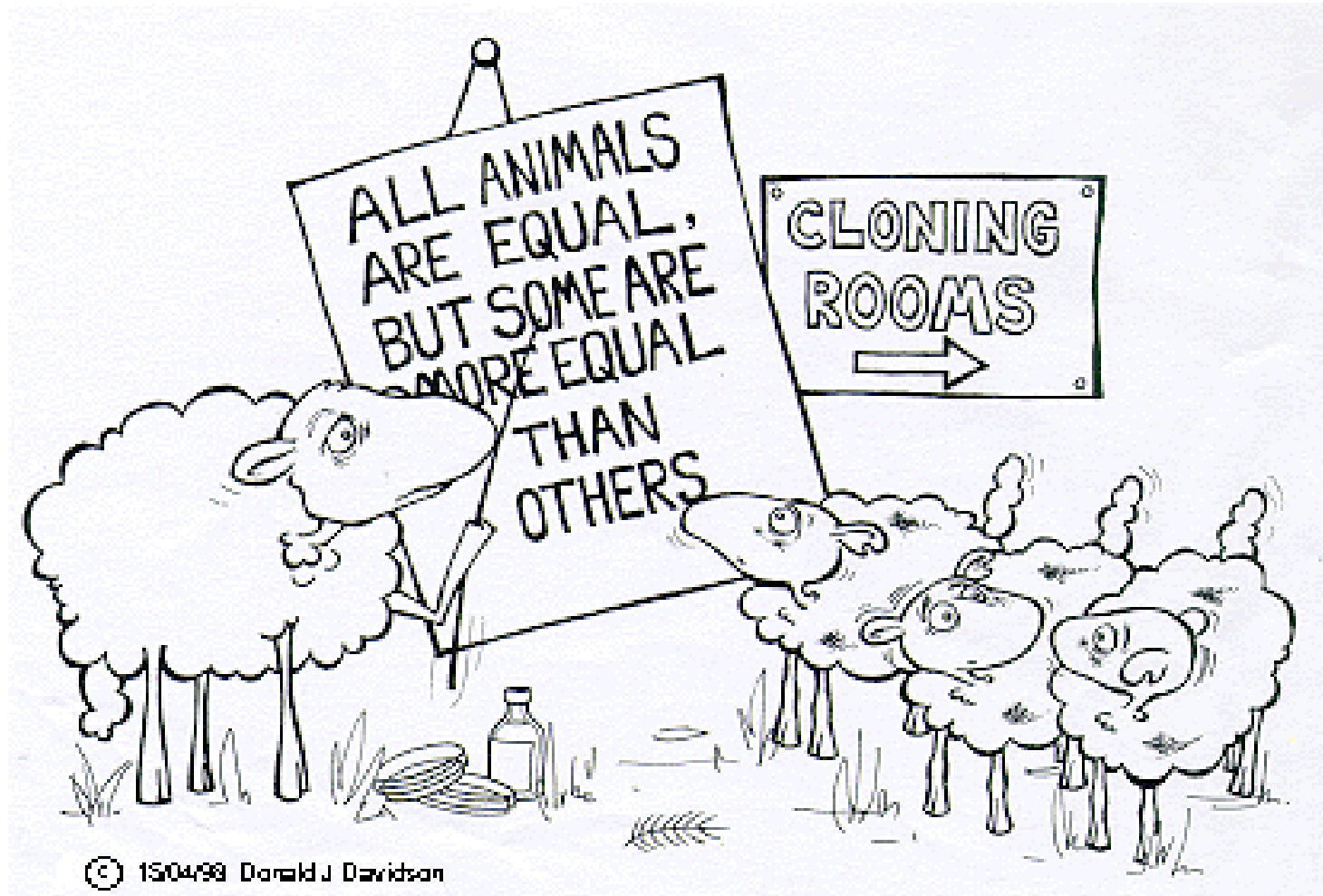


Трансгенез животных: прошлое, настоящее, будущее



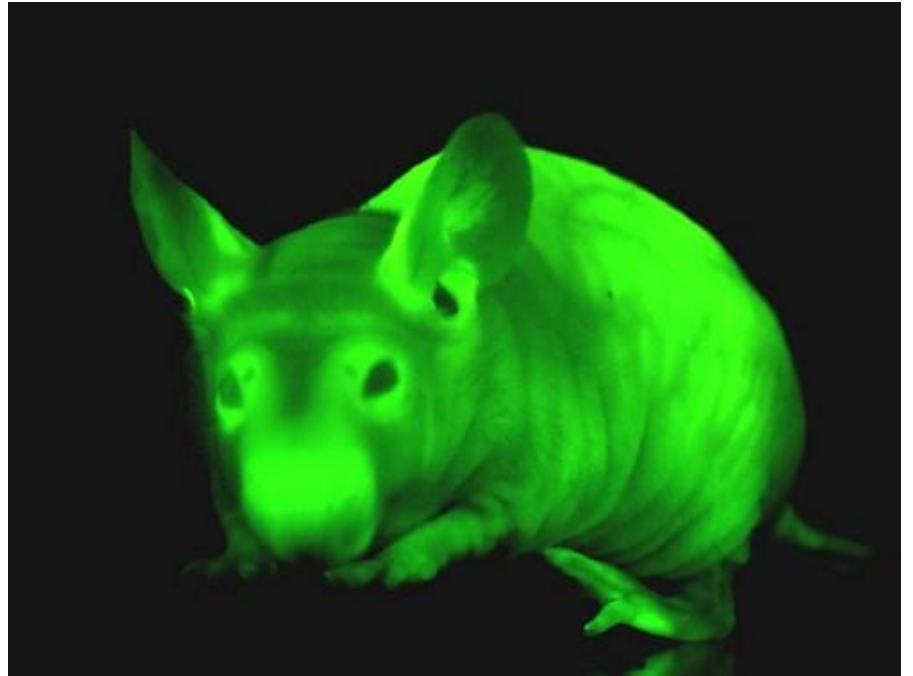
- Задачи и методология генетической инженерии.
- Основы генетической инженерии растений и животных: трансформация клеток высших организмов, введение генов в зародышевые и соматические клетки животных. Получение трансгенных организмов.
- Проблемы генотерапии. Значение генетической инженерии для решения задач биотехнологии, сельского хозяйства, медицины и различных отраслей народного хозяйства.
- Использование методов генетической инженерии для изучения фундаментальных проблем генетики и других биологических наук. Социальные аспекты генетической инженерии.

Что такое трансгенез
и что можно называть
“трансгенным
организмом”?



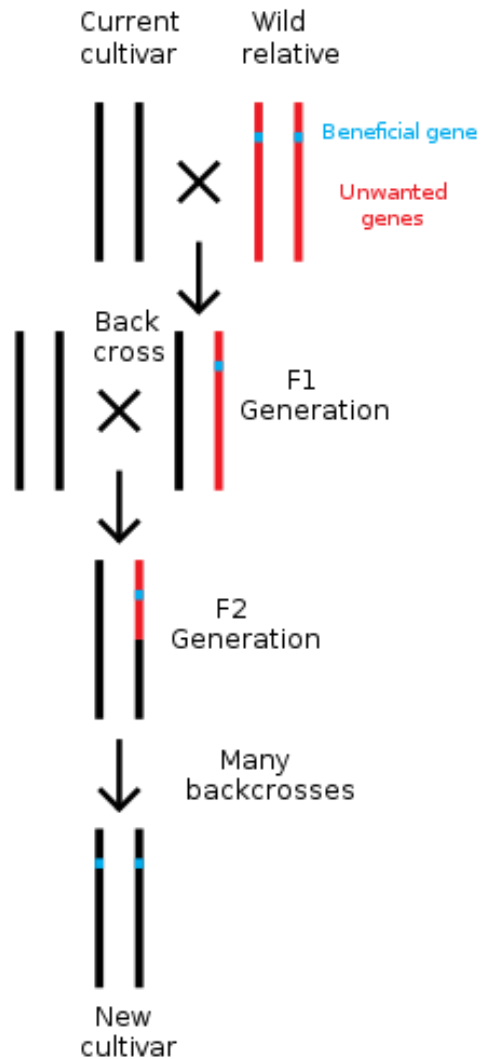
Erich Krause

- Трансгенез – это процесс введения чужеродной ДНК (трансгена) в живой организм
- Получивший трансген организм приобретает новое свойство, которое он может передавать своему потомству
- Геном трансгенных животных является преднамеренно модифицированным

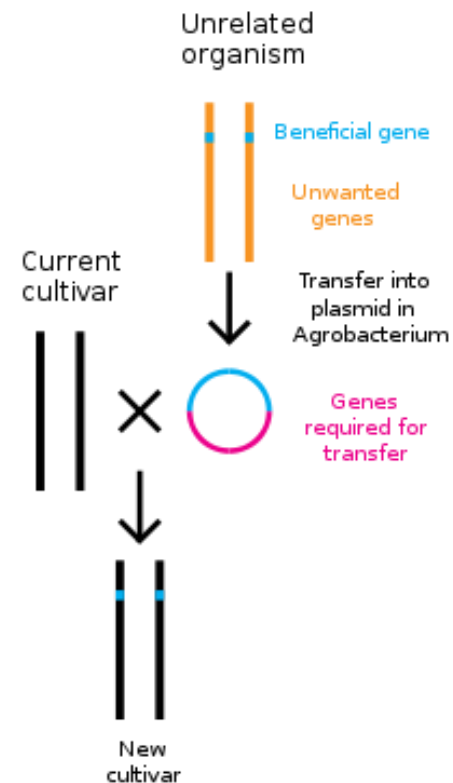


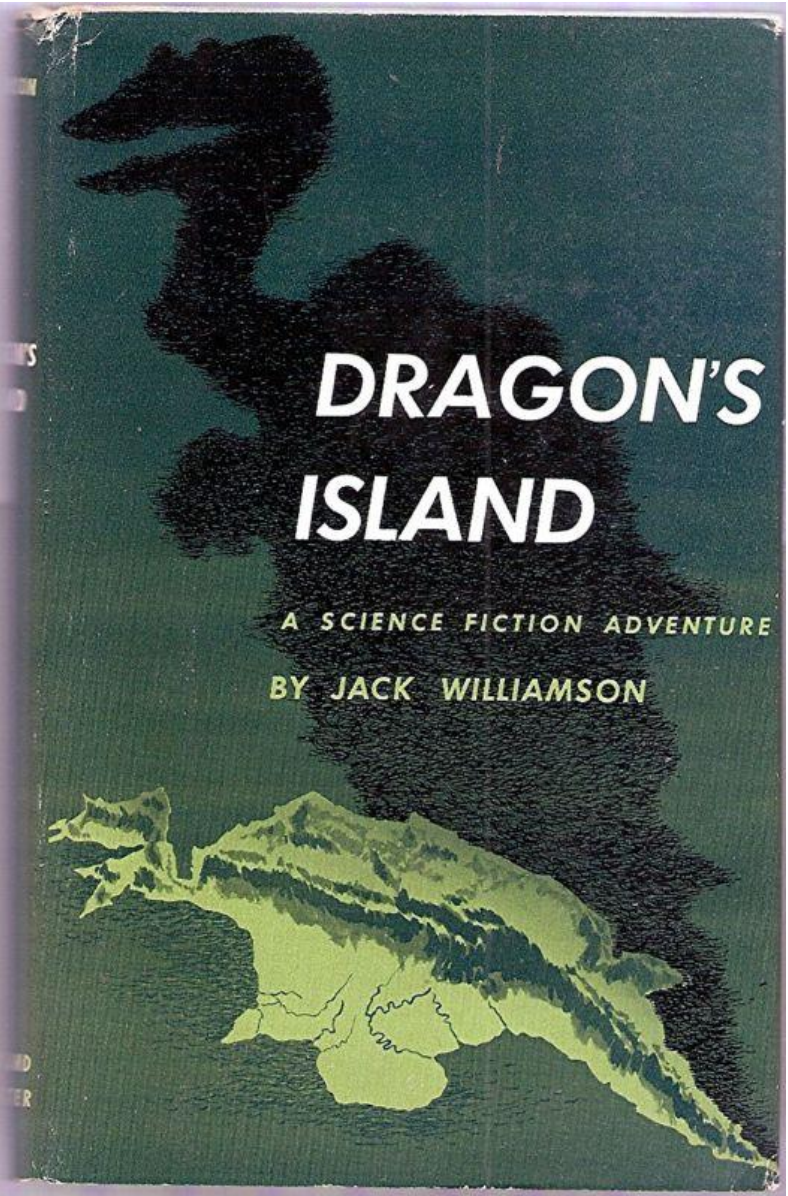
Селекция **vs** Трансгенез

Conventional breeding



Transgenesis





DRAGON'S ISLAND

A SCIENCE FICTION ADVENTURE

BY JACK WILLIAMSON

Первые эксперименты по созданию трансгенных организмов



Paul Berg (1926 -)

- 1972 – Пауль Берг, «Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli»



- 1973 – Стенли Коэн, «Recircularization and Autonomous Replication of a Sheared R-Factor DNA Segment in Escherichia coli Transformants»

Первые эксперименты по созданию трансгенных организмов

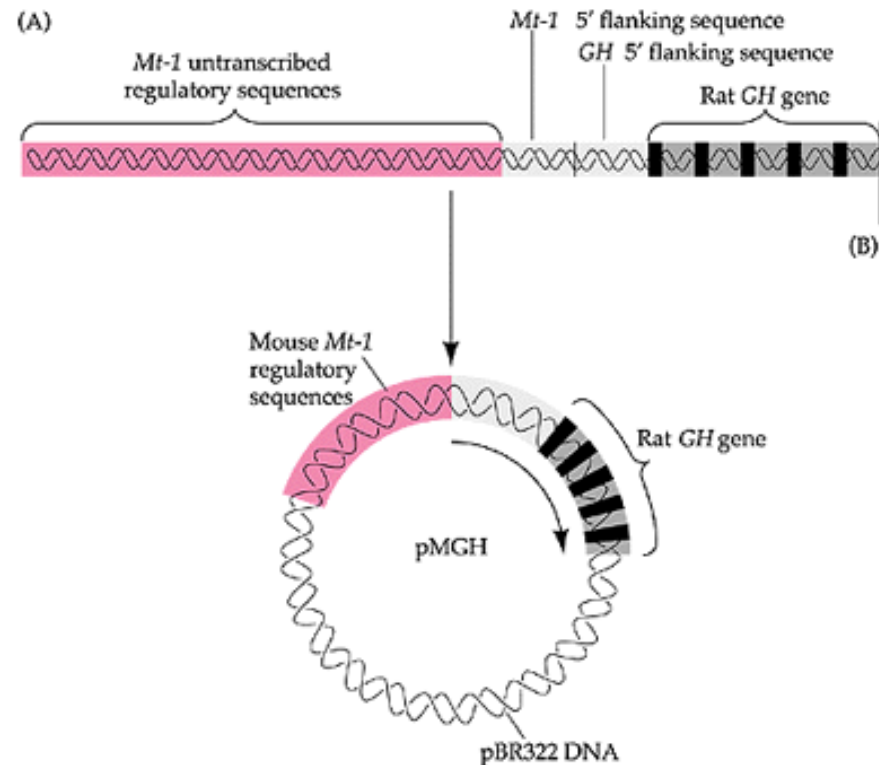


- 1974 – Рудольф Ениш, “Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA”.



- 1976 – Херб Бойер открывает компанию “Genentech”, которая в последующие шесть лет создает и коммерциализует E.Coli, продуцирующую человеческие белки, в т.ч. инсулин.

Palmiter D.R.: “**Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes**”
Nature; 1982

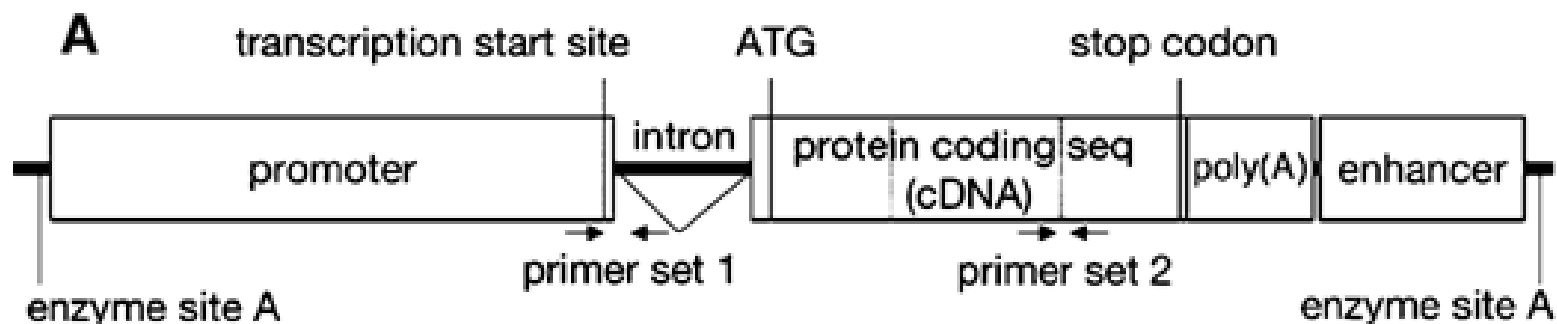


Необходимые шаги на пути к созданию трансгенного организма

1. Получить изолированную целевую последовательность ДНК
2. На основе данной последовательности создать специальный трансгенный вектор
3. Внедрить вектор в модифицируемый организм
4. Выявить и отобрать успешно модифицированных особей

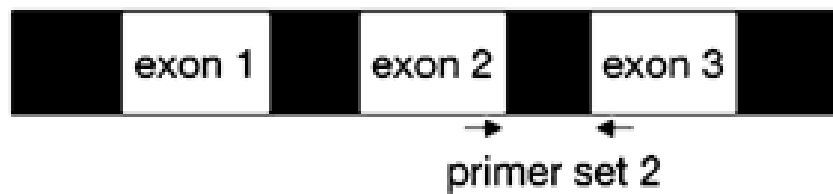
Общие требования к трансгенному вектору

- Для правильной экспрессии, вектор должен иметь 5'-регуляторный район, промотор, кодон инициации трансляции, кодирующий район, стоп-кодон, 3'-UTR и PolyA сайт
- Вектор должен быть оптимальных размеров



B

location of primer set 2
in genomic DNA



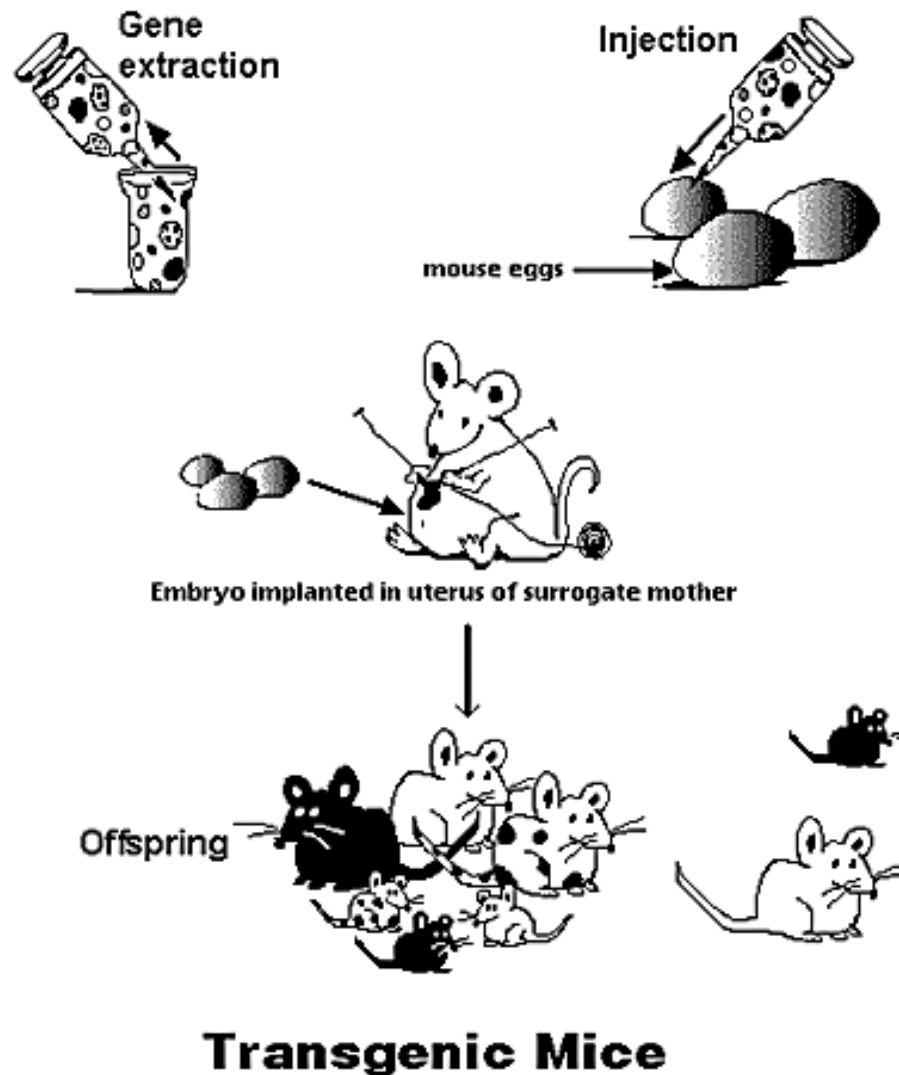
Выбирая определенный промотор, мы получаем возможность задавать пространственные и временные параметры экспрессии трансгена

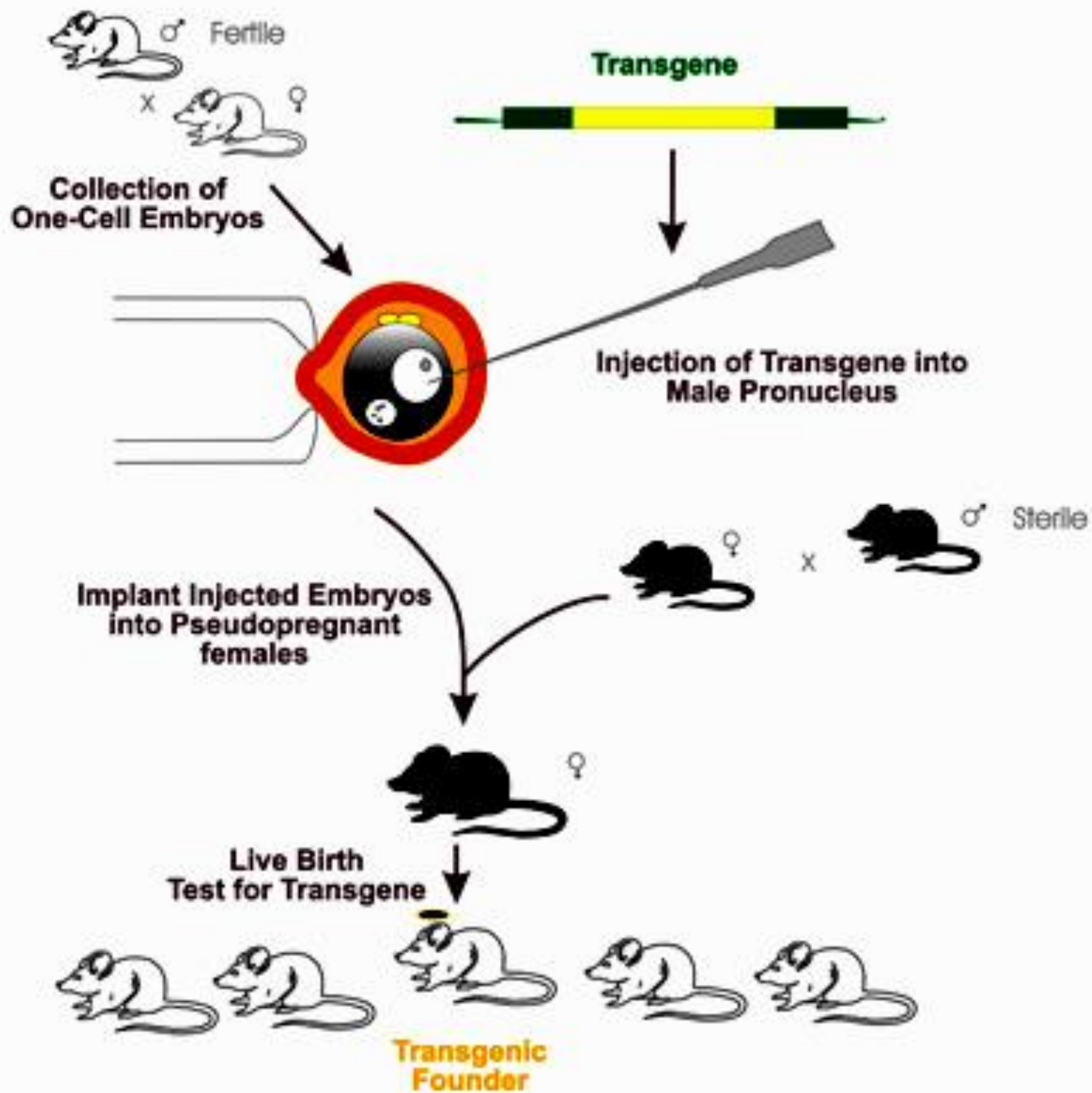
PROMOTER	GENE EXPRESSION IN
(beta)-actin promoter	many tissues of the transgenic animal
simian virus 40 T antigen promoter	many tissues of the transgenic animal
adipocyte P2 promoter	fat cells
myosin light-chain promoter	muscle
amylase promoter	acinar pancreas
insulin promoter	islets of Langerhans beta cells
casein promoter	mammary glands during lactation

Основные способы внедрения трансгенных конструкций в животные клетки

1. Микроинъекция ДНК в пронуклеус зиготы
2. Использование генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток
3. Искусственное оплодотворение с использованием генетически модифицированных сперматозоидов (ICSI)
4. Плазмидная, вирусная трансфекция
5. Электропорация

Получение трансгенных животных методом пронуклеарной микроинъекции рекомбинантной ДНК





ПЛЮСЫ

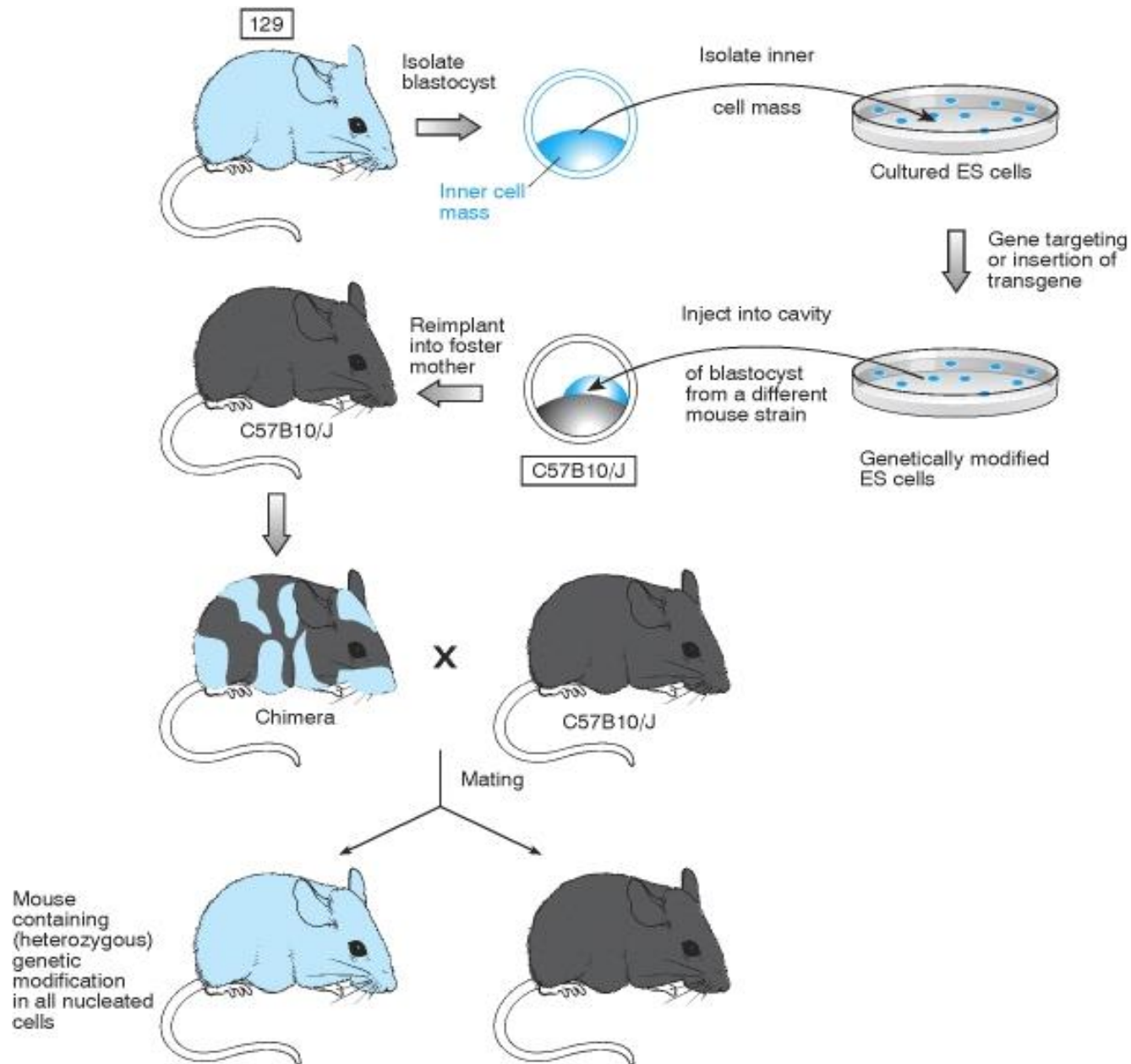
- Есть возможность регулировать количество вводимой ДНК
- Точность «доставки»
- Можно работать с различными животными

МИНУСЫ

- Процесс микроинъекции может привести к гибели эмбриона
- Одна инъекция – одна клетка
- Трансген встраивается случайным образом
- Требуется высокой квалификации
- Относительно низкий уровень трансформации

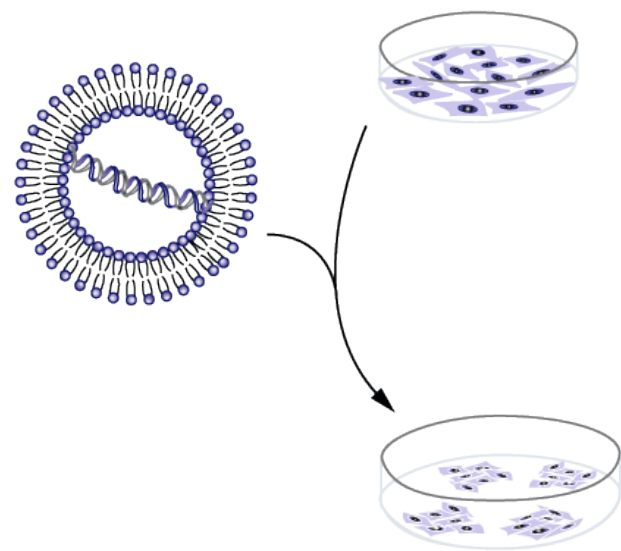
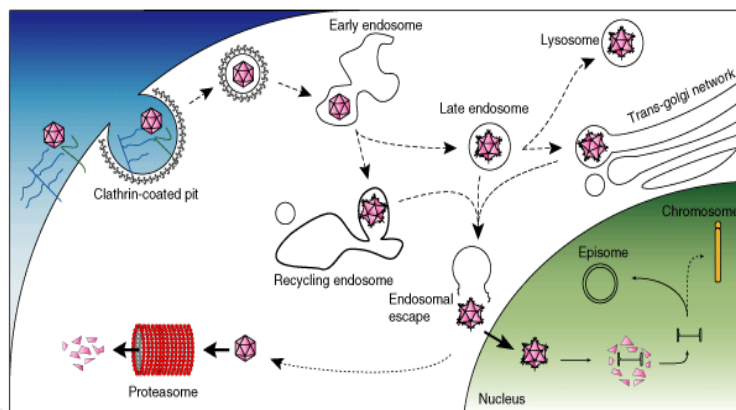
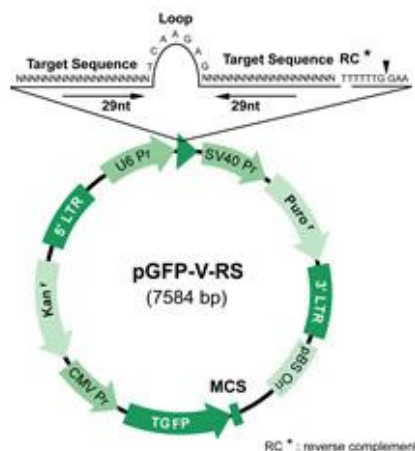
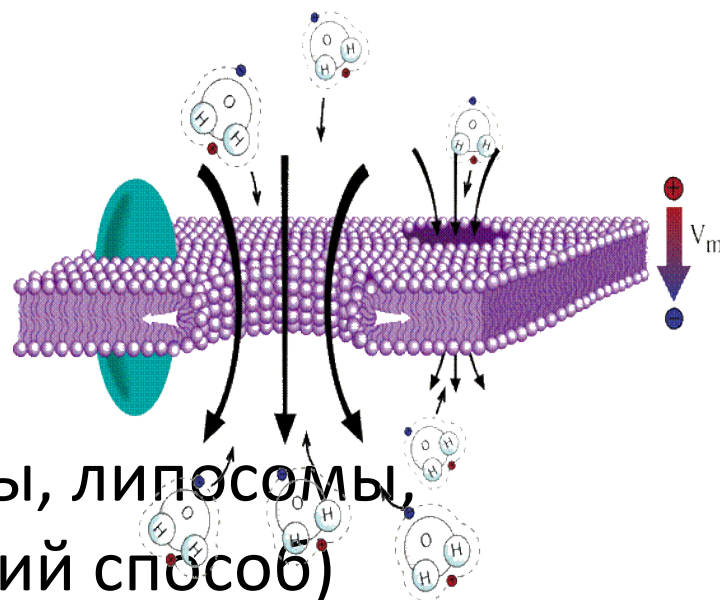


Использование эмбриональных стволовых клеток



Использование эмбриональных стволовых клеток

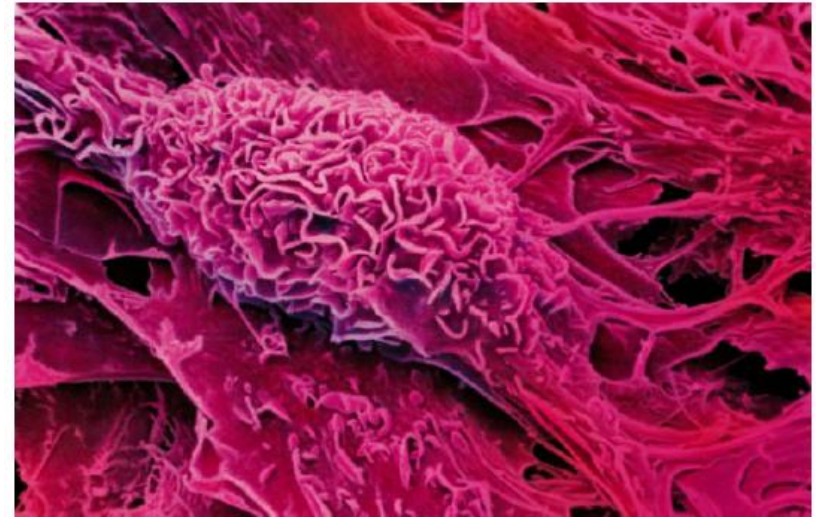
- Плазмиды (химические агенты, липосомы, электропорация, баллистический способ)
- Вирусная трансфекция



Fibroblast cells

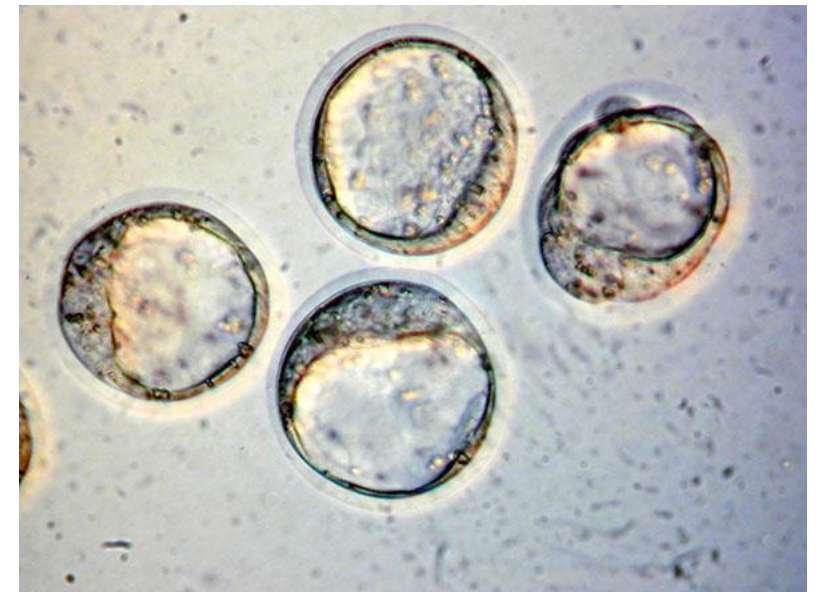
ПЛЮСЫ

- Возможность направленной интеграции трансгена в геном
- Можно выявить и отобрать клетки, получившие трансген



МИНУСЫ

- На настоящий момент данная методика демонстрирует свою эффективность только в работах с мышинными клетками



Чую, что трансгенез
это здорово, но... Для
чего все это
делается?



Основные направления использования трансгенных животных

- Моделирование заболеваний и изучение фундаментальных биологических процессов
- Продукция белков и ростовых факторов, используемых в науке и медицине
- Решение ксенотрансплантационных проблем
- Сельскохозяйственные и пищевые нужды
- С целью эстетического удовольствия (радовать глаз)

Моделирование заболеваний и изучение фундаментальных биологических процессов

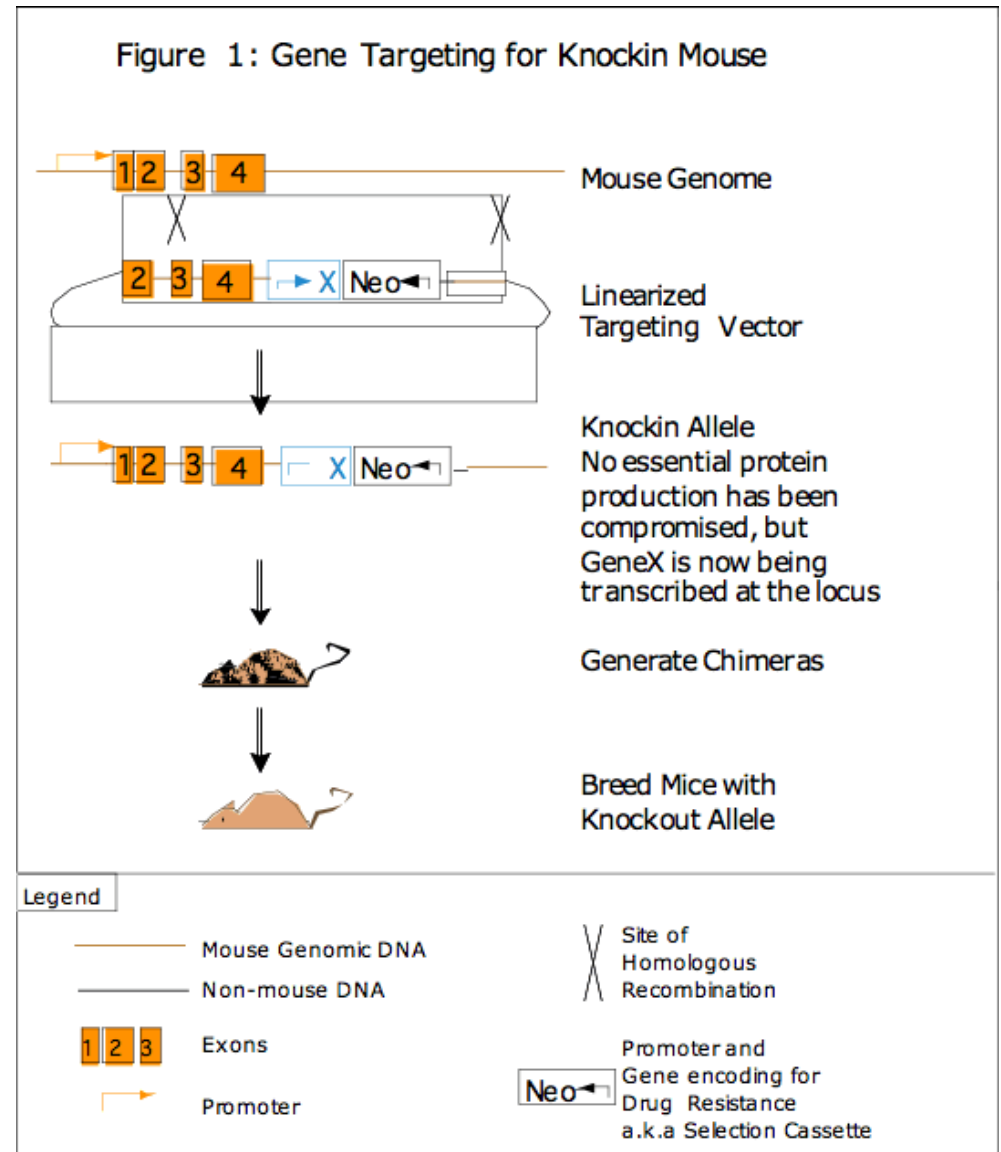


"Some genetic engineers we turned out to be!"

Моделирование заболеваний и изучение фундаментальных биологических процессов

KNOCK-IN

Интересующая последовательность ДНК с помощью гомологичной рекомбинации встраивается в выбранный хромосомный локус, при этом **не нарушается** работа других генов.

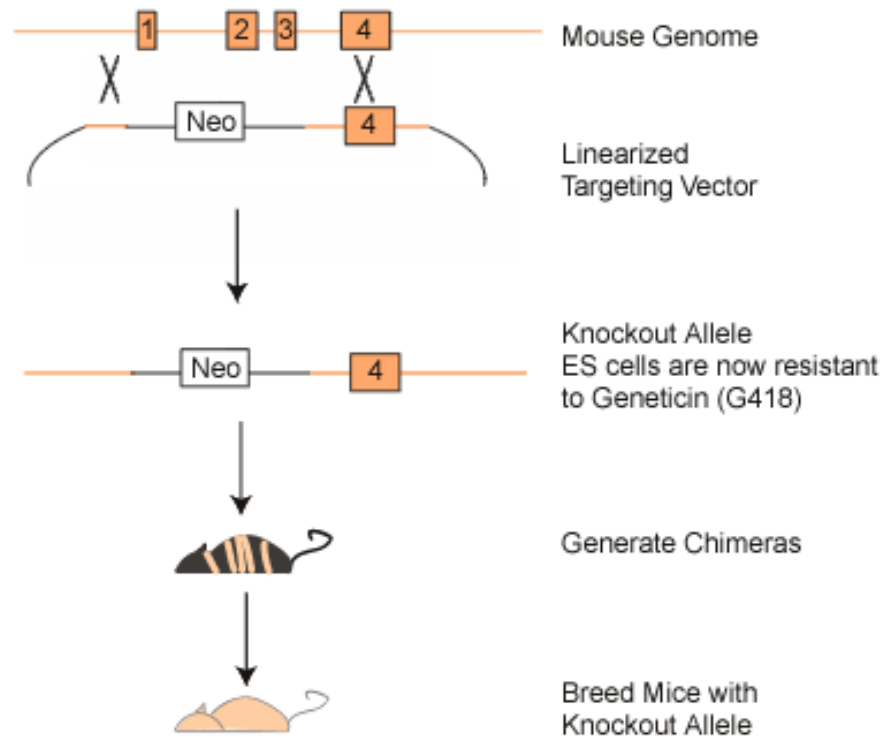


Моделирование заболеваний и изучение фундаментальных биологических процессов

KNOCK-OUT

последовательность ДНК с помощью гомологичной рекомбинации встраивается в выбранный хромосомный локус, при этом **нарушается** работа выбранного гена.

Figure 1: Gene Targeting for Knockout Mice



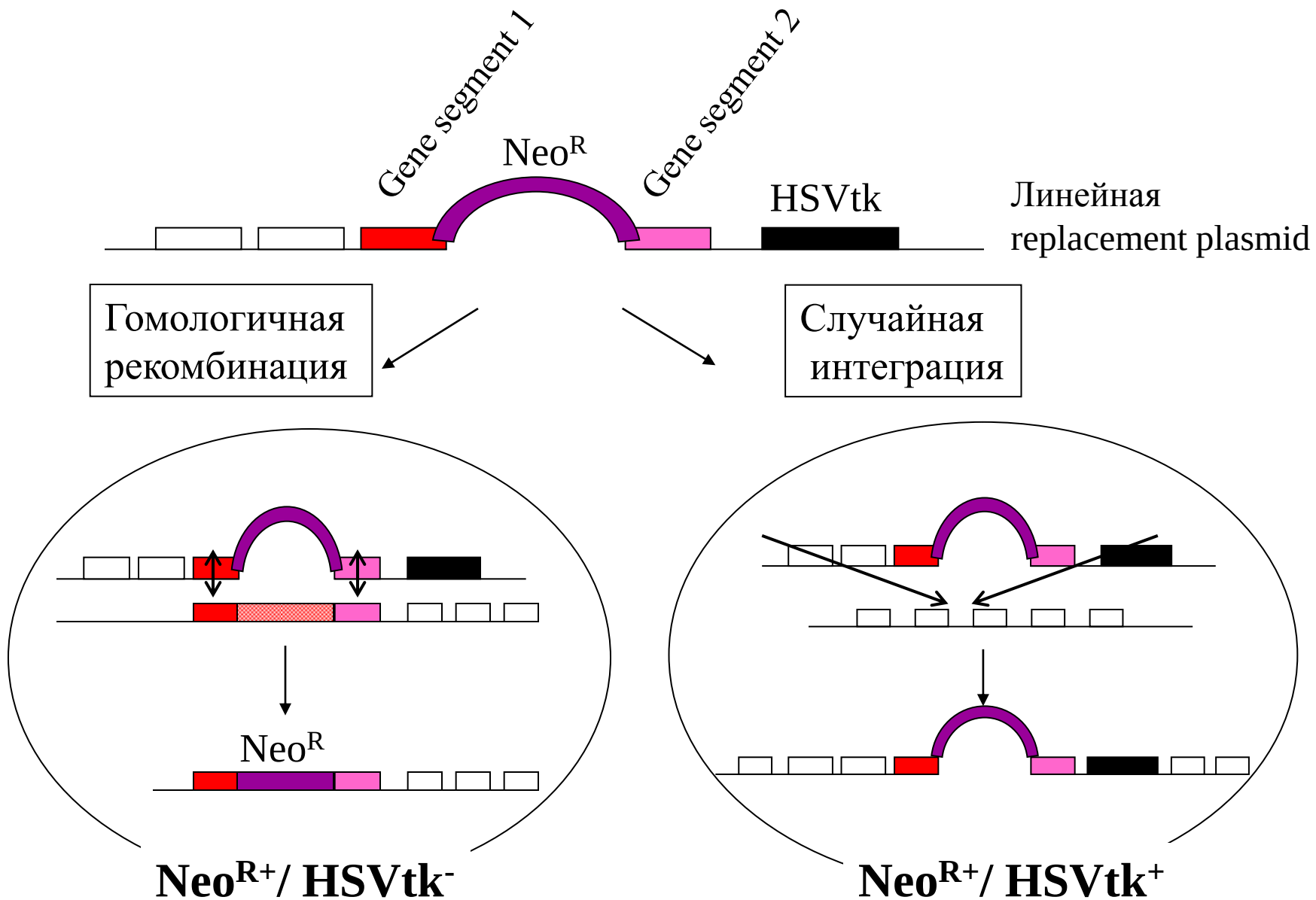
Сопутствующие проблемы knock-in и knock-out моделей

Помимо ожидаемого рекомбинационного события с достаточно большой вероятностью происходят случайные встройки трансгенной конструкции в геном, в результате чего становится очень сложно выявить «искомые» трансформированные клетки

Решение: Replacement vectors

Knock-out конструкт содержит: 1) **NeoR ген** фланкированный **двумя сегментами «гена мишени»** и **геном HSV-TK**

ЕС клетки отбираются по встройке NeoR и против интеграции HSV-TK* (NeoR+/ HSVtk-) на среде с **ганцикловиром**



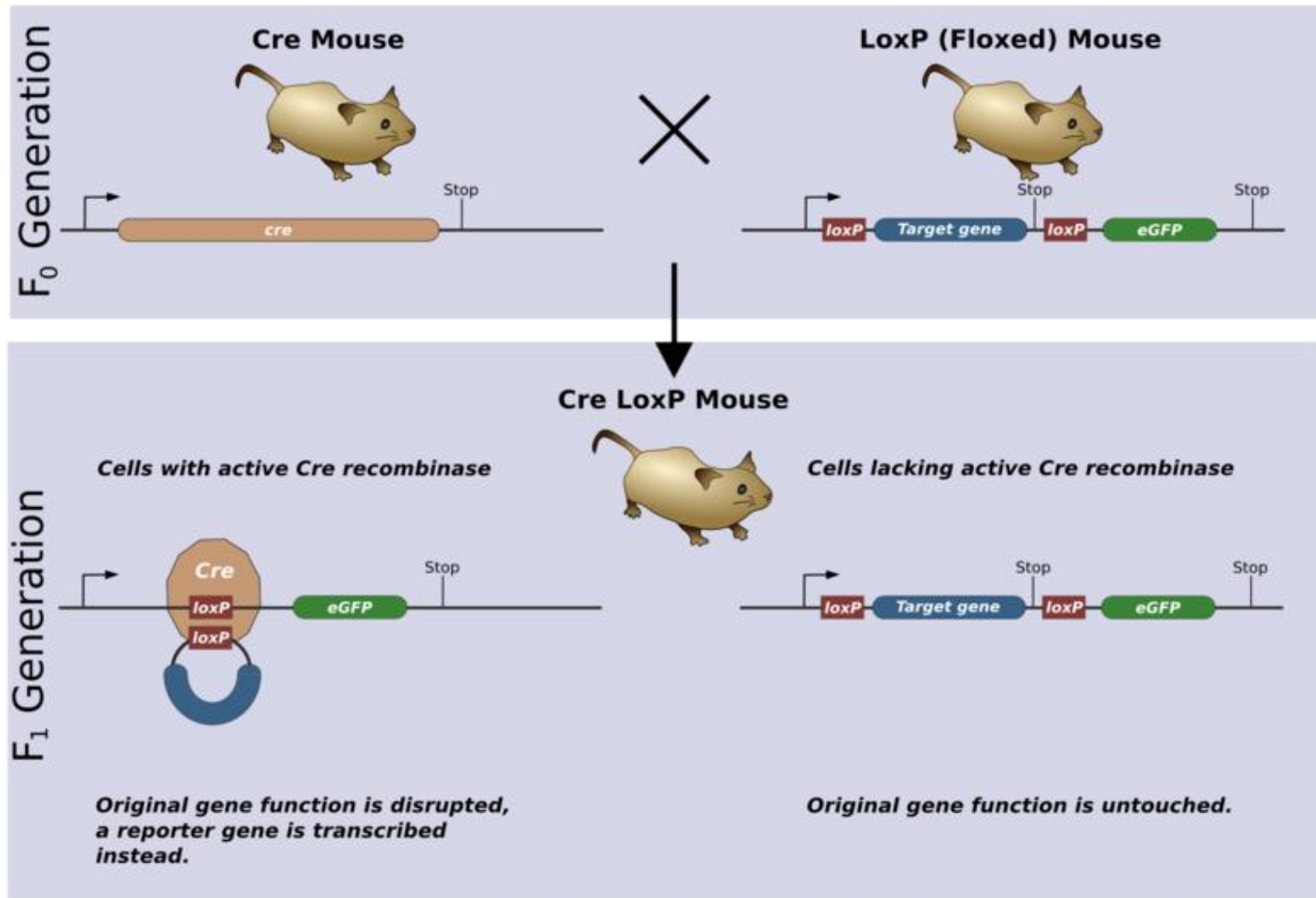
Ганцикловир убивает клетки, содержащие HSV-TK

Проблемы интерпритации knock-out экспериментов

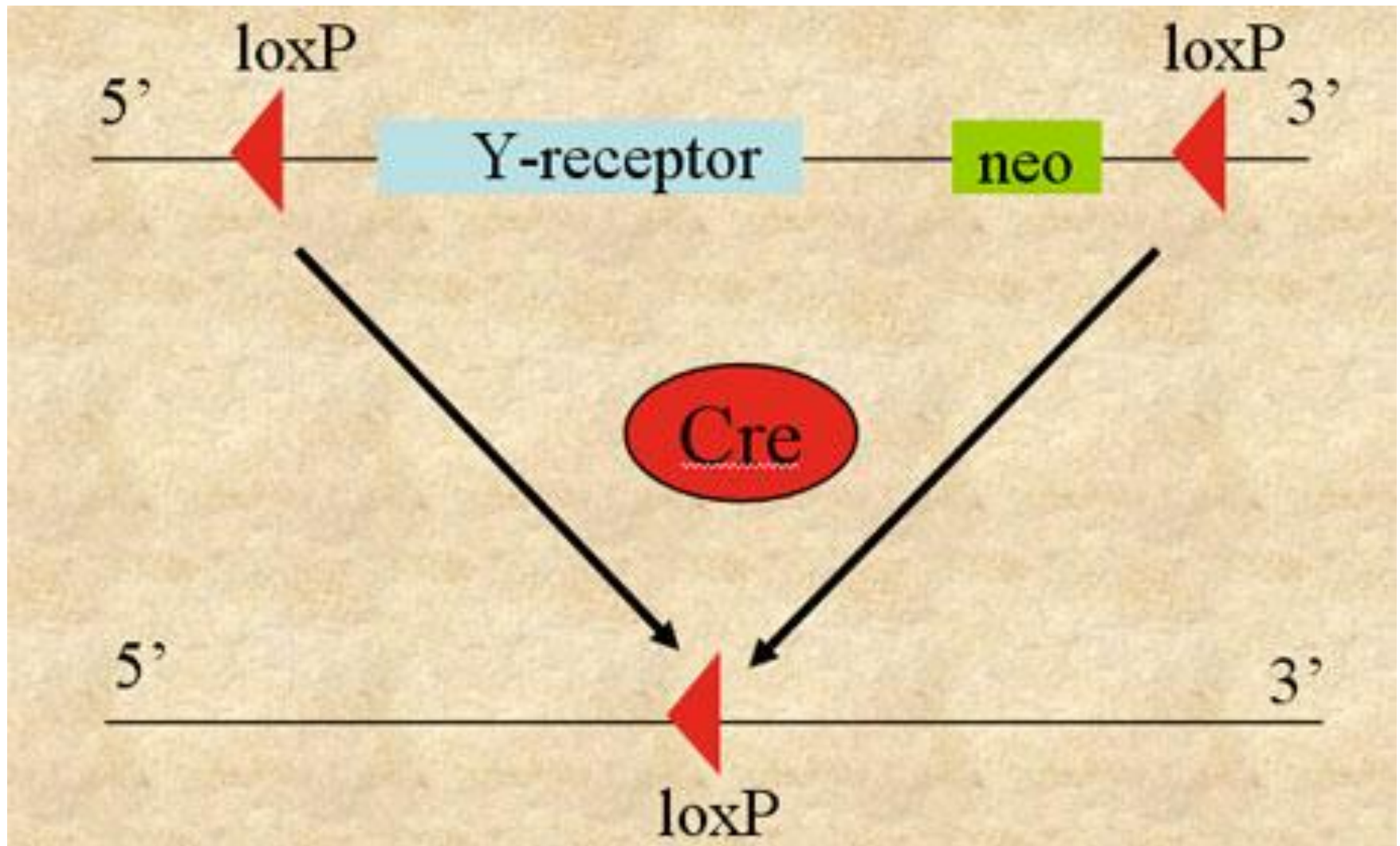
- 1) Достаточно часто нокаутные эмбрионы погибают, как в таком случае можно узнать о роли гена в организме взрослого животного?
- 2) Что делать, если мы не видим новый фенотип?
- 3) Вариабельность нового фенотипа
- 4) Комбинаторное действие генов

Нокаут по какому-либо гену не дает нам исчерпывающей информации о том, как функционирует данный ген в каком-либо органе или ткани.

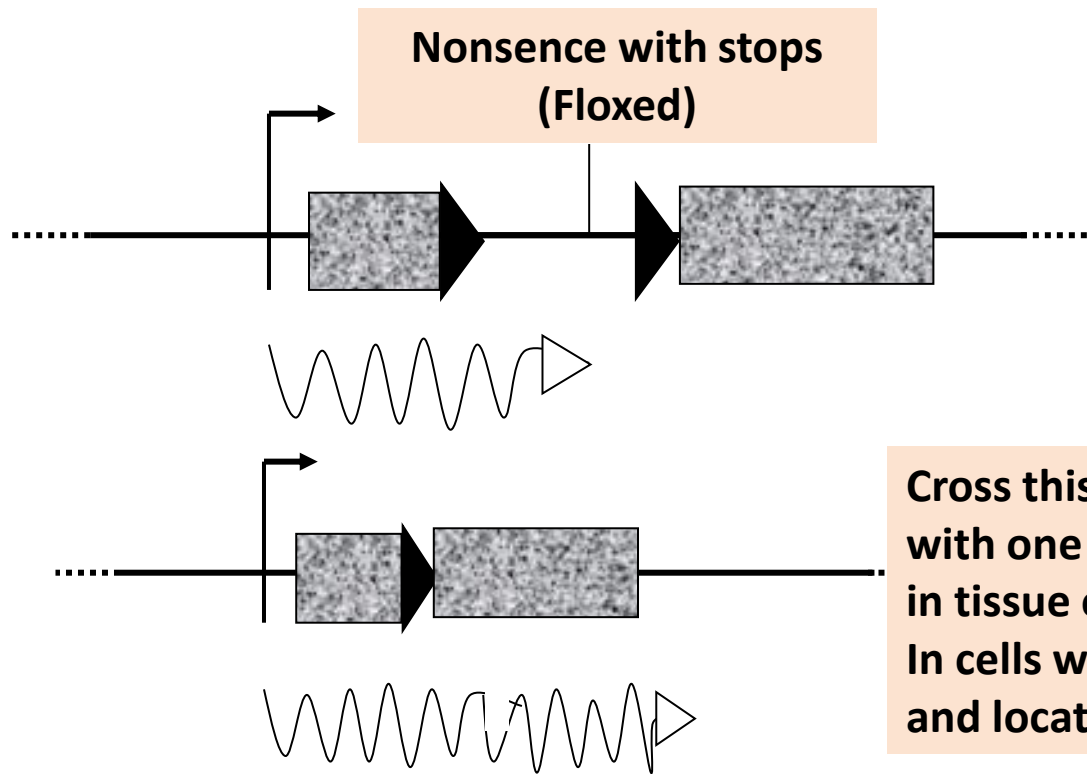
Условный (conditional) knock-out



Условный (conditional) knock-out



Активация трансгена с помощью Cre-рекомбиназы



**Cross this transgenic mouse
with one expressing Cre
in tissue of interest.
In cells where Cre is expressed
and located in nucleus, get....**

Нарушения в гене *kit* приводят к нарушению пигментации.

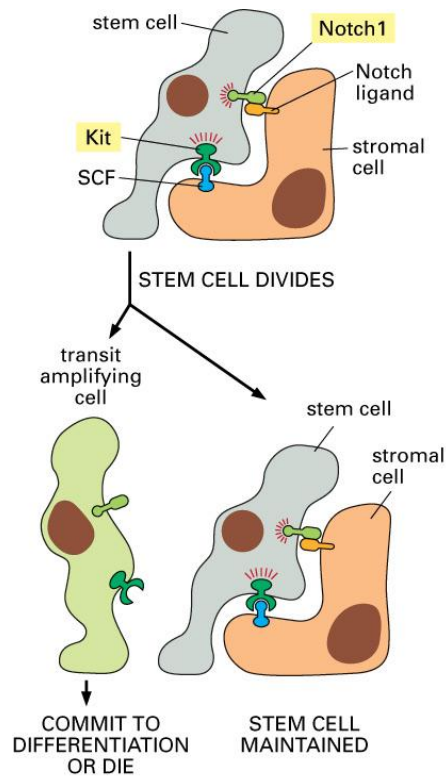
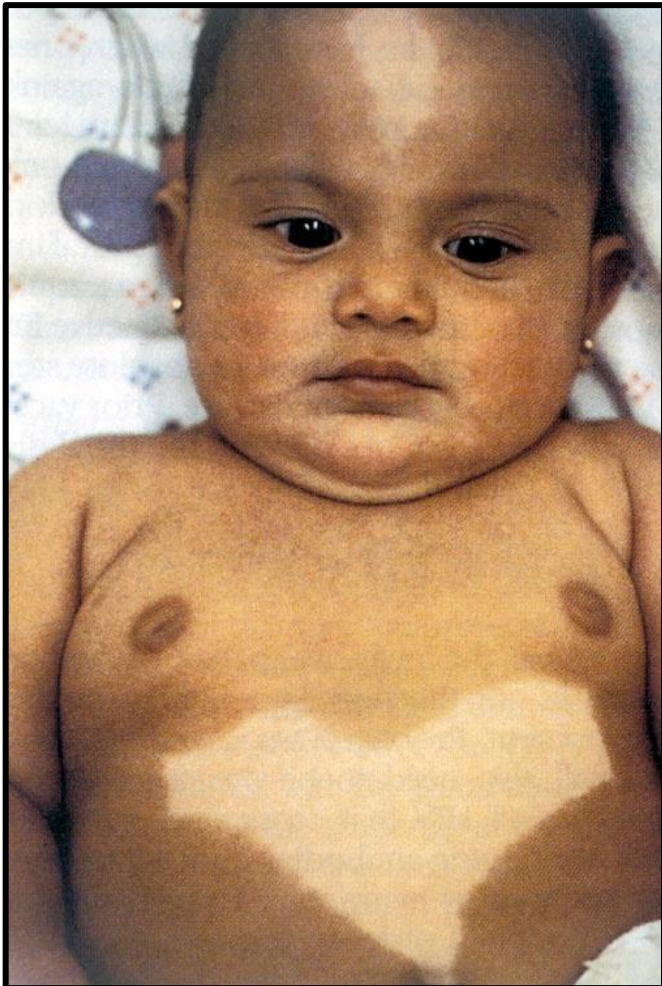
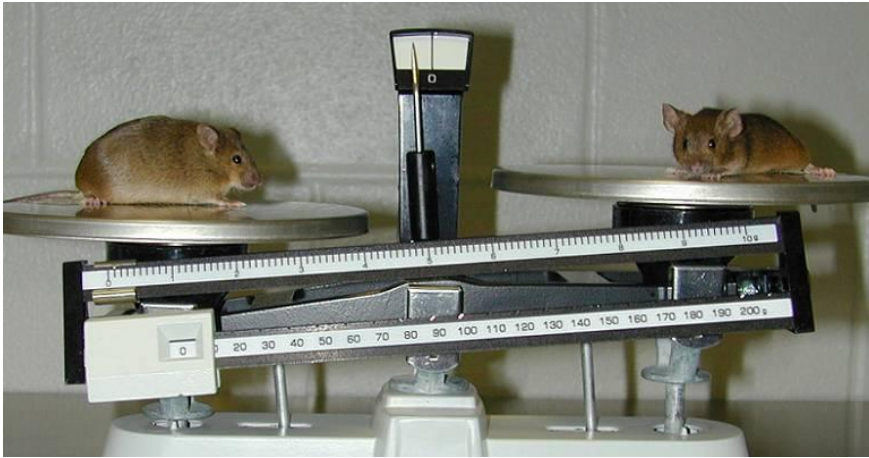


Figure 22-36. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.





Нокаут как модель изучения ожирения

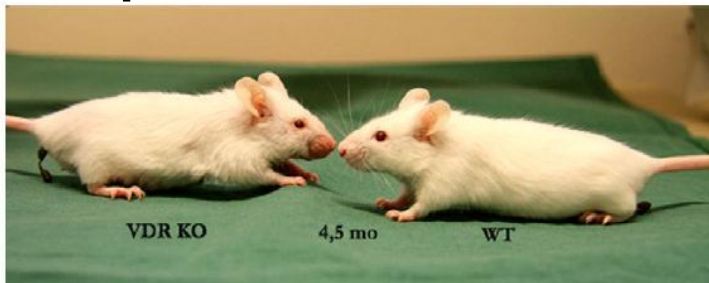
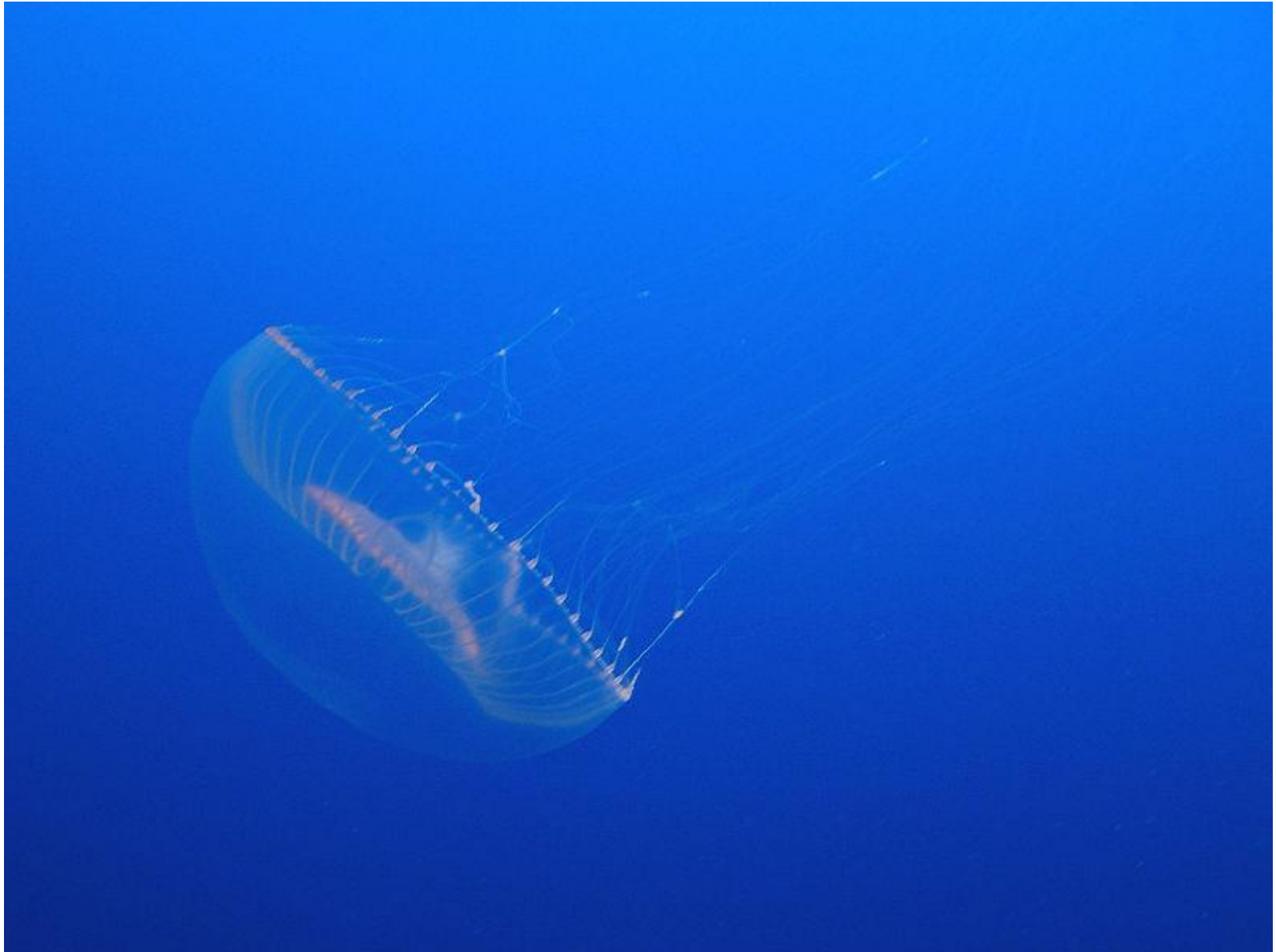


Fig. 2. Phenotype of VDR knockout mouse (KO) compared to wildtype littermate (WT; NMRI background strain) at the age of 4.5 (top) and 8.5 (bottom) months.

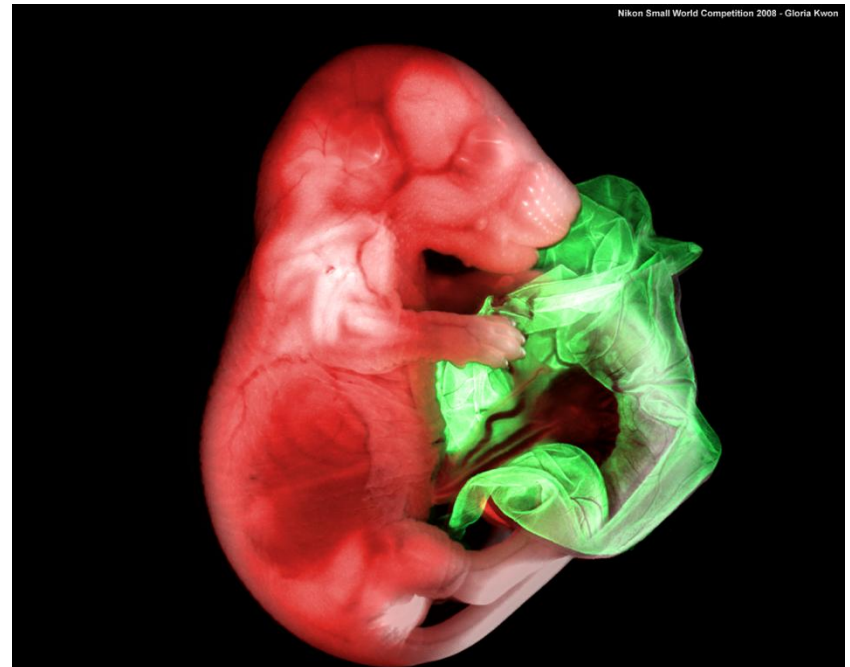
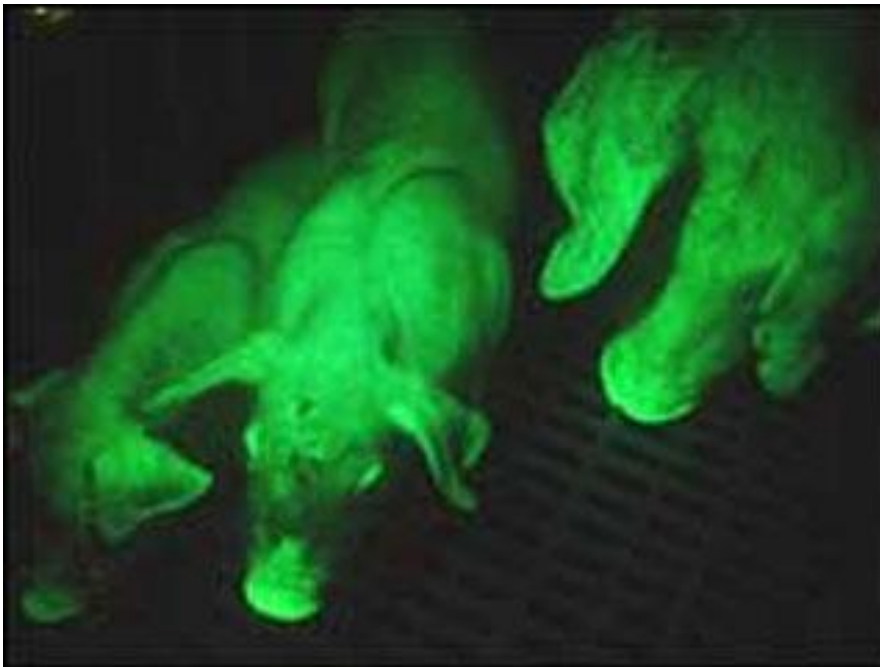
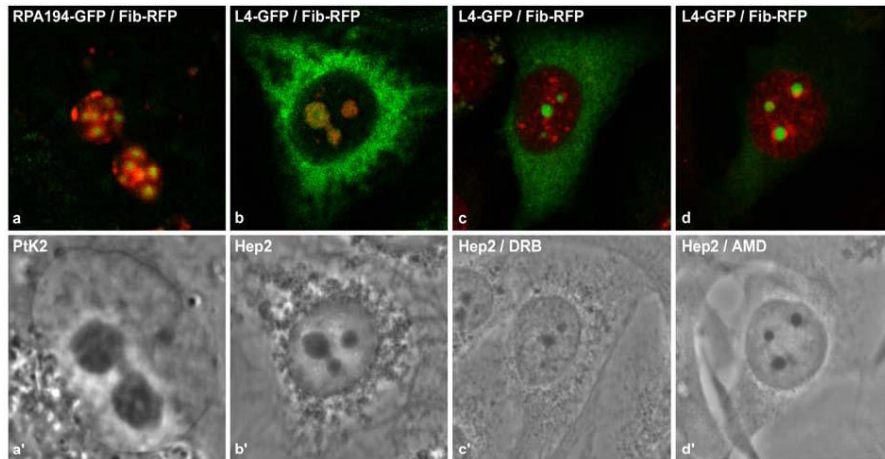


Нокаут по гену **FGF5** (fibroblast growth factor 5). Данный ген отвечает за негативную регуляцию роста шерсти.

Green Fluorescent Protein

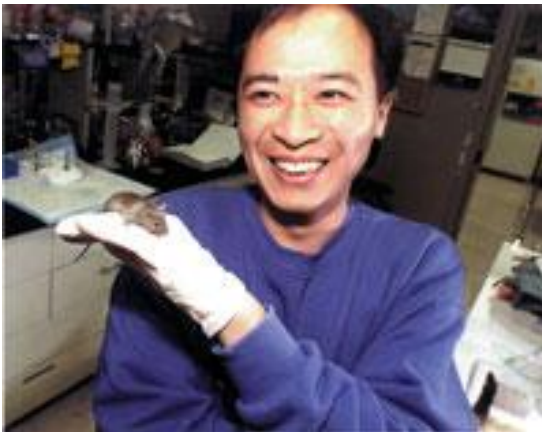


Green Fluorescent Protein



“Doogie”: умная мышь (Tang et al, 1999)

Синаптическая
оверэкспрессия
рецепторов **NR2B**
привела к
повышенной
обучаемости и
способности
запоминать ранее
предъявленные
объекты



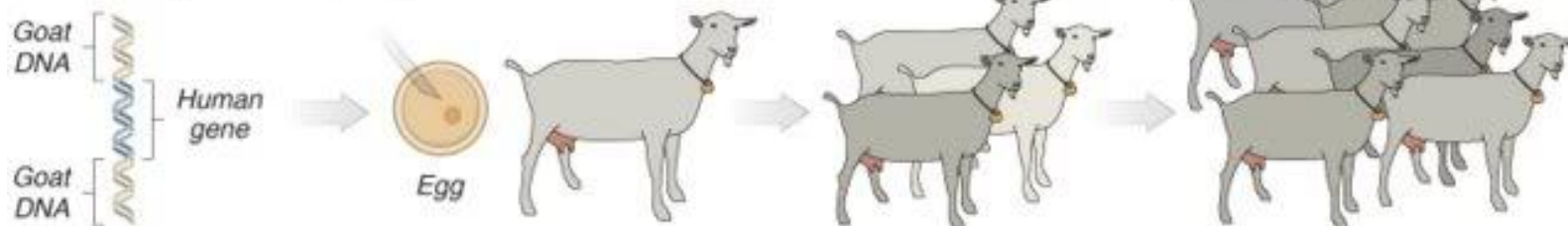
Примеры

- **AIDS mouse**; в геном мыши введен геном ВИЧ (кроме двух генов). На таких мышах изучается раннее поведение вируса
- **Alzheimer's mouse**; мыши этой трансгенной линии несут мутацию, ответственную за раннее проявления заболевания
- **Oncomouse**; различные варианты, такие как отсутствие аллеля гена *p53*, наличие трансгенной конструкции вирусный промотор-ген *тус* и так далее.

Продукция белков и ростовых факторов, используемых в медицине

Bioengineering on the Farm

The Food and Drug Administration has approved the first drug produced in the milk of genetically engineered animals.



MODIFYING THE DNA

A human gene that produces the blood protein antithrombin is inserted into a short strand of goat DNA.

IMPLANTING THE DNA

The modified DNA is injected into the nucleus of a fertilized goat egg, which is then implanted into a female.

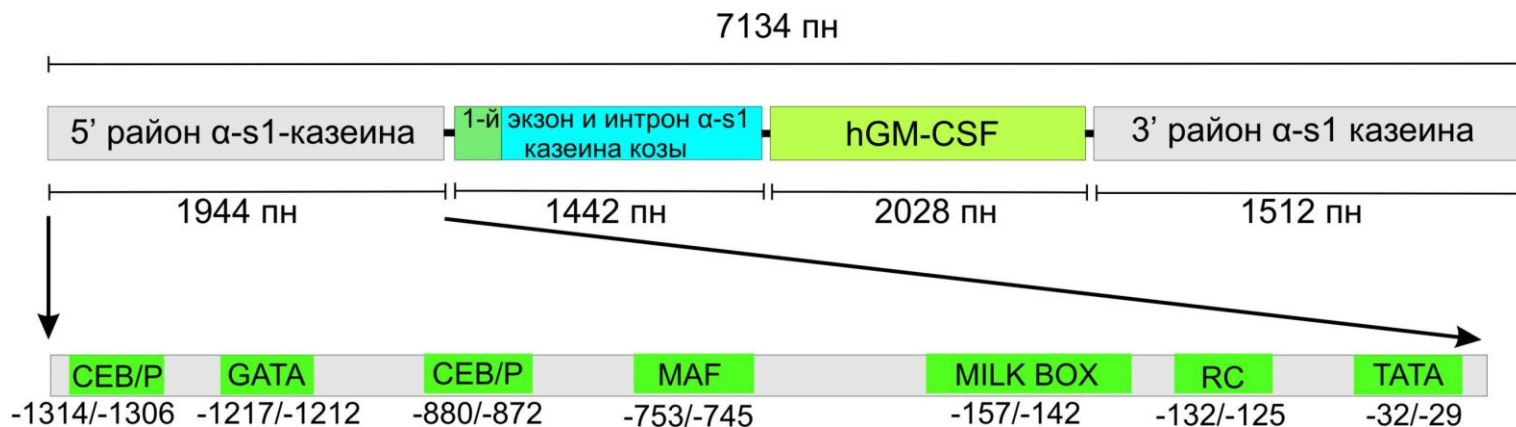
TESTING THE OFFSPRING

Kids born from the modified eggs are tested for the presence of antithrombin in their milk. Promising kids are bred normally to create a herd of modified goats.

EXTRACTING THE PROTEIN

Milk from the herd is filtered and purified. Annually, each goat can produce as much antithrombin as 90,000 human blood donations.

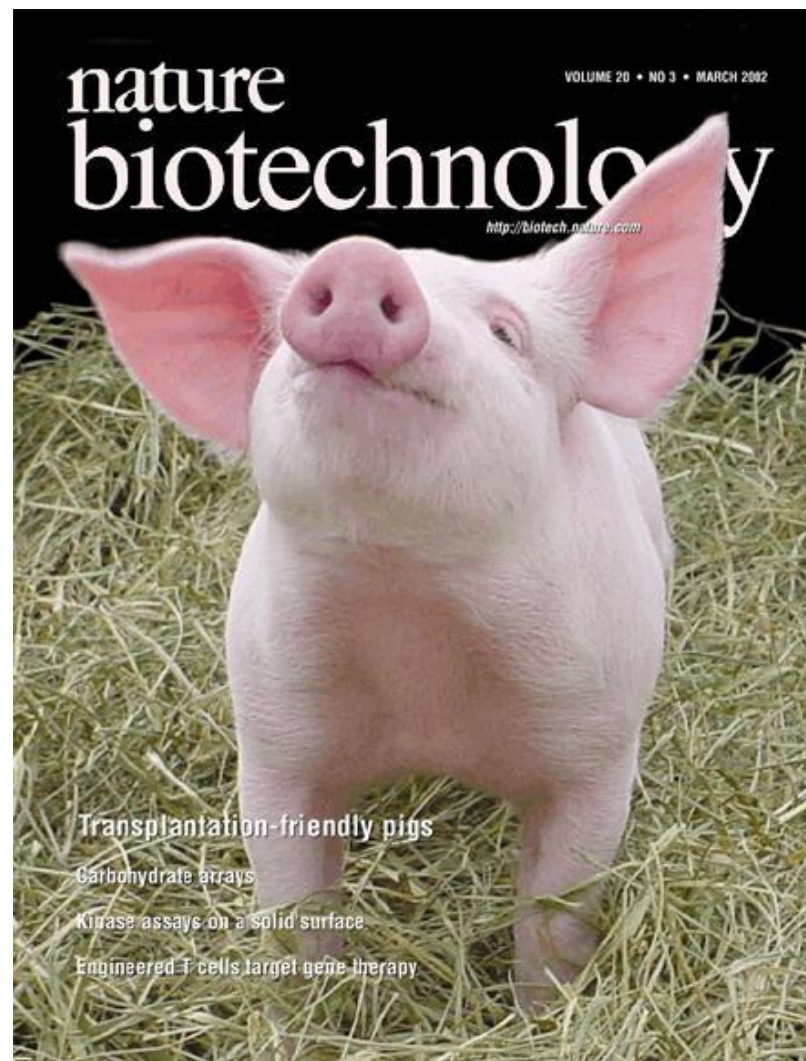
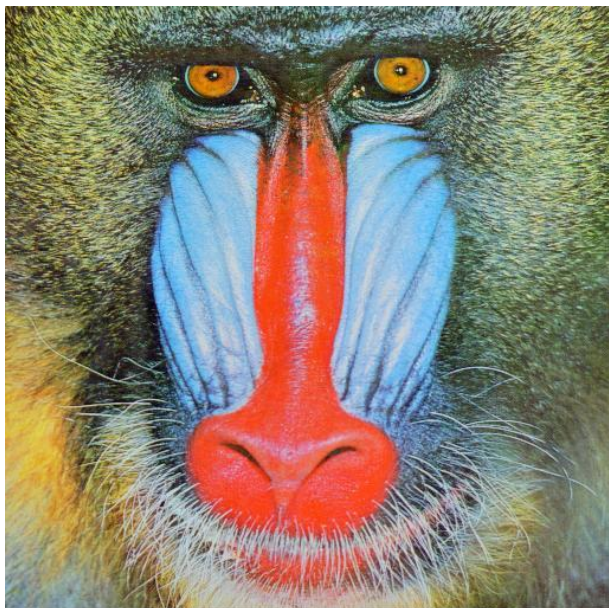
Sources: GTC Biotherapeutics





Решение сопутствующих проблем ксенотрансплантаций

На поверхности свиных клеток присутствует **альфа-1,3 – галактозилтрансфераза**.
В 2002 году впервые были получены поросята, у которых был нокаутирован ген отвечающий за ее синтез (Lai et al, 2002).



Сельскохозяйственные и пищевые нужды

1. Давать много
молока, мяса,
шерсти, икры, и т.д.
2. Не болеть
3. Быть сильным
4. Мало кушать
5. Быстро расти
6. Хорошо
размножаться
(опционально)



COUNTERTHINK "FISHING FOR GM SALMON"



Сельскохозяйственные и пищевые нужды



TRANSGENIC PIGS
more lean - less fat



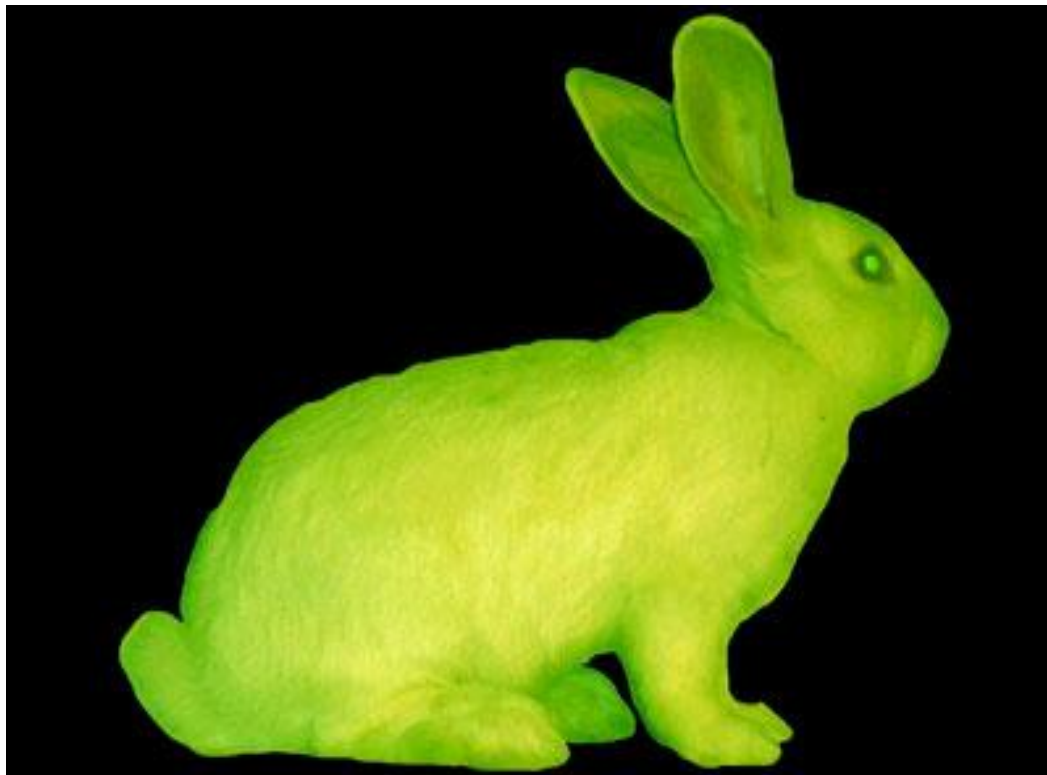
Control

Transgenic

Эстетическое удовольствие



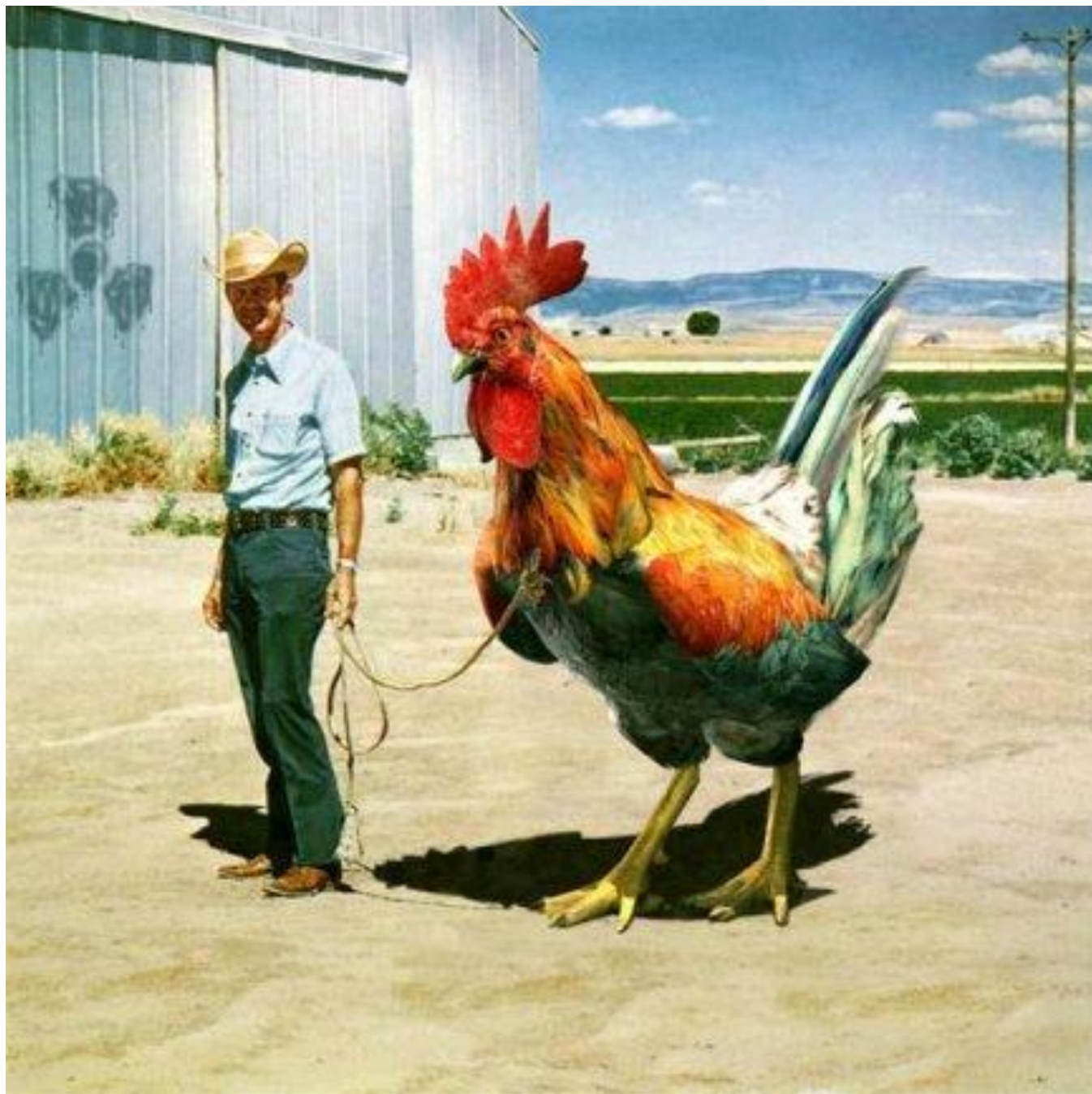
Эстетическое удовольствие



Морально-этические проблемы, встающие на пути трансгенных исследований

Трансгенез и биотехнологии дают нам колоссальное количество новых возможностей, таких, как победа над голодом, предотвращение опасных заболеваний и т.д. Однако, на ум приходят некоторые вопросы, такие как:

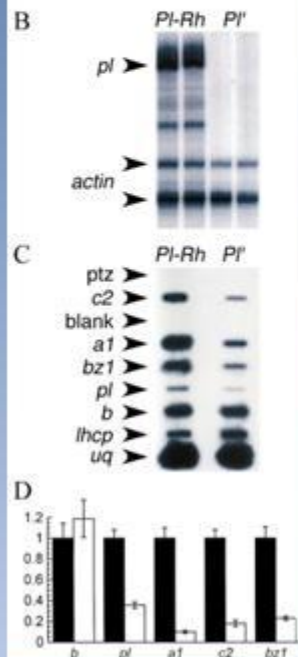
- Не размываем ли мы границу между различными видами животным, создавая искусственные комбинации их генотипов?
- Наносят ли трансгенные организмы вред здоровью (своему или окружающим)?
- Каких последствий можно ожидать, если трансгенные организмы «вырвутся» из лабораторных условий?
- Должны ли мы вводить какие-либо ограничения или моратории на использование трансгенных технологий?
- Причиняем ли мы боль и страдания созданным нами существам (химерам и т.д.)?
- Если трансгенные вмешательства будут проводиться на человеке, можно ли в таком случае считать результирующий организм «человеком»?
- И многое другое..



28 апреля

16-00

конференц-зал ИЦиГ



публичная лекция

**«Молекулярные методы анализа
структурно-функциональной
организации генов и геномов
(на примере высших растений)»**

Хлесткина Е.К.

ИЦиГ СО РАН