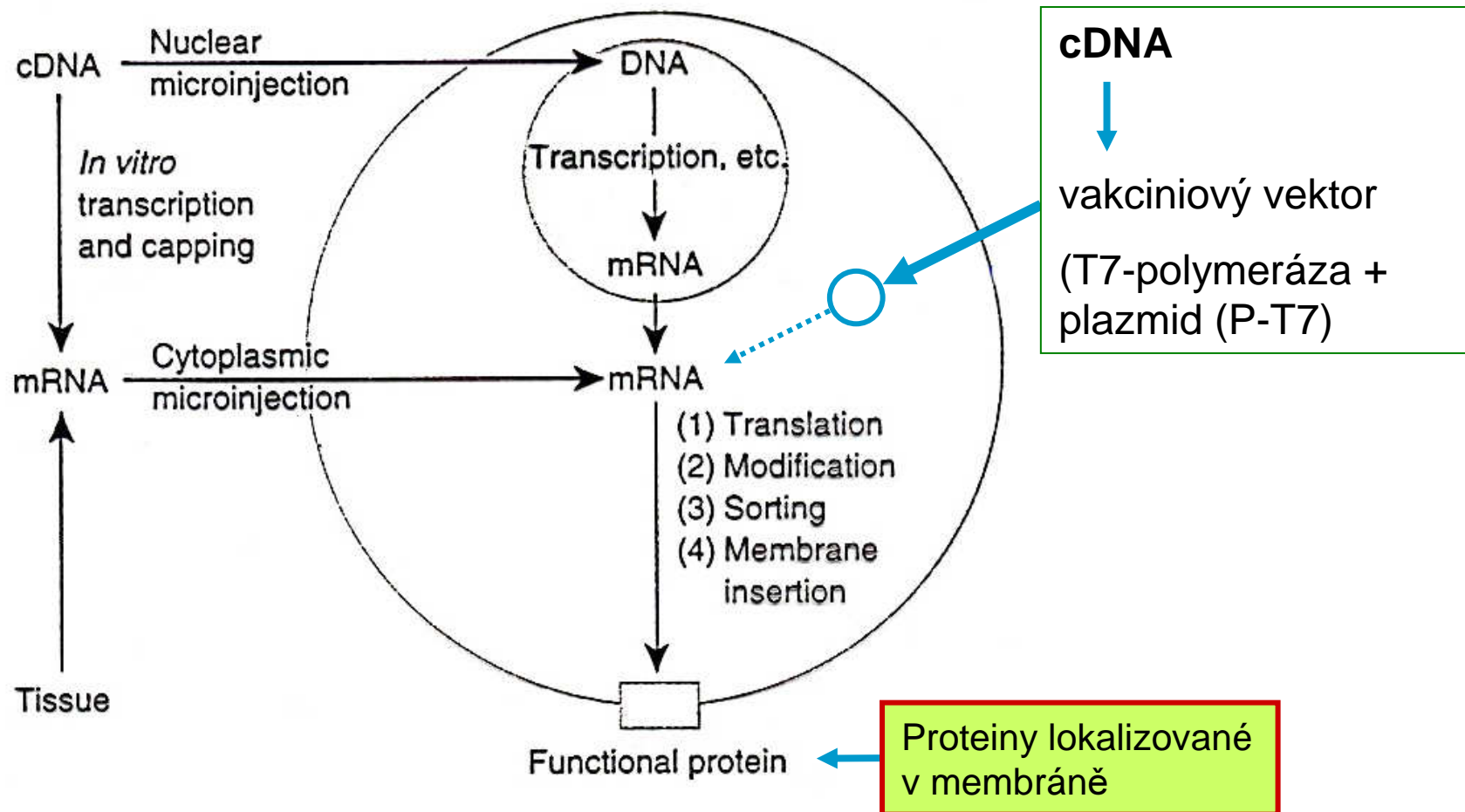
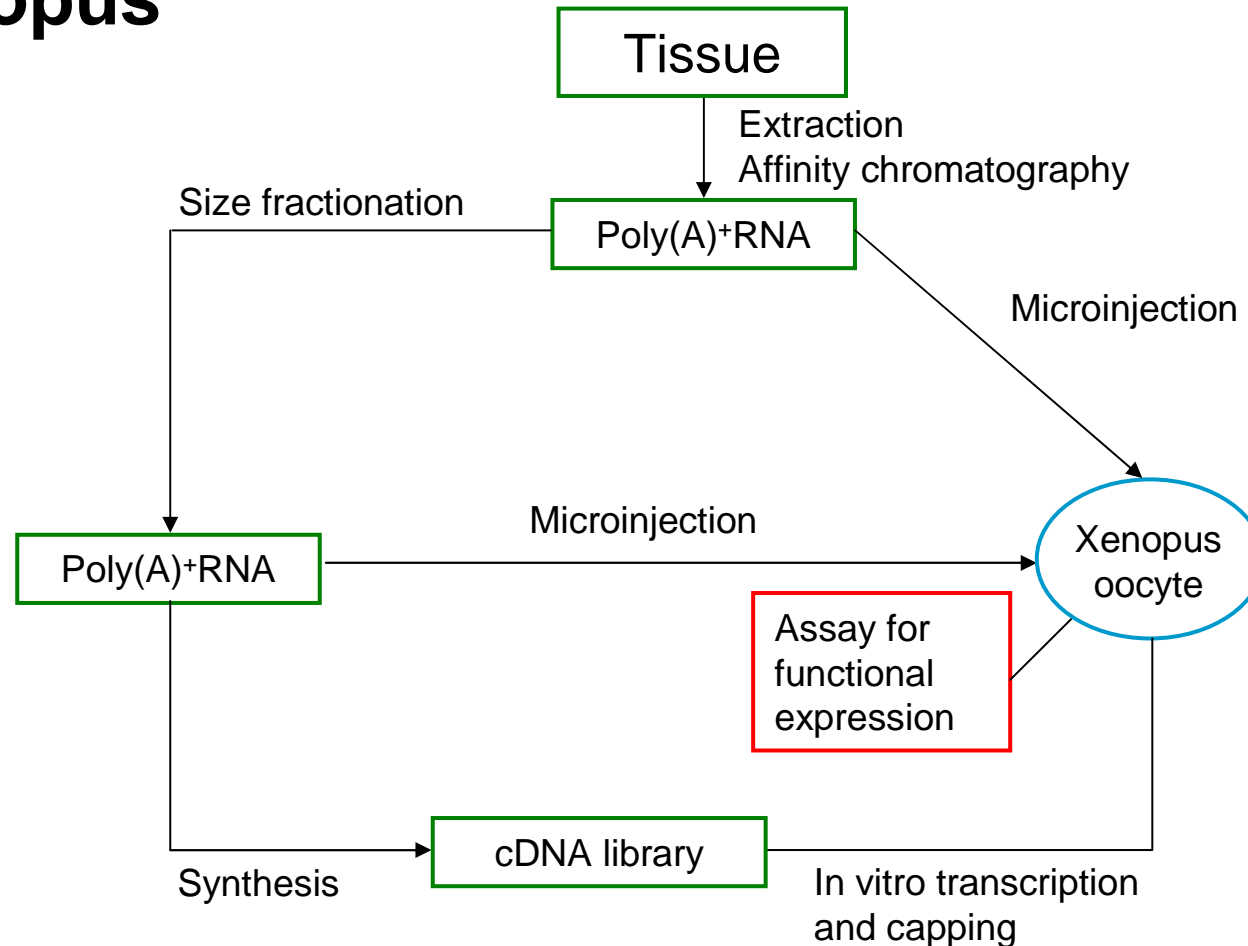


Heterologní expresní systém v oocytech Xenopus

System vhodný pro expresi genů z vyšších eukaryot – dochází k posttranslačním úpravám a transportu, včetně exkrece



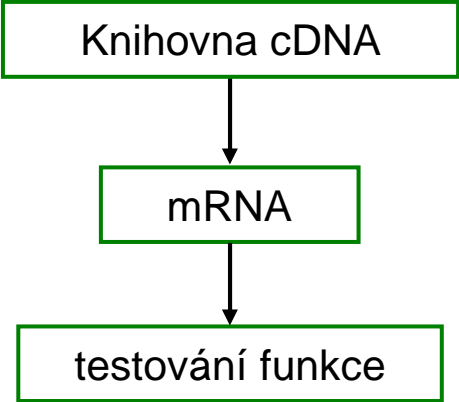
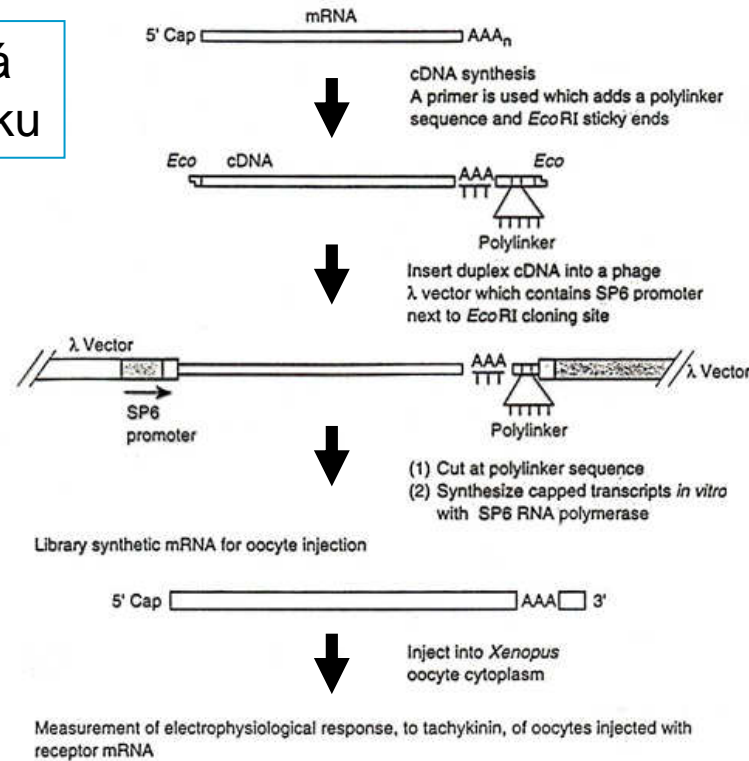
Strategie funkčního klonování v oocytech *Xenopus*



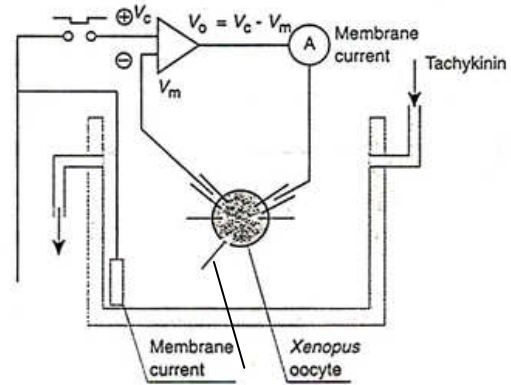
Studium vývojových defektů pramenících z nadprodukce normálních nebo změněných produktů genů

Izolace klonu cDNA obsahujícího receptor pro tachykinin

mRNA připravená z hovězího žaludku



Substance K, neurokinin

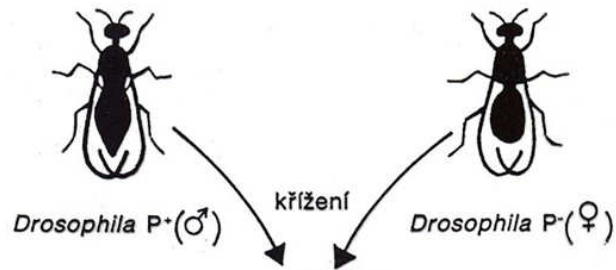


Examples of cDNAs encoding plasma membrane proteins which have been cloned by functional expression in *Xenopus* oocytes

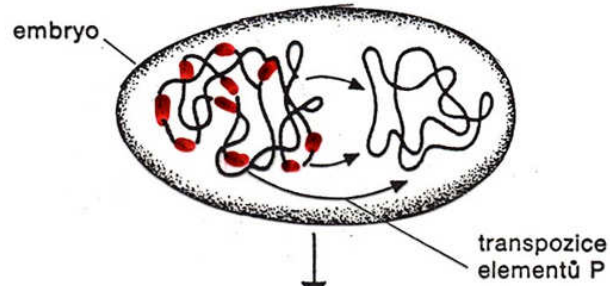
Protein	Reference
Receptors	
Thyrotropin-releasing hormone receptor (mouse pituitary)	Straub et al. 1990
Serotonin 5-HT _{1C} receptor (mouse choroid plexus)	Lubbert et al. 1987
Substance K receptor (bovine stomach)	Masu et al. 1987
Glutamate receptor (rat brain)	Hollmann et al. 1989
Platelet-activating factor receptor (guinea-pig lung)	Honda et al. 1991
Carriers	
Na ⁺ /glucose co-transporter (rabbit intestine)	Hediger et al. 1987
Na ⁺ -independent neutral amino acid transporter (rat kidney)	Tate et al. 1992
Channels	
K ⁺ channel (rat brain)	Frech et al. 1989
Cl ⁻ channel (Madin Darby canine kidney epithelial cell)	Paulmichl et al. 1992

Dysgeneze hybridů navozená transpozicí P-elementů

Kmen P



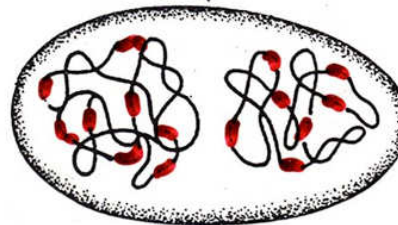
Kmen M



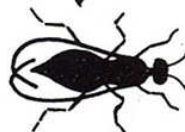
P element 2,9 kb



31 bp



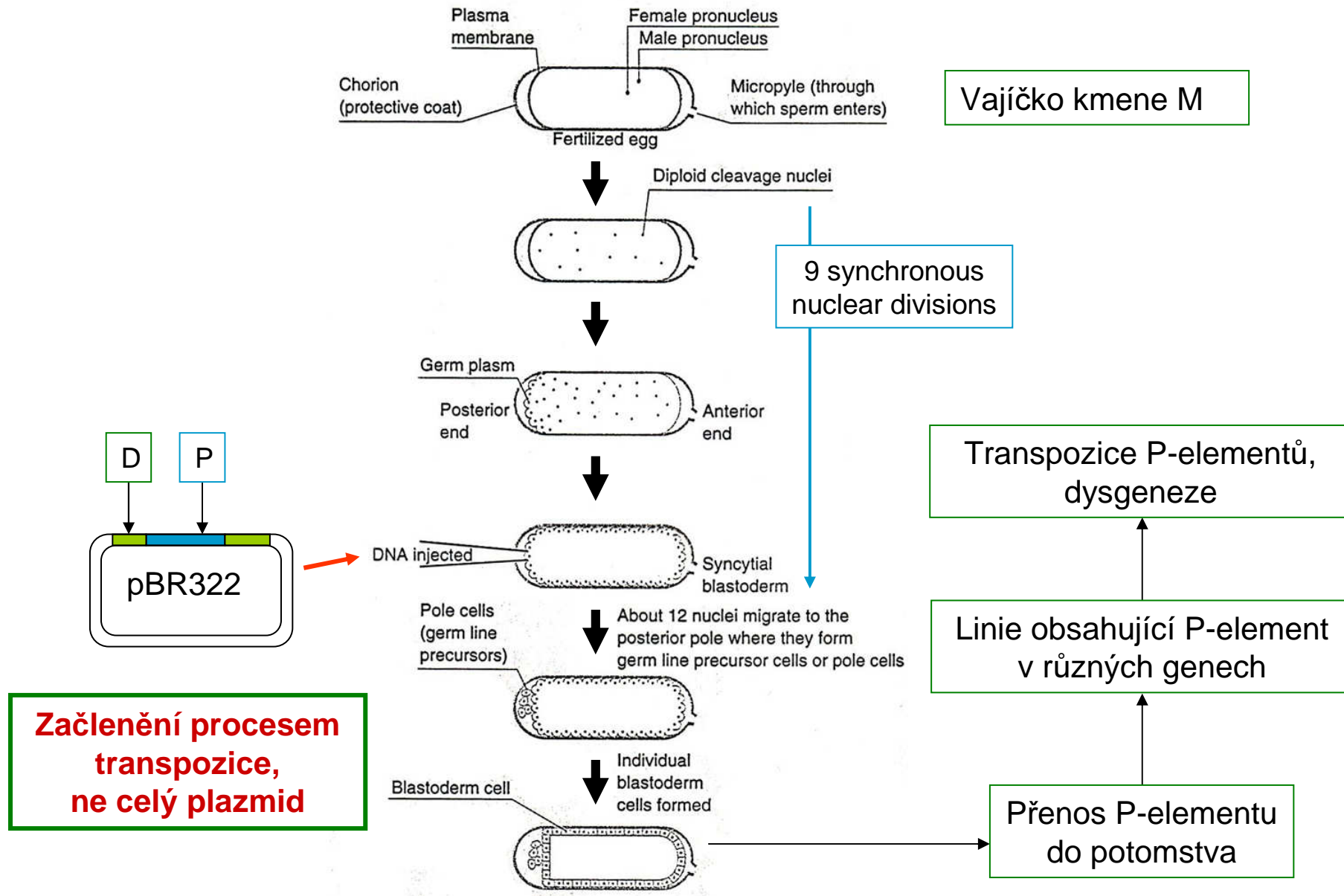
inzerce elementů P
způsobí mutace



sterilní potomstvo

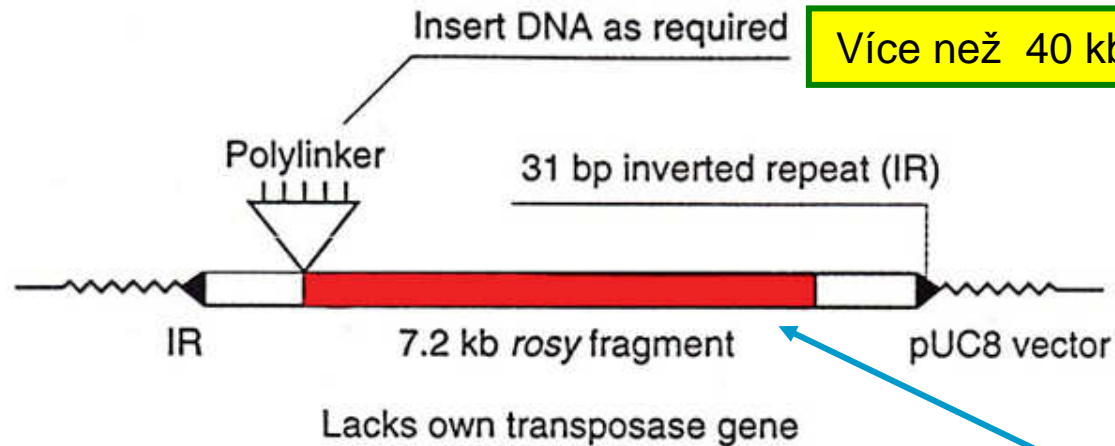
Vysoká frekvence mutací,
chromozomové aberace,
neschopnost tvorby gamet

Časná embryogeneze u drosofily, přenos P elementů do zárodků



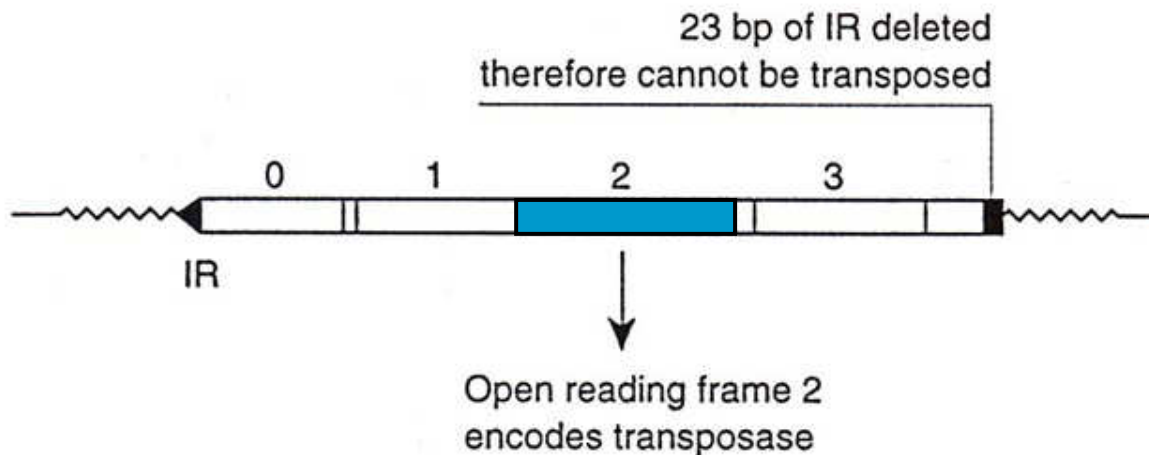
Vektory odvozené z P-elementů

Structure of P-element derivative: Carnegie



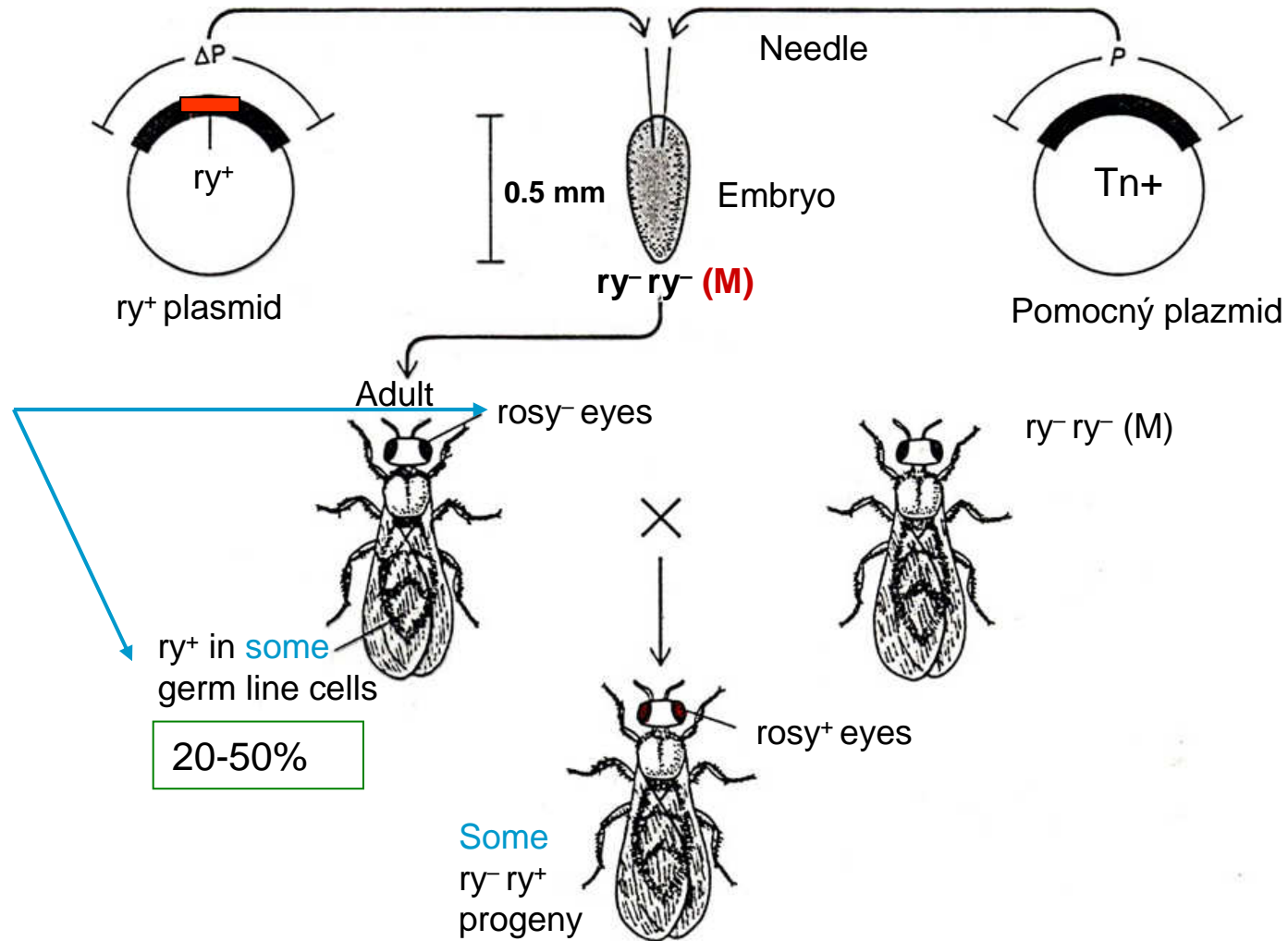
***rosy* = xanthine dehydrogenase**

Structure of helper P-element: $\pi\pi$ 25.7 wings clipped

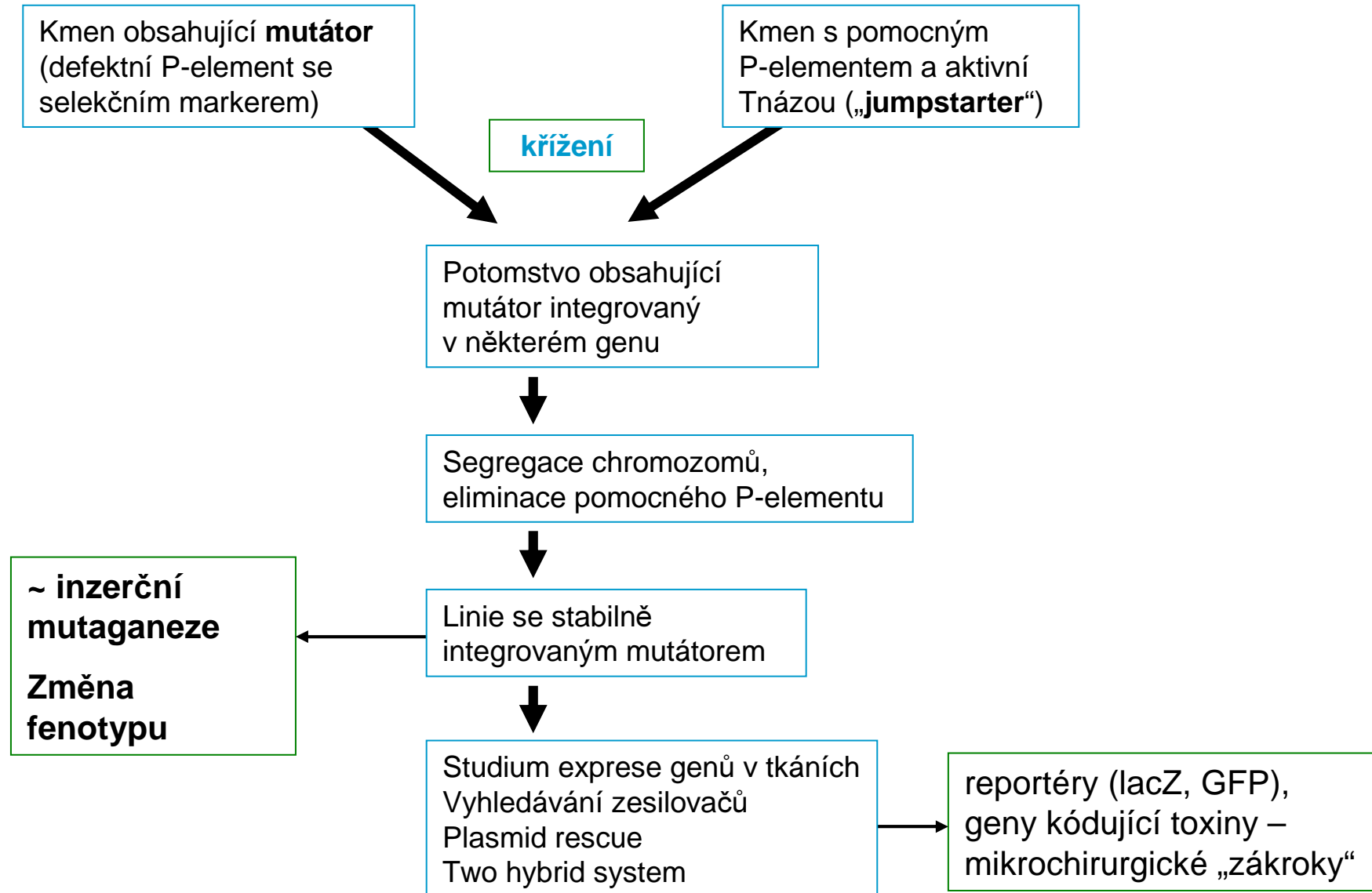


Selekční markery
***rosy*⁺**
***adh* ...etanol**
***neoR* ...G418**

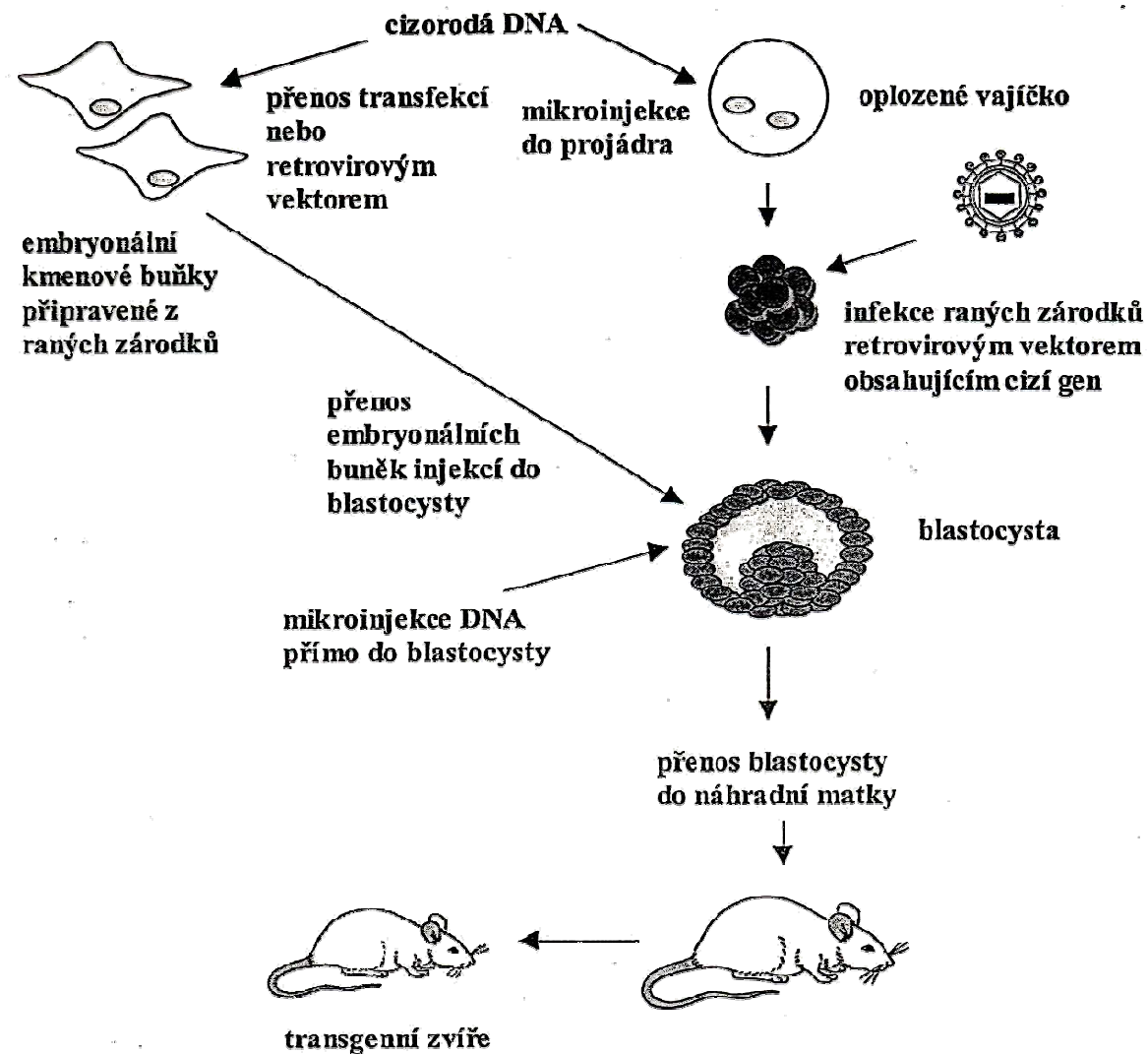
Přenos genů do drosofily zprostředkovaný P-elementy



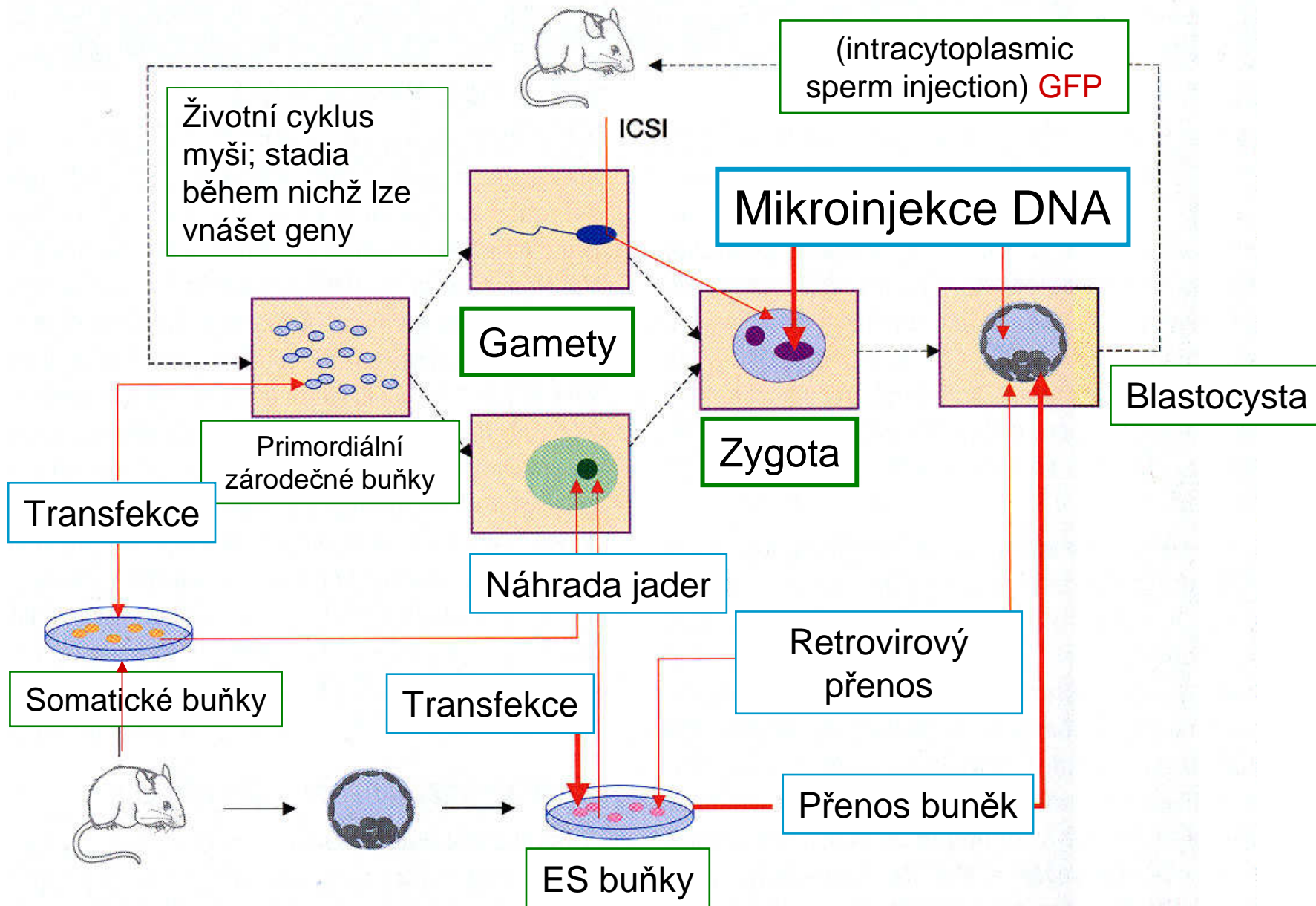
Využití P-elementů jako mutátorů



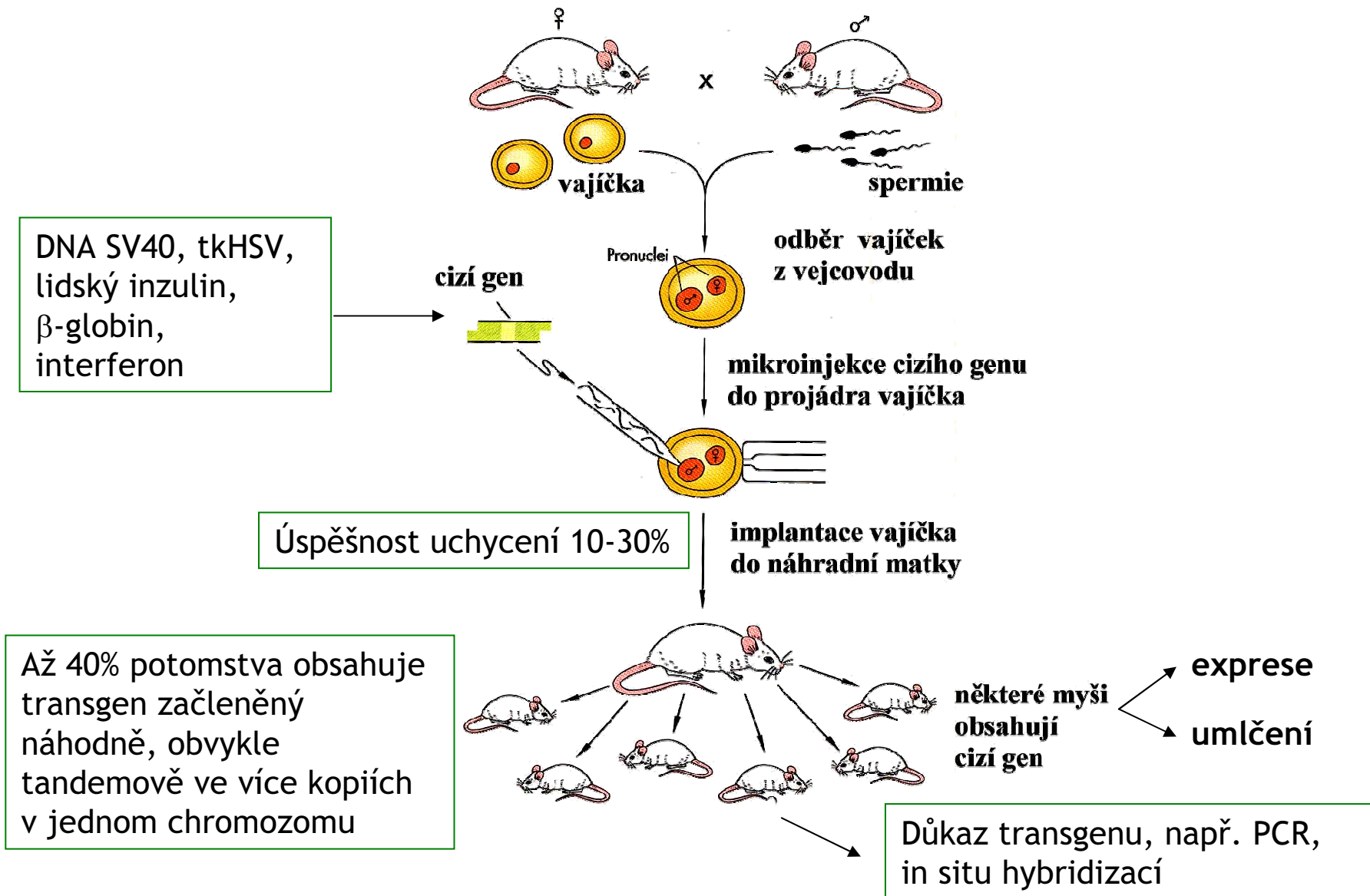
Příprava transgenních savců



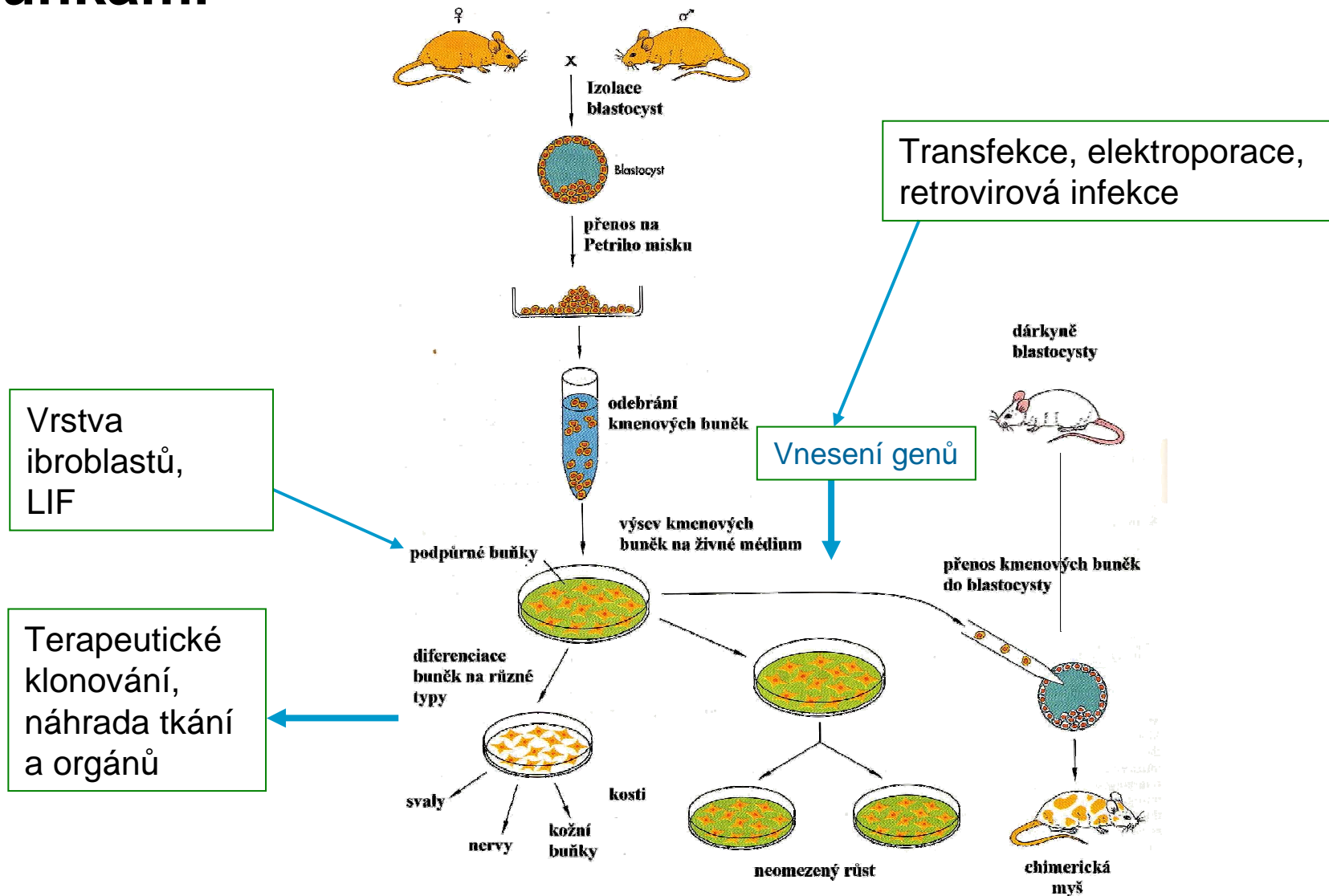
Možnosti přípravy geneticky modifikovaných myší



Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka



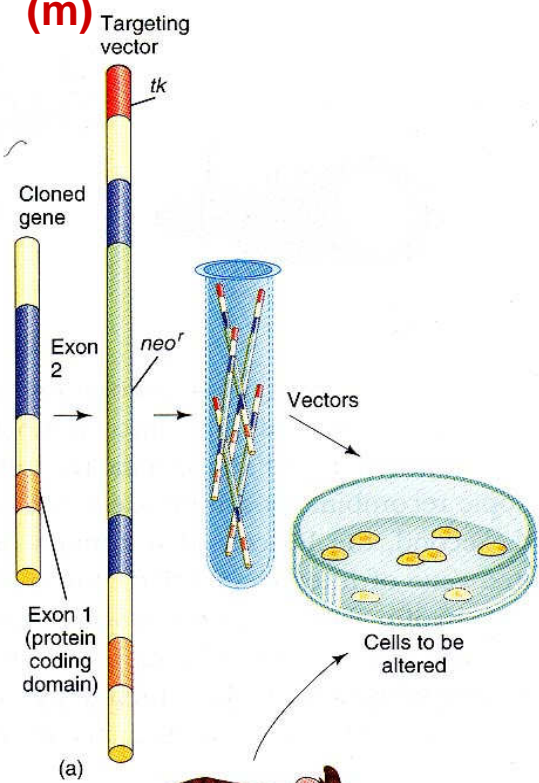
Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami



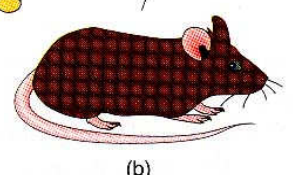
Příprava ES buněk s geny knokautovanými homologní rekombinací

PNS vektor

(m)



(a)

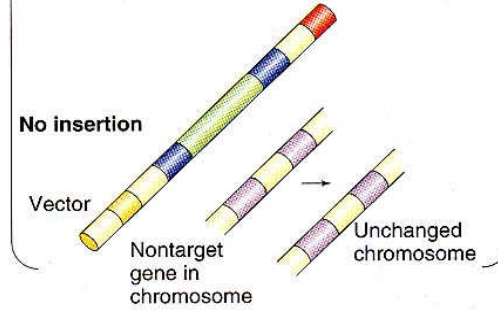
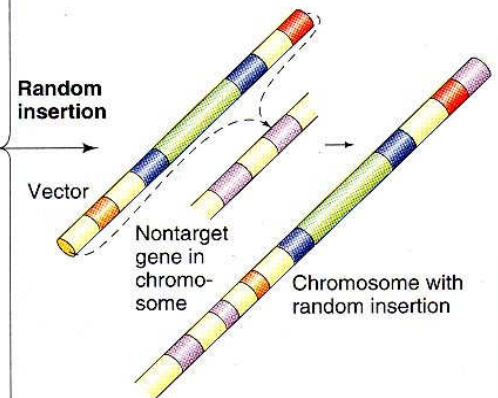
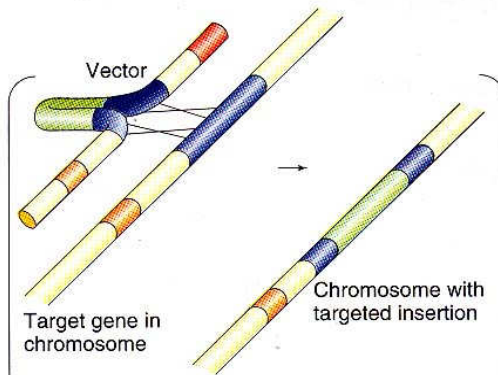


(b)

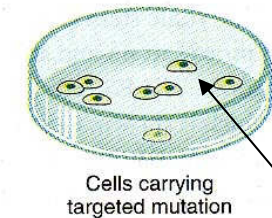
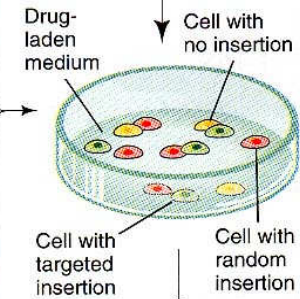
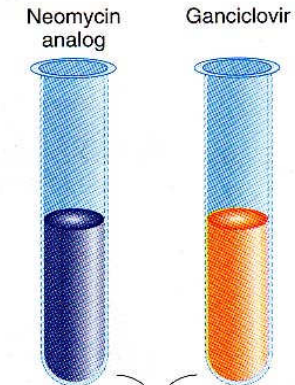
Dárkyně ES buněk

AAMM

Targeted insertion of vector DNA by homologous recombination



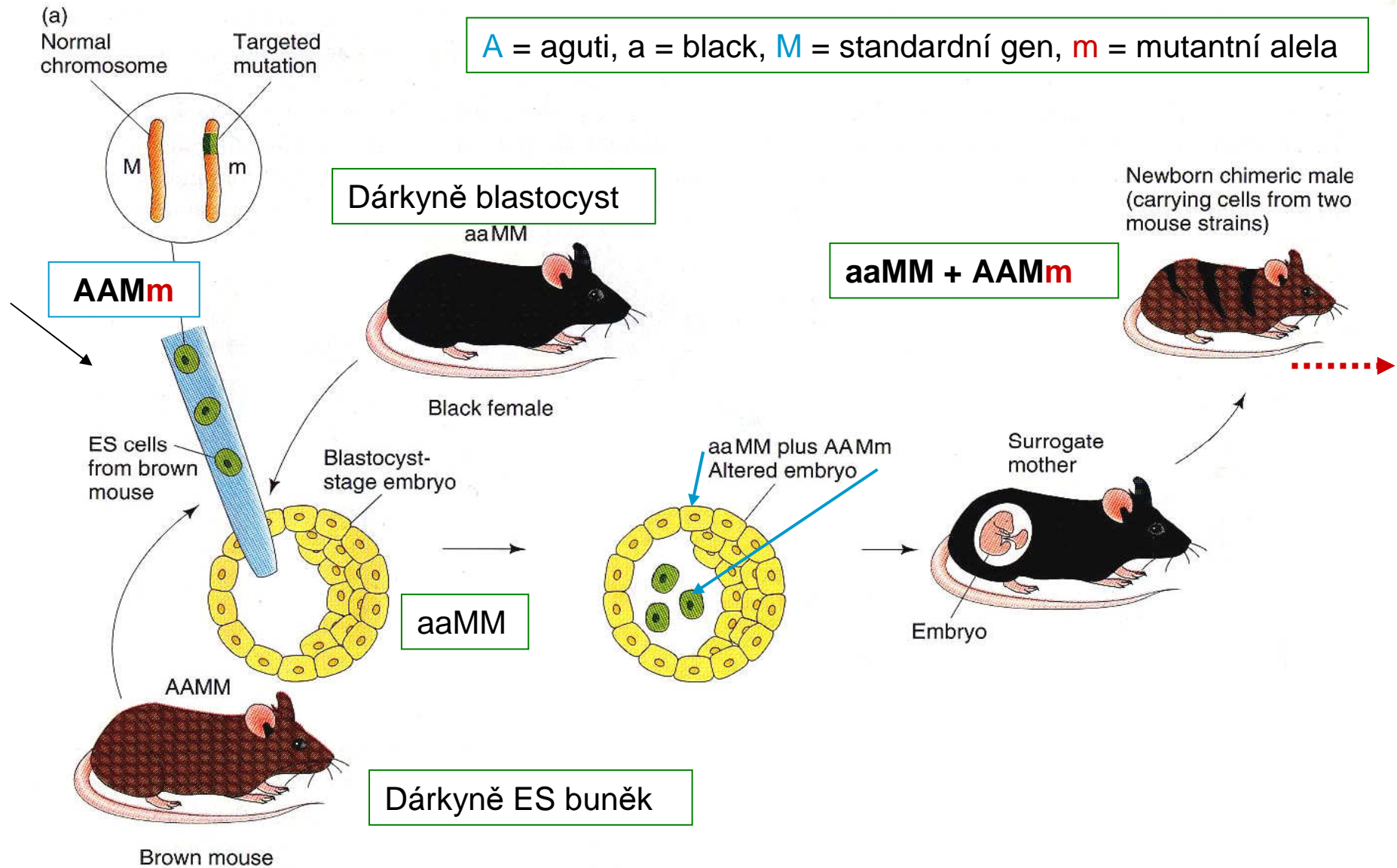
(c)



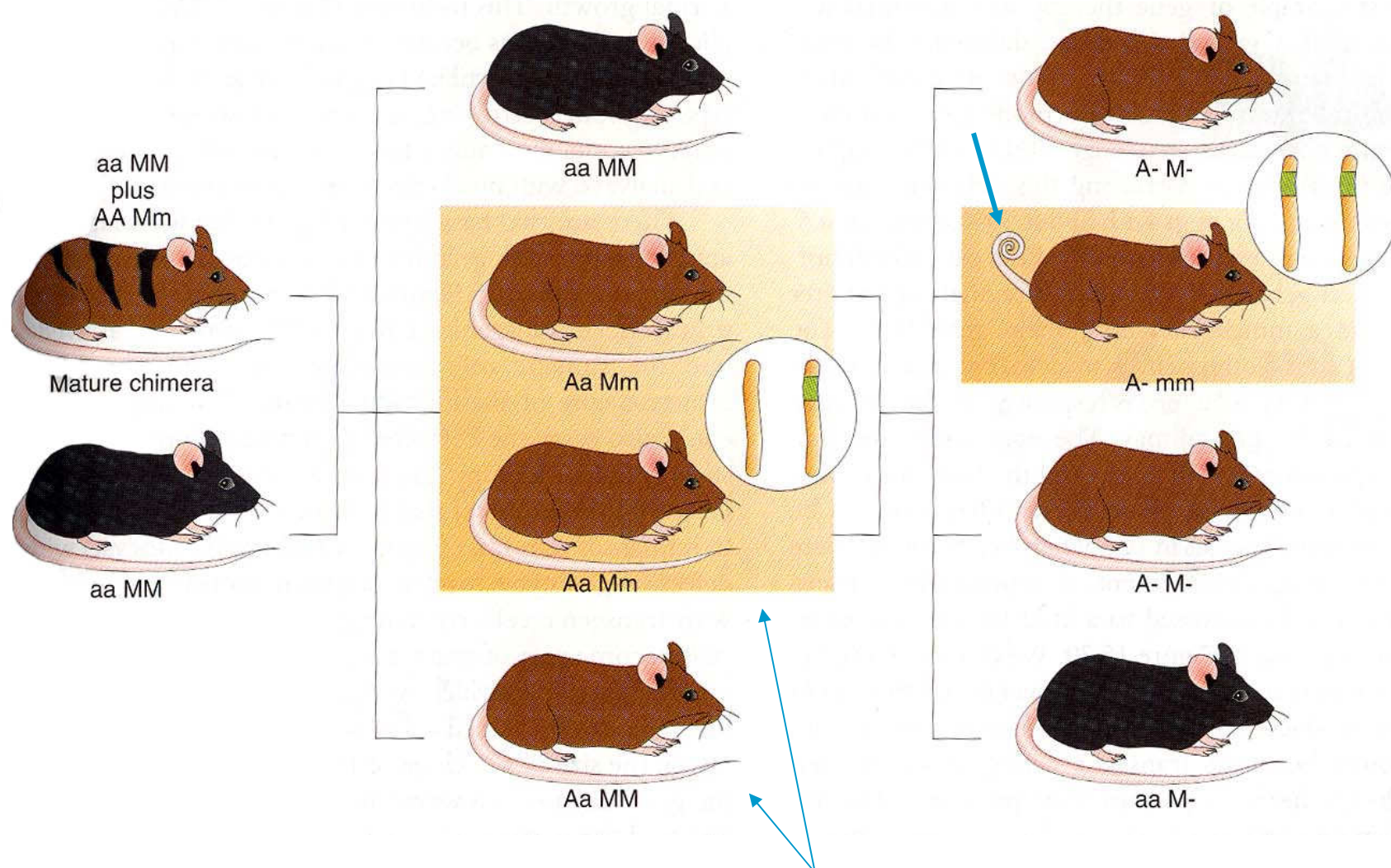
(d)

AAMm

Vytvoření myši nesoucí knokautovaný gen

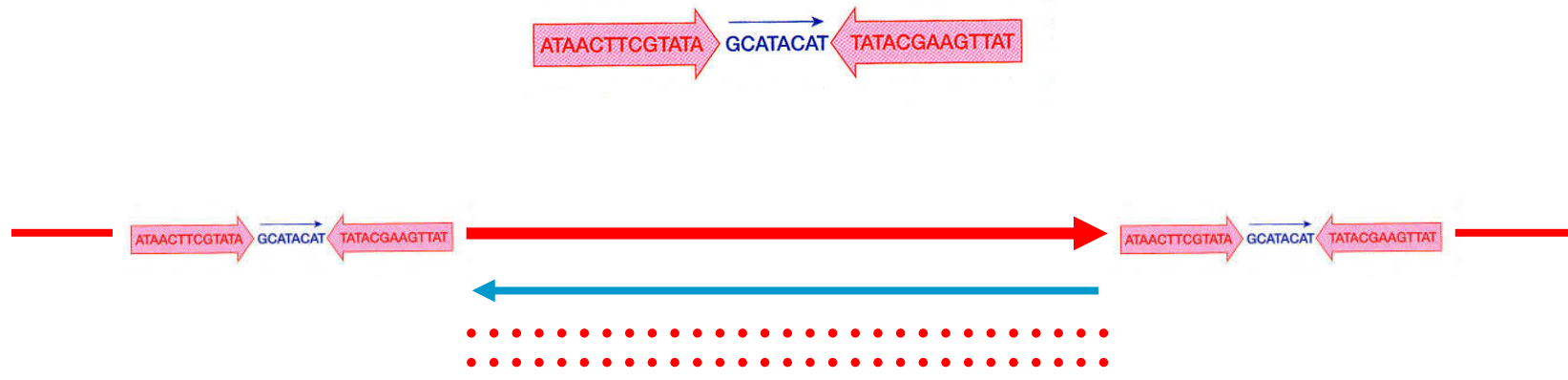


Pokračování – vytvoření myši s knokautovaným genem



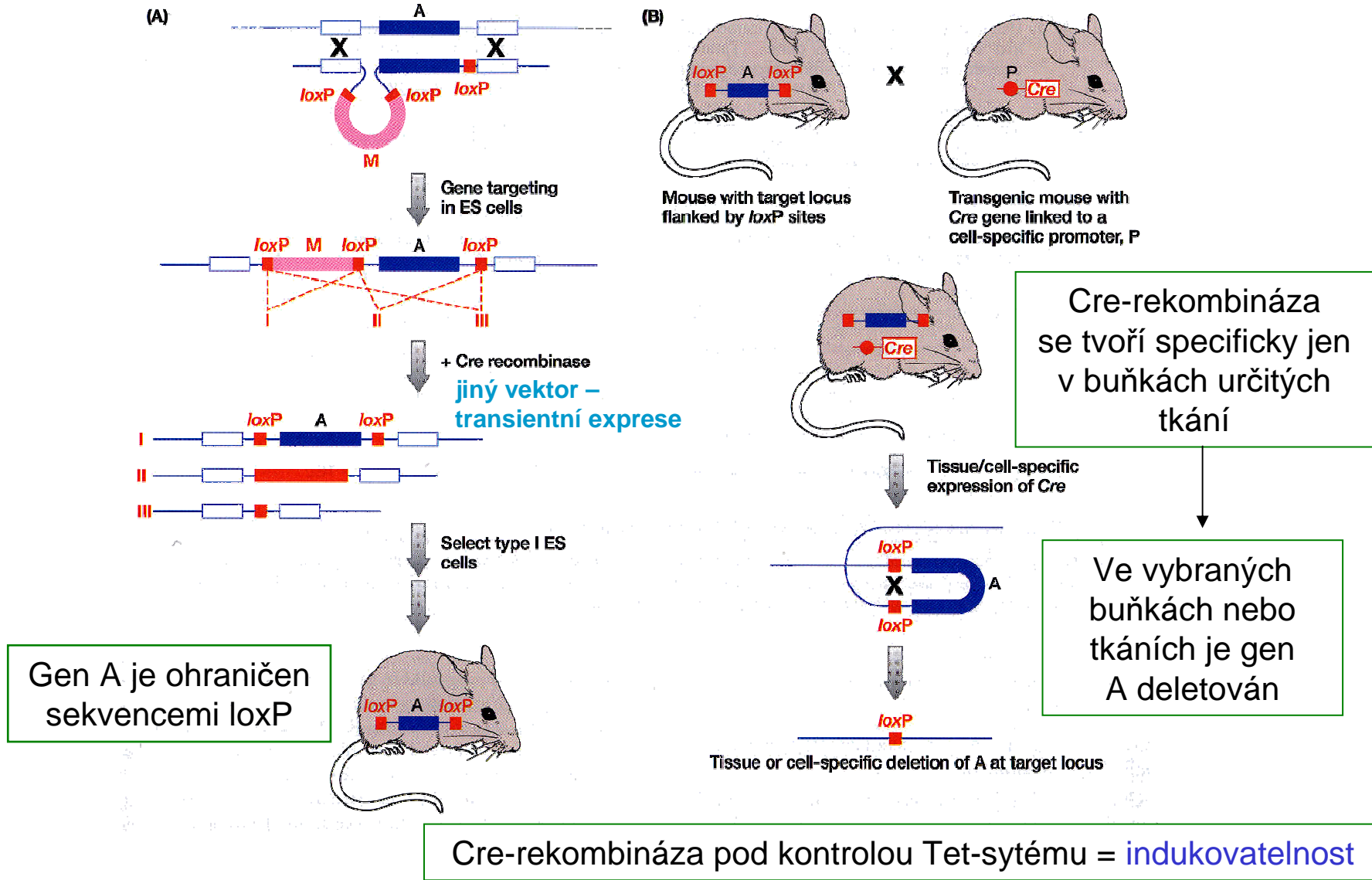
Stanovení genotypu analýzou DNA

Struktura rozpoznávací sekvence lox P fága P1



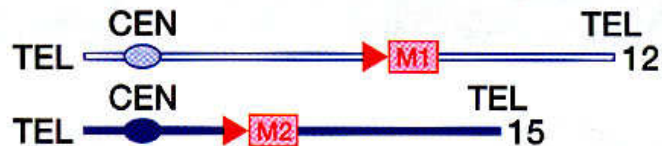
Podle orientace loxP sekvencí je úsek DNA mezi nimi místně specifickou rekombinací prostřednictvím Cre-rekombinázy buď deletován nebo invertován

Využití Cre-loxP rekombinačního systému k selektivní inaktivaci genů

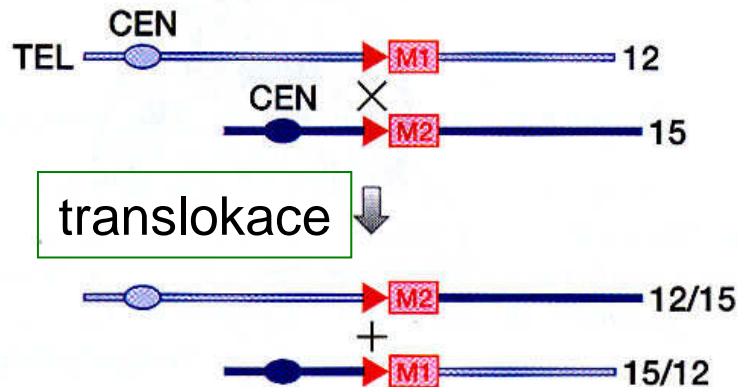


Inženýrství chromozomů s využitím rekombinačního systému Cre-LoxP

- (A) 1. Use sequential gene targeting to introduce *loxP* site (▶) plus a marker gene (M) into two desired locations on different chromosomes



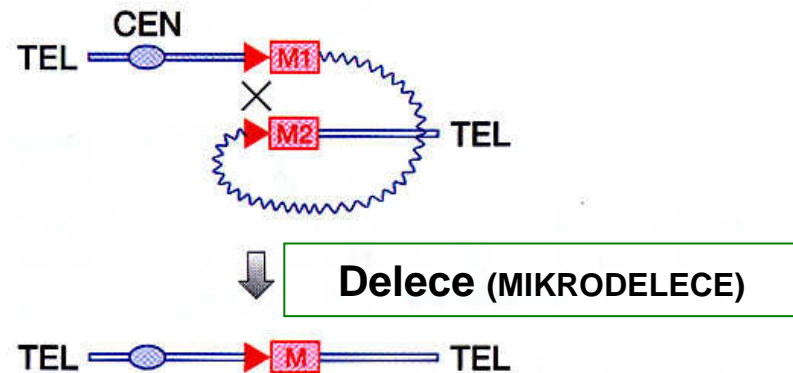
2. Expose *loxP*-containing chromosomes to Cre recombinase



- (B) 1. Use sequential gene targeting to introduce *loxP* site plus a marker gene into two desired locations flanking chromosomal region to be deleted (wavy line)

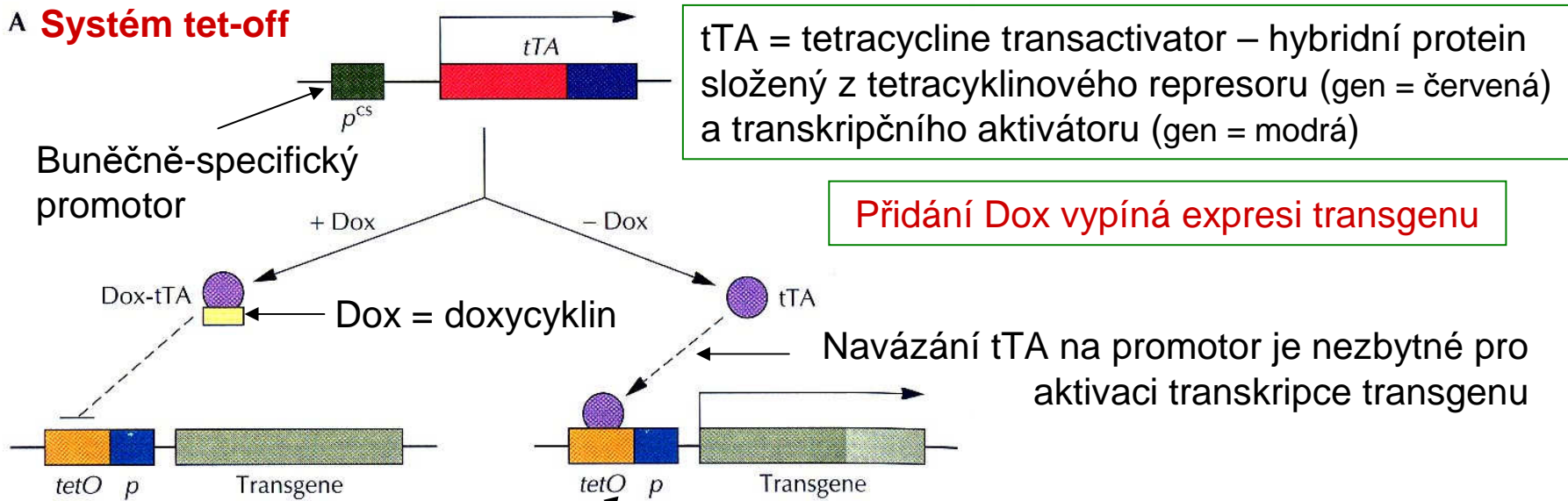


2. Allow to undergo intrachromosomal 'recombination' in presence of Cre recombinase

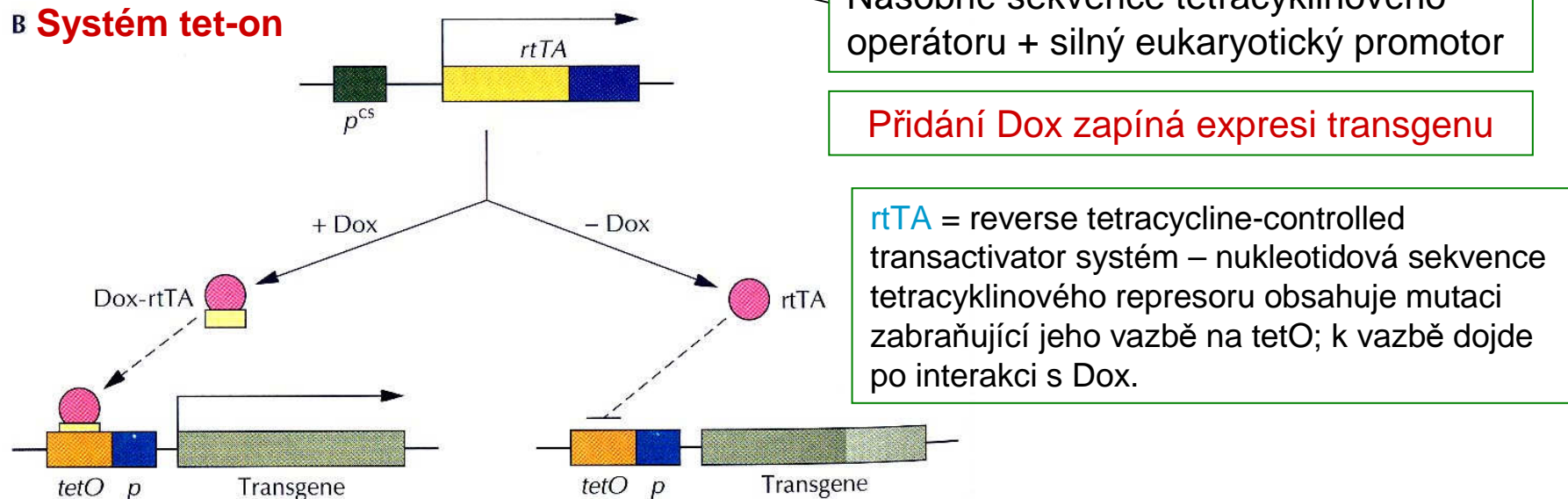


Genová exprese regulovaná tetracyklinem

A **Systém tet-off**



B **Systém tet-on**



Tetracyklinový systém regulace

Obě transkripční jednotky (tTA/rtTA + transgen) mohou být umístěny na jeden vektor, což usnadňuje přípravu transgenních myší.

Využití:

- Sledování dopadu tvorby defektních proteinů
- Dopad nadprodukce určitého normálního proteinu (simulace buněčně specifických poruch)
- Testování exprese genů u chorob, ovlivňujících jen určitý buněčný typ

- Tvorba cre-rekombinázy

Summary of methods for interfering with endogenous gene expression without mutating the target gene	
Interference at the RNA level	Interference at the protein level
Antisense RNA	Dominant negatives *
Antisense oligonucleotides	Antibodies, intrabodies
Ribozymes or maxizymes	Aptamers, intramers **
Deoxyribozymes	
Sense RNA (cosuppression)	
dsRNA (RNA interference)	
siRNA (RNA interference)	
miRNA	

* Mutantní forma genu, jehož produkt vytváří spolu s produktem endogenu nefunkční dimer (inaktivní komplex, např. receptor)

** Intrabody: protilátka vytvářená uvnitř buňky z transgenu – inaktivuje produkt cílového genu

Aptamer: DNA/RNA oligonukleotid vázající se na cílový protein a inhibující jeho aktivitu

Intramer: totéž jako aptamer, ale exprimovaný uvnitř buňky

Table 20.2: Summary of methods for interfering with endogenous gene expression without mutating the target gene

Interference at the RNA level

Antisense RNA
Antisense oligonucleotides
Ribozymes or maxizymes
Deoxyribozymes
Sense RNA (cosuppression)
dsRNA (RNA interference)
siRNA (RNA interference)

miRNA

Interference at the protein level

Dominant negatives
Antibodies, intrabodies
Aptamers, intramers

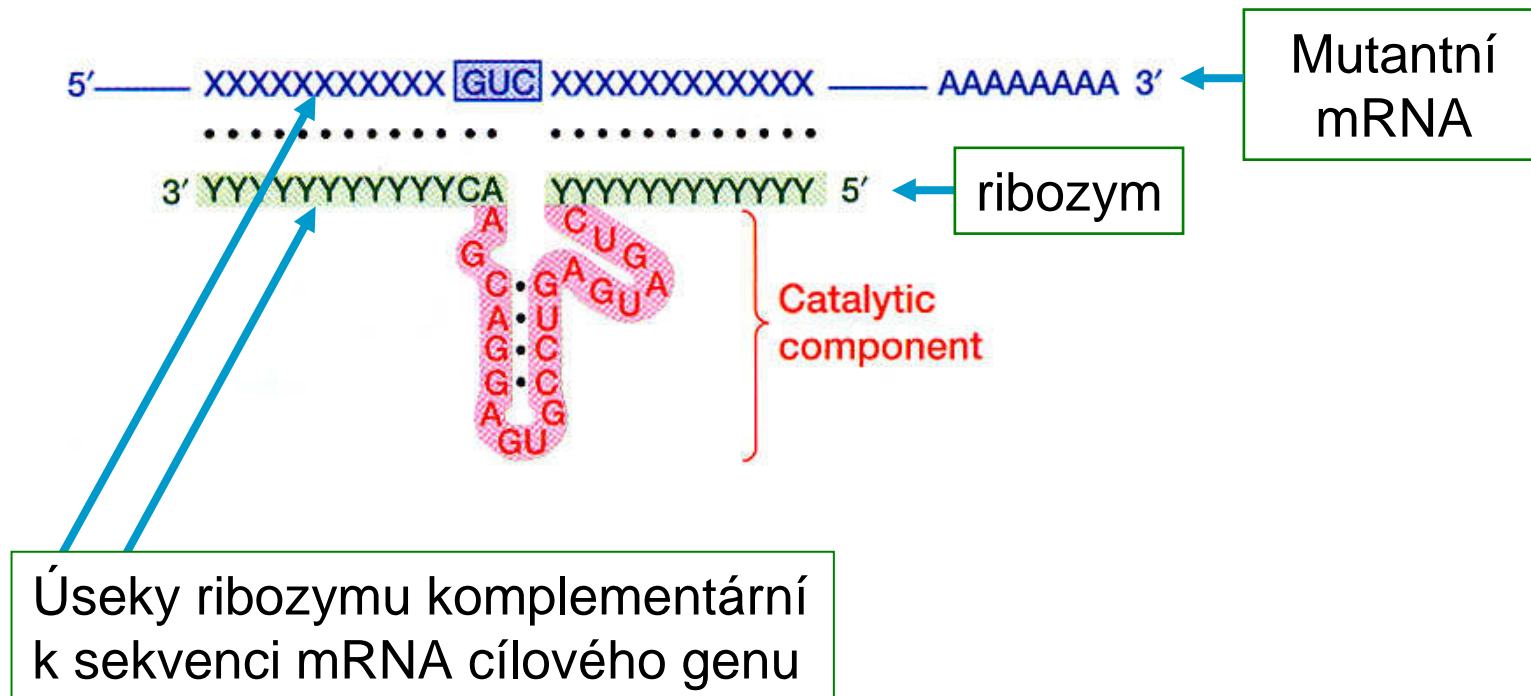
Mutantní forma genu, jehož produkt vytváří spolu s produktem endogenu nefunkční dimer (inaktivní komplex, např. receptor)

Intrabody: protilátka vytvářená uvnitř buňky z transgenu – inaktivuje produkt cílového genu

Aptamer: DNA n. RNA oligonukleotid vázající se na cílový protein a inhibující jeho aktivitu

Intramer: totéž jako aptamer, ale exprimovaný uvnitř buňky

Použití ribozymu typu „hammerhead“ ke štěpení mutantní mRNA



Využití transgenů k usmrcování specifických buněčných typů (mikrochirurgické zásahy)

Gen kódující toxin (transgen) je začleněn za regulační oblast aktivní v určité tkáni – exprese transgenů je tak cílena do buněk této tkáni

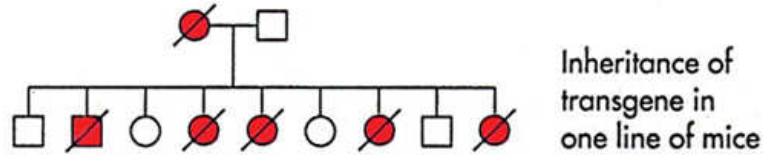
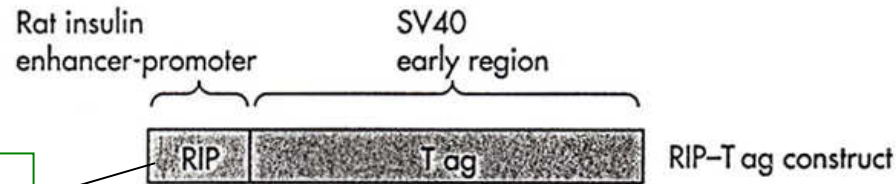
Toxiny: difterický toxin, T-antigen SV40, ricin (lektin)

Problém: exprese genu pro toxin v okamžiku aktivace endogenu (např. v časně fázi vývoje) může být letální pro organismus

Alternativa: použití genu TK z HSV, který je zapojen za specifickou E-P sekvenci. Buňky s tímto genem nejsou usmrceny, dokud nejsou do organismu injikovány syntetické toxické nukleotidy – ty nejsou toxické pro buňky, v nichž k expresi genu nedochází, protože v nich není aktivována specifická E-P sekvence. V buňkách, v nichž je E-P aktivní, dochází k expresi TK, která syntetické nukleotidy metabolizuje na produkty, které zabíjejí dělící se buňky exprimující daný gen.

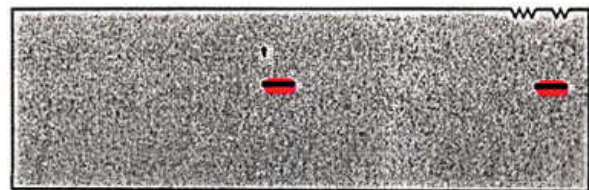
Cílená exprese genu ve specifické tkáni

Řídí tkáňově specifickou expresi klonovaného genu do beta-buněk pankreatu



- Normal male
- Normal female
- Transgenic male
- Transgenic female
- Mice that died before 12 weeks of age

Transgen se exprimuje jen v pankreatu, kde navozuje vznik nádorů. V ostatních tkáních se neexprimuje.



Detekce protilátkou

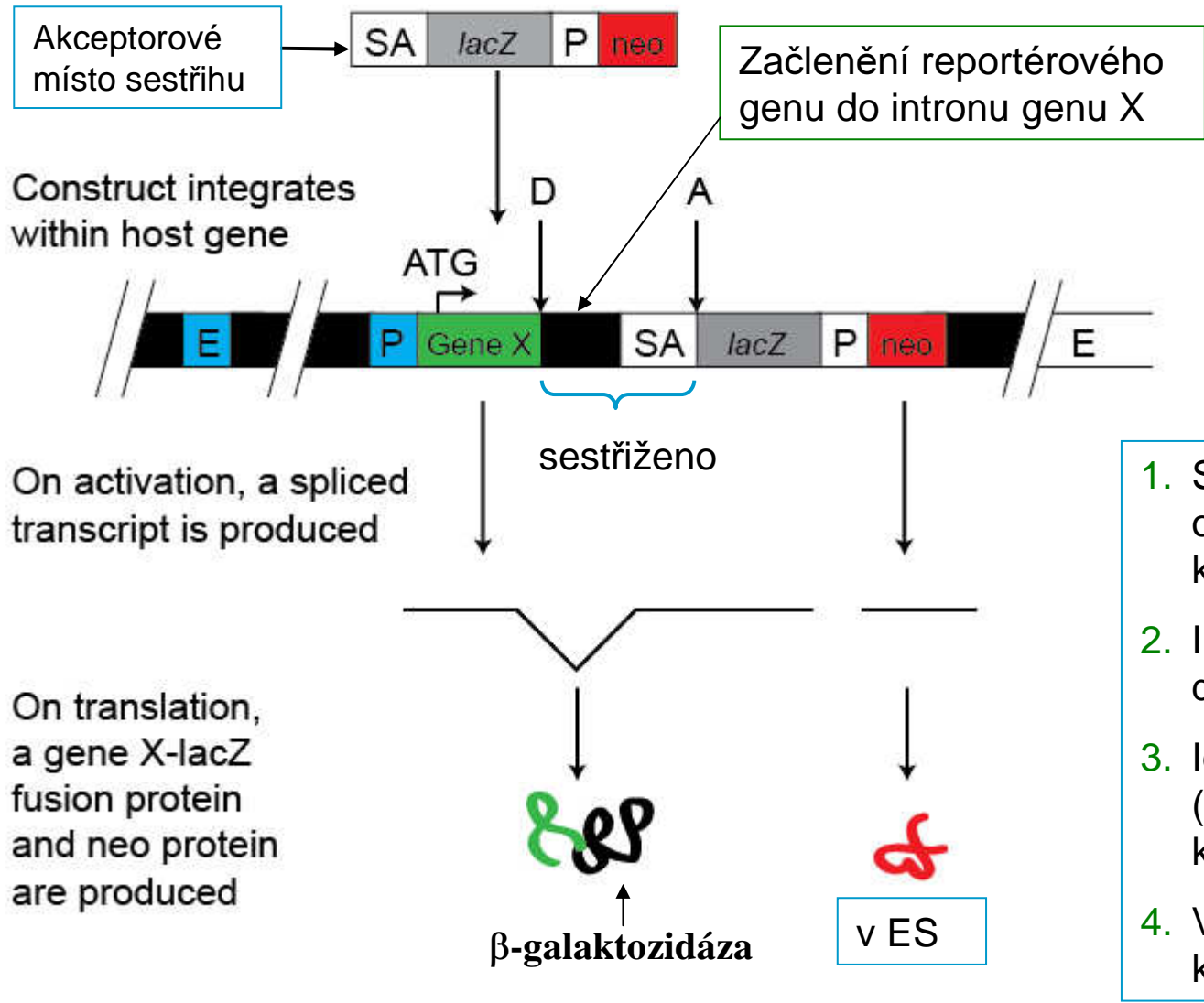
Intestine
Kidney
Liver
Lung
Muscle
Pancreas
Skin
Spleen
Stomach
Testes
Thymus
COS cells

Konstitutivní tvorba T-ag

Tkáňově specifická exprese transgenu

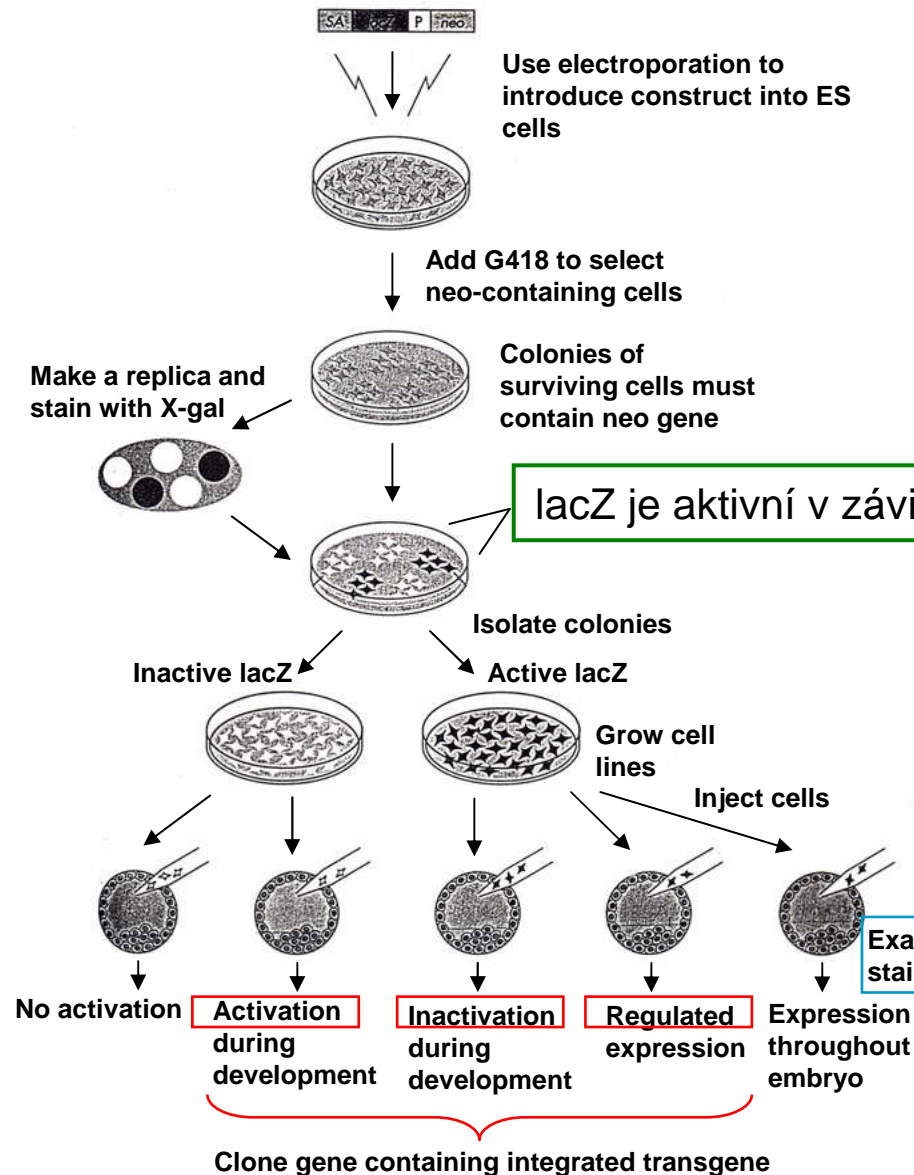
Transgeny jako reportérové geny pro sledování exprese genů hostitele

Gene trap construct



1. Selekcce ES buněk obsahujících vnesený konstrukt (G418),
2. Injekce ES buněk do blastocyst,
3. Identifikace buněk (tkání), kde dochází k expresi lacZ,
4. Vyhledání genu X, který řídí expresi lacZ

Využití reportérových genů k vyhledání genů aktivních v určitých fázích vývoje



Analogicky lze využít retrovirových vektorů s reportérovými geny – infekce tkání vyvíjejícího se organismu

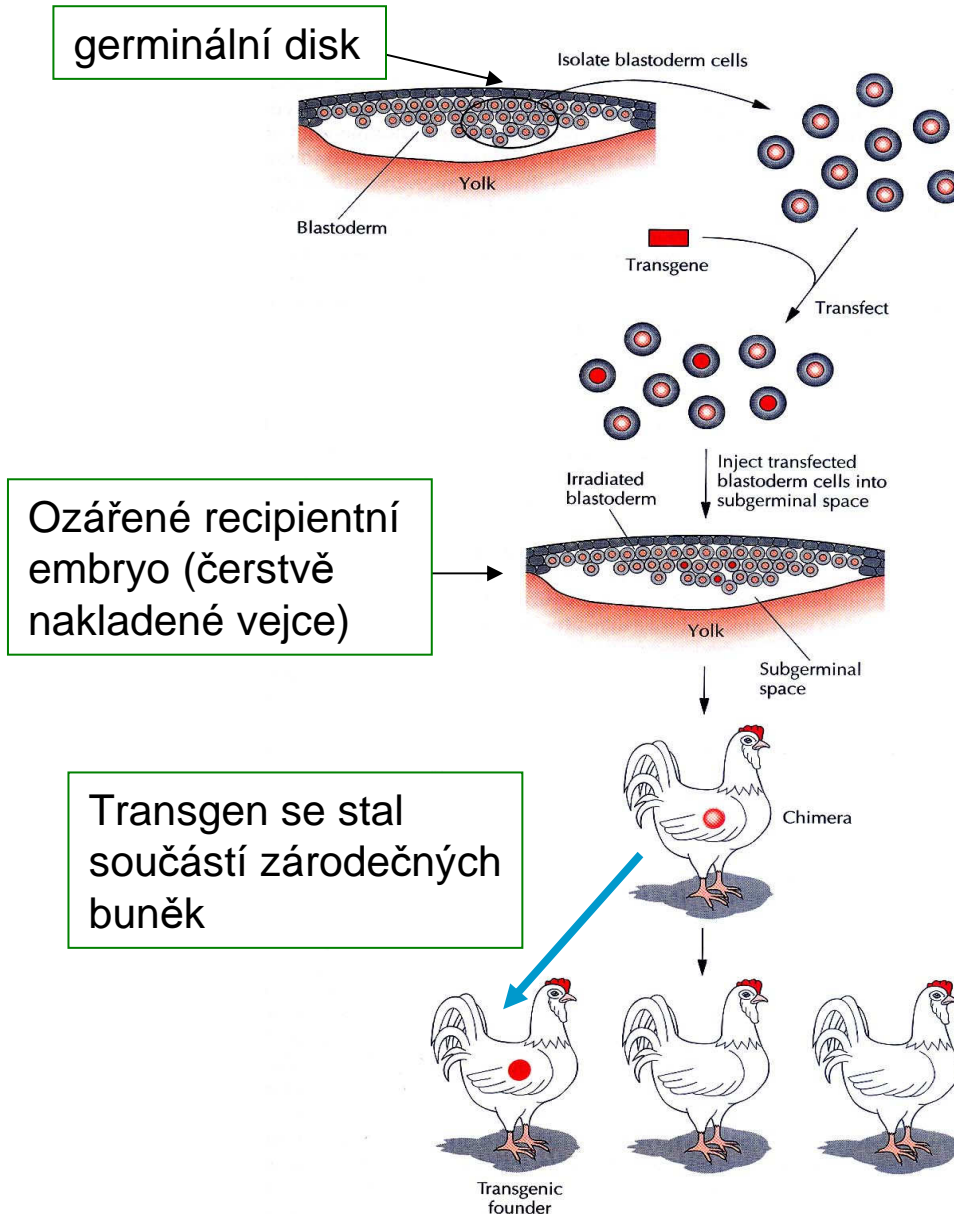
lacZ je aktivní v závislosti na místě začlenění

Buněčná linie obsahující transgen (lacZ) začleněný v konkrétním místě (genu)

Sledování exprese genu během vývoje embrya

Inzerční inaktivace genů vede k pozměněným fenotypům, izolace těchto genů

Příprava transgenních ptáků



Ozářené recipientní embryo (čerstvě nakladené vejce)

Transgen se stal součástí zárodečných buněk

Pluripotentní buňky (blastodermální a primordiální) pěstované in vitro

Cíle transgenozu u drůbeže

Odolnost proti virovým a bakteriálním chorobám, proti kokcidióze

Nižší obsah tuku a cholesterolu ve vejcích, vyšší kvalita masa

Příprava rekombinantních proteinů: monoklonální protilátky, růstový hormon, inzulin, HSA, interferon, lysozym

Příklady transgenních živočichů

- Zvířata (myši, drůbež, hospodářská zvířata, ryby) obsahující gen pro růstový hormon – rychlejší růst, změna vlastností produktů
- Přežvýkavci obsahující ve střevě GMO-mikroorganismy, které redukuje toxicitu některých rostlin (rozšíření potenciálu krmiv)
- Drůbež s pozměněnými trávicími schopnostmi (celulóza, lignin, tuky)
- Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu ve vejcích (využití v průmyslu a farmakologii)
- Ovce s vylepšenou srstí
- **Myši s pozměněnými nebo inaktivovanými geny**
 - studium lidských genetických poruch: neurodegenerativní, imunitní, hormonální choroby,
 - vliv faktorů na organismus (např. léků, mutagenů)
 - studium poruch paměti
- Zvířata jako dárci orgánů pro transplantace (xenotransplantáty) – orgány s pozměněnými antigeními vlastnostmi vhodné pro člověka
- **Zvířata produkující cizorodé látky v mléce, moči, krvi nebo tkáních (animal farming: zvířata jako bioreaktory)**

Transgenní zvířata

- **Transgenní prasata**
 - Prasata exprimující lidský hemoglobin – 15 % lidského hemoglobinu
 - Náhražka krve pro transfúze, uchovávání orgánů pro transplantace
- **Transgenní myši používané jako modely při studiu lidských chorob**
 - Např.: myši se změnou barvy srsti, abnormality v ledvinách, kostech, s cukrovkou, osteopetrozou, změnou vývoje T-lymfocytů, změněnou aktivitou interferonu, uspořádání genů pro imunoglobuliny, osteoarthritis, s receptory pro viry /HIV/ a řada jiných.
- **Modifikace trávicích enzymů savců**
 - Příprava myší, které depolymerizují celulózu v tenkém střevě – nepřezvykující savci schopni trávit celulózu.
- **Transgenní kmen myší, který roste bez stárnutí**
 - Gen pochází z kapra a kóduje protein tithonin.
 - Perspektiva – zavedení genu do dobytka – příprava křehkého masa

Ovce, myš – knokaut prionového genu

Myši – knokaut genu pro myostatin (chybění myostatinu vede k růstu svalů) – belgický modrý skot, jiná hospodářská zvířata

Transgenní zvířata

- Transgenní živočichové hypersenzitivní k mutagenům nebo karcinogenům
 - testování toxicity látek vnějšího prostředí, farmak aj.
- Transgenní prasata s genem pro somatotropin
 - stejná rychlost růstu, o 15 % účinnější konverze potravy
 - zvířata mají méně tuku a netrpí poruchami
- Transgenní ovce exprimující gen kódující obalový protein visna viru
 - *vlastní retrovirová vakcína* /retrovirus způsobující pneumonie, proti nimž není možná vakcinace/. Zavedení cizího genu do ovcí vede k produkci protilátek proti proteinu a tím ochraně vůči infekci.
- Transgenní ryby
 - rezistentní k prostředí (salinita, kyselá dešť)
 - rezistentní vůči chorobám
 - zvýšení přírůstku ryb zavedením genu pro chimerický všeobecný růstový hormon (losos – 13-ti násobné přírůstky ve srovnání s netransgenními rybami)

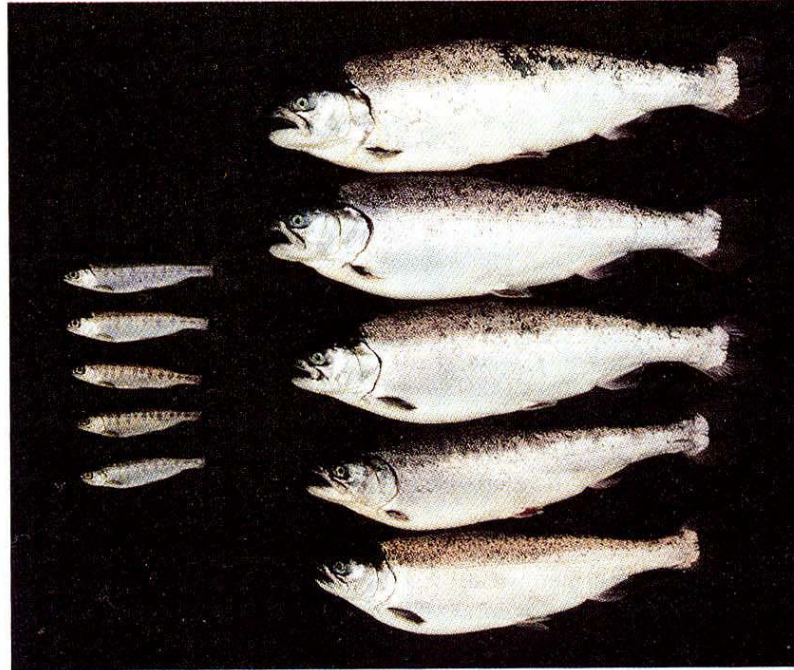


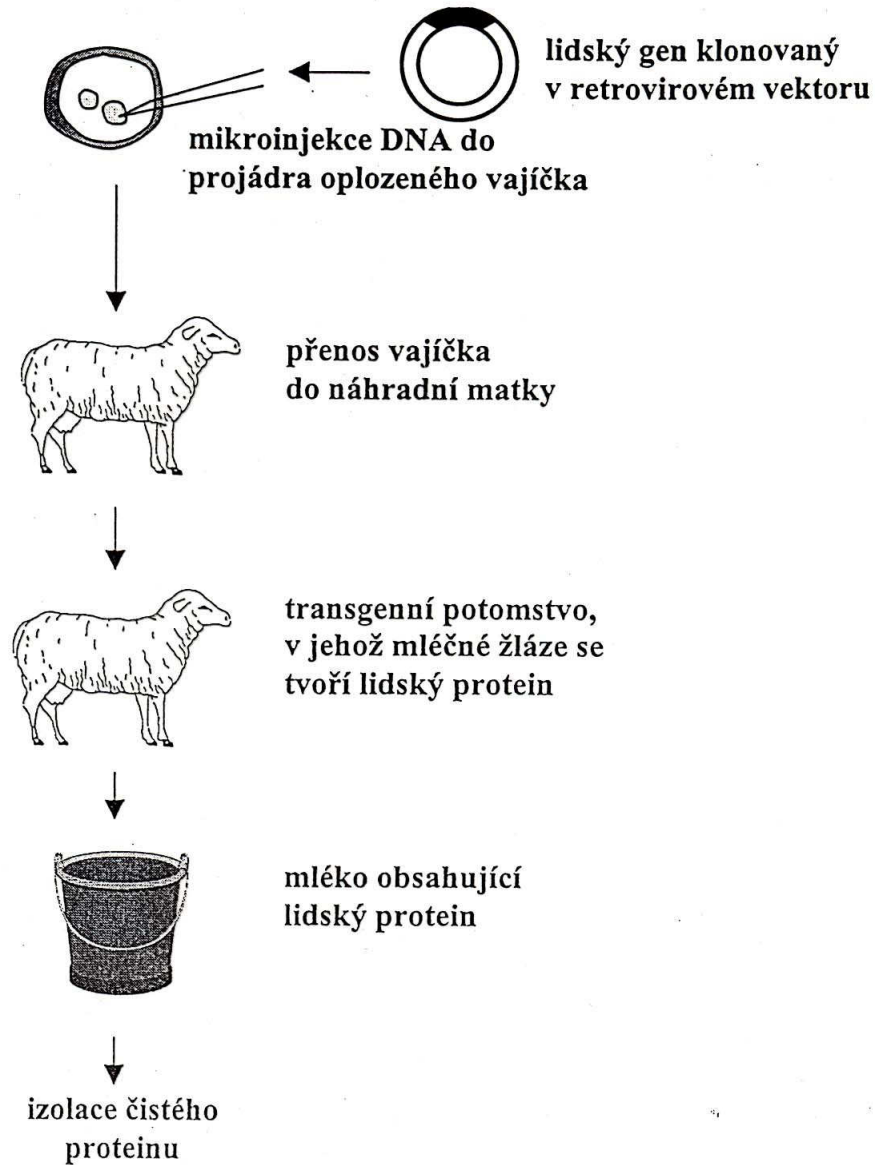
Figure 11.18 Normal coho salmon (left) and genetically engineered coho salmon (right) containing a sockeye salmon growth-hormone gene driven by the regulatory region from a metallothionein gene. The transgenic salmon average 11 times the weight of the nontransgenic fish. The smallest

fish on the left is about 4 inches long. [Courtesy of R. H. Devlin. Reprinted by permission from *Nature* 371: 209, R. H. Devlin, T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, E. M. Donaldson, P. Swanson, and W. K. Chan. Copyright 1994 Macmillan Magazines Ltd.]

Přenos genů do ryb: do oplozeného vajíčka nebo do časného zárodku je mikroinjekcí do cytoplazmy přenesena DNA (účinnost 10-30%), pak křížení transgenních ryb – ustavení transgenních linií)

- Růstový hormon (all-fish n. all- salmon) pod kontrolou „antifreeze proteinu“

Zvířata jako živé továrny („animal farming“)



Příklady látek vytvářených v transgenních zvířatech

Zvíře	Látka	Využití
ovce	Alfa-1-antitrypsin	Léčba rozedmy plic
koza	Tkáňový aktivátor plazminogenu	Rozpouštění krevních sraženin
ovce	Faktor pro srážení krve VIII, IX	Navození srážení krve
prase	hemoglobin	Náhražka krve při transfúzi
koza	Lidský růstový hormon	Léčba nanismu
ovce, myš	Regulátor CFTR	Léčba cystické fibrózy
prase	Lidský protein C	Antikoagulans krve

koza – protein pavoučího vlákna v mléce, atp.

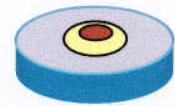
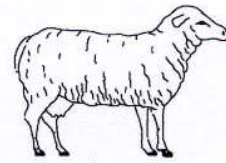
kráva – lysozym v mléce

New genes introduced into farm animals to alter growth characteristics

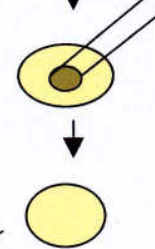
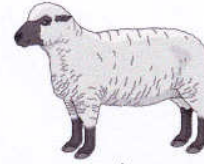
Species	Regulatory element	Structural gene
Pig	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone
Pig	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone
Sheep	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone
Pig	Mouse metallothionein promoter	Bovine growth hormone
Pig	Human metallothionein promoter	Porcine growth hormone
Pig	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone releasing factor
Pig	Mouse Moloney leukaemia virus long terminal repeat	Rat growth hormone
Pig	Mouse albumin promoter	Human growth hormone releasing factor
Cow	Mouse mammary tumour virus long terminal repeat	Bovine growth hormone
Sheep	Mouse metallothionein promoter	Bovine growth hormone
Sheep	Ovine metallothionein promoter	Ovine growth hormone
Pig	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone releasing factor
Sheep	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone releasing factor
Pig	Mouse metallothionein promoter	Human insulin-like growth factor I
Pig	Bovine prolactin promoter	Bovine growth hormone
Pig	Cytomegalovirus long terminal repeat	Porcine growth hormone
Pig	Rat phosphoenol pyruvate carboxykinase promoter	Bovine growth hormone
Cow	Chicken skeletal actin promoter	Human oestrogen receptor
Sheep	Mouse transferrin promoter	Bovine growth hormone
Pig	Mouse sarcoma virus long terminal repeat	Chicken SKI
Cow	Chicken skeletal actin promoter	Human insulin-like growth factor I

Klonování savců

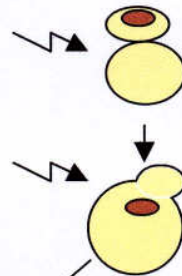
Odebrání buněk z mléčné žlázy bílé ovce a jejich přenos do media se sníženou koncentrací živin



Odebrání neoplozeného vajíčka z ovce černohubky a odstranění jeho jádra obsahujícího chromozomovou výbavu

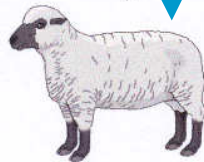


Umístění obou buněk do těsné blízkosti a navození jejich splynutí elektrickým impulzem. Další impulz nastartuje buněčné dělení

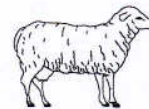


Možnost přenosu cizích genů

Přenos vyvíjejícího se embrya do dělohy náhradní matky, která zárodek donosí

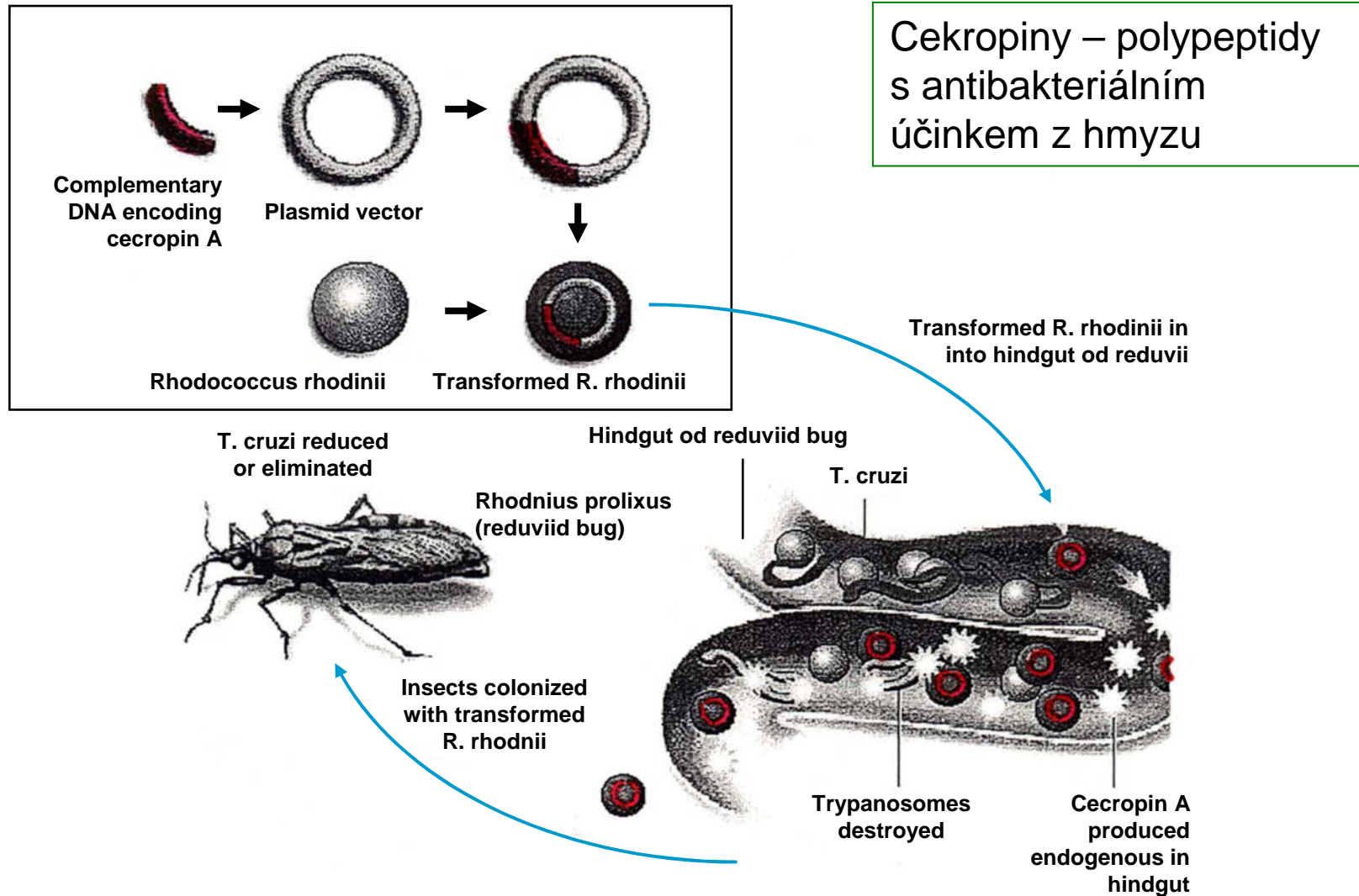


Polly

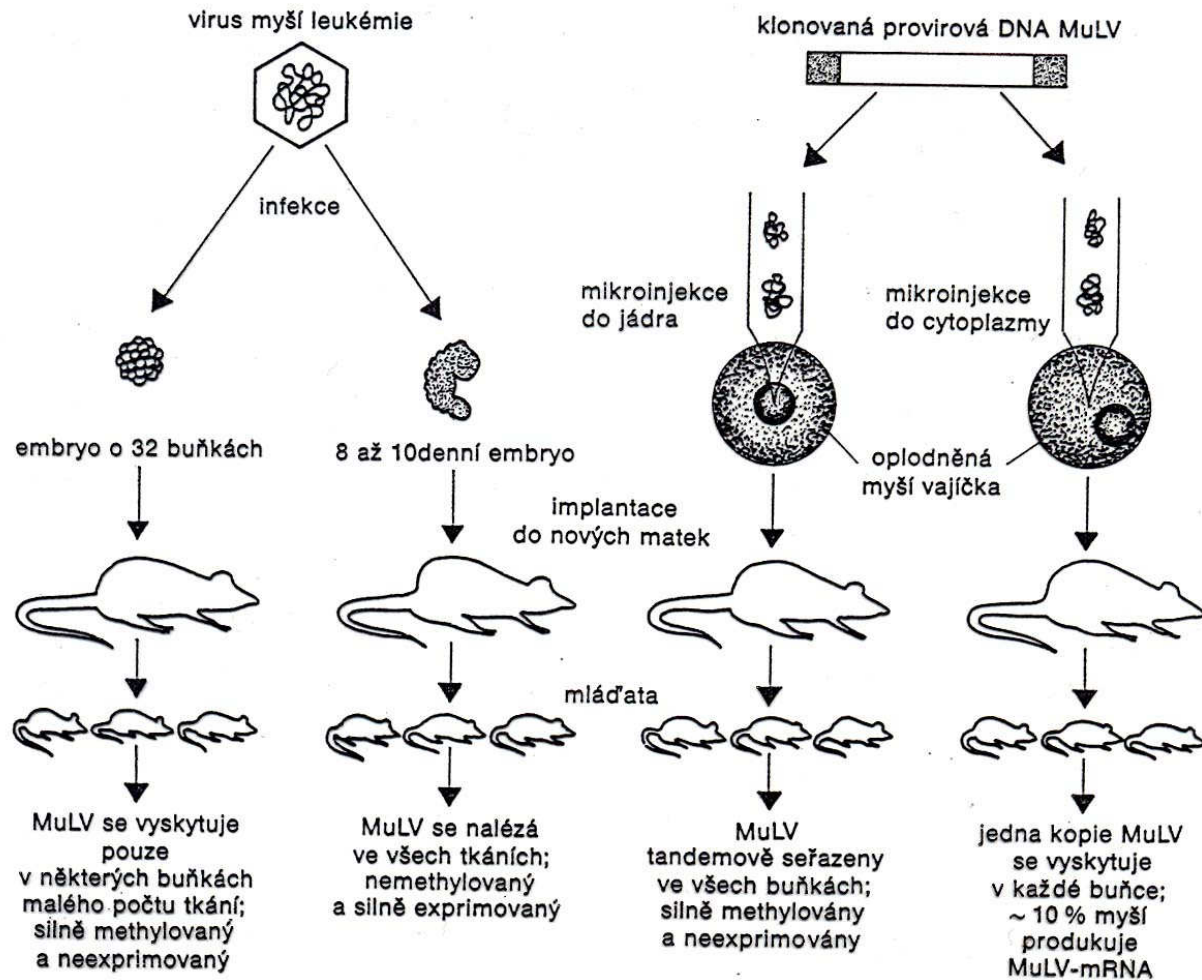


Narozené jehně Dolly má stejnou výbavu chromozomů jako bílá ovce, z jejíž mléčné žlázy byla buňka odebrána

Transgenní bakterie (Rhodococcus) produkující toxin (cecropin) usmrcující trypanozomy ve střevě ploštic



Různé osudy DNA viru leukémie po přenosu do myši – závislost na čase a metodě přenosu



Mozaikovitost,
1 kopie integrovaná
v různých místech

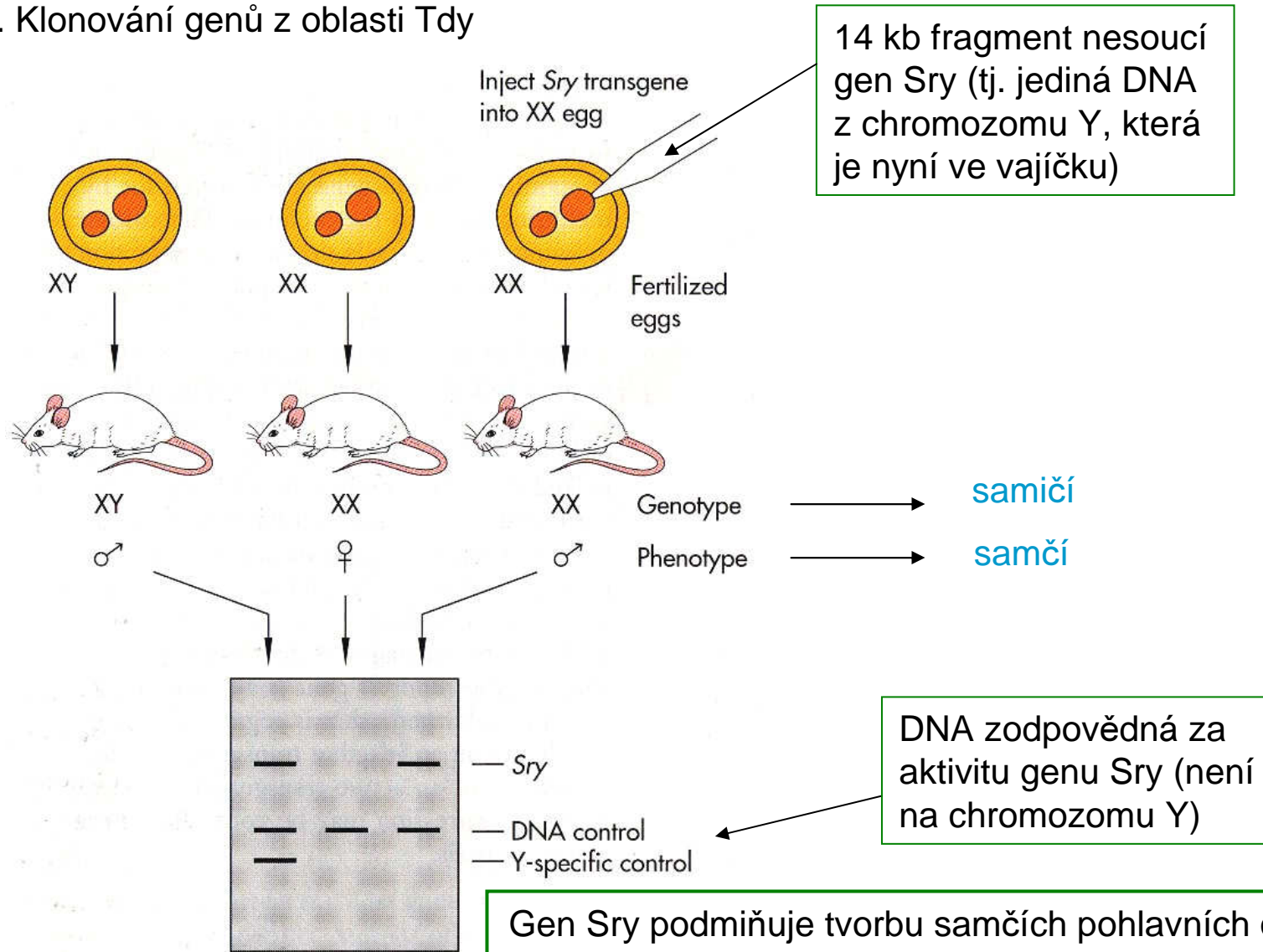
Virus působí
jako infekční
agens

20-40 kopií
v jednom
chromozomu

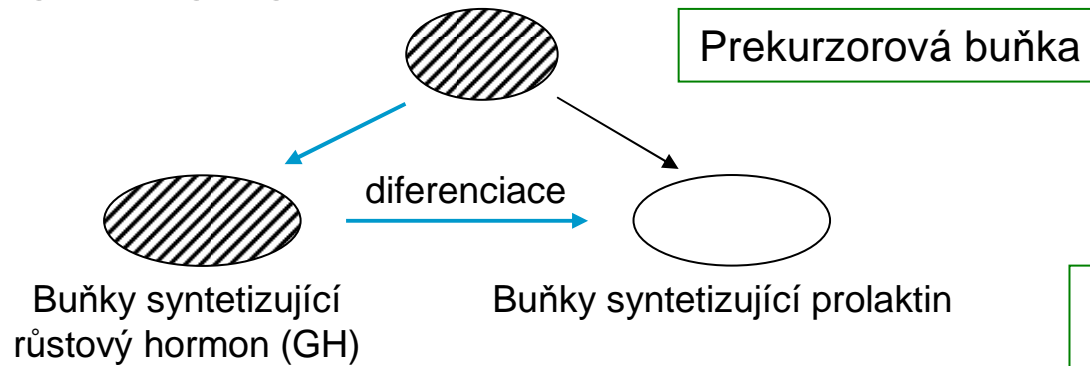
Tkáňově
specifická
exprese

Analýza sexuální determinace – funkce genu sry

1. Lokalizace genu Tdy (Sry) na chromozomu
2. Klonování genů z oblasti Tdy



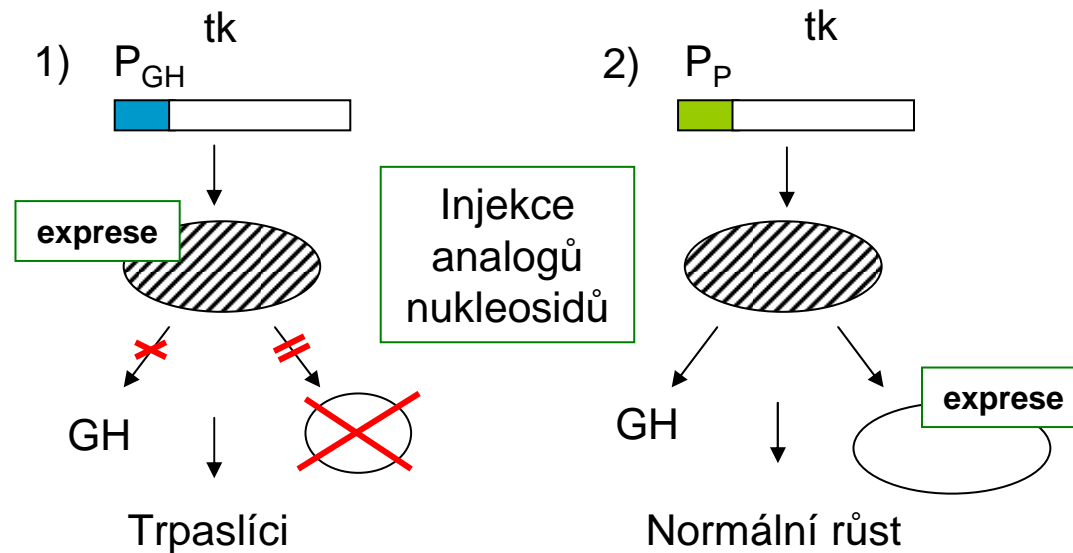
Objasnění vývojových vztahů mezi buňkami hypofýzy



P_{GH} = promotor genu pro GH

P_P = promotor genu pro prolaktin

Zvířata s genem tk pod kontrolou P_{GH} (1) P_P (2)



V buňkách, v nichž je P aktivní, dochází k expresi TK, která analogy nukleotidů metabolizuje na produkty, které zabíjejí dělicí se buňky exprimující daný gen.

Závěry:

- Buňky syntetizující prolaktin se nedělí (nejsou usmrcovány)
- Buňky syntetizující GH jsou prekurzory buněk syntetizujících prolaktin