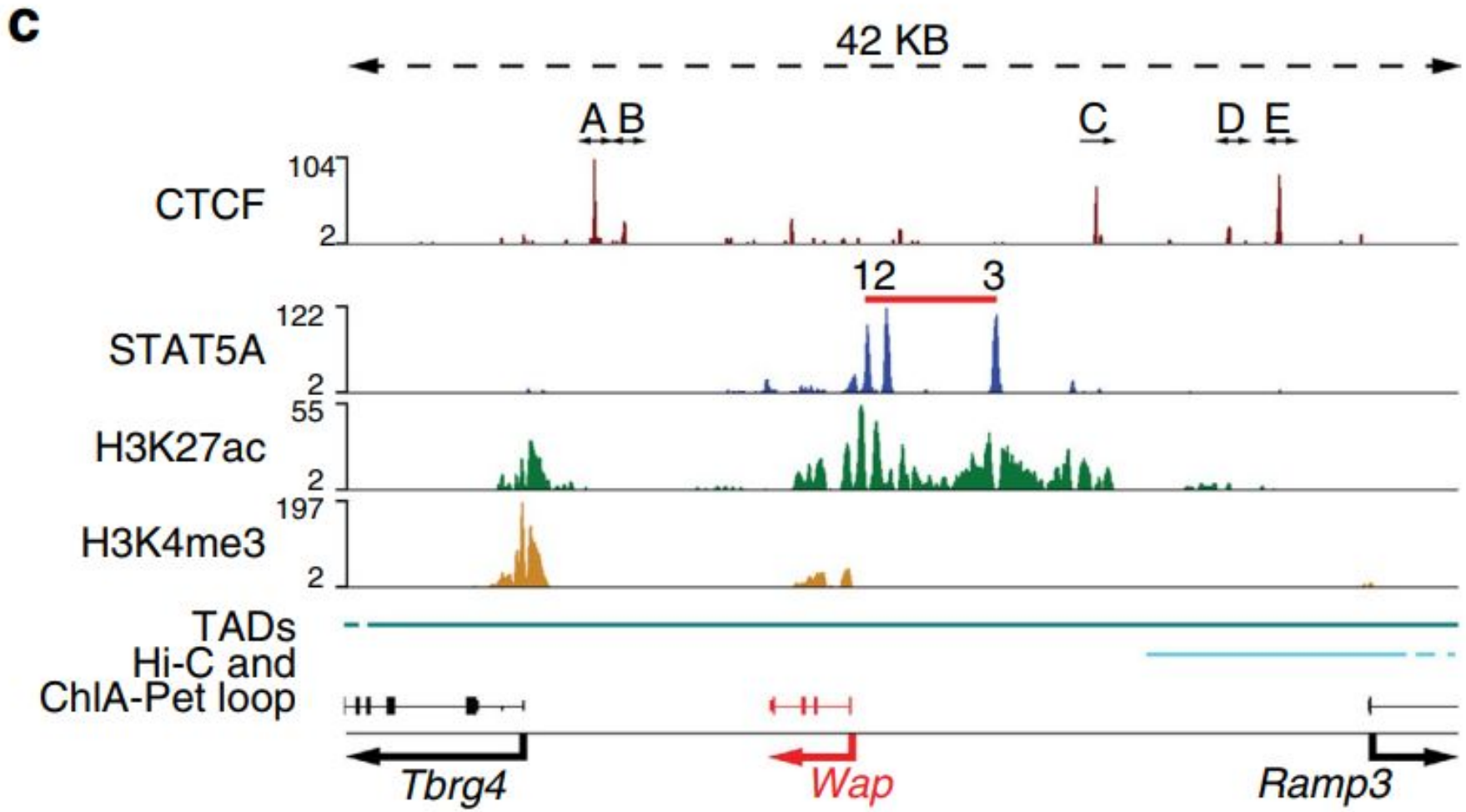
c

DR4

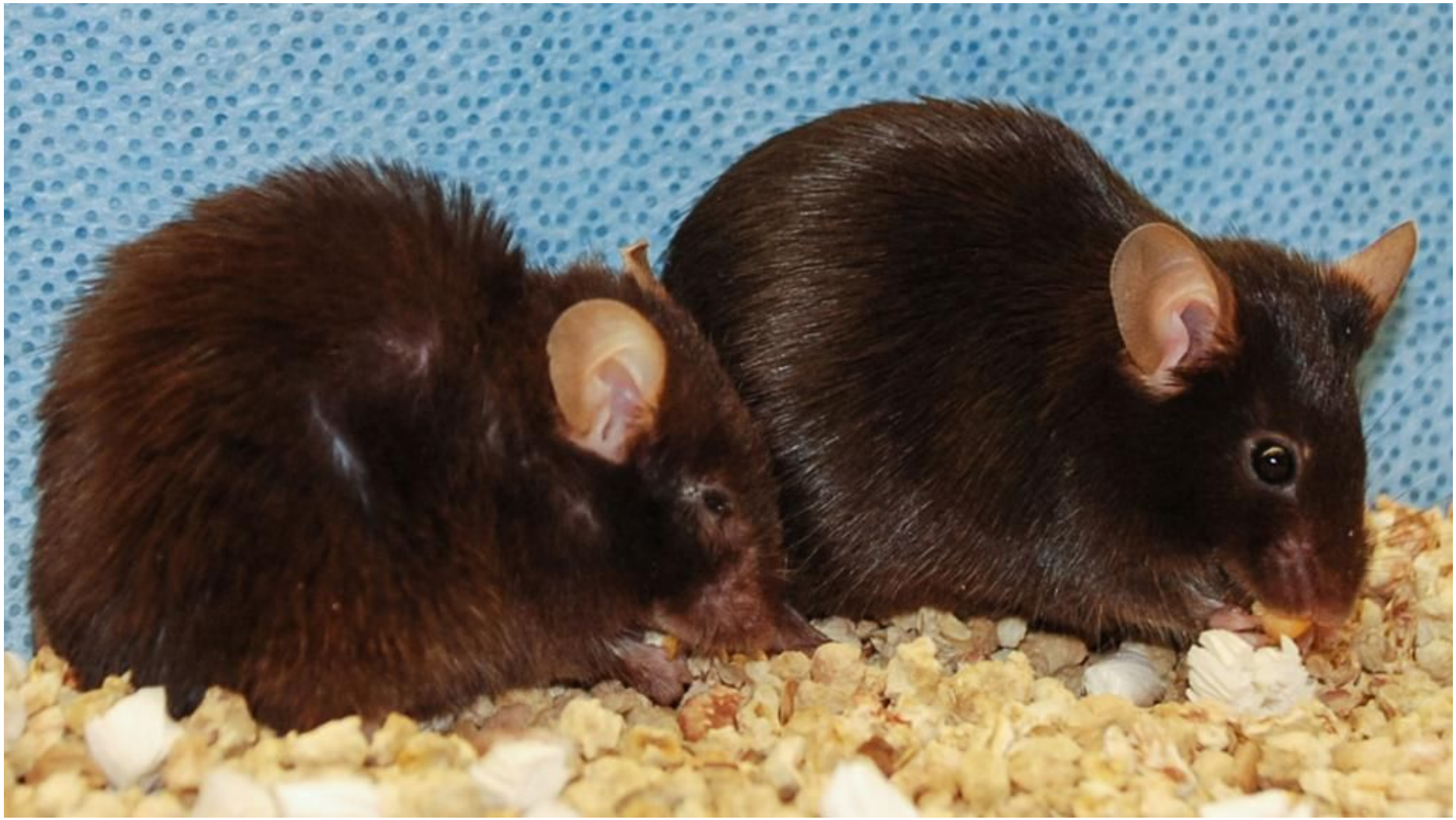
EF-PDGF

DR4 + EF-PDGF

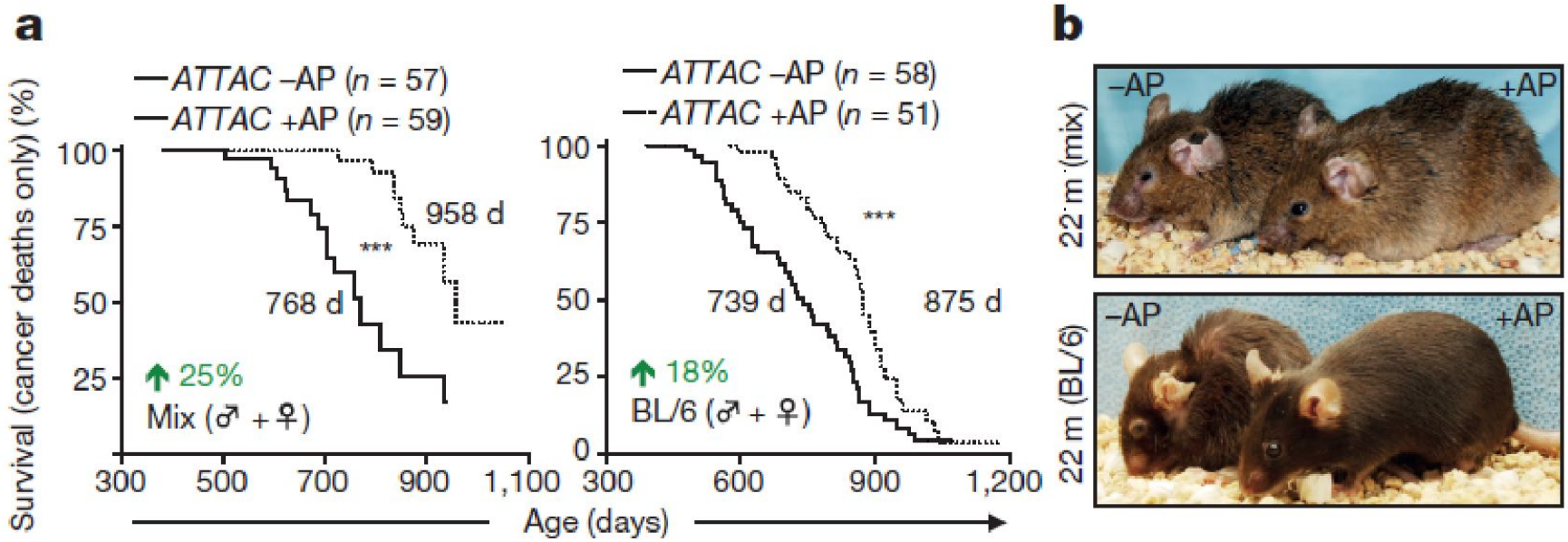
Активность генов тонко контролируется удаленными энхансерами

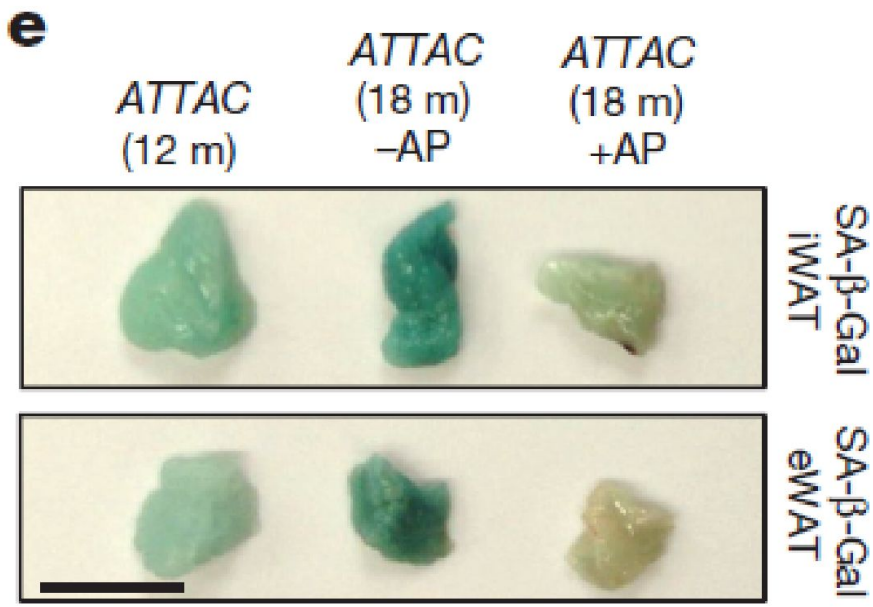


PEPCK-C^{mus} mice were created by introducing the cDNA for the enzyme (phosphoenolpyruvate carboxykinase), linked to the human α-skeletal actin gene promoter



INK-ATTAC, a transgenic mouse model that expresses the FK506-bindingprotein–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).


a
ATTAC –AP (n = 57)
ATTAC +AP (n = 59)
Survival (cancer deaths only) (%)
100
75
50
25
958 d
***
768 d
25%
Mix (♂ + ♀)
300
500
700
900
1,100
ATTAC –AP (n = 58)
ATTAC +AP (n = 51)
100
75
50
25
0
***
739 d
875 d
18%
BL/6 (♂ + ♀)
300
600
900
1,200
Age (days)
b
–AP
+AP
22 m (mix)
–AP
+AP
22 m (BL/6)


e
ATTAC (12 m)
ATTAC (18 m) –AP
ATTAC (18 m) +AP
SA-β-Gal iWAT
SA-β-Gal eWAT

Wild type

‘Serpentized’

Трансгенный лосось

рыбы в возрасте 18 месяцев

рыбы в возрасте 36 месяцев

Где взять нужные гены?

Американская бельдюга

Чавыча

промотор гена антифриз-белка

ген гомона роста

Трансгенный лосось одной рыбы хватить на целый месяц…

если сможете его поймать!

+

Гормо
н
роста

KFC

Как генная инженерия помогла в производстве некаллорийного 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 трансгенеза

CRE/loxP система интеграции фага P1

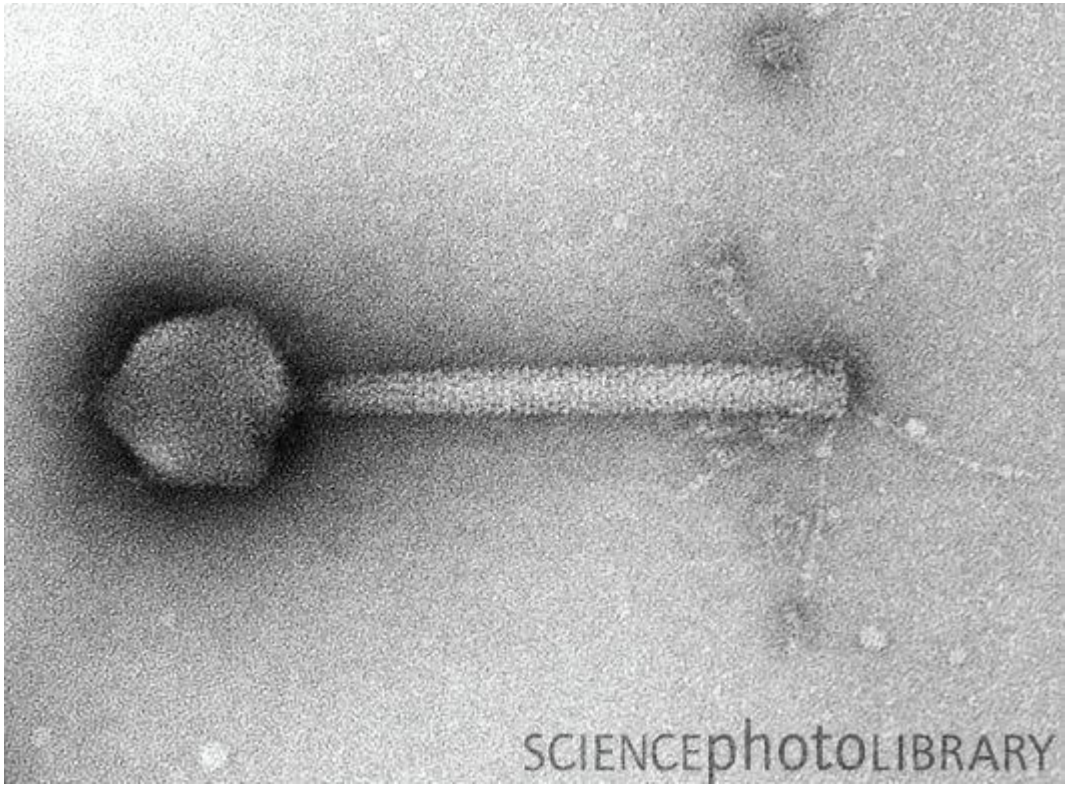
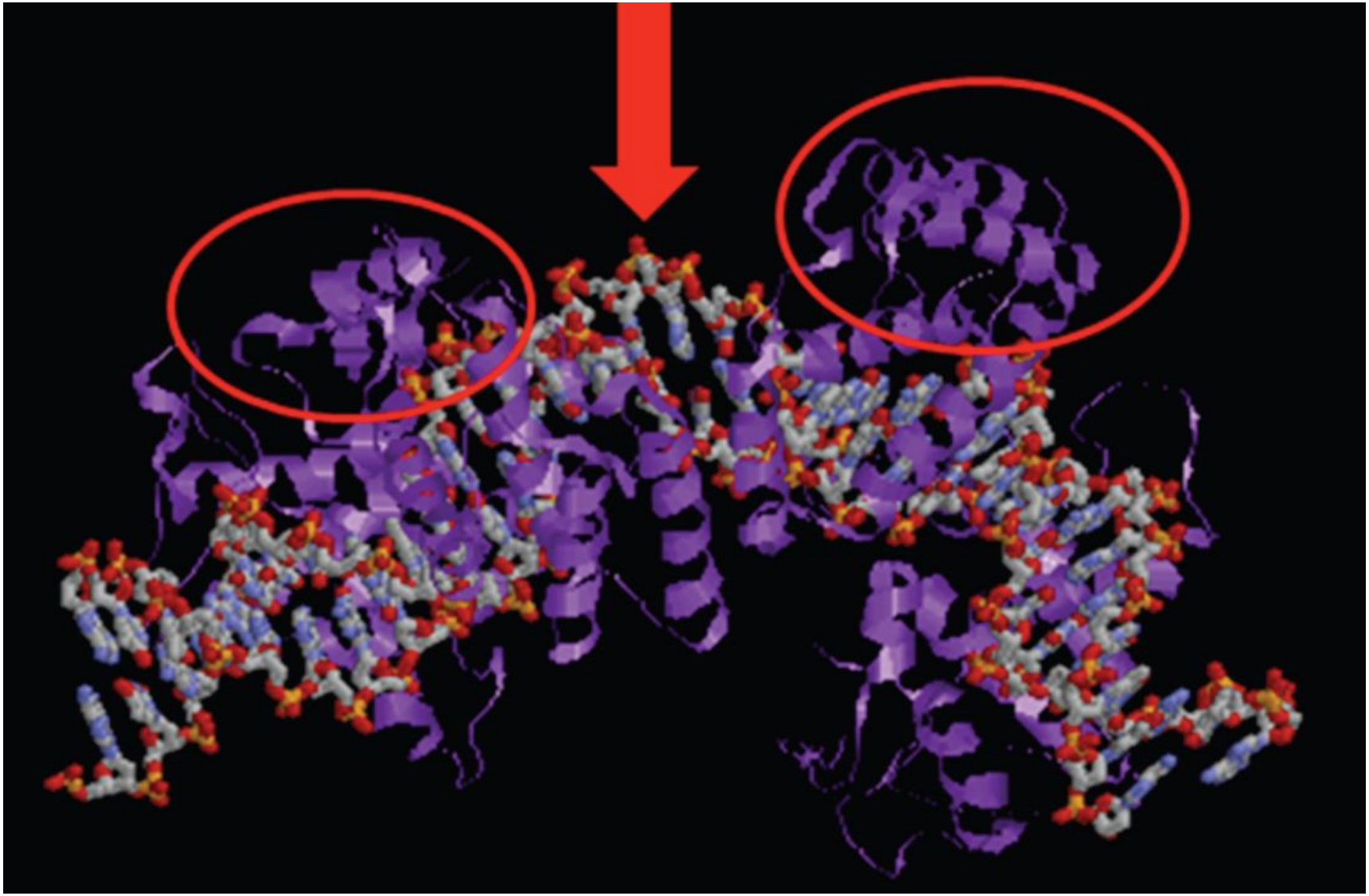


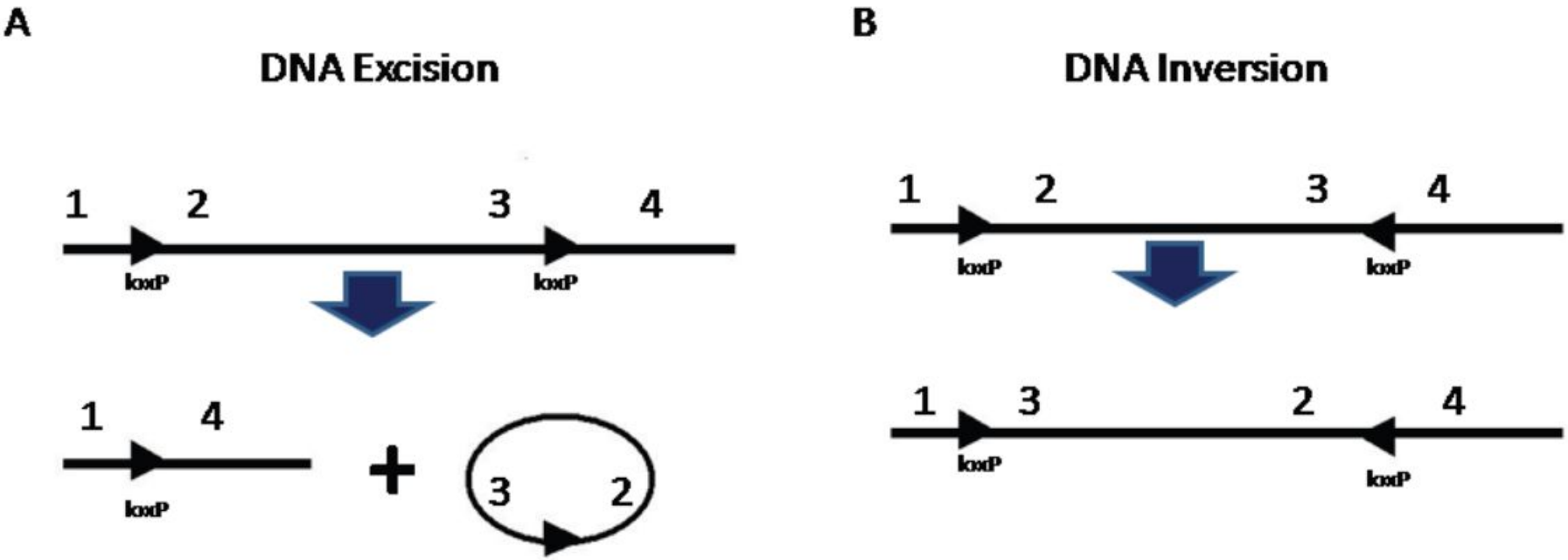
Схема loxP сайта

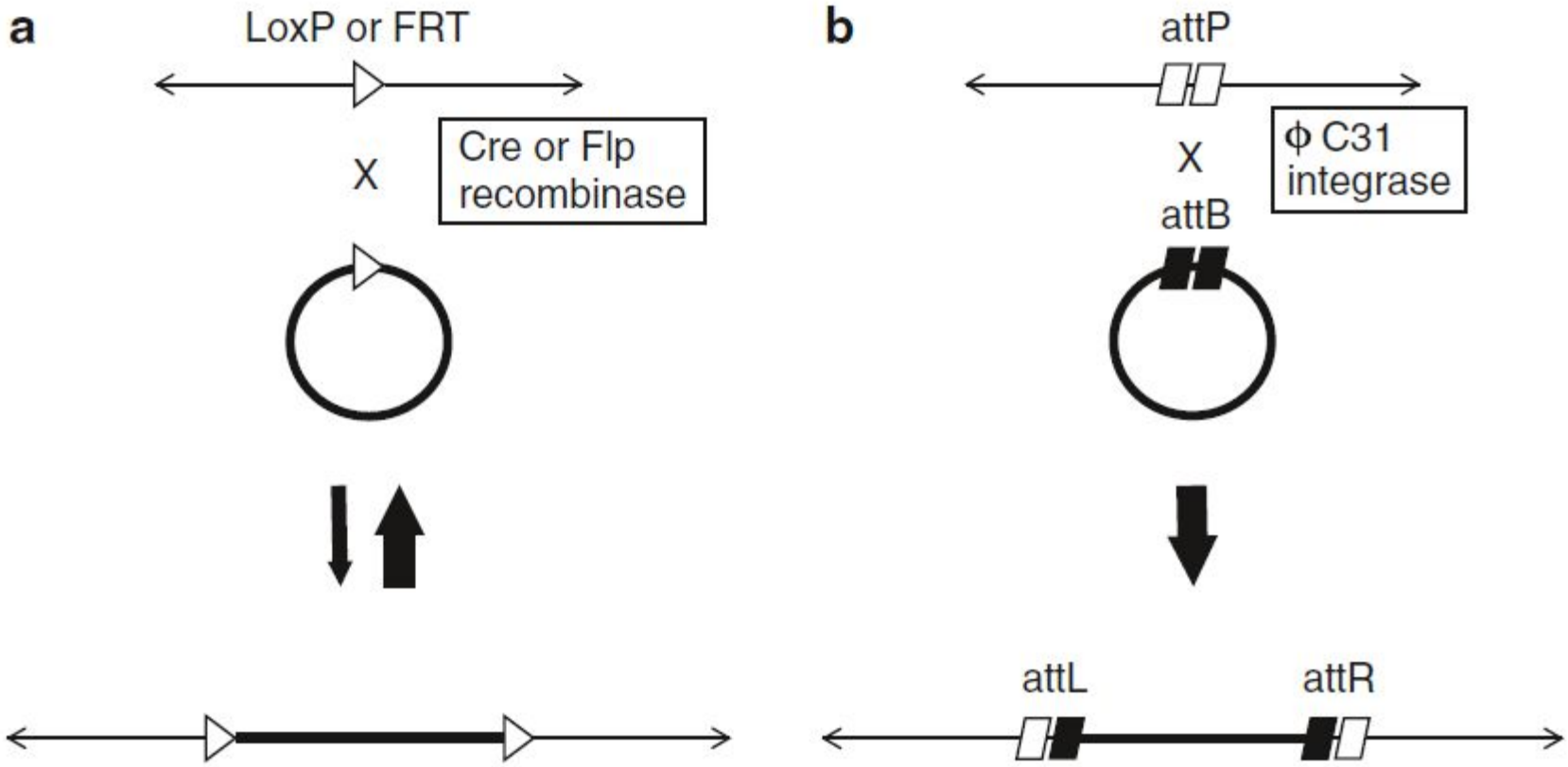
34 bp: 8-bp последовательность фланкирована 13-bp инверитрованными повторами

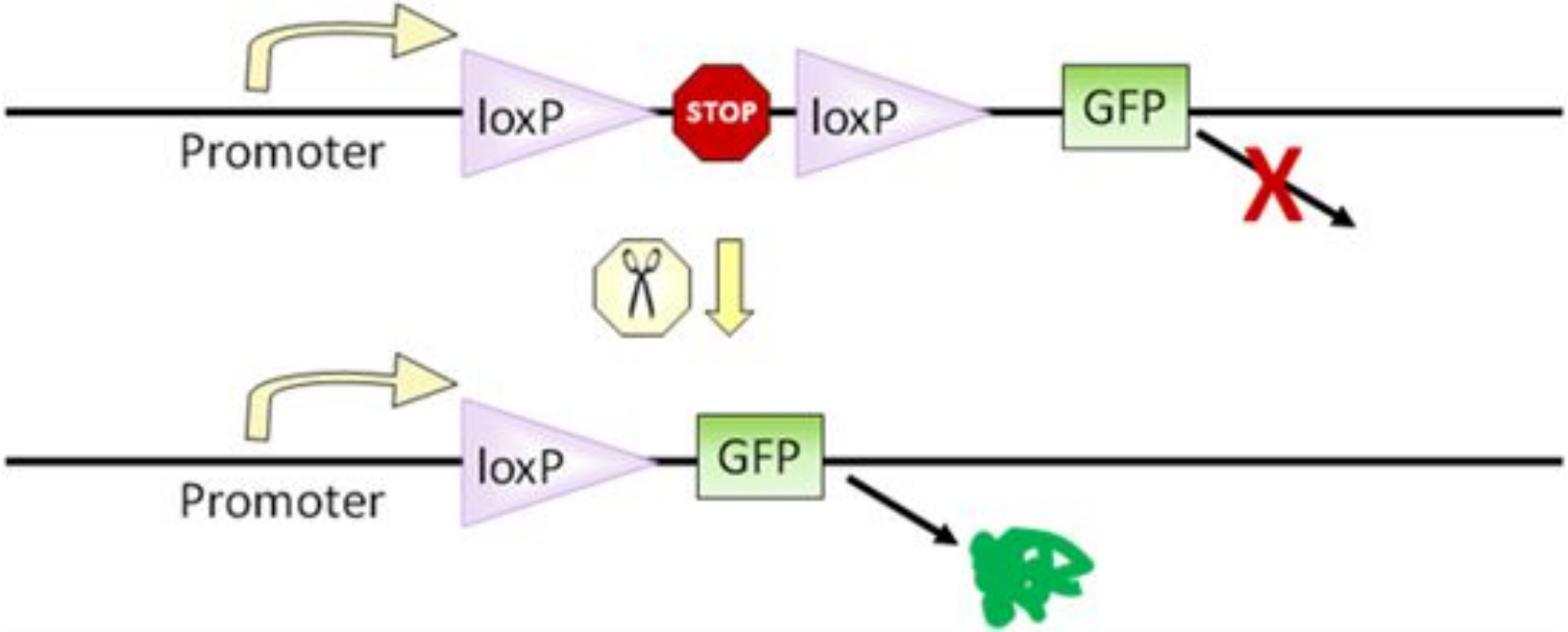
Left 13bp repeat
8bp spacer
Right 13bp repeat
5'-ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT-3'
3'-TATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATA-5'

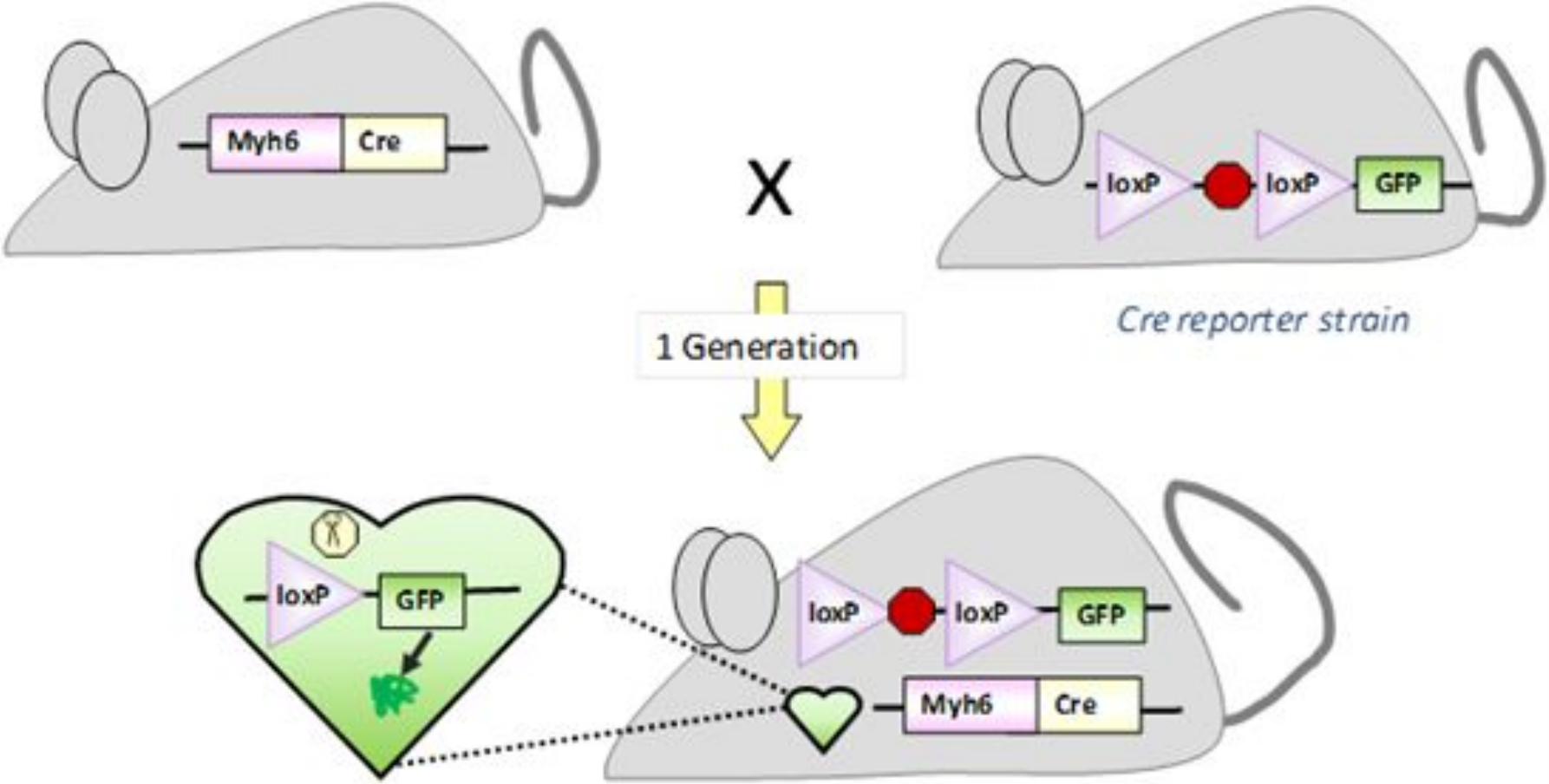
cre
cre
5'-A
CGTATAGCATACATTATACGA
-3'
3'-TA
AGCATATCGTATGTAATATGCT
A-5'




A
DNA Excision
1
2
3
4
loxP
loxP
1
4
loxP
+
3
2
B
DNA Inversion
1
2
3
4
loxP
loxP
1
3
2
4
loxP
loxP

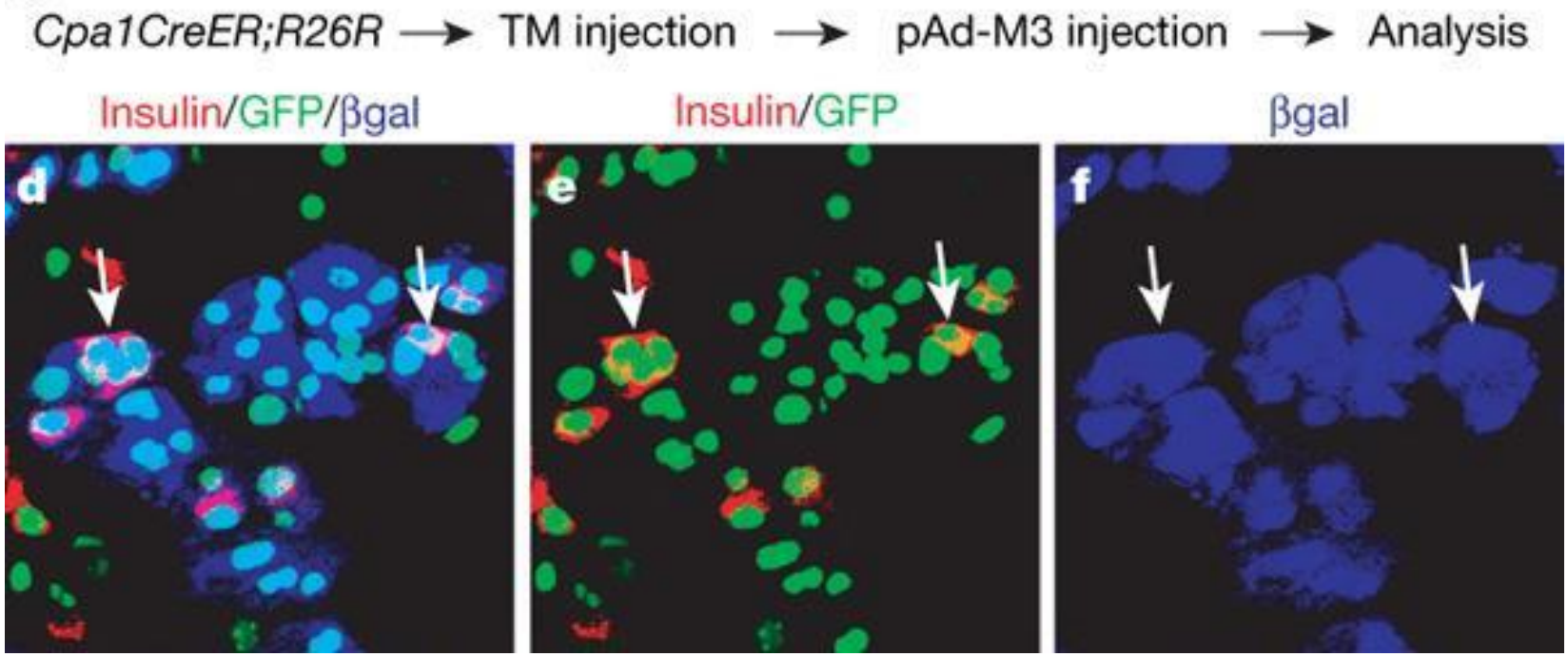

a
LoxP or FRT
X
Cre or Flp
recombinase
b
attP
X
attB
ϕ C31
integrase
attL
attR


Promoter
loxP
STOP
loxP
GFP
Promoter
loxP
GFP



GFP fluorescence confirms Cre activity in expected tissues

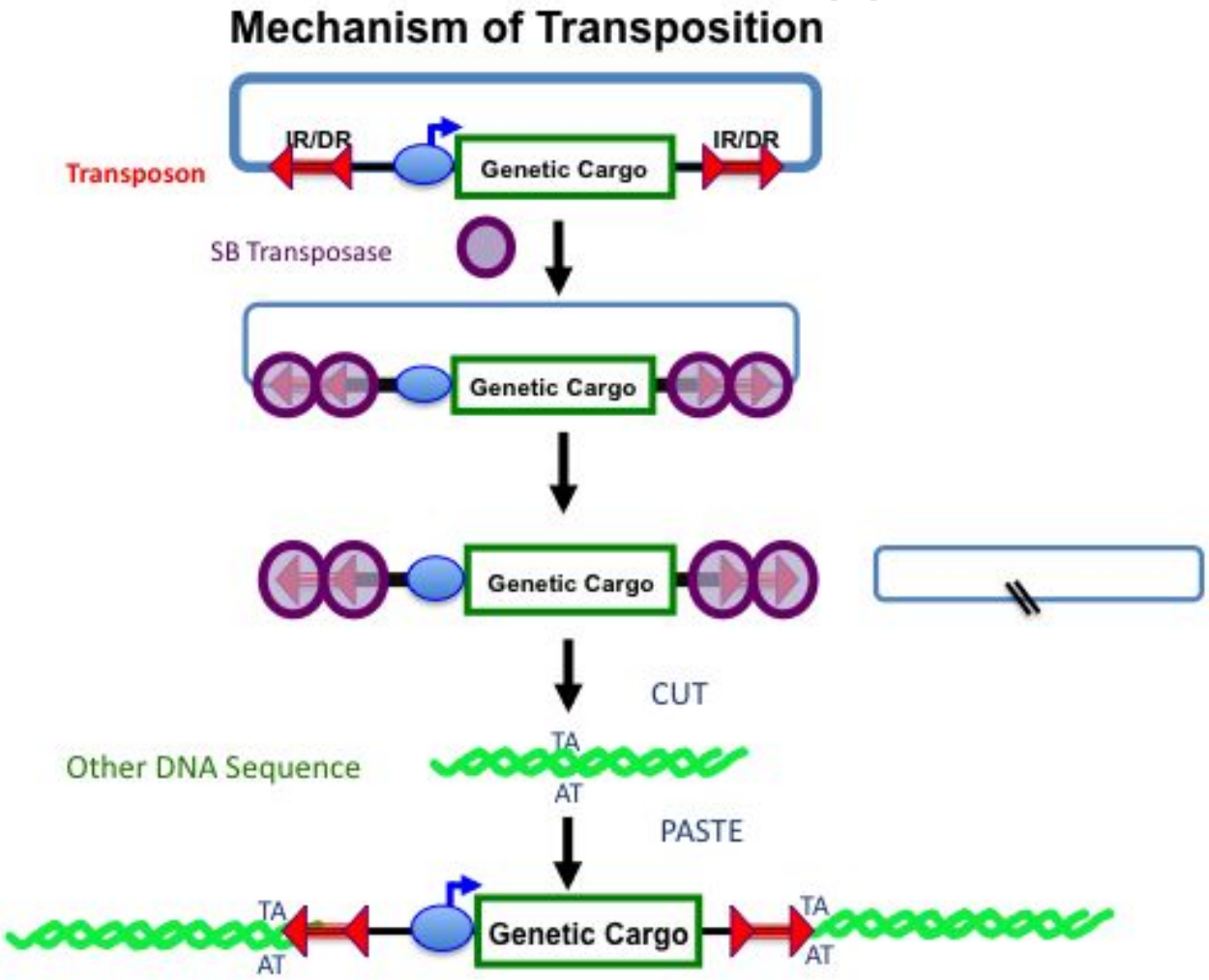
Induced new b-cells originate from differentiated exocrine cells.



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

nature

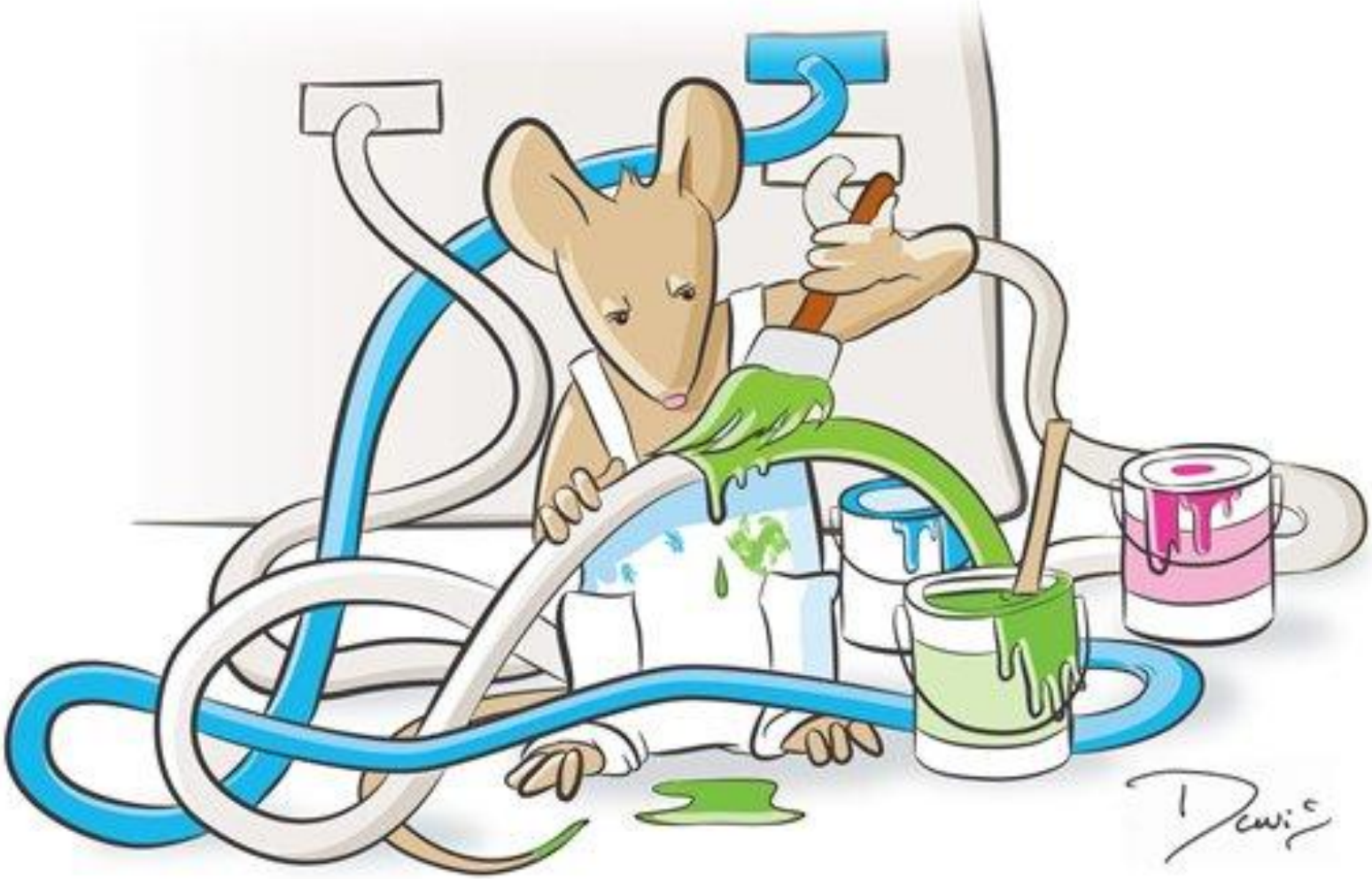
Транспозон спящая красавица (*Sleeping Beauty*) не оставляет «следов»



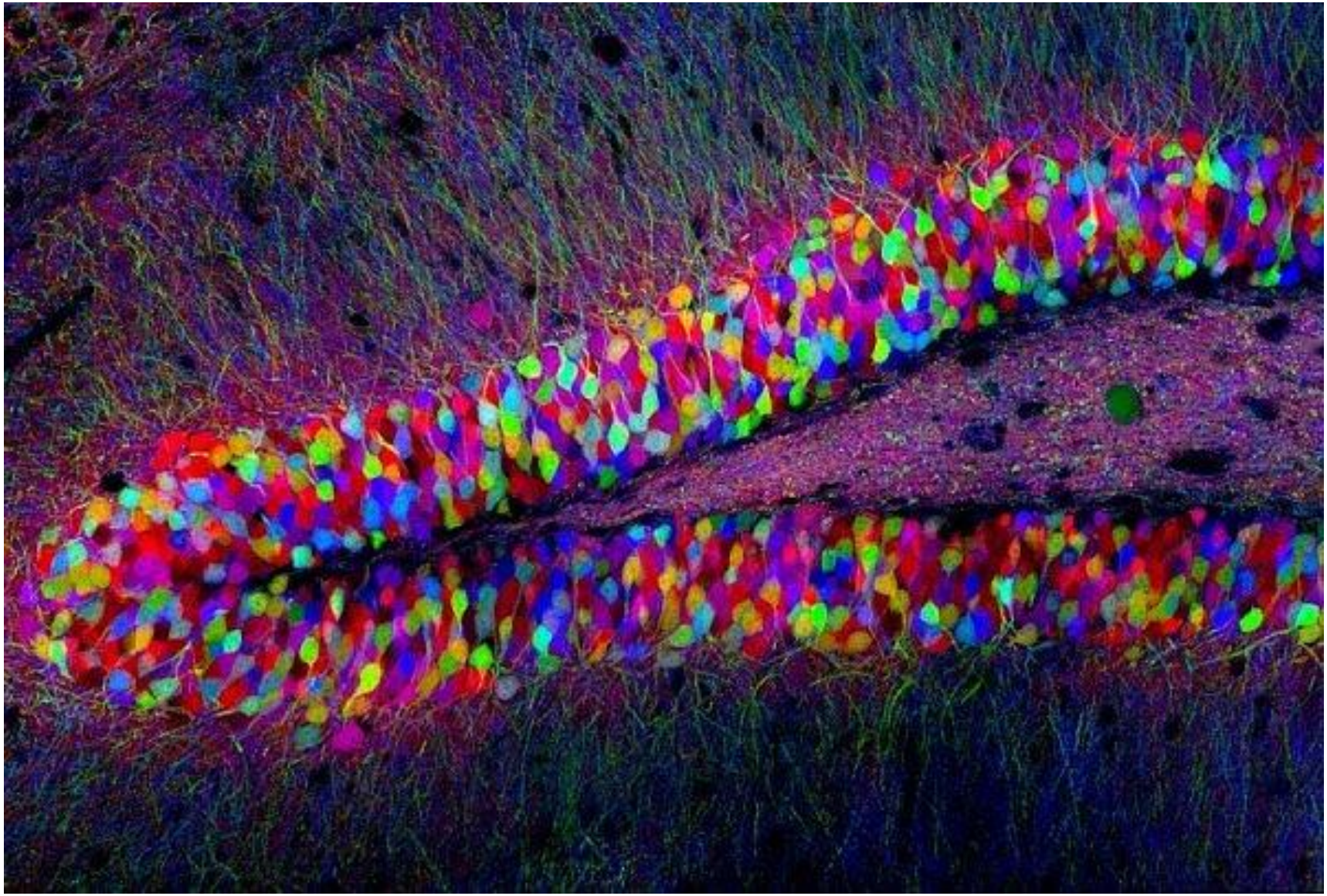
Sleeping Beauty transposon system

Frog Prince transposon system

Транспозон леопардовой лягушки
Rana pipiens

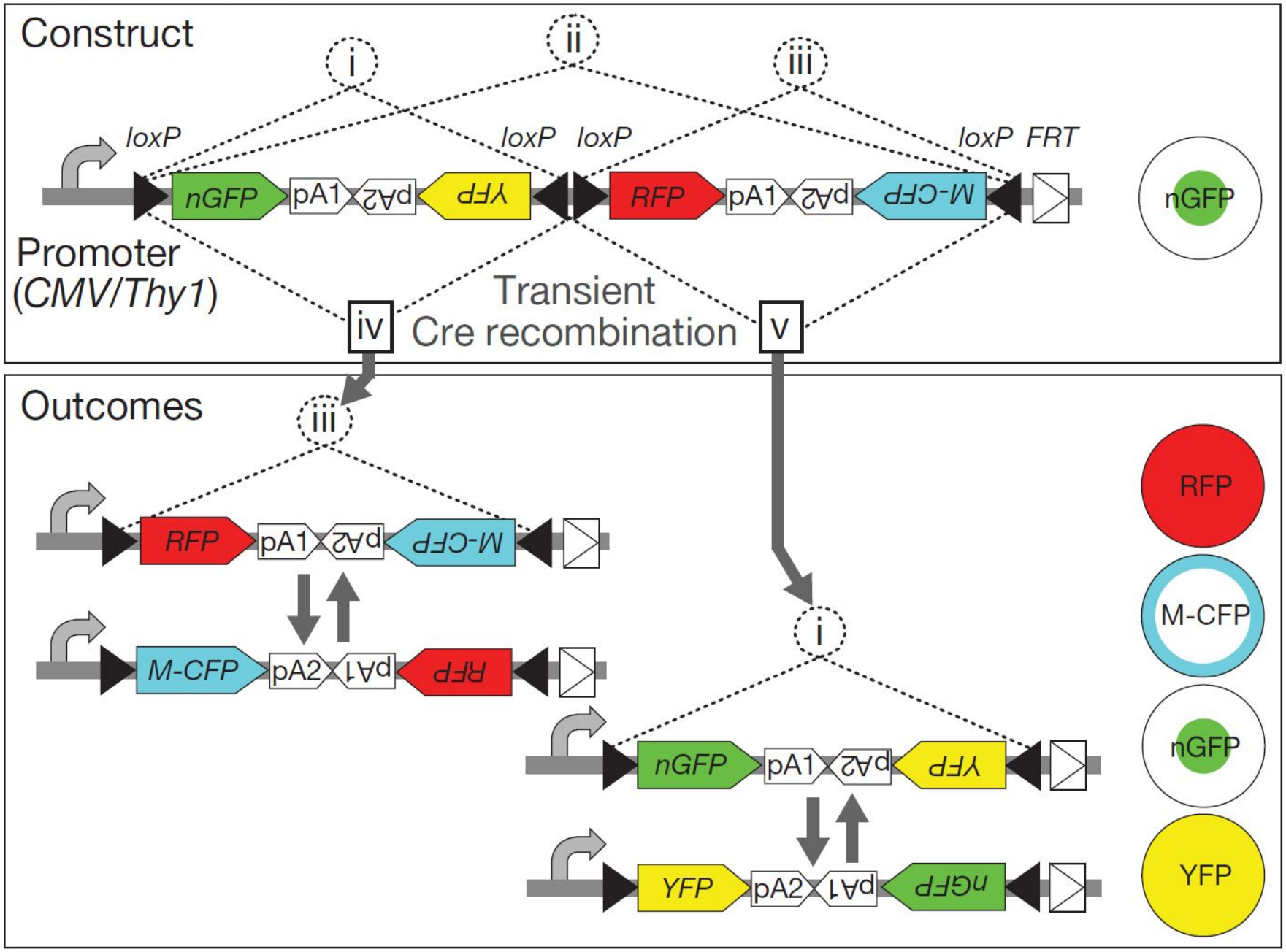


Brainbow мыши



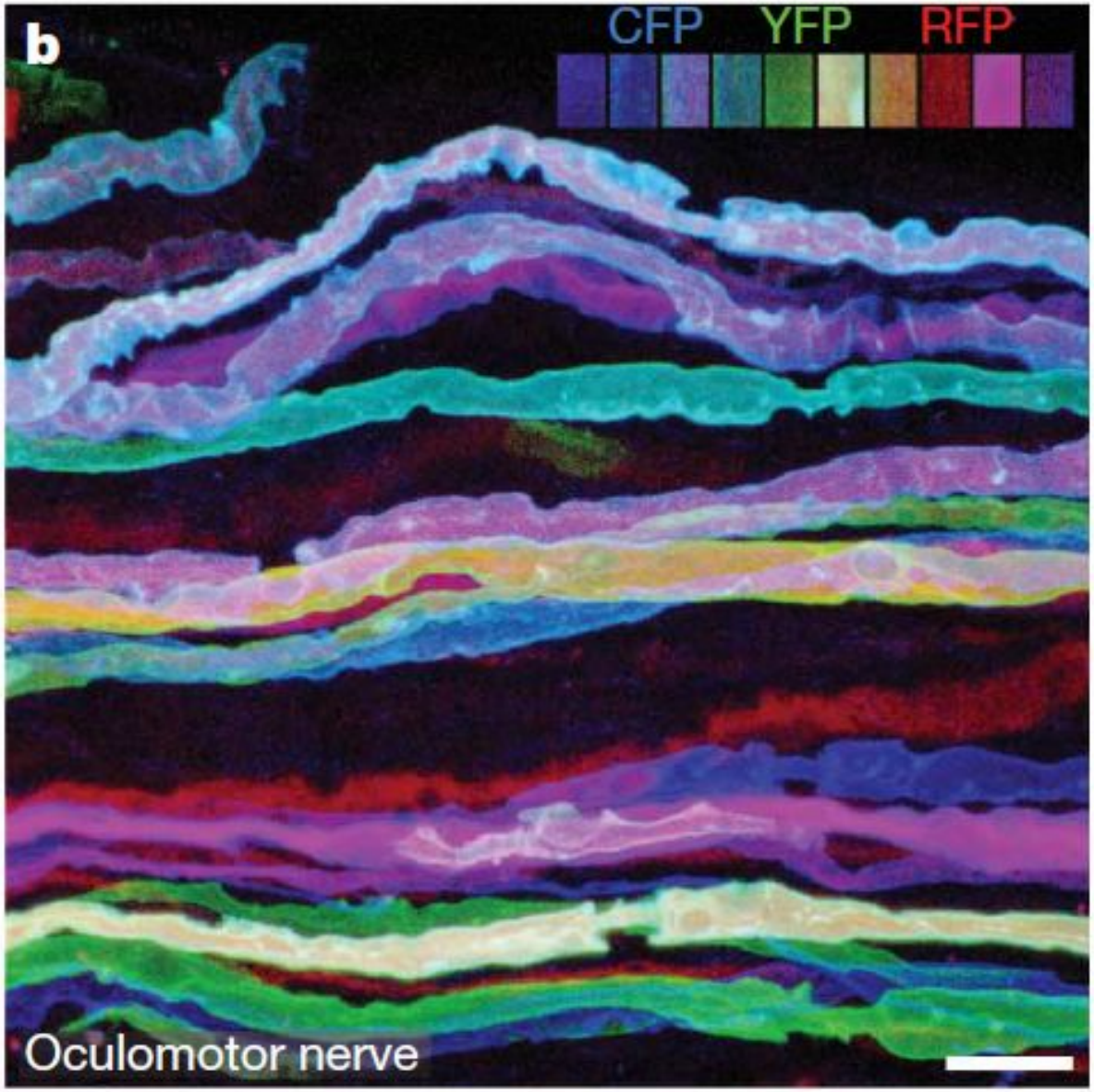
Из чего состоит трансген? Комплектация люкс

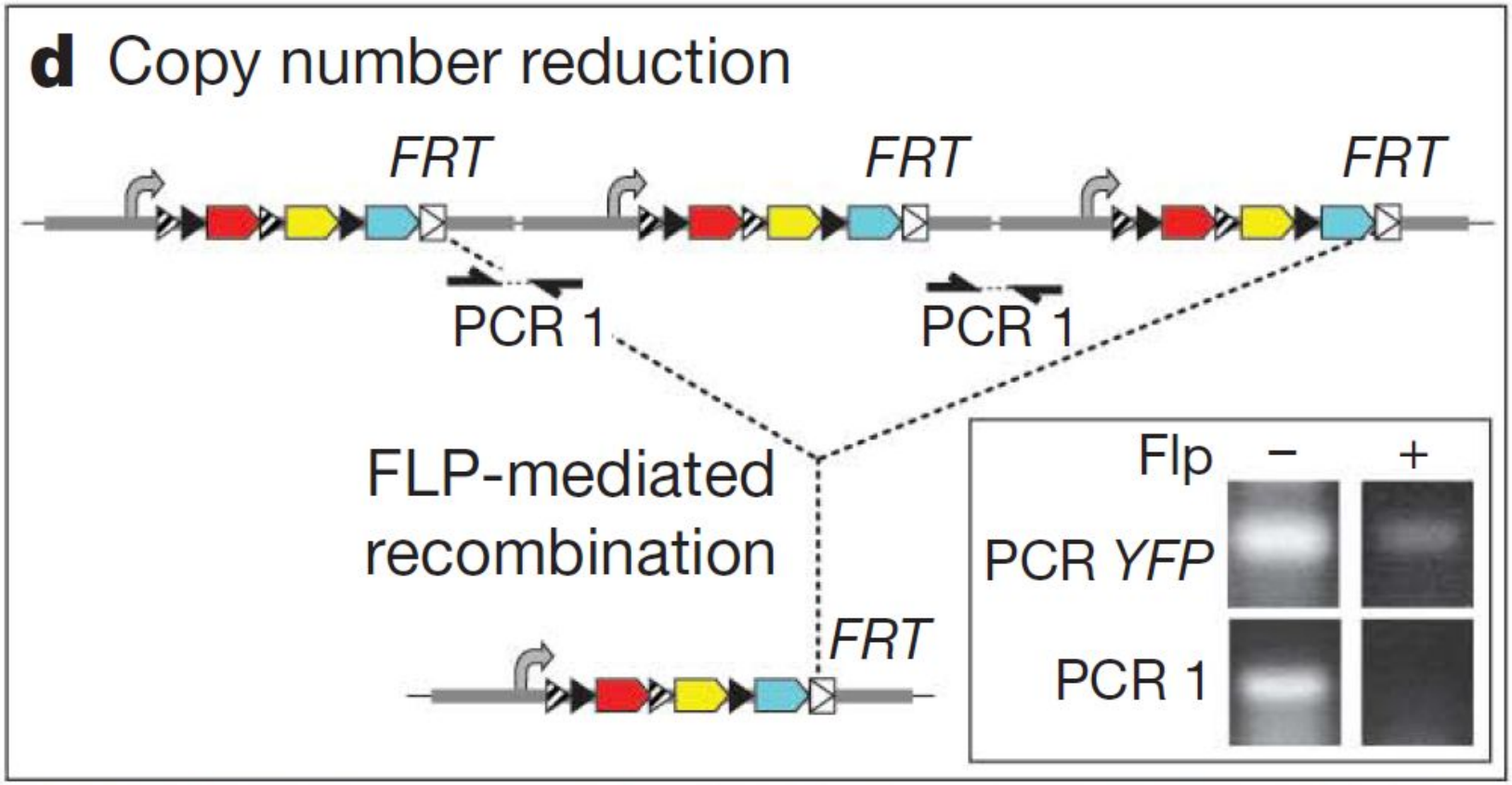
c *Brainbow-2.1*

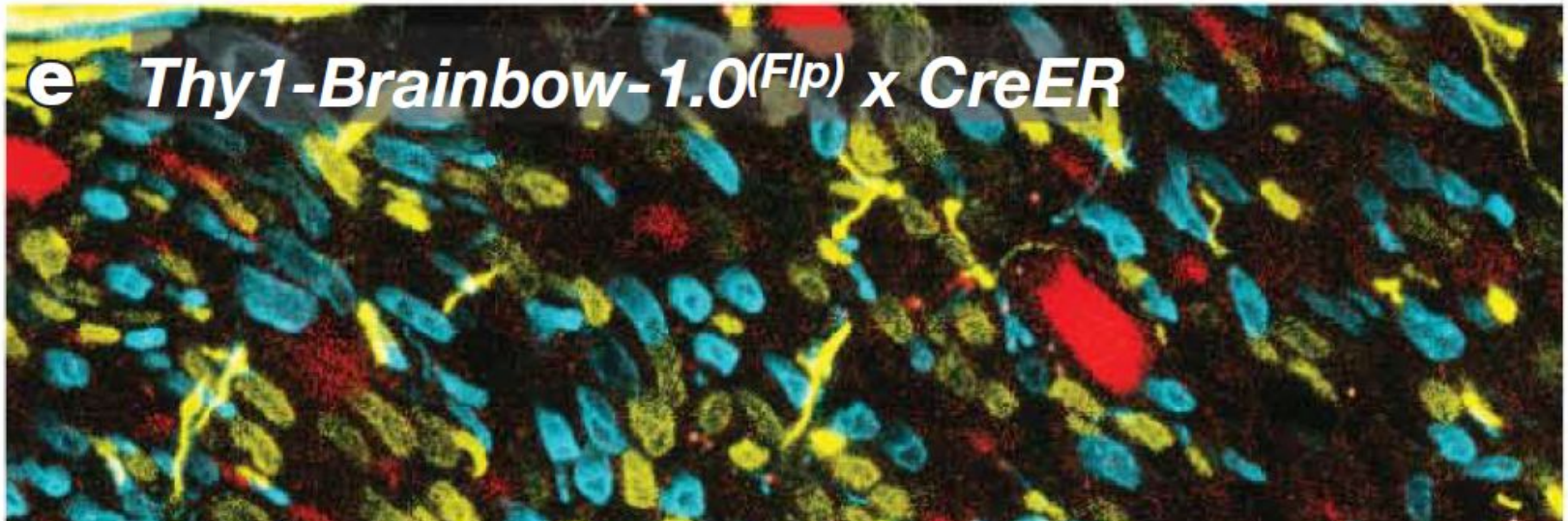


a XFP combinations

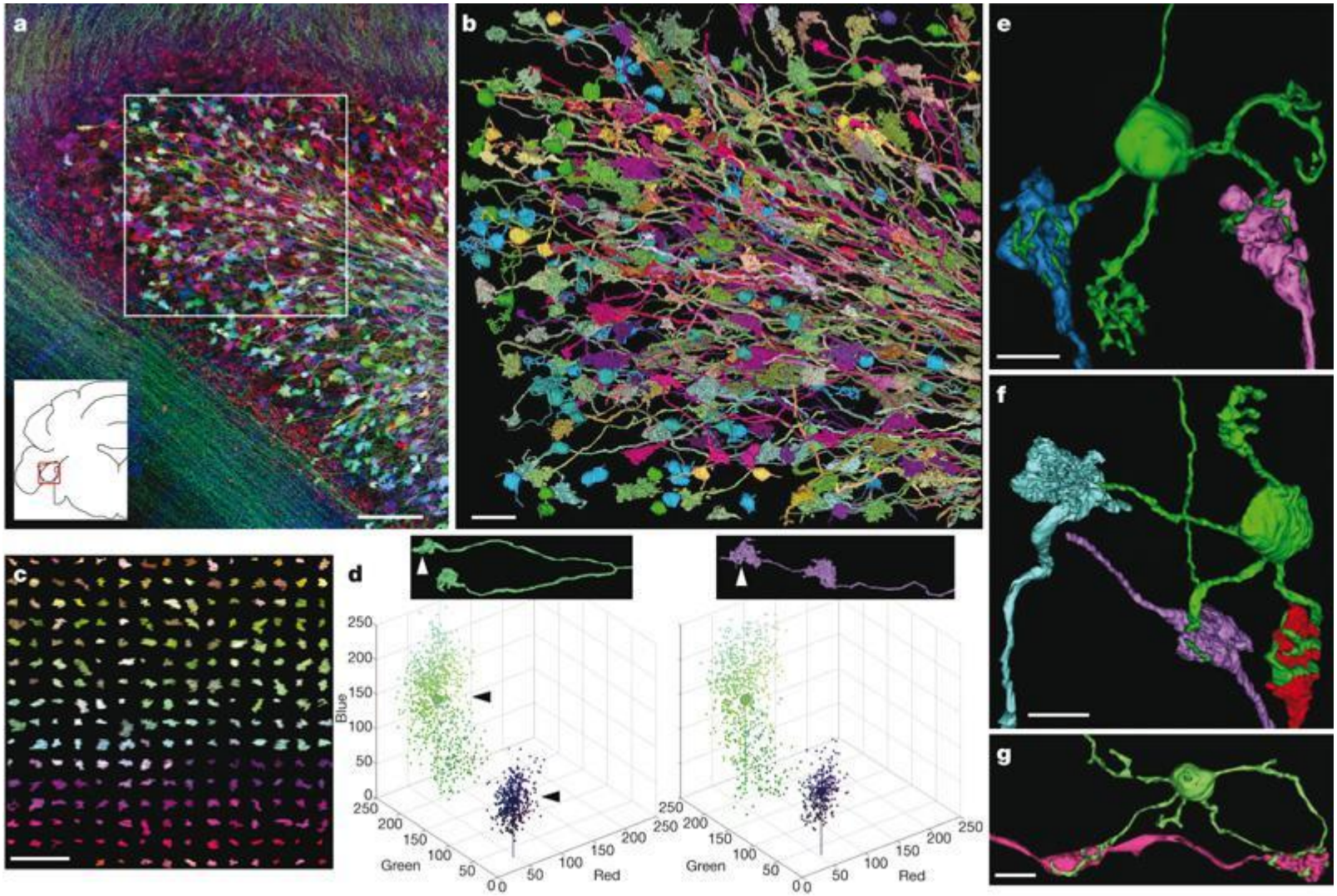
Outcome for each copy 1	2	3	Resulting colour
C	C	C	Blue
C	C	Y	Light blue
C	Y	Y	Blue-green
Y	Y	Y	Green
Y	Y	R	Light green
Y	R	R	Orange
R	R	R	Red
R	R	C	Magenta
R	C	C	Purple
R	C	Y	Grey



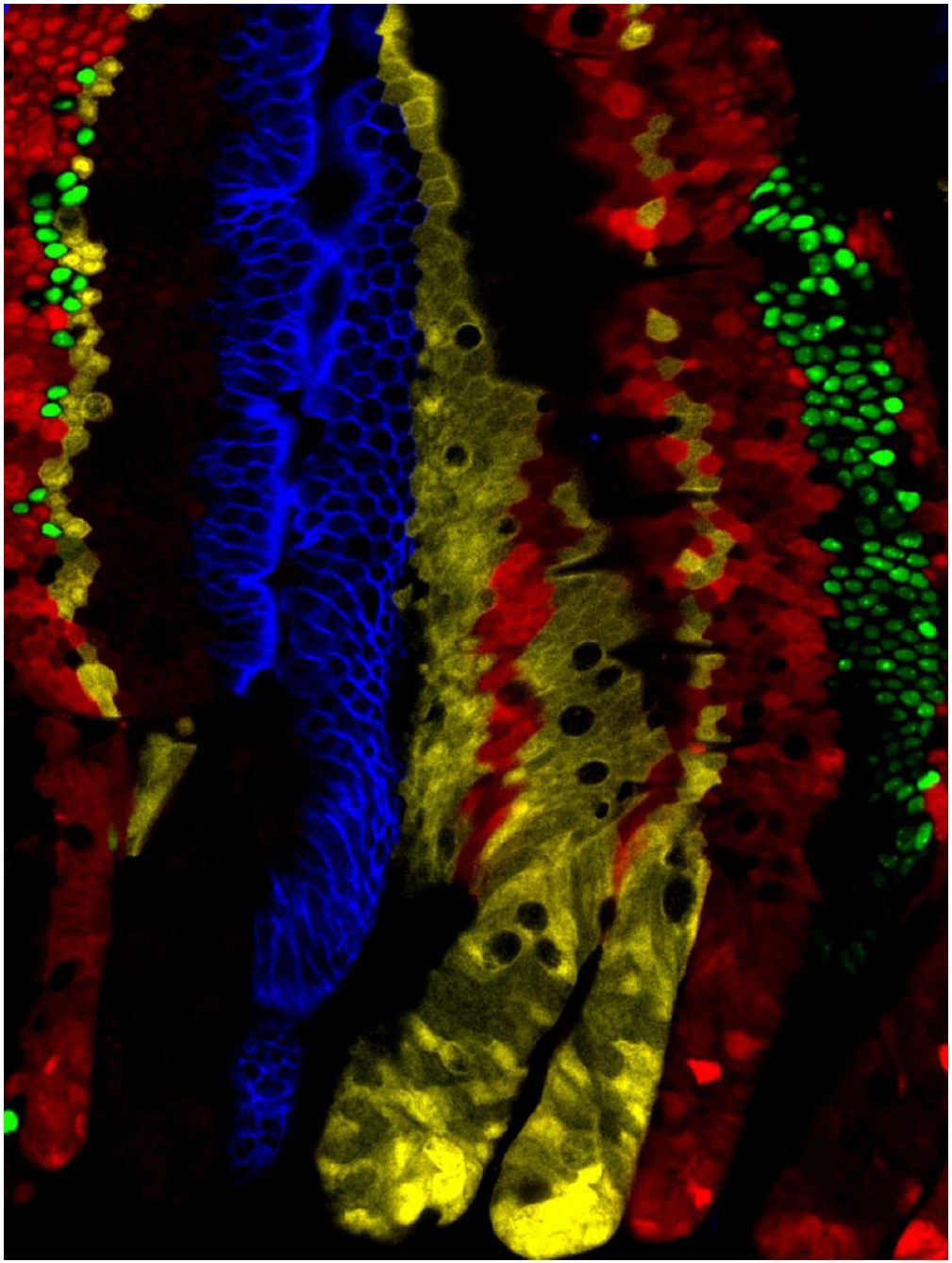

d Copy number reduction
FRT
FRT
FRT
PCR 1
PCR 1
FLP-mediated
recombination
FRT
Flp
–
+
PCR YFP
PCR 1


e Thy1-Brainbow-1.0(Flp) x CreER

Трехмерная реконструкция отдельных клеток

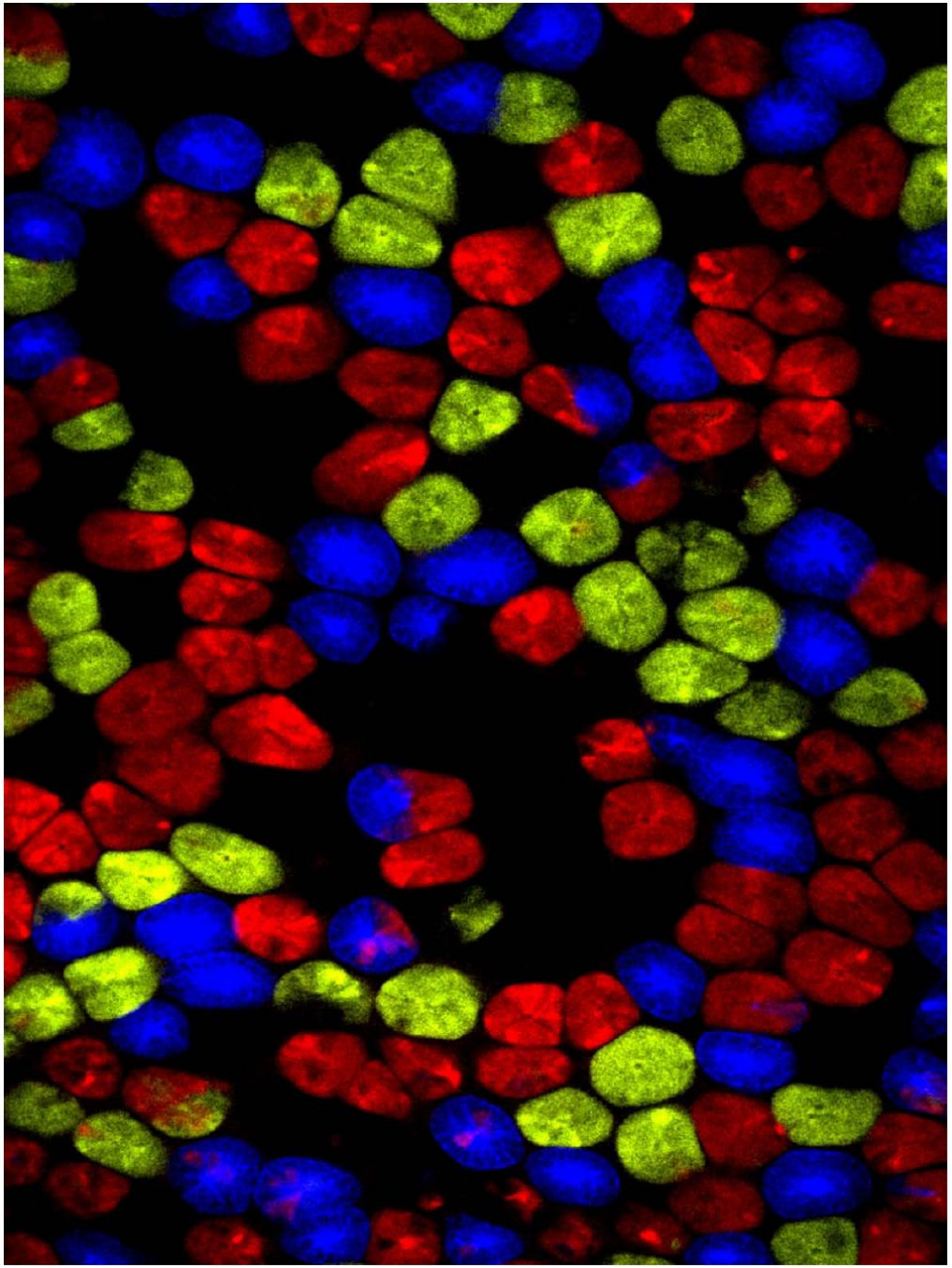


Картина Джексона Полока, авангардный экспрессионизм

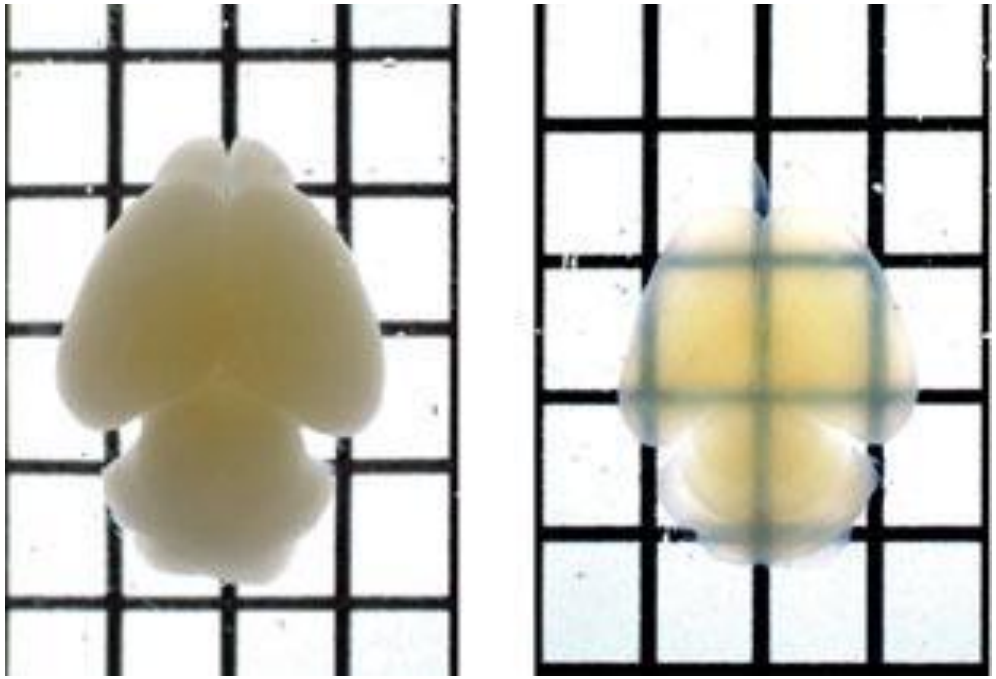


Крипты тонкого кишечника
у мышей, несущих конструкцию
конфети

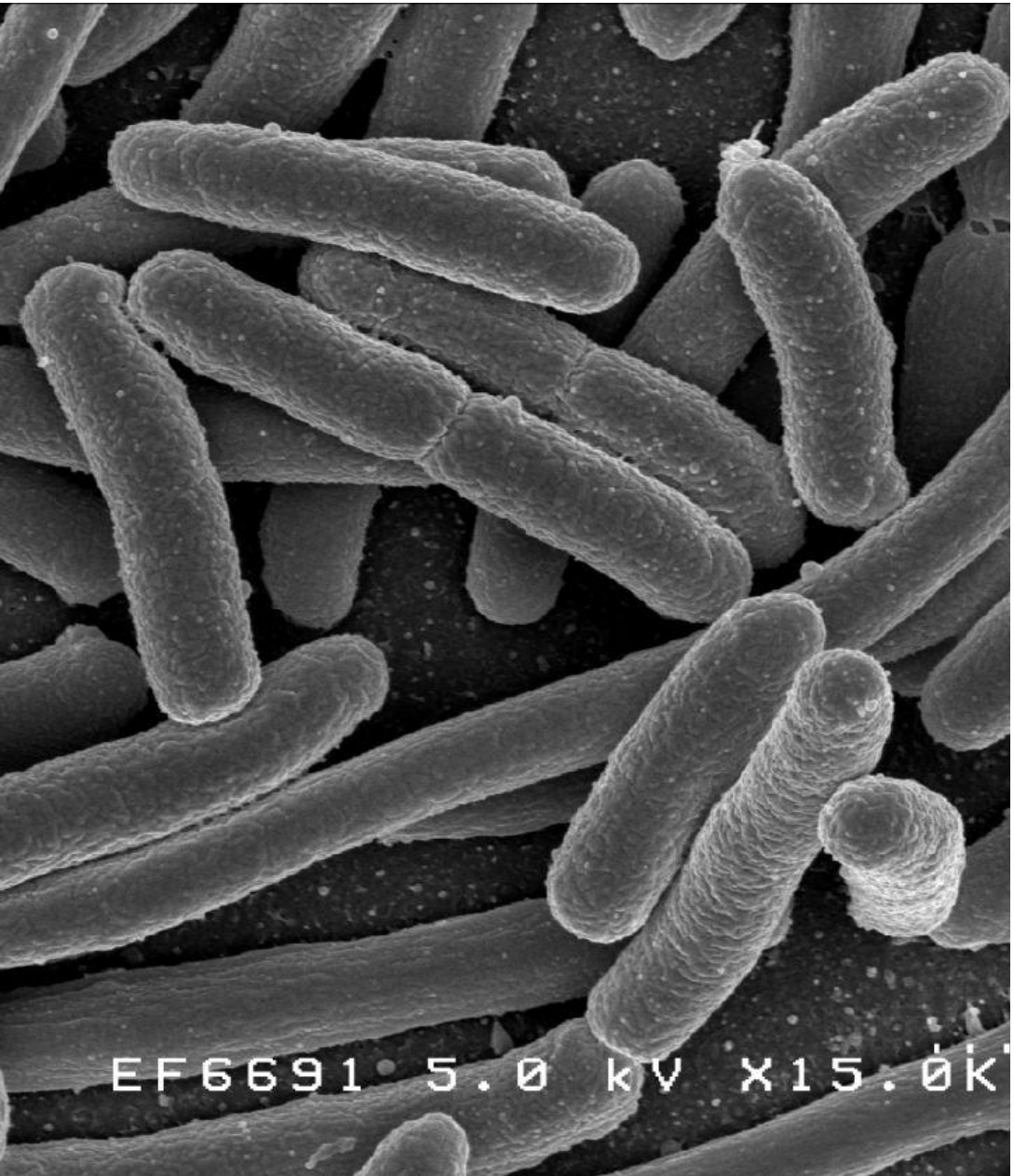
Ворсинки тонкого кишечника
у мышей, несущих конструкцию
конфети



CLARITY (**C**lear, **L**ipid-exchanged, **A**natomically **R**igid, **I**maging/immunostaining compatible, **T**issue h**Y**drogel)



Organic vs GMO

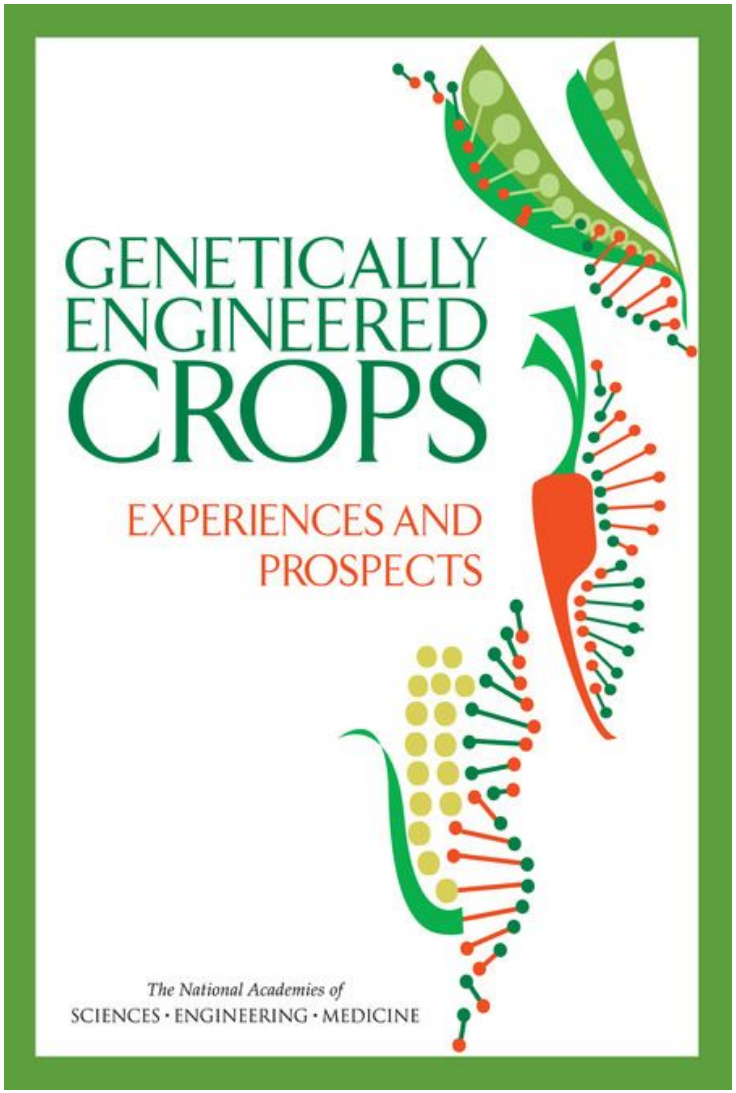


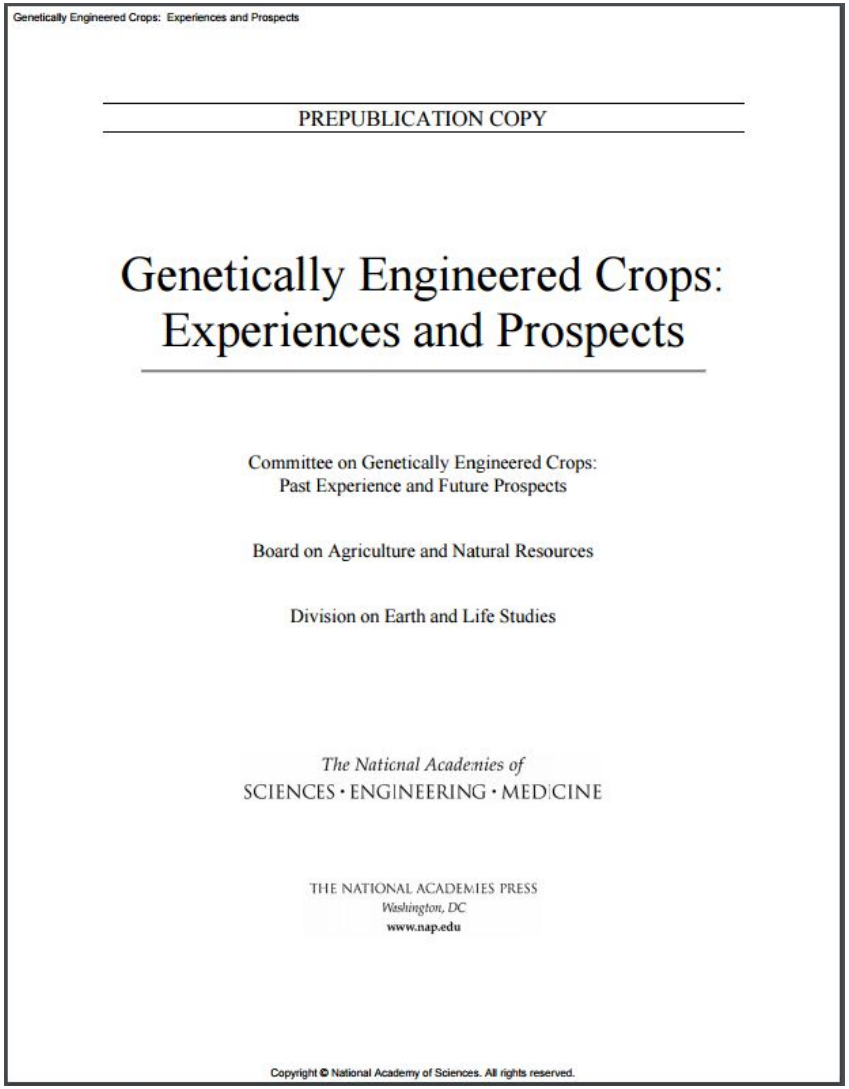
Вспышка пищевых отравлений в Европе в 2011 году

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

Пажитник

НАТРИЙ ДВУУГЛЕКИСЛЫЙ
Сода пищевая
НАТРИЙ ДВУУГЛЕКИСЛЫЙ
(ГИДРОКАРБОНАТ НАТРИЯ)
Пищевая добавка Е500
Не содержит ГМО
Разрыхлитель
Применяется при изготовлении кондитерских изделий и в хлебопечении
Масса нетто 500 г
Дата изготовления: смотри на упаковке
Срок годности не ограничен
Хранить в закрытых
reactor.cc





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

Copyright © National Academy of Sciences. All rights reserved.

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