

Дейкин Алексей Васильевич

Получение и исследование лактоферрина человека, синтезируемого с молоком
трансгенных мышей

Специальность 03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Москва 2009

Работа выполнена в лаборатории трансгенеза Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН.

Научный руководитель	кандидат химических наук Садчикова Елена Рубеновна
Научный консультант	доктор биологических наук, профессор Георгиева Софья Георгиевна
Официальные оппоненты	доктор биологических наук Юдинкова Елена Станиславовна кандидат медицинских наук Городецкий Станислав Иванович
Ведущая организация	Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится «11» декабря 2009 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан «11» ноября 2009 года

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук

Л.С. Грабовская

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

В современной медицине большое внимание уделяется биологически активным белкам человека как лекарственным средствам. Такие белки принято называть лекарственными, они высокоэффективны и биологически безопасны. К их числу относятся различные гормоны, ферменты, факторы свёртываемости крови, роста тканей и др. Существенным препятствием на пути развития новой области фармацевтики является практическая невозможность получения необходимых белков в промышленных масштабах из жидкостей и тканей самого человека. В связи с этим в последние десятилетия для получения лекарственных белков человека использовались биотехнологические методы, главным образом, микробный синтез. В качестве продуцентов лекарственных белков человека также используются водоросли, высшие растения, грибы. Таким путём получают инсулин, интерфероны, некоторые факторы свёртываемости крови и ряд иммуномодуляторов. К сожалению, ни одна из этих биотехнологических систем не смогла в полной мере обеспечить идентичность рекомбинантных белков человека природным, в частности, необходимые посттрансляционные модификации структуры белка. Крайне сложным оказался процесс очистки таких рекомбинантных белков. Их применение нередко сопровождалось аллергическими реакциями у пациентов. Кроме того, такое производство лекарственных белков человека оказалось экологически проблемным. В ряде стран оно выводится из хозяйственного обращения. Проблему получения рекомбинантных белков человека также пытаются решить с использованием культивируемых соматических клеток, однако этот путь длителен и дорогостоящ.

В связи с этим возникла идея в качестве биореакторов лекарственных белков человека использовать трансгенных сельскохозяйственных животных, в частности, продуцирующих эти белки с молоком. Исследования в этом направлении ведутся в ряде индустриально развитых стран. В разработке находятся более 50 лекарственных белков человека, для одних из которых получены трансгенные животные, для других проводятся доклинические или клинические испытания.

Несмотря на отдельные практические достижения, проблема получения лекарственных белков человека с использованием трансгенных животных нуждается в глубокой научной проработке. В числе её актуальных вопросов находится генное конструирование, технология получения трансгенных животных, обеспечение экспрессии генов интереса и передача трансгена в ряду поколений, получение промышленных стад животных-продуцентов.

Цель работы:

Получение и исследование ключевого белка человека – лактоферрина, обеспечивающего антибактериальную защиту детей раннего возраста, из молока трансгенных мышей, а также выбор оптимальных генных конструкций, обеспечивающих продукцию полноценного лактоферрина человека с молоком трансгенных животных и передачу рекомбинантного гена последующим поколениям.

Задачи:

1. Получить первичных трансгенных по различным конструкциям с геном лактоферрина человека мышей.
2. Выбрать генную конструкцию, обеспечивающую наибольшую продукцию рекомбинантного лактоферрина человека с молоком трансгенных мышей.
3. Проследить передачу трансгена в ряду поколений животных.
4. Определить динамику продукции рекомбинантного лактоферрина человека на протяжении лактации.
5. Определить соответствие рекомбинантного лактоферрина человека природному по физико-химическим и биологическим свойствам.
6. Определить влияние трансгена лактоферрина человека на состояние здоровья трансгенных мышей.
7. Определить перспективность получения первичных трансгенных сельскохозяйственных животных – продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека – на основе исследованных генетических конструкций.

Новизна и достоверность предложенных методов и решений материалов диссертационной работы

Установлено, что выбранные генные конструкции обеспечивают высокий, экономически значимый уровень продукции рекомбинантного лактоферрина человека с молоком трансгенных мышей. Средний уровень продукции рекомбинантного лактоферрина человека для лучшей генной конструкции в ряду поколений трансгенных животных составил 16,7 г/л. У отдельных животных установлен высокий уровень продукции рекомбинантного лактоферрина человека с молоком – до 40,0 г/л. В одной из линий трансгенных мышей обнаружены особи с необычно высоким уровнем продукции лактоферрина человека от 80,0 до 160,0 г/л. Определена динамика продукции рекомбинантного белка в течение периода лактации и исследована передача трансгена до 8-го поколения от первичных трансгенных животных. Для мышей, как вида многоплодных животных, установлено, что с использованием самцов и самок, трансгенных по наиболее удачным генным конструкциям, можно получить характеризующееся такими же свойствами потомство. Показано соответствие рекомбинантного лактоферрина природному по основным физико-химическим показателям и биологическим свойствам.

Практическая и научная значимость, положения, выносимые на защиту

Получены новые материалы, характеризующие экспрессию генов человека у трансгенных животных. Результаты работы реализованы при выполнении программ Союзного государства России и Беларуси «БелРосТрансген» и «БелРосТрансген-2». Усовершенствованные методы создания первичных трансгенных животных при личном участии соискателя использованы для получения первичных трансгенных сельскохозяйственных животных, что привело к рождению трансгенных

козлов Лак-1 и Лак-2, несущих в своём геноме ген лактоферрина человека. Популяционные исследования трансгенных мышей будут использованы при планировании создания стад трансгенных сельскохозяйственных животных – промышленных продуцентов рекомбинантных белков человека.

В процессе выполнения диссертационной работы:

- Обследовано 67 первичных трансгенных по конструкциям с геном лактоферрина человека мышей.
- Установлено, что использованные конструкции с геном лактоферрина человека обеспечивают тканеспецифичную экспрессию трансгена.
- Получено 3885 потомков первичных трансгенных мышей до 8-го поколения.
- Определён уровень продукции рекомбинантного белка в зависимости от использованной генетической конструкции, количества копий встроившегося трансгена, дня лактации и возраста лактирующей самки мышей.
- Проведено сравнение свойств рекомбинантного лактоферрина, выделенного из молока трансгенных мышей, и природного белка человека.
- Определена перспектива получения на основе исследованных конструкций первичных трансгенных коз.

Апробация работы и личный вклад соискателя

Результаты работы представлены на 8-й и 9-й международных конференциях «Лактоферрин: структура, функция и использование» (г. Ницца, Франция, 2007; г. Пекин, Китай, 2009) и на Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (г. Казань, Россия, 2009).

Соискатель проанализировал литературу по теме исследования, осуществил планирование экспериментов, их научный анализ и статистическую обработку полученных результатов, которые представил в статьях и докладах на конференциях. В ходе выполнения диссертационной работы автор овладел современной технологией получения трансгенных животных методом микроинъекции рекомбинантной ДНК в мужской пронуклеус зигот, методами культивирования эмбрионов, а также предложил ряд оригинальных, практически значимых усовершенствований в технологию вымывания и трансплантации эмбрионов животных. Соискателем созданы уникальные линии трансгенных мышей, позволившие изучить характер передачи трансгена и условия, обеспечивающие высокую продукцию рекомбинантного лактоферрина человека с молоком трансгенных животных, которые депонированы в «Трансгенбанке» ИБГ РАН.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 121 странице, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы (228 источников). Работа содержит 8 таблиц и 31 рисунок.

Результаты и обсуждение

Генные конструкции

В лаборатории академика Ю.В. Ильина Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН были получены 9 генных конструкций, содержащих ген лактоферрина человека. Конструкции были созданы на основе вектора pBC1 из набора “pBC1 Milk Expression Vector Kit” (Invitrogen):

- LTF2 – кДНК лактоферрина размером 2100 п.н., клонирована в вектор pBC1 по сайту XhoI;
- LTF3 – гибридная конструкция лактоферрина, первая часть которой – геномная копия с 1 по 7 экзон (14479 bp, с ATG кодона до SmaI сайта), а вторая часть – кДНК (1331 bp, от SmaI сайта до Stop кодона), клонирована в вектор pBC1 по сайту XhoI. Эти две части состыкованы по SmaI сайту, который находится в 7 экзоне. 3' некодируемая область из гена β -казеина коз;
- LTF4 – кДНК лактоферрина размером 2100 п.н., клонирована в вектор pBC1 по сайту XhoI, промотор заменён на α -казеиновый;
- LTF5 – геномная последовательность лактоферрина длиной 35013 bp, начиная с ATG кодона, клонирована в вектор pBC1 по сайтам XhoI и NotI;
- LTF6 – геномная последовательность лактоферрина длиной 28672 bp, начиная с ATG кодона, клонирована в вектор pBC1 по сайту XhoI, промотор заменён на α -казеиновый;
- LTF7 – геномная последовательность лактоферрина длиной 28672 bp, начиная с ATG кодона, клонирована в вектор pBC1 по сайту XhoI;
- LTF8 – из конструкции LTF7 удалены инсуляторы перед β -казеиновым промотором;
- LTF10 – геномная последовательность лактоферрина длиной 35013 bp, начиная с ATG кодона, клонирована в вектор pBC1 по сайтам XhoI и NotI, промотор заменён на собственный промотор гена лактоферрина человека;
- LTF11 – гибридная конструкция лактоферрина, первая часть которой – геномная копия с 1 по 7 экзон (14479 bp, с ATG кодона до SmaI сайта), а вторая часть – кДНК (1331 bp, от SmaI сайта до Stop кодона), клонирована в вектор pBC1 по сайту XhoI. Эти две части состыкованы по SmaI сайту, который находится в 7 экзоне. 3' некодируемая область из гена лактоферрина человека;

На рисунке 1 представлены наиболее удачные конструкции.

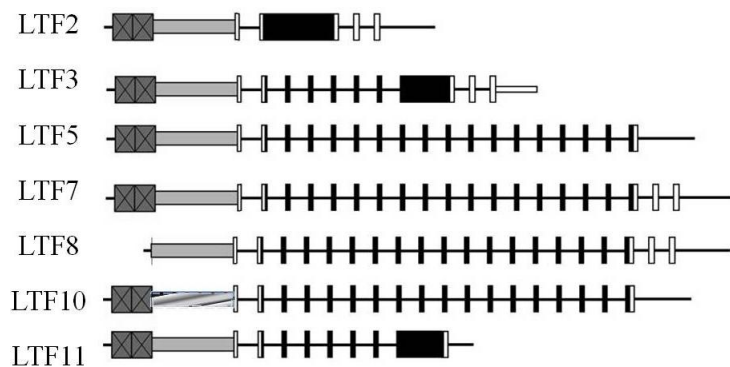


Рисунок 1. Структура наиболее удачных экспрессионных конструкций с геном лактоферрина человека. Две копии инсулятора отмечены крестами, серым цветом выделен β -казеиновый промотор, серым со штриховкой промотор гена лактоферрина человека, чёрным отмечены кодирующие области лактоферрина, белым отмечены нетранслируемые области.

Получение первичных трансгенных мышей

В совокупности рекомбинантной ДНК было микроинъектировано в мужской пронуклеус 3905 зигот, которые пересадили 231 реципиенту. В результате было получено 324 животных-трансплантатов, среди которых 1,72% оказались трансгенными. При этом было отмечено, что количество рождающегося потомства варьировало от сезона, когда проводились эксперименты.

Мы пытались увеличить количество трансплантируемых эмбрионов, однако это не давало соответствующего увеличения выхода мышат. Интересным оказался следующий факт: увеличение количества трансплантированных эмбрионов не приводит к увеличению выхода мышат (коэффициент ранговой корреляции Спирмена 0,13), как и выхода трансгенов (коэффициент ранговой корреляции -0,18). Среди родившихся трансгенных мышат отхода практически не было.

Специфичность экспрессии трансгена

Продукция лактоферрина человека в целом была тканеспецифичной в молочной железе. Для анализа были взяты образцы тканей и органов трансгенных по конструкциям LTF5, LTF10 и LTF11 мышей.

Передача трансгена в ряду поколений трансгенных мышей

Из 67 первичных трансгенных мышей потомство было получено от 54 (80,6%), а трансгенные потомки были только у 44 (81,5%) из них, 23 (34,3%) первичных трансгена не оставили трансгенного потомства. Размножались, но не передали трансген потомству 8 первичных трансгенных самок и 2 первичных трансгенных самца, от которых было получено 152 потомка.

От 18 (56,3%) передающих трансген потомкам первичных трансгенных самок в F1 было получено 360 мышат: из них 157 (43,6%) самцы, 203 (56,4%) самки; трансгенными оказались 118 (32,8%) животных: 51 самец (32,5%) и 67 самок (33%). Внутри различных линий эффективность передачи трансгена в 1-ом поколении значительно варьировала: от 85,7% в линии LTF5 146 до 6,8% в линии LTF11 126.

От 26 (74,3%) передающих трансген потомкам первичных трансгенных самцов в F1 было получено 1023 мышонка: из них 494 (48,3%) были самцами, 529 (51,7%) самками; трансгенными

оказались 295 (28,8%) животных: 129 самцов (26,1%) и 166 самок (31,4%). Внутри различных линий эффективность передачи трансгена в 1-ом поколении также варьировала от 73,3% в линии LTF5 138 до 3,4% в линии LTF6 728. Эти значения были рассчитаны для популяции в целом, но, поскольку речь идёт о размножении значительного числа первичных трансгенных животных, мы статистически обработали данные по отдельным линиям. Результат такого анализа представлен на рисунке 2.

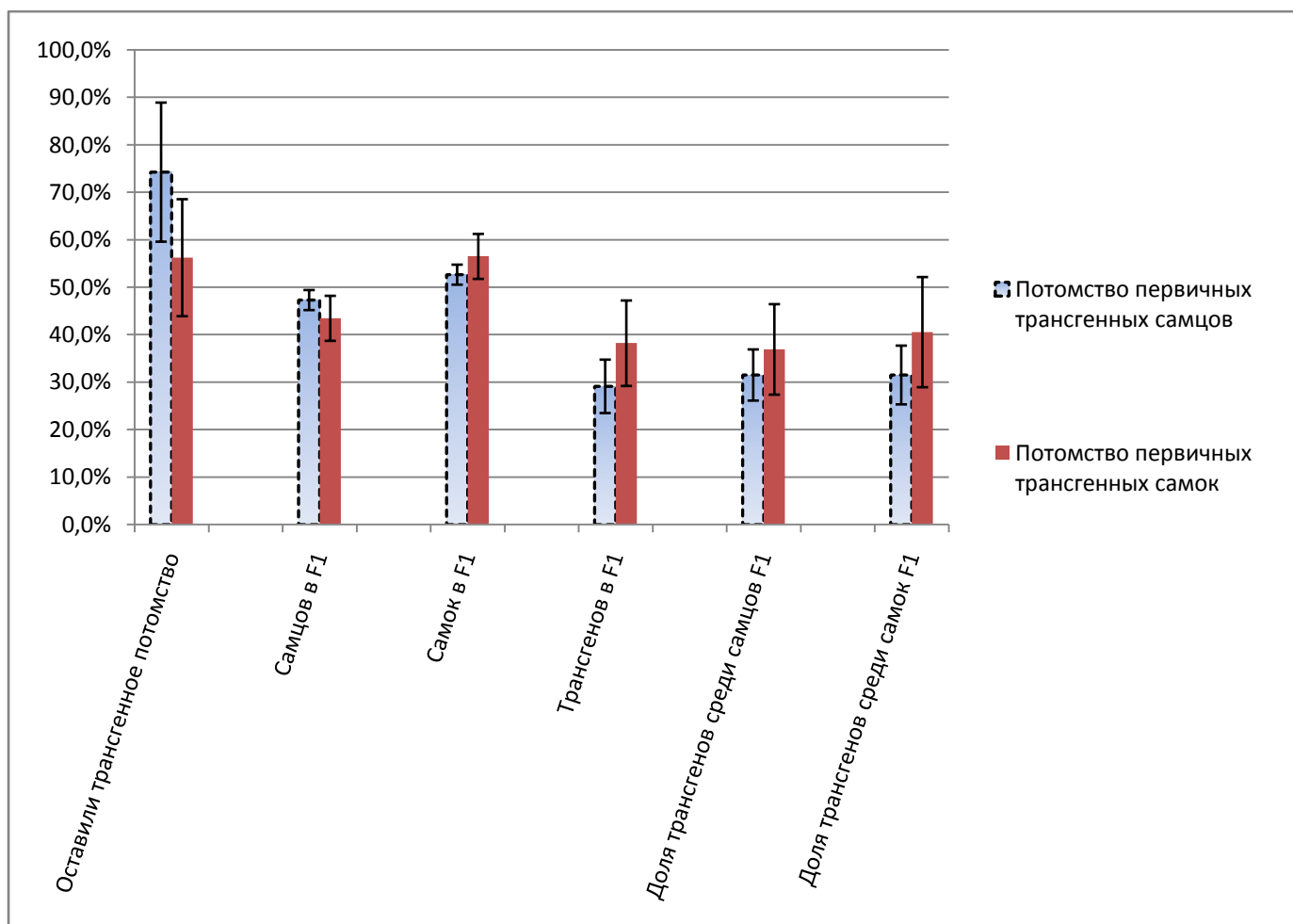


Рисунок 2. Статистический анализ результатов размножения первичных трансгенных мышей.

Из рисунка 2 видно, что для всех случаев отличия в количестве трансгенных потомков первичных трансгенных самцов и самок являются статистически недостоверными. Интересно отметить, что в целом для популяции и для потомков, как самцов, так и самок достоверно отличаются значения количества самцов и самок в F1; это, по-видимому, отражает биологическую закономерность репродукции этого вида в данных условиях содержания. В то же время достоверных различий между долями трансгенов среди самцов и самок в F1 нет, что указывает на не зависящее от пола наследование рекомбинантного гена, а большее количество трансгенных самок связано с большим количеством самок в F1.

В базе данных мы имеем записи о размножении отдельных первичных трансгенов до F8 (линия LTF2 219), в-среднем же, первичные трансгены были размножены до 2-3-го поколения. До F5 результаты размножения первичных трансгенов могут быть статистически обработаны, до F6-F8

размножены только отдельные линии. Результат нашего анализа представлен на рисунке 3. Для сравнения приведён результат для F1, но при расчёте среднего для всех поколений он не учитывался, поскольку значительные отклонения (особенно для самцов) связаны с индивидуальными особенностями первичных трансгенных животных-родителей, в частности, с их возможной мозаичностью.

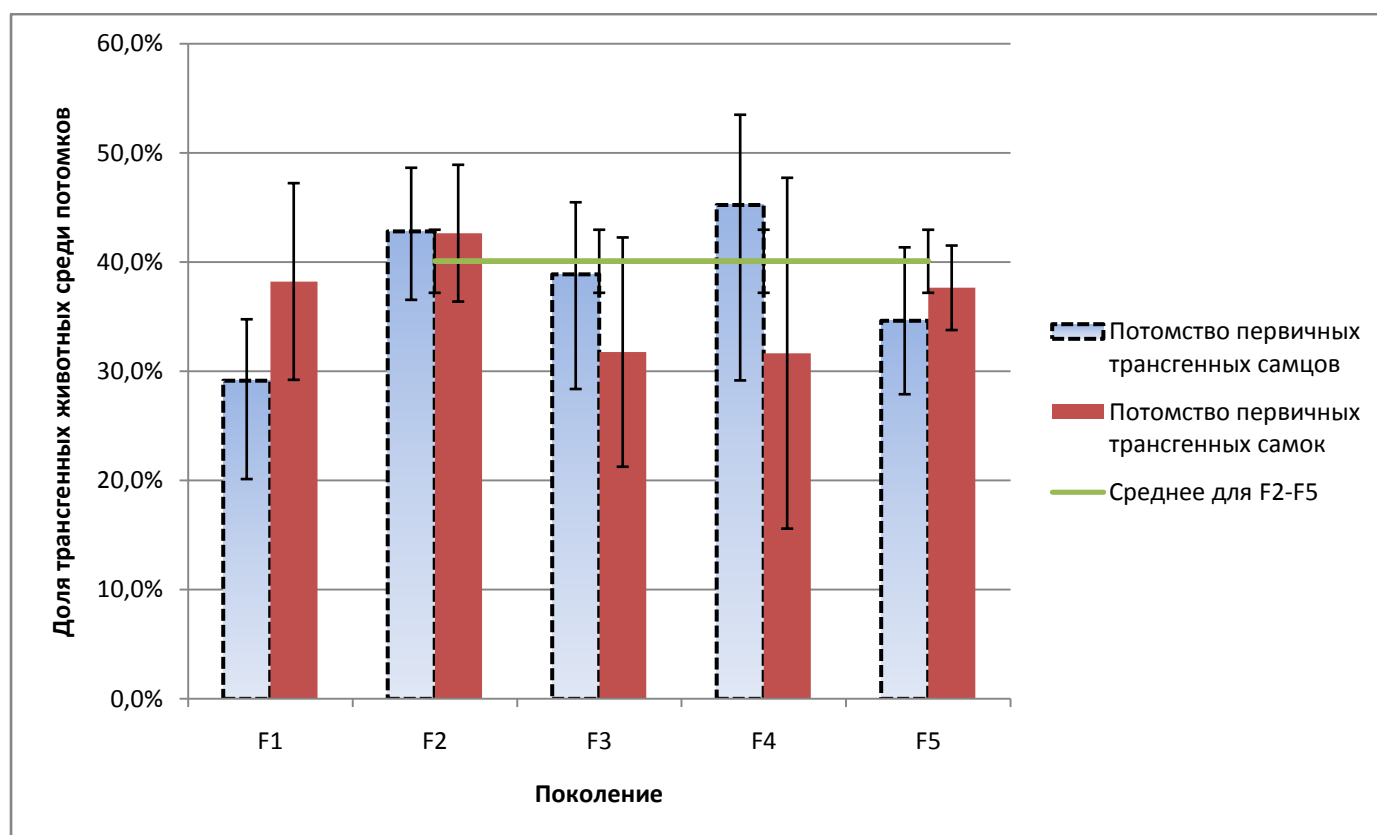


Рисунок 3. Передача трансгена в поколениях.

Из рисунка 3 видно, что, во-первых, значимых различий в эффективности передачи трансгена в поколениях в линиях первичных трансгенных самцов и самок нет, во-вторых, нет значимых различий между эффективностью передачи трансгена в F2-F5 и средним для всех поколений уровнем 40%. Показатель этот является крайне важным, поскольку определяет возможность получения на основе исследованных конструкций с помощью использованного метода первичных трансгенных сельскохозяйственных животных и стад их потомков без риска значительного снижения уровня передачи трансгена в поколениях и без необходимости получения гомозиготных по трансгену животных.

Продукция рекомбинантного лактоферрина человека с молоком первичных трансгенных самок и дочерей первичных трансгенных самцов мыши

В экспериментах по гену лактоферрина человека было получено 67 первичных трансгенных мышей. Из них самок – 32 (48%). У 25 (78%) из них были взяты пробы молока, всего 46 образцов. Из 7 первичных трансгенных самок, не охарактеризованных по продукции рекомбинантного белка с молоком, 6 потомства не дали и не лактировали.

Первичные трансгенные самки получены для всех исследованных ДНК-конструкций с геном лактоферрина человека, кроме LTF6. Максимальный уровень продукции рекомбинантного белка с молоком этих мышей составил 40,0 г/л (LTF5), средний для всех конструкций $7,1 \pm 1,43$ г/л, средний для лучшей из конструкций LTF5 – $27,0 \pm 5,58$ г/л (рисунок 4).

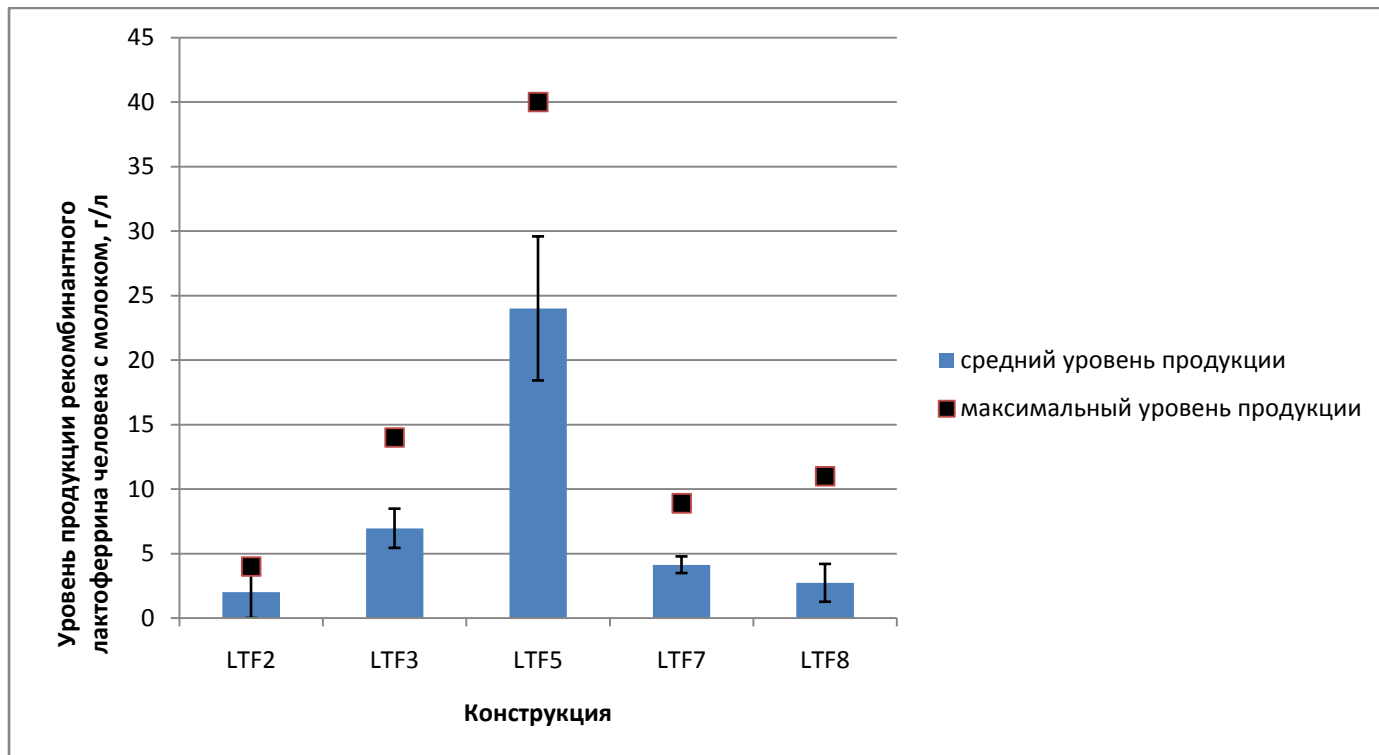


Рисунок 4. Продукция рекомбинантного лактоферрина человека с молоком первичных трансгенных самок.

На рисунке 4 сравниваются максимальные и средние уровни продукции рекомбинантного белка в молоке первичных трансгенных по гену лактоферрина человека мышей в зависимости от использованной генной конструкции. Приведены результаты только для конструкций, для которых первичные трансгенные мыши продуцировали этот белок с молоком. Первичные трансгенные самки по конструкциям LTF4, LTF10 и LTF11 не показали продукции рекомбинантного белка в молоке, и в диаграмме их результаты не указаны, но при расчёте среднего уровня продукции для всех конструкций они учитывались. Из диаграммы видно, что продукция лактоферрина человека с молоком первичных трансгенных по конструкции LTF5 мышей значительно превосходила как по максимальному, так и по среднему значению остальные варианты, даже с учётом значительных колебаний индивидуальных значений для разных животных.

Тут же надо отметить, что уровень продукции рекомбинантного белка мышами, трансгенными по конструкции LTF3, практически соответствует среднему для всех конструкций, а фактически выше всех, кроме LTF5, и значительно более стабилен. Максимальный результат для конструкции LTF3 также уступает только таковому для LTF5. Остальные конструкции продемонстрировали средний результат от 2,0 г/л до 4,11 г/л. Из 25 охарактеризованных по продукции лактоферрина человека с молоком первичных трансгенных мышей 6 (24%) рекомбинантного белка не

продуцировали; в то же время в молоке самок F1 и F2, полученных от одной из этих мышей, концентрация рекомбинантного белка достигала 18,7 г/л. Большое количество трансгенных, но не продуцирующих белок с молоком животных можно объяснить, во-первых, высокой вероятностью рождения животных-мозаиков при использовании метода микроинъекции ДНК в пронуклеус зигот (они, неся трансген в коже, могут не иметь его в молочной железе); во-вторых, из-за неспецифичного встраивания трансгена в геном возможна ситуация, когда генетическое окружение препятствует экспрессии гена, несмотря на наличие инсуляторов в составе конструкции.

На рисунке 5 сравниваются индивидуальные значения максимального уровня продукции рекомбинантного белка и количество копий трансгена в геноме мыши. Мы располагаем такими результатами для 9 животных. В эту выборку не вошла самка, показавшая максимальный уровень продукции рекомбинантного белка (160,0 г/л), так же как и первичные трансгенные мыши, не продуцирующие лактоферрин человека в молоке.

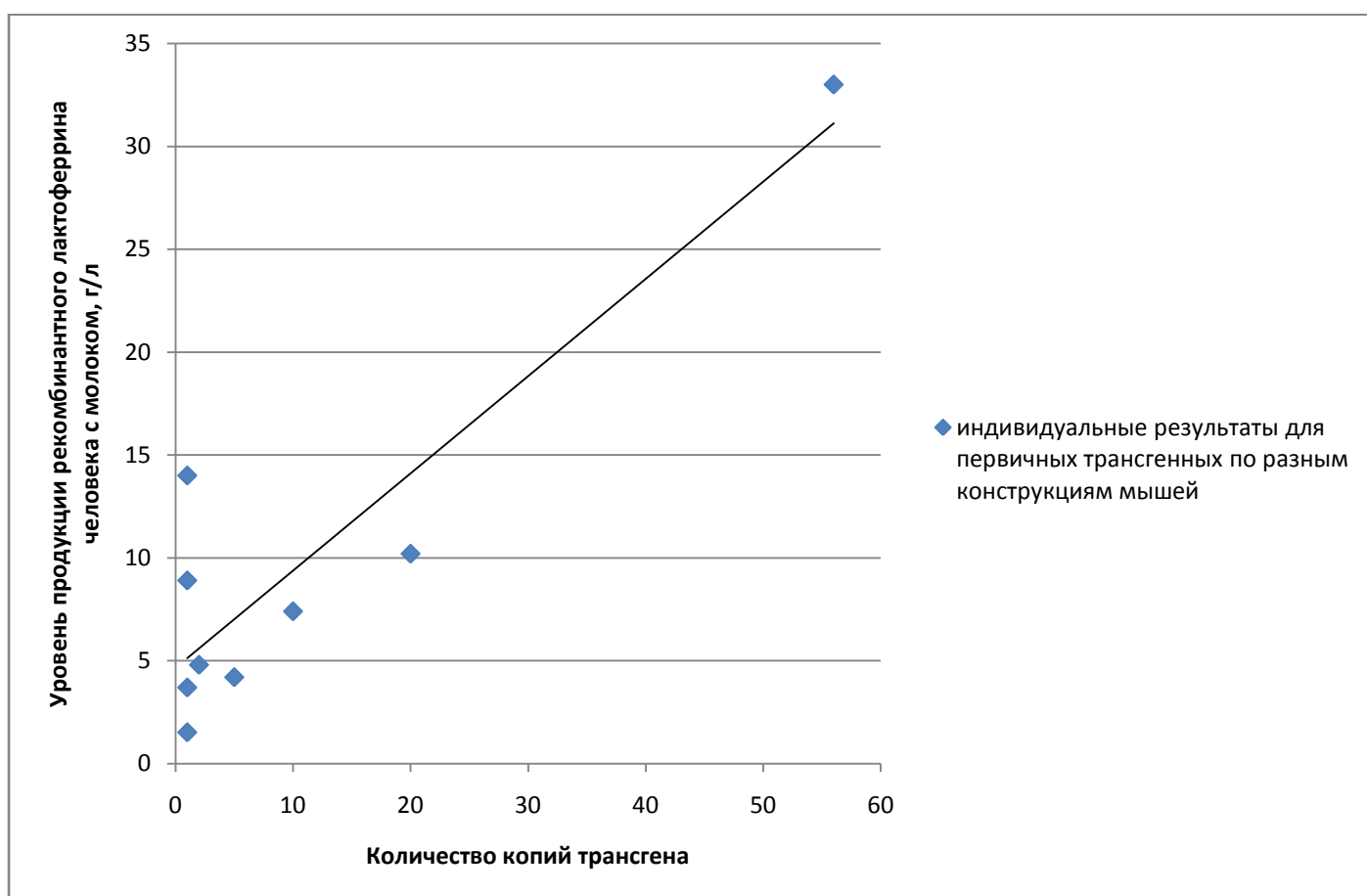


Рисунок 5. Продукция рекомбинантного лактоферрина человека с молоком первичных трансгенных самок в зависимости от количества встроившихся копий трансгена.

Коэффициент ранговой корреляции оказался равен 0,6, что соответствует умеренной корреляции, причём корреляция оказалась положительной.

Из рисунка 5 видно, что наибольшему уровню продукции рекомбинантного белка у первичных трансгенных самок соответствует наибольшее количество встроившихся копий трансгена, в то время как 1 копия в среднем обеспечивает продукцию рекомбинантного белка на уровне $7,03 \pm 2,8$ г/л.

Сравнивая этот результат с данными по всей популяции, можно отметить, что на бóльшей выборке средняя продукция рекомбинантного белка при встроившейся 1 копии трансгена составила $5,88 \pm 1,2$ г/л, а максимальному значению продукции в 160,0 г/л соответствует максимальное количество копий встроившегося трансгена – 230.

Охарактеризовать первичных трансгенных самцов мыши по продукции рекомбинантного лактоферрина человека можно, исследуя молоко их дочерей. Такая постановка задачи – единственно возможная, и это удлиняет время получения результата, но в итоге мы имеем значительное число образцов для анализа.

Из 67 первичных трансгенных по гену лактоферрина человека мышей 35 (52%) оказались самцами. Трансгенные самцы получены для всех конструкций. Из них 7 (20%) не оставили потомства, а из 28 размноженных 3 (11%) не дали трансгенного потомства. У 4 первичных трансгенных самцов (в том числе, у всех трансгенных по конструкции LTF4 самцов) трансгенные дочери были получены, молоко от них мы не брали. Таким образом, по продукции рекомбинантного белка с молоком дочерей был охарактеризован 21 первичный трансгенный самец. Проанализировано 130 проб молока от 90 трансгенных дочерей первичных трансгенных самцов.

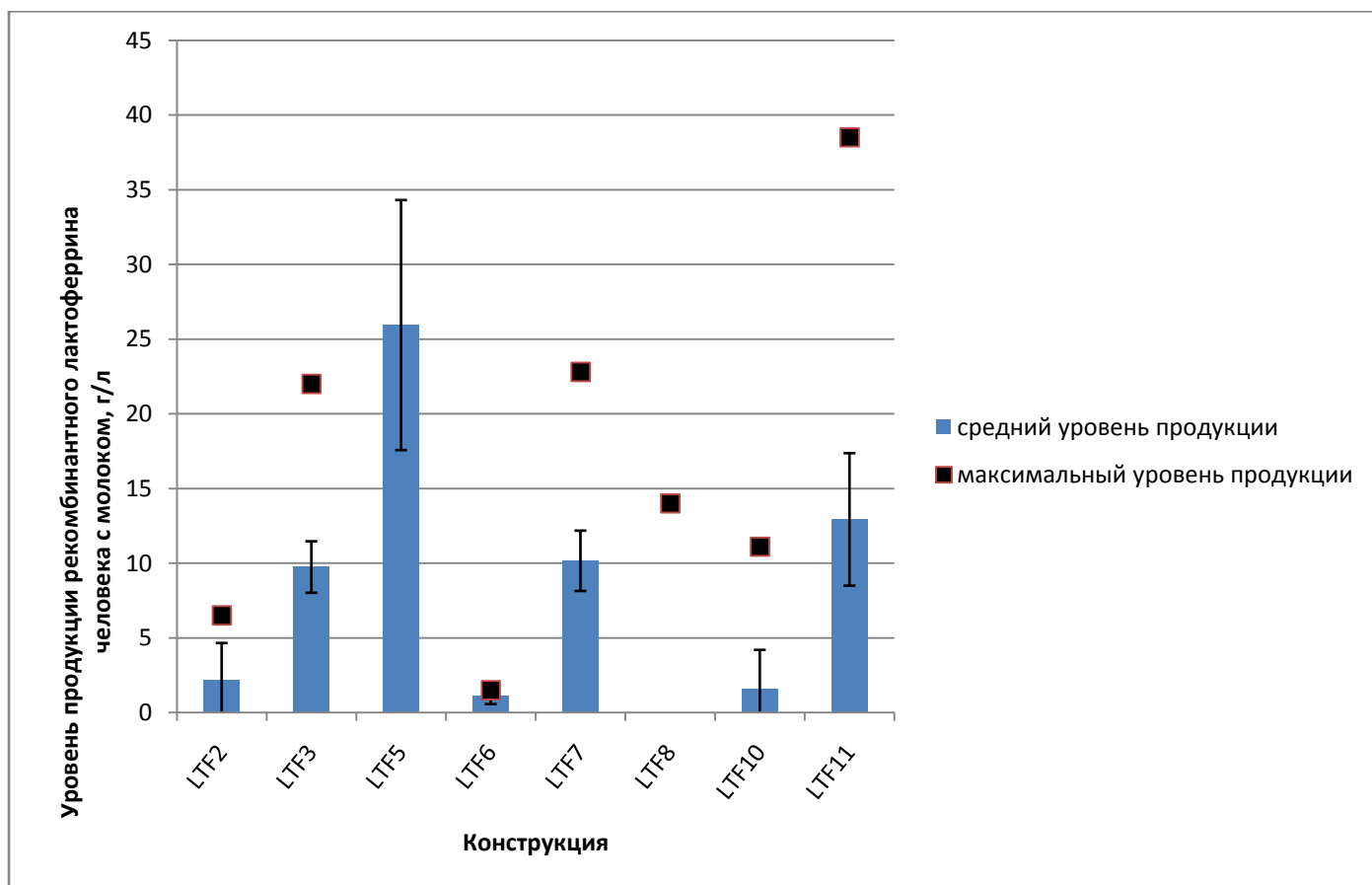


Рисунок 6. Продукция рекомбинантного лактоферрина человека с молоком дочерей первичных трансгенных самцов.

Максимальный уровень продукции рекомбинантного белка с молоком дочерей первичных трансгенных самцов, зарегистрированный в наших экспериментах, составил 160,0 г/л (LTF5),

средний для всех конструкций – $13,95 \pm 1,68$ г/л, средний для лучшей конструкции LTF5 – $25,26 \pm 5,0$ г/л (рисунок 6). На рисунке 6 для удобства анализа не указан максимальный результат для конструкции LTF5, а для конструкции LTF8 не приводится средний результат, поскольку была взята только одна проба молока и материала для статистической обработки недостаточно. На рисунке 6 можно видеть, что продукция лактоферрина человека с молоком дочерей первичных трансгенных по конструкции LTF5 самцов, как и в случае первичных трансгенных самок, значительно превосходила как по максимальному ($160,0$ г/л для LTF5), так и по среднему значению остальные варианты. Результат для трансгенов по конструкции LTF5 можно объяснить особенностями генетической конструкции и её объективным превосходством по функциональности. Высокий средний результат продукции рекомбинантного лактоферрина человека с молоком дочерей связан с индивидуальными особенностями полученных первичных трансгенных самцов, в частности, с бóльшим количеством встроившихся в их геном копий трансгена.

Результат сопоставления количества копий трансгена в геноме дочерей первичных трансгенных самцов и уровня продукции рекомбинантного белка в их молоке представлен на рисунке 7А. Главным аргументом в пользу состоятельности выдвинутой гипотезы о связи уровня продукции рекомбинантного белка с количеством трансгена, как и ранее, может быть статистический анализ. Коэффициент ранговой корреляции для индивидуальных значений, полученных для отдельных трансгенных мышей F1 от первичных трансгенных самцов, составил $0,47$, что соответствует, как и в случае первичных трансгенных самок, умеренной положительной корреляции. Точки на рисунке 7А можно разделить на четыре группы: первая группа значений образует облако в районе от 1 до 22 копий трансгена и от $1,71$ до $21,0$ г/л рекомбинантного белка в молоке (коэффициент ранговой корреляции $0,82$); вторая группа точек – 39-43 копий трансгена и $8,06$ - $18,15$ г/л рекомбинантного белка (коэффициент ранговой корреляции $1,0$); третья зона – 44-60 копий трансгена и $6,0$ - $20,2$ г/л рекомбинантного белка (коэффициент ранговой корреляции $0,5$), четвёртая группа – 62-77 копий трансгена и $12,6$ - $20,7$ г/л рекомбинантного белка (коэффициент ранговой корреляции $0,47$), пятая группа – 74-93 копий трансгена и $4,9$ - $20,3$ г/л рекомбинантного белка (коэффициент ранговой корреляции $0,5$). Приведённые результаты необходимо рассматривать с известной долей осторожности, поскольку при определении количества копий трансгена ошибка метода составляла 10-15%, что несколько «смазывает» отмеченную тенденцию (особенно для группы 2).

Обратимся к рисунку 7Б, на котором рассмотрены точки этих групп. Точки из группы 1 характеризуют потомков трёх самцов: LTF5 138, LTF7 704 и LTF7 803 (за исключением мыши 1906 F1 704, из-за аномального для этой линии количества копий трансгена). Группа 2 образована результатами для потомков первичного трансгенного самца LTF7 864, группа 3 – LTF3 373, группа 4 – LTF3 281, группа 5 – LTF5 145. В группы не вошли мыши 1304 F1 281 и 1723 F1 864 из-за нехарактерных для данных линий отклонений в уровне продукции рекомбинантного белка. Из диаграммы видно, что, во-первых, бóльшему количеству копий трансгена в пределах конкретной

линии соответствует бóльшая продукция рекомбинантного белка; во-вторых, в пределах одной линии конкретному количеству копий трансгена соответствует определённое, с незначительными колебаниями, характерными для продукции рекомбинантного белка в разные дни лактации, значение количества лактоферрина человека в молоке. Остальные точки рисунка 7А представляют индивидуальные данные для одиночных потомков отдельных линий, и, как сказано ниже, лишь предоставляют возможность определить соотношение копийности к продукции белка, но не позволяют судить о тенденциях, обозначенных выше.

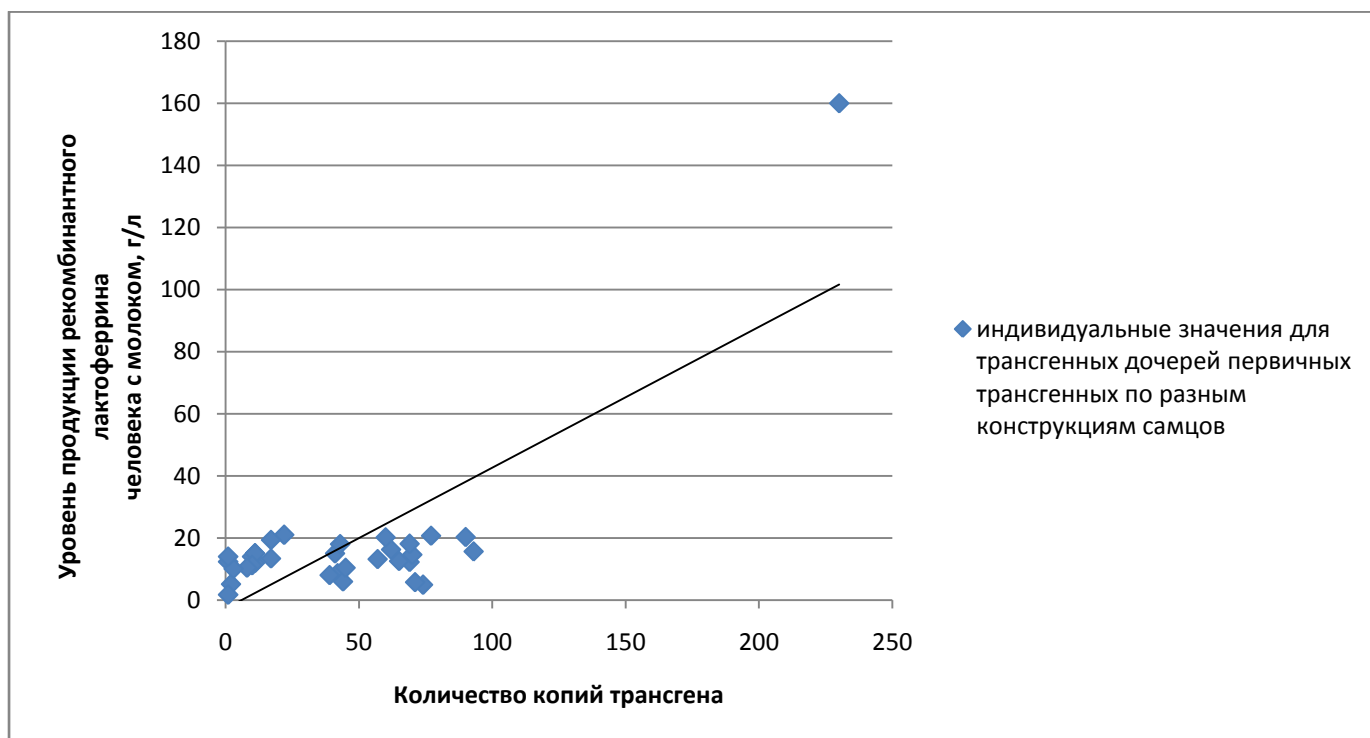


Рисунок 7А. Продукция рекомбинантного лактоферрина человека с молоком дочерей первичных трансгенных самцов в зависимости от количества встроившихся копий трансгена.

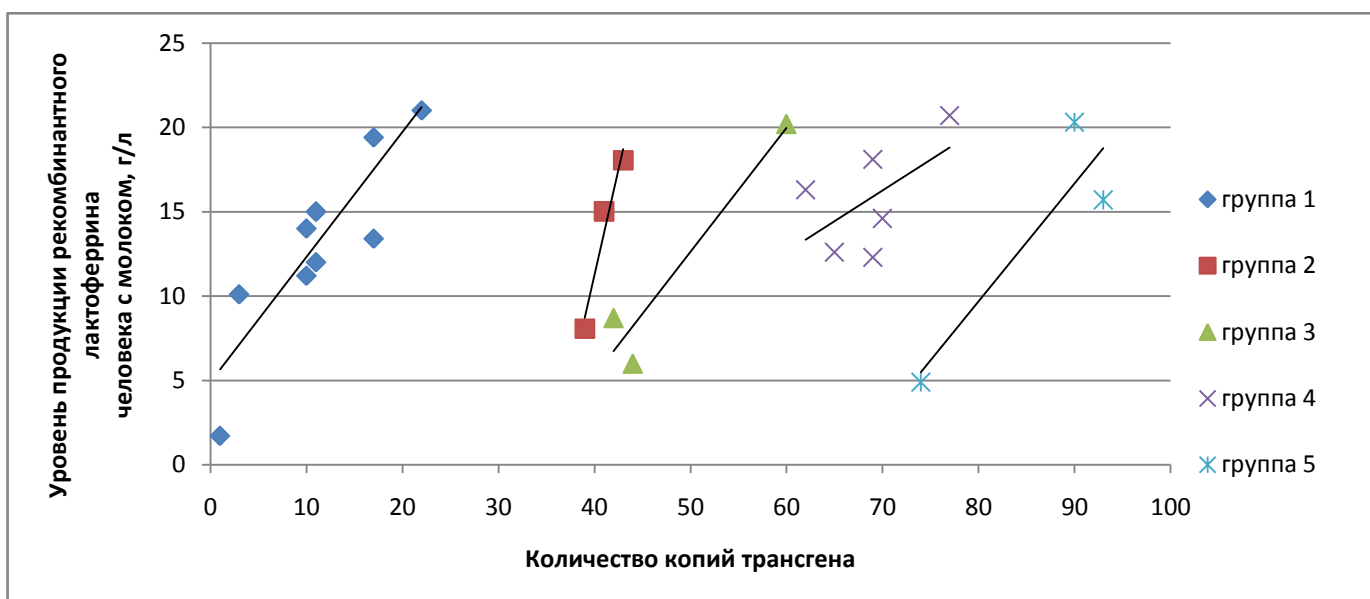


Рисунок 7Б. Продукция рекомбинантного лактоферрина человека с молоком некоторых дочерей первичных трансгенных самцов в зависимости от количества встроившихся копий трансгена.

Вернувшись к рисунку 7А, можно обнаружить несколько тенденций. Во-первых, выбранный нами способ опосредованной оценки «качества» трансгенных самцов адекватен. Он позволяет охарактеризовать животное по исследованному признаку и сделать объективное предположение о перспективности линии. Во-вторых, доза рекомбинантного гена по-разному проявляется фенотипически и для каждой линии первичных самцов (145 линия – 1,3 (г/л)/копию, 138 линия – 0,12 (г/л)/копию). Это связано как с различными сайтами интеграции трансгена, контролировать которые при использовании применяющегося у нас метода микроинъекции в пронуклеус зигот не представляется возможным, так и с феноменом снижения вклада копий в уровень продукции рекомбинантного белка с увеличением их количества, рисунок 8. В-третьих, в целом для выборки повторяется закономерное внутри групп распределение – большему количеству копий соответствует большая продукция рекомбинантного белка, особенно в случае экстремальных значений.

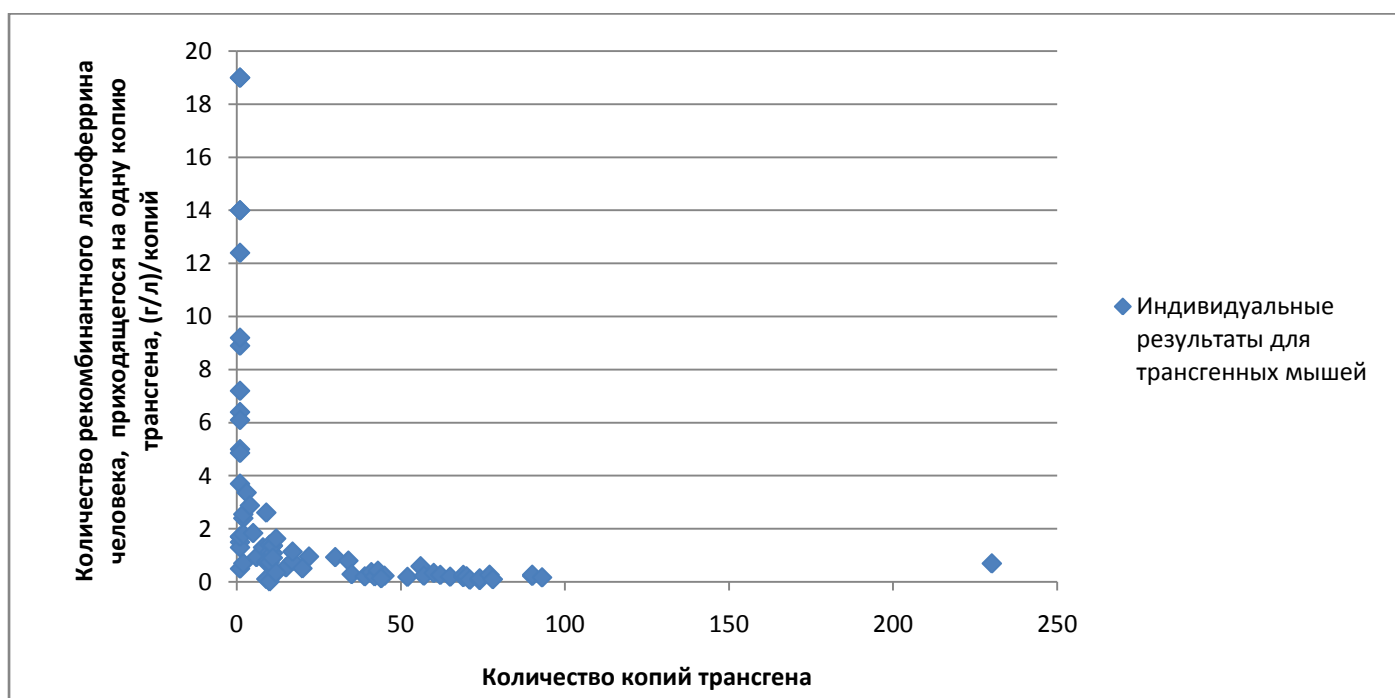


Рисунок 8. Фенотипическое проявление дозы трансгена.

Экстраполируя результаты, полученные на дочерях первичных трансгенных самцов, необходимо учитывать характер распределения трансгена в 1-ом поколении. В связи с тем, что интеграция трансгена происходит неконтролируемо в произвольные сайты встраивания, в 1-ом поколении количество трансгенов в потомстве может значительно варьироваться, и конкретные показатели передачи трансгена потомству могут указывать на мозаичность, встраивание в один или несколько сайтов в геноме, встраивание в половые хромосомы. В случае первичных трансгенных самок мы можем анализировать непосредственно результаты определения копийности встроившегося трансгена (хотя и без учёта возможной мозаичности) и уровень продукции рекомбинантного белка. Поскольку копийность встроившегося трансгена не определялась без привязки к уровню продукции рекомбинантного белка, мы не располагаем прямыми данными по

самцам, и характеризовать первичных трансгенных самцов по копияности трансгена и продукции рекомбинантного белка в F1 необходимо с учётом обозначенных оговорок.

Животные с необычно высоким уровнем продукции рекомбинантного лактоферрина человека с молоком

В процессе выполнения исследований регистрировались животные, уровень продукции лактоферрина человека с молоком у которых превышал 20,0 г/л. Прежде всего, такие мыши были выявлены среди первичных трансгенных самок, полученных с использованием конструкции LTF5 (№116 – 33,0 г/л и №146 – 40,0 г/л). В потомстве этих самок максимальное значение продукции 28,0 г/л у самки №159 F1 LTF5 116 и 27,2 г/л у самки №1058 F2 LTF2 146.

Среди дочерей первичных трансгенных самцов по конструкции LTF5 также имелось большое количество животных, показавших высокий уровень продукции рекомбинантного лактоферрина с молоком.

Среди потомков первичного трансгенного самца LTF5 113 были обнаружены самки с необычно высоким уровнем продукции рекомбинантного лактоферрина человека с молоком. Была зарегистрирована самка № 3190 F1 LTF5 113, в молоке которой оказалось наивысшее для всех исследованных ранее животных количество рекомбинантного белка с молоком – 160,0 г/л по первой лактации. Во второй и третьей лактации уровень продукции рекомбинантного лактоферрина у данной самки снизился, однако продолжал оставаться высоким – 102,95 г/л. Эта самка привлекла наше внимание и была взята в размножение. Были получены дочери, уровень продукции лактоферрина человека в молоке которых достигал 117,0 г/л, таблица 1. Все эти животные характеризовались многокопийностью встроенного гена. Так, у самки № 3190 F1 LTF5 113 выявлено 230 копий трансгена.

Наибольшее количество работ по получению животных-продуцентов рекомбинантных белков было выполнено на трансгенных мышах, полученных с использованием традиционного метода микроинъекции ДНК в пронуклеус зигот, на которых отработывался дизайн генных конструкторов. Как известно, уровень продукции рекомбинантных белков в молоке трансгенных животных существенно варьирует в зависимости от использованных генных конструкторов и места их интеграции в геном. Для возможности сравнения опубликованных материалов нами были взяты максимально достигнутые показатели продукции рекомбинантного лактоферрина человека, отражающие некую идеальную ситуацию. Тем более что в ряде работ авторы представляли единичных первичных трансгенных животных. Наивысший показатель продукции рекомбинантного лактоферрина человека в молоке трансгенных мышей не превышал 29,8 г/л. Соответственно этому низкими были и средние показатели экспрессии, варьирующие около 5,4 г/л.

Таблица 1. Уровень продукции рекомбинантного лактоферрина человека в молоке трансгенных самок - потомков первичного трансгенного самца LTF5 113.

P			F1				F2			F3	
конструкция	линия	пол	номер	лактация 1, г/л	лактация 2, г/л	лактация 3, г/л	номер	лактация 1, г/л	лактация 2, г/л	номер	лактация 1, г/л
LTF5	113	М	121	13,0	20,5	24,5	3084	30,0		4851	41,3
			127	32,0	33,1		3081	32,8		4794	86,0
			164	16,4			3596	6,96		4876	19,4
			167	8,1			3093	30,3		4875	44,6
			175	33,0			4804	89,0		4856	97,0
			185	22,3			4607	80,9	77,3		
			3143	38,6	41,0		4606	117,0			
			3145	23,7							
			3147	34,2	31,7						
			3190	160,0	102,0	95,0					

Имеется много литературных данных о необычно высоком уровне продукции рекомбинантных белков в молоке различных видов трансгенных животных, в их ряду можно указать на синтез α -антитрипсина с молоком трансгенных овец – 60,0 г/л.

Продукция рекомбинантного лактоферрина человека в поколениях трансгенных по гену лактоферрина человека мышей в зависимости от линии, конструкции, копийности встроившегося трансгена

Всего от 229 трансгенных самок-потомков первичных трансгенных мышей получено 315 проб молока, средний уровень продукции рекомбинантного лактоферрина человека с молоком составил 12,55 г/л. Результаты статистического анализа среднего уровня продукции рекомбинантного белка с молоком в зависимости от внедрённой генетической конструкции представлены на рисунке 9. Из диаграммы видно, что явными аутсайдерами являются конструкции LTF6 (1,2 г/л) и LTF2 (5,2 г/л), максимальный уровень продукции рекомбинантного белка с молоком обеспечивает конструкция LTF5 (16,7 г/л). Группа конструкций LTF7-LTF11 обеспечивает близкий и стабильный уровень продукции рекомбинантного белка с молоком, отстаёт от них по среднему уровню продукции LTF3 (он достоверно ниже, чем у LTF7 и LTF11).

Рассматривая колебание уровня продукции рекомбинантного белка в поколениях, необходимо отметить, что хотя колебания индивидуальных значений оказались значительными, от 30% для F2 LTF8 до 173% для F4 LTF7, для всей популяции уровень продукции рекомбинантного белка во всех поколениях в среднем был близок к 100% и корреляции между уровнем продукции рекомбинантного белка и поколением мышей не обнаружено (коэффициент ранговой корреляции 0,07).

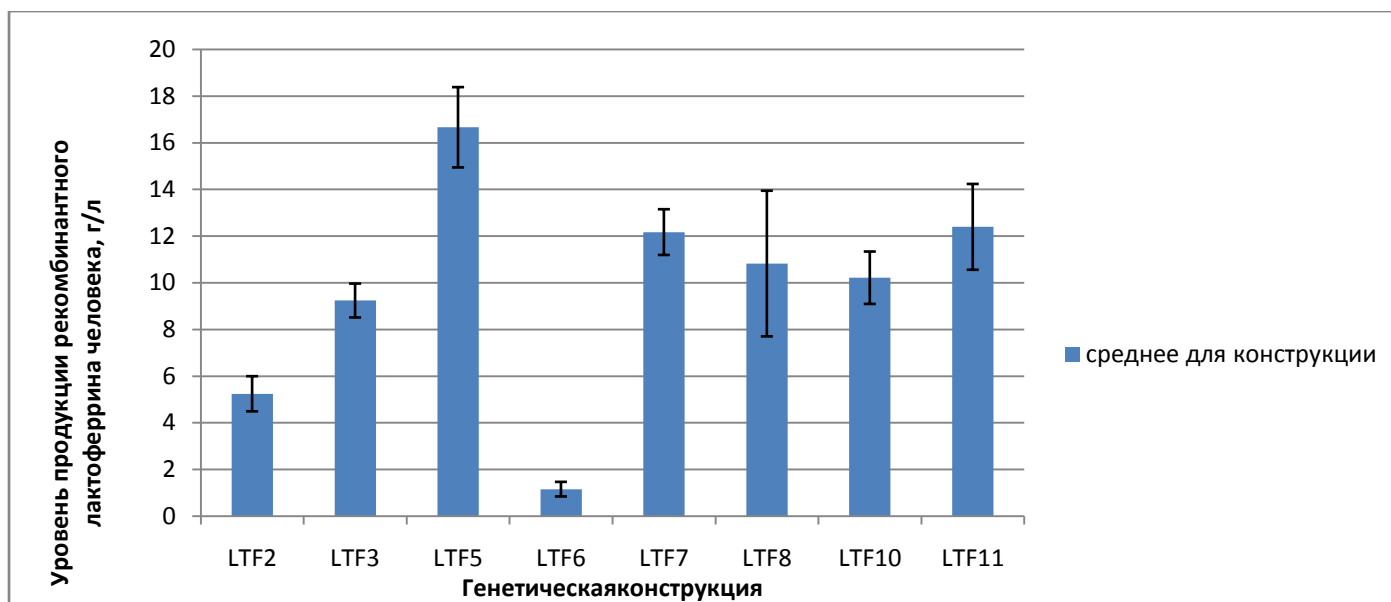


Рисунок 9. Продукция лактоферрина человека в поколениях трансгенных мышей в зависимости от использованной генной конструкции.

Продукция рекомбинантного лактоферрина человека с молоком трансгенных самок мыши в течение периода лактации

Важным фактором для оценки работоспособности ДНК-конструкции с геном лактоферрина является динамика продукции рекомбинантного белка в период лактации. Особую значимость этот показатель имеет в случае организации промышленного производства рекомбинантных белков. Сложность оценки этого параметра у мышей состоит в том, что лактация у этого вида животных продолжается, в среднем, 21 день. Практика показывает, что отбирать молоко более двух раз и с периодом менее трёх дней опасно как для самой лактирующей самки, так и для её потомства. Мышь может отказаться выкармливать детёнышей из-за перенесённого стресса или же съесть их. Кроме того, лактирующая самка может погибнуть из-за аллергической реакции на наркоз. Этот риск повышается при повторной наркотизации через короткий промежуток времени. В сочетании с технической сложностью процесса доения это привело к тому, что, даже располагая значительной популяцией трансгенных мышей, мы можем привести сравнительно небольшое количество таких экспериментов. Тем не менее, они позволили достоверно судить о динамике продукции рекомбинантного лактоферрина человека с молоком трансгенных самок. График изменения уровня продукции рекомбинантного белка в течение лактации строился на основании следующих расчётов: рассматривались только мыши, пробы молока у которых брались несколько раз в разные дни лактации (как в течение одной, так и нескольких лактаций). Для каждой мыши определялось среднее значение продукции рекомбинантного белка и индивидуальные значения продукции в конкретный день лактации; эти значения определялись как процентная доля от среднего для данной мыши, рисунок 10.

Хотя индивидуальные колебания уровня продукции рекомбинантного белка в молоке были весьма значительными – от 9,5% до 190%, в среднем для популяции уровень продукции с 4 по 17

день лактации был наиболее высоким и сохранялся на уровне 100%. С 1 по 4 день лактации наблюдался рост продукции лактоферрина человека, а с 17 по 20 день – снижение продукции рекомбинантного белка.

Также мы обнаружили, что мыши в течение всего репродуктивного периода показывали относительно постоянный уровень продукции рекомбинантного белка; хотя индивидуальные колебания подчас были значительными, с возрастом они уменьшались. Эти результаты в известной степени оригинальны, поскольку для многих других белков ранее была показана неравномерность продукции, выражающаяся в высоком уровне в начале и снижении этого показателя к концу лактации.

Указанные результаты относятся к тем генным конструкциям, в которых использовался β -казеиновый промотор из гена коз. Кроме того, мы имели две генные конструкции, в одной из которых использовался α -казеиновый промотор из гена коз (LTF6), а в другой (LTF10) – собственный промотор гена лактоферрина человека. Для этих групп динамика продукции рекомбинантного белка в течение лактации носит аналогичный выявленной тенденции характер.

На основе популяционного анализа мы можем сделать вывод, что предложенные конструкции обеспечивают стабильную продукцию в течение всего репродуктивного периода и всей лактации как в целом для популяции, так и для конкретных животных. Разницы по этим параметрам для отдельных конструкций мы не обнаружили, что вполне предсказуемо, поскольку регуляторные последовательности созданы на основе высокоэффективных молочных промоторов, а структура кодирующей последовательности влияет, как оказалось, на уровень продукции, но не на его стабильность.

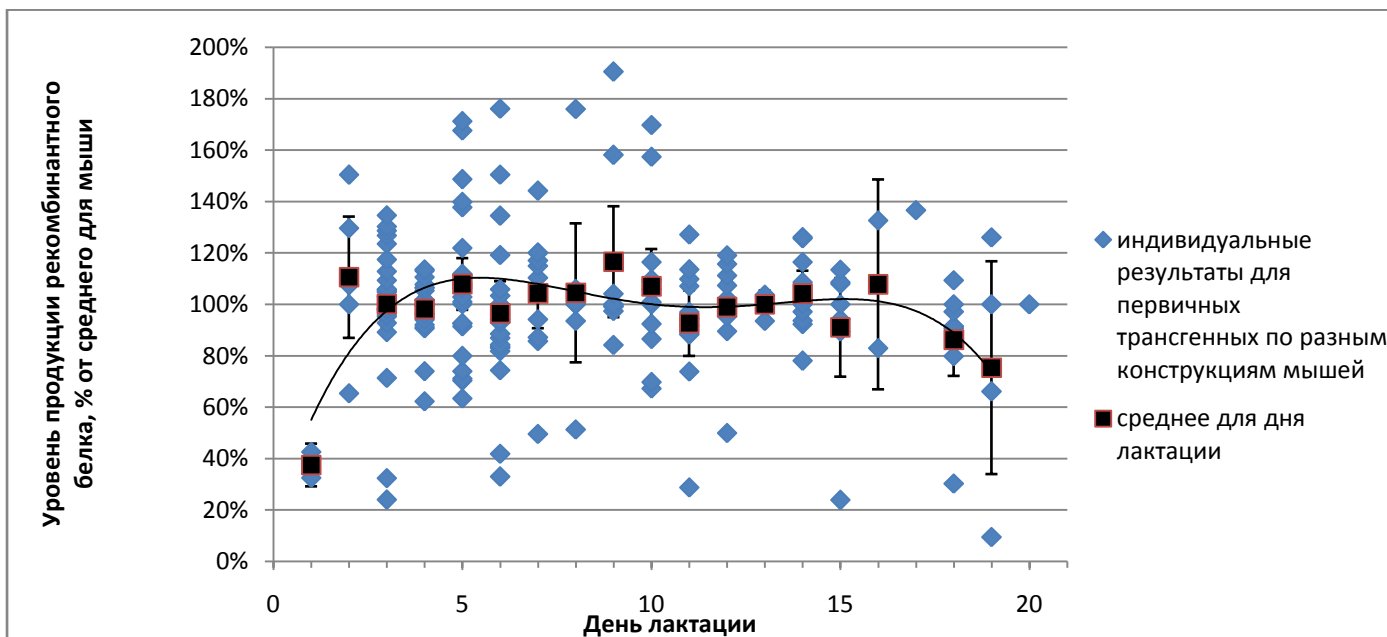


Рисунок 10. Динамика продукции рекомбинантного лактоферрина человека с молоком трансгенных самок мыши в течение лактации.

Физико-химические и биологические свойства рекомбинантного лактоферрина человека из молока трансгенных мышей

Для оценки физико-химических и биологических свойств рекомбинантного лактоферрина человека из молока трансгенных мышей совместно с отделом молекулярной генетики Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН была выполнена серия физико-химических исследований.

Выделенный нами рекомбинантный лактоферрин человека насыщен Fe^{3+} в среднем на 50%. В грудном молоке лактоферрина человека на 75-88 % представлен апо-формой.

Для полностью насыщенных Fe^{3+} и апо-форм лактоферрина человека и рекомбинантного лактоферрина человека были получены спектры кругового дихроизма. Значения содержания α -спиралей – 0,40, β -слоев – 0,2 и β -поворотов – 0,18. Полученные результаты свидетельствуют в пользу нативной конформации рекЛФ и его апо-формы.

Рекомбинантный и природный лактоферрины человека различались по характеру взаимодействия с лектином (конканавалин А). При хроматографии этих препаратов на ConA-Сефарозе рекомбинантный белок сорбировался на смоле и эффективно элюировался 50-250 мМ α -метил-D-маннозидом, а природный лактоферрин человека не взаимодействовал со смолой. Такой результат говорит о различном характере гликозилирования рекомбинантного и природного лактоферринов человека.

При сравнении кинетики трипсинолиза природного и рекомбинантного лактоферринов человека, разделенных электрофорезом в ПААГ, для рекомбинантного лактоферрина человека наблюдали появление дополнительных фрагментов, постепенно исчезающих в ходе протеолиза. Поскольку известно, что на подверженность лактоферрина трипсинолизу влияет степень гликозилирования белка и степень насыщения железом, наши результаты еще раз указывают на необходимость тщательного анализа пост-трансляционных модификаций.

По характеру взаимодействия с ДНК, ЛПС и гепарином природный и рекомбинантный лактоферрины человека не отличались. Рекомбинантный лактоферрин человека образовывал с ЦП комплекс, который выявлялся по задержке оксидазной ЦП-содержащей зоны при электрофорезе в ПААГ в щелочных неденатурирующих условиях. Добавление к такому комплексу гепарина, ДНК и ЛПС приводило к восстановлению электрофоретической подвижности ЦП, что позволяет говорить о взаимодействии рекомбинантного лактоферрина человека с этими веществами и о вытеснении ими ЦП из комплекса. Также показано, что природный и рекомбинантный лактоферрин человека связываются с гепарином, иммобилизованным на Сефарозе 4В.

Показано, что характер агглютинации протопластов *M. luteus* природного и рекомбинантного лактоферринов человека не различался.

Бактерицидную активность против *E. coli* и *Listeria monocytogenes*, а также фунгицидную активность против *Candida albicans* выявляли методом радиальной диффузии в агарозном геле после электрофореза в ПААГ в присутствии мочевины и уксусной кислоты. Отмечено, что природный и рекомбинантный лактоферрин человека проявляли активность, препятствующую развитию микроорганизмов, тогда как лактоферрин мыши не проявлял такой активности.

Таким образом, рекомбинантный белок проявлял свойства, присущие лактоферрину человека, а именно: связывался с полианионами (ДНК, ЛПС и гепарином), проявлял антимикробную активность, эффективно связывал ионы железа. Выявленные нами отличия в характере гликозилирования не сказались на функциональной активности рекомбинантного лактоферрина человека.

Патоморфологический и гистологический анализ трансгенных мышей

Для оценки состояния здоровья подопытных животных совместно с лабораторией биологических испытаний филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова был выполнен патоморфологический и гистологический анализ 4 (2 самца и 2 самки) трансгенных мышей с конструкцией LTF5 (давшей наибольший уровень продукции лактоферрина человека с молоком) в сравнении с 4 (2 самца и 2 самки) интактными мышами. Обследовались половозрелые животные, находящиеся на стандартном рационе кормления.

В процессе наружного осмотра мышей, а также визуальной оценки органов брюшной и грудной полостей, органов шеи, головного и спинного мозга каких-либо патологических отклонений, характеризующих каждую из групп обследованных животных, отмечено не было, что позволило сделать заключение об их удовлетворительном состоянии.

При проведении гистологического исследования тканей и органов опытных и контрольных животных были изучены следующие внутренние органы и ткани мышей: головной мозг, спинной мозг, селезёнка, брыжеечные лимфоузлы, тимус, лёгкие, сердце, почки, надпочечники, кожа, кожа с молочной железой, двуглавая мышца бедра, щитовидная железа, мочевого пузырь, поджелудочная железа, печень, желудок, кишечник, двенадцатиперстная кишка, тощая кишка, подвздошная кишка, слепая кишка, ободочная кишка, прямая кишка; яичники и матка (у самок); семенные придатки, предстательная железа, семенники (у самцов).

На основании патоморфологического исследования сделано общее заключение о том, что мыши, трансгенные по гену лактоферрина человека, соответствуют физиологической норме для этого вида животных, поскольку единичные цитологические изменения, обнаруживаемые на гистологических препаратах, в равной мере были присущи как опытным, так и контрольным животным.

Выводы

1. Выбрана оптимальная из 9 исследованных генная конструкция, обеспечивающая наибольшую (в среднем 16,7 г/л и максимум 160,0 г/л) продукцию рекомбинантного лактоферрина человека с молоком трансгенных мышей – LTF5. Она состоит из геномной копии гена лактоферрина человека и находится под контролем β -казеинового промотора, инсуляторов кластера β -глобиновых генов кур.

2. Прослежена передача трансгена в ряду 8-ми поколений 3885 потомков 67 первичных трансгенных мышей. Количество трансгенных потомков в 1-ом поколении колебалось от 3,4% (линия LTF6 728) до 85,7% (линия LTF5 146), во 2-ом и последующих поколениях средний уровень передачи трансгена потомству приближался к 50% и его колебания уменьшились.

3. Установлено, что продукция рекомбинантного лактоферрина человека тканеспецифична и с 4 по 17 день лактации остаётся стабильной, находясь на уровне среднего для мыши в разные дни лактации.

4. Установлено, что рекомбинантный лактоферрин человека, выделенный из молока трансгенных мышей, аналогичен лактоферрину молочной железы женщин по физико-химическим и биологическим свойствам; некоторое отличие состоит в уровне гликозилирования рекомбинантного белка.

5. Определено, что трансген лактоферрина человека не влияет на состояние здоровья и репродуктивную способность трансгенных мышей.

6. Показана перспективность использования исследованных генетических конструкций для получения трансгенных сельскохозяйственных животных – продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека с молоком.

Список публикаций по теме диссертации:

Статьи:

А.В. Дейкин, Т.Г. Ермолкевич, И.Л. Гольдман, Я.Г. Гурский, А.Н. Краснов, А.Н. Попов, С.Г. Георгиева, С.Л. Кузнецов, В.Г. Деревянко, Н.И. Новикова, А.Н. Мурашёв, Е.Р. Садчикова. Состояние здоровья и воспроизводительная способность трансгенных мышей, продуцирующих с молоком рекомбинантный белок человека лактоферрин. *ДАН*. 2009;427(4),545-548.

Материалы научных конференций:

Goldman I.L., Krasnov A.N., Kadulin S.G., Ermolkevich T.G., Gursky Ya.G., Deikin A.V., Georgieva S.G., Sadchikova E.R. High level of lactoferrin in milk of transgenic animals. 8th International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications, 2007, p.16

Sadchikova E.R., Gursky Ya.G., Krasnov A.N., Ermolkevich T.G., Deikin A.V., Sokolov A.V., Pulina M.O., Vasiliev V.B., Georgieva S.G., Goldman I.L. Research of Two isoforms of recombinant human lactoferrin. 8th International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications, 2007, p.9

А.В. Дейкин, Т.Г. Ермолкевич, Я.Г. Гурский, А.Н. Краснов, С.Г. Георгиева, И.Л. Гольдман, Е.Р. Садчикова. Создание высокоэффективных и биологически безопасных лекарственных препаратов нового поколения на основе белков человека, получаемых из молока трансгенных животных. IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». 2009, с.386

Goldman I.L., Deikin A.V., Ermolkevich T.G., Gursky Ya.G., Minashkin M.M., Krasnov A.N., Georgieva S.G., Sadchikova E.R. Recombinant human lactoferrin in milk of transgenic animals. 9th International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications, 2009, p.59

Budzevich A., Sheiko I., Budzevich I., Chartaryiski V., Shautsou I., Kazlou S., Kyrkovich Y., Paitserau S., Zarembo N., Bandarenka V., Lukashevich T., Piatrushka A., Mikhedava I., Sakhonchyk P., Sapsaliou S., Rzhepishevski O., Mironov A., Barilko S., Deikin A., Krasnov A., Georgieva S., Aybazov M., Goldman I., Sadchikova E.. Human lactoferrin transgenic goat breeding. 9th International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications, 2009, p.58