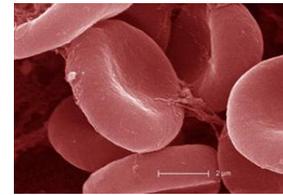


Лаборатория Цитометрии и
Биокинетики, ИХКГ СО РАН

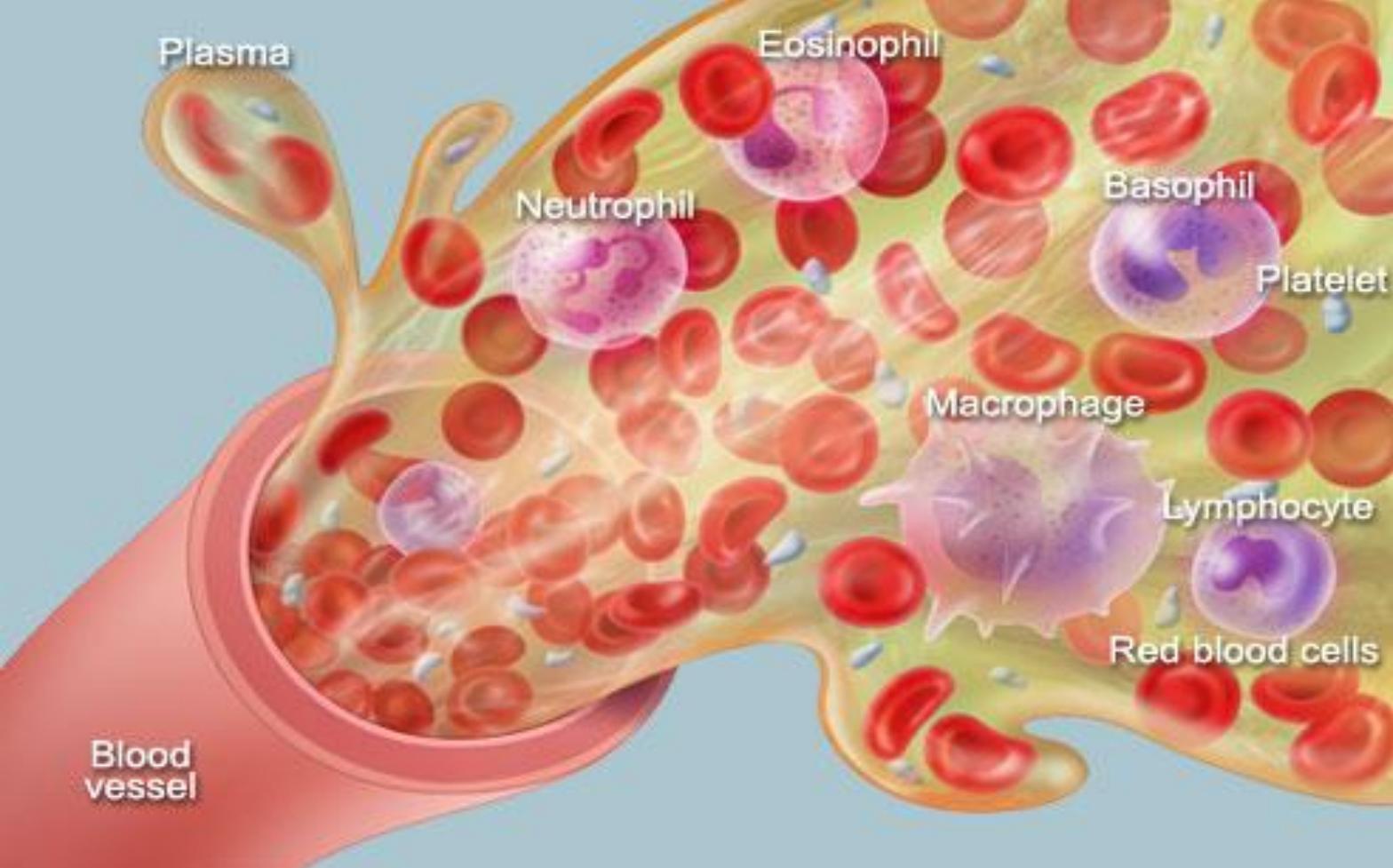


Современные направления исследований

Ястребова Екатерина

Содержание лекции

1. Исследование клеток крови в лаборатории ЦИБ
2. Современные трудности в мировой диагностике клеток крови
3. Анализ одиночных клеточных сигналов
4. Другие актуальные биомедицинские исследования

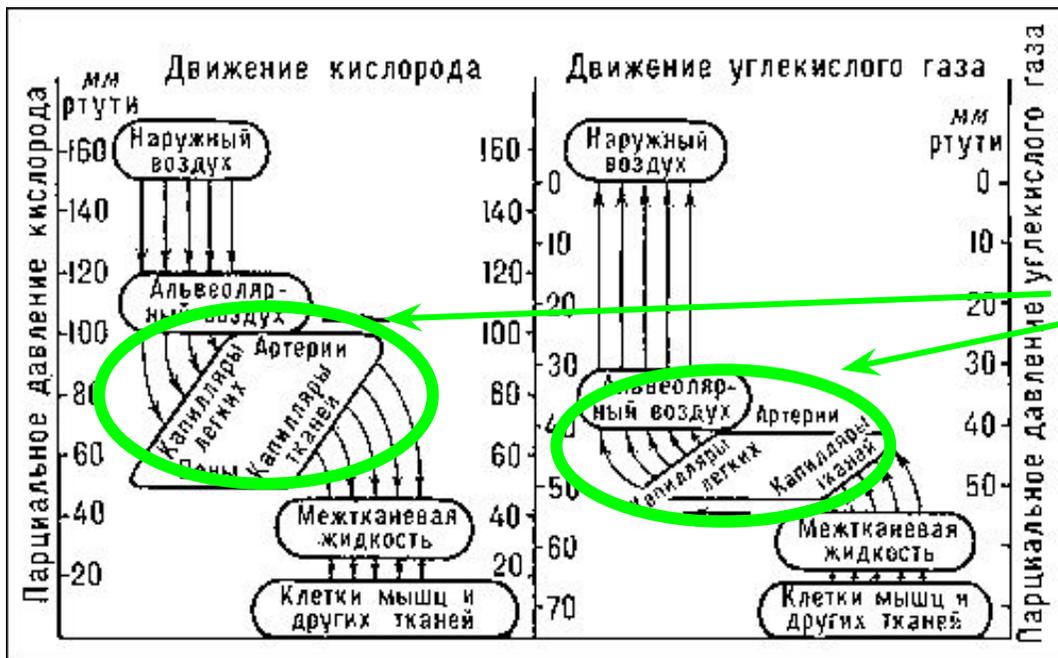


«...blood is the essence of life possessing mysterious properties that provided sustenance for human survival»*

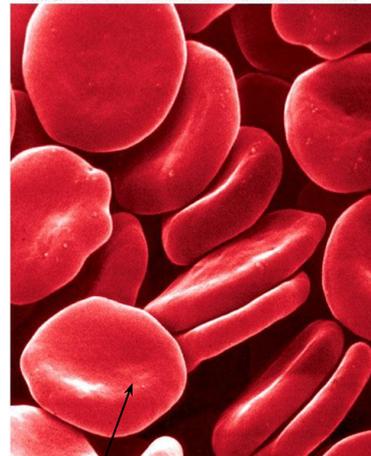
* Green, 2015

1. Функциональные характеристики эритроцитов

CO₂/O₂ обмен в организме



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Эритроциты

Характеристики эритроцитов, отвечающие за CO_2/O_2 обмен в организме

— **Анионная проницаемость мембраны эритроцита**

Chernyshev A.V. et al. Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification // J. Theor. Biol. 2008. Vol. 251, № 1. P. 93–107

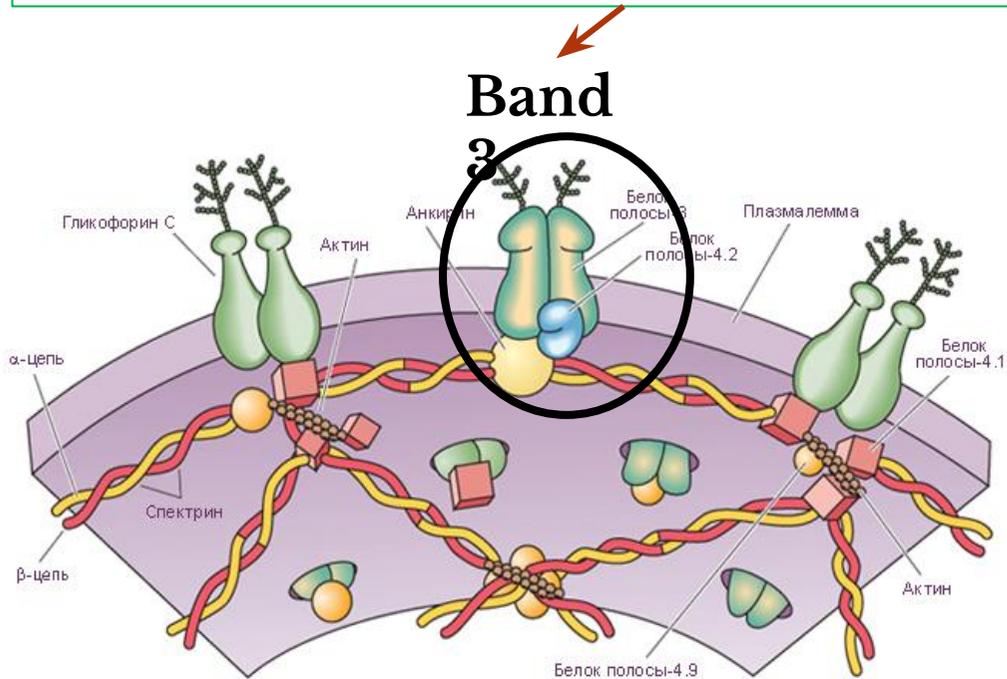
— **Форма эритроцита**

Wang C-H, Popel AS. Effect of red blood cell shape on oxygen transport in capillaries. Mathematical Biosciences 1993;116:89-110

— **Эластичность мембраны эритроцита**

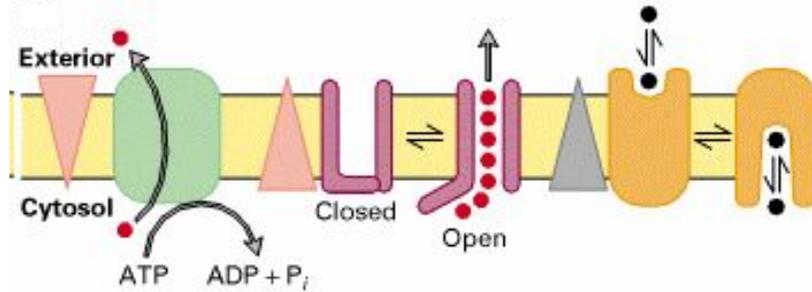
Božič B, Gomišček G. Role of red blood cell elastic properties in capillary occlusions. Phys Rev E 2012;86:051902

Трансмембранный эритроцитарный белок полосы 3 как участник кислородного обмена



Существует ли способ изменения работы белка полосы 3 (Band 3)?

Временные масштабы динамики эритроцита



Акваторины

H_2O , CO_2 , O_2 ,
 NH_3

Анионные обменники

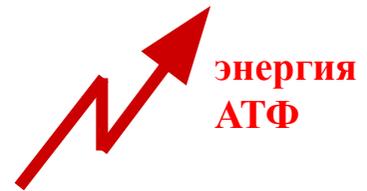
Cl^- , OH^- , HCO_3^-

Катионные насосы

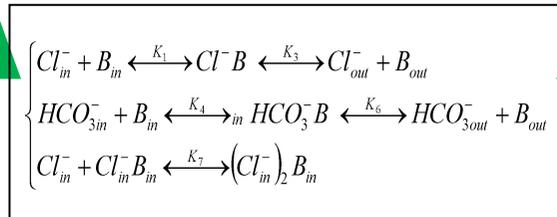
Na^+ , K^+ , Ca^{+2}

0.1 1 10 100 1000 10000

Время, сек.



+ кинетика реакций:
гидратации CO_2 ,
диссоциации, ...



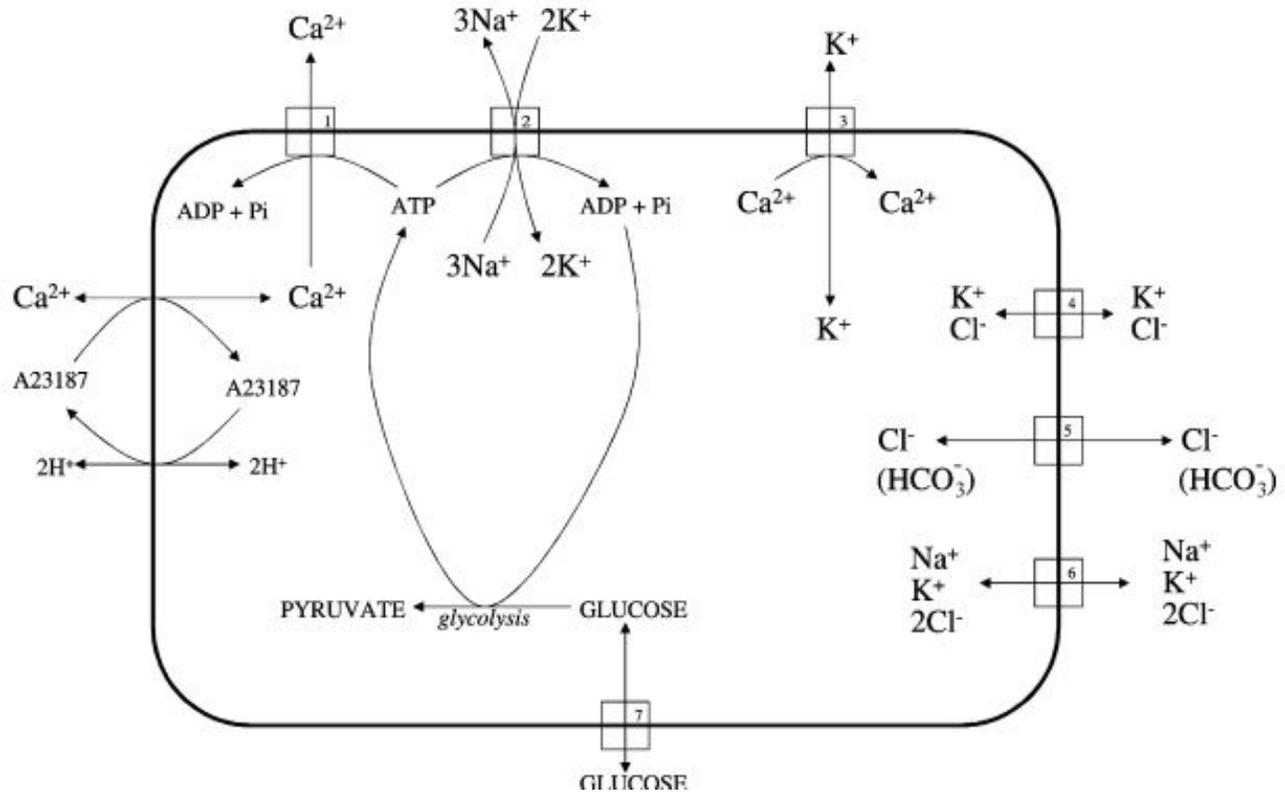
+ кинетика гликолиза
и др. ферментативных
реакций

В.О. Palsson

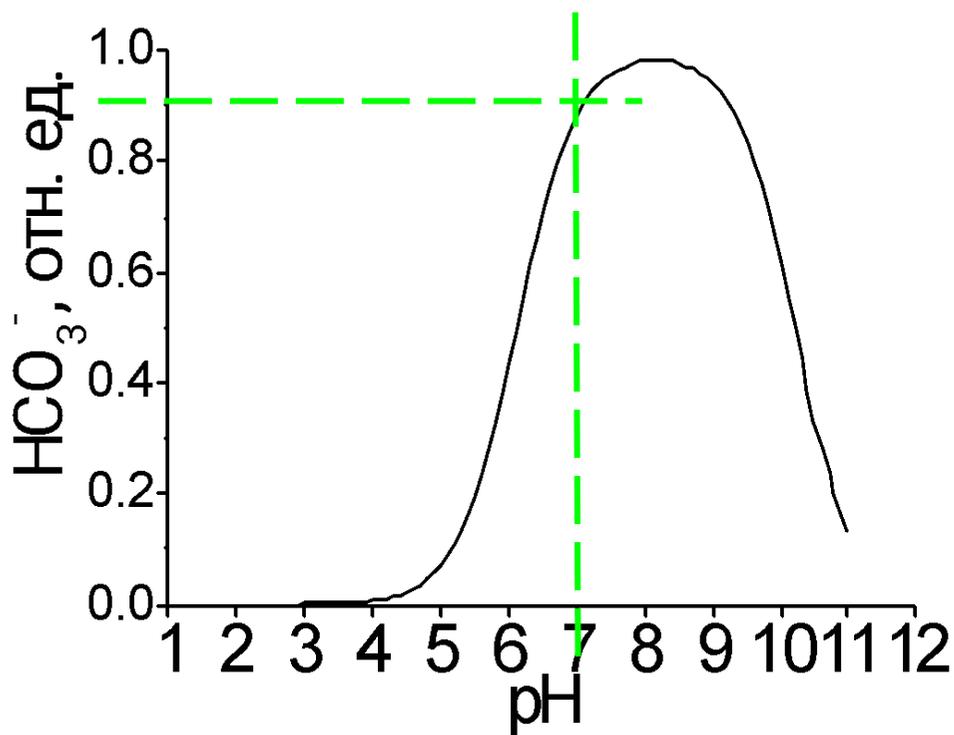
1990

Ионные каналы эритроцита

A.D. Maher, P.W. Kuchel / *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (2003) 1182–1197

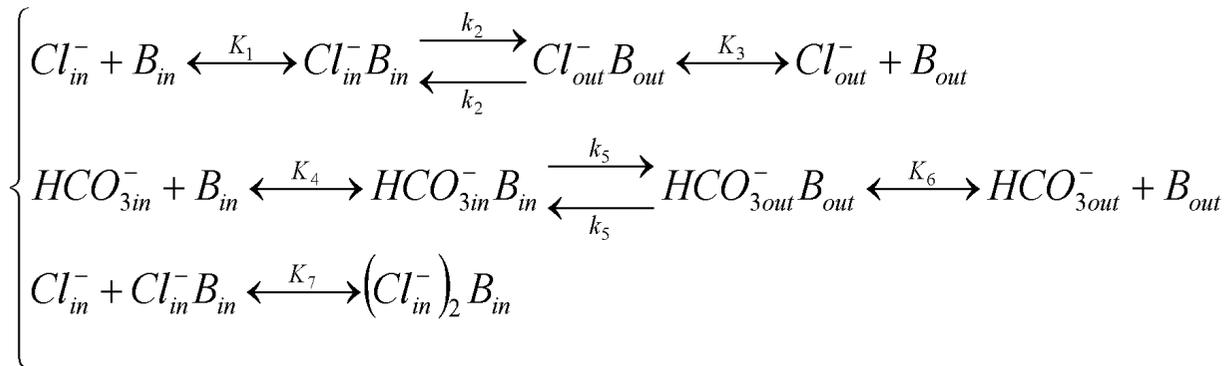


Растворенный CO_2 находится в HCO_3^-



Динамика ионного транспорта

Пинг-понг механизм работы белка Band 3



Осмотический баланс

Сохранение (нулевого) полного заряда

Осмотический лизис эритроцитов в растворе NH_4Cl

Составные части общей модели:

Осмотические и
буферные
свойства эритроцита

V, Hb, δ_c

+

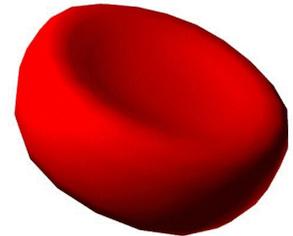
Мембранный
транспорт

Количество белка полосы 3, В

+

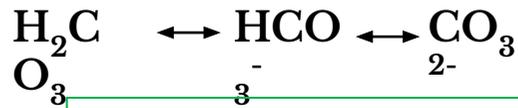
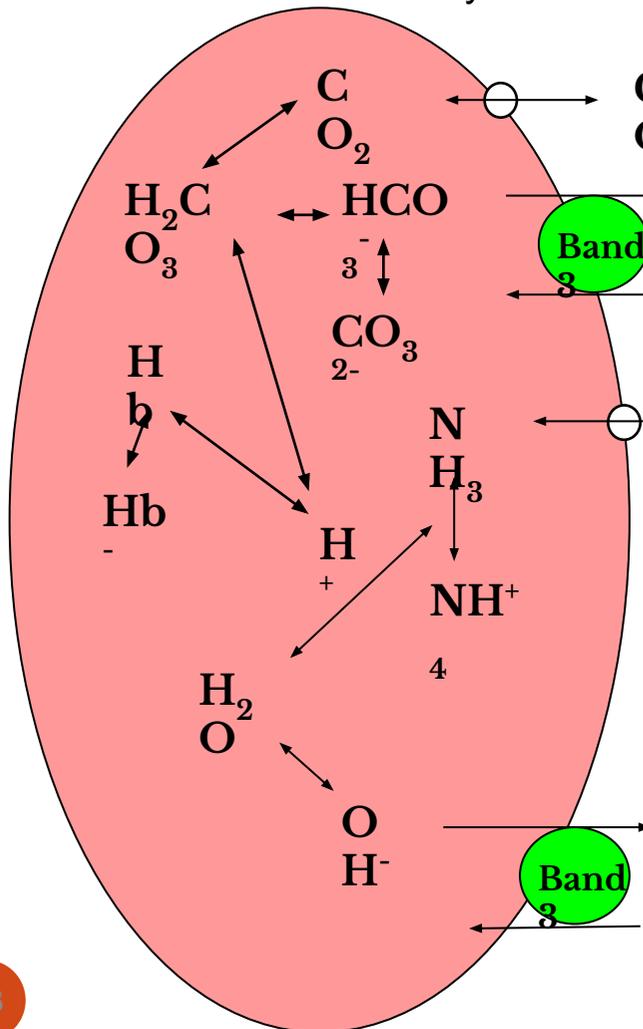
Динамика разрушения мембраны
при ее растяжении

Отношение динамической
прочности к упругости
эритроцитарной мембраны, $\frac{\sigma_\beta}{K_s}$



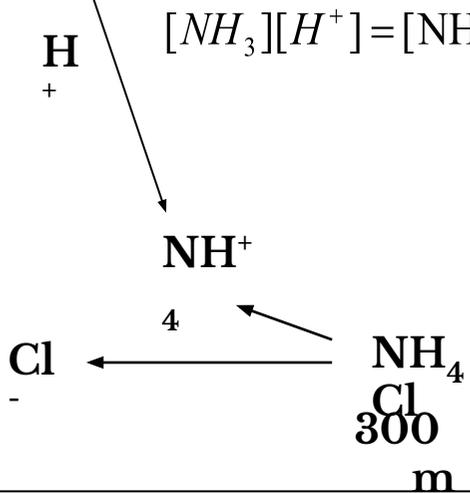
Измерение cdV3 методом гемолиза

Jacobs-Stewart cycle



Chernyshev A.V. et al.
 Erythrocyte lysis in isotonic
 solution of ammonium chloride:
 Theoretical modeling and
 experimental verification // J.
 Theor. Biol. 2008. Vol. 251, № 1.
 P. 93–107

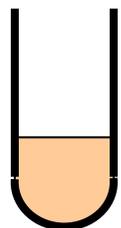
$$[\text{NH}_3][\text{H}^+] = [\text{NH}_4^+] \cdot 10^{-9.25}$$



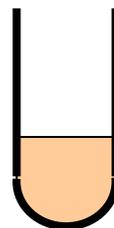
Эксперимент *in vitro*



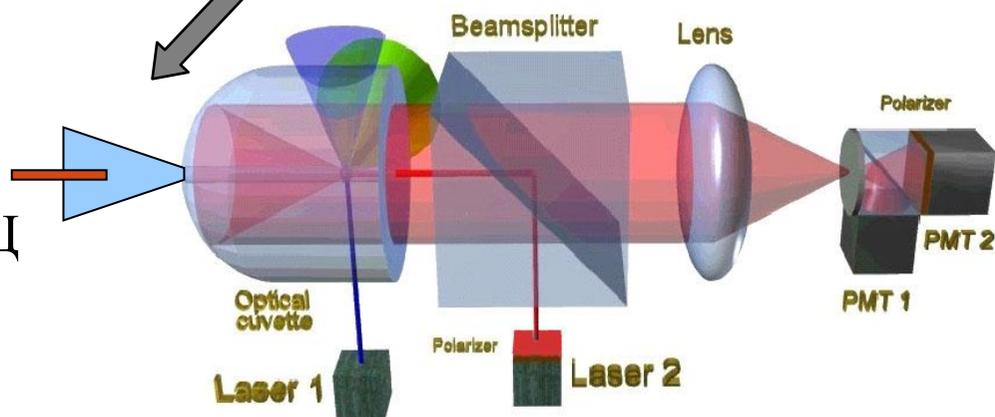
Изотонический
водный р-р NH_4Cl



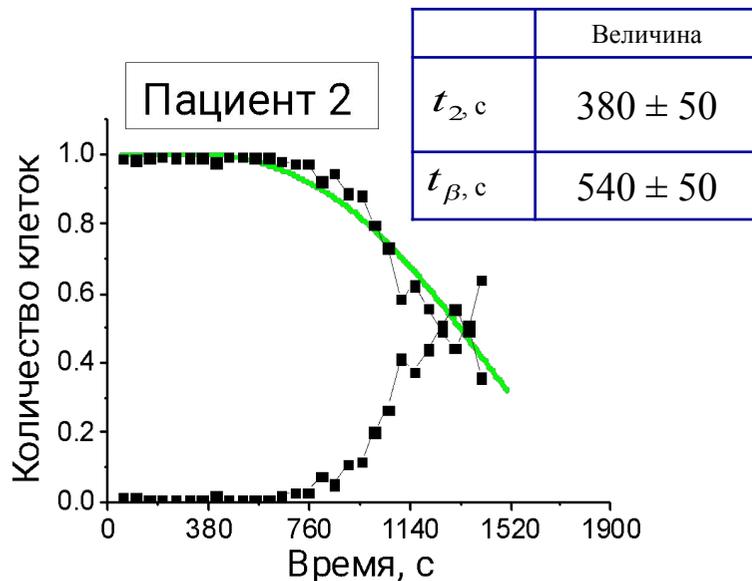
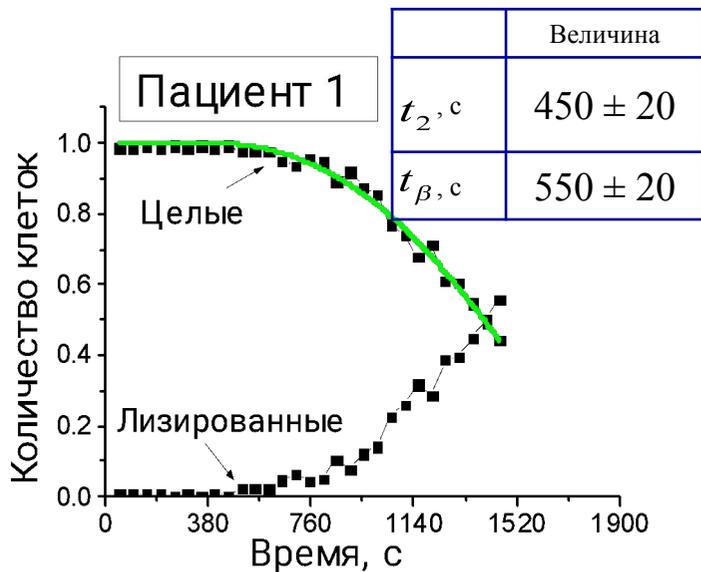
Изотонический
водный р-р NaCl



измерение на СПЦ



Динамика лизиса эритроцитов



$$N(t) = \exp \left[-\frac{t}{t_0} \left(\frac{t}{t_0} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left((t-t_0)/t_{\beta} \right) + \operatorname{Erfi} \left(\frac{t-t_0}{t_{\beta}} \right)^{\frac{1}{2}} \right]$$

Chernyshev A. V. et al. Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification // J. Theor. Biol. 2008. Vol. 251, № 1. P. 93–107

Скорость CO₂ / O₂ обмена

$$\frac{dP}{dt} = \frac{SBK_1}{K + S}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{SBK_2}{K + S}$$

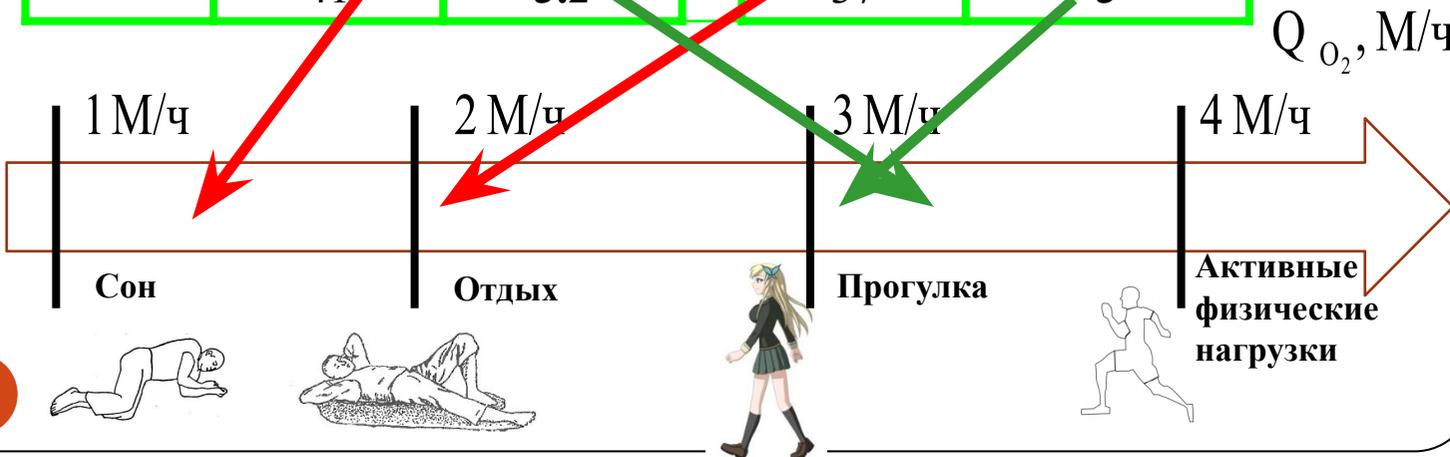
$$Q_{CO_2} = \frac{K_1 [B] [HCO_3^-]}{K + [HCO_3^-]}$$

$K_1 = 8 \cdot 10^3$ ионы/с/переносчик

$K_2 = 8 \cdot 10^4$ ионы/с/переносчик

$K = 50$ mM

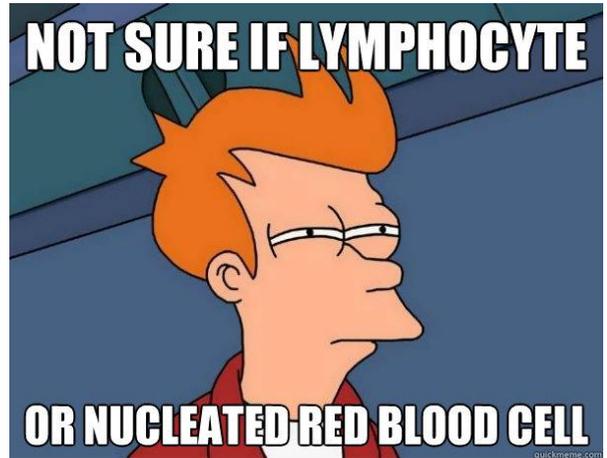
	Пациент 1	Скорость обмена		Пациент 2	Скорость обмена
	Nb3, μM	CO ₂ , M/ч		Nb3, μM	CO ₂ , M/ч
День 1	18	1.4		25	2
День 2	38	3		28	2.2
День 3	28	2.2		29	2.3
День 4	41	3.2		37	3



2. Современные трудности в мировой диагностике клеток крови

Относительно новые характеристики для общего анализа крови

- Ядерные эритроциты (NRBC);
- Незрелые гранулоциты (IG);
- Незрелые ретикулоциты (IRF);
- Незрелые тромбоциты (IPF);
- Шизоциты (FRC) (Only for research laboratory use)



Кто следит за мировыми стандартами

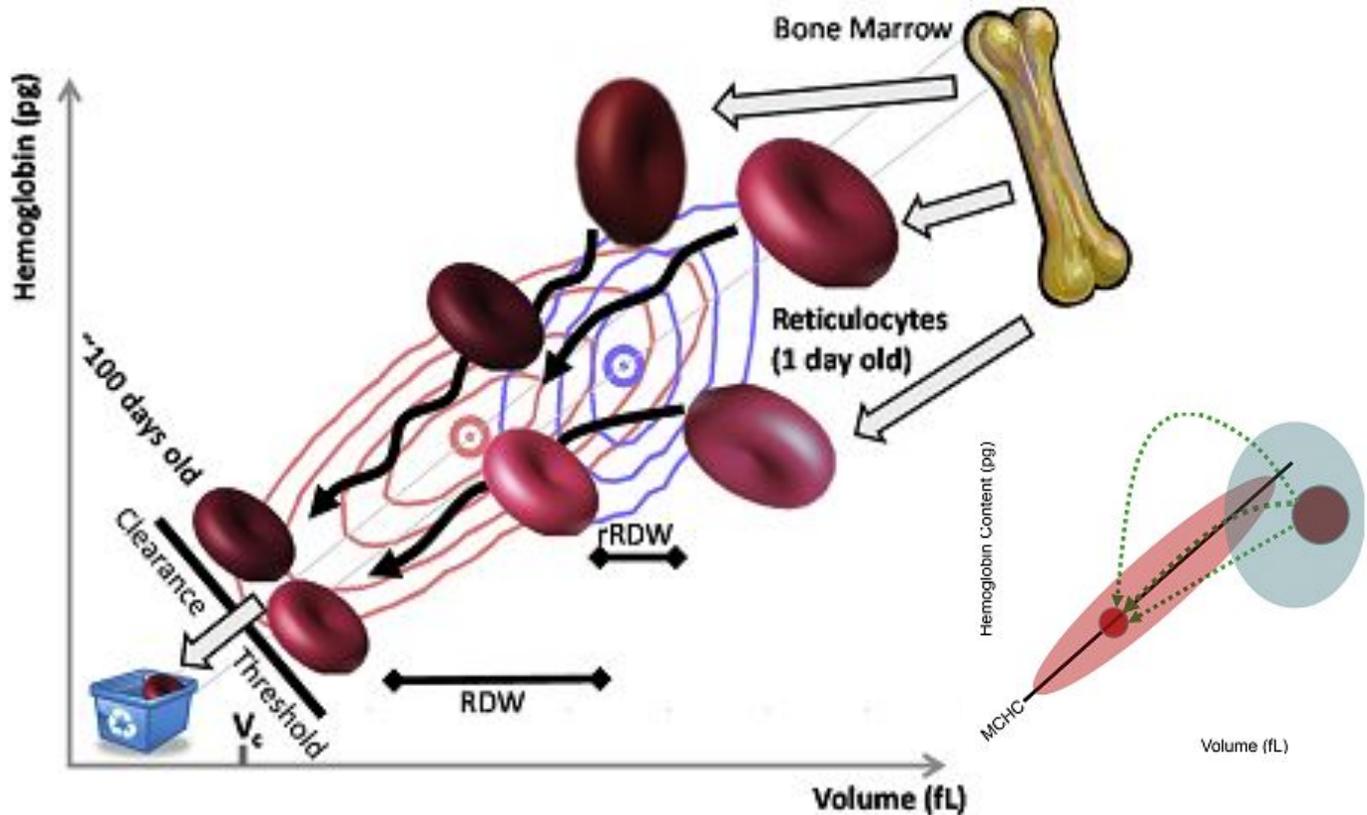
«In addition to validation and verification, standardization play an important role in CBC parameters»*

— Clinical and Laboratory Standards Institute
(CLSI, 1968)

— International Committee for Standardization in Hematology
(ICSH, 1992)

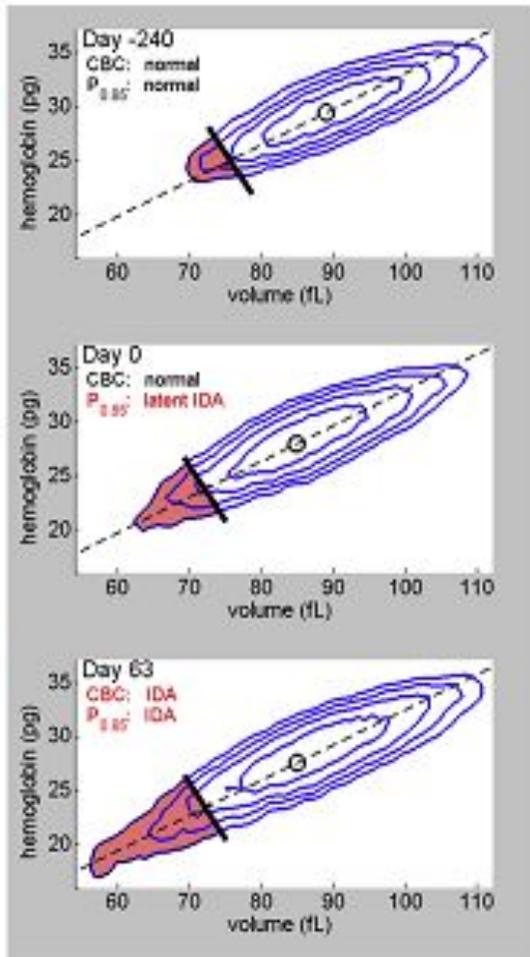
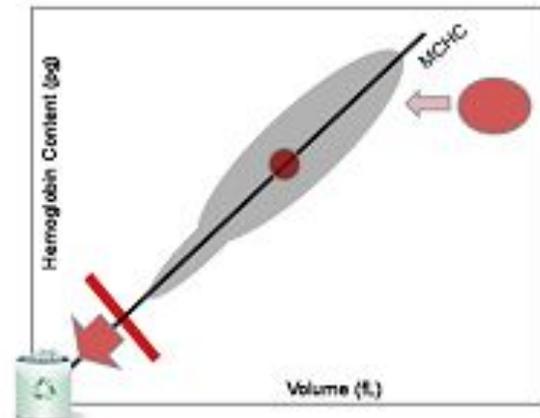
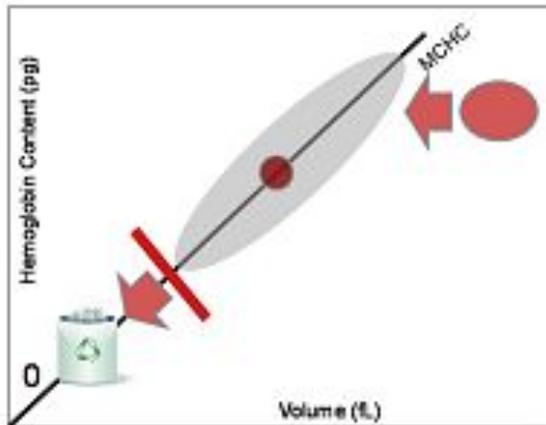
* Verbrugge, 2015

Nucleated Red blood cells



John M. Higgins, Red Blood Cell Population Dynamics, Automated Hematology Analyzers: State of the Art, 2015.

Nucleated Red blood cells



Nucleated Red blood cells

Abbott Sapphire (Abbott Park, IL, USA)

Lysis and Dye

Horiba Medical (Montpellier, France) Pentra DX120 analyser

Volume and Different FLuo

Beckman Coulter instruments (Hialeah, FL, USA)

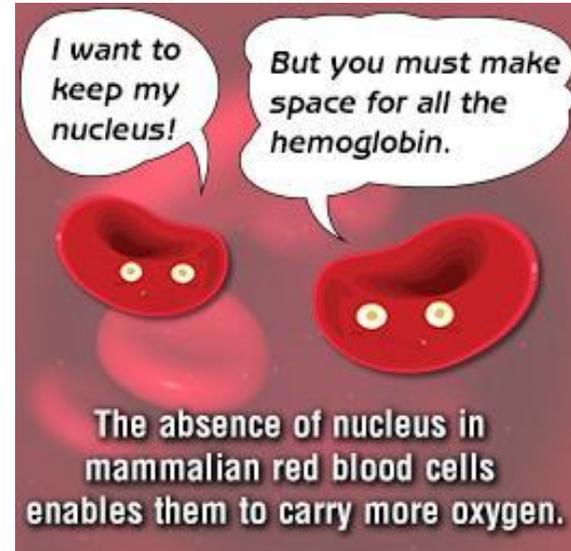
Volume threshold

Siemens Diagnostics, Tarrytown, NY, USA

Separation from Basophil/Peroxidase channel

Sysmex XE-2100 (Kobe, Japan) analyser

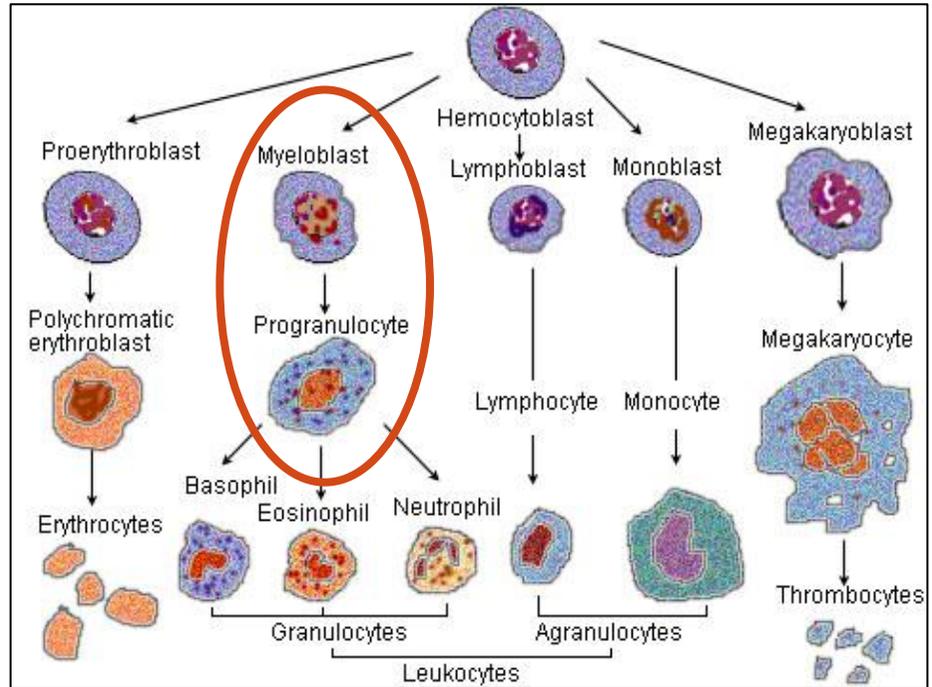
Lysis and Dye



IMMATURE GRANULOCYTES

Horiba Medical
Pentra DX120

Sysmex XE-2100 IG
Lysis and Dye



IMMATURE RETICULOCYTE FRACTION

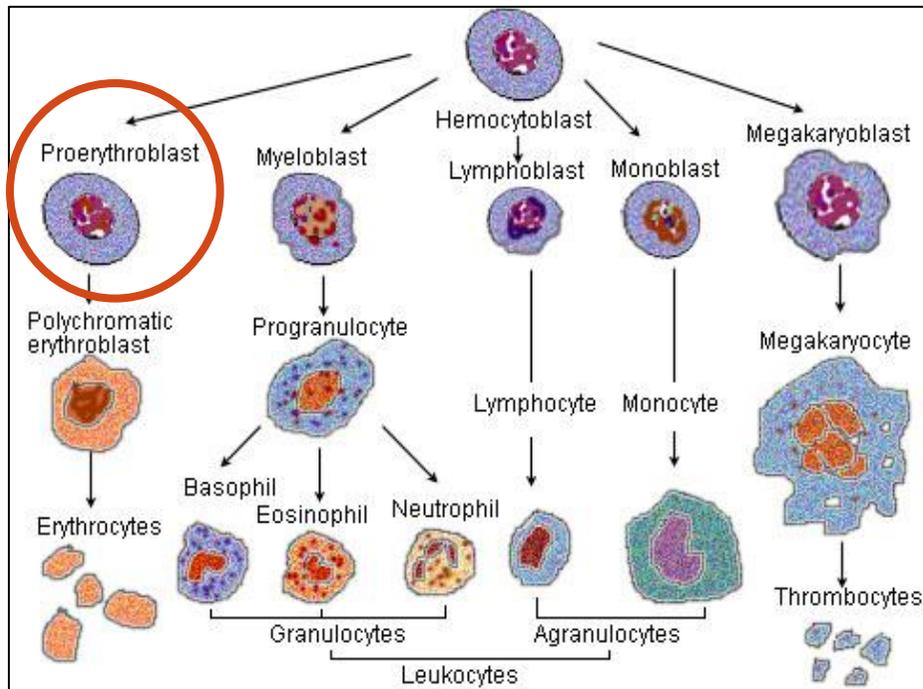
Abbott

Horiba Medical Pentra

Beckman Coulter

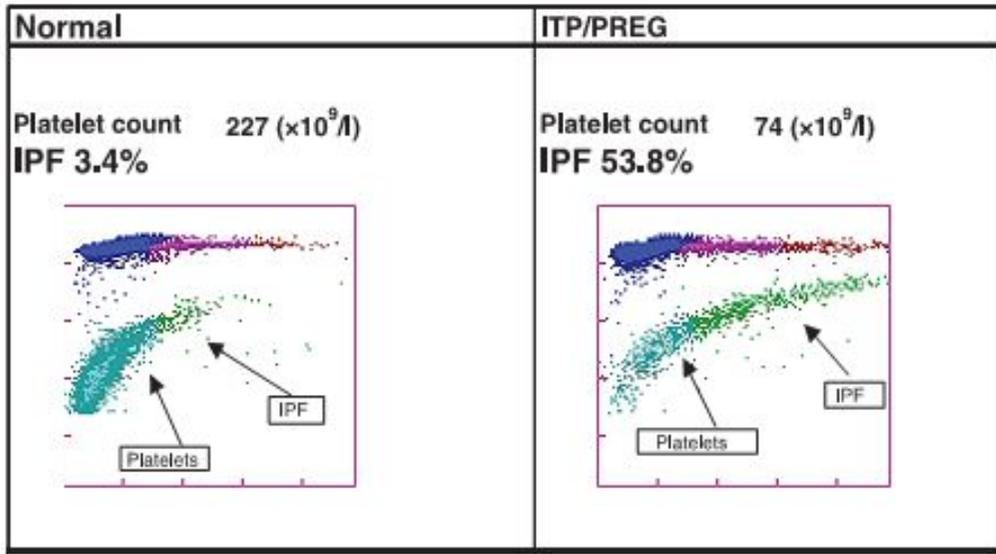
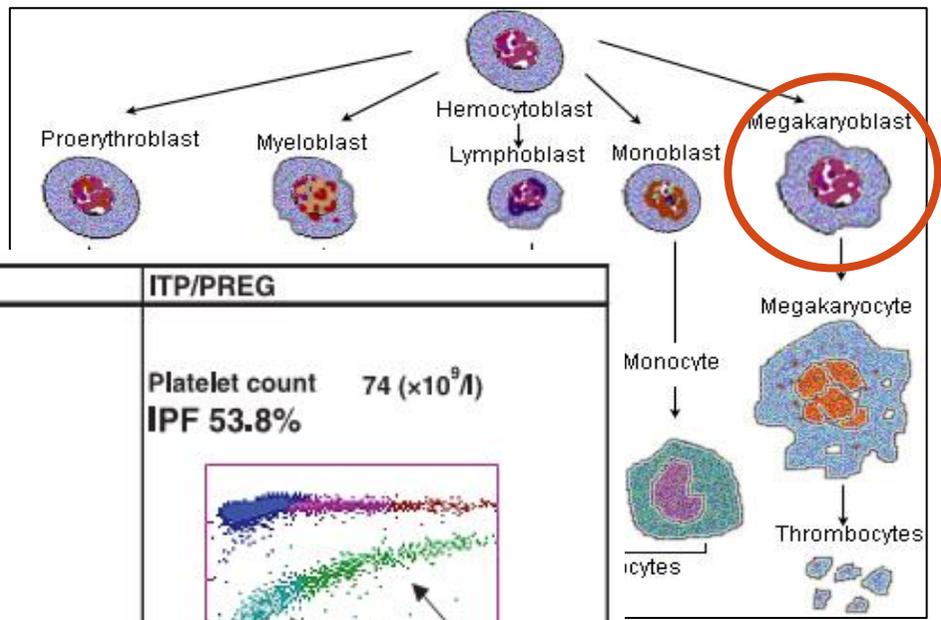
Siemens

Fluorescence



THE IMMATURE PLATELET FRACTION

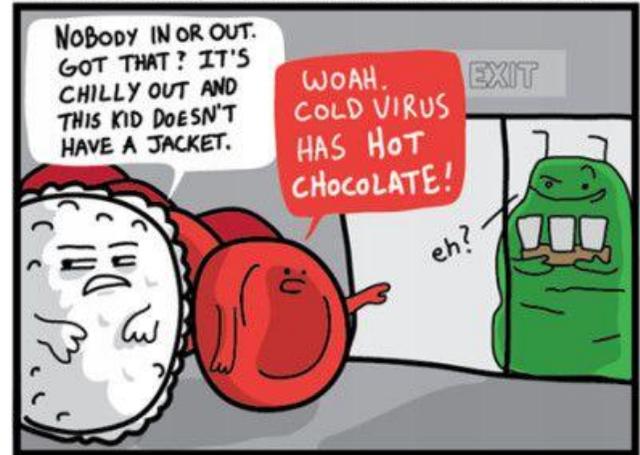
Sysmex
XE-2100
and XE-5000



Чего ждет мир от гематологических анализаторов

1. Стандартизированных параметров, что приведет к исключению влияния на результат марки используемого прибора;
2. Требуется создать прибор способный детектировать редкие события, а также микрочастицы крови.

WHITE BLOOD CELL VS. THE COMMON COLD

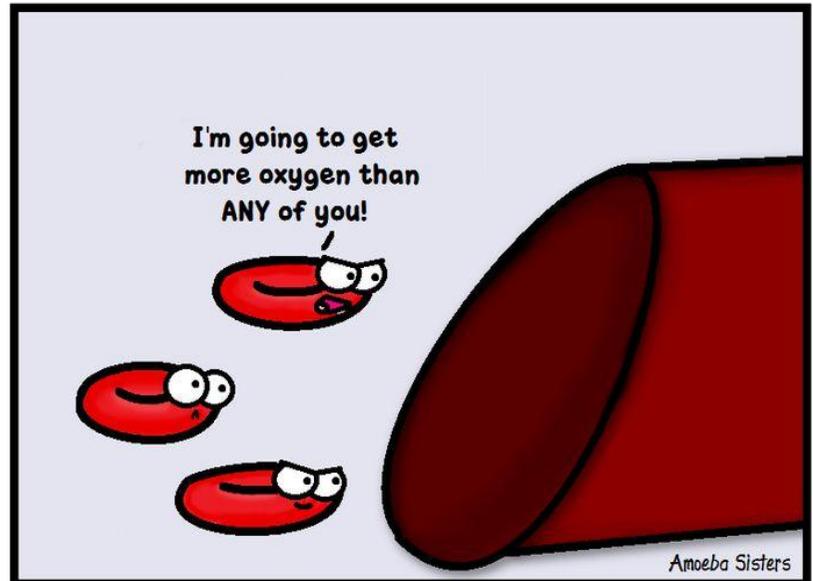


Сканирующий проточный цитометр

Общий анализ крови

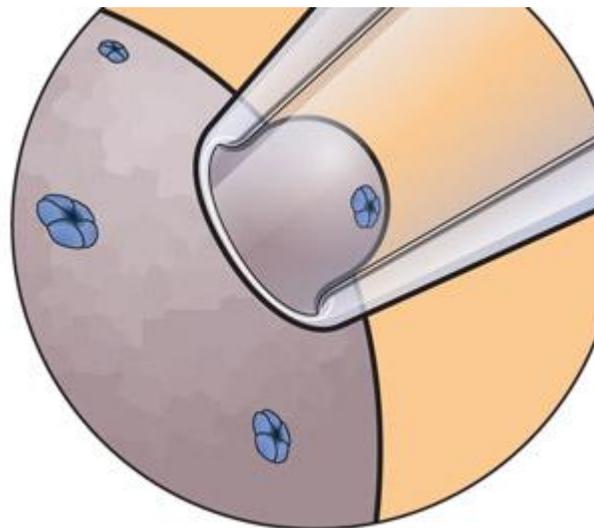
+

1. Микрочастицы;
2. Анионный обмен эритроцитов + упругость мембраны;
3. Высокая точность определения формы тромбоцитов → оценка способность к активации

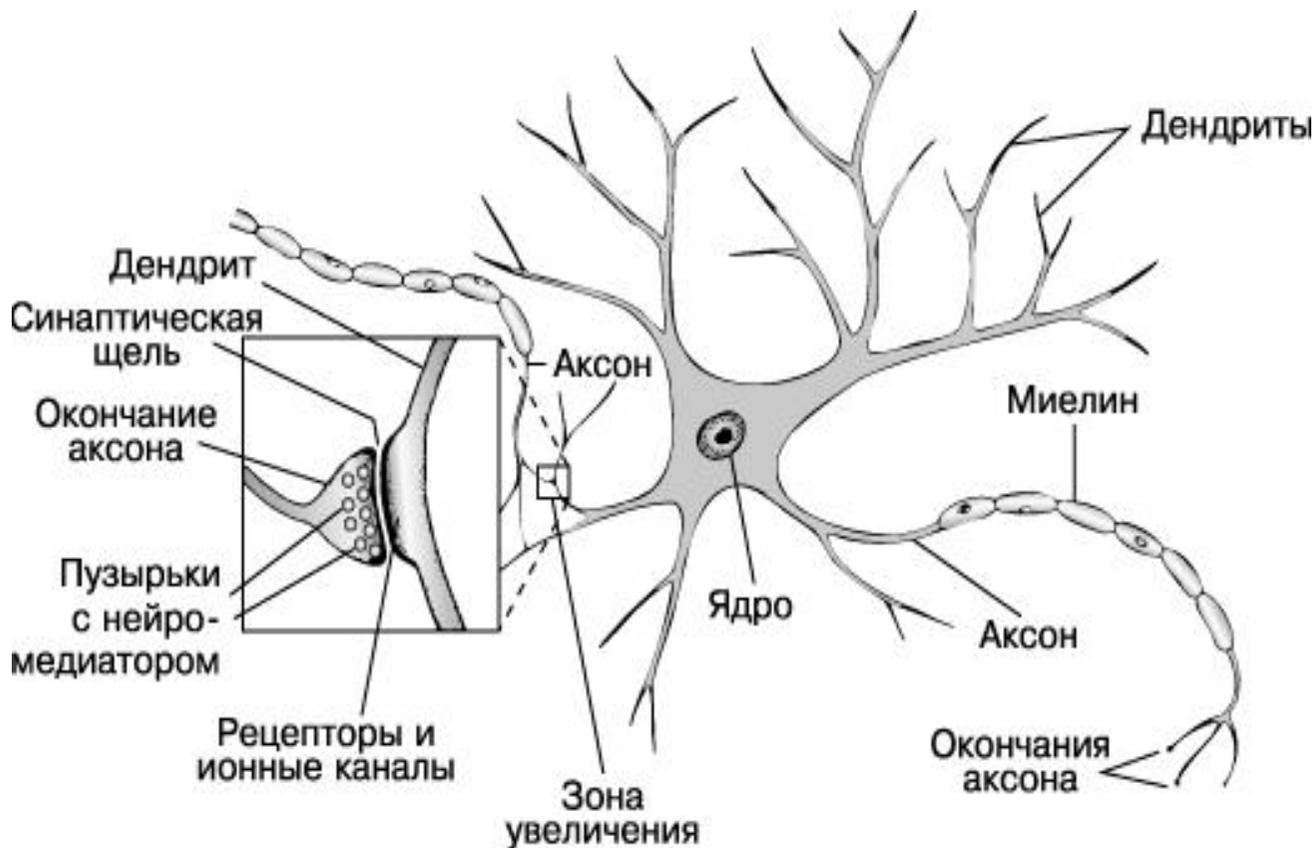


3. Анализ одиночных клеточных сигналов

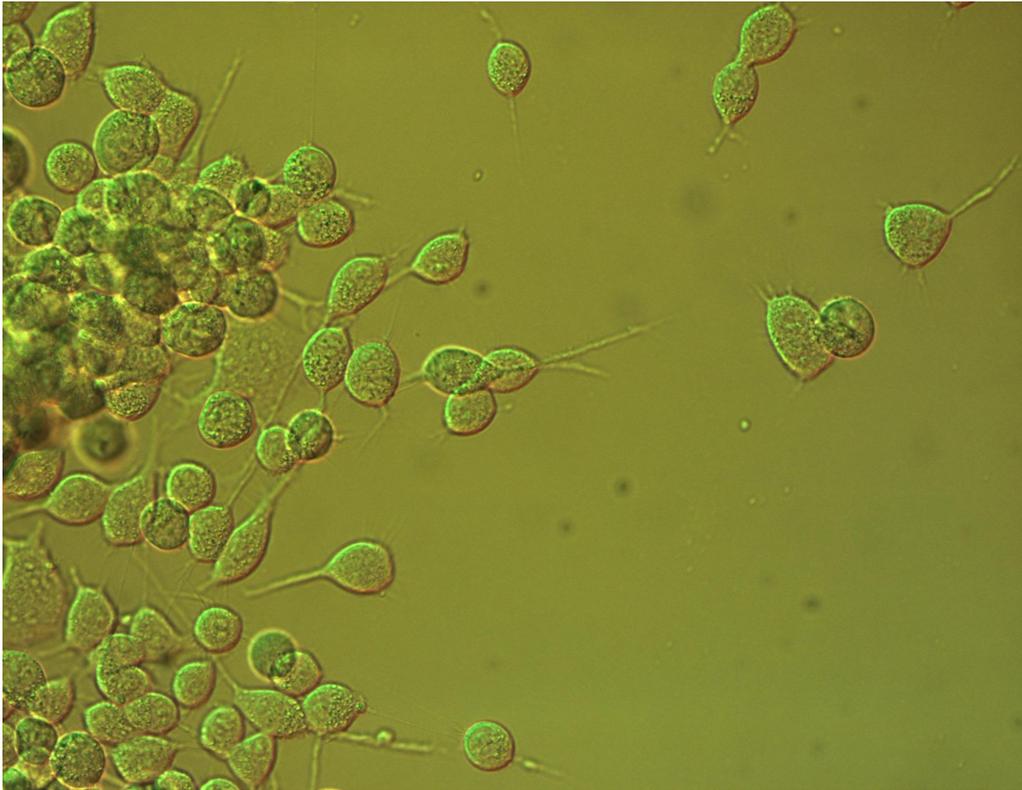
Методика Patch Clamp



НИИ Молекулярной биологии и биофизики СО РАМН



Строение нервной клетки



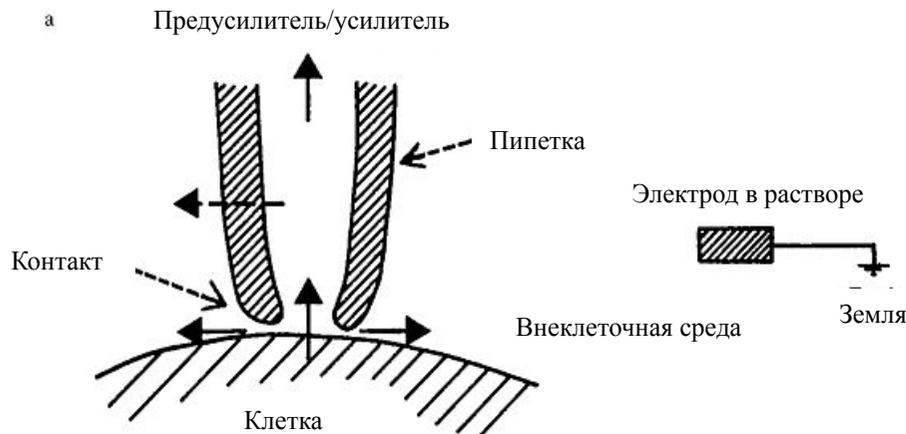
Фотография культуры нейробластомы, сделанная с помощью камеры микроскопа Axio Examiner A1(Carl Zeiss) с увеличением 400X. Здесь изображены дифференцированные нервные клетки размера около 10 мкм.

Уравнения Ходжкина-Хаксли

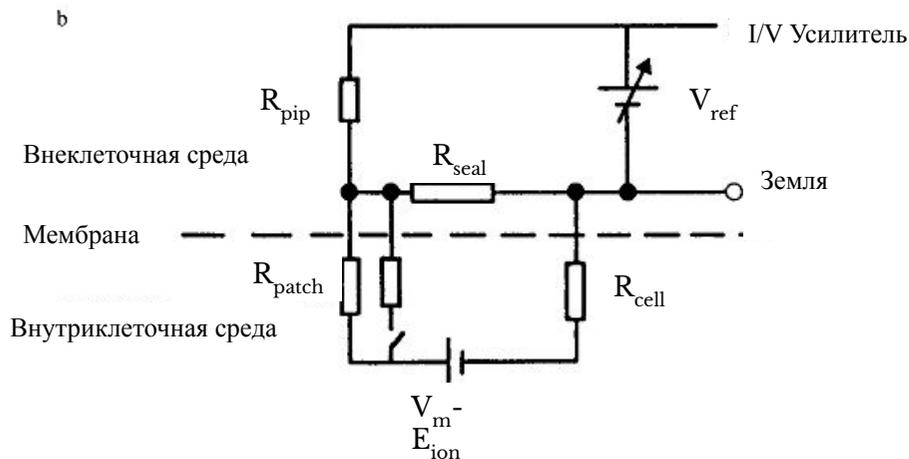
$$I = C \frac{d\varphi}{dt} + \overline{g_{Na}} m^3 h (\varphi - \varphi_{Na}) + \overline{g_K} n^4 (\varphi - \varphi_K) + \overline{g_Y} (\varphi - \varphi_Y),$$

- Теоретический расчет — формы потенциала действия и скорости распространения импульса.

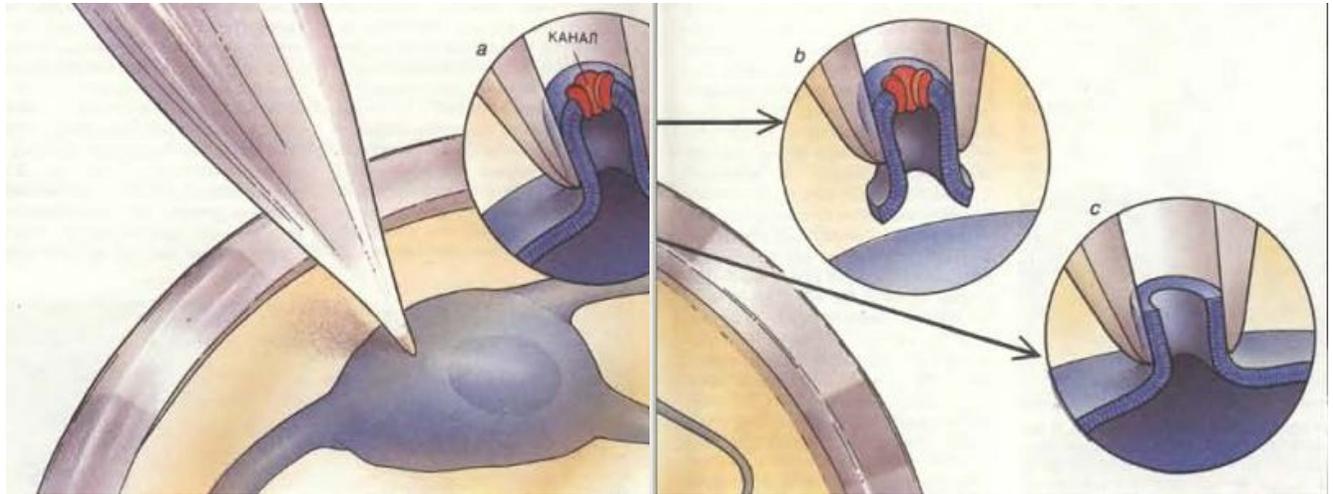
Схема эксперимента



□ Эквивалентная электрическая схема мембраны и пипетки в ходе проведения записи patch clamp;



Три варианта метода Patch clamp



Изображение возможных конфигураций данной техники: a – cell-attached, b – inside-out, c – whole-cell

Характерные данные

Рис.1 Пример записи ионных токов на модельном объекте (R10 Мом) при подаче ступеньки напряжения в 10 мV.

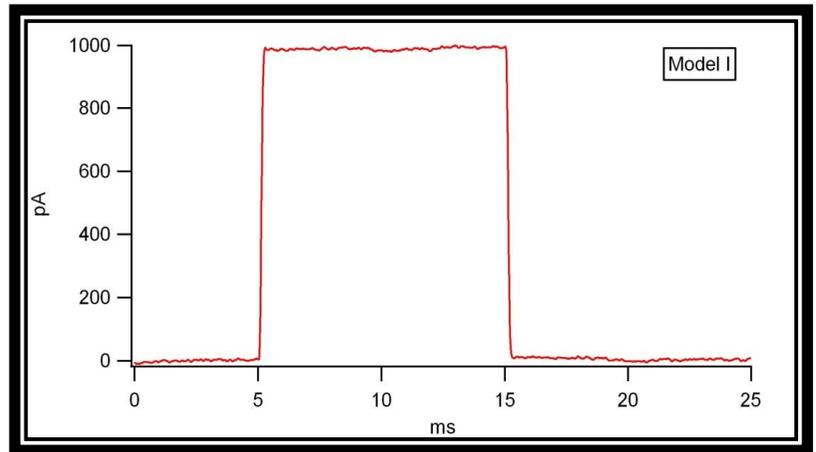
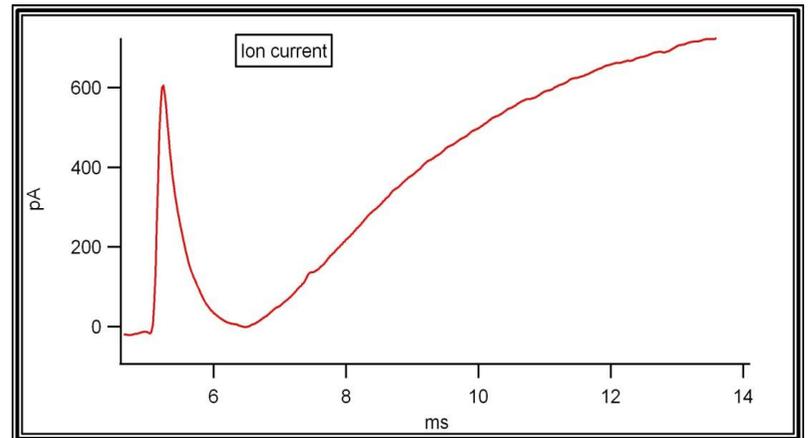


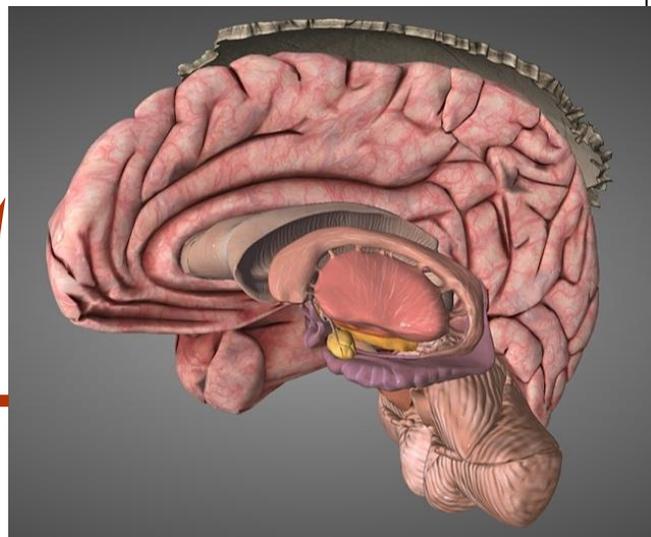
Рис.2 Пример регистрации тока от клетки нейробластомы С-1300 в режиме whole-cell в ответу на ступеньку напряжения в 10 мV.



Что можно получить?



Определение способов
протекции формирования
зависимости



4. Другие актуальные биомедицинские исследования

Средства доставки лекарств

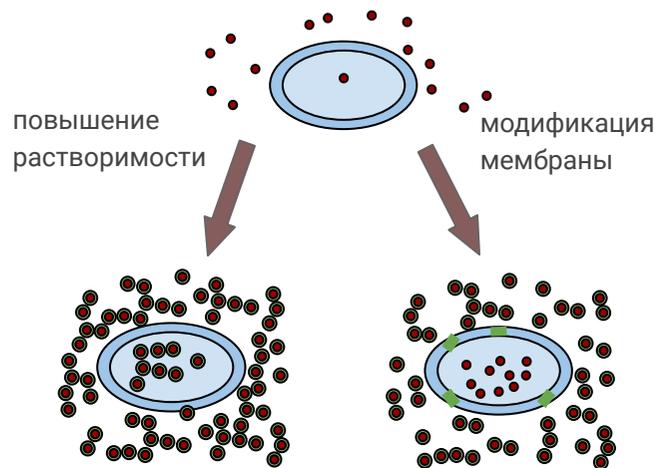
Около 85% популярных лекарств принимаются перорально.

Для проникновения лекарства во внутриклеточное пространство необходимо достичь достаточно большой концентрации во внеклеточном окружении.

Около 40% выпускаемых лекарственных соединений классифицируются как нерастворимые.

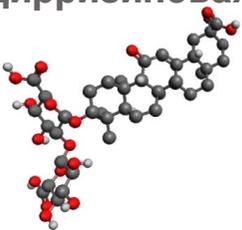
Средства доставки:

- повышение растворимости за счет комплексообразования
- модификация мембраны (поры, каналы, извлечение холестерина)



Комплексанты

Глицирризиновая кислота (ГК)



Природный олигосахарид

Комплексообразование со множеством лекарств

Способность мицеллообразования

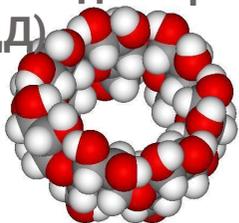
Образование комплексов с холестерином

Широкий спектр биологической активности

Усиление биодоступности лекарств

Влияние на свойства клеточных мембран (упругость*, проницаемость*, подвижность липидов**)

Циклодекстрин (ЦД)

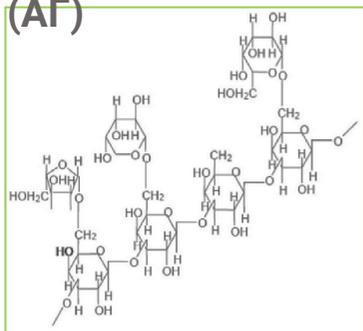


Тороид с гидрофобной полостью

Комплексообразование с различными лекарствами

Извлечение мембранного холестерина

Арабиногалактан (АГ)



Природный полисахарид

Комплексообразование с различными лекарствами

Усиление биодоступности лекарств

*O. Yu. Selyutina, N. E. Polyakov, D. V. Korneev, B. N. Zaitsev, *Influence of glycyrrhizin on permeability and elasticity of cell membrane: perspectives for drugs delivery*, Drug Delivery, 2014, DOI: 10.3109/10717544.2014.919544

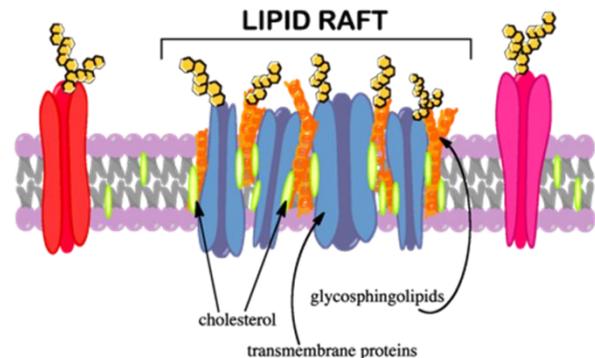
**О. Ю. Селютина, И. Е. Апанасенко, Н. Э. Поляков, *Исследование мембраномодифицирующей активности глицирризиновой кислоты*, Известия АН. Серия химическая, 2015, №7, 1555-1559

КОНЦЕНЦИЯ ЛИПИДНЫХ рафтов в биофизике мембран

1970-е гг. – разработка гипотезы кластеров липидов;

1988 г. – К. Симонсом и Г. Ван Меером предложен термин «липидный рафт»;

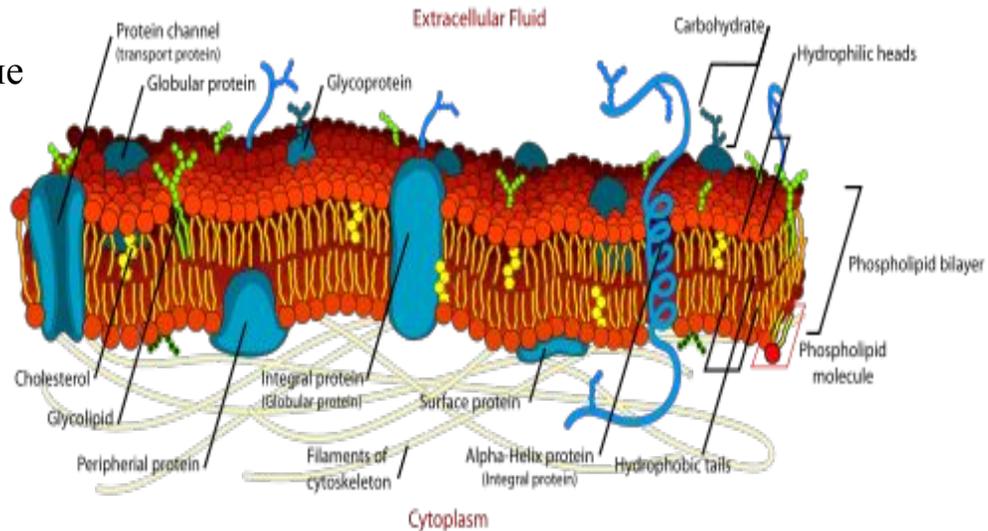
2006 г. - на Главном симпозиуме по липидным рафтам и клеточным функциям липидные рафты определены как «небольшие (10—200 нм), гетерогенные, высоко динамичные домены, обогащенные стеролами и сфинголипидами, которые компартментализуют клеточные процессы. Небольшие рафты могут иногда объединяться в более крупные через белок-белковые взаимодействия».



Жидкостно-мозаичная модель Сингер и Николсон, 1972 г.

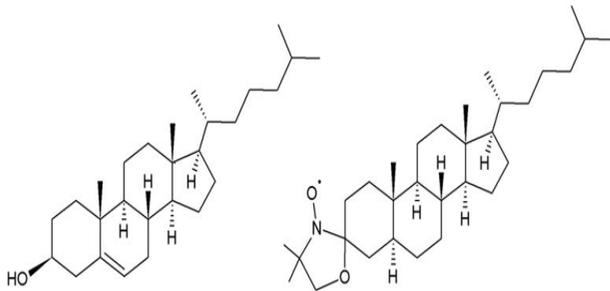
Белки в мембране:

- Интегральные
- Полуинтегральные
- Периферические

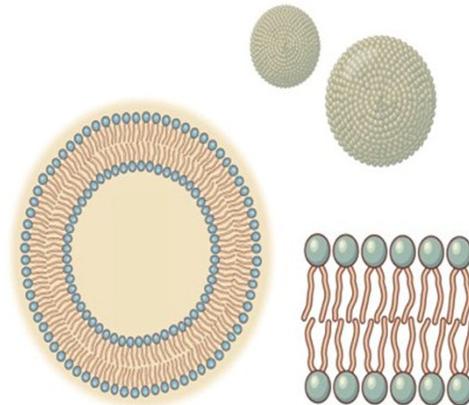


https://en.wikipedia.org/wiki/Membrane_models

Спиновые метки «пришиваются» к биологическим молекулам

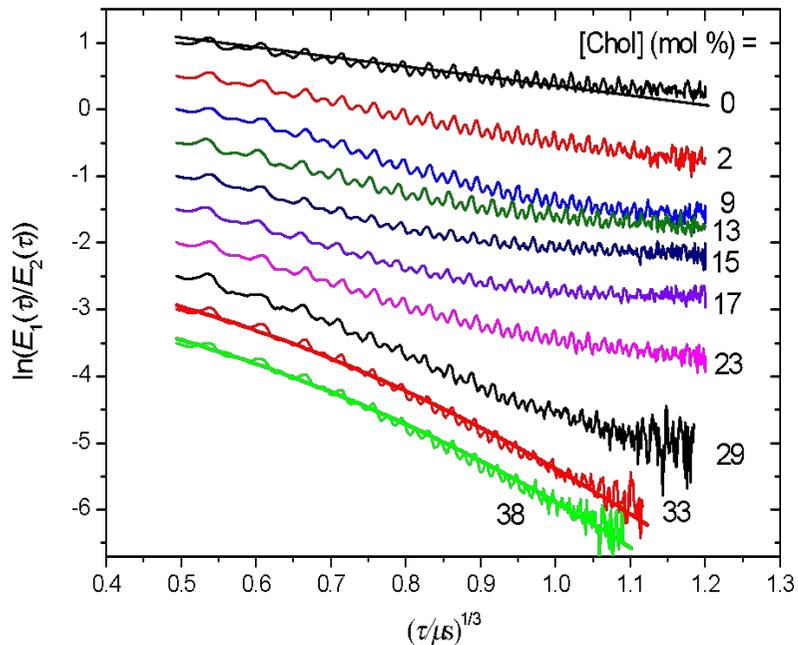


Холестерин и холестеран, меченый
нитроксильным радикалом



© Classe Qsl - www.encyclopediasalud.com - V.Barceló

Кластеры со спин-меченым аналогом холестерина сильно уменьшаются в размере



При количестве холестерина ~15 мол.% размер кластеров уменьшается до 6-10 нм.

Спасибо за внимание!

**Контакт
ы**

*Чернышова Екатерина
E-mail: kat30cer@gmail.ru
Моб. тел.: +7 983 313 74
77*

Генная инженерия и биотехнологии

Генная инженерия и биотехнологии

- Большинство методик в генной инженерии включают выделение определенных фрагментов ДНК и последующее их соединение с другими фрагментами для получения новых комбинаций генов.
- Первая рекомбинантная ДНК была получена в 1972 г.

эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы)

эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) – группа ферментов, катализирующие специфическое расщепление двунитевой ДНК. Для их обозначения используются сокращенные названия микроорганизмов - продуцентов. Например, *EcoRI* — эндонуклеаза, выделенная из *Escherichia coli*, *Hind III* - *Haemophilus influenzae*, *Sal* - *Streptomyces albus*. Подобно многим другим рестриктазам, этот фермент расщепляет ДНК по **палиндромной последовательности**, т. е. короткому сегменту ДНК, в котором обе цепи при считывании в направлении 5'→3' имеют одинаковую последовательность.

ATGCGAATTCTT

Т

TACGCTTAAG

AAA



«липкие концы»

ATGCG

AATTCTTT

TACGCTTAA

Нае III:

ATGCGGCCCTTT

TACGCCCGG AAA



«тупые концы»

ATGCGG

CCTTT

TACGCC

GG AAA

ДНК-лигаза фермент, сшивающий фрагменты ДНК

Векторы

- **Вектор** - молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.

вектор должен быть небольшим, способным поддерживаться в клетке-хозяине (**реплицироваться**), многократно копироваться (**амплифицироваться**), экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности), должен иметь **маркерный** ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции их; должен быть способен передаваться в клетку соответствующего организма.

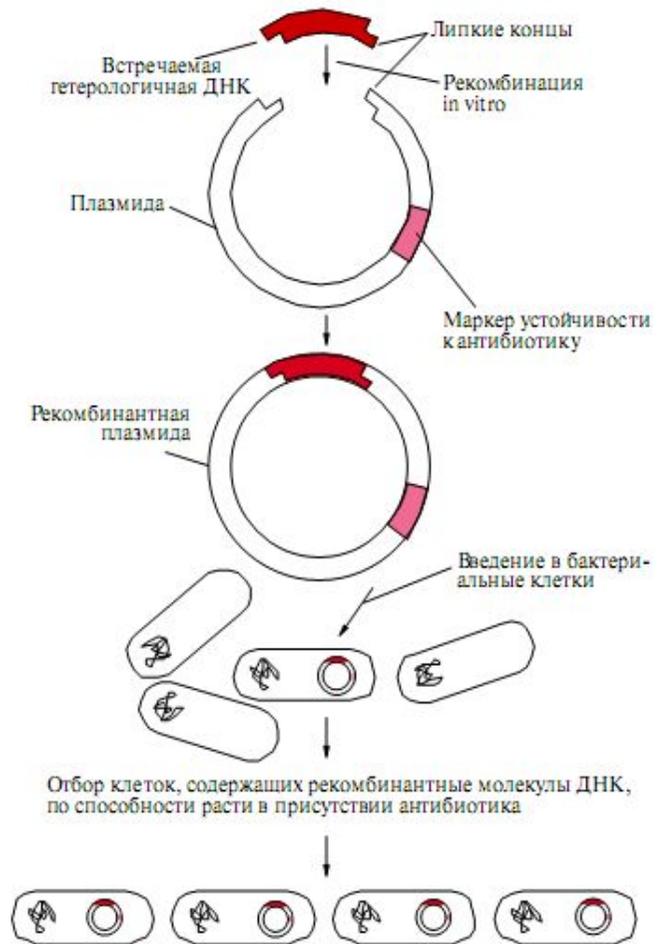
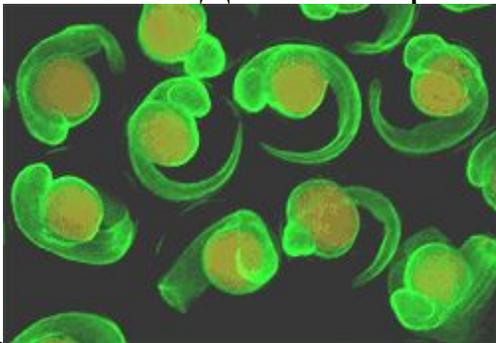
Можно выделить **2 группы маркерных генов**, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. **Селективные гены**, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.

2. Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано, например, зеленый флюоресцентный белок (GFP), люцифераза (LUC)

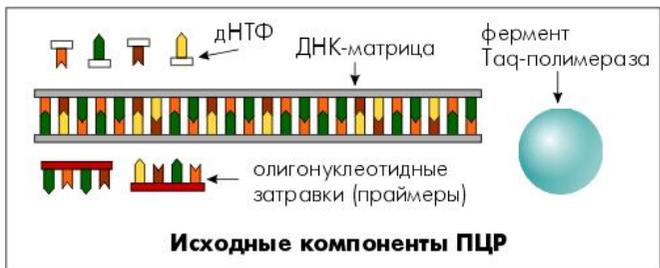
Клонирование фрагмента ДНК в плазмиде.

Наиболее часто использующиеся векторы — **плазмиды** - маленькие кольцевые ДНК, встречающиеся в бактериях и часто переносящие гены устойчивости к антибиотикам. Плазмиды не являются частью основного генома бактерий, поскольку встречаются штаммы, как с плазмидами, так и без них. Благодаря малому размеру и кольцевой структуре плазмидных ДНК их легко отделить от геномной ДНК бактерий



полимеразная цепная реакция (ПЦР, polymerase chain reaction, PCR)

разработана Кэри Маллисом в 1984 г.

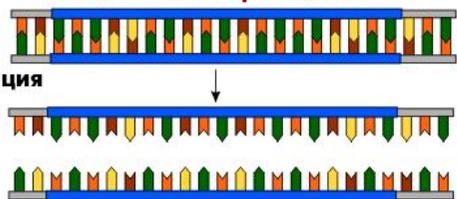


1-ый цикл амплификации

1-ый этап

Денатурация

93-95°C

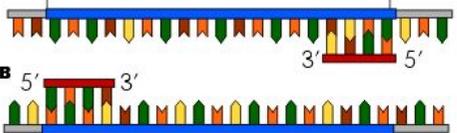


Искомый фрагмент ДНК

2-ый этап

**Отжиг
праймеров**

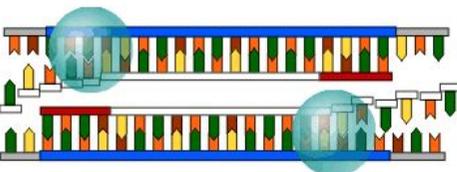
50-65°C



3-ий этап

**Синтез
цепи ДНК**

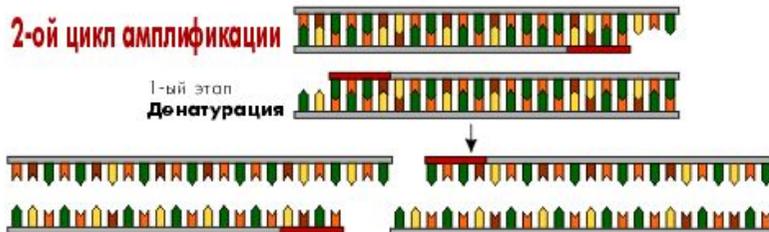
72°C



2-ой цикл амплификации

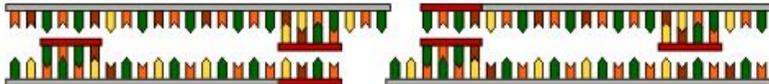
1-ый этап

Денатурация



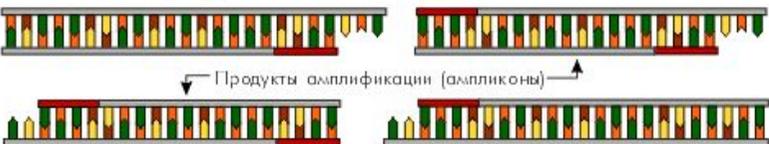
2-ый этап

Отжиг праймеров



3-ий этап

Синтез цепи ДНК



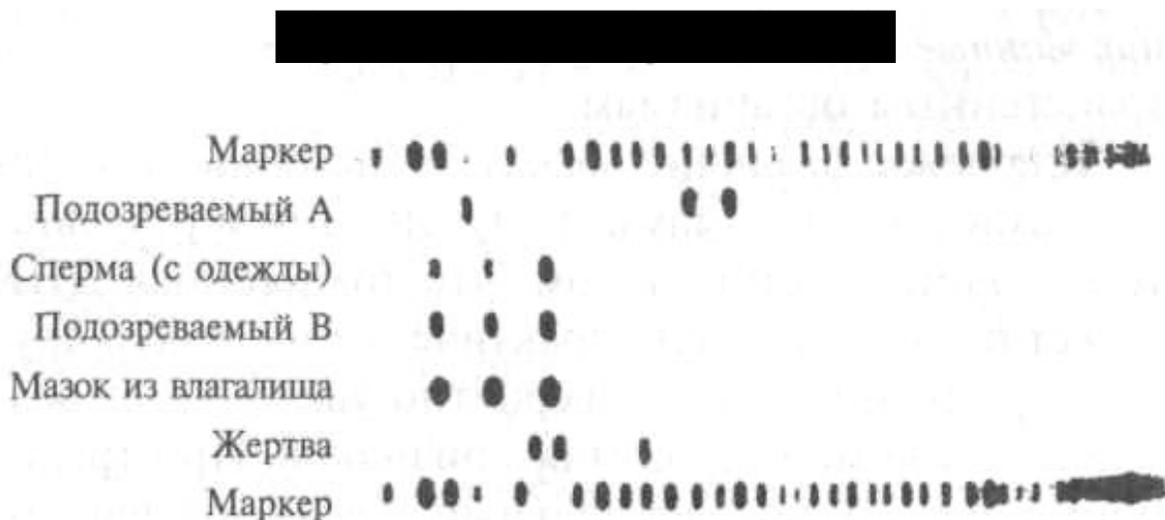
← Продукты амплификации (ампликоны) →

ПЦР- Диагностика заболеваний и инфекций, передающихся половым путем (ИППП)

- Инфекции, передающиеся половым путем
- Вирусные инфекции
- болезнь Тея—Сакса, аутосомное рецессивное заболевание нервной системы с летальным исходом . Его вызывает аллель, распространенный среди ашкеназских евреев, выходцев из Восточной Европы. В Северной Америке эта болезнь была распространена среди новорожденных в семьях иммигрантов. С развитием науки стало возможным проведение ДНК-анализа и выявление гетерозигот по аллелю Тея—Сакса.
- Анализ клетки эмбриона при ЭКО



Судебная медицина. Фингерпринтинг - ДНК-овые «отпечатки пальцев»



Метод ДНК-отпечатков использован для установления невиновности одного из двух обвиняемых в изнасиловании. Образцы ДНК подозреваемых А и В протестированы вместе с ДНК жертвы (ряд 6), образцом ДНК семени с ее одежды (ряд 3) и образцом ДНК из влагалища (ряд 5).

Метод основан на ПЦР минисателлитных повторов человека.

методы идентификации личности и установления биологического родства на основе анализа ДНК.

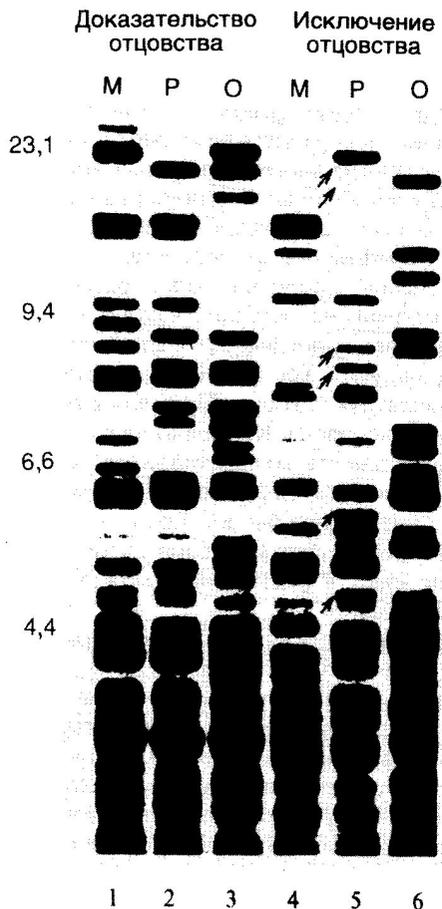
Генетическая экспертиза родства включает исследование у предполагаемых родственников тех или иных признаков, которые определяются только последовательностью ДНК .

в ДНК человека имеется много так называемых полиморфных локусов, то есть участков, имеющих многочисленные (до 8-12) варианты последовательностей ДНК.

Ценность полиморфных аллелей для разных генетических исследований, в том числе для экспертизы родства, определяется неизменностью их в течение жизни, строгой передачей родительских аллелей потомству и множеством вариантов сочетаний аллелей. Определение набора аллелей для нескольких полиморфных локусов (например 10) у конкретного человека позволяет получить для него своего рода индивидуальную "геномную карту". Исследование полиморфных локусов (как и других "чисто" наследственных признаков) не способно различить только однояйцевых близнецов, молекулы ДНК которых идентичны.

Использование полиморфных локусов (их также называют ДНК-маркерами) поставило экспертизу родства на совершенно новый уровень. Согласно международным требованиям, анализируется не менее девяти полиморфных локусов, что позволяет достичь очень высокой точности. При проведении экспертизы отцовства возможны два результата. Отрицательный результат - исключение отцовства - является 100%-ным; такое заключение делается при несовпадении не менее трех локусов. Положительный результат - подтверждение отцовства, - как и при использовании других методов, носит вероятностный характер, но величина ошибки несопоставимо ниже и составляет сотые доли процента. Отцовство считается установленным при достоверности анализа не менее 99,999% (вероятность случайного совпадения 1 на 100 тысяч человек). Таким образом, вероятность практически не отличается от 100%-ной, и положительный результат столь же юридически полноправен, как отрицательный.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ОТЦОВСТВА



Существует 2 основных подхода:

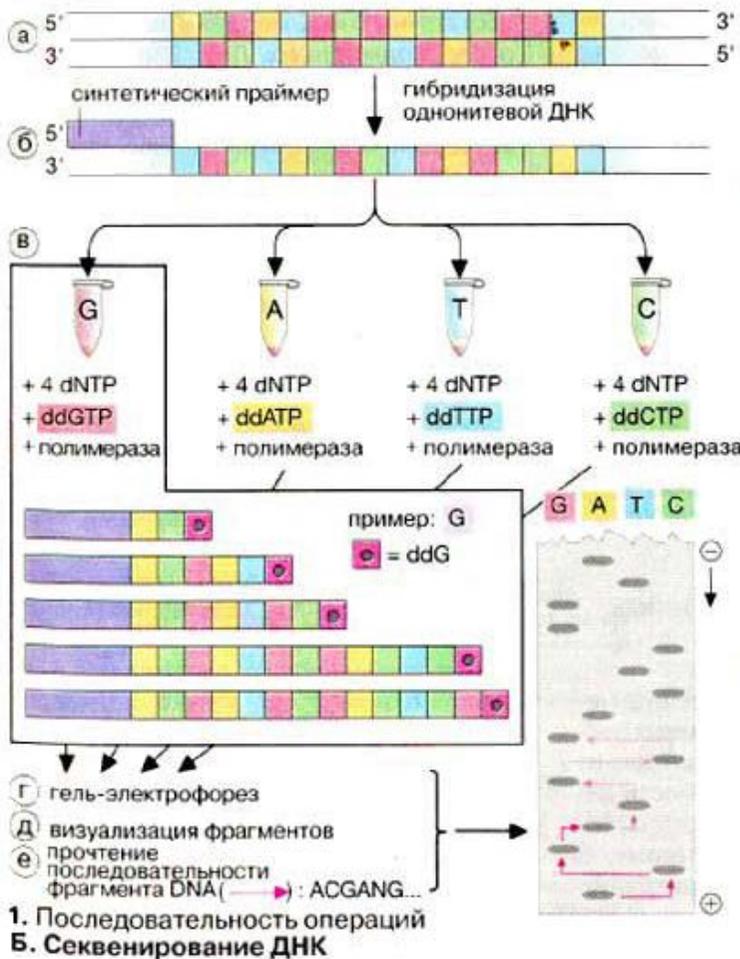
1. **Гибридизация зондов.** В 1985 г. было показано, что олигонуклеотидные зонды, комплементарные последовательностям миоглобинового гена человека, одновременно обладают способностью гибридизоваться с множественными локусами минисателлитной ДНК. Профили гибридизации оказались специфичными для отдельных индивидуумов.

2. Для **типирования с помощью ПЦР** наиболее часто используются три минисателлитных локуса человека: в гене аполипопротеина В (АРОВ), D17S5 (известный также как локус D17S30) и D1S80. Все три локуса легко амплифицируются (максимальный размер их аллельных вариантов не превышает 1 т.п.о.) и легко обнаруживаются с помощью электрофореза.

Результаты **гибридизации** показывают полную идентичность фрагментов ДНК у ребенка и отца (дорожки 2 и 3), что рассматривается как доказательство отцовства, либо выявляют, по крайней мере, 6 дополнительных фрагментов ДНК у ребенка, обозначенных стрелками, которые отсутствуют у отца (дорожки 5 и 6 – исключение отцовства)

Секвенирование ДНК

Схема секвенирования ДНК по методу Сангера и Коулсона.

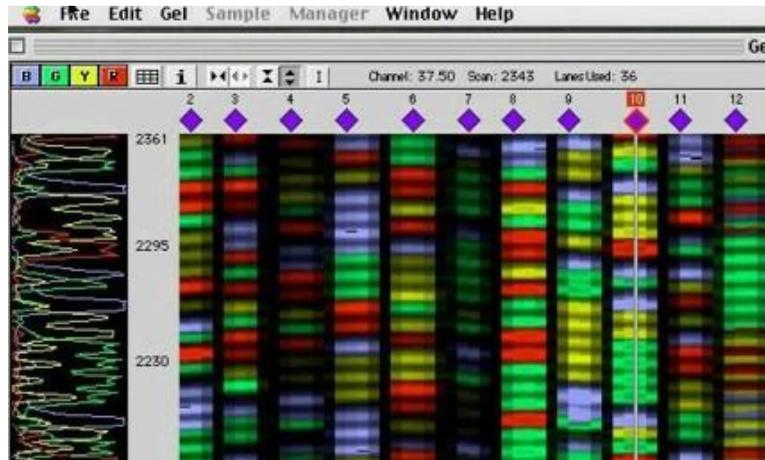
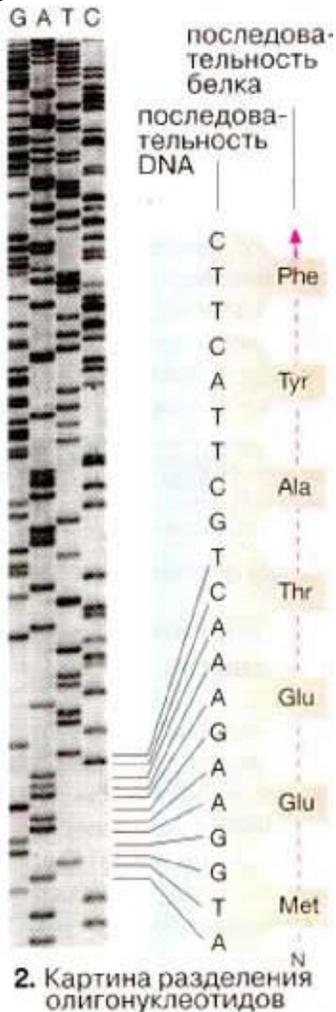


метод был разработан Сангером и Коулсоном в 1975 году.

анализируемый фрагмент ДНК используется как матрица, с которой копируются нуклеотидные цепочки. образец ДНК разделяется на 4 пробы. К каждой из проб прибавляется короткий праймер, набор оснований, а также **терминаторы синтеза** (дидезоксирибонуклеотиды: ddA, ddГ, ddЦ, ddТ)., которые после своего присоединения останавливают синтез ДНК. К каждой из проб добавляют свой терминатор, который комплементарен 1 из 4 оснований. Терминатор случайным образом способен заменять соответствующее основание в растущей цепочке ДНК. Поскольку терминация происходит в разных местах, то получается набор цепей, фрагментов разной длины. Фрагменты, полученные в результате синтеза визуализируются с помощью электрофореза. Размер фрагмента соответствует положению комплементарного ему нуклеотида в исходной анализируемой цепи ДНК

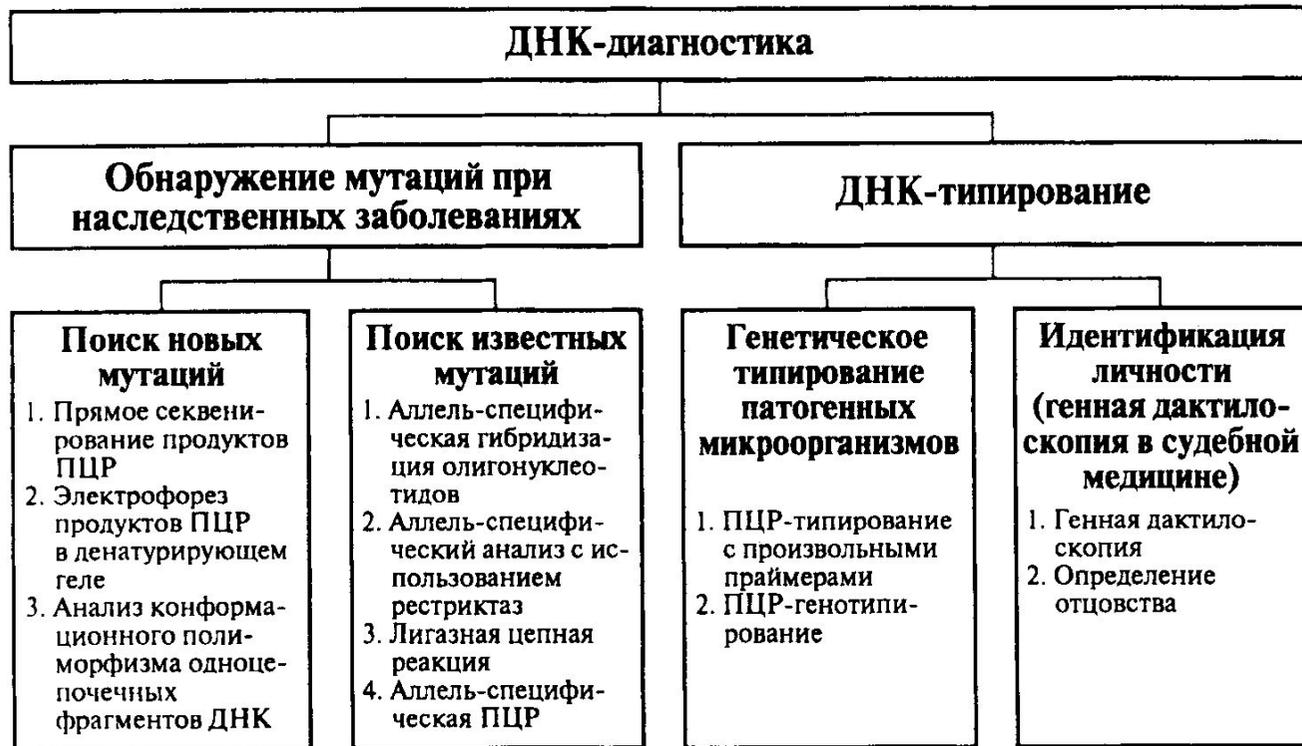
Секвенирование ДНК

В настоящее время механизмы секвенирования автоматизированы. Больше распространение получил метод Сангера-Коулсона. В модификации этого метода, в праймер вводят флуоресцирующую метку. Кроме того, каждый из 4 терминаторов обладает способностью к свечению при различной длине волн. Таким образом, сканируя образец при различных длинах волн, можно быстро считывать результаты секвенирования.



Заключительная стадия автоматического секвенирования ДНК - компьютерная обработка данных. Справа - электрофореграммы разных образцов ДНК, слева - результат сканирования электрофореграммы при различных длинах волн.

Биотехнологии в жизни человека.



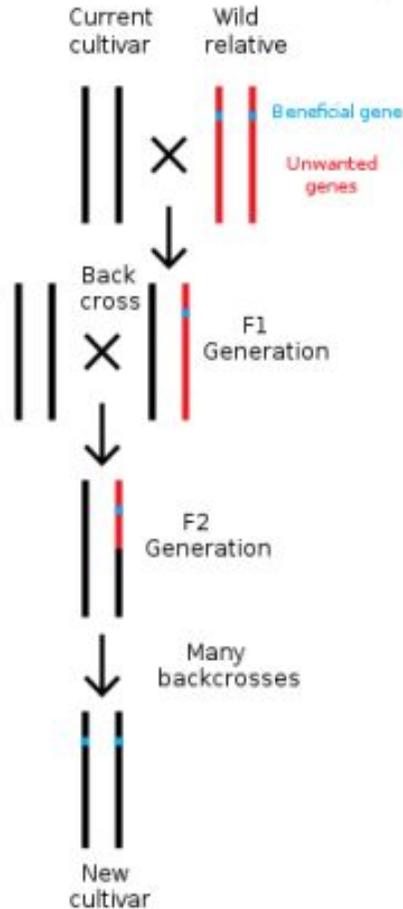
Генетически модифицированные организмы

- При помощи метода клонирования генов можно создавать организмы с внедренными генами других организмов . Добавленный в геном ген называется *трансгеном*, а организм, полученный в результате такой операции, называется *трансгенным организмом*. В популярной литературе этот процесс известен под названием *генетическая модификация*, но это не совсем точное определение, так как полученные в результате традиционной селекции организмы также в какой-то степени подвергаются генетической модификации. Более точные термины «*генетически модифицированные организмы*» и «*генетически модифицированные продукты*» относятся исключительно к трансгенным организмам.

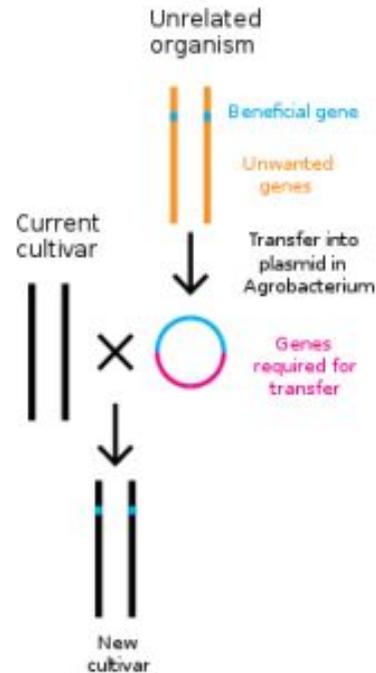


Селекция vs Трансгенез

Conventional breeding



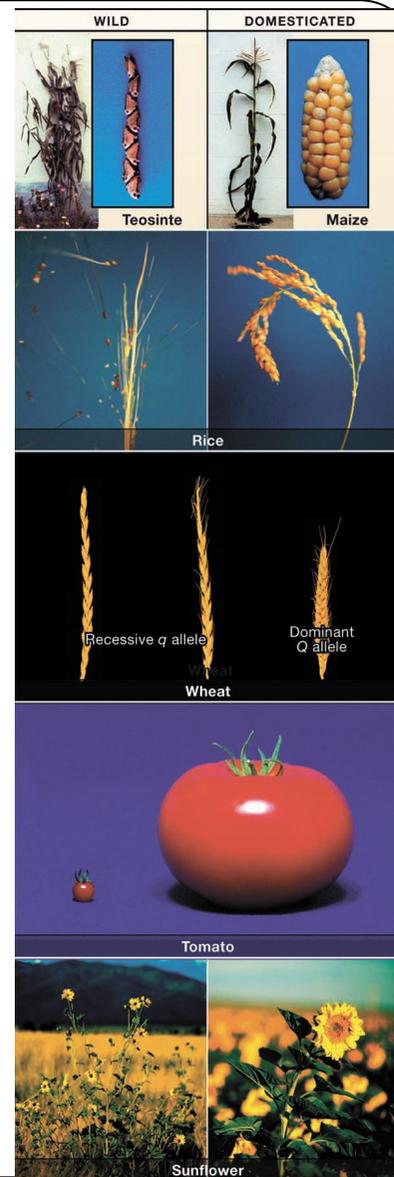
Transgenesis



Селекция и генетика

- На примере урожайности **пшеницы** за последние **200** лет можно проследить основные прорывы в селекционных и генетических методах.
- В 1800–1900-х годах она составляла **10–20** ц/га.
- В начале 1900-х годов к целенаправленному отбору добавилось осмысленное скрещивание.
- С 1900 по 1950 г. урожайность пшеницы выросла до **30** ц/га.
- К середине прошлого столетия появились первые продуктивные сорта на основе мутагенеза.
- С 1950 по 1990 г. средняя урожайность пшеницы достигла **80** ц/га.
- За последние **20** лет ни традиционная селекция, ни биотехнология ощутимого прироста к урожайности не принесли вообще. Самый оптимистичный прогноз на последующие **10** лет — увеличение урожайности всего на **1%**

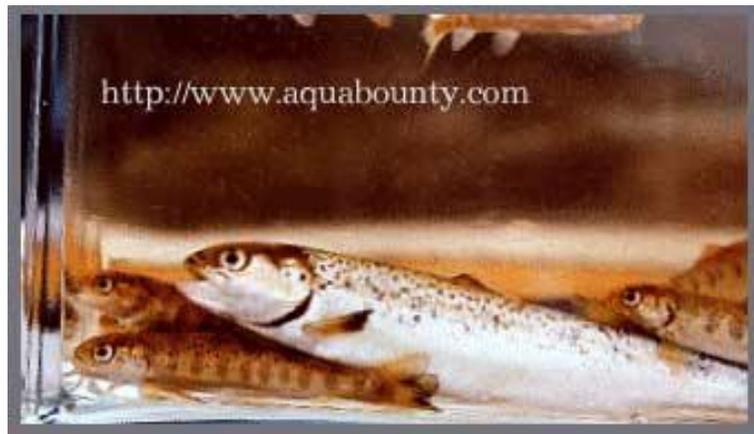
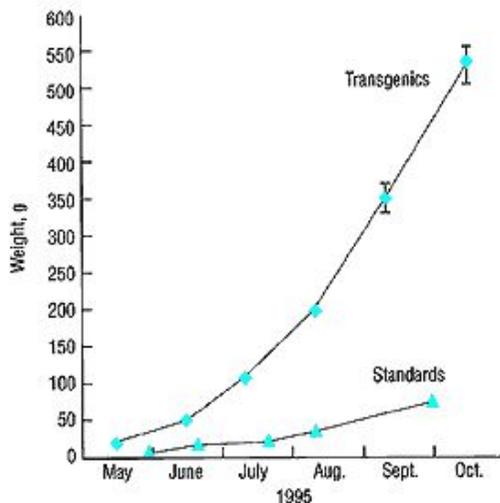
Иллюстрация из: Doebley J, Gaut BS, Smith BD. The Molecular Genetics of Crop Domestication (2006) Cell 127:1309–1321



Получение трансгенных организмов

- **Первыми генетически модифицированными организмами** были бактерии центров кристаллизации льда и помидоры сорта **FlavrSaver**, выведенные еще в **1970-х** годах. Бактерии предназначались для того, чтобы после распыления на растениях они образовывали центры кристаллизации льда; таким образом можно было бы немного повысить устойчивость сельскохозяйственных культур к холоду и увеличить период роста. Помидоры должны были созревать позднее обычного, чтобы дольше сохраняться на складе.
- **Первым трансгенным животным** стала мышь с крысиным геном гормона роста. Как и ожидалось, она выросла значительно больше своих братьев и сестер (и выглядела при этом скорее как крыса). Также повышенное внутриклеточное содержание гормонов роста быка или человека в клетках трансгенных мышей сопровождалось ускорением их роста через три недели после рождения, рост стабилизировался через **12** недель, когда размер мышей в два раза превышал обычный.

Получение и использование трансгенных рыб



Сравнение скорости роста генетически модифицированных и обыкновенных лососей.

Рис. из статьи "[Antifreeze proteins and their genes: From basic research to business opportunity](#)" – СЕМТЕСН , 30(6), 17-28, 1999.

Трансгенез

Современные сорта культурных растений — продукты активного радиационного и химического мутагенеза.

В период с 1930 по 2004 г. получено 2250 таких сортов, 70% из которых — продукт прямого мутагенеза и 30% — продукт скрещивания с мутантными растениями. Из всех мутантных растений около 75% составляют злаки и бобовые.

Первое генетически модифицированное растение появилось на рынке в 1994 г. Через несколько лет его сняли с производства за невыгодностью. Существуют обычные сорта с такими же свойствами.

Состояние на 2010 г.: на рынок допущены только 33 вида ГМО из нескольких основных выращиваемых культур: соя (1), кукуруза (9), рапс (4), хлопчатник (12) и еще несколько, которые не имеют большого экономического значения. Генетическая модификация касается исключительно технологии культивирования — устойчивости к насекомым, вирусам и гербицидам.

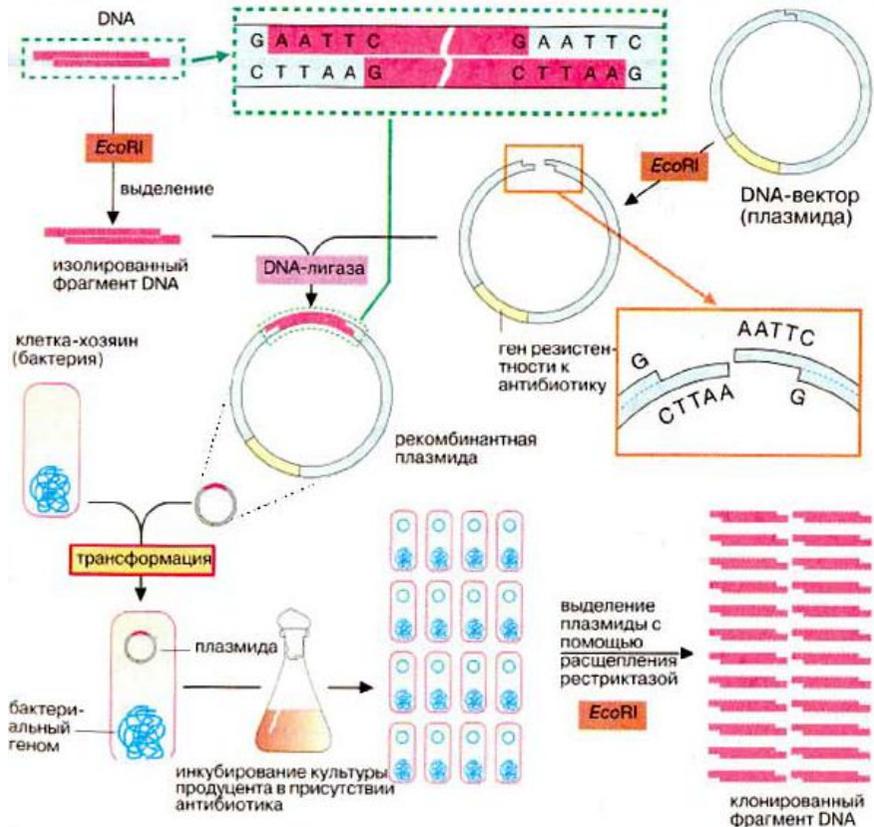
К 2015 г. ожидается 120 различных ГМО. К списку добавятся картофель, свекла, рис и другие культуры. Причем половина ожидаемых ГМО сконструирована в азиатских странах.

Первые эксперименты по созданию трансгенных организмов



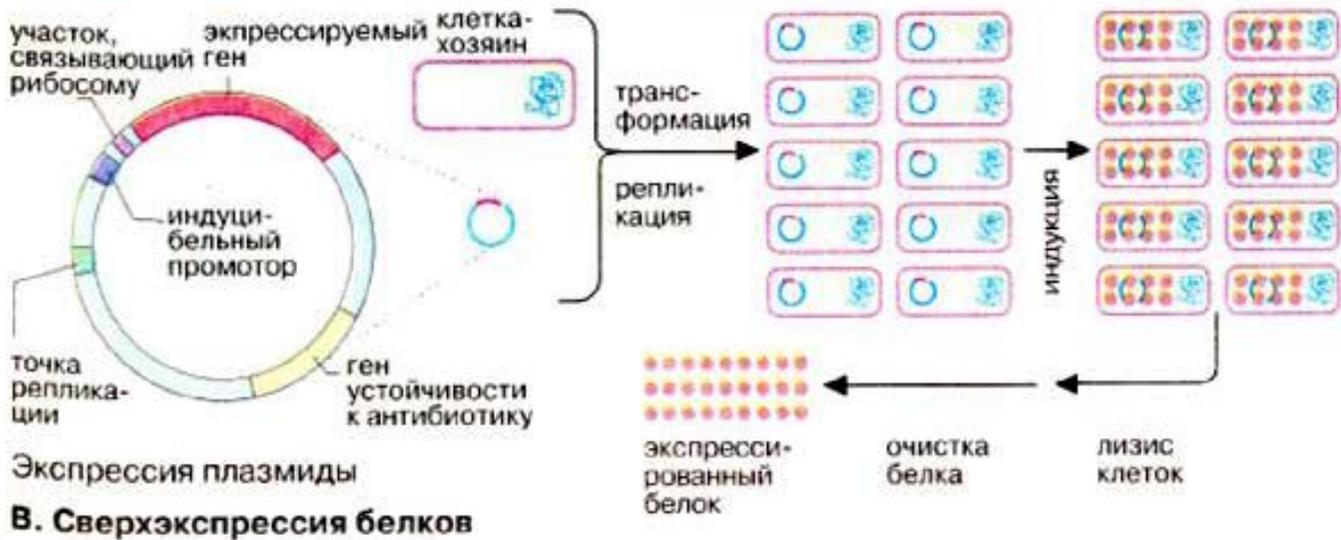
- 1976 – Херб Бойер открывает компанию “Genentech”, которая в последующие шесть лет создает и коммерциализует E.Coli, продуцирующую человеческие белки, в т.ч. инсулин.

Инсулин занимает в истории науки особое место. За одну и ту же молекулу Нобелевский комитет дважды присуждал премию: в 1923 году — за его открытие (Фредерику Бантингу и Джону Маклеоду), а в 1958-м — за установление его химического состава Фредерику Сенгеру (инсулин и здесь оказался первым — первым белком с полностью расшифрованной последовательностью аминокислот). Сенгер к тому же был первым из химиков, получившим Нобелевскую премию дважды (второй раз — в 1980-м, вместе с Полом Бергом и Уолтером Гилбертом, за разработку методов расшифровки нуклеиновых кислот). В 1978 году инсулин стал первым человеческим белком, синтезированным в генетически модифицированной бактерии. С инсулина началась новая эпоха в биотехнологии: в 1982 году американская компания «Genentech» начала продажу натурального человеческого инсулина, синтезированного в биореакторе генно-модифицированными бактериями кишечной палочки.



Б. Клонирование ДНК

1982г. Клонированные гены человеческого инсулина были введены с плазмидой в бактериальную клетку, где начался синтез гормона, который природные микробные штаммы никогда не синтезировали.



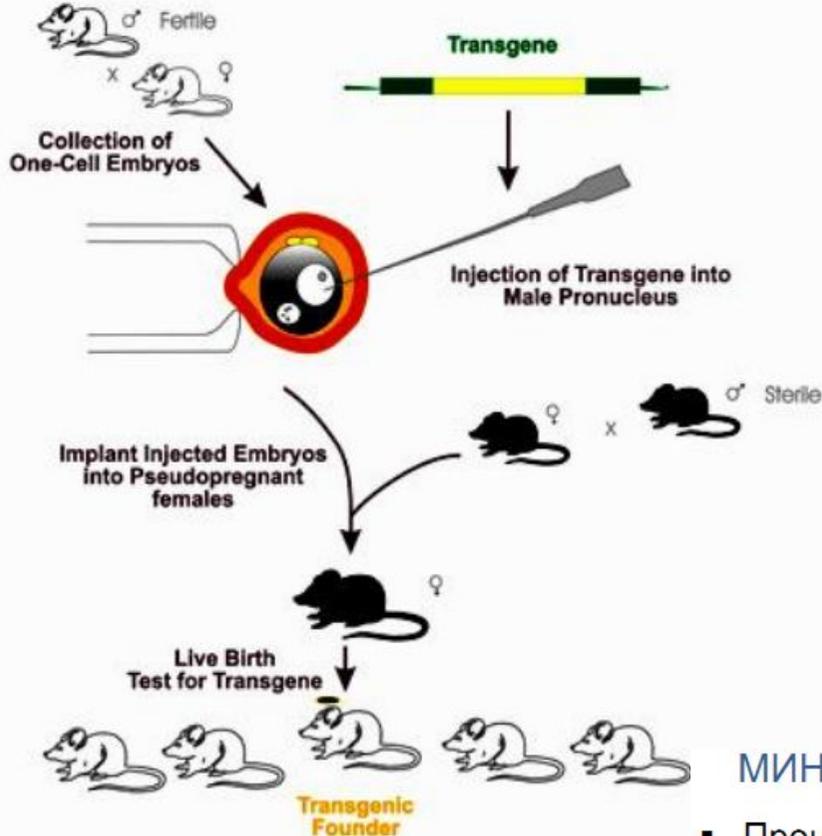
Из 1000 литров бактериальной культуры получают приблизительно 200 г инсулина, что равно количеству, получаемому из 1600 кг поджелудочной железы животных. Параллельно была решена проблема иммунологического поражения организмов диабетиков животным инсулином. Производство и продажу инсулина впервые начала американская фирма Eli Lilly.

Мировой рынок инсулина составляет в настоящее время более 400 млн. долларов, ежегодное потребление около 2500 кг.

Следующими были интерферон и интерлейкин. Около 200 новых диагностических препаратов уже введены в медицинскую практику, и более 100 генно-инженерных лекарственных веществ находится на стадии клинического изучения.

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



ПЛЮСЫ

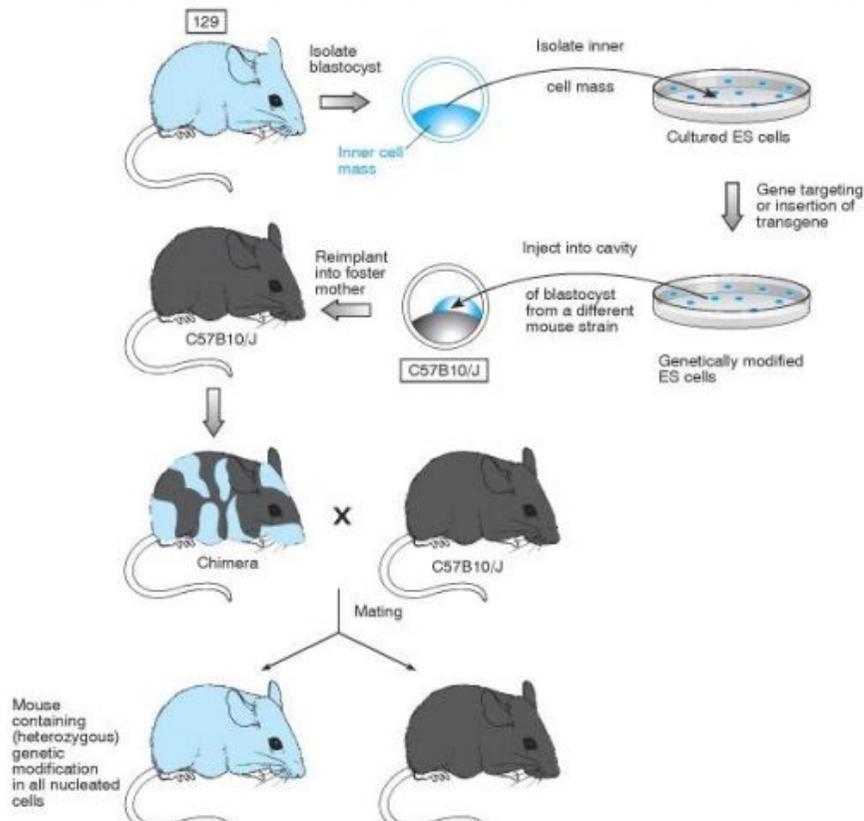
- Есть возможность регулировать количество вводимой ДНК
- Точность «доставки»
- Можно работать с различными животными

МИНУСЫ

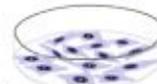
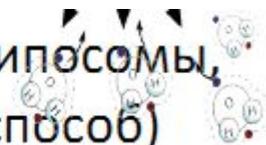
- Процесс микроинъекции может привести к гибели эмбриона
- Одна инъекция – одна клетка
- Трансген встраивается случайным образом
- Требуется высокой квалификации
- Относительно низкий уровень трансформации



Использование эмбриональных стволовых клеток



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



Loop

Target Sequence RC

Each endosome

Основные направления использования трансгенных животных

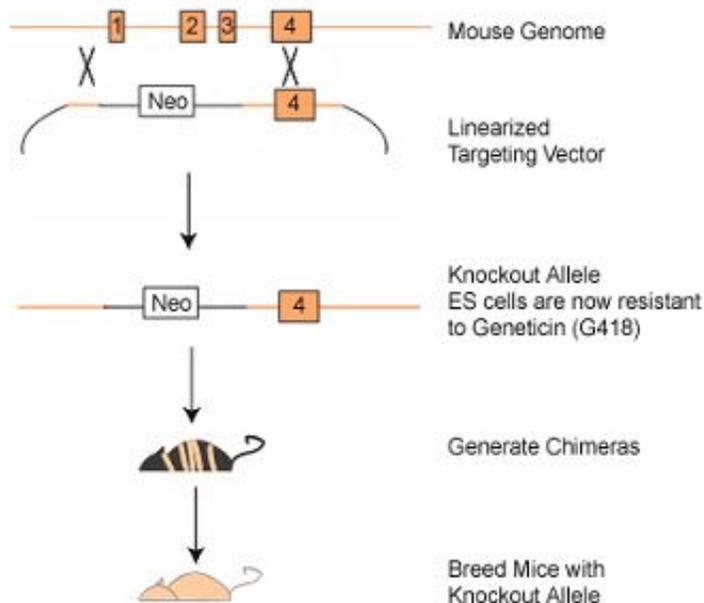
- Моделирование заболеваний и изучение фундаментальных биологических процессов
- Продукция белков и ростовых факторов, используемых в науке и медицине
- Решение ксенотрансплантационных проблем
- Сельскохозяйственные и пищевые нужды
- С целью эстетического удовольствия (радовать глаз)

Моделирование заболеваний и изучение фундаментальных биологических процессов

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



“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.

Биофармакология – продуценты БАВ: белки, ростовые факторы, гормоны



Сельскохозяйственные и пищевые нужды

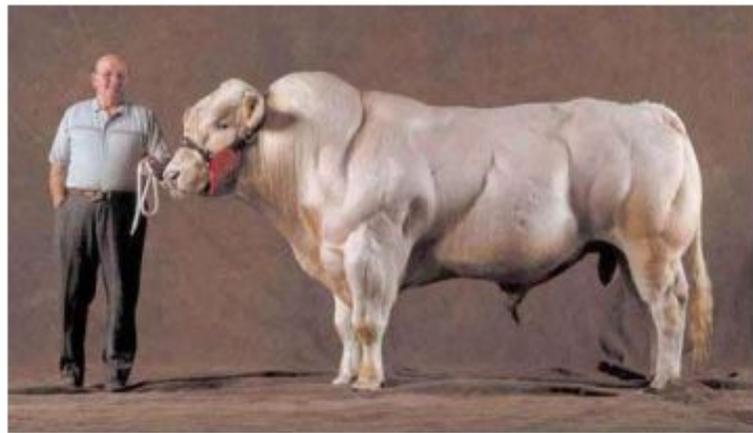
HOW THEY COMPARE



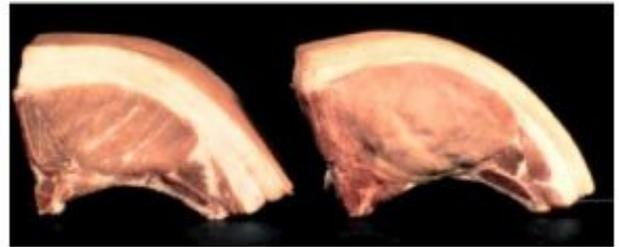
The image shows two salmon of different sizes. The larger one is labeled 'GM salmon' and the smaller one is labeled 'Farm salmon'. Callout boxes provide their respective lengths and weights. A note at the bottom states that both fish are 18 months old.

Type	Length	Weight
GM salmon	24ins	6.6lb
Farm salmon	13ins	2.8lb

*Both fish are 18 months



TRANSGENIC PIGS
more lean - less fat



Control

Transgenic

Агробиотехнологии

- появление новых азотфиксирующих растений
- Растения, устойчивые к насекомым-вредителям или грибковым заболеваниям: токсин Bt-гены, полученные от бактерии *Bacillus thuringensis*
- устойчивость к гербицидам, особенно к глифосфату (торговое название Roundup) – уничтожение сорняков при опрыскивании поля гербицидом.
- улучшение питательной ценности растений: трансгенный «золотой рис», например, отличается повышенным содержанием витамина А.
- «съедобные вакцины»
- Производство рекомбинантных белков. В настоящее время ген человеческого инсулина внедрен в некоторые бактерии, которые служат дешевым источником этого средства в качестве альтернативы инсулину свиней или коров, который использовали прежде.

Получение трансгенных растений хлопка с геном *Bt*, несущим устойчивость к насекомым. Растения хлопка были трансформированы этим вектором через агробактериальную инфекцию. Трансгенные растения оказались устойчивыми к личинкам большого числа видов насекомых

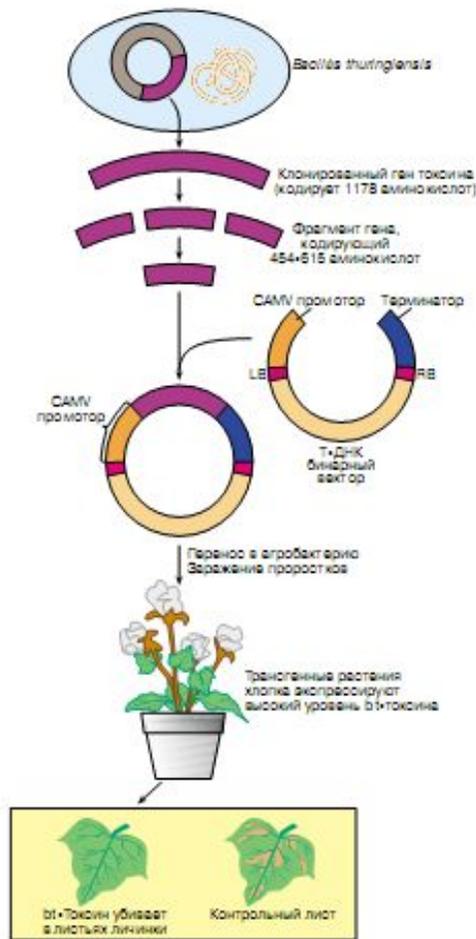


Иллюстрация уникального свойства растительной клетки – тотипотентности:

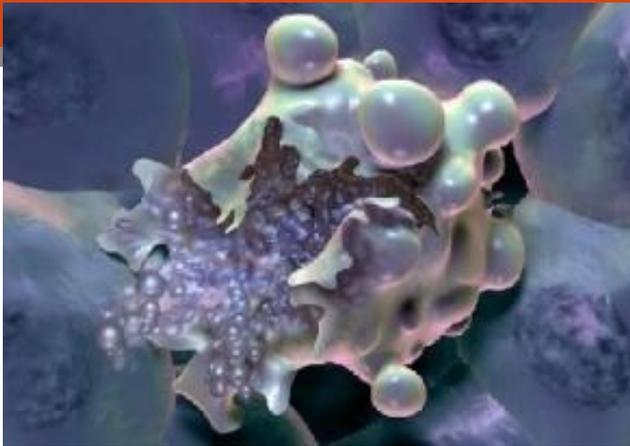
а – каллус (масса недифференцированных клеток) табака, полученный из единичных клеток; б – органогенный каллус, полученный из каллуса табака при его перенесении на среду с цитокинином; в – регенерация растений табака из органогенного каллуса

Эстетическое удовольствие

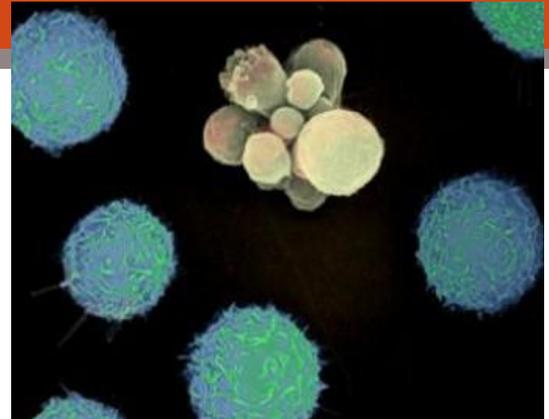


Клеточная Гибель

Некроз



Апоптоз



Суммарная масса клеток
погибших за один год
приблизительно равна массе
человека!

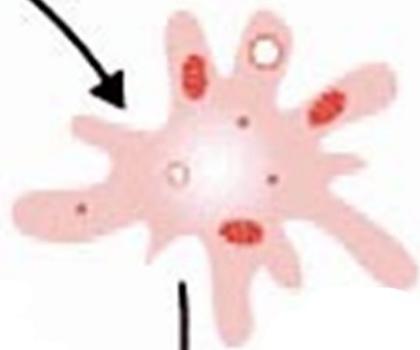
Каждую секунду в
человеке погибает 10^6
клеток! \Rightarrow к концу
доклада $10^8 - 10^9$ клеток

инициация
апоптоза

сжатие клетки
конденсация хроматина



фрагментация ядра
блеббинг



образование
апоптических
телец



Фрагментация ДНК между нуклеосомами

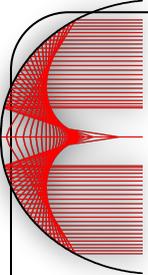
Конденсация хроматина

Фрагментация ядра

13

лизис
апоптических
телец





Заболевания связанные с нарушением механизма апоптоза

Заболевания связанные с усилением апоптоза:

Фолликулярная лимфома

Онкологические заболевания

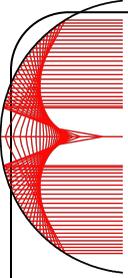
Аутоиммунные заболевания

Некоторые вирусные инфекции

Заболевания связанные с ингибированием апоптоза:

СПИД

Нейродегенеративные заболевания



Методы исследования апоптоза

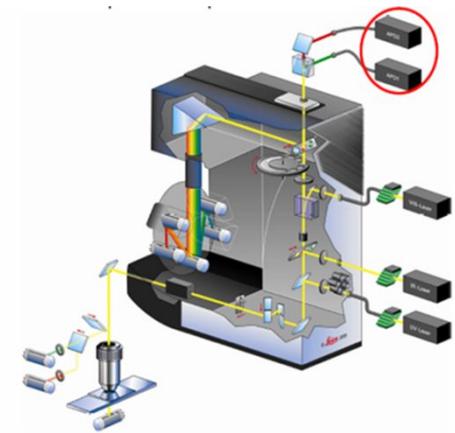
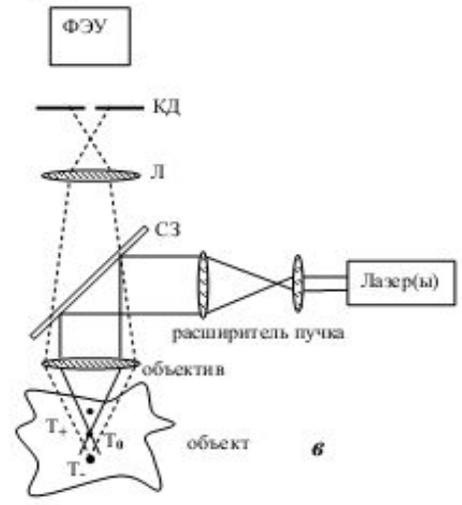
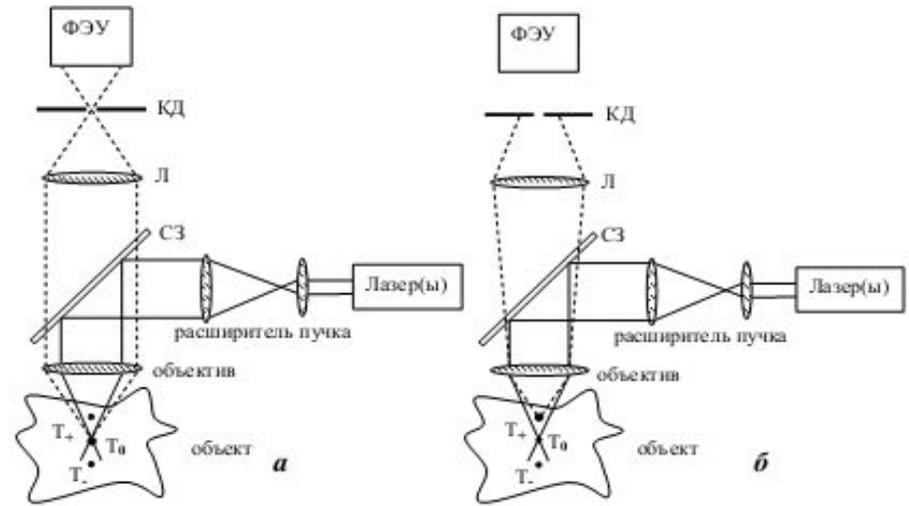
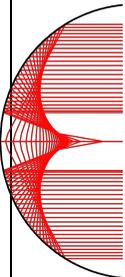
Микроскопические методы регистрации морфологических изменений (просвечивающая электронная микроскопия, конфокальная и оптическая микроскопия, флуоресцентное окрашивание и т.д.)

Биохимические методы (флуориметрический анализ активации каспаз)

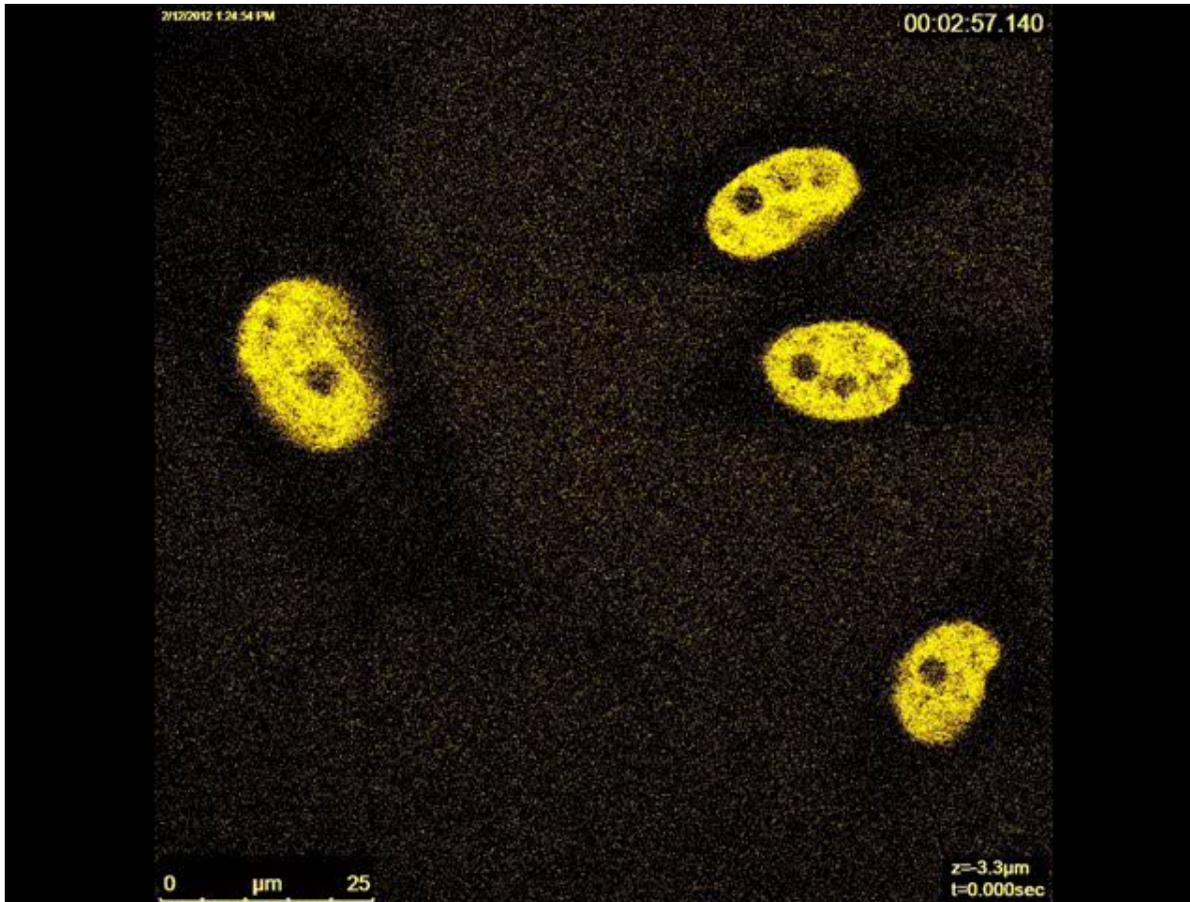
Молекулярно-биологические методы (электрофорез)

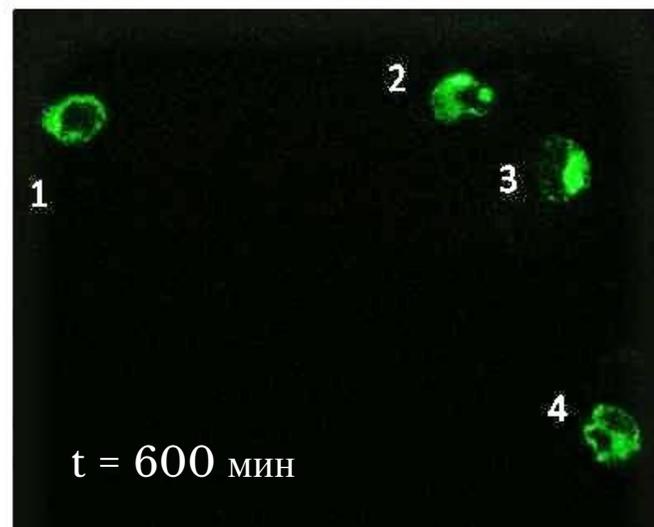
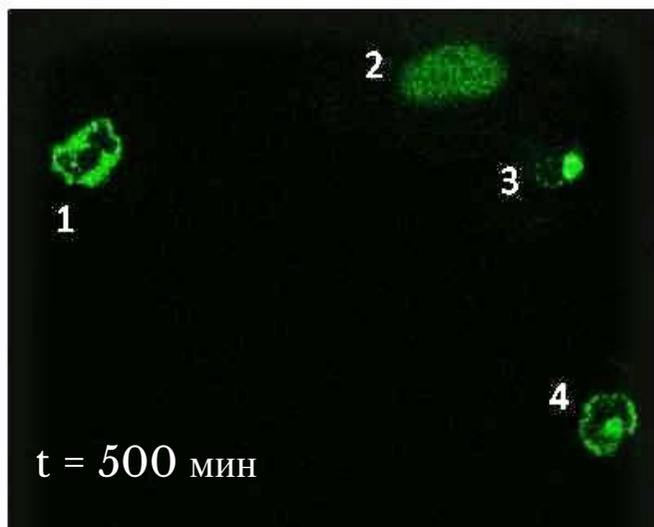
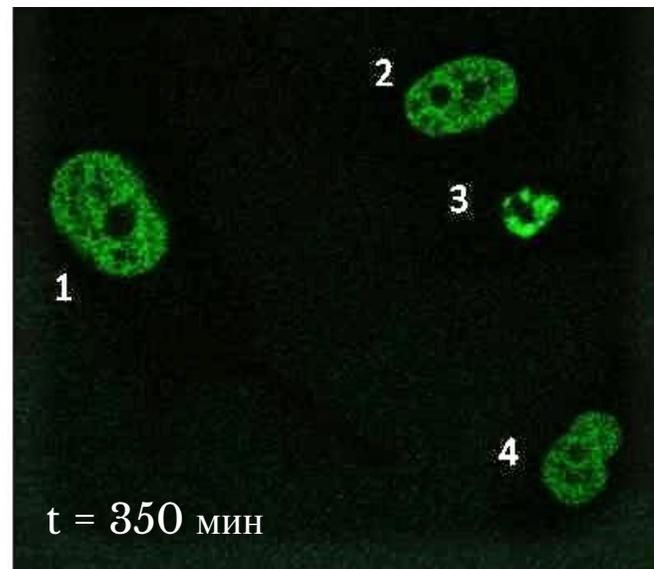
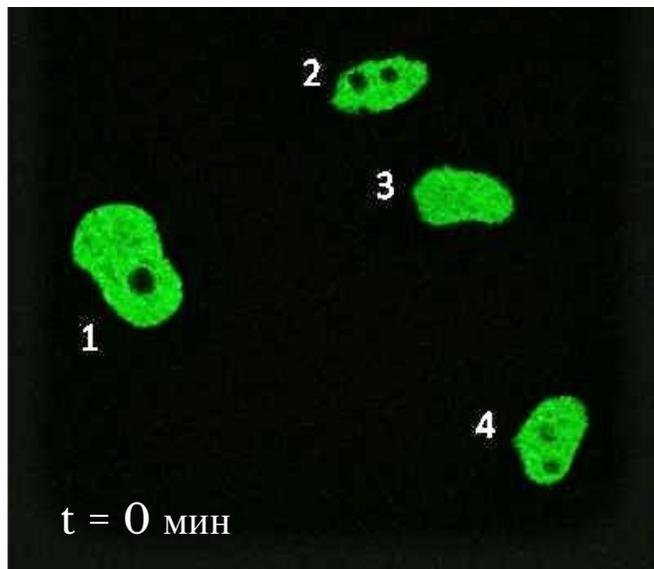
Проточная цитометрия

Конфокальная микроскопия

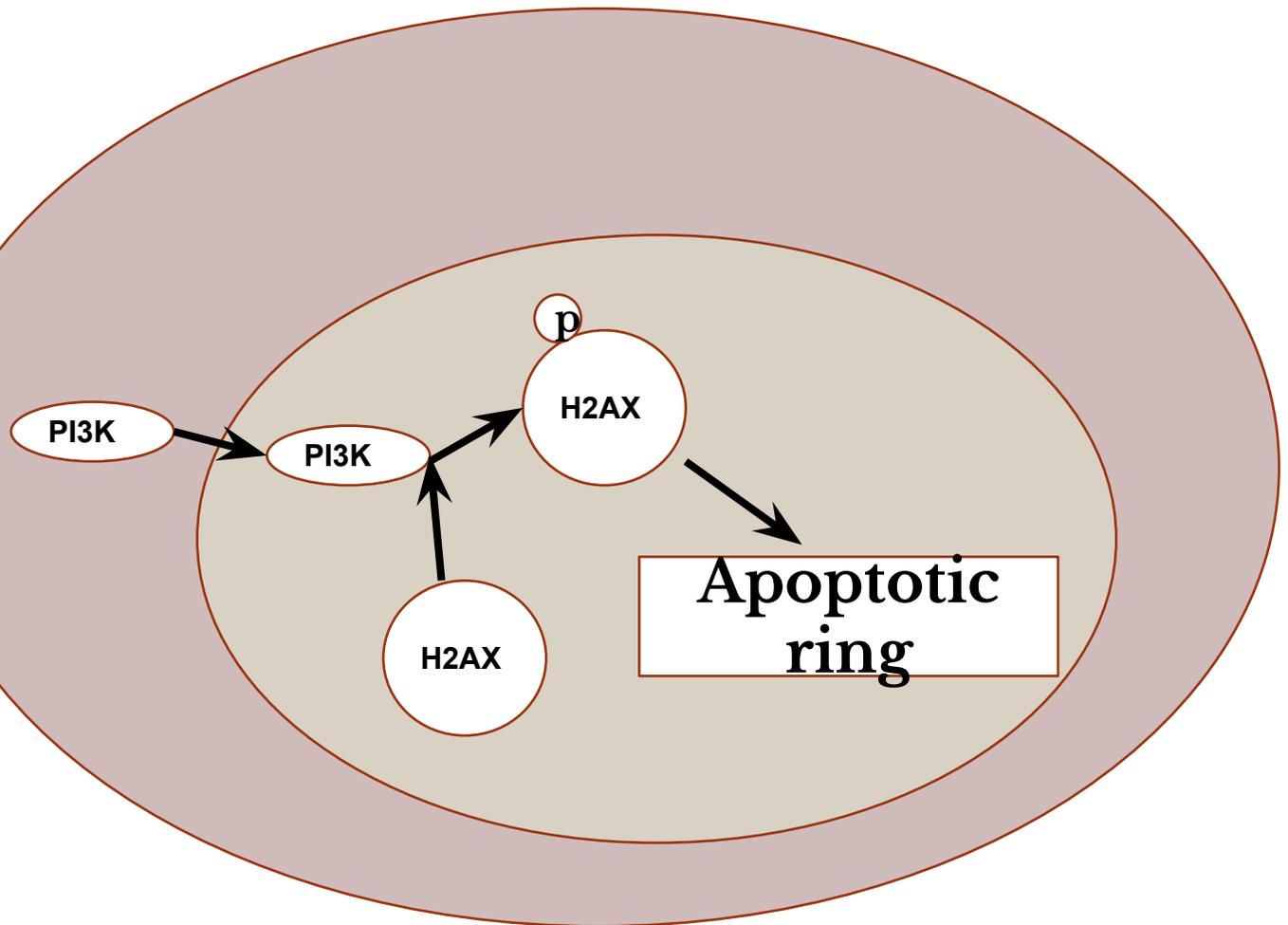


Клетки HepG2+Etoposide (стабильно экспрессирует белок H4-Dendra2)





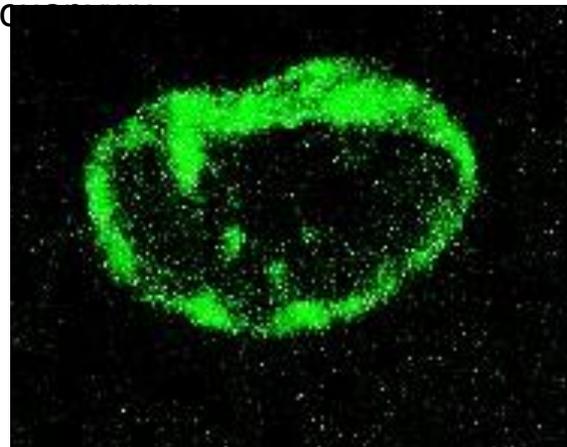
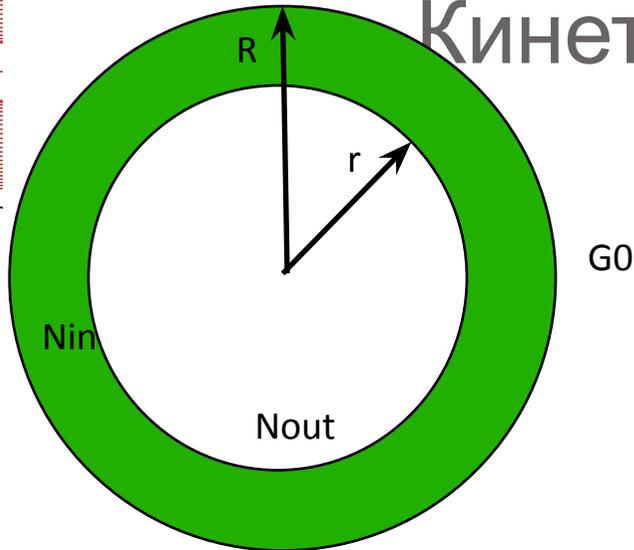
Реакционная схема конденсации хроматина



Кинетическая модель

$(V - V_1)$ – объем воды в ядре

клетке
 G_0 – концентрация Р1ЗК



$$\frac{d}{dt} N_{in} = \frac{DG_0 Rr}{R-r} \quad \text{Поток Р1ЗК через кольцо}$$

$$\alpha_{in} N_{in} + \alpha_{out} N_{out} = c(V - V_1) \quad \text{Осмотический баланс}$$

$$N_{in} + N_{out} = N_0 \quad \text{Полное количество хроматина}$$

$$\frac{4}{3} \pi \rho (R^3 - r^3) = N_{in} \quad \text{Количество конденсированного хроматина в кольце}$$

$$\frac{4}{3} \pi R^3 = V \quad \text{Объем ядра клетки}$$

$$N_0 = c(V_0 - V_1) \quad \text{Начальное условие на осмотический баланс}$$

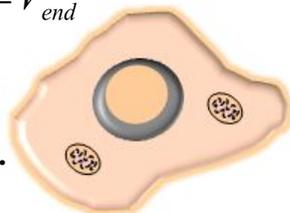
Lagphase

Pro-apoptotic stimuli
(Etoposide)

Volume

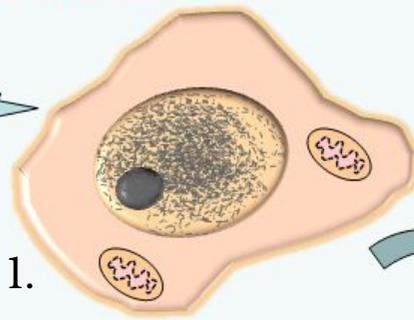
$$V = V_{end}$$

4.



Chromatin condensation;
Cell and nuclear volume
depletion

1.



Volume

$$V = V_0$$

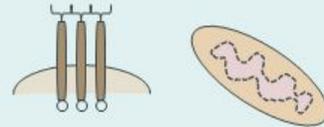
Osmotic balance

$$\alpha_{out} N_0 = c(V_0 - V_1)$$

Total amount of chromatin

$$N_{out} = N_0$$

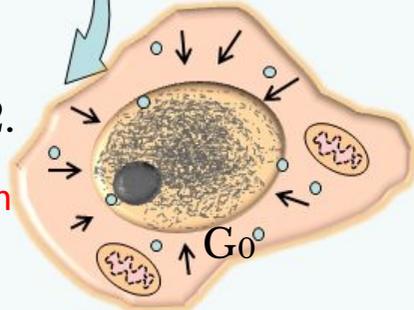
Death receptor Mitochondria



Effector Caspases

Phosphoinositide 3-kinase
activation

2.



Changes of cellular
osmolarity

Volume depletion

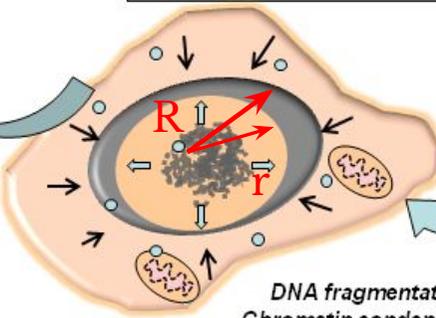
$$\frac{d}{dt} V = -\mu \frac{R r}{R - r}$$

$$\mu = \frac{1 - \beta}{N_0} DG_0 (V_0 - V_1)$$

Osmotic balance

$$\alpha_{in} N_{in} + \alpha_{out} N_{out} = c(V - V_1)$$

3.



DNA fragmentation
Chromatin condensation

Amount of the condense chromatin

$$\frac{4}{3} \pi \rho (R^3 - r^3) = N_{in}$$

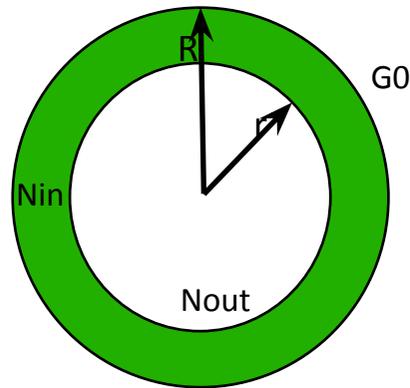
PI3K + H2AX → H2AXp
→ Apoptotic ring

$(V - V_1)$ – volume of water inside the
cell's nucleus

G_0 – concentration of PI3K from outside
 $\beta = \alpha_{in} / \alpha_{out}$

Аналитическое решение модели

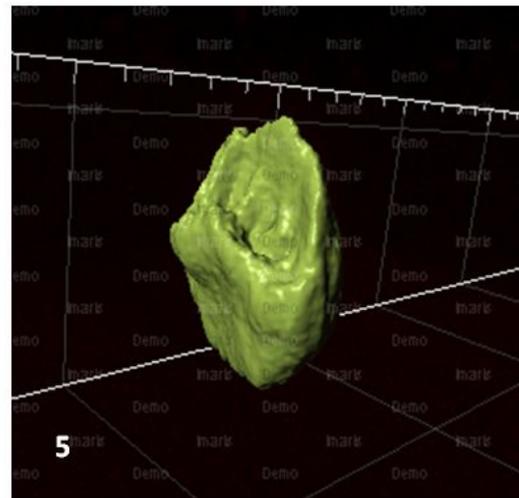
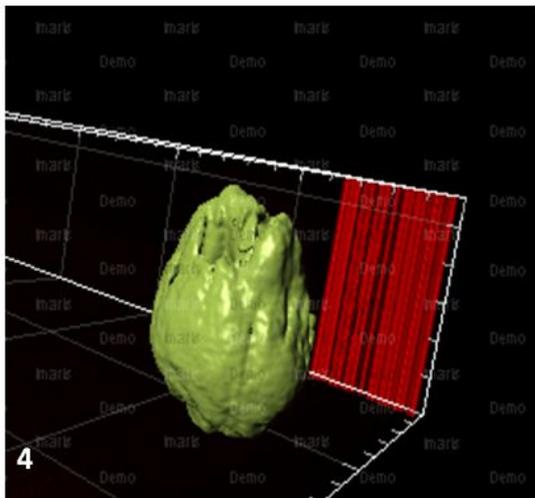
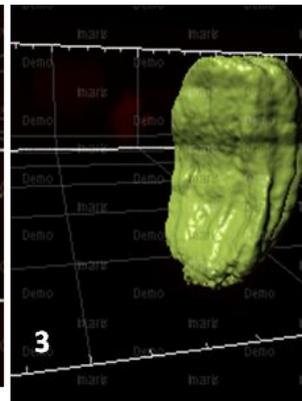
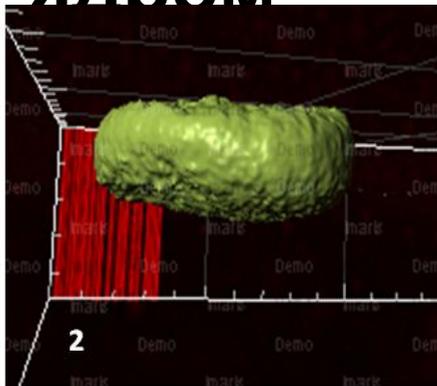
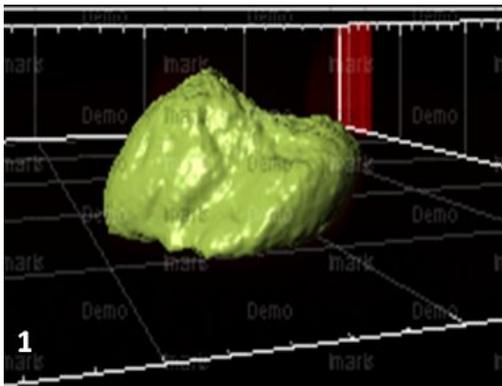
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d}{dt} V = -\mu \frac{Rr}{R-r} \\ r = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} (V(1+\eta) - \eta V_0)} \\ R = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} V} \\ \mu = \frac{1-\beta}{N_0} DG_0 (V_0 - V_1) \\ \eta = \frac{N_0}{(1-\beta)\rho(V_0 - V_1)} \\ \beta = \frac{\alpha_{in}}{\alpha_{out}} \end{array} \right. \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} A = \frac{2(1+\eta)\mu}{3V_0^{2/3}} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{1/3} = \\ = - \frac{\left(\frac{V_{end}}{V_0} (1+\eta) - \eta \right)^{2/3} - (1+\eta) \left(\frac{V_{end}}{V_0} \right)^{2/3} + \eta}{T_{end} - T_0} \\ \eta = \frac{V_{ring_end}}{V_0 - V_{end}} \\ \delta = \frac{V_{ring_end}}{V_0} \end{array} \right.$$



Решени

$$\left(\frac{V}{V_0} (1+\eta) - \eta \right)^{2/3} - (1+\eta) \left(\frac{V}{V_0} \right)^{2/3} + \eta = - \frac{2(1+\eta)\mu}{3V_0^{2/3}} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{1/3} (t - T_0)$$

3D Конструирование клеток НерG2 с прокрашенным ядром



Экспериментальная кривая Imaris + Sobel

Глубина, диаметр

