

# Генная инженерия

## Лекция9. Генная инженерия ЖИВОТНЫХ

(бакалавры)

Составитель: проф. М.Р. ШАРИПОВА

## Nature 1982



41.2 г

21.2 г

В 1982 г. Ричард Палмитер и его коллеги сообщили о создании первой трансгенной мыши ([Nature 1982. Dec 16;300\(5893\):611-615](#)).

Они первыми осуществили перенос гена от одного вида животных другому.

Чужеродные гены внедряли в оплодотворенную яйцеклетку капиллярной трубкой.

Манипуляцию провели после оплодотворения яйцеклетки. Получили трансгенную мышь, в геном которой внедрен ген гормона роста крысы.

В сравнении с обычной мышью, «супермышь» с измененным геномом вдвое крупней и росла в два раза быстрее обычных мышей.

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ  
ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ**



**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ  
ЭМБРИОЛОГИЯ**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ  
ГЕНЕТИКА**

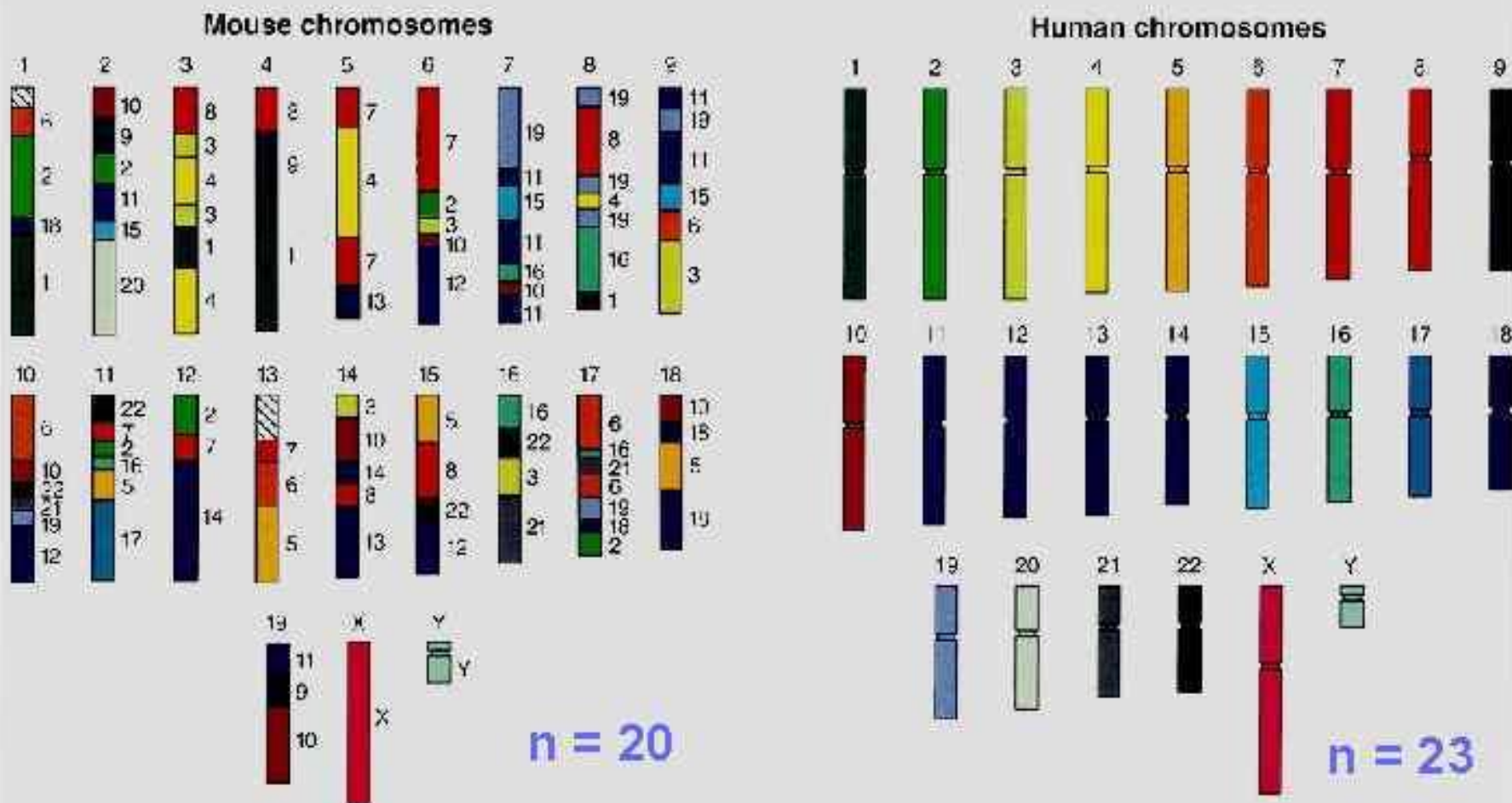
# Основные термины

- **Трансгенное животное** – животное, чей генотип изменен путем введения чужеродной ДНК
- **Трансген** – целевая чужеродная ДНК, которую вводят в организм-реципиент
- **Трансгеноз, трансгенная технология** – процесс введения чужеродной ДНК

# ОБОСНОВАНИЕ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ТРАНСГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ЖИВОТНЫХ

- Доступность информации в базах данных о секвенированных геномах
- Технологический потенциал и разработка программного обеспечения
- Характер пост-трансляционных модификаций рекомбинантных белков
- Правильный фолдинг сложных рекомбинантных белков человека
- Генетическая близость человека и млекопитающих животных

# Порядок генов в хромосомах мыши и человека – 80 млн. лет дивергенции.



~ 200 синтенных групп – участков, где порядок генов совпадает

# Синтенные гены млекопитающих и человека

- Синтенные локусы - это консервативные группы сцепления в геномах с идентичным расположением
- **Всего выявлено 1159 синтенных блоков при сравнении 7 видов млекопитающих с человеческим геномом**
- Синтенные локусы позволяют проводить исследования на модельных объектах, что значительно ускоряет эффективность картирования и молекулярного анализа индивидуальных **генов человека**

**Повышение качества  
продукции  
животноводства**



**Для чего  
используют  
трансгенных  
животных?**



**Получение животных,  
устойчивых к  
заболеваниям**

**Трансгенные животные –  
биореакторы –  
продуценты  
лекарственных белков**

**Трансгенные животные –  
модели генетических  
заболеваний**

**Разработка методов  
генной терапии**

**Выращивание органов из  
стволовых клеток  
животных**



# Продуценты лекарственных белков

- Трансгенные животные-биореакторы как продуценты лекарственных белков получают на основе клонирования генов человека в геном животных
- Технология построена на получении животных, которые экспрессируют человеческие белки в клетках молочной железы
- В этом случае лекарственные белки выделяют из животного молока и контаминирующие белки нетоксичны для человека
- Получены трансгенные мыши, способные к экспрессии в молоке человеческие интерферон, сывороточный альбумин, урокиназу, интерлейкин-2, супероксиддисмутазу и др.
- Получены трансгенные кролики, овцы и козы, активно ведутся работы по получению трансгенных коров для продуктов, которые секретируются в молоко

# Моделирование генетических заболеваний

- **Выяснение** механизмов формирования заболеваний проводят на трансгенных животных
    - Среди млекопитающих наиболее развита техника моделирования на мышах
    - Создают два типа моделей: мыши с функционирующим трансгеном и мыши с утратой функции гена
- На первой модели исследуют взаимосвязь экспрессии гена и степенью заболевания
- На второй модели – конкретную роль гена в заболевании, что особенно важно при анализе причин мультигенных болезней

# Разработка методов генной терапии

- **Все методы генной терапии разрабатываются и проходят обязательные испытания на модельных трансгенных животных**
- **Методы генной терапии актуальны в борьбе с неизлечимыми заболеваниями:**
  - ✓ **моногенные наследственные болезни**
  - ✓ **онкозаболевания, СПИД и другие соматические болезни**
- **Методы:** используется соматическая трансфекция, когда генетические конструкции вводят в определенные клетки пациента

# Выращивание органов из стволовых клеток

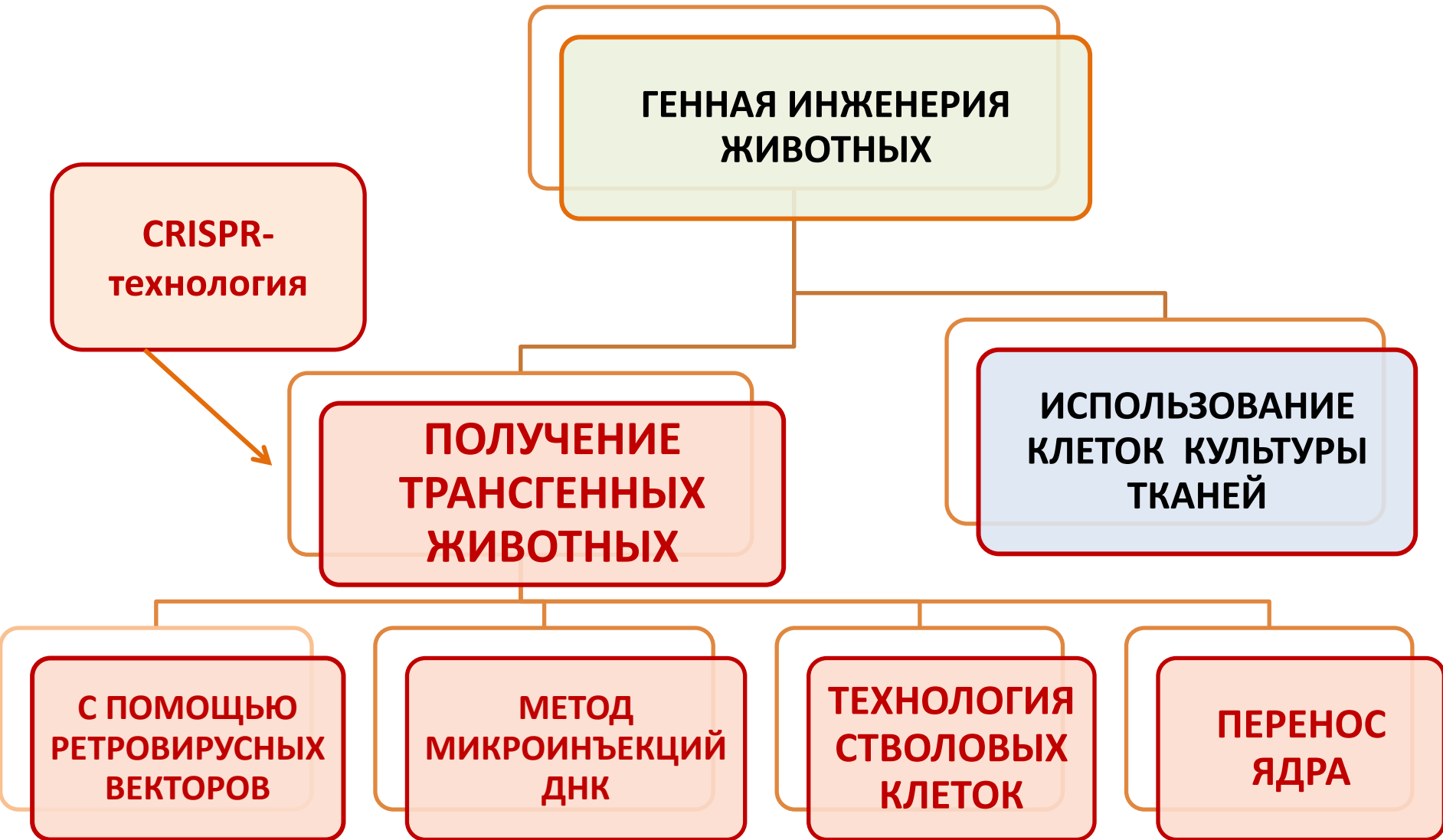
- Японские ученые в мышинных эмбрионах выключили ген для формирования поджелудочной железы и ввели стволовые клетки крысы. В результате поджелудочная железа у рожденных животных состояла из крысиных клеток.
- В мышинных эмбрионах отключали также гены, ответственные за формирование сердца или глаз, и вводили стволовые клетки крыс. Недостающие органы у получившихся мышей состояли из крысиных клеток.
- Применяя человеческие стволовые клетки пытаются выращивать животных с органами человека. Пациент получает орган, выращенный из собственных стволовых клеток, и без отторжения

Исследования в области трансгеноза животных сконцентрированы на разработке двух главных технологических платформ:

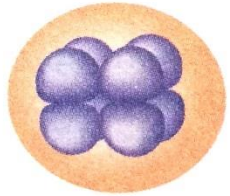
- 1) на основе трансгенных животных
- 2) на основе культур клеток млекопитающих

Доминирующую роль в получении рекомбинантных белков занимают культуры клеток – в 2012 г на рынке США представлены 312 терапевтических препарата, из которых 193 продукты культур клеток

# Техника трансгеноза

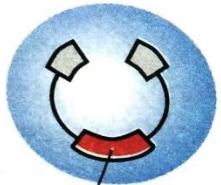


Самка-донор

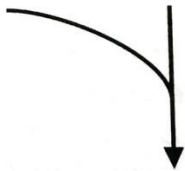


8-клеточный  
эмбрион

Ретровирус



Трансген



Самка  
с имплантантом



Трансгенное  
животное-основатель

# Использование ретровирусных векторов

- 1) Эмбрион на стадии 8 клеток инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген
- 1) Инфицированные эмбрионы имплантируют в суррогатную мать, которая производит трансгенное потомство
- 1) Проводят идентификацию мышат, которые несут трансген в клетках зародышевой линии

# Использование ретровирусных векторов

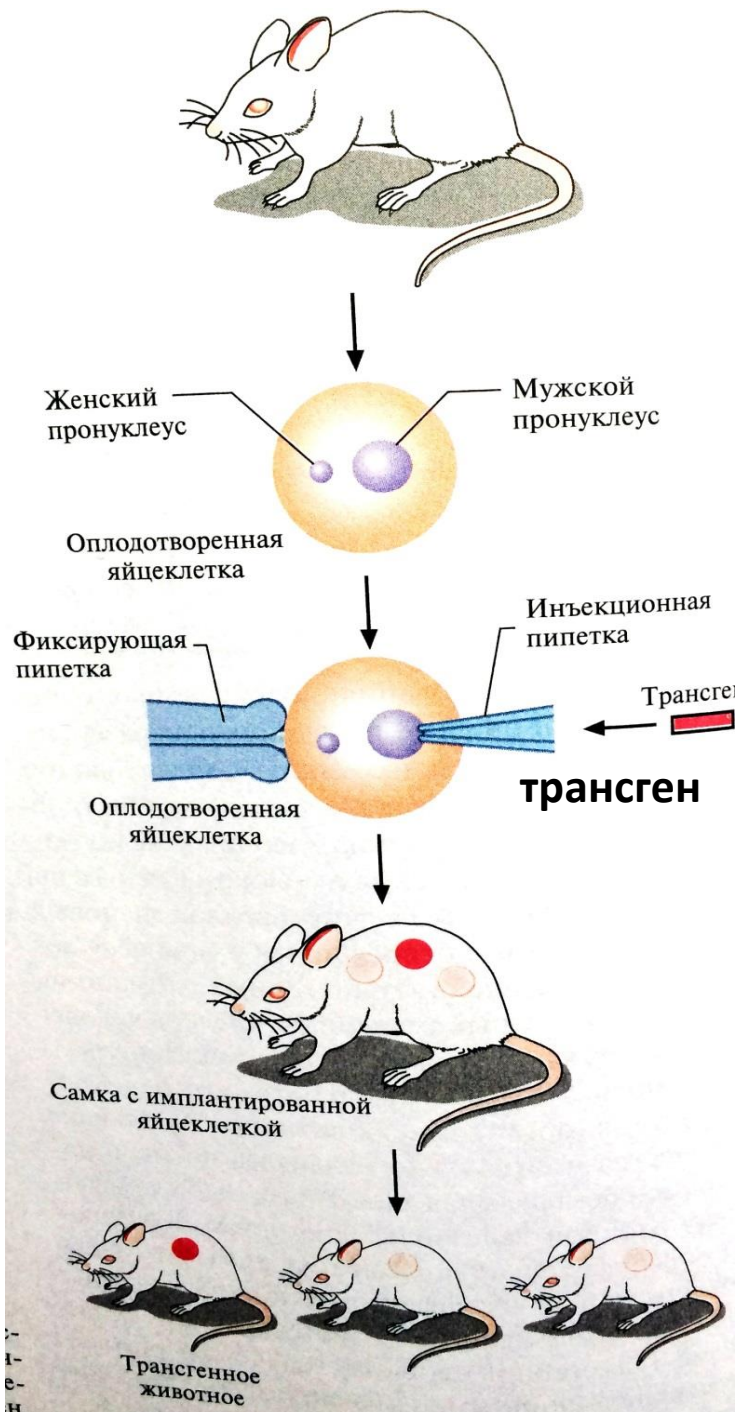
- 1) **Преимущество** метода в эффективности по сравнению с другими методами
- 2) **Недостаток:** Ограничен размер вставки (не более 8 т.п.н.)
- 3) **Недостаток:** применение ретровирусных векторов недопустимо при получении коммерческих продуктов
- 4) **Недостаток:** эксперименты проводят на зародышевой линии, это запрещено



# Вектора на основе аденовирусов

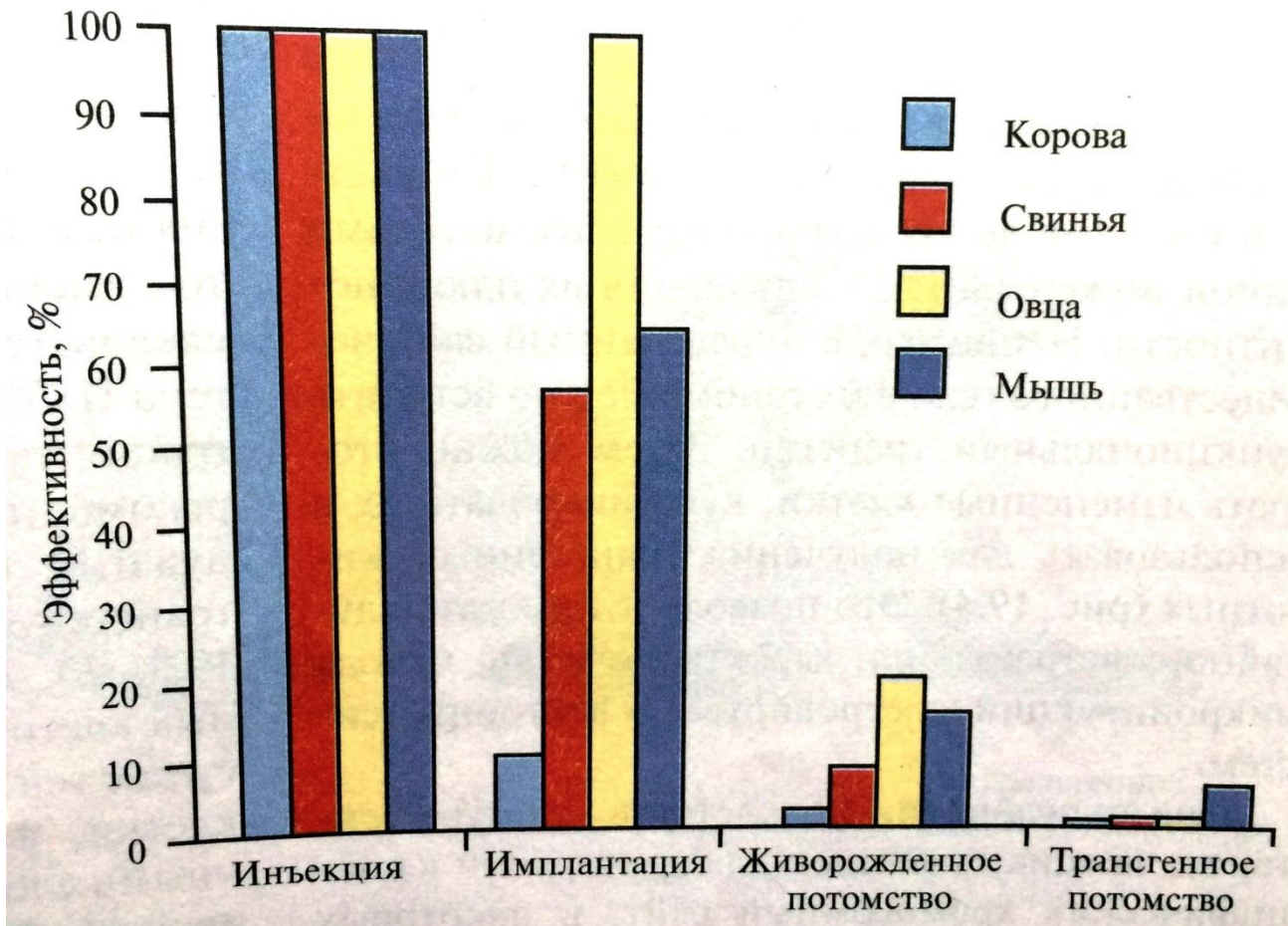
- Разработаны методы, основанные на заражении организма дефектным по репликации ДНК-содержащим аденовирусом с геном целевого белка, что приводит к непродолжительной и не передающейся по наследству продукции рекомбинантного белка

# Метод микроинъекций



- 1) После оплодотворения самку умерщвляют и вымывают оплодотворенные яйцеклетки
- 2) В оплодотворенные яйцеклетки *in vitro* инъецируют трансгенную конструкцию
- 3) После микроинъекции яйцеклетки имплантируют в суррогатную мать, которая производит трансгенное потомство
- 4) В потомстве идентифицируют мышат, которые несут трансген

# Эффективность трансгеноза после микроинъекций



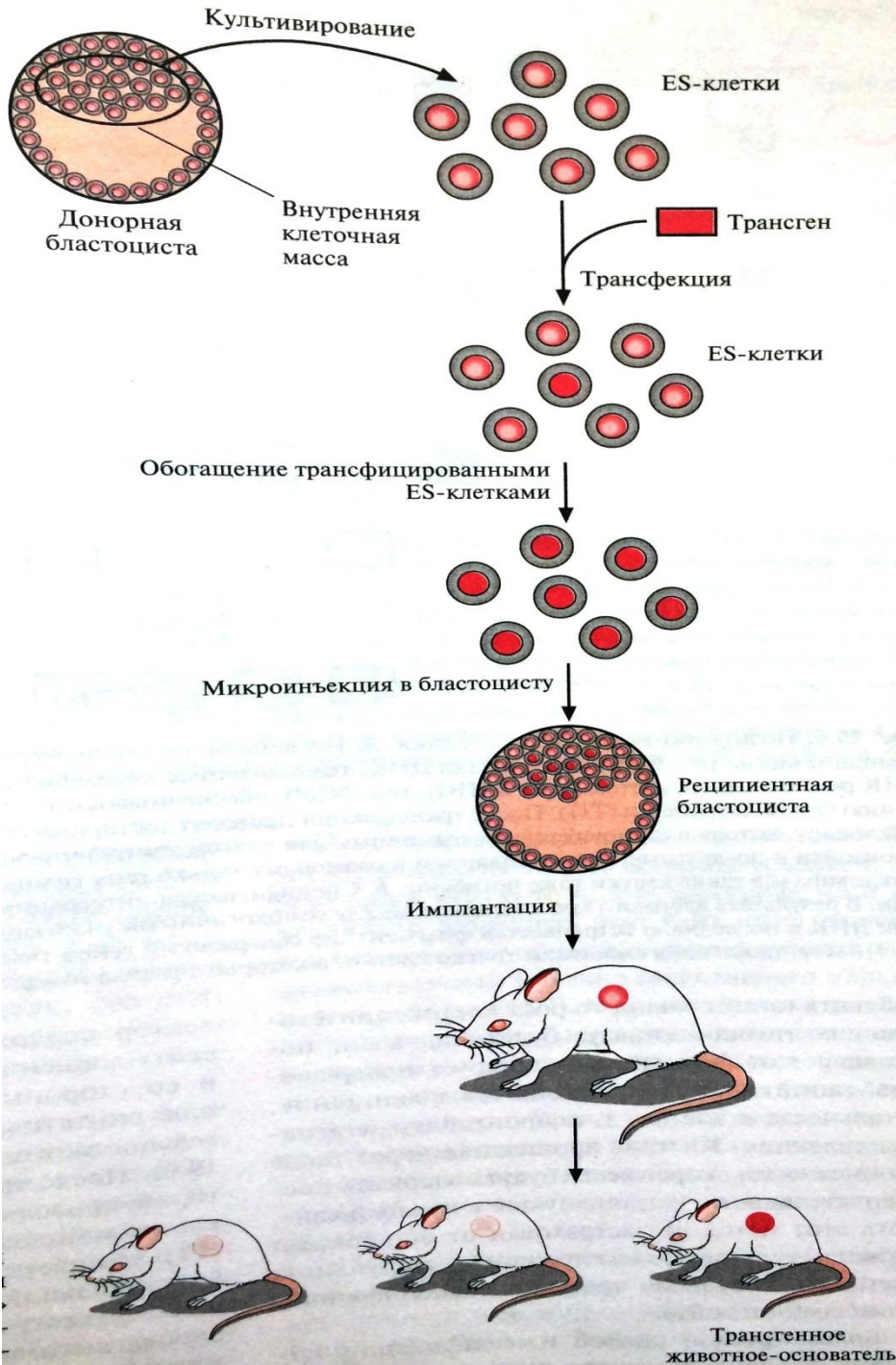
Успешная имплантация и появление потомства для менее 5% обработанных яйцеклеток

# Ограничения метода микроинъекций

- Требуется высокой квалификации несмотря на простоту исполнения
- Низкий выход трансгенного потомства, т.е. надо брать в эксперимент много животных
- Ни один из этапов эксперимента не эффективен на 100%, поэтому необходимо использовать большое число оплодотворенных яйцеклеток
- Отсутствует контроль за интеграцией трансгенной ДНК
- Не все трансгенные мышата будут обладать нужными свойствами

# ES-Клетки

- Клетки, выделенные из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре и сохраняют способность к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты
- Такие клетки называют плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками -- **(ES-клетки)**
- **ES-Клетки в культуре легко модифицировать методами генной инженерии без нарушения их плюрипотентности**



## Метод модификации стволовых клеток (ES-клеток)

- 1) ES-клетки получают из бластоцисты мыши
- 2) ES-клетки трансфицируют вектором, несущим трансген, культивируют и идентифицируют трансфицированные клетки ПЦР
- 3) Отобранные клетки с трансгеном культивируют и вводят в бластоцисты
- 4) Бластоцисты имплантируют в суррогатную мать
- 5) Идентифицируют трансгенных мышей

# Преимущества метода ES-клеток

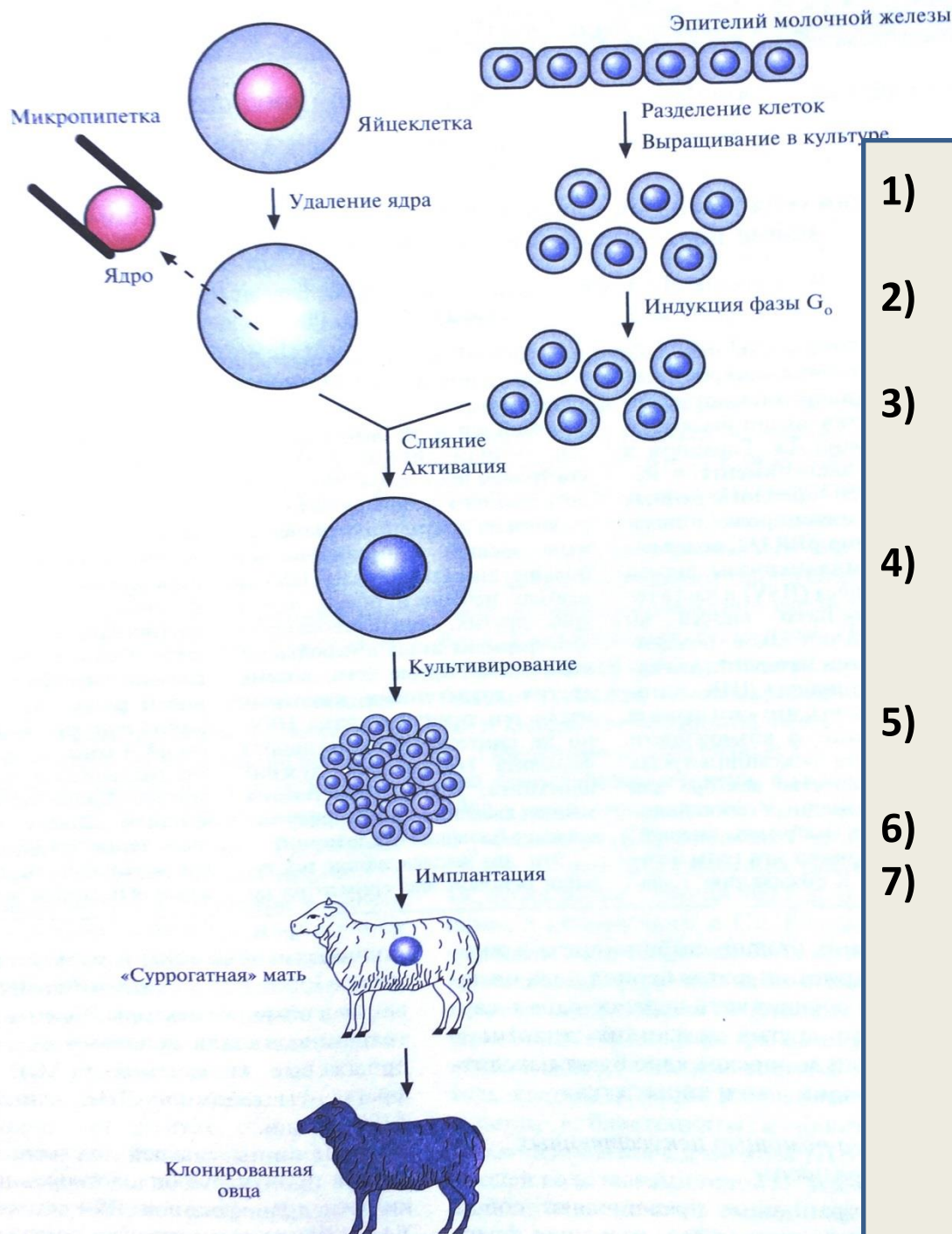
- После трансплантации до 30% мышат содержат трансген
- Можно встроить трансген в специфический сайт, а также разрушить этот сайт путем нокаута
- Для эффективности отбора используют зеленый флуоресцентный белок (GFP) вместо генов устойчивости
- ES-клетки пока не обнаружены у крупного рогатого скота, овец, свиней, цыплят и их поиск продолжается, метод разработан на мышах

# Трасгенные мыши с экспрессией GFP (зеленый флуоресцирующий белок медузы)





# Метод переноса ядра



- 1) Ядро яйцеклетки удаляют с помощью микропипетки
- 2) Культивируют эпителиальные клетки молочной железы
- 3) Осуществляют слияние эпителиальных клеток и яйцеклеток, лишенных ядра
- 4) Культивируют восстановленные яйцеклетки до ранней стадии эмбриогенеза
- 5) Яйцеклетки имплантируют в матку «суррогатной» матери
- 6) Получают трансгенное потомство
- 7) В эксперименте с овечкой Долли проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами с эпителиальными клетками молочной железы – из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода

# Метод переноса ядра

- Эта техника позволила удешевить и упростить процедуру получения трансгенных животных
- Важно, что большая часть работы переносится с фермы в лабораторию, где проводят трансфекцию соматических клеток и отбирают клоны, в которых произошла интеграция трансгена в геном
- **К негативным последствиям** метода относятся низкая выживаемость эмбрионов и слабое здоровье модифицированных животных

**Для контроля разнообразия и сохранности модельных животных созданы SPF-центры:**

- 1) разведение SPF-животных, свободных от видоспецифических патогенов (Specific Pathogen Free)**
- 2) формирование **криоколлекций** биологического материала (эмбрионы, эмбриональные стволовые клетки)**
- 3) выполнение работ по **созданию** трансгенных животных**
- 4) высокотехнологичное генотипирование и фенотипирование**

spf-Виварий - исследования генетической природы заболеваний (Новосибирск)



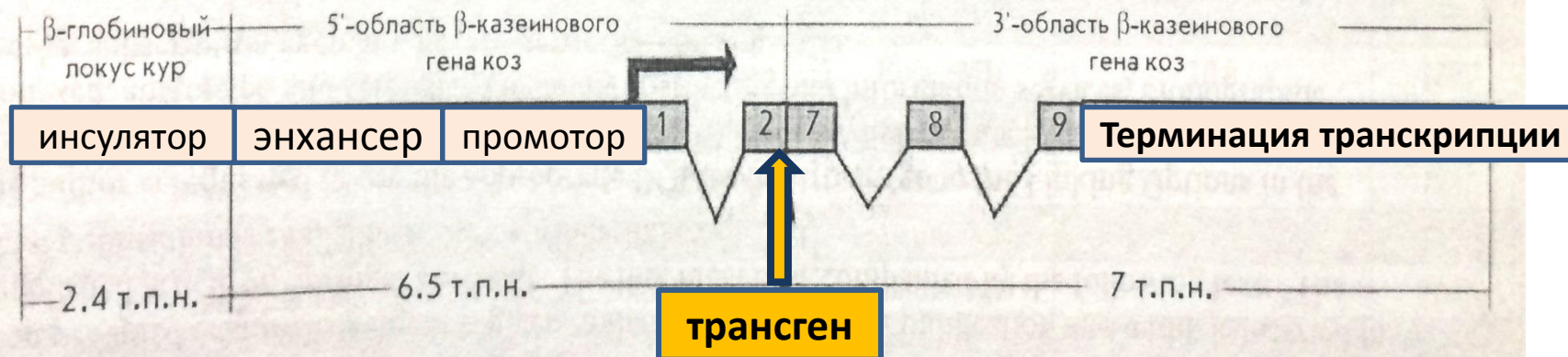
# Векторы для продукции рекомбинантных белков

А



Б

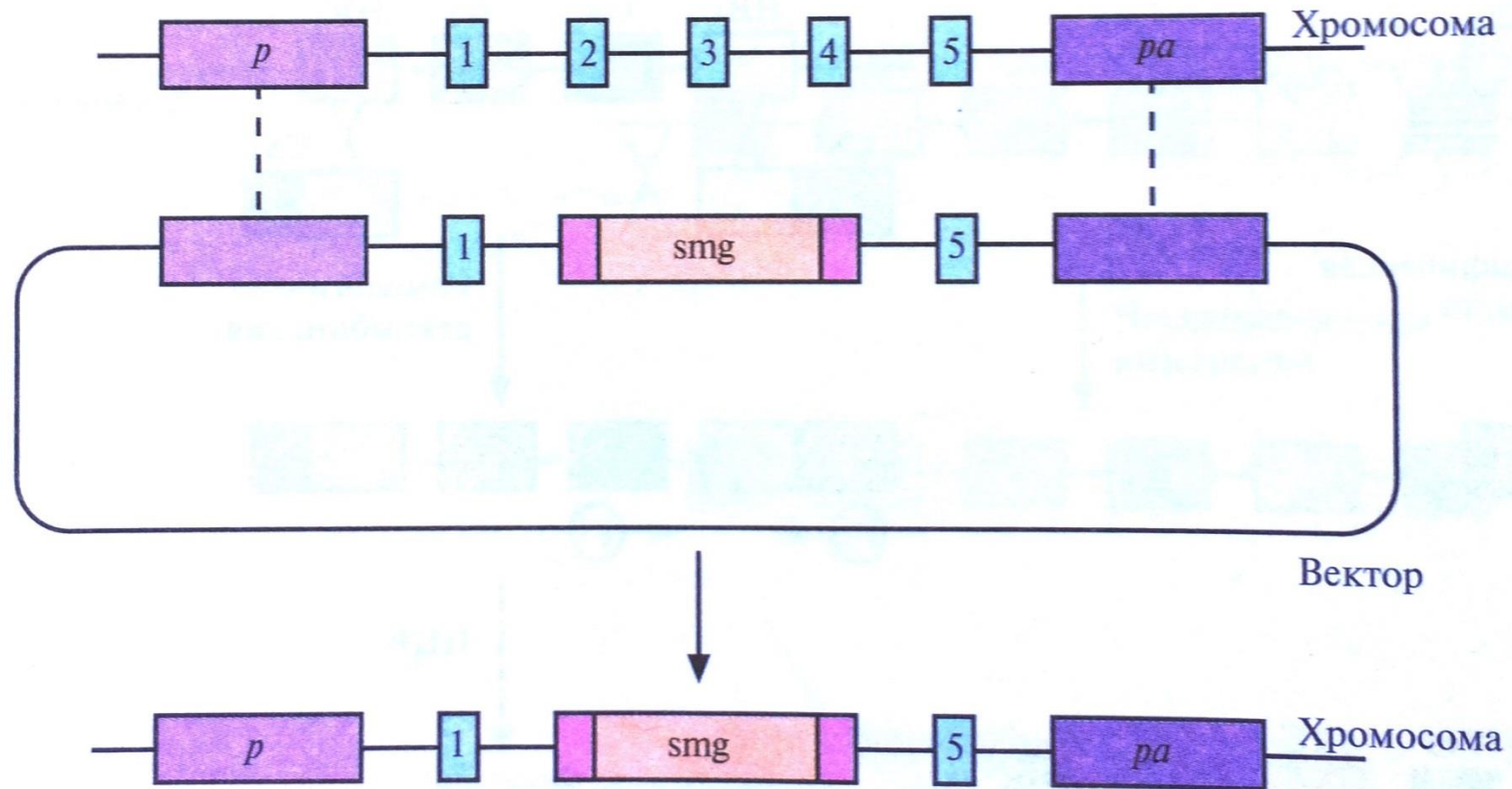
Вектор рВС 1



# Вектора на основе мобильных элементов

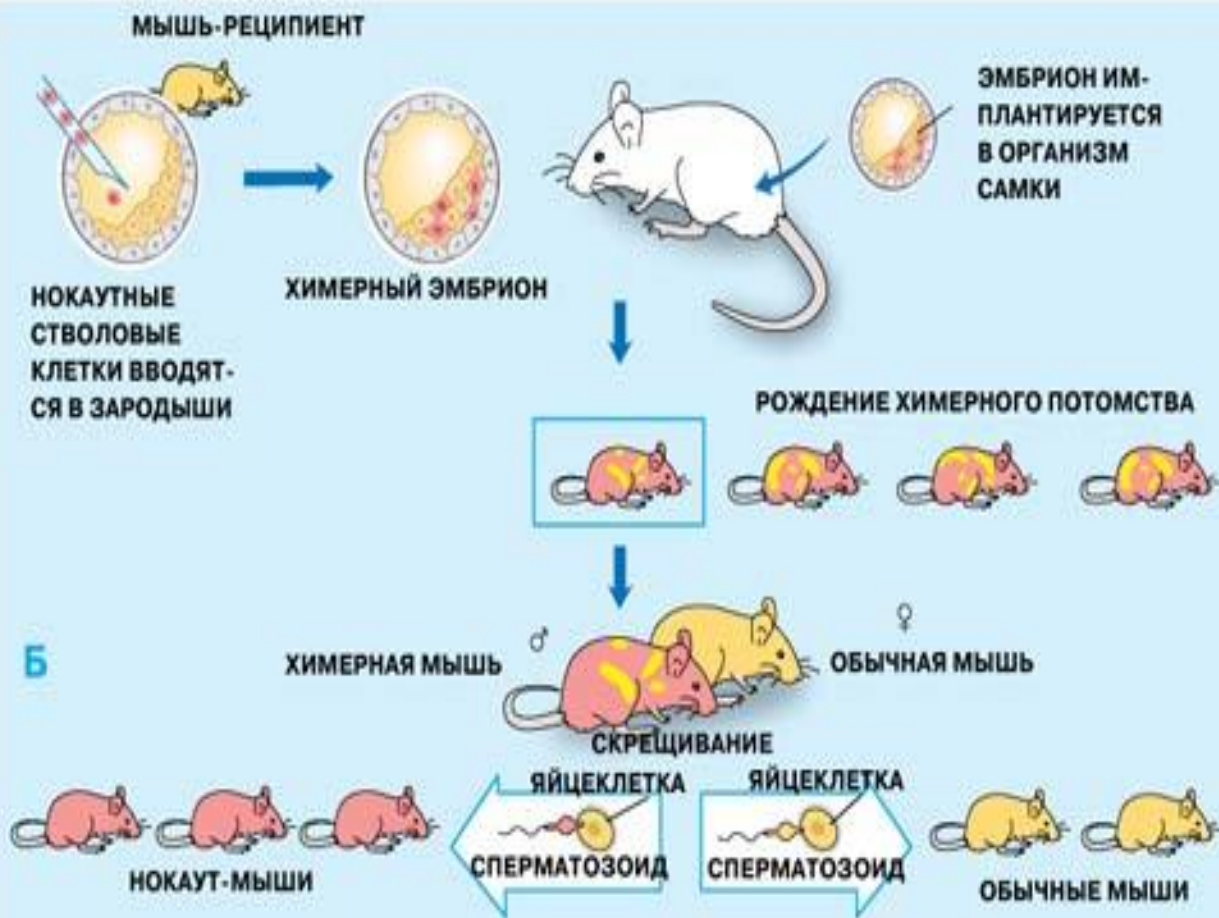
- Перспективным считают использование векторов на основе мобильных генетических элементов, которые встраиваются в геном с помощью фермента транспозазы
- В зиготу вводят модифицированный МЭ с геном транспозазы и трансгеном
- В результате реакции, катализируемой транспозазой, трансген встраивается в одно или несколько мест в геноме животного
- Эффективность интеграции трансгена в геном зависит от типа транспозона, длины трансгена и места встраивания ДНК
- Этот подход использовали для получения крупных сельскохозяйственных животных

# Получение генных нокаутов



1. В основе метода **гомологичная рекомбинация** геномной ДНК с искусственно синтезированным фрагментом ДНК с гомологией к участку одного из генов
2. Фрагменты ДНК вводят в клетки посредством электропорации
3. За счет рекомбинации введенная последовательность внедряется в хромосому на место нормальной

# КОМР: KnockOut Mouse Project

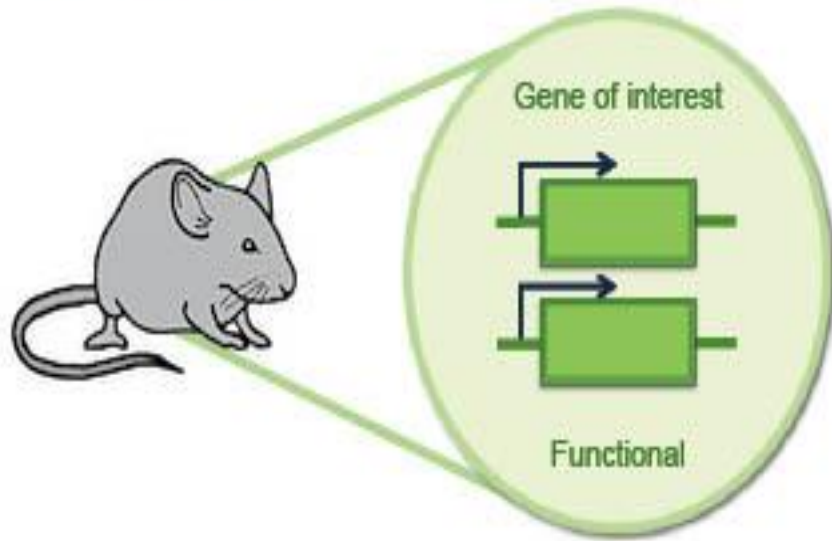


В 1989 г. получена первая нокаутная линия мышей.  
2007г. - Нобелевская премия присуждена за изобретение метода нокаута генов

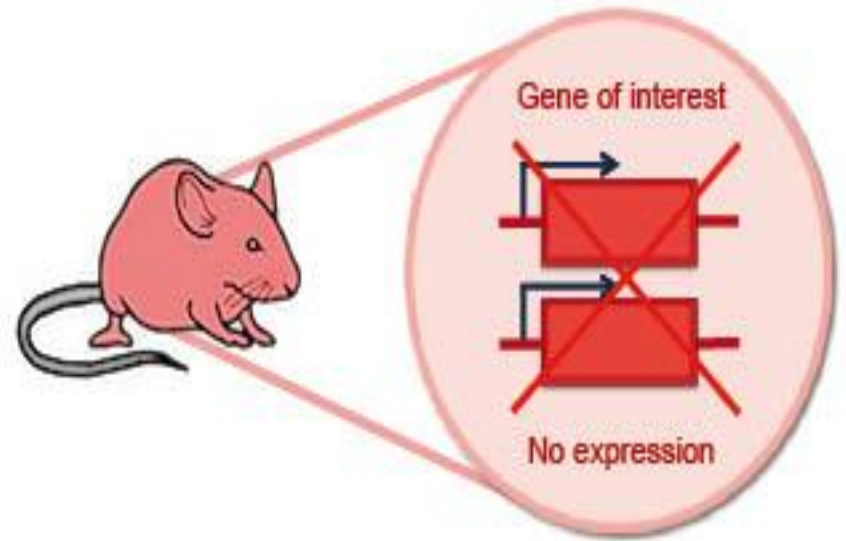
Метод позволяет получать линии нокаутных мышей с выключенным конкретным геном и исследовать роль этого гена в развитии организма в норме и патологии, изучать человеческие болезни, используя мышей в качестве модельных объектов. Выключенный ген приводит к тем или иным нарушениям. Характер нарушений позволяет судить о функциях гена.



## Wildtype Mouse



## Constitutive Knockout Mouse



- Последовательно нокаутируя различные гены мышиного генома исследователи выясняют функции каждого из них.
- Учитывая, что у человека и мыши многие гены сходны и выполняют одни и те же функции, нокаутные мыши предоставляют богатый материал для изучения роли генов в нормальном развитии и жизни человеческого организма и в патологических процессах
- Благодаря методу нокаута генов удастся изучить свойства всех генов мышиного генома

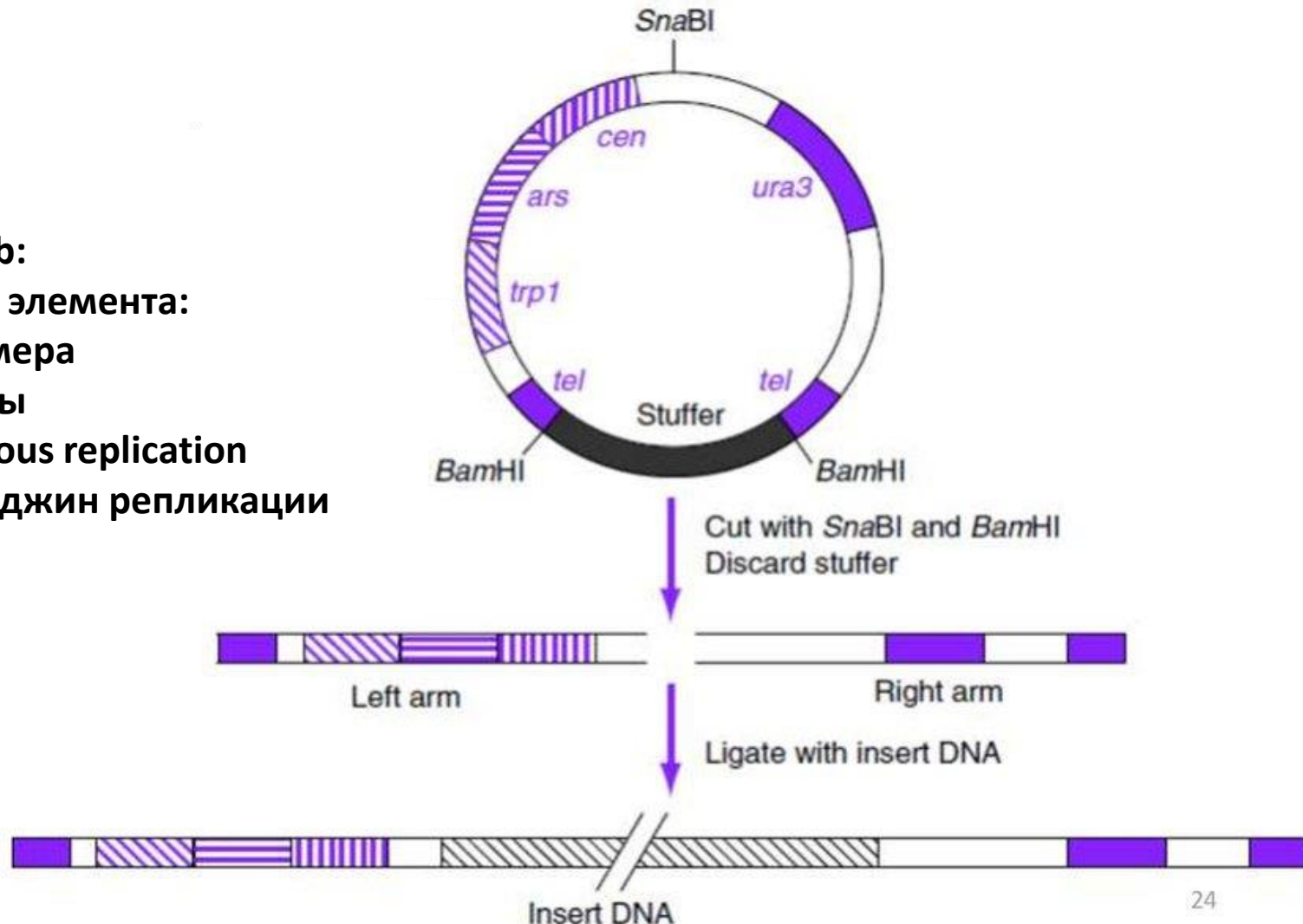
# Вектор – искусственная хромосома дрожжей

YAC (Yeast Artificial Chromosome) – кольцевая молекула ДНК, существующая во внехромосомном состоянии в клетках дрожжей

Емкость до 2 Мб:

3 необходимых элемента:

- CEN – центромера
- TEL – теломеры
- ARS (autonomous replication sequence) – ориджин репликации



# Перенос генов с помощью искусственных дрожжевых хромосом

## Встраивают в YAC для переноса:

- 1) полноразмерные гены, включая регуляторные последовательности до- и после гена-мишени
- 2) мультигенные комплексы

## Способ введения:

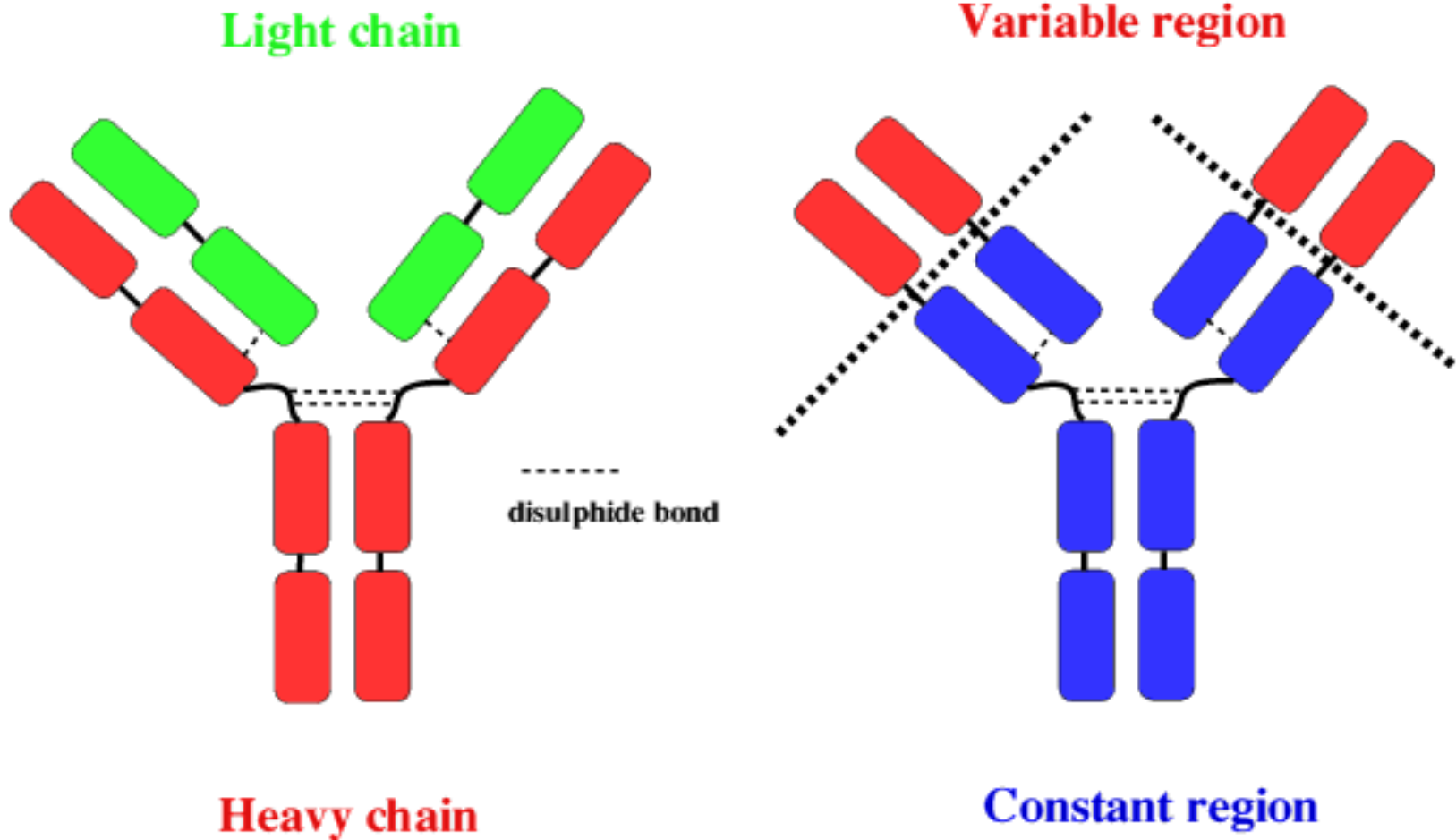
- 1) микроинъекция в оплодотворенные яйцеклетки
- 2) трансфекция ES-клеток с помощью YAC

Результат: с помощью такой трансгенной системы добиваются получения аутентичных человеческих белков, которые не вызывают иммунную реакцию

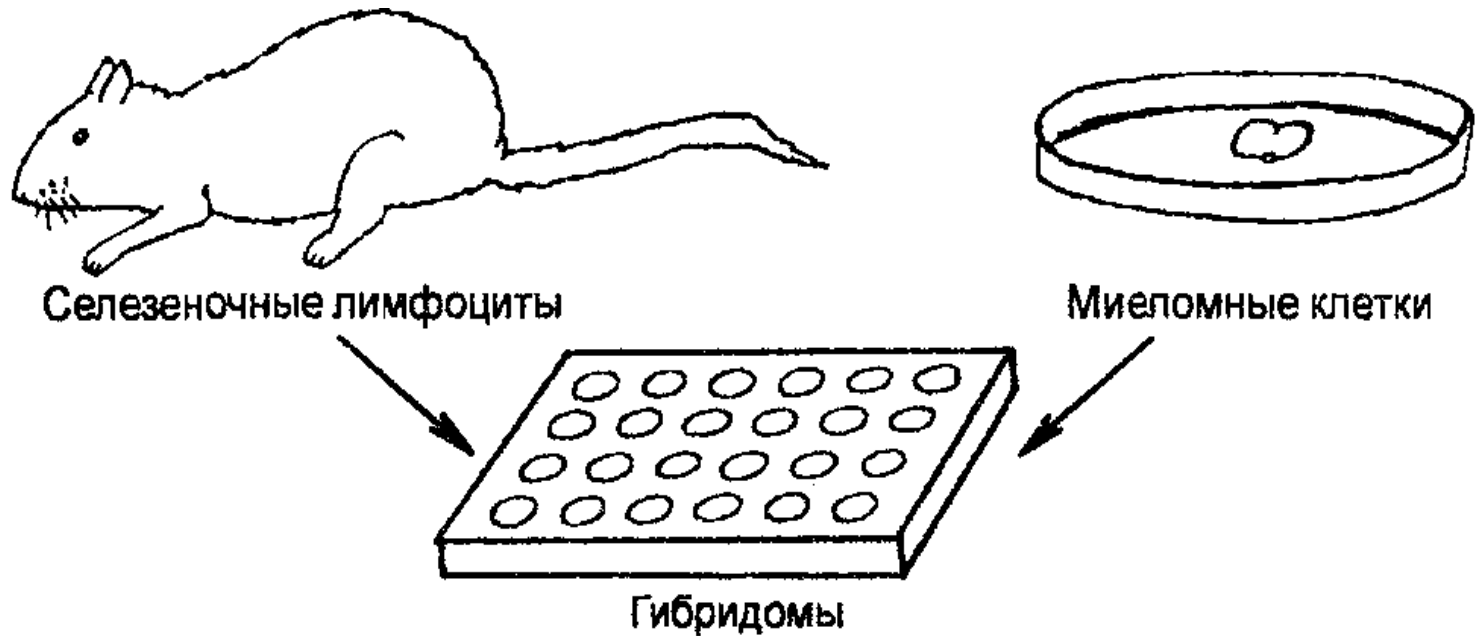
# Применение

- **Получены трансгенные мыши**, несущие кластер из 5 функциональных генов  **$\beta$ -глобина человека**, длина участка - 250 кб, экспрессия происходила тканеспецифично и в нужное время, также как у человека
- **УАС используют для получение человеческих антител** – емкость хромосомы позволяет существенно увеличить число переменных участков H- и L-цепей иммуноглобина человека и расширить разнообразие продуцируемых трансгенными мышами антител

# Basic structure of an Antibody

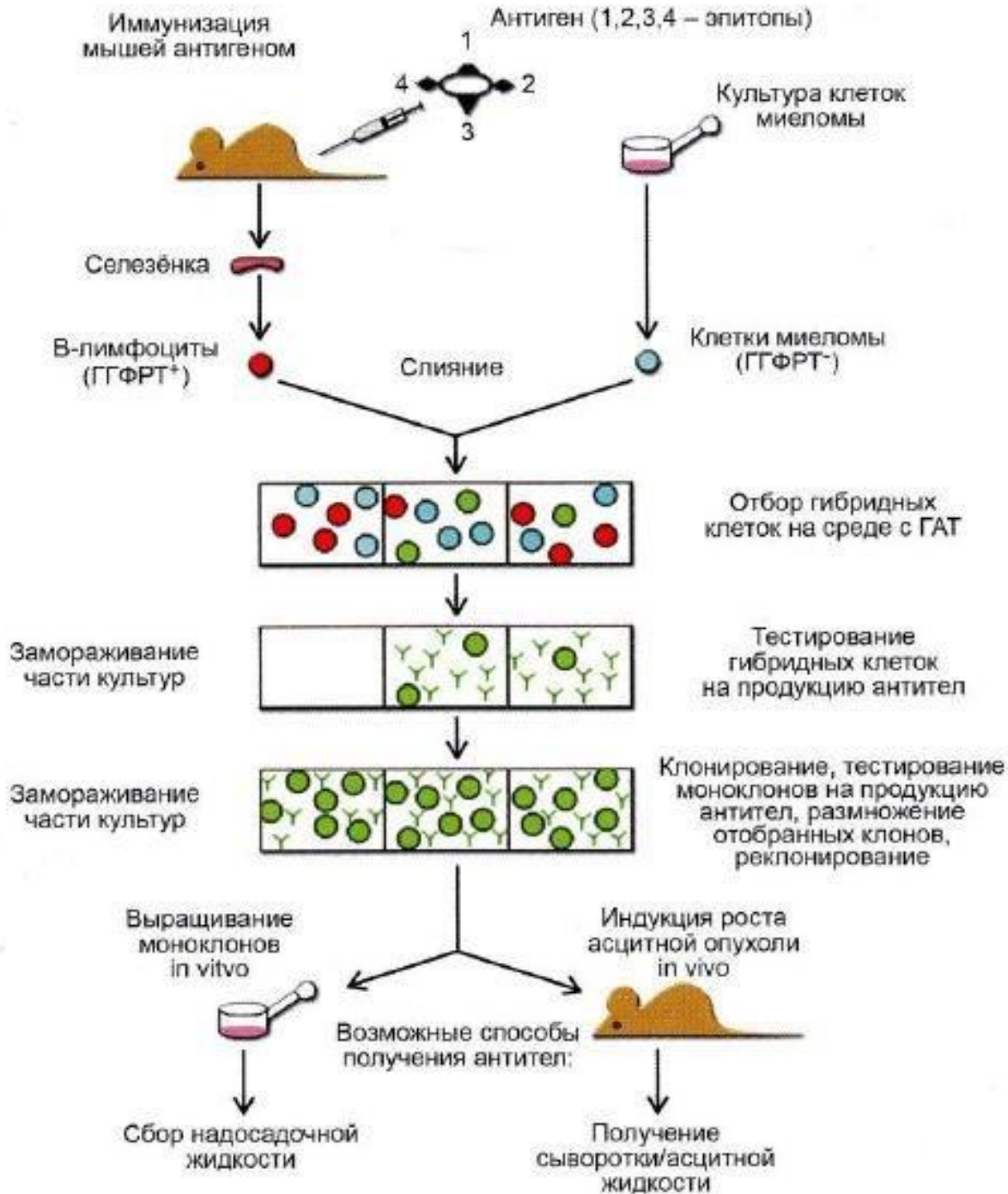


- Разнообразие человеческих антител, продуцируемых трансгенными мышами, невелико из-за ограниченного набора вариабельных сегментов H- и L- цепей
- Проблему решают созданием YAC с большим набором генов вариабельных участков H- и L- цепей гемоглобина человека



- **Гибридомы** - это гибриды между лимфоцитами мышей, иммунизированными антигеном, и опухолевыми клетками костного мозга
- От лимфоцита гибридома наследует способность к образованию антител, от миеломных клеток - способность размножаться на искусственных питательных средах и давать многочисленную популяцию гибридом.

# ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ

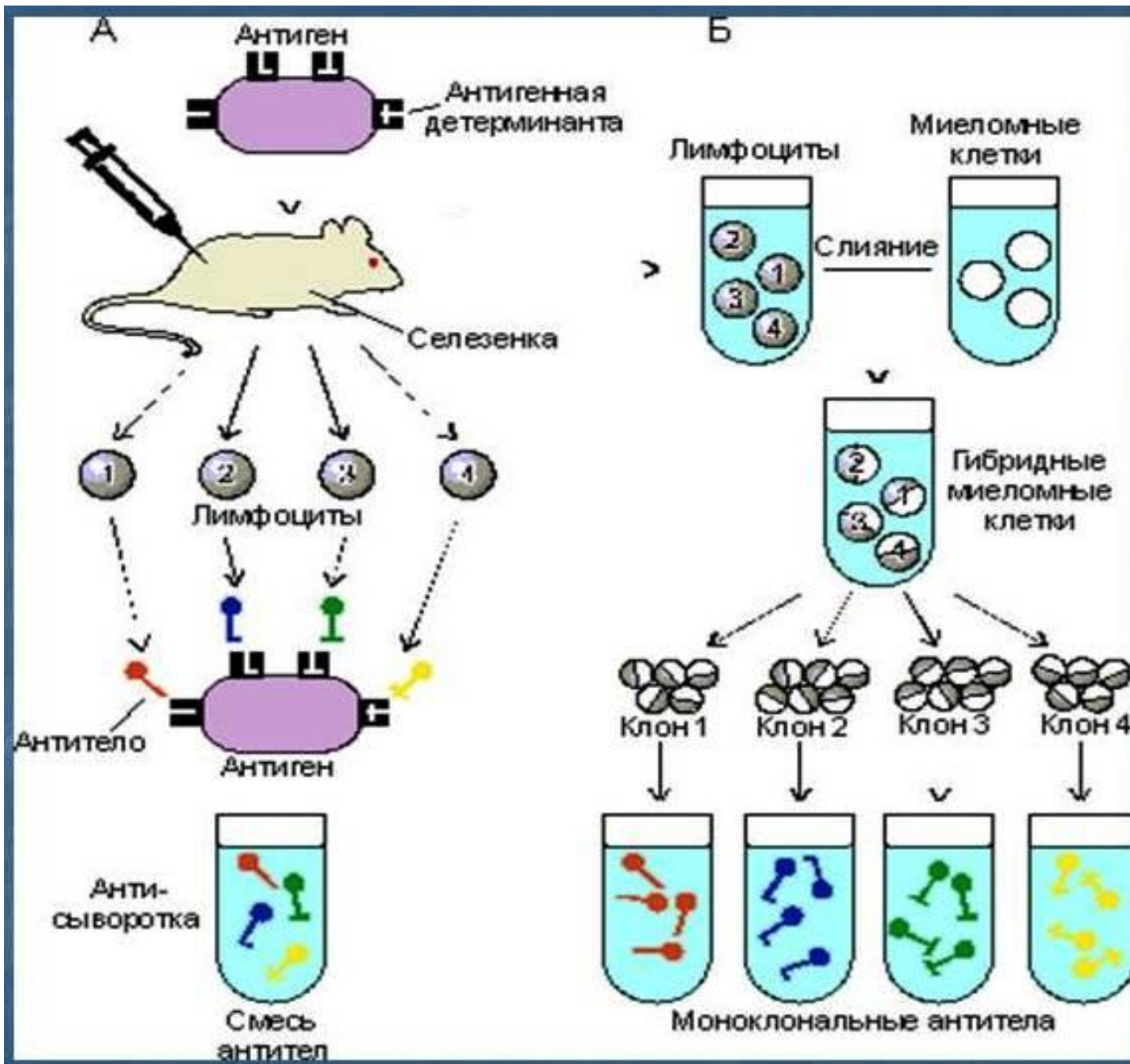


- Выбор партнеров для гибридизации
- Слияние в присутствии полиэтиленгликоля
- Селективный отбор
- Тестирование гибридных клеток на специфические антитела
- Получение антител:
  - 1) выращивание МАТ in vitro
  - 2) индукция роста in vivo

# Получение гибридом

- За выбором партнеров гибридизации следует этап слияния опухолевых клеток и лимфоцитов для получения гибридом в присутствии полиэтиленгликоля или агентов, способствующих слиянию (вирус Сендай, электрическое поле).
- После слияния клетки помещают в селективную среду, содержащую маркер, в которой опухолевые клетки без маркера погибают. Лимфоциты, имеющие маркер, но не способные к длительному культивированию *in vitro* также погибают.
- Выживают гибридные клетки, имеющие маркер и способные к длительному культивированию *in vitro*.
- Тестирование гибридом на выработку специфических антител, отбор моноклонов и их выращивание.
- Моноклоны тиражируют в массовой культуре или гибридомы переводят в брюшную полость реципиента с целью накопления асцита как источника антител.





На одну антигенную детерминанту реагируют до 100 различных клонов В-лимфоцитов, незначительно различающихся антигенной специфичностью рецепторов. В результате иммунизации антигеном получают *поликлональные* антитела.

# Применение гибридом

## Области применения моноклональных антител:

- с диагностической целью: определение экспрессии различных молекул
- блокада рецепторов
- инактивация и лизис клеток (лечение онкологических и аутоиммунных заболеваний)

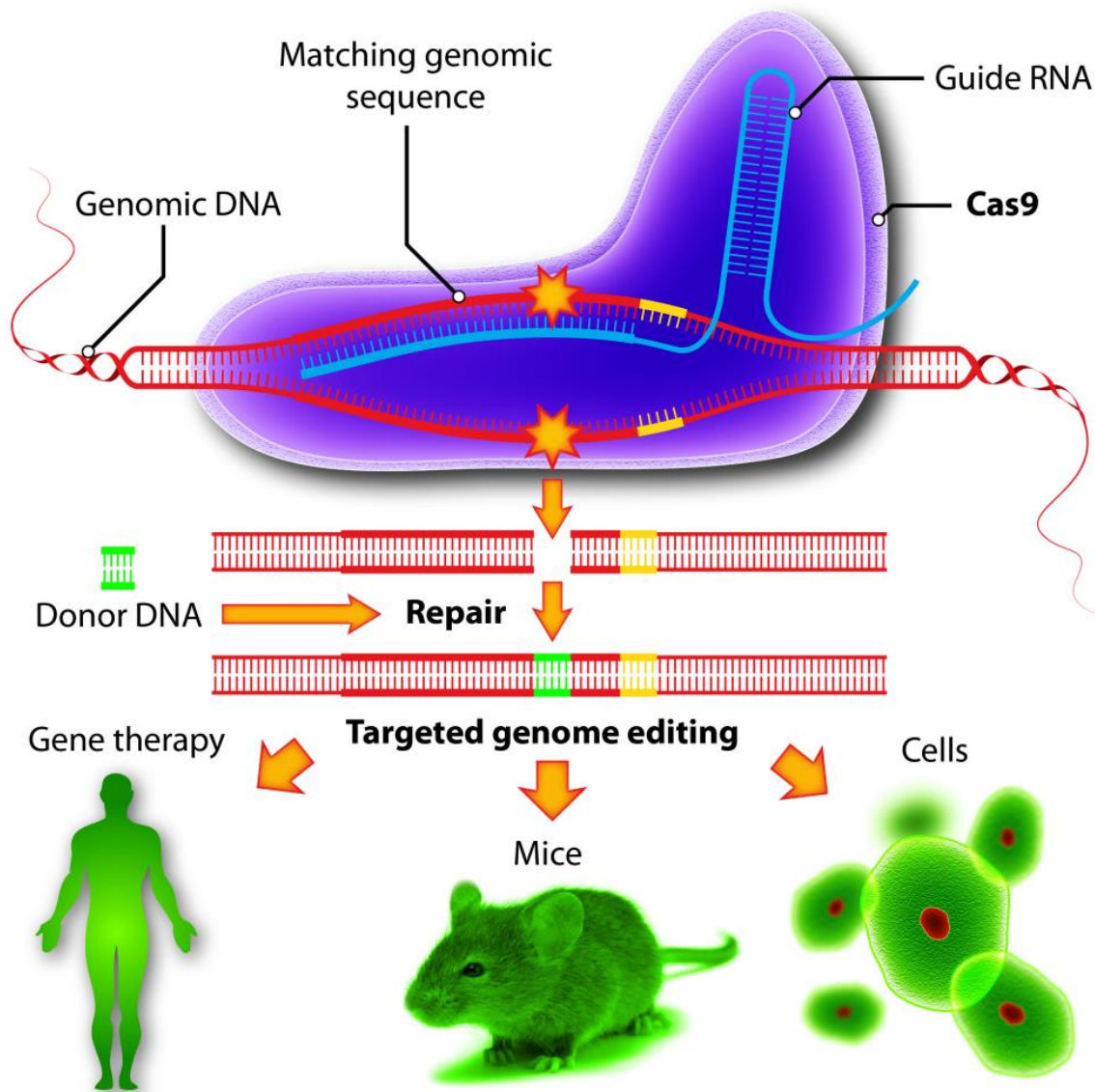
# Абзимы

- Перспективное направление в создании новых препаратов на основе моноклональных антител — каталитические антитела абзимы.
- Абзимы - это молекулы, обладающие свойствами антител (могут связываться с определенными эпитопами) и биологических катализаторов различных химических реакций

## Области применения абзимов:

- Диагностика аутоиммунных заболеваний (анти-ДНК аутоантитела с каталитической активностью)
- Лечение аутоиммунных заболеваний
- Лечение инфекционных заболеваний (создание абзимов, направленных на специфический катализ инфекционных агентов).

# Принцип использования CRISPR-Cas9



Применяют систему CRISPR-Cas9. Доставку sgРНК и Cas9 в клетки-мишени осуществляют с помощью плазмиды, кодирующей sgРНК и Cas9, и трансфицируют клетки при помощи электропорации. Также используют плазмиды, кодирующие Cas9, а РНК доставляют в виде наработанных с помощью ПЦР ампликонов