

Основы генной инженерии и биотехнологии



Лекция 7

Трансгенные животные

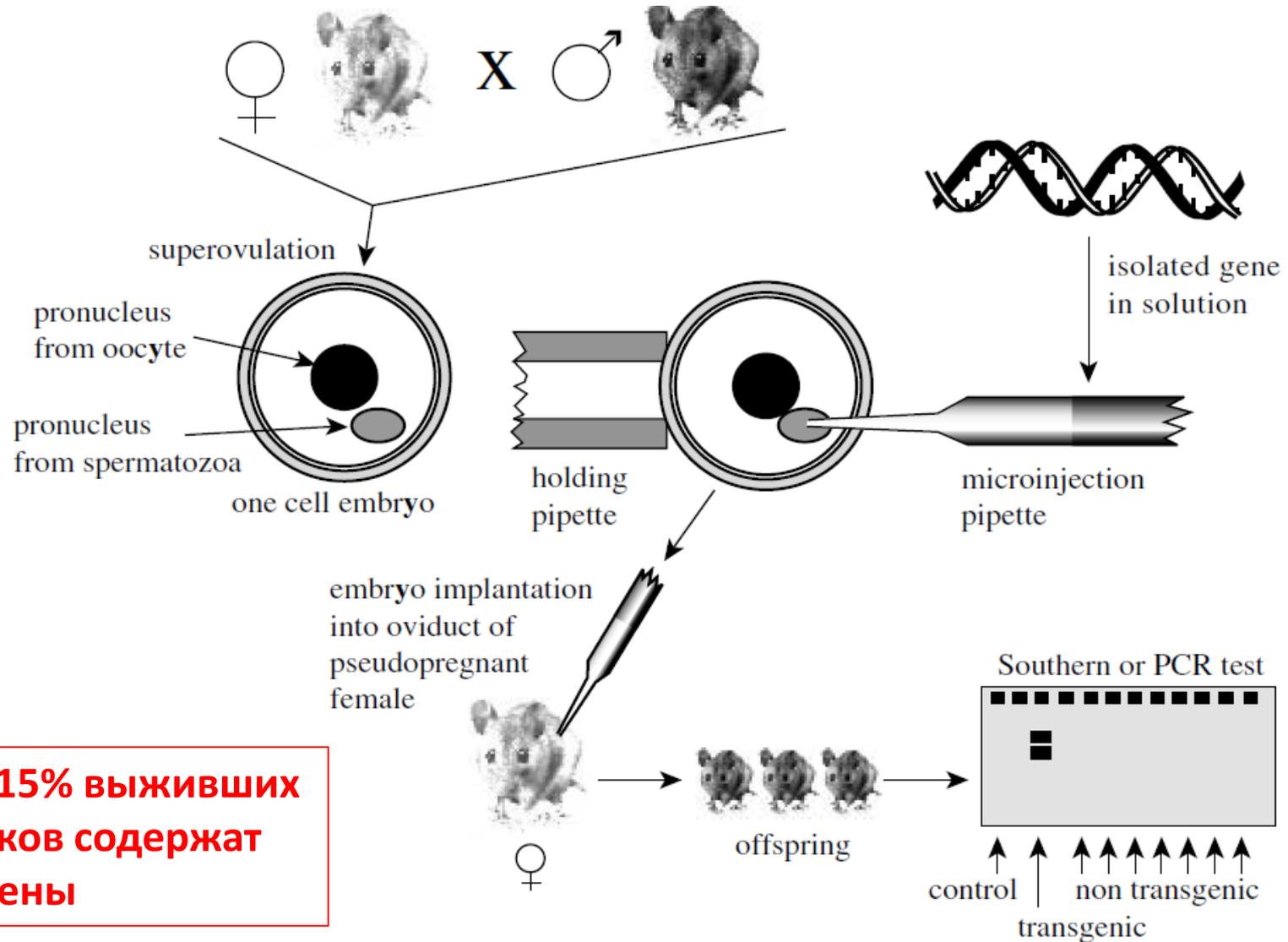
Трансгенез:

**введение генов в
эукариотический организм путем
генетической трансформации,
трансфекции или переносом
ядер соматических клеток
(неполовым путем)**

Три способа получения трансгенных ЖИВОТНЫХ

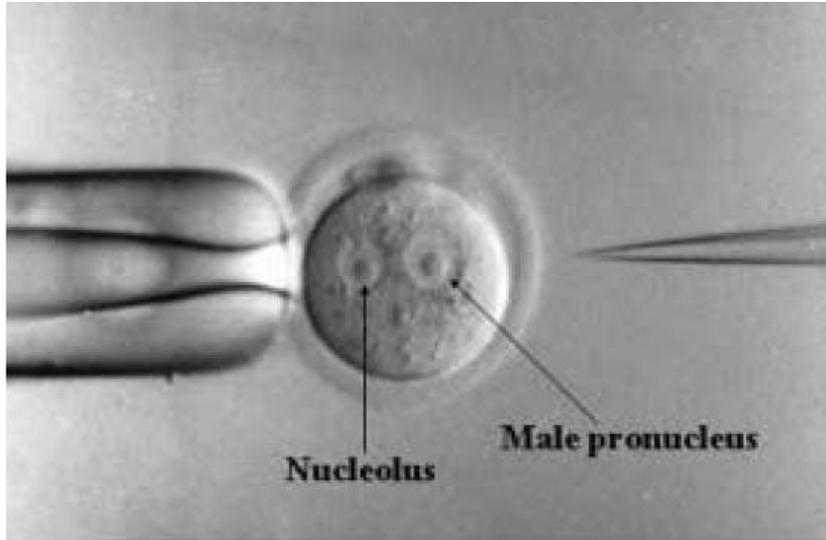
1. Прямая инъекция ДНК в пронуклеусы оплодотворенных яйцеклеток
2. Использование рекомбинантных вирусов для заражения эмбриональных клеток зародыша
3. Использование эмбриональных стволовых клеток (ES)

Получение трансгенных мышей путем прямой микроинъекции ДНК в пронуклеус

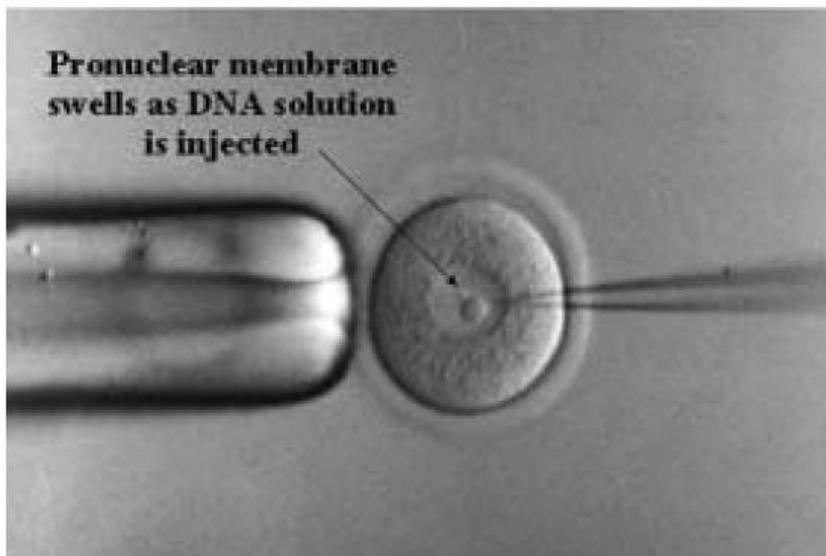


Лишь 15% выживших потомков содержат трансгены

Прямая инъекция ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки мыши

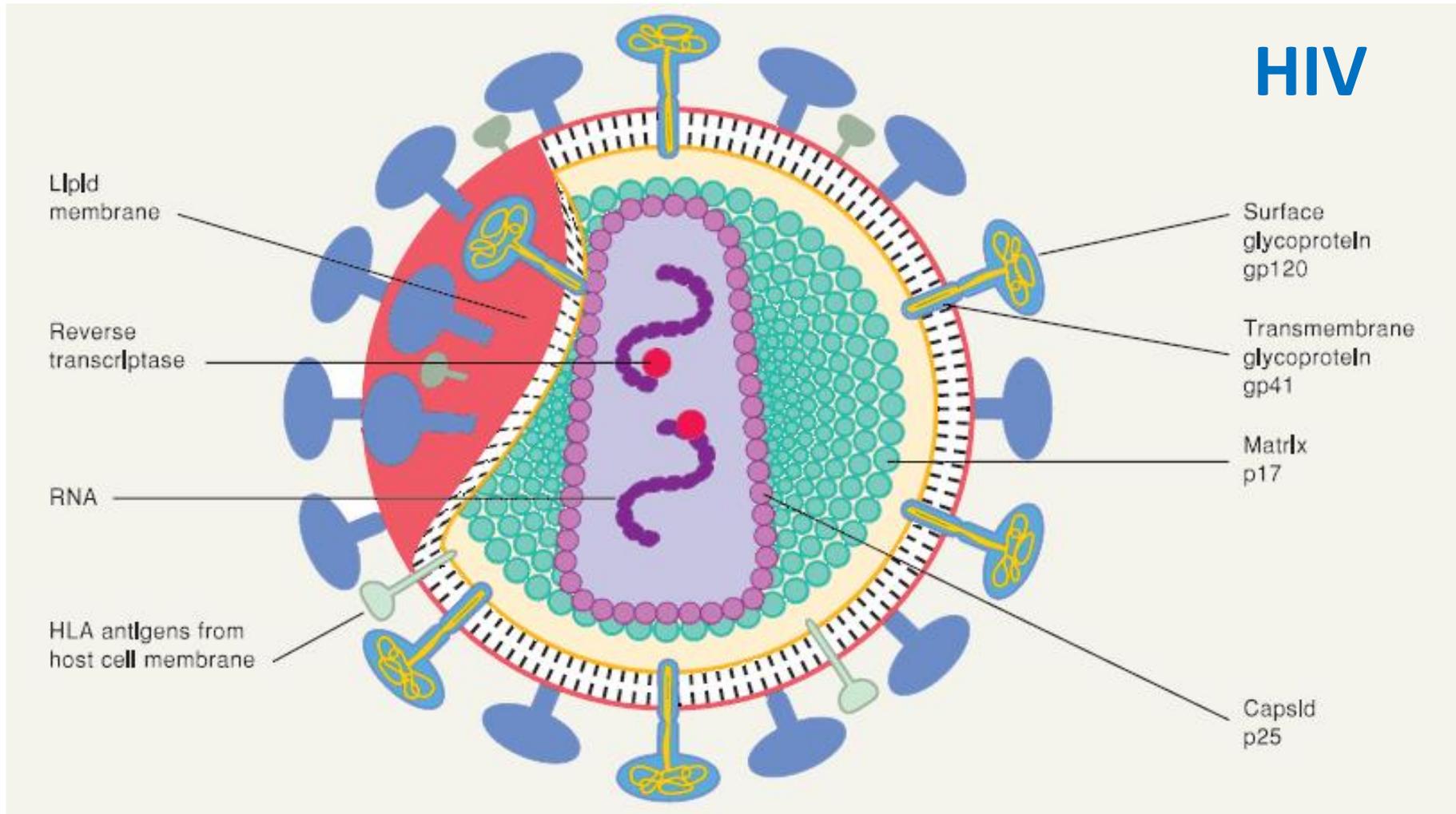


Оплодотворенная яйцеклетка фиксирована удерживающей пипеткой. Справа игла, содержащая ДНК

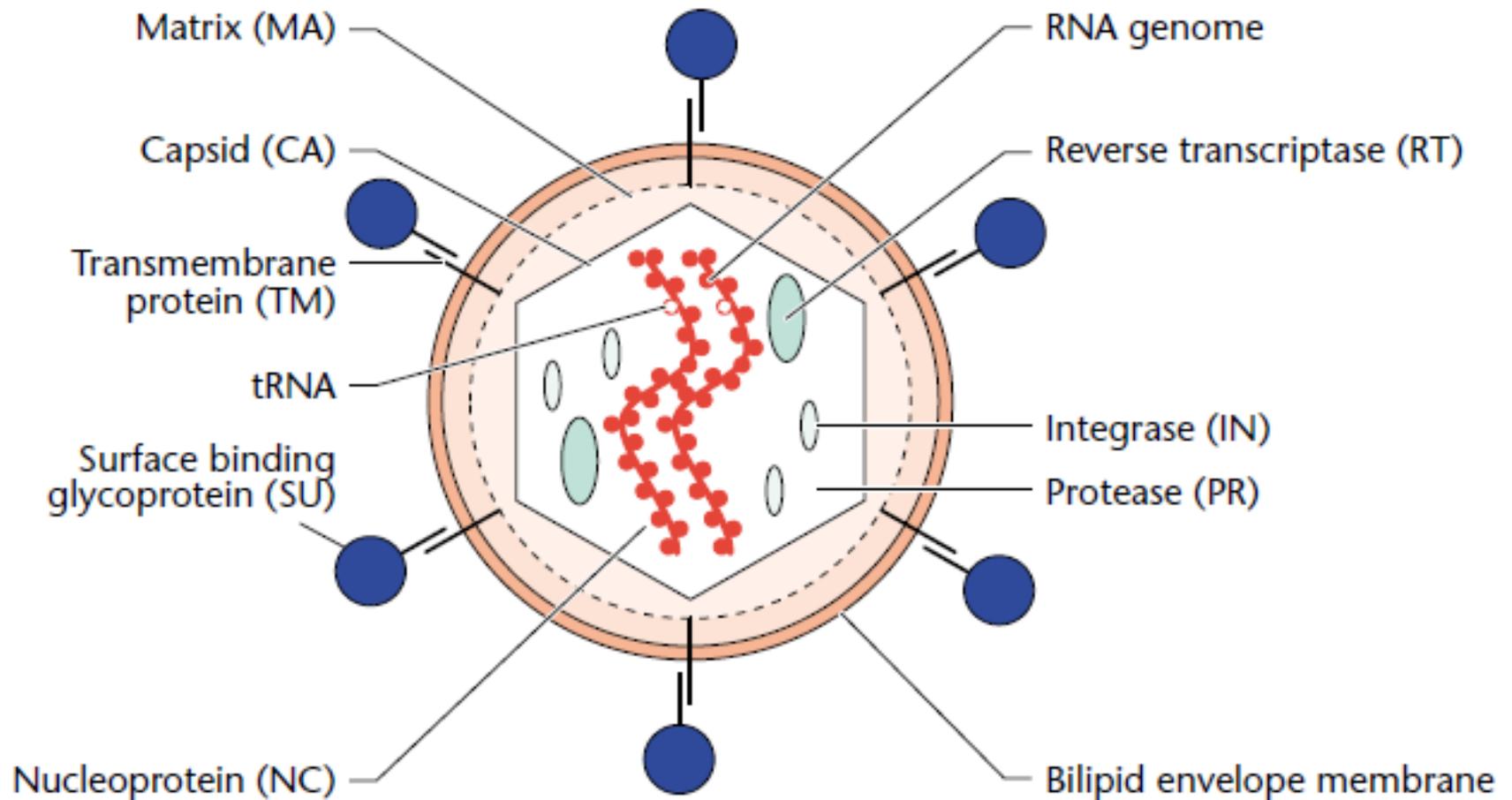


Инъекция раствора ДНК в пронуклеус сопровождается увеличением его объема

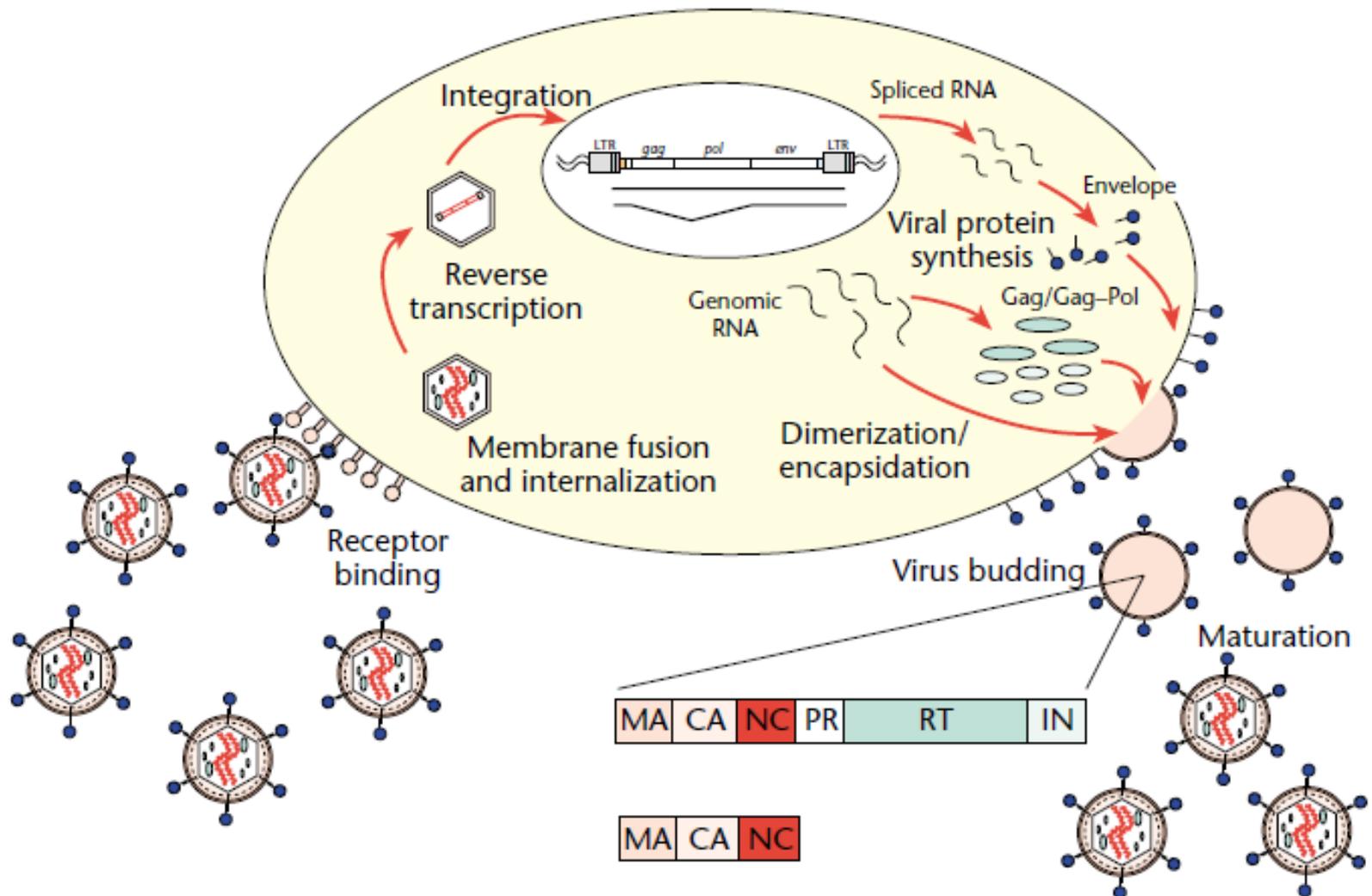
Ретровирусные векторы



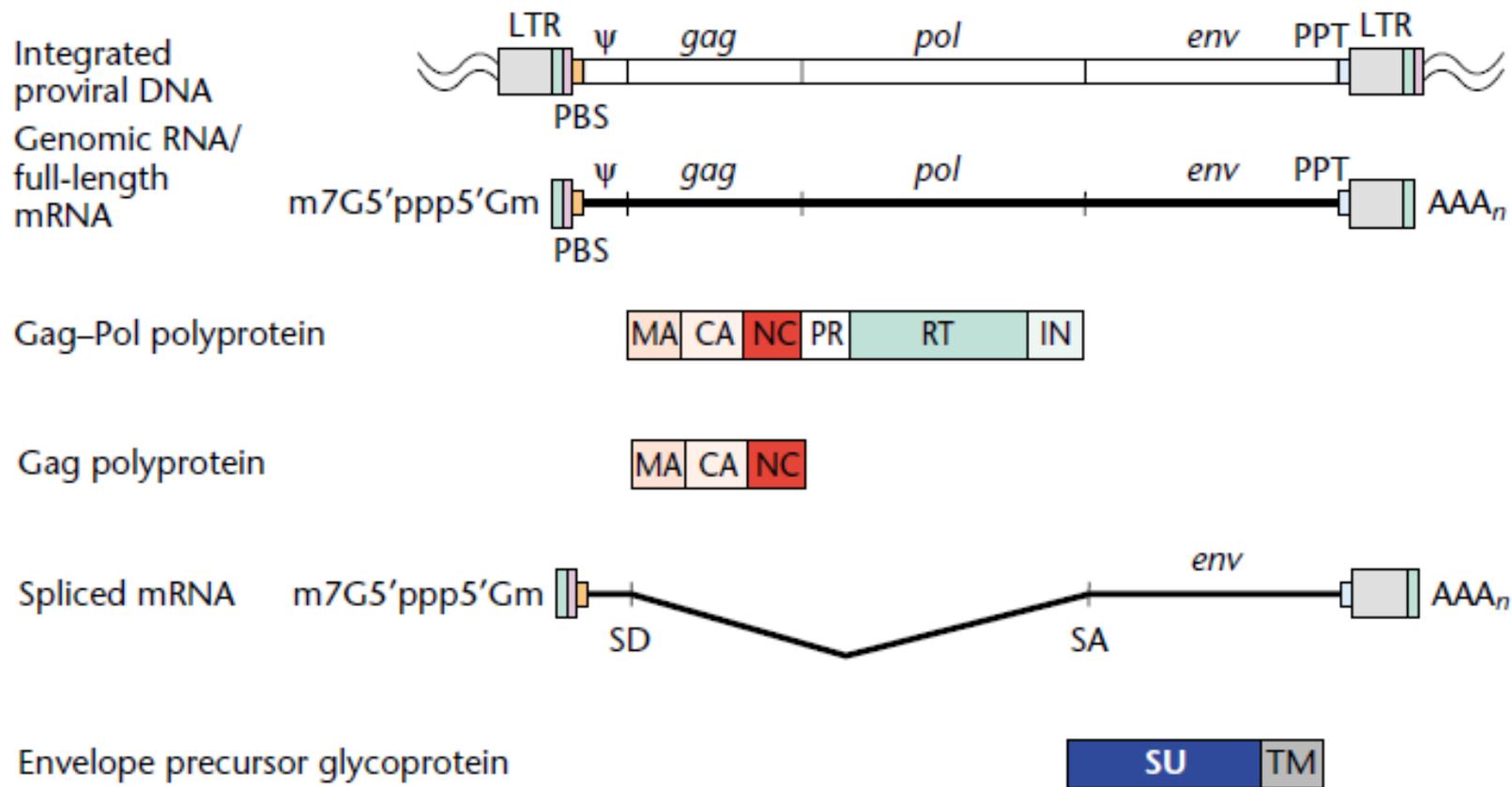
Строение ретровирусной частицы



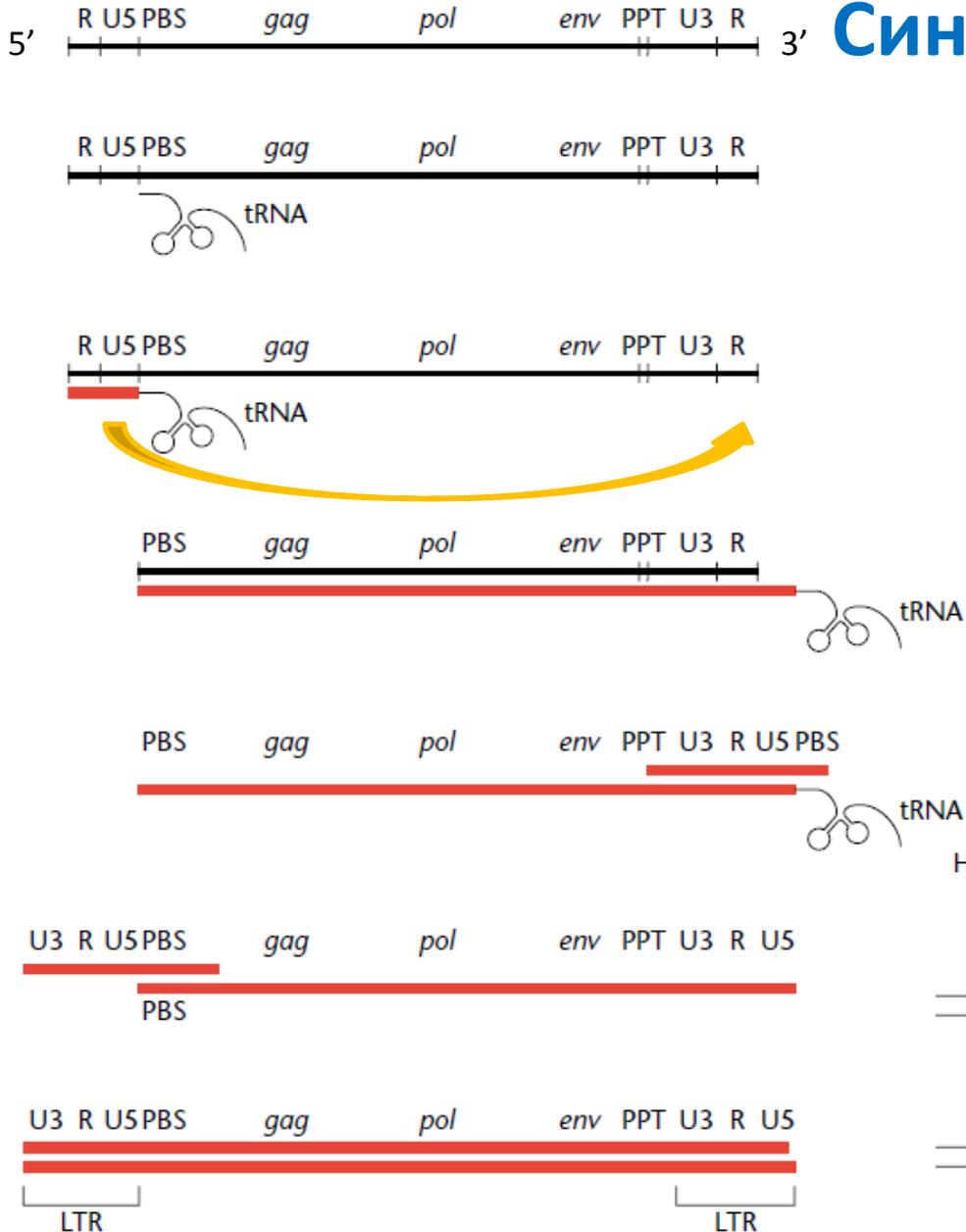
Цикл размножения ретровирусов



Строение генома ретровируса и продуктов его экспрессии

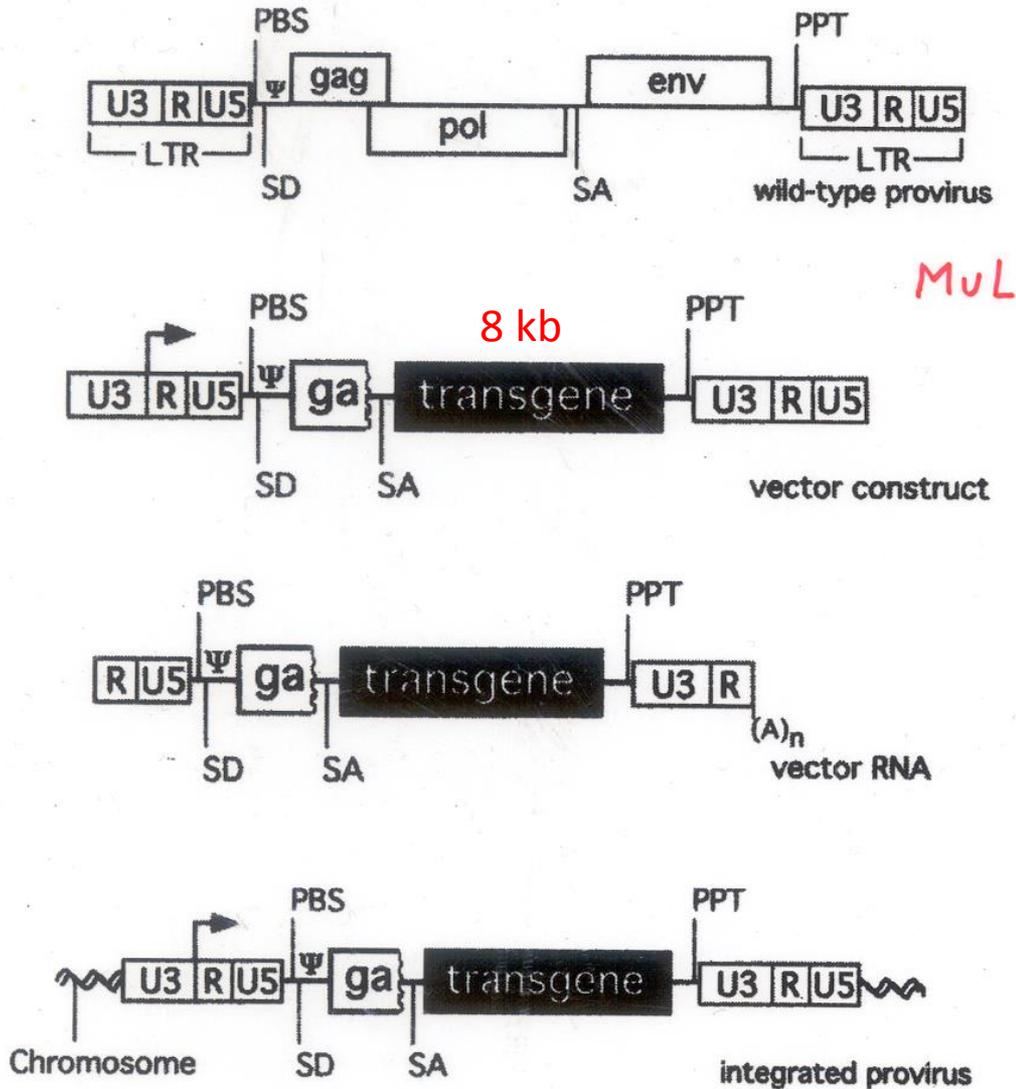


Синтез кДНК ретровируса



- ❖ тРНК взаимодействует с сайтом связывания праймера (PBS)
- ❖ ОТ синтезирует фрагмент ДНК, который переносится на 3'-конец РНК и синтезирует (-)-цепь кДНК
- ❖ Устойчивый к РНКазе Н фрагмент (+)-цепи РНК используется как праймер для синтеза короткого фрагмента (+)-цепи кДНК, PBS – на матрице тРНК
- ❖ Фрагмент переносится на 3'-конец (-)-цепи кДНК и используется в качестве праймера для синтеза (+)-цепи
- ❖ В результате на концах кДНК образуются длинные концевые повторы – LTR

Схема получения и интеграции ретровирусного вектора (MuLV)



PBS – сайт связывания праймера

SD, SA – донорный и акцепторный сайты сплайсинга

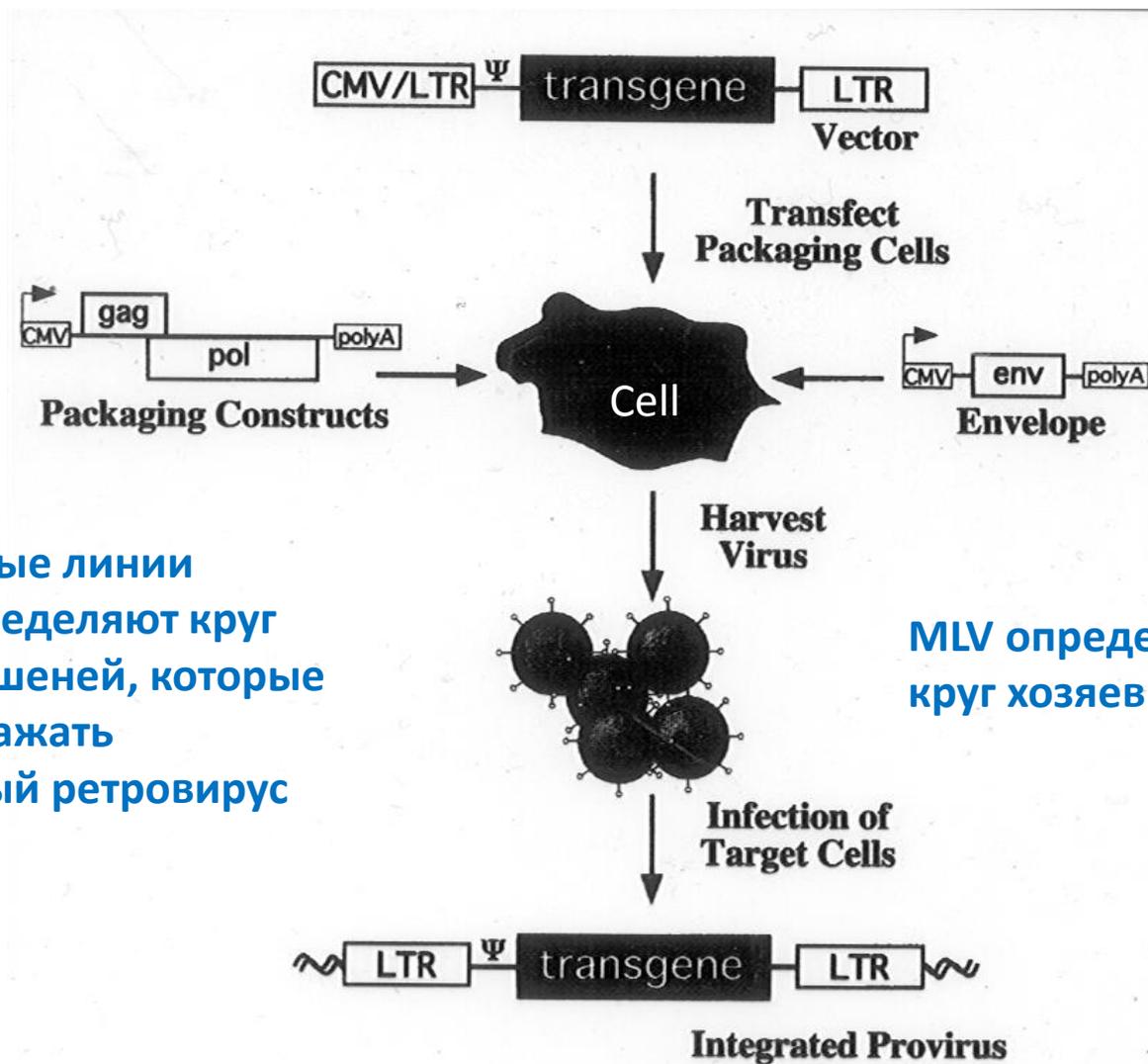
Ψ – упаковочный сигнал

PPT – полипуриновая последовательность

LTR – длинный концевой повтор

Трансген транскрибируется с промоторно-энхансерной области U3 5'-концевого LTR

Упаковка ретровирусного вектора в вирусные частицы



Упаковочные линии клеток определяют круг клеток-мишеней, которые может заражать трансгенный ретровирус

MLV определяет широкий круг хозяев

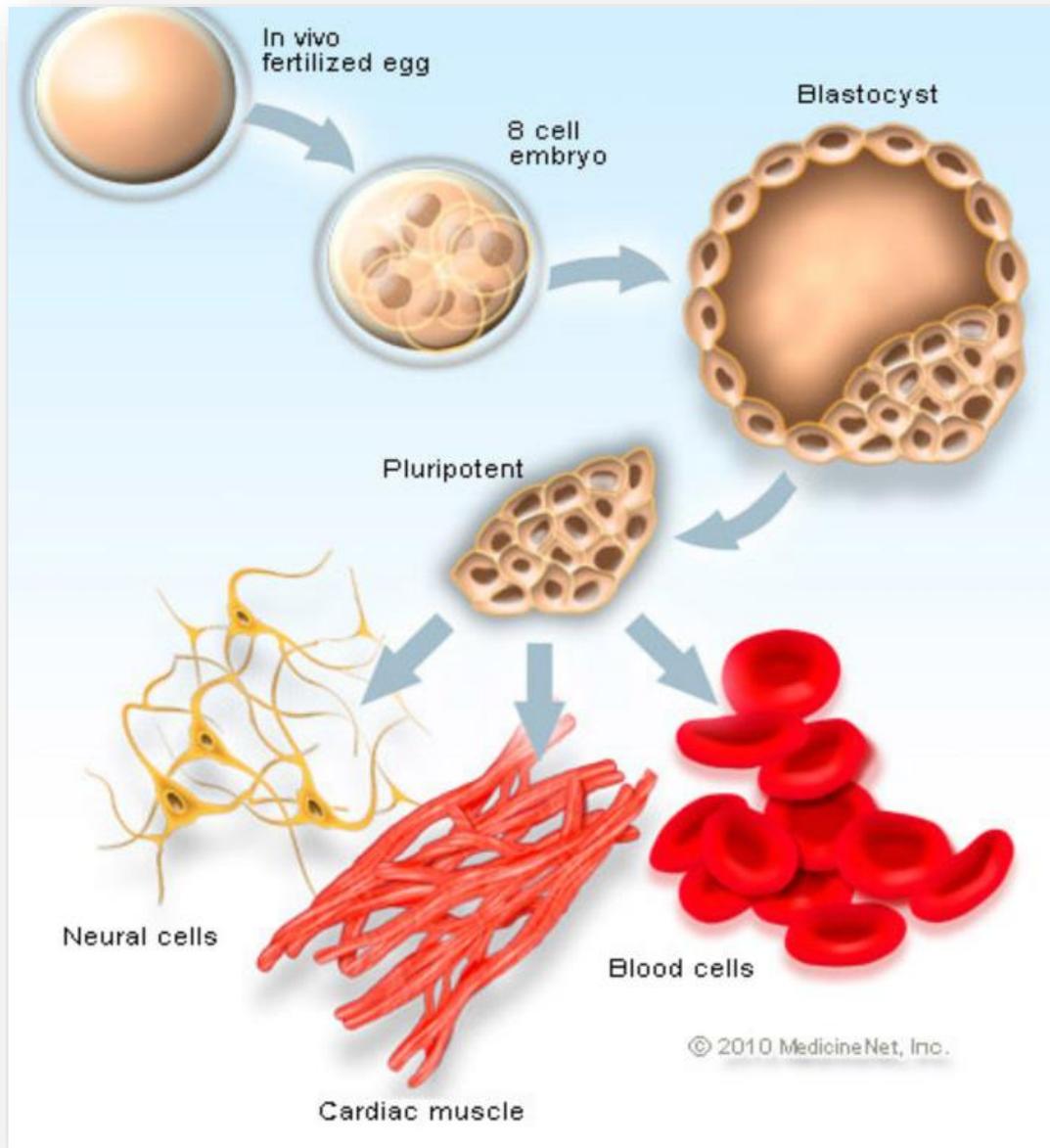
Трансгенные игрунки (*Callithrix jacchus*), экспрессирующие EGFP в конечностях. Использован ретровирусный вектор



Инъекция в
бластоцист

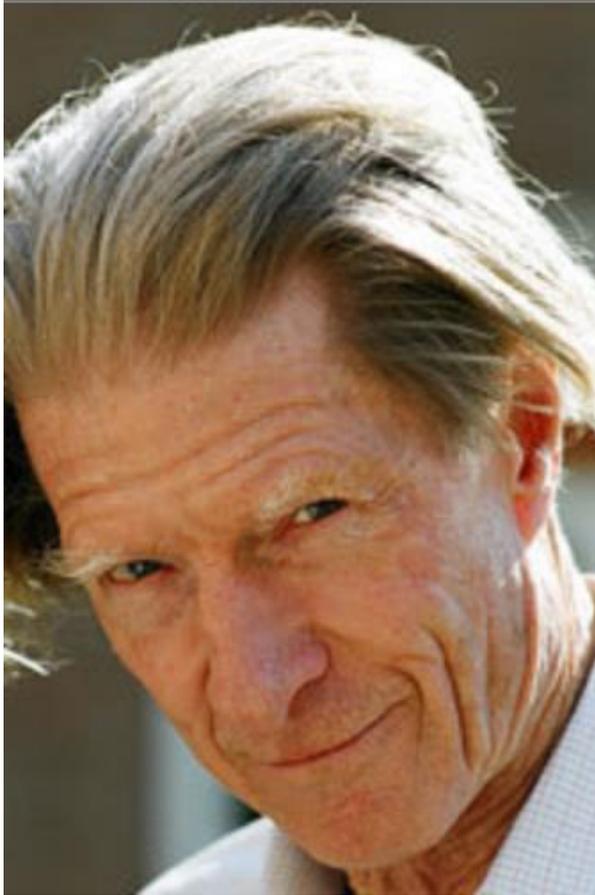


NATURE,
459, 523,
2009



**Технологии,
основанные на
использовании
эмбриональных
стволовых (ES)
клеток**

Джон Гердон и Синъя Яманака - лауреаты Нобелевской премии по биологии и медицине 2012



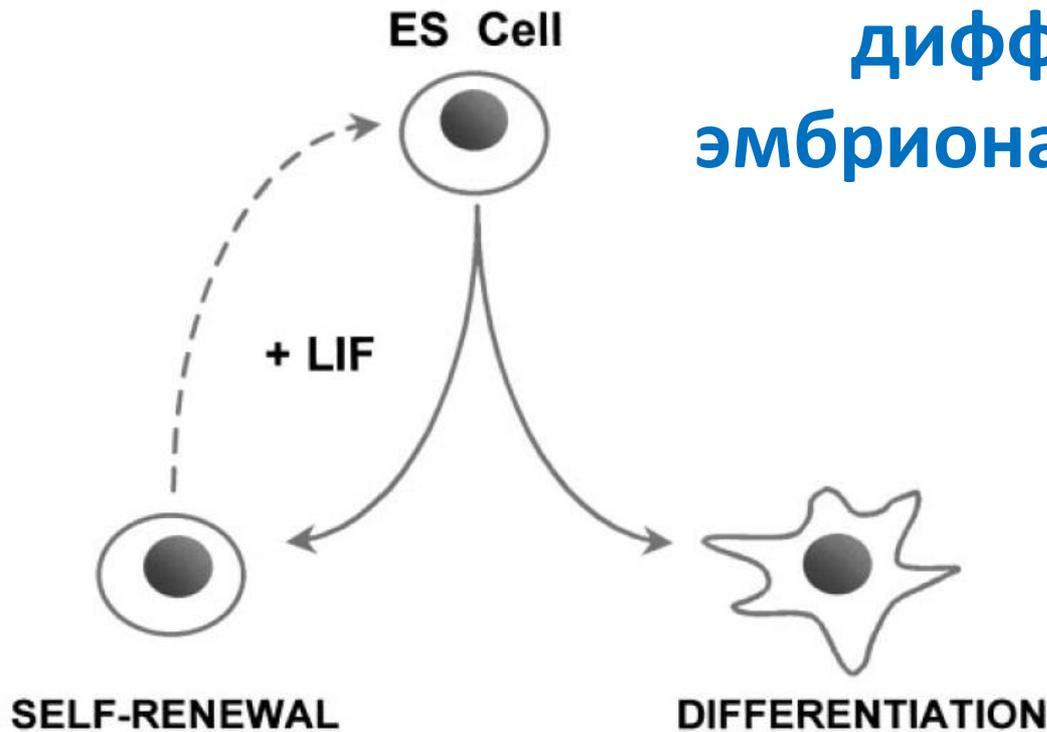
1933 г.р.



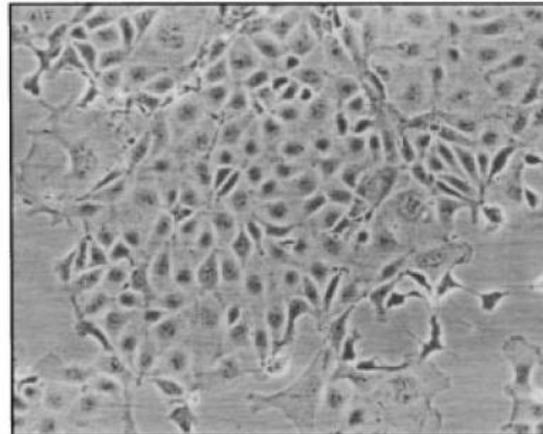
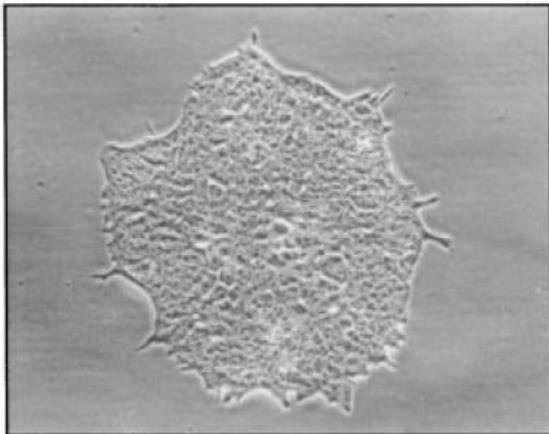
1962 г.р.

За "открытие возможности перепрограммирования зрелых клеток в плюрипотентные"

Самообновление и дифференцировка эмбриональных стволовых клеток

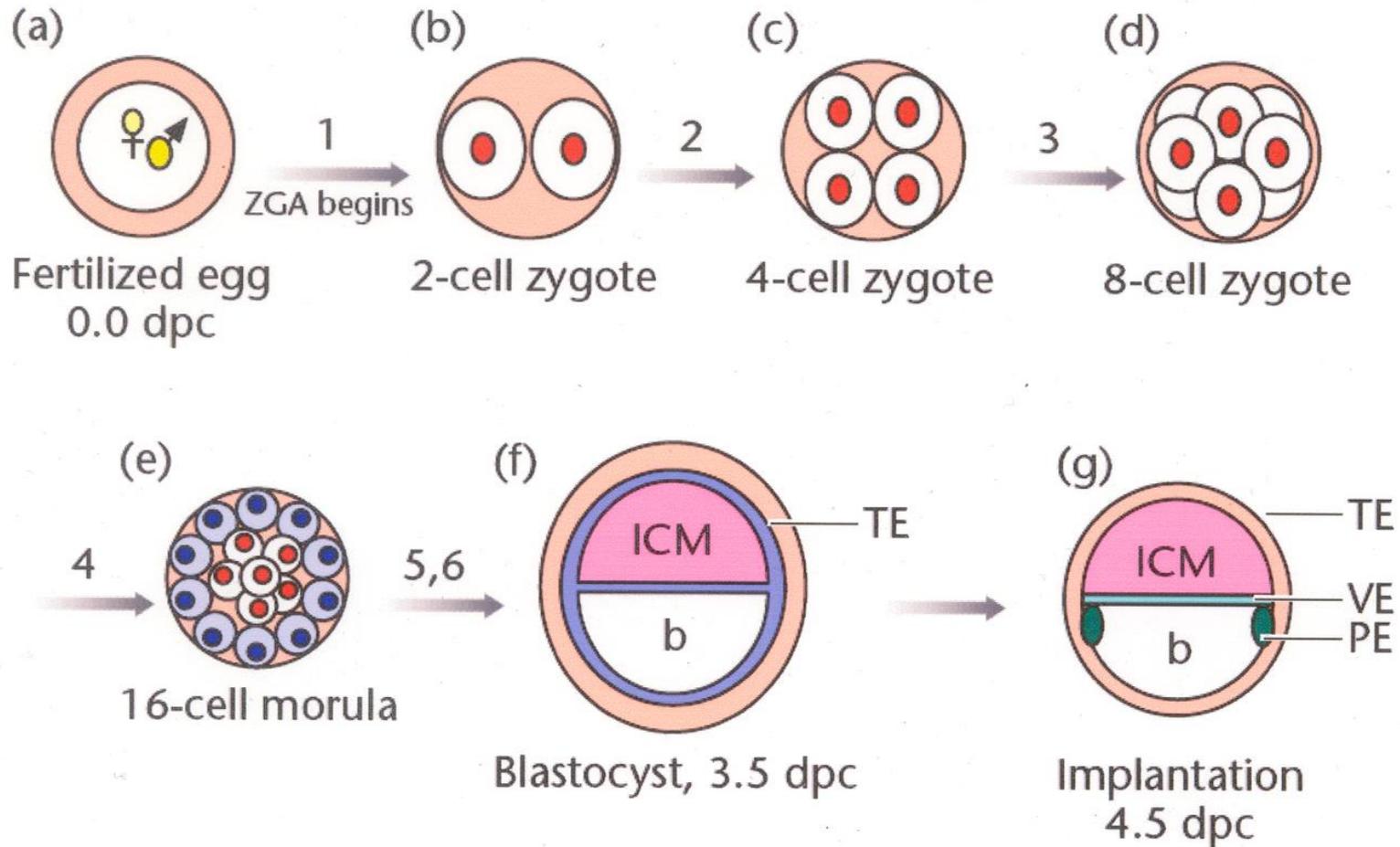


LIF – цитокин - фактор, ингибирующий лейкозы (leukemia inhibitory factor)



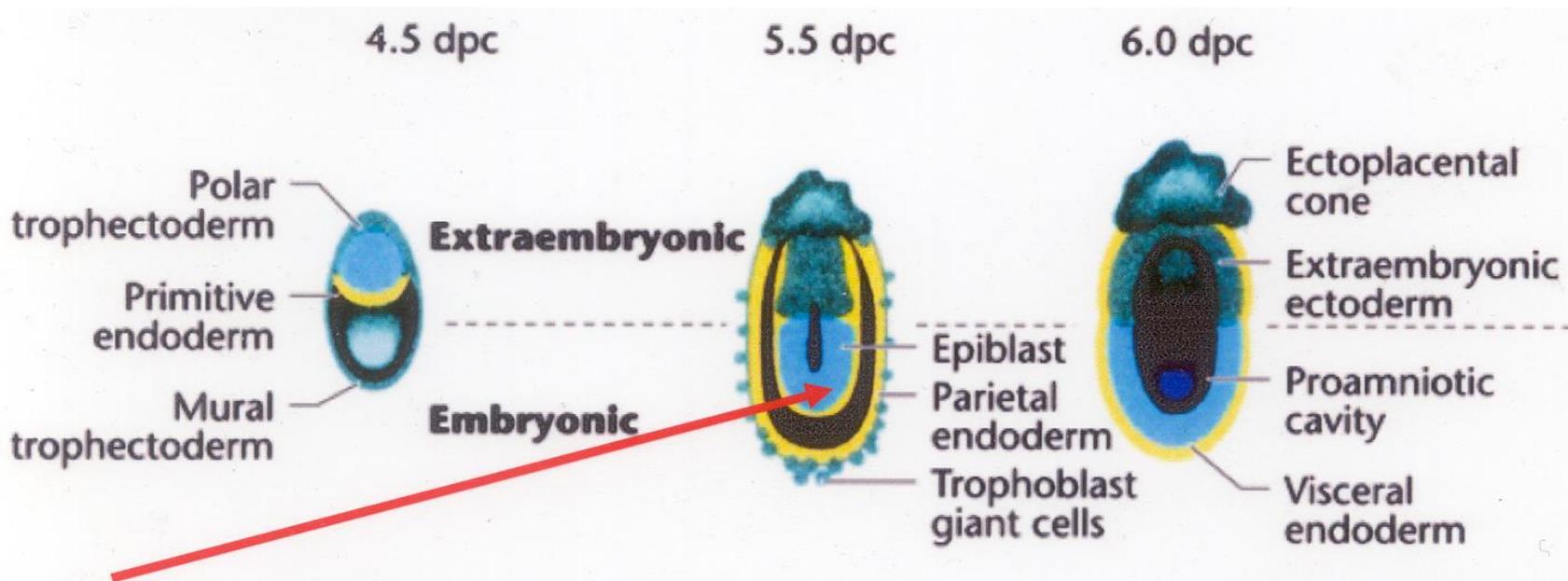
Справа – дифференцированные фибробласты через 4 дня после удаления LIF из культуральной среды

Раннее предимплантационное развитие мыши



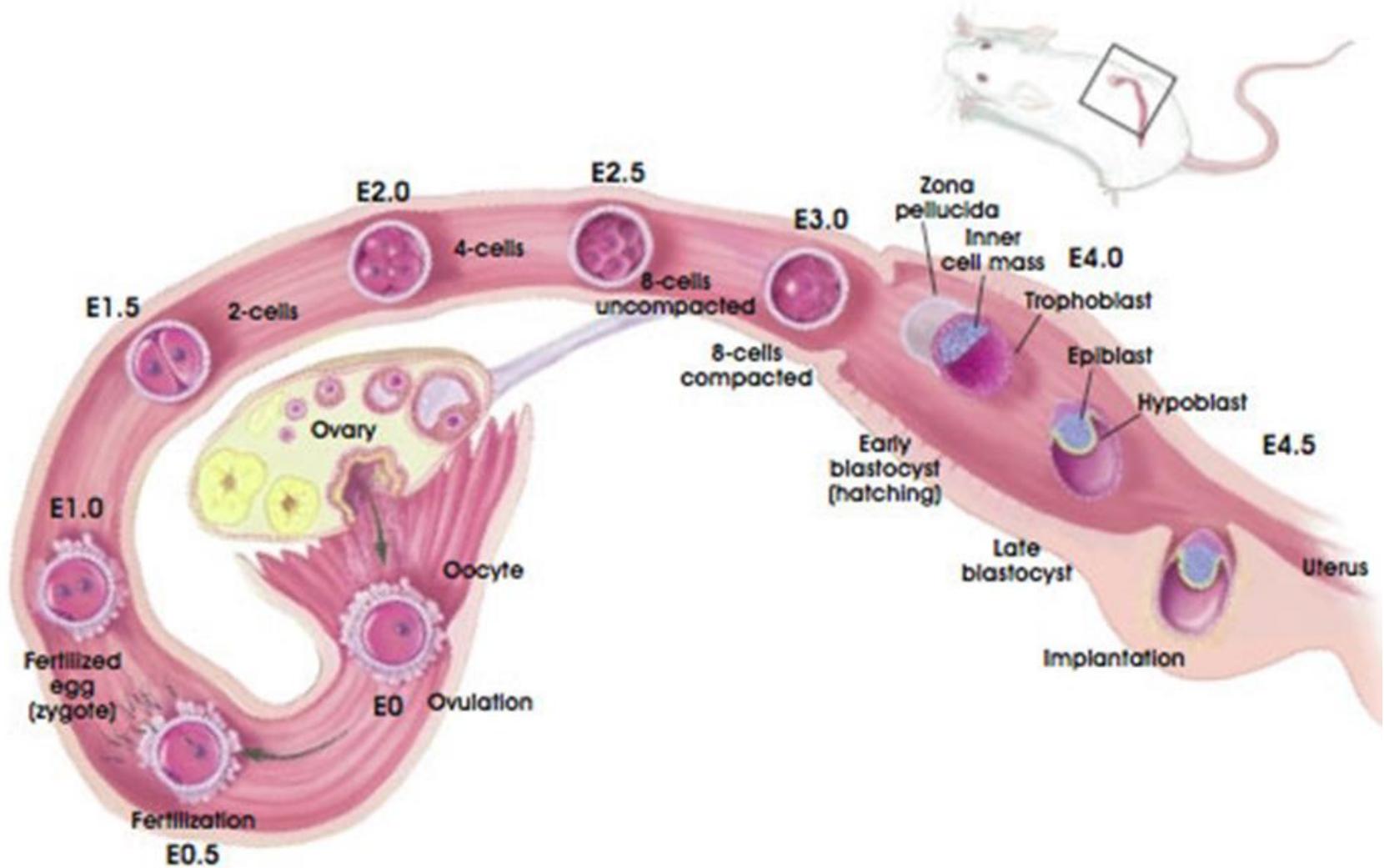
a-d – Дробление зиготы с образованием бластомеров
e – Компактизация зародыша: внешние бластомеры образуют трофоэктодерму (**TE**), внутренние – внутреннюю клеточную массу (**ICM**)
ZGA – зиготная активация генов, **dpc** – дни после оплодотворения

Раннее предимплантационное развитие мышы (продолжение)

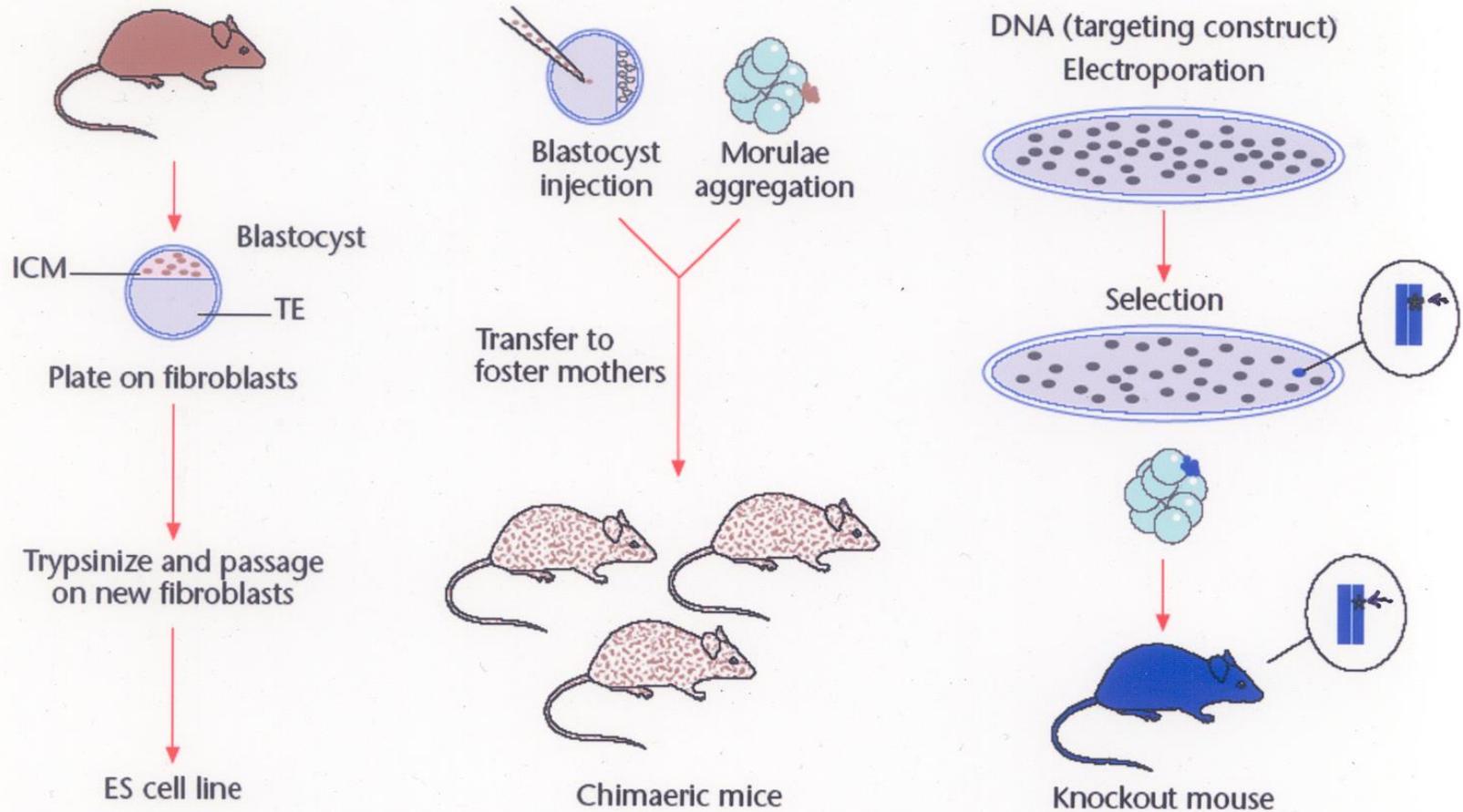


Эпибласт и **ICM** – источники плюрипотентных эмбриональных
стволовых клеток (**ES**)

Перемещение развивающегося зародыша мыши по яйцеводу



Этапы технологии, основанной на использовании эмбриональных стволовых клеток



Получение линий ES

Создание трансгенных зародышей

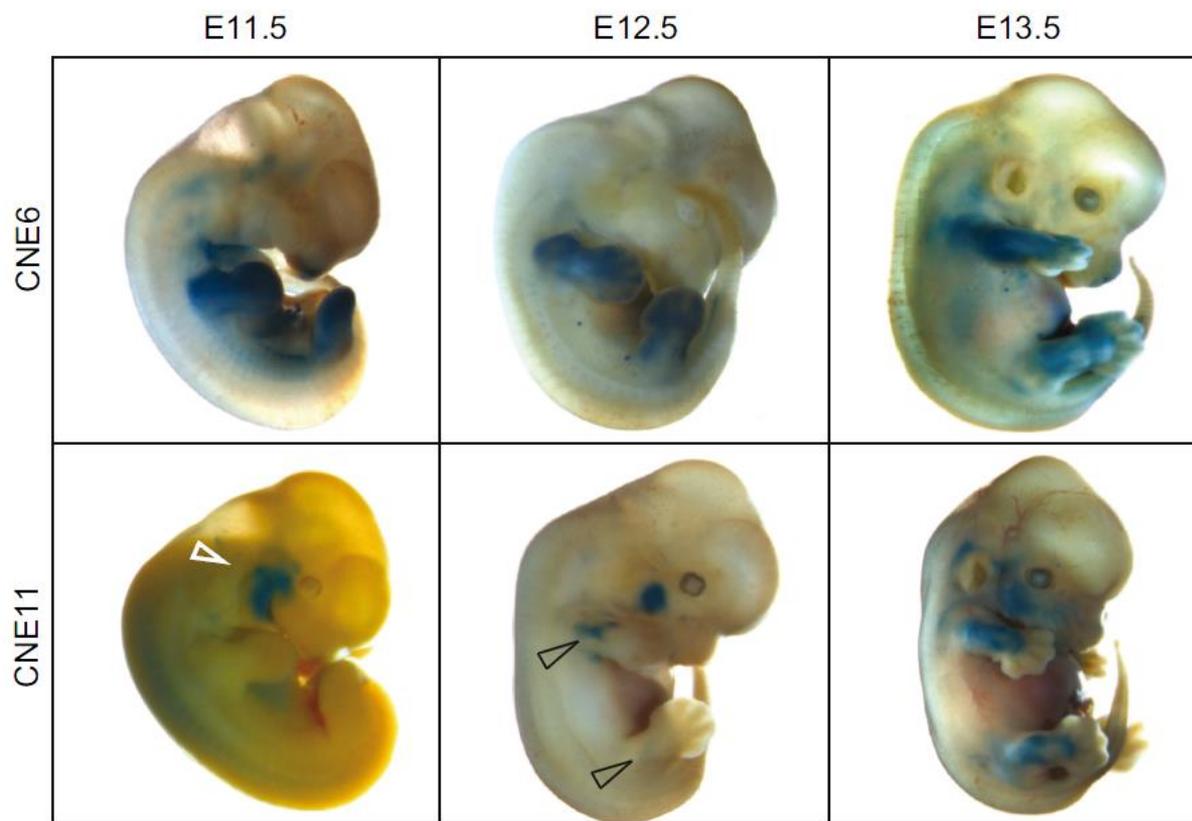
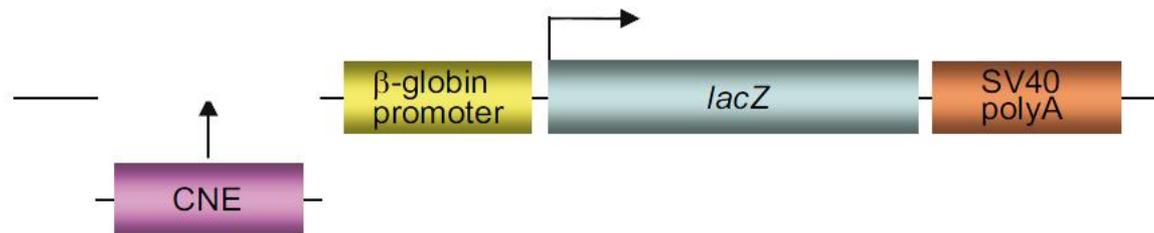
Генетическая модификация ES



**Химерный эмбрион
трансгенной мыши,
экспрессирующий
 β -галактозидазу
*E.coli***

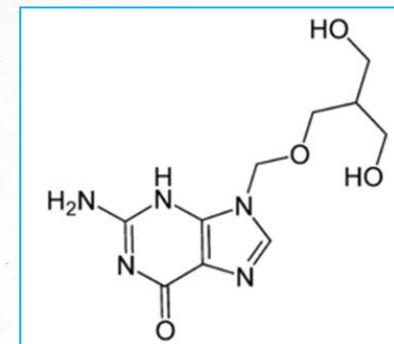
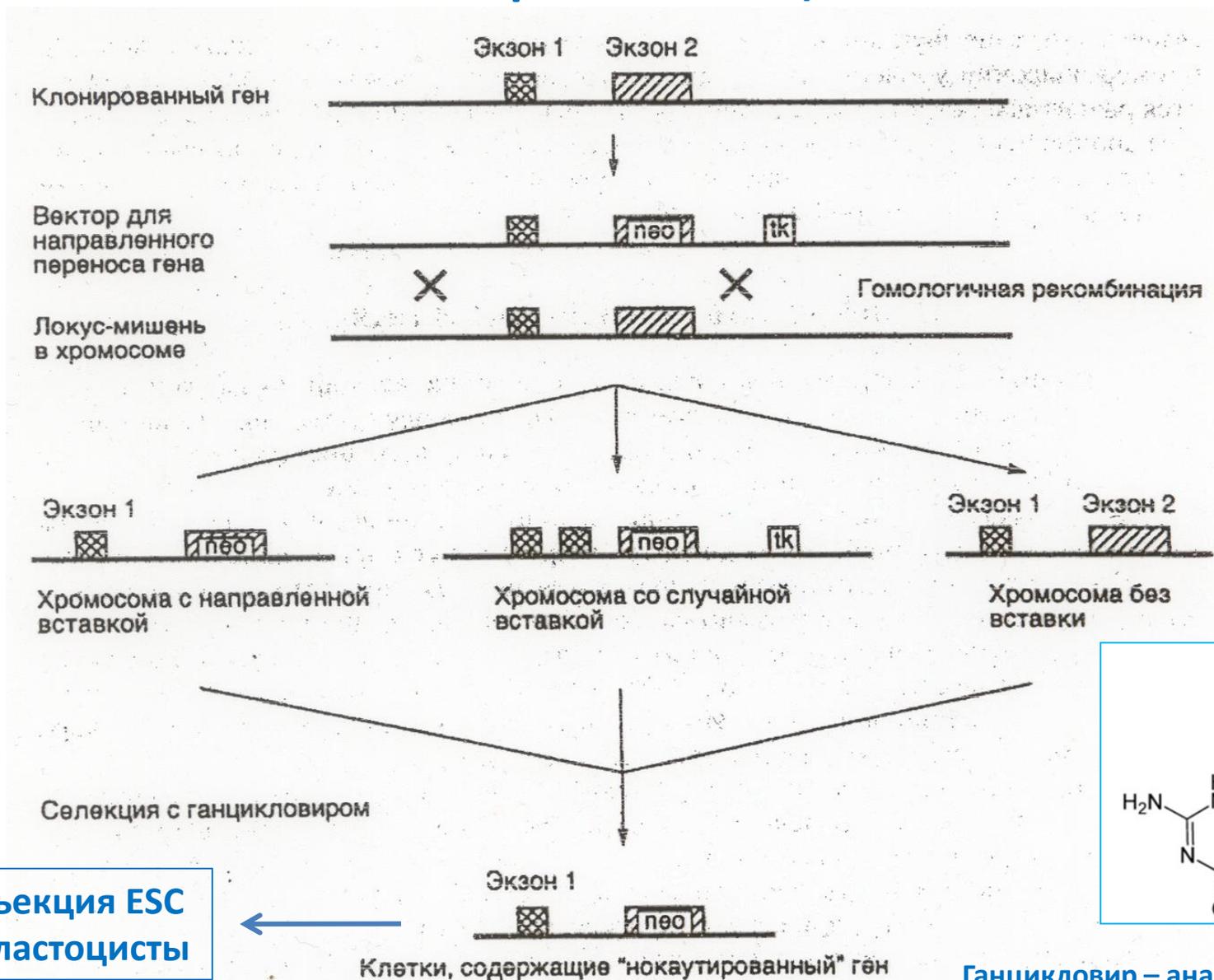
**Окрашены потомки
эмбриональных
стволовых клеток,
экспрессирующие β -
галактозидазу, после
окраски X-gal**

Энхансеры гена
фактора
транскрипции
GLI3 человека
активны в
развивающихся
конечностях
эмбрионов
мышей



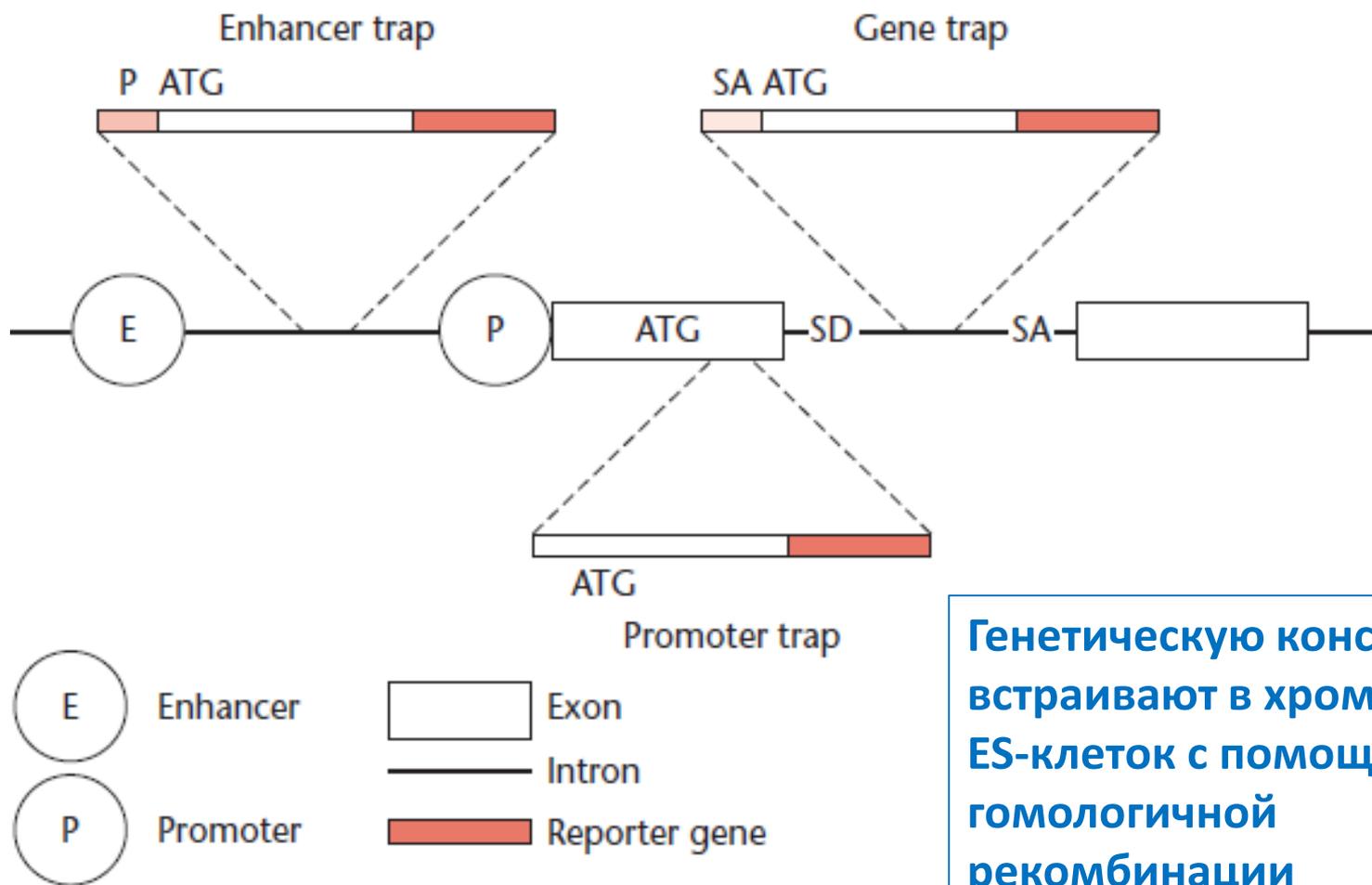
Интронные энхансеры гена *GLI3* активируют β -глобиновый промотор и ген *lacZ*

Получение генного нокаута у мышей с использованием гомологичной рекомбинации в ES-клетках



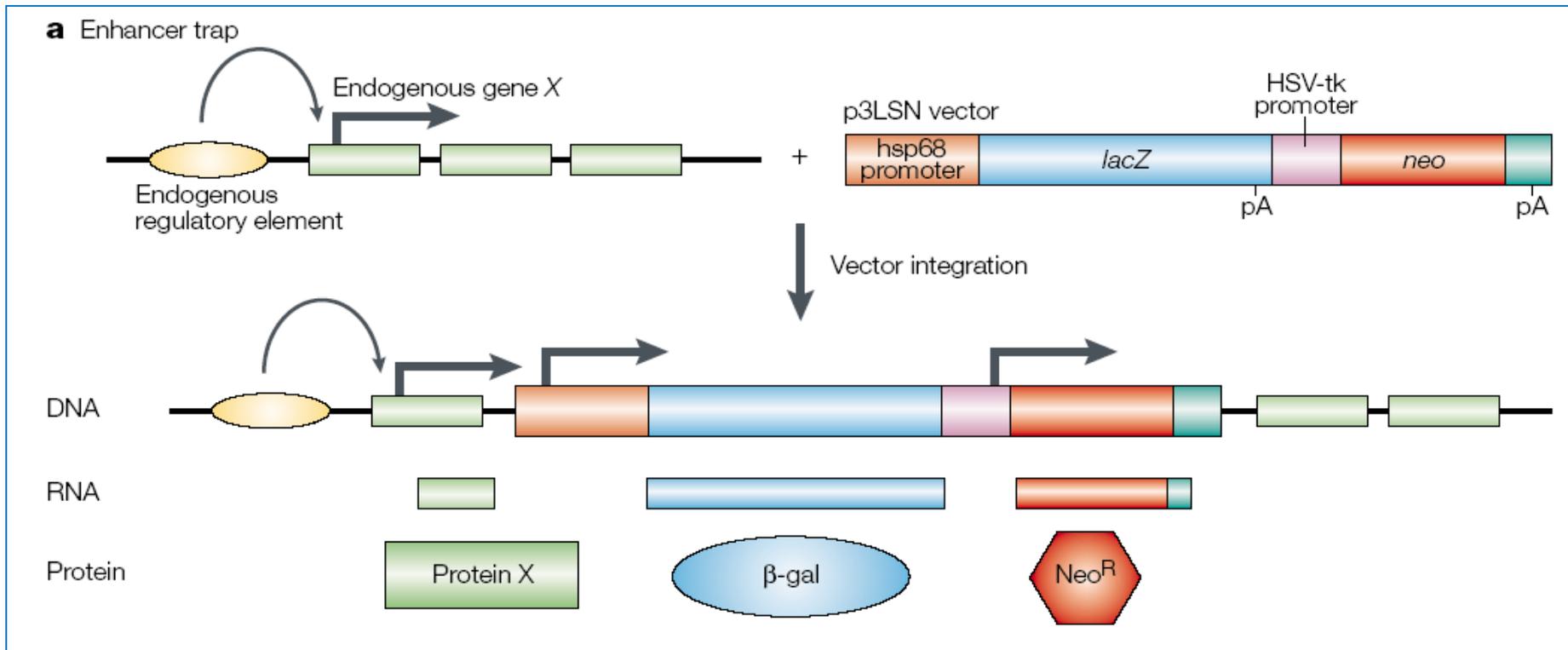
Ганцикловир – аналог гуанозина

Генные нокауты с использованием энхансерных, промоторных и генных ловушек (gene trapping)



Генетическую конструкцию встраивают в хромосомы ES-клеток с помощью гомологичной рекомбинации

Направленная инактивация генов животных методом энхансерных ловушек (Enhancer trapping)

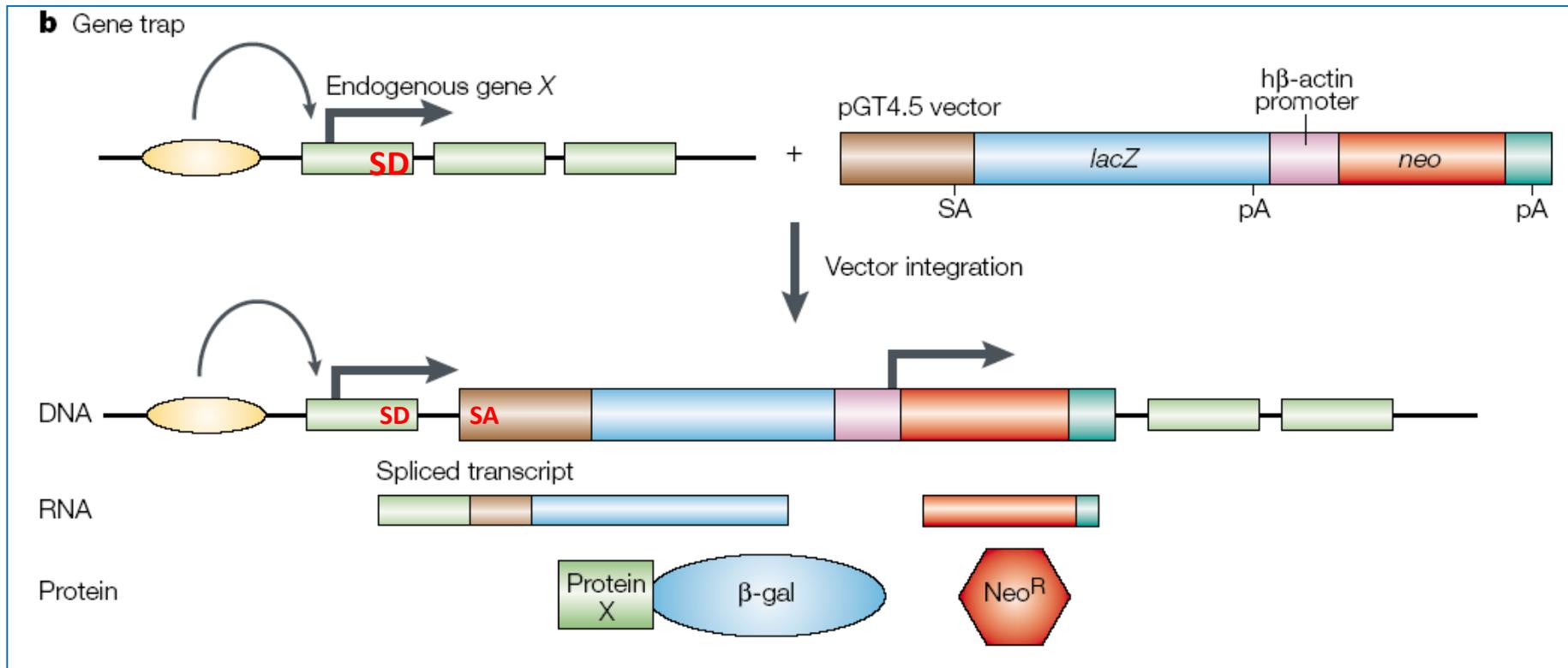


В результате сплайсинга образуется нормальный белок X. Чаше возникают гипоморфные мутации; ~20% вставок мутагенны при электропорации ES.

neo – бактериальная неомицинфосфотрансфераза (G418),

pA – сайт полиаденилирования

Направленная инактивация генов животных методом генных ловушек (Gene trapping)

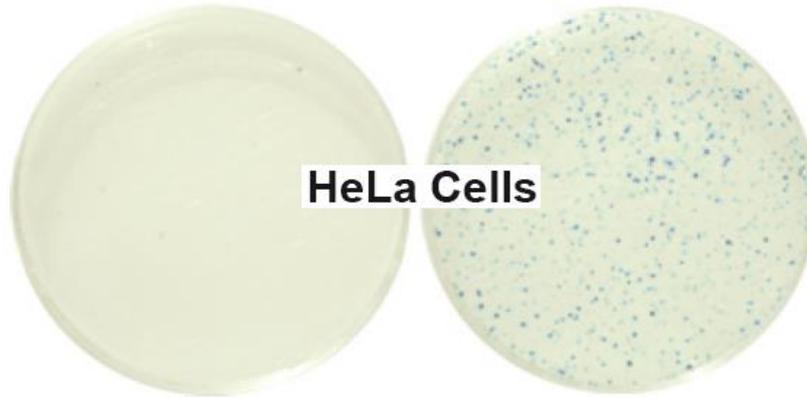


Образование химерного белка X сопровождается потерей его функции (нуль-мутации; частота возникновения 10^{-3} , идентификация сайта интеграции – 5'-RACE) **SD – донорный, SA – акцепторный сайты сплайсинга**

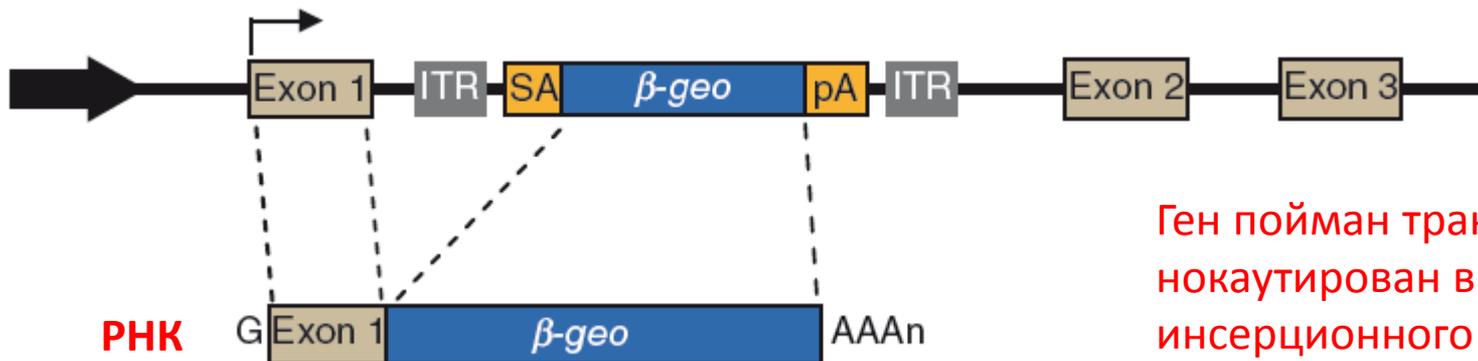
Транспозон «Спящая красавица» в геномном нокауте

Случайную интеграцию трансгена в геном трансфицированных клеток HeLa по ITR-сайтам обеспечивает транспозаза, экспрессируемая плазмидой-помощником.

β -Geo – ген устойчивости к антибиотик G-418, **SA** – акцепторный сайт сплайсинга, **pA** – сигнал полиаденилирования, **ITR** – инвертированные концевые повторы

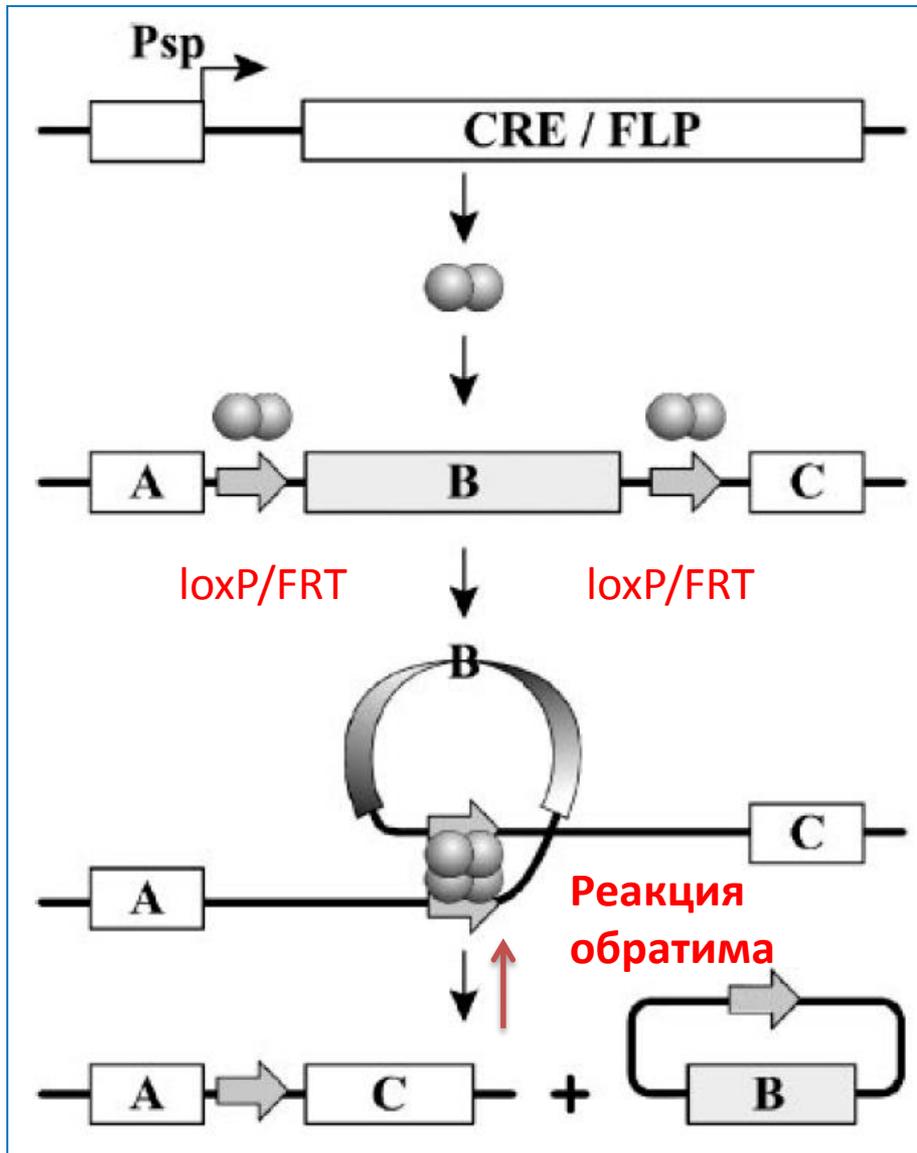


- pSB Transposase + pSB Transposase
+ pβ-Geo Transposon



Ген пойман транспозоном и нокаутирован в результате инсерционного мутагенеза

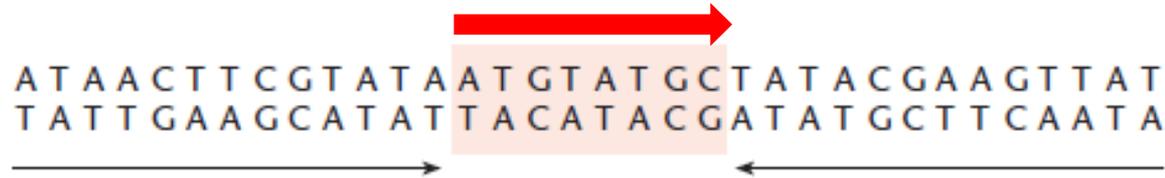
Принцип действия системы сайт-специфической рекомбинации Cre/lox



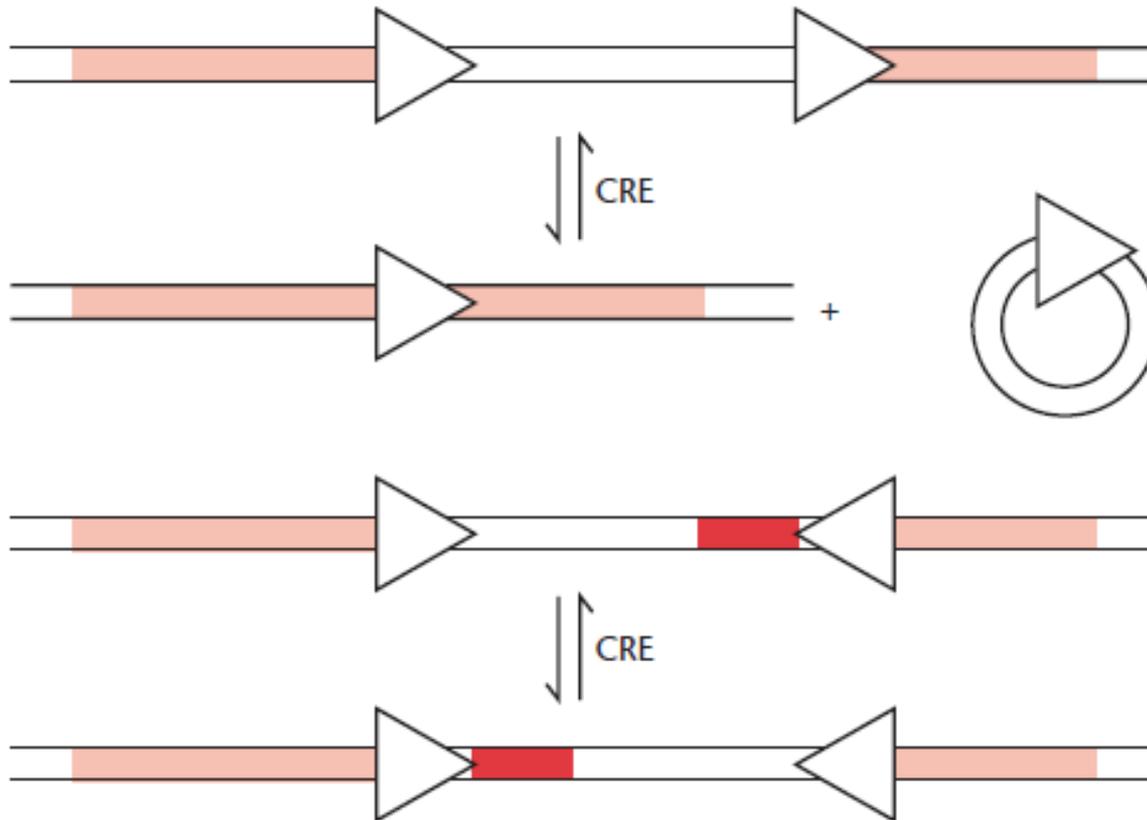
- ❖ Димерные рекомбиназы **Cre** (фаг P1) или **Flp** (дрожжи) взаимодействуют со специфическими сайтами **loxP** или **FRT** (18-звенные инвертированные повторы, разделенные 8-звенной коровой последовательностью)
- ❖ Гомологичная рекомбинация происходит в 8-звенной коровой последовательности
- ❖ **Psp** – тканеспецифический (или индуцируемый) промотор

Влияние взаимной ориентации loxP-сайтов на результат действия рекомбиназы Cre

ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
TATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATA

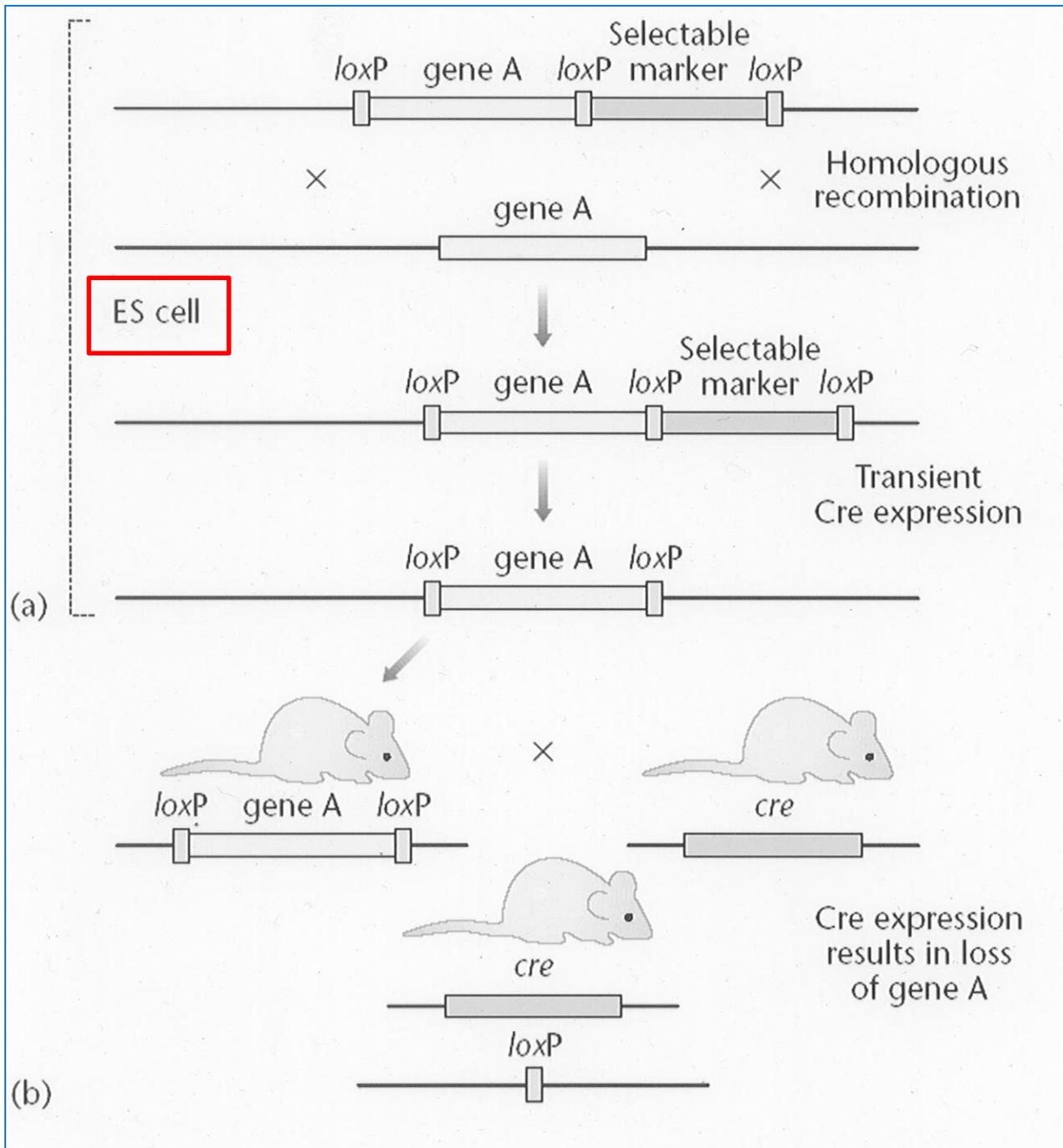


Структура loxP-сайта



Однонаправленная ориентация – вырезание фрагмента

Разнонаправленная ориентация – инверсия фрагмента



Индуцируемый генный нокаут с использованием Cre-рекомбиназы

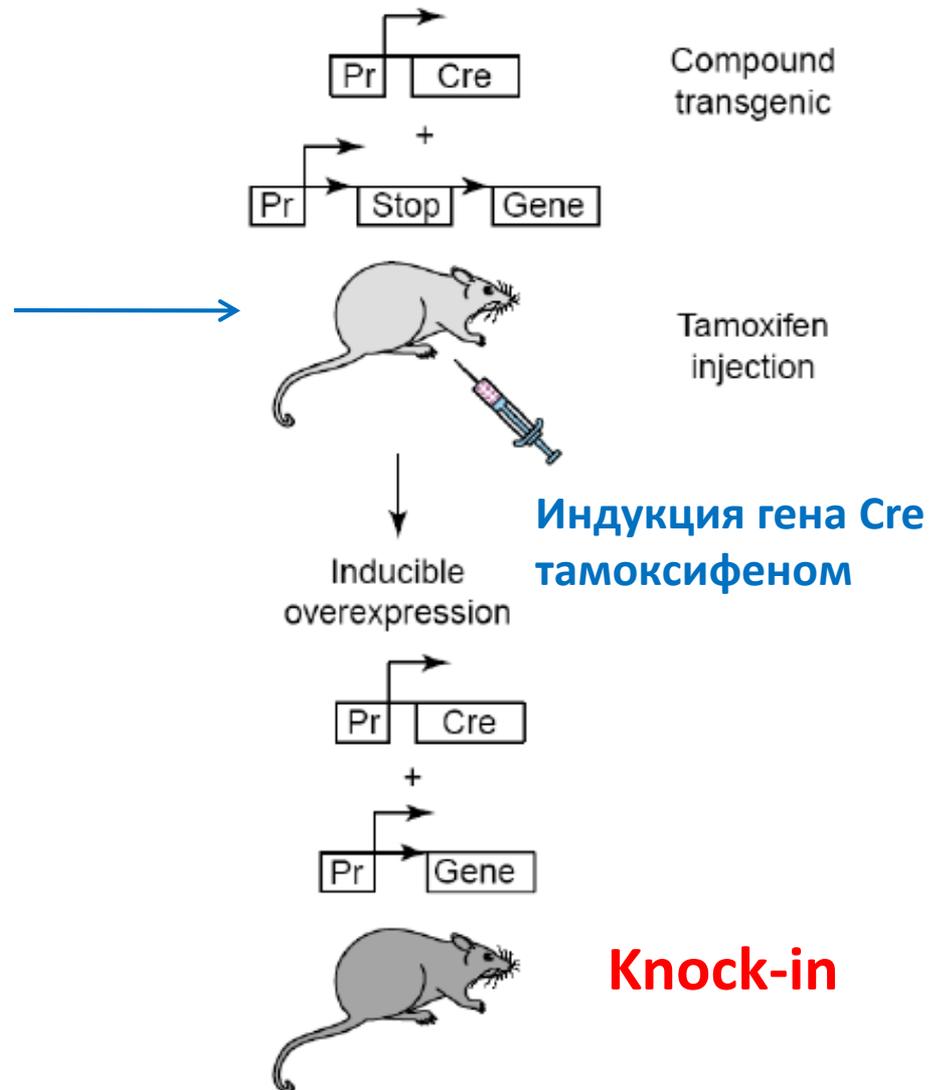
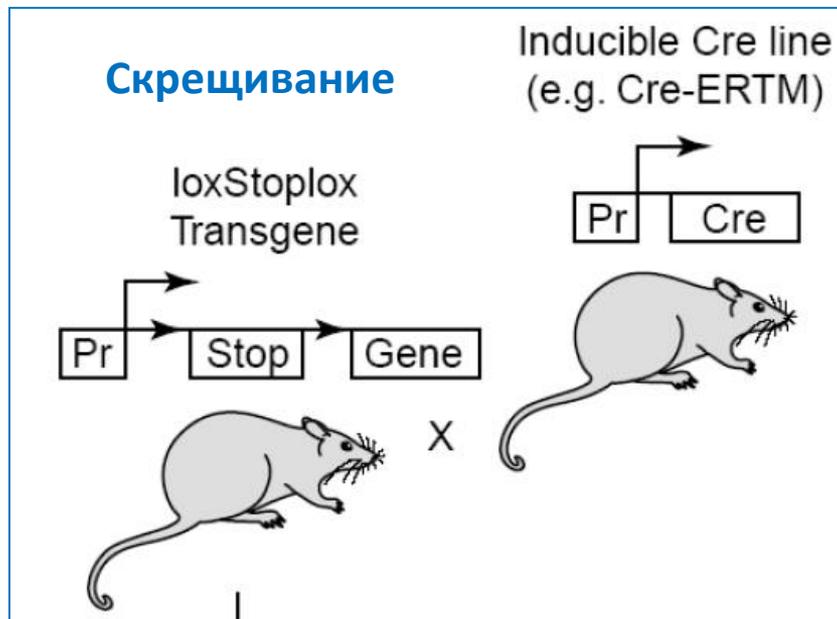
Селектируемый маркер:

ген *neo*

+

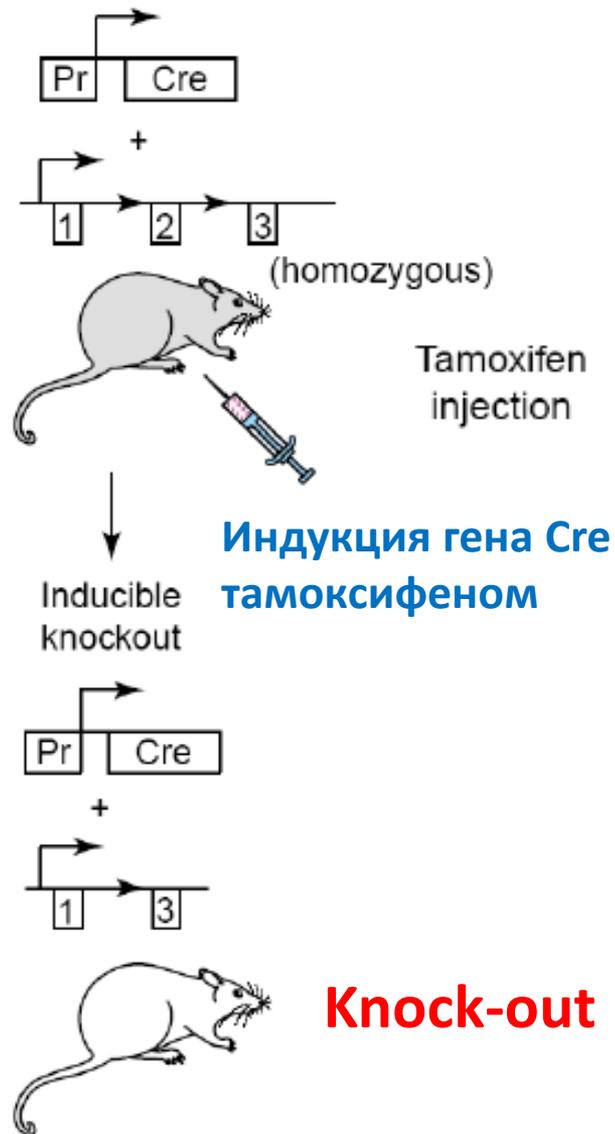
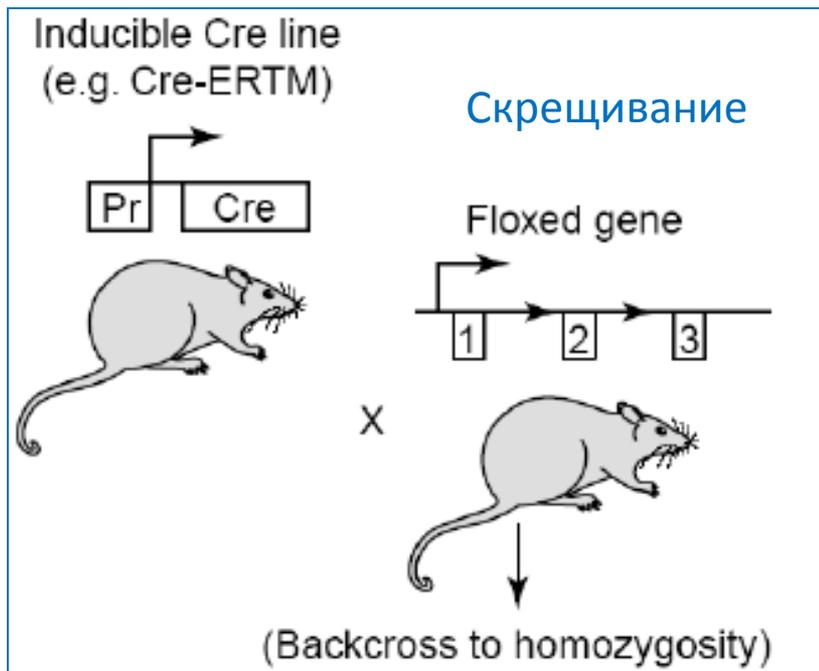
индуцируемый ген Cre-рекомбиназы

Индуцируемая сверхэкспрессия трансгенов с использованием системы Cre/lox



Stop – последовательность, блокирующая транскрипцию исследуемого гена - фланкирована loxP-сайтами

Индуцируемый необратимый генный нокаут с использованием системы Cre/lox

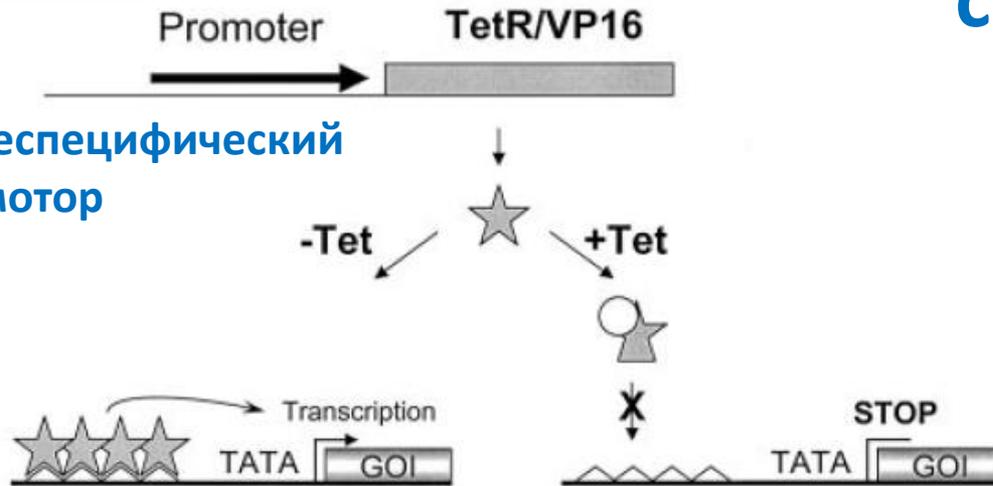


Последовательность экзона 2
фланкирована (**floxed**) loxP-
сайтами

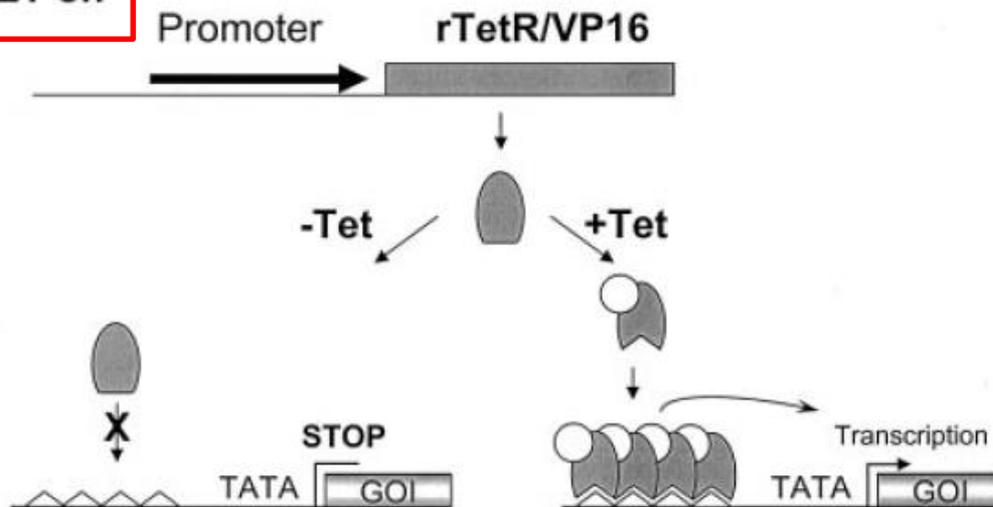
Тетрациклиновая система индукции трансгенов

TET off

Тканеспецифический промотор



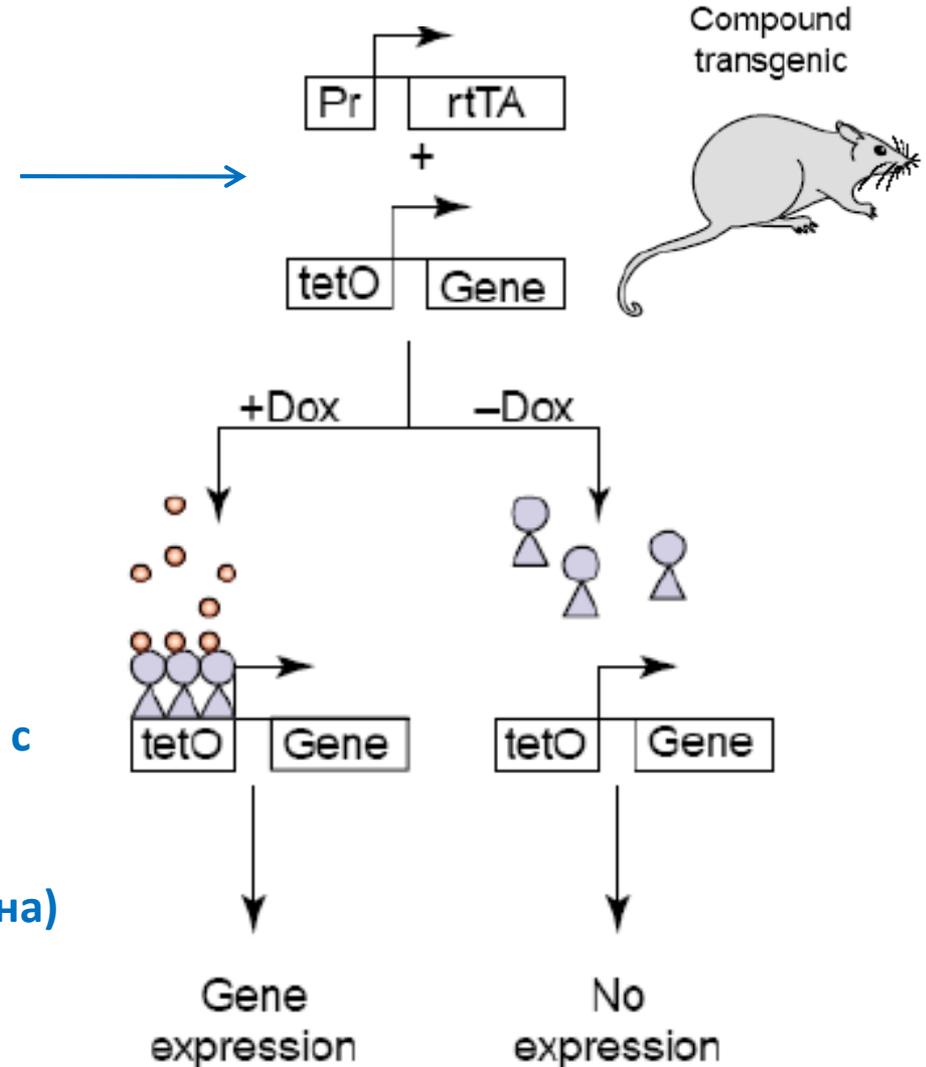
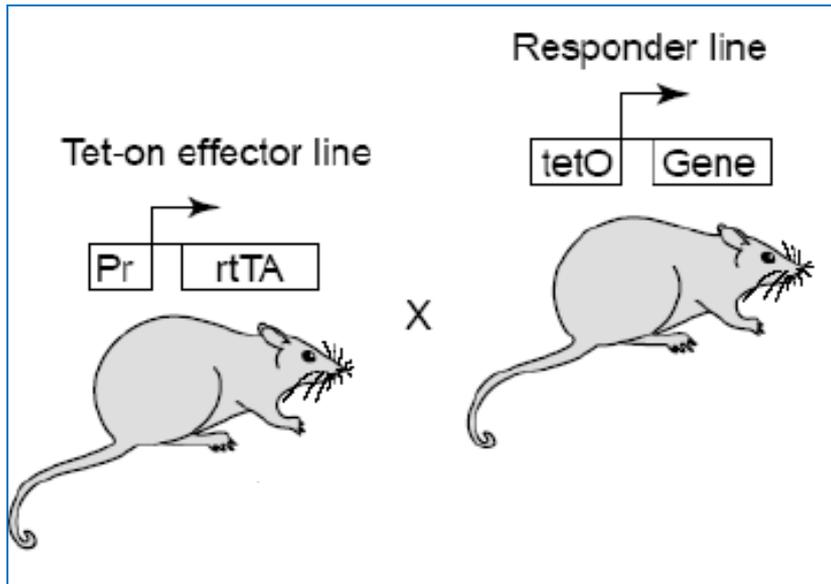
TET on



TetR/VP16 – химерный белок, в котором объединены тетрациклиновый репрессор **TetR** и транскрипционный активатор простого герпеса **VP16**

Мутантный репрессор-активатор связывается с оператором в присутствии тетрациклина (Tet)

Индуцируемая сверхэкспрессия трансгенов с использованием тетрациклиновой системы

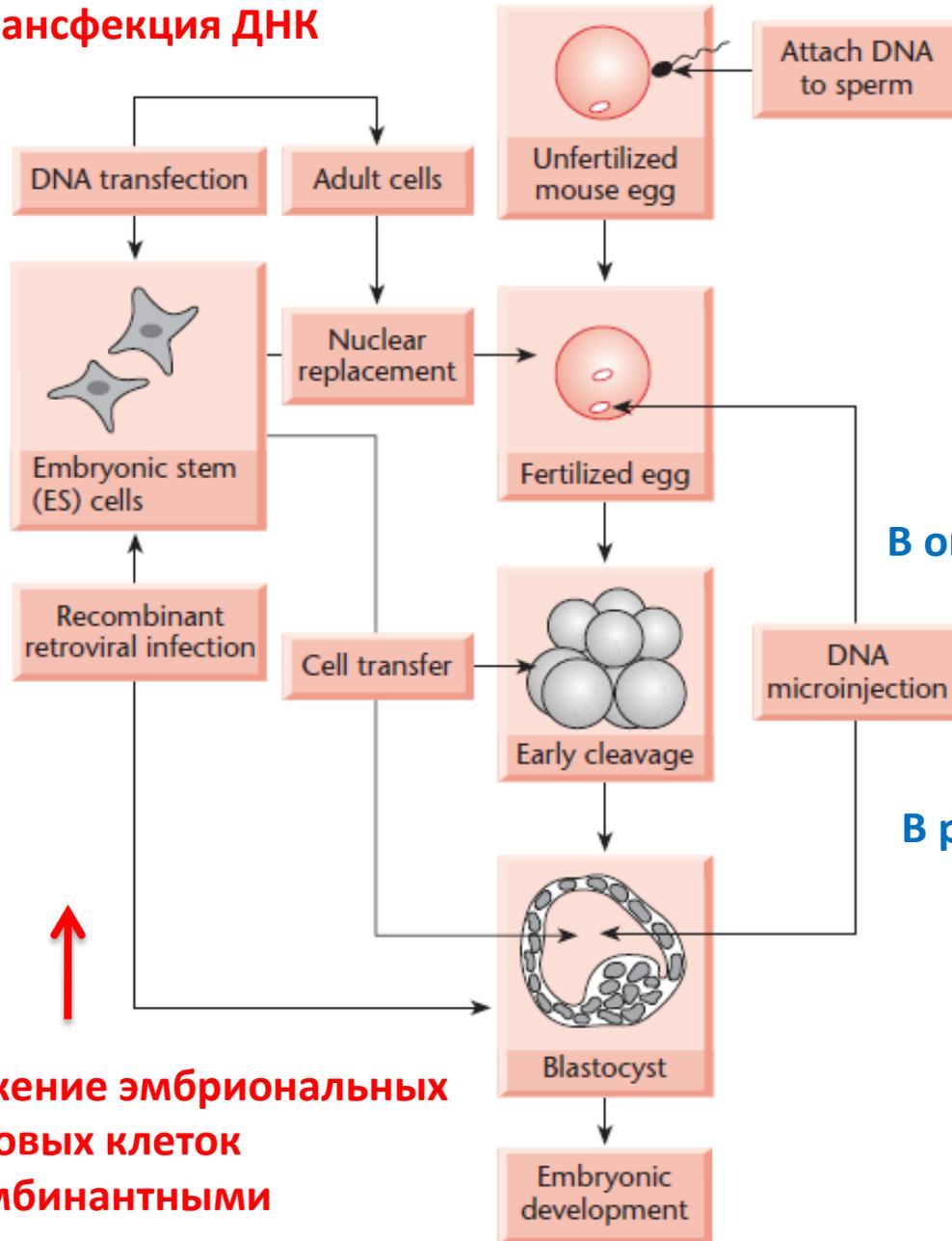


rtTA – химерный ген, кодирующий мутантный тетрациклиновый репрессор с трансактиватором транскрипции

dox – доксорубицин (аналог тетрациклина)

Стратегии получения трансгенных животных

Трансфекция ДНК



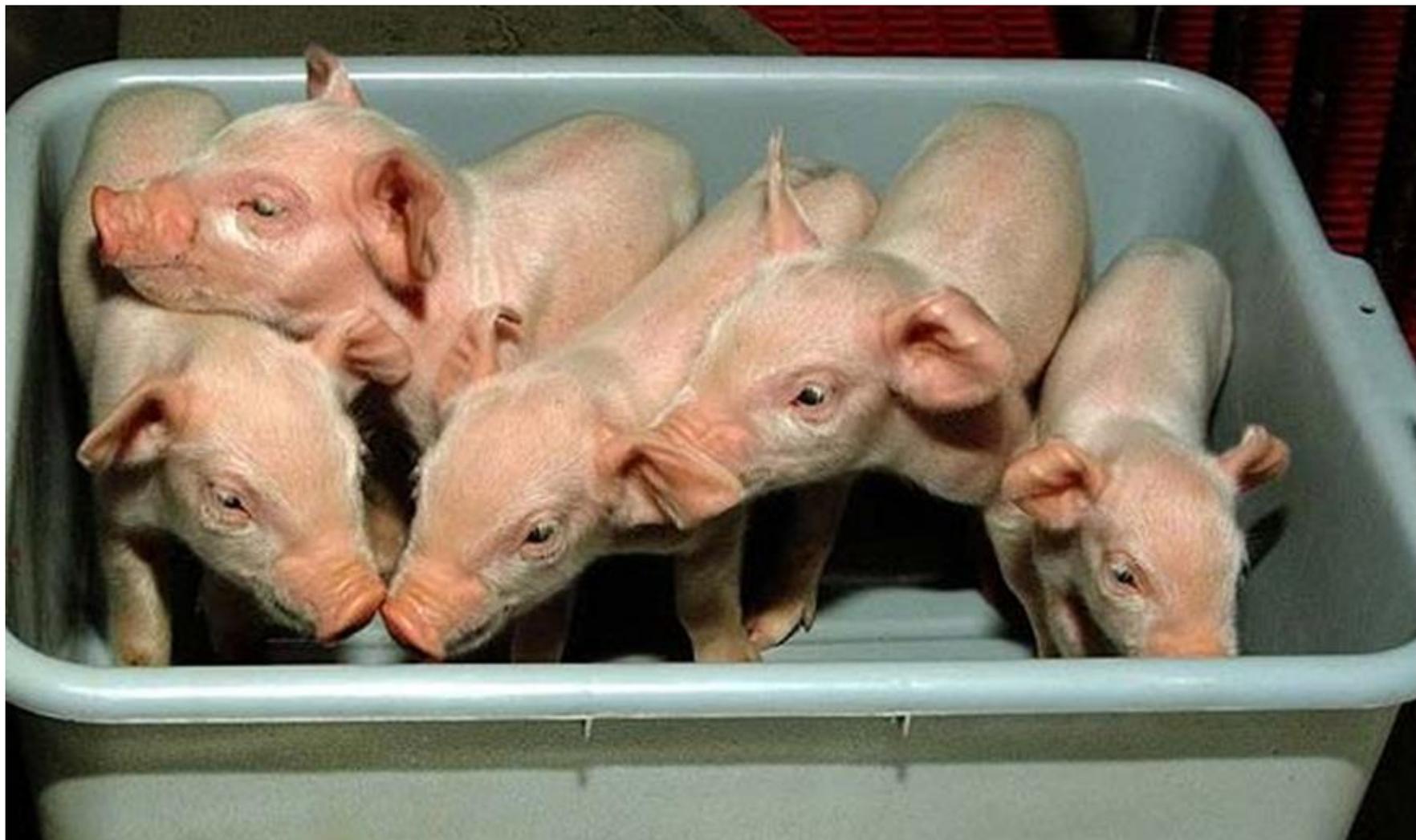
В оплодотворенную яйцеклетку

Микроинъекции ДНК

В ранний эмбрион (бластоцист)

Заражение эмбриональных стволовых клеток рекомбинантными ретровирусами

Клонирование животных



Первый «клон», полученный путем пересадки ядра соматической клетки



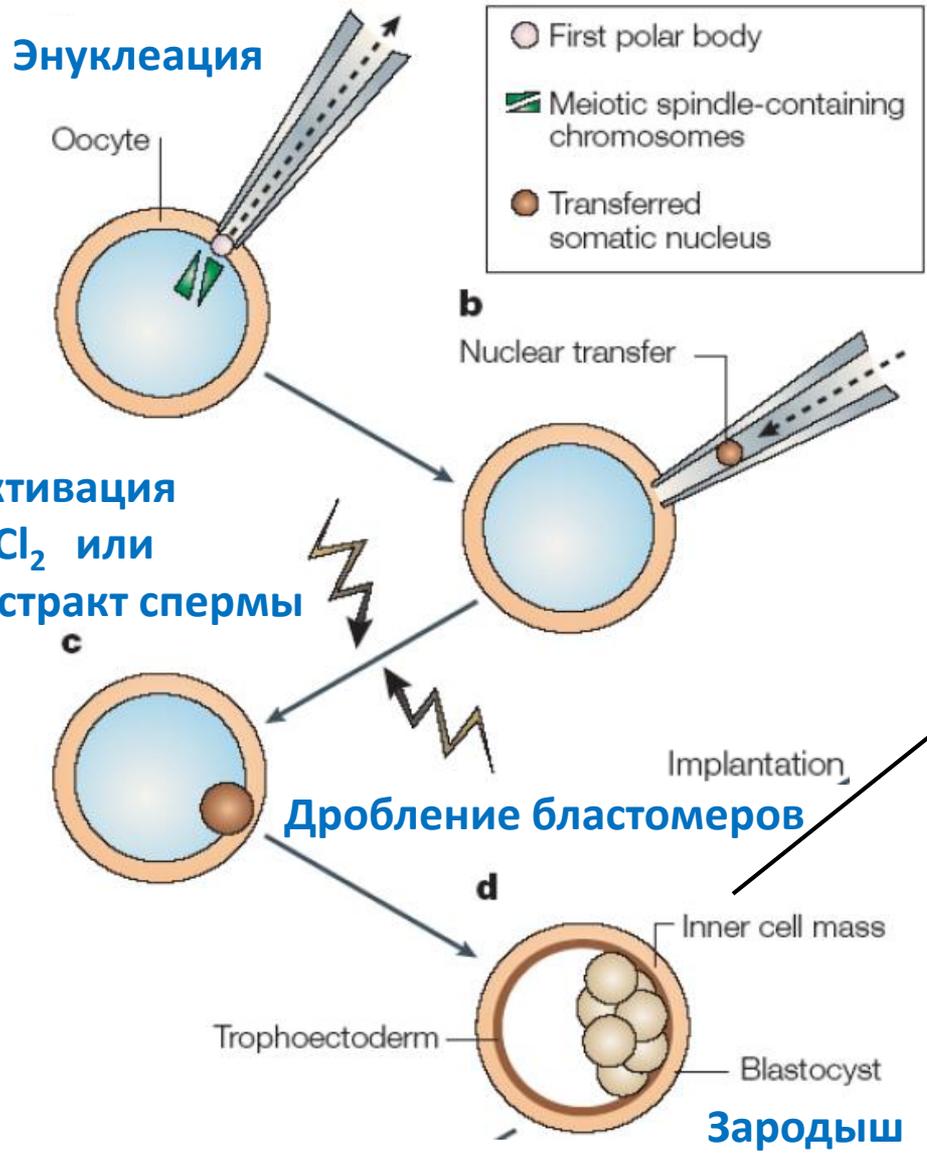
Овца Долли (1997-2003) и ее первый ягненок Бонни (1998)

Рослинский институт в Шотландии близ Эдинбурга



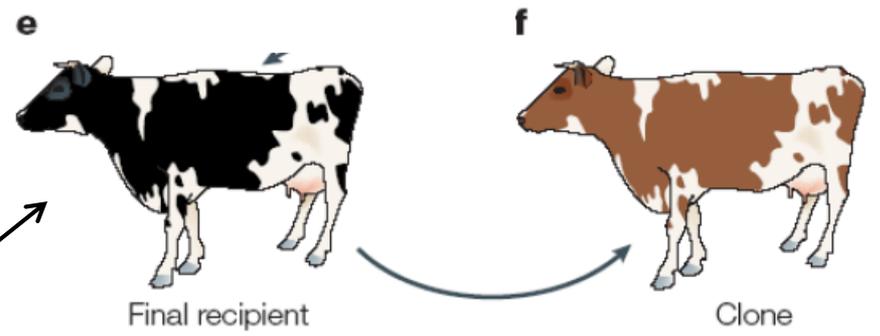
Американская кантри-певица Долли Партон

Стадии процесса клонирования млекопитающих



Традиционный метод переноса ядер соматических клеток

Перенос ядра соматической клетки

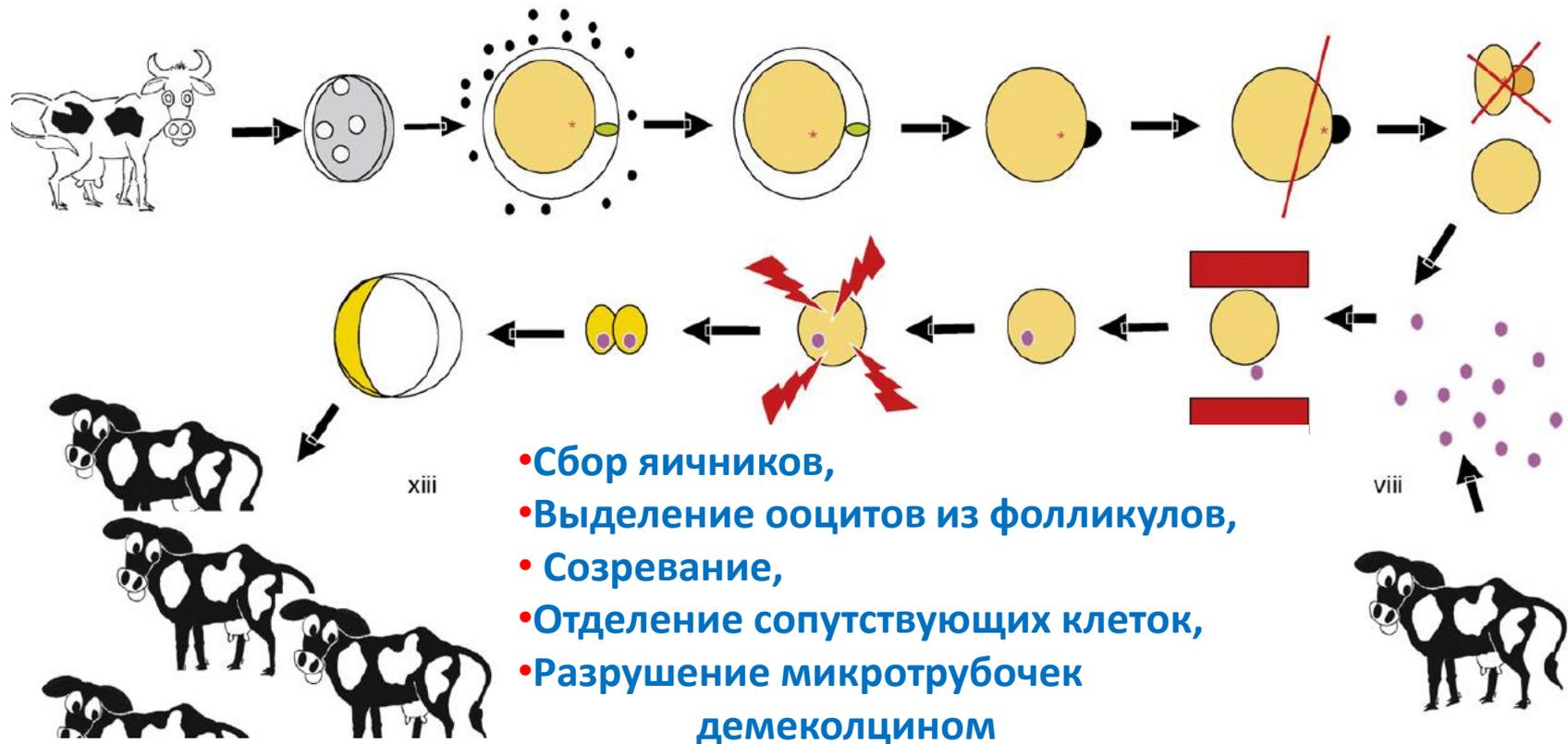


Приемная мать

Клон

SCNT – somatic cell nuclear transfer

Стадии клонирования млекопитающих вручную (Handmade cloning - НМС)



- Разрушение *zonae pellucidae* проназой
- Ядро в выпячивании удаляется лезвием
- Кариопласт удаляется, цитопласт - акцептор
- Культивирование соматических клеток

- Фитогемагглютинин, индивидуал. прикрепление к цитопласту
- Электрослияние
- Химическая активация

Преимущества НМС-клонирования перед традиционным клонированием животных

- ❖ Оборудование в 10 раз дешевле
- ❖ Простой, быстрый, легко передаваемый метод
- ❖ Требуется меньше времени и рабочих площадей
- ❖ Эффективность такая же, как у традиционного метода
- ❖ Возможна криоконсервация эмбрионов
- ❖ Возможность автоматизации с использованием технологии микрофлюидики

Клоны поросят, полученные вручную и традиционным методом



НМС

НМС

ТС

У Сук Хван приносит извинения за допущенные фальсификации и прощается с Сеульским университетом



Хван У Сук с клонированным Снаппи (афганская борзая)

За последние годы в Южной Корее удалось клонировать корову, кота, свинью, волка и койота

Харуко Обакате (Япония) фальсифицирует метод получения индуцированных эмбриональных стволовых клеток (2014)



Obokata Scandal Puts Research in ...

www.eetimes.com - 421 x 235 - Поиск по картинке

Haruko Obokata answered questions at a nearly two-hour-long press conference Wednesday in

[Показать на странице](#)

[Открыть в полном размере](#)

Похожие картинки

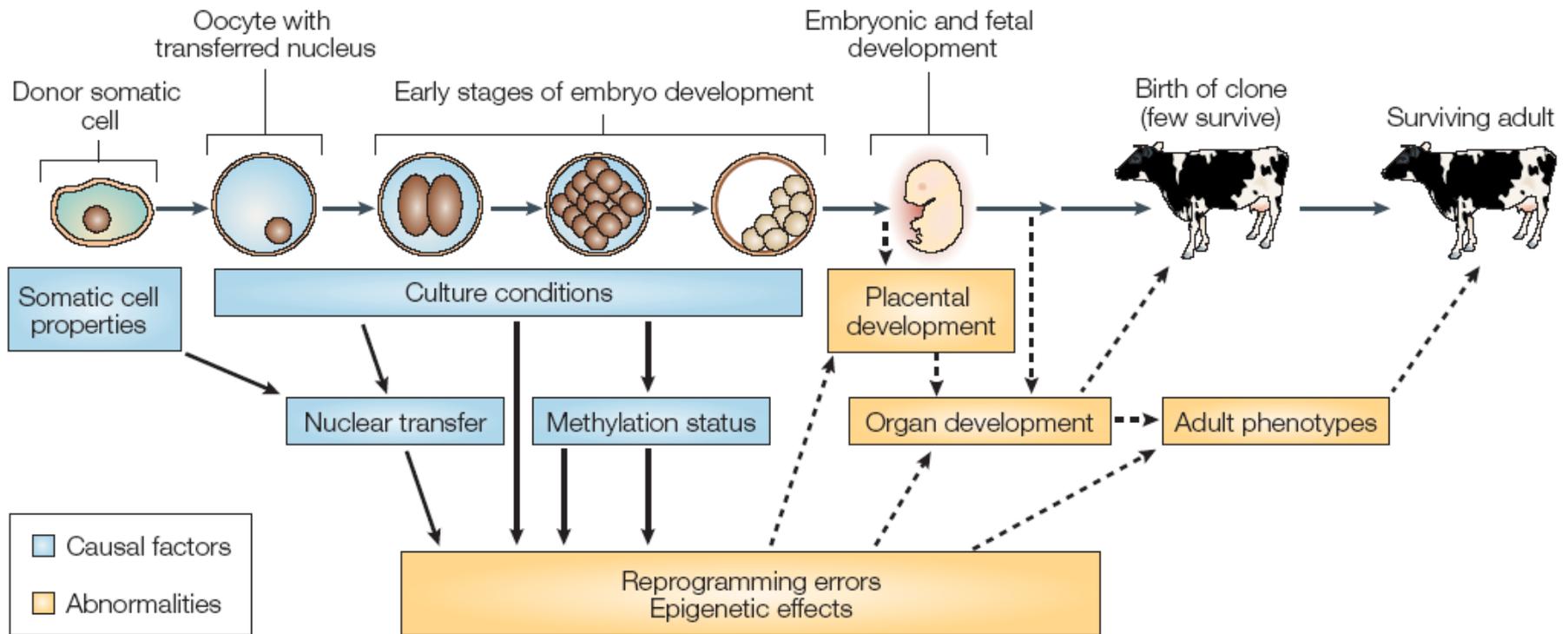


Изображения могут быть защищены авторским правом. - [Отправить отзыв](#)

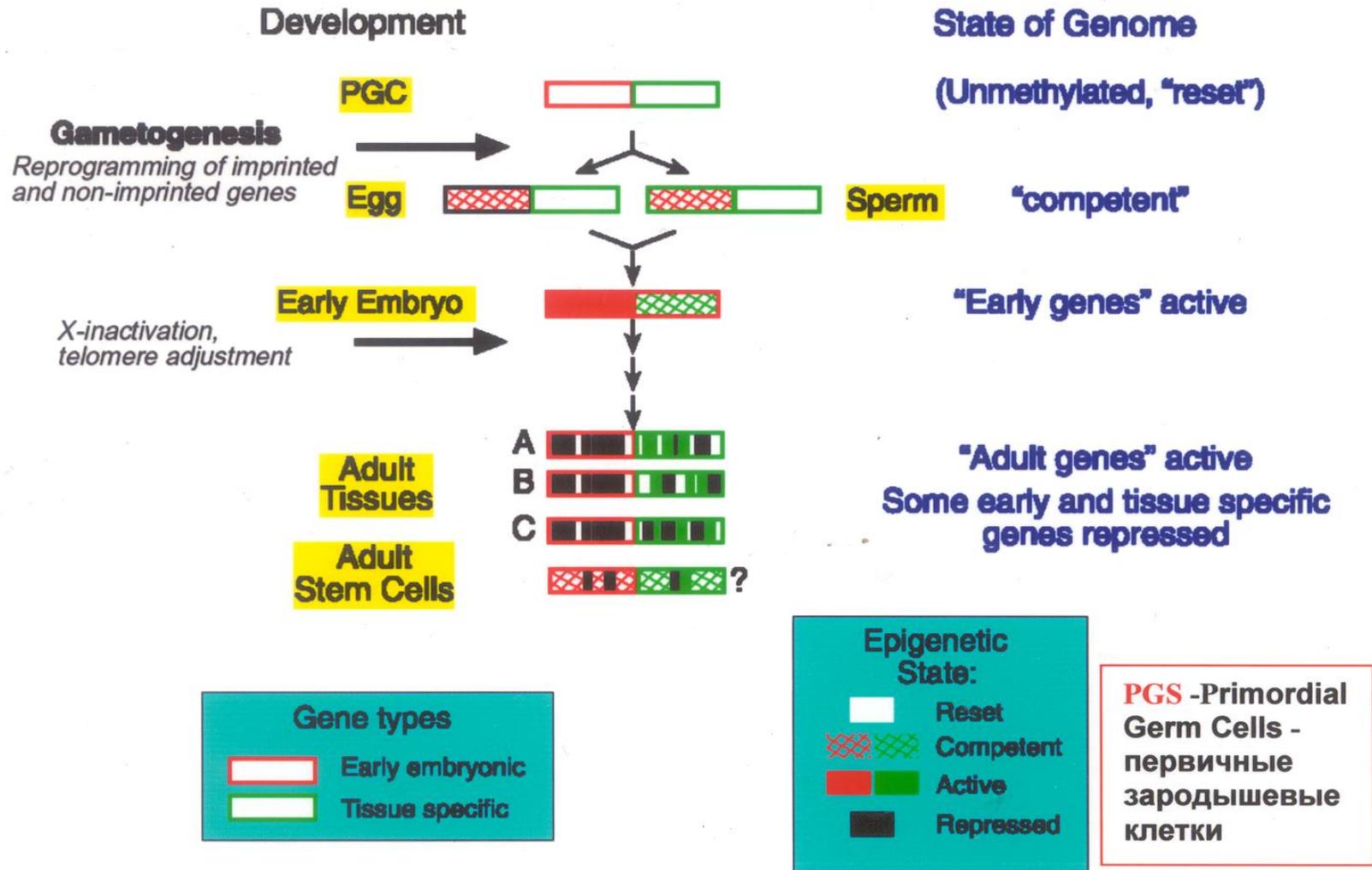
Основные патологические фенотипы, отмеченные у клонированных животных

Organ	Cattle	Sheep	Goats	Pigs	Mice
Cloning efficiency (%)	0–5	0.4–4.3	0.7–7.2	0.1–0.9	0.2–5.8
Placenta	Impaired development, oedematous cotyledons, enlarged umbilical vessels, hydrallantois	Reduced vascularity	–	–	Placentomegaly
BW	Higher	–	–	Lower	–
Heart	RV enlargement	Hypertrophy	–	RV enlargement	–
Lungs	Hypertension¶	Hypertension, MPV	Pneumonia	–	Pneumonia
CNS	–	Pathology	–	–	–
Kidneys	Abnormalities (including size abnormalities)	Defects, hydronephrosis	–	–	–
HLS	Lymphoid hypoplasia, anaemia	–	–	–	Immune impairment
Endocrine	Diabetes	–	–	–	–
Liver	Fibrosis, fatty liver	Enlargement, BDP, fibrosis	–	–	Hepatic necrosis
MS	Limb deformities	Body-wall defects	–	–	–

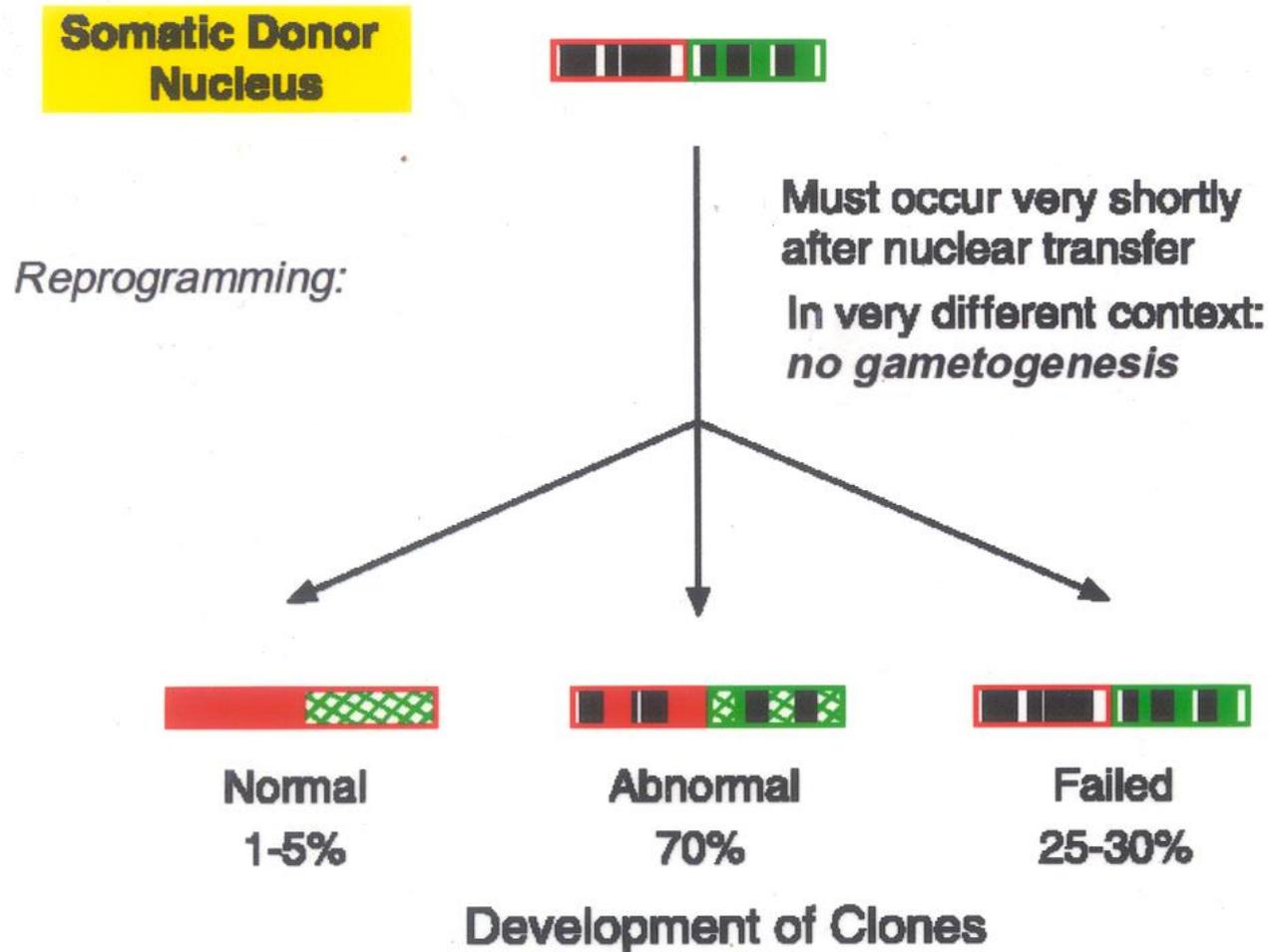
Основные факторы, оказывающие влияние на неправильное развитие клонируемого организма



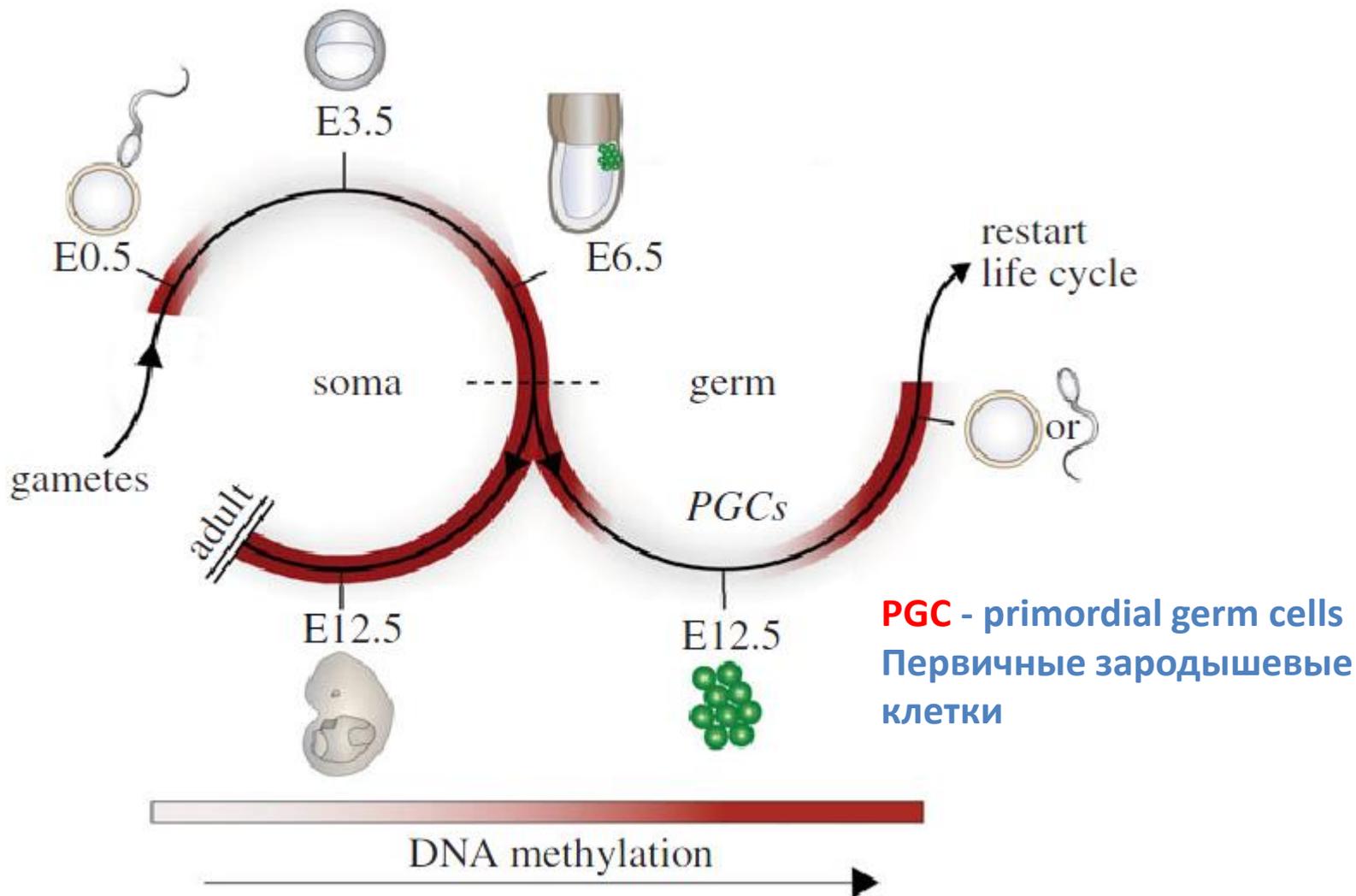
Программирование генома в нормальном развитии



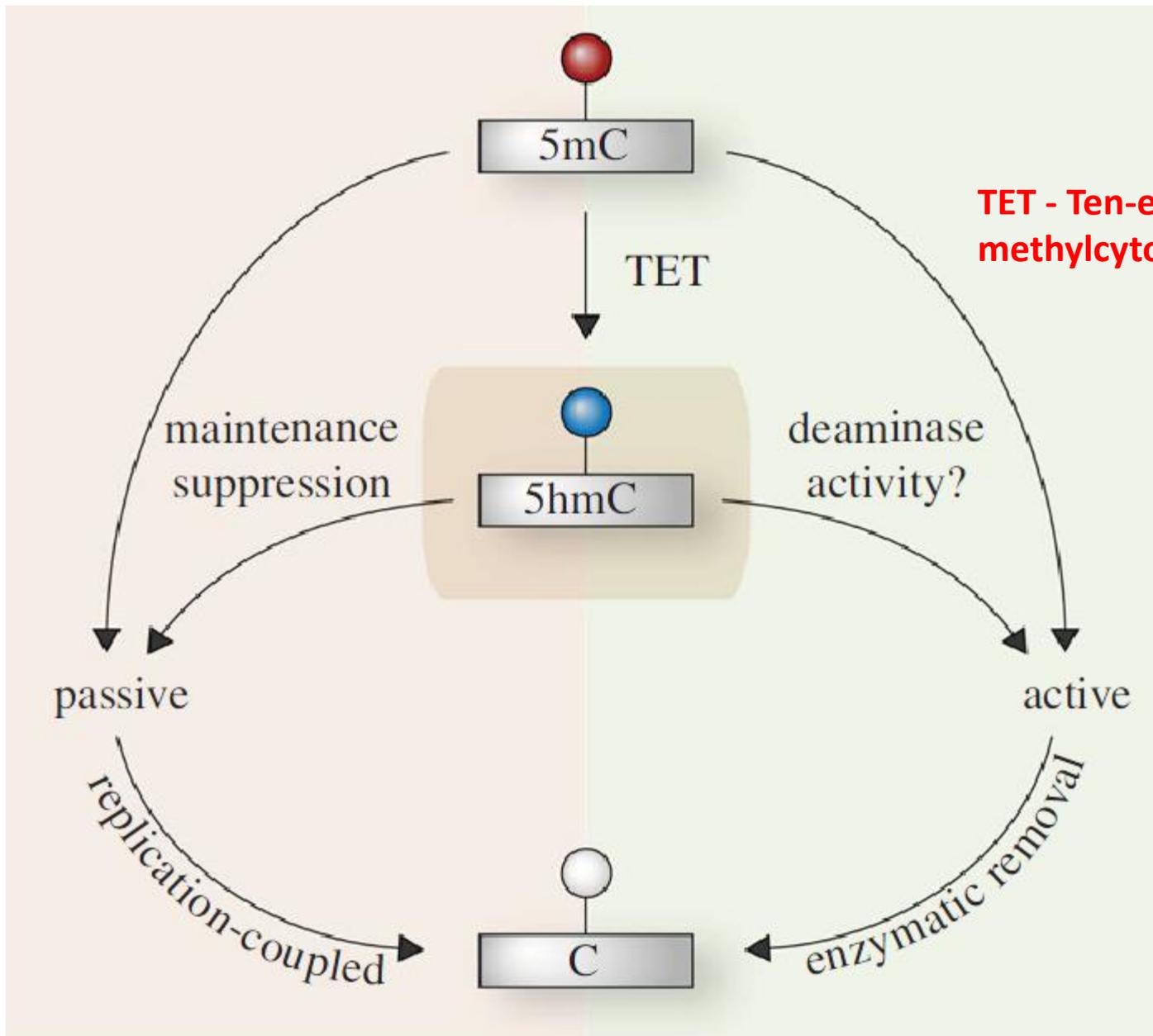
Перепрограммирование генома соматических клеток после пересадки ядер



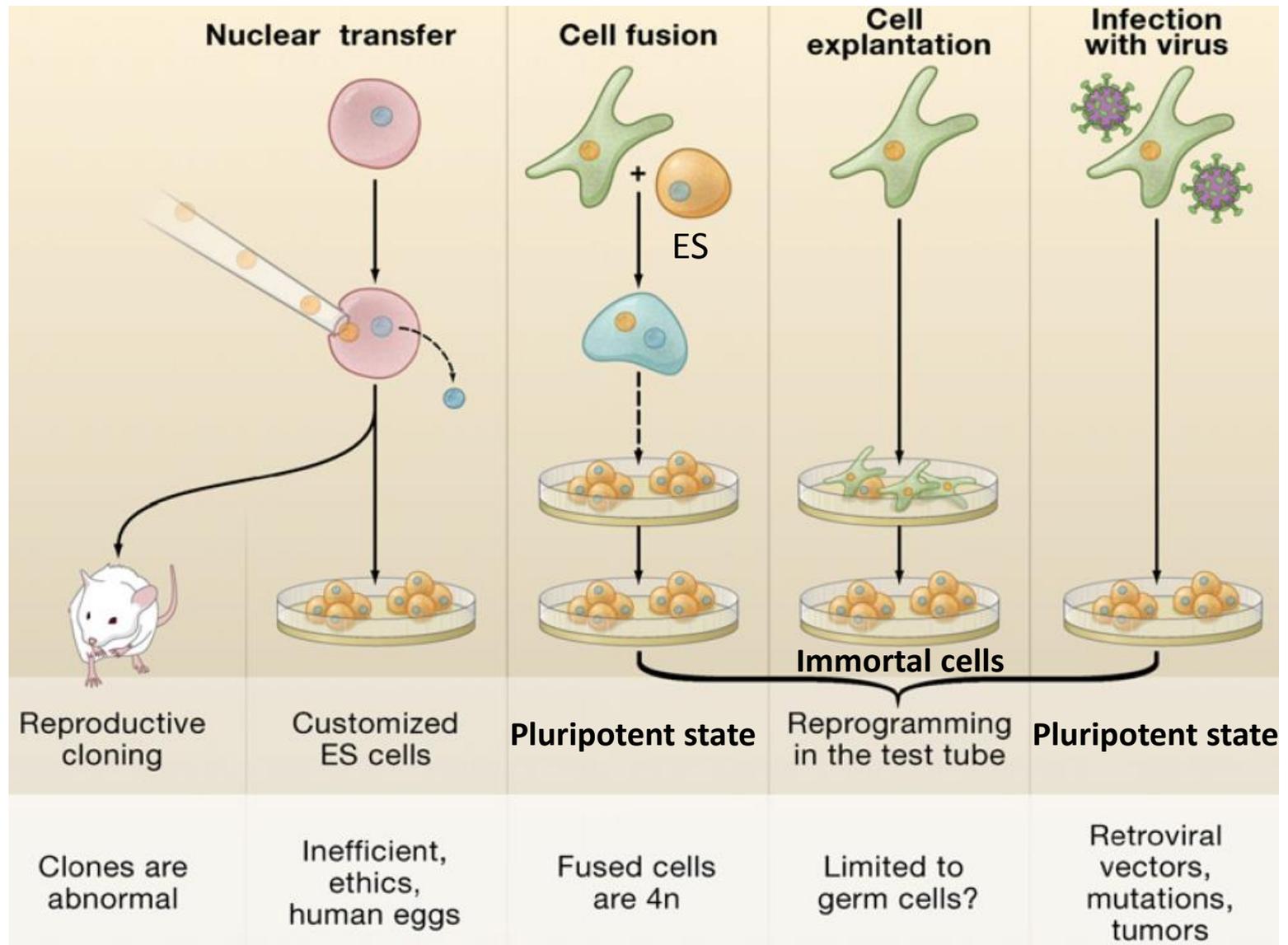
Динамика глобального метилирования ДНК во время жизненного цикла млекопитающих



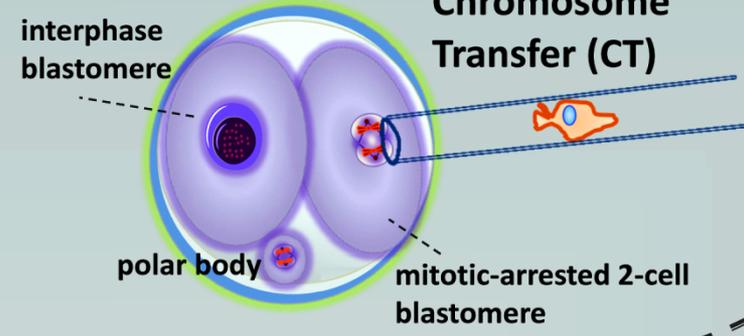
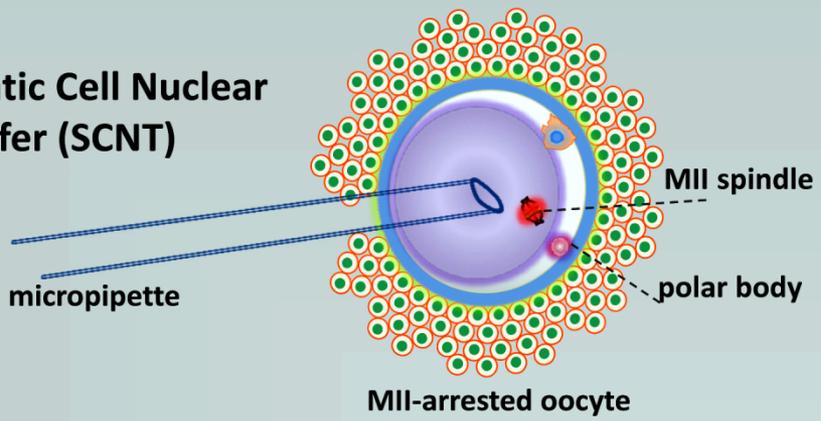
Механизмы деметилирования ДНК



Четыре стратегии перепрограммирования соматических клеток

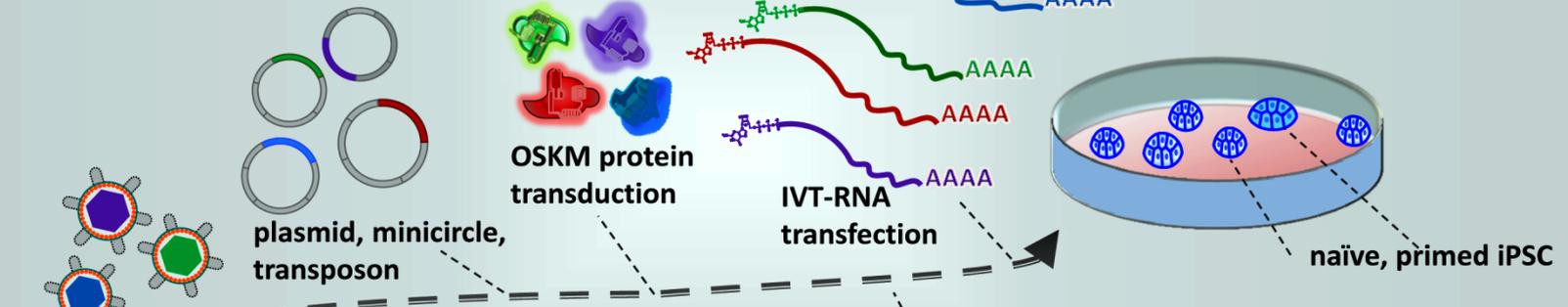


Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)



Totipotency

Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc



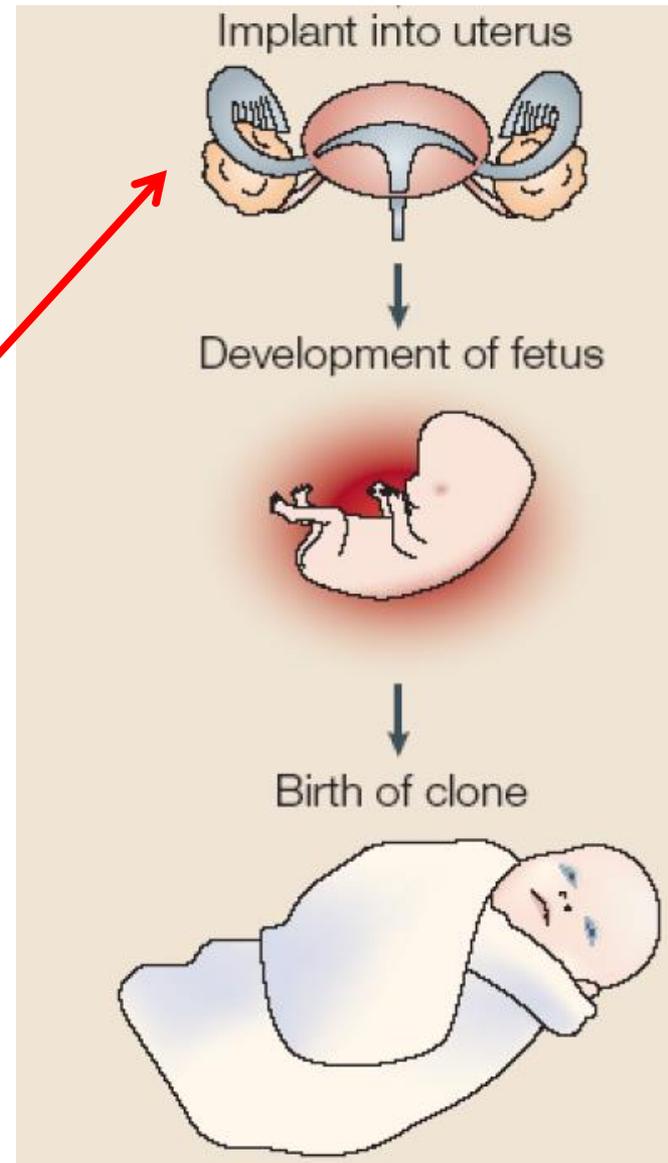
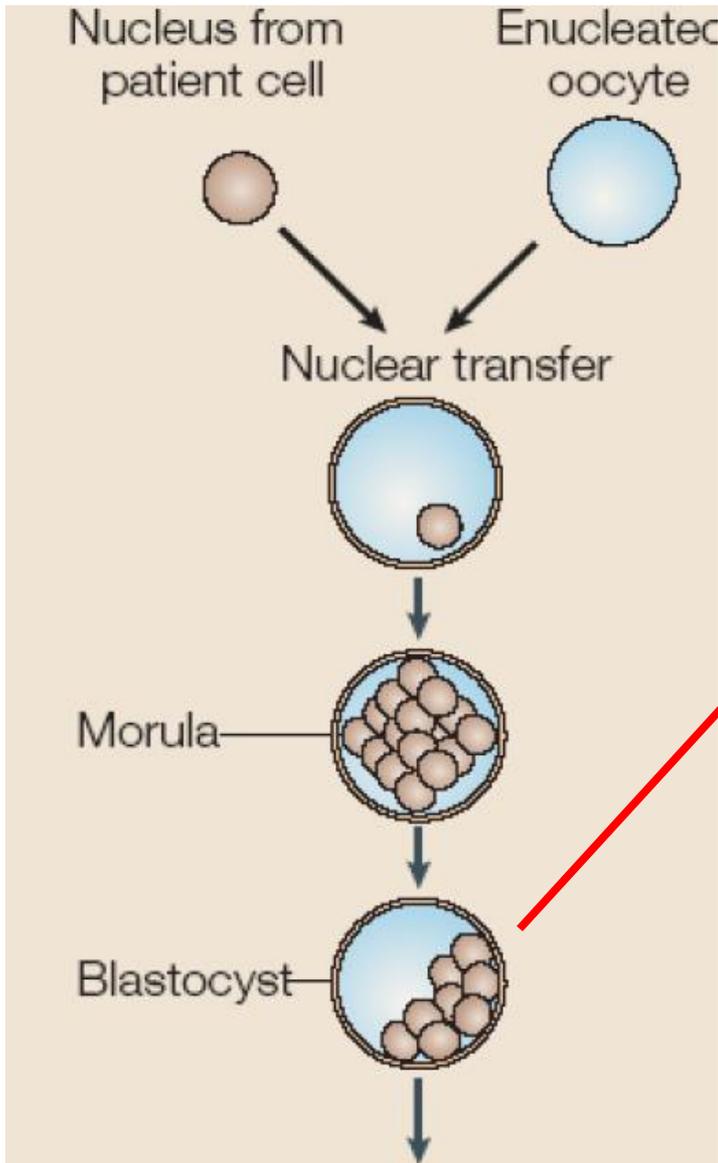
Pluripotency

Получение индуцированных эмбриональных стволовых клеток

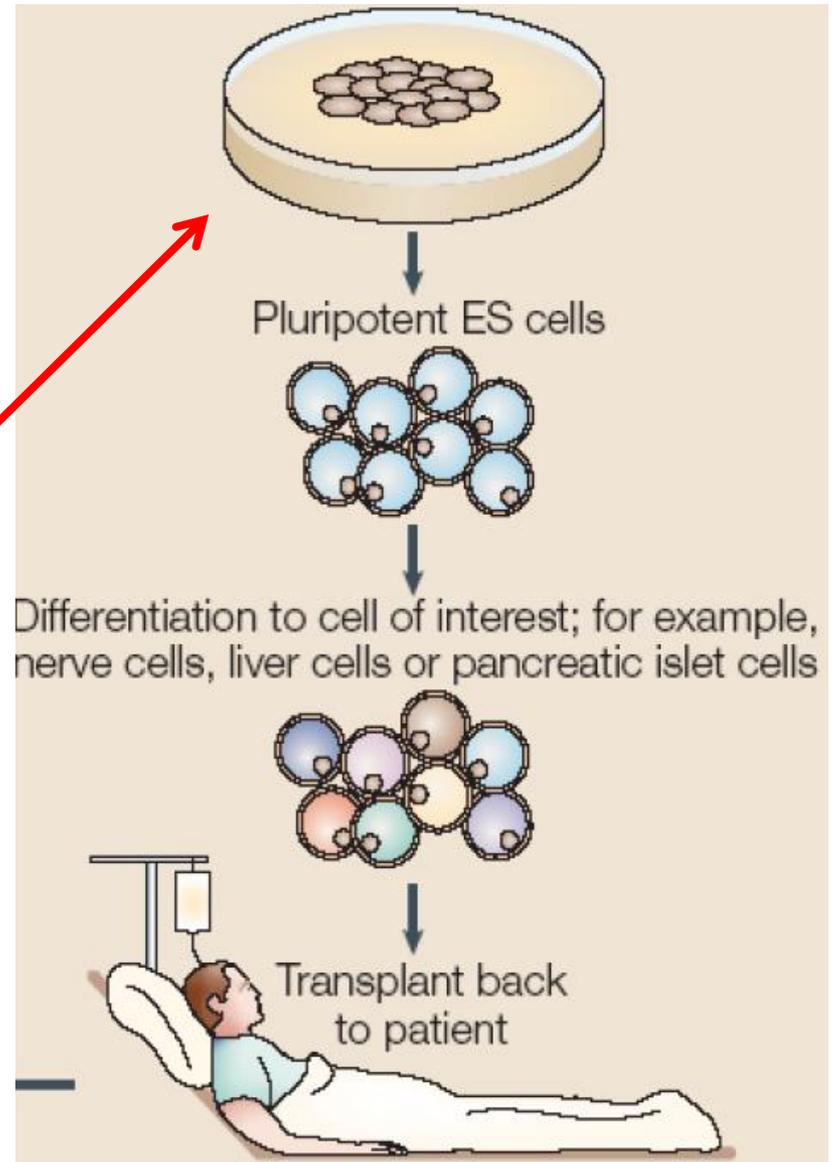
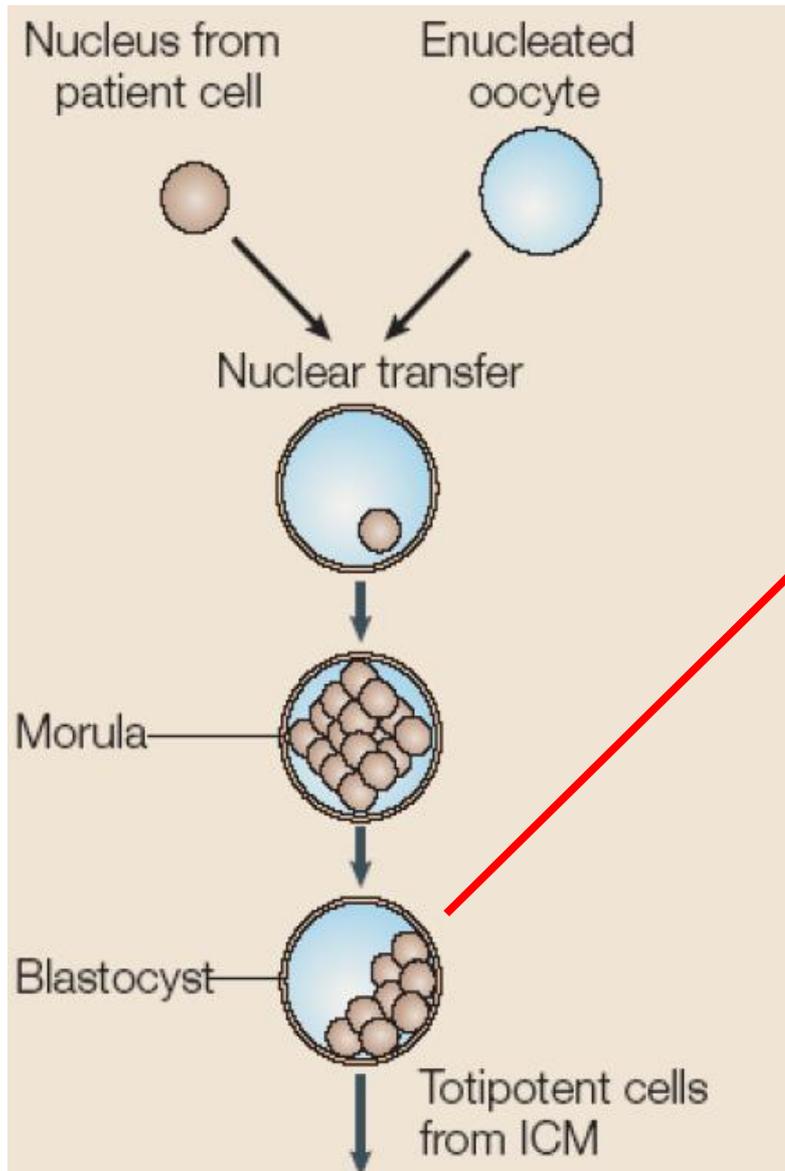
Ингибиторы ДНК метил-трансферазы, деацетилазы гистонов и др.

small molecule-mediated

Репродуктивное клонирование человека



Нерепродуктивное (терапевтическое) клонирование человека



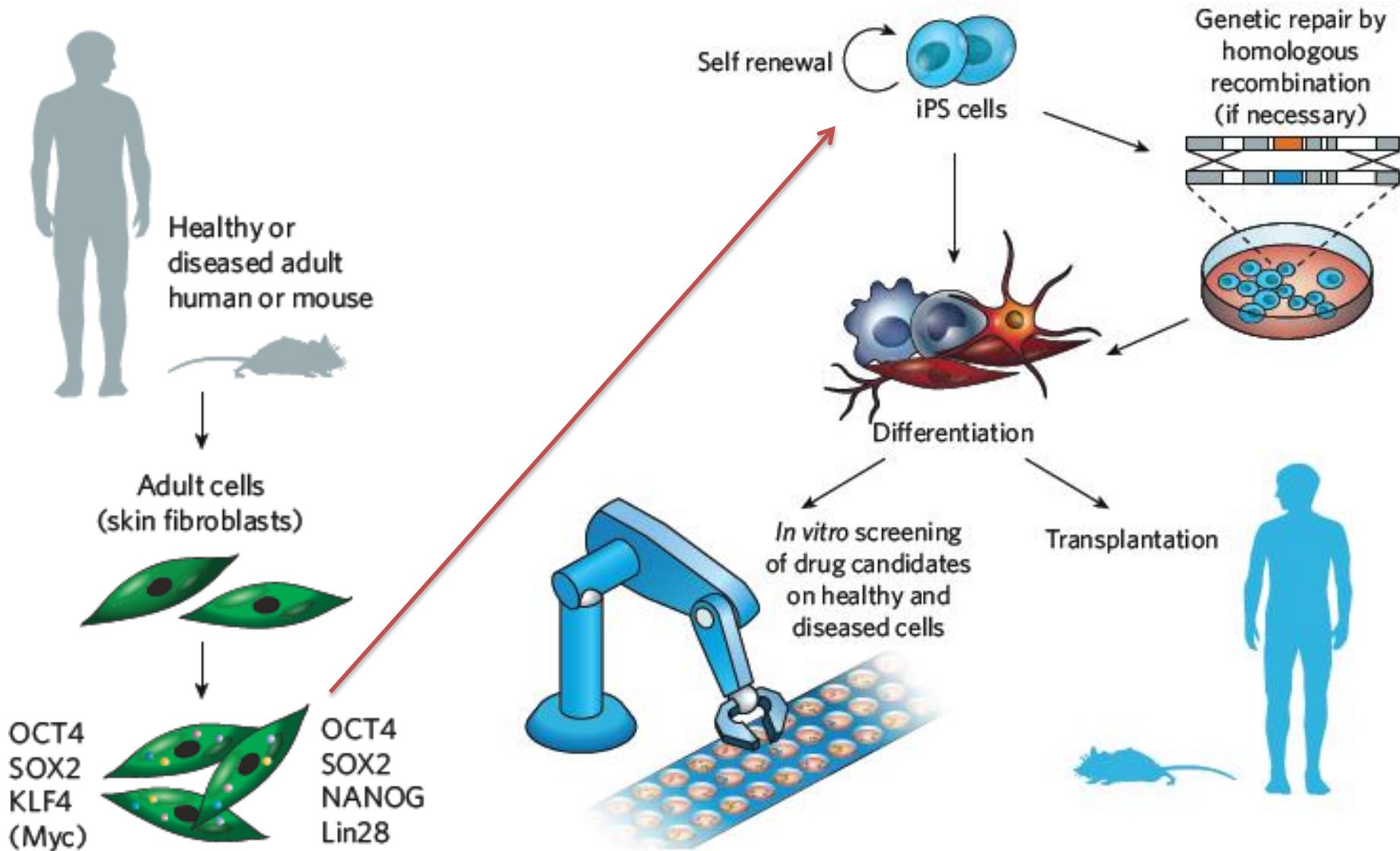
Профессор Роберт Эдвардс – лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 2010 г.



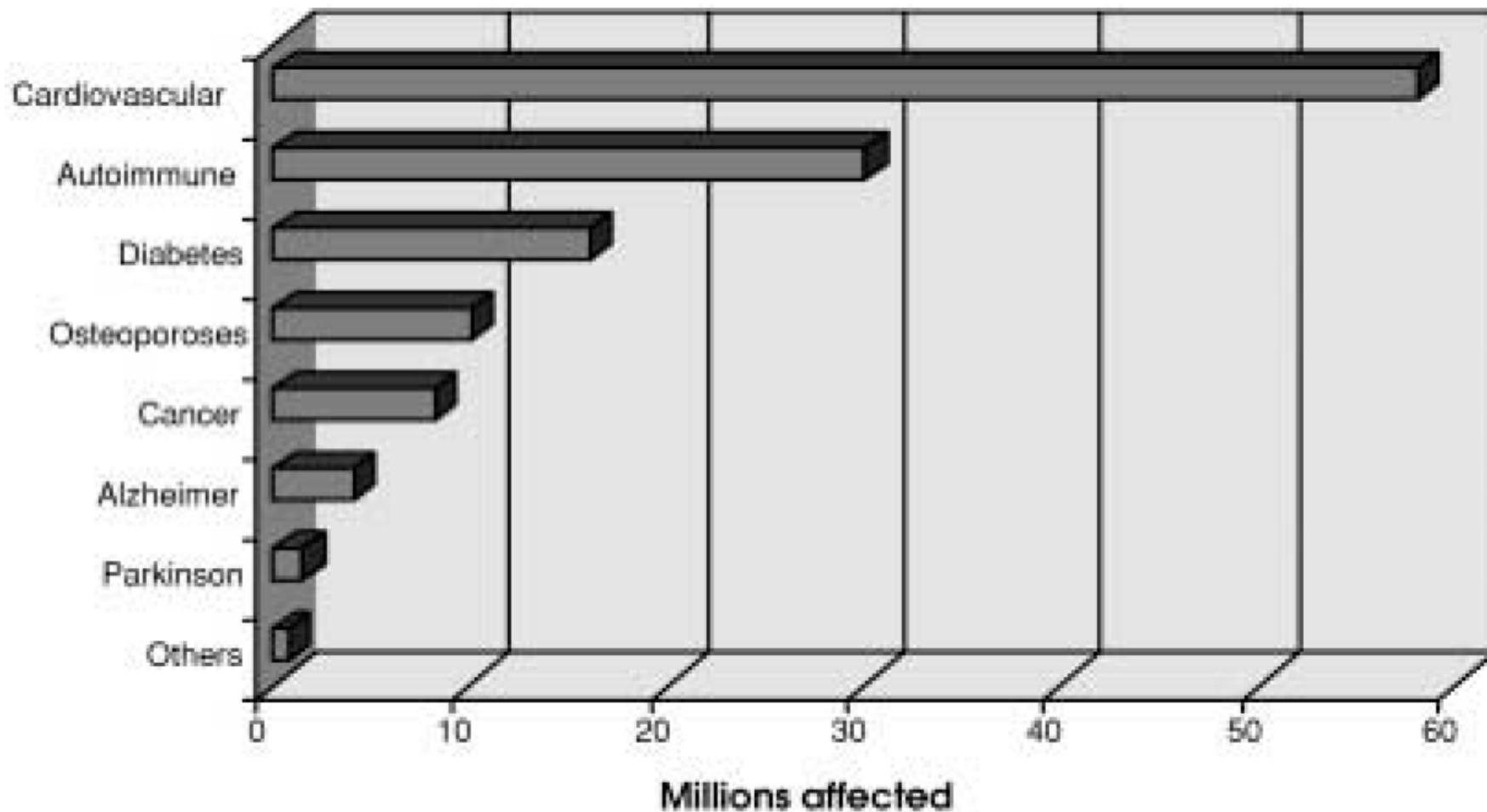
Экстракорпоральное оплодотворение

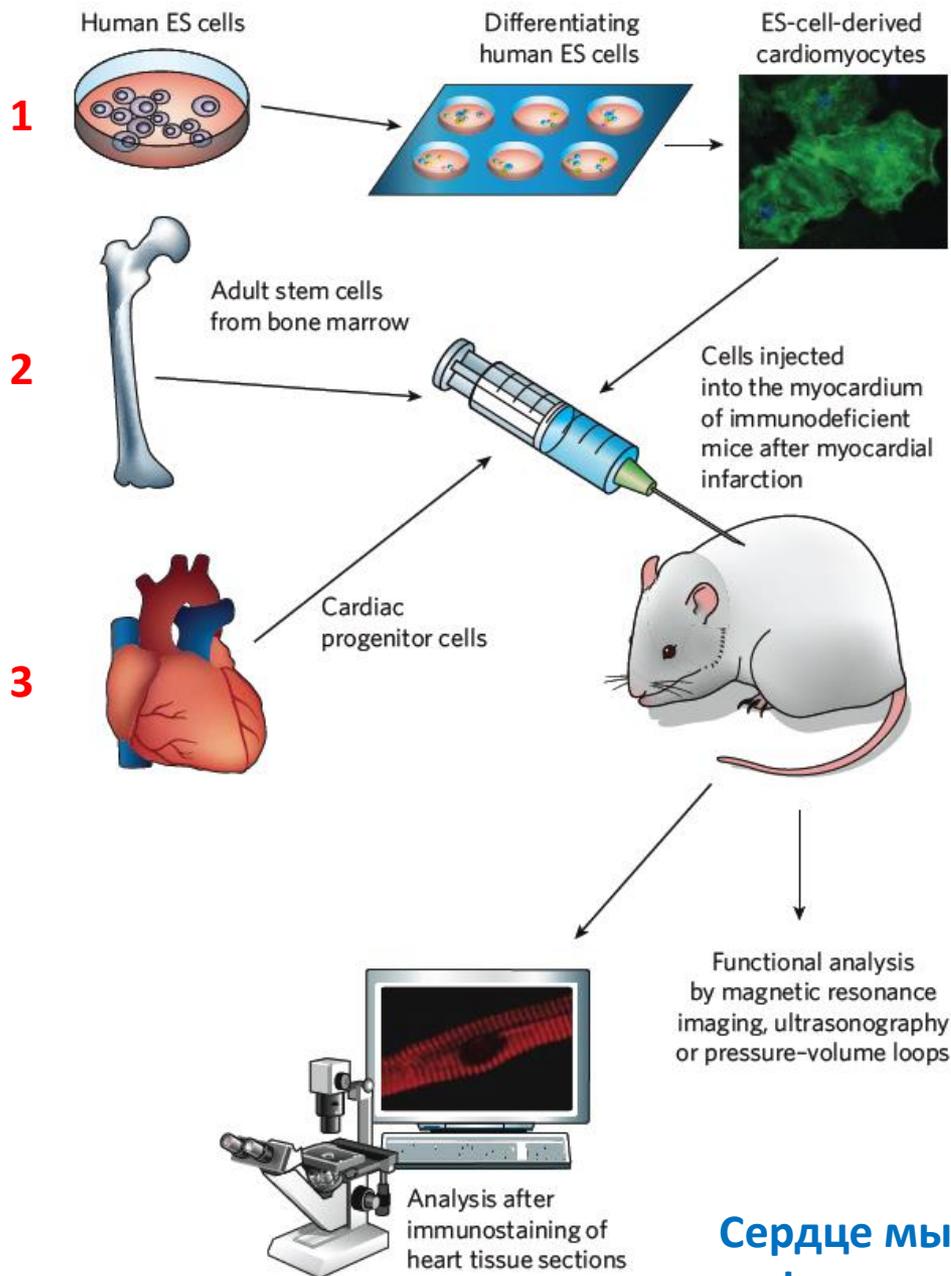
Test-tube babies

Индукированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) и их трансплантация в целях терапии



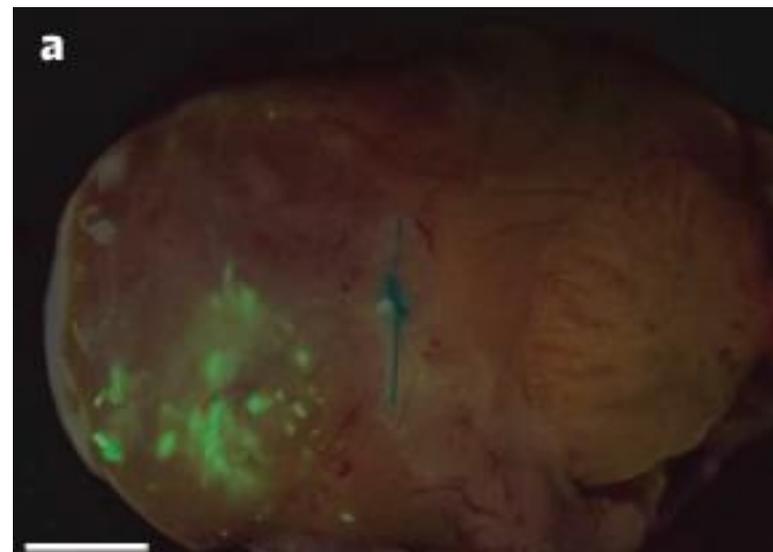
Частота встречаемости заболеваний, требующих пересадки или регенерации тканей





Стратегии трансплантации клеток для регенерации сердца

Зрелые стволовые клетки (ES) **человека**, ES костного мозга, или предшественники клеток сердца вводили иммунодефицитной мышши, перенесшей инфаркт



Сердце мышши через 12 недель после индукции инфаркта миокарда и инъекции GFP-кардиомиоцитов

Предшественники клеток сердца в терапии

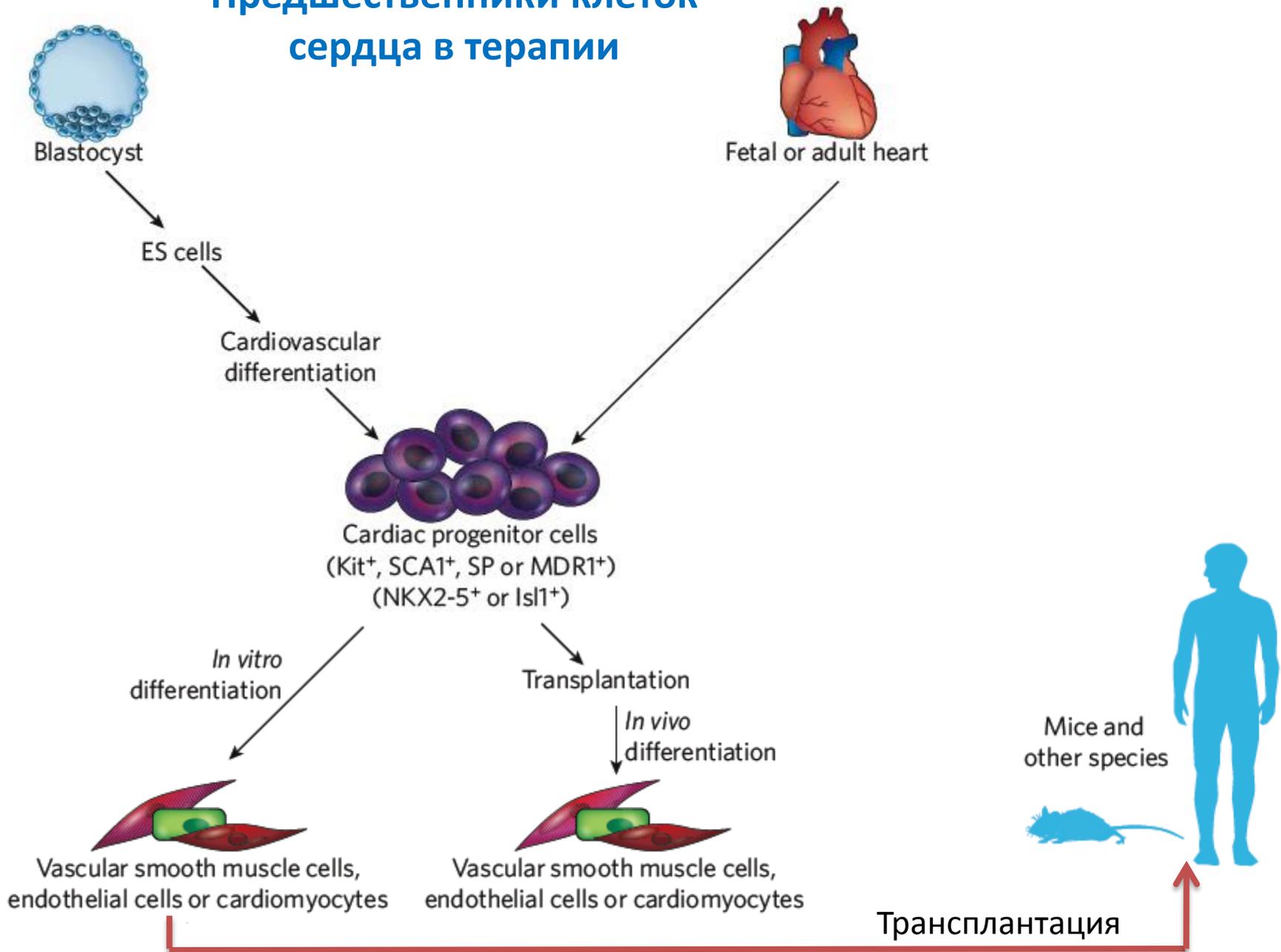
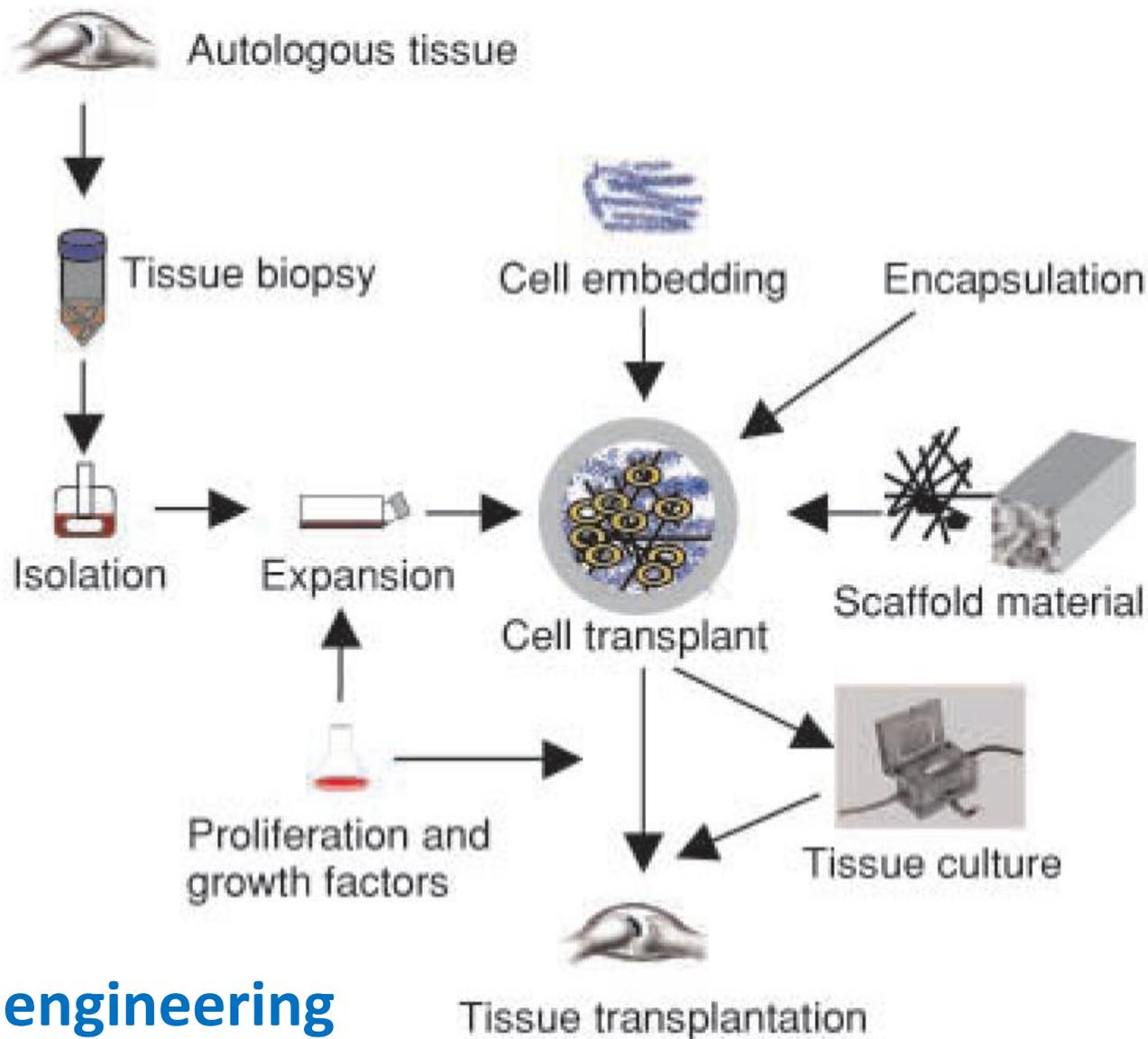


Схема получения искусственных тканей



Tissue engineering

Различные методы получения трансгенных животных

