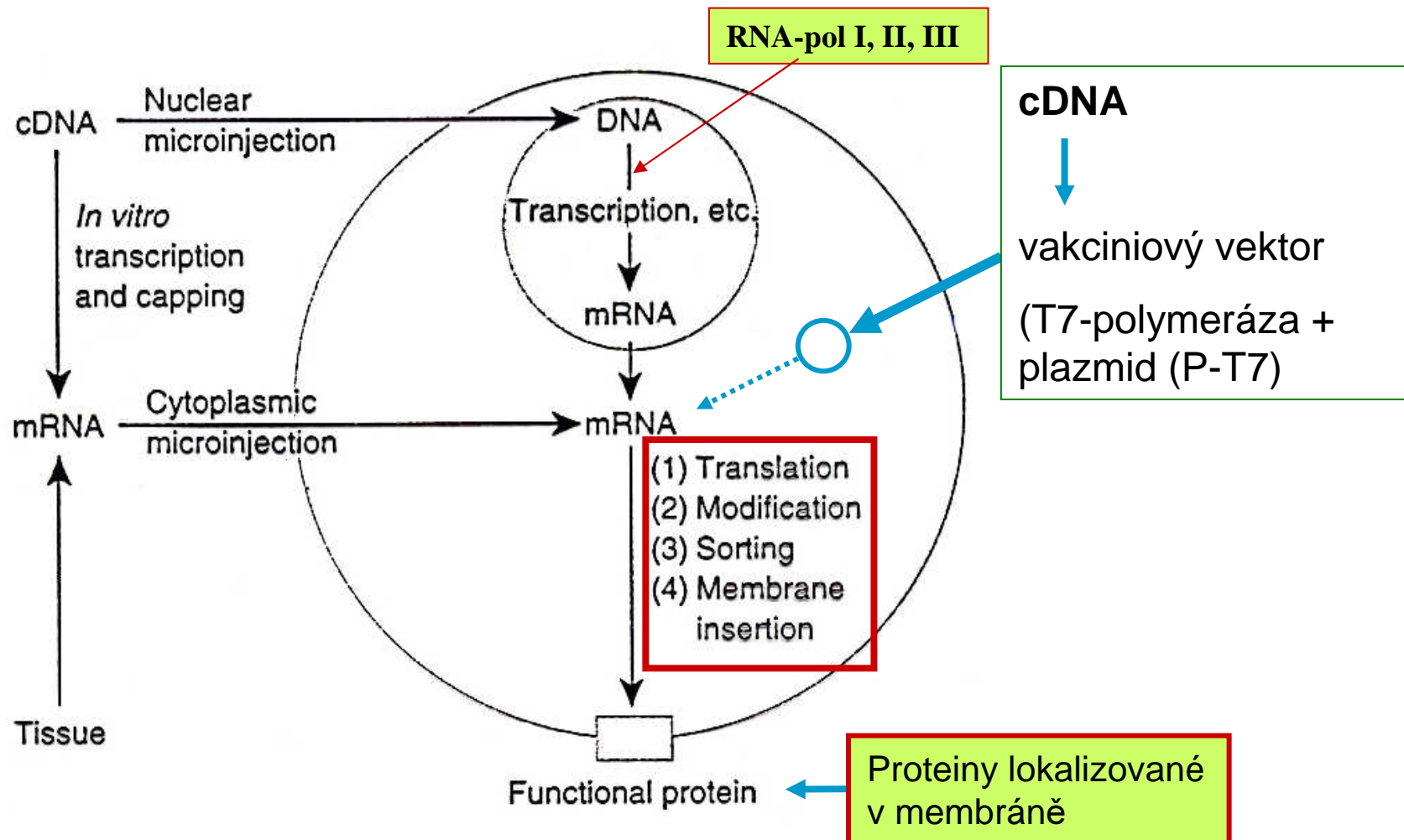
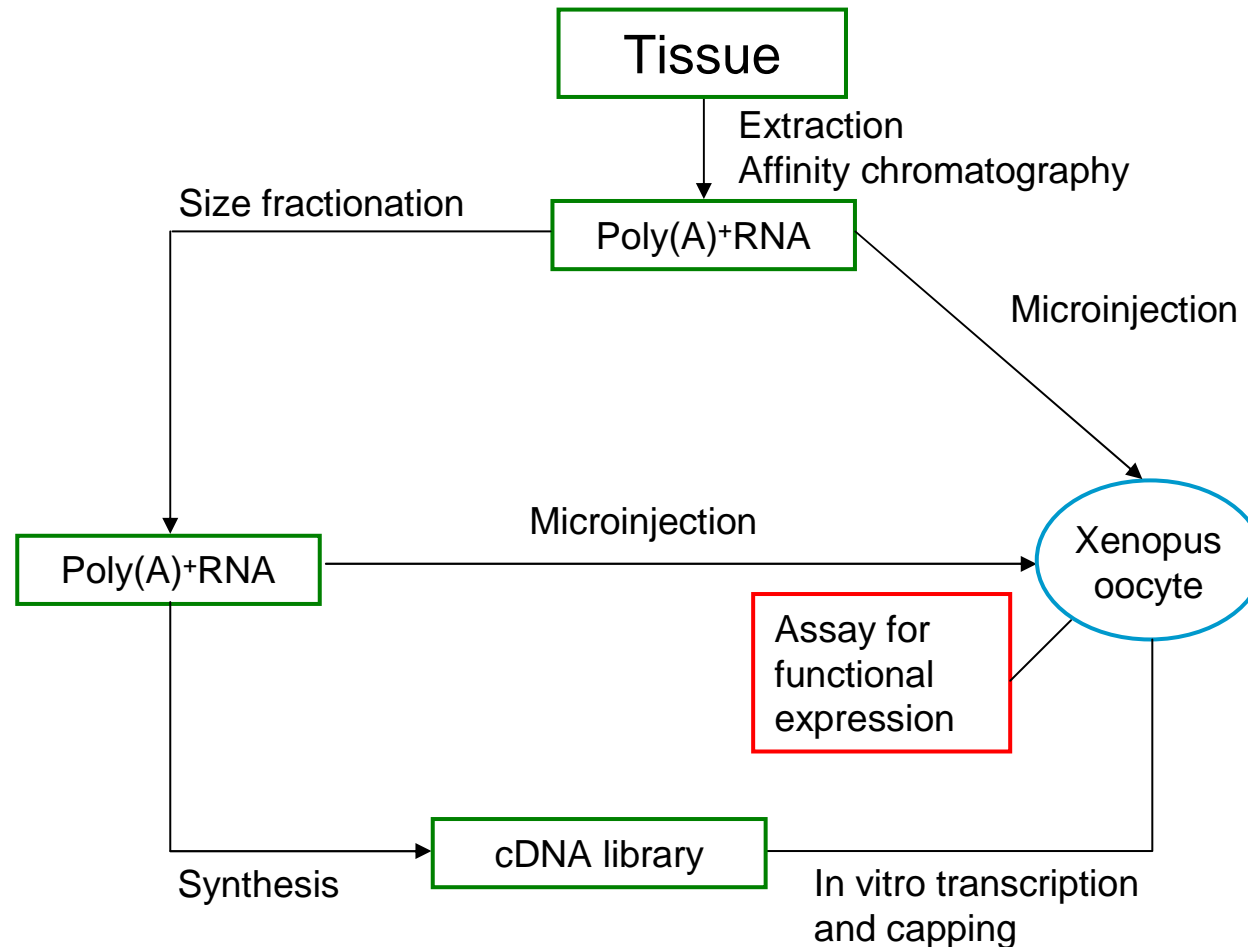


Heterologní expresní systém v oocytech Xenopus

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



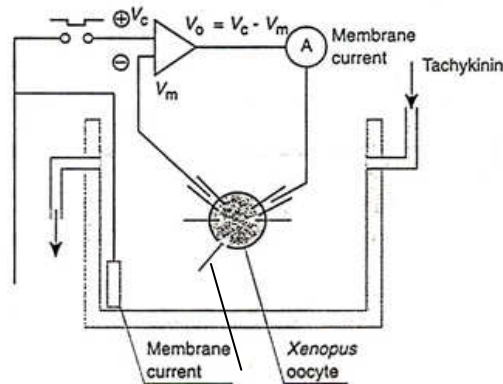
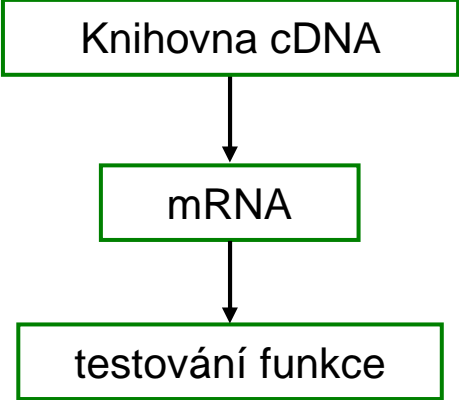
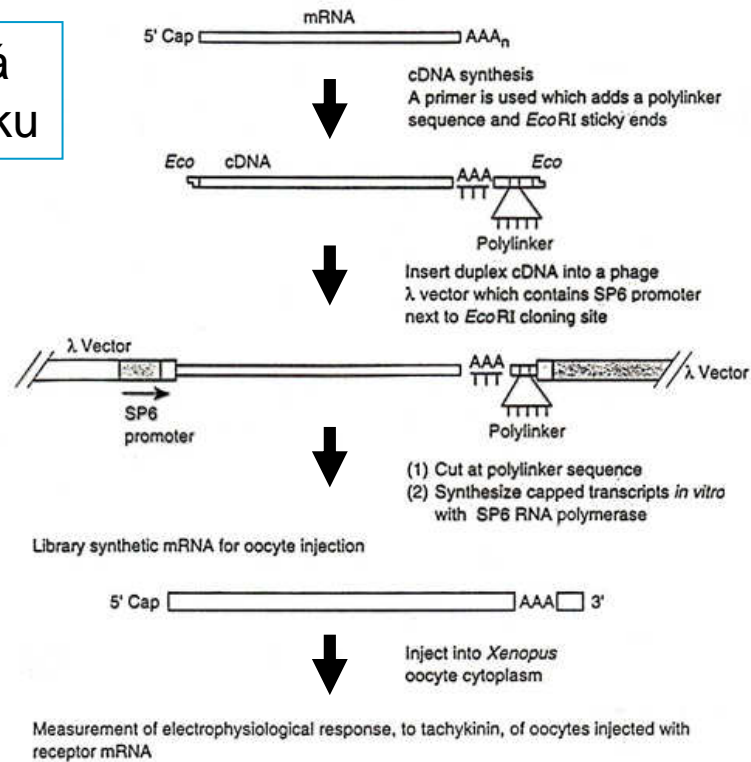
Strategie funkčního klonování v oocytech Xenopus



Studium vývojových defektů pramenících z nadprodukce normálních nebo změněných produktů genů

Izolace klonu cDNA obsahujícího receptor pro tachykinin

mRNA připravená z hovězího žaludku



Oocyt, do něhož byla vnesena mRNA exprimuje membránový receptor pro substanci 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

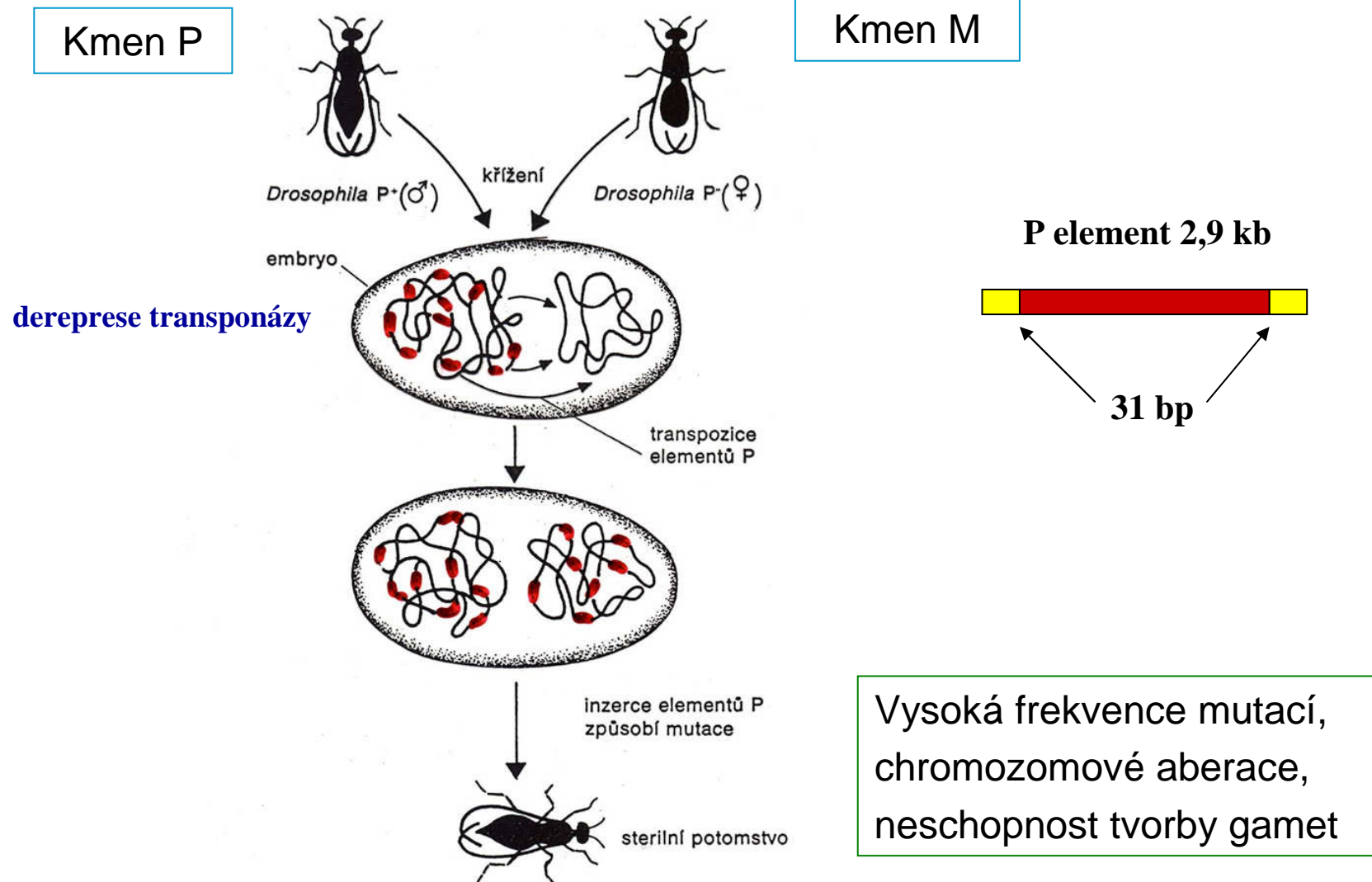
Carriers

Na⁺/glucose co-transporter (rabbit intestine)	Hediger et al. 1987
Na⁺-independent neutral amino acid transporter (rat kidney)	Tate et al. 1992

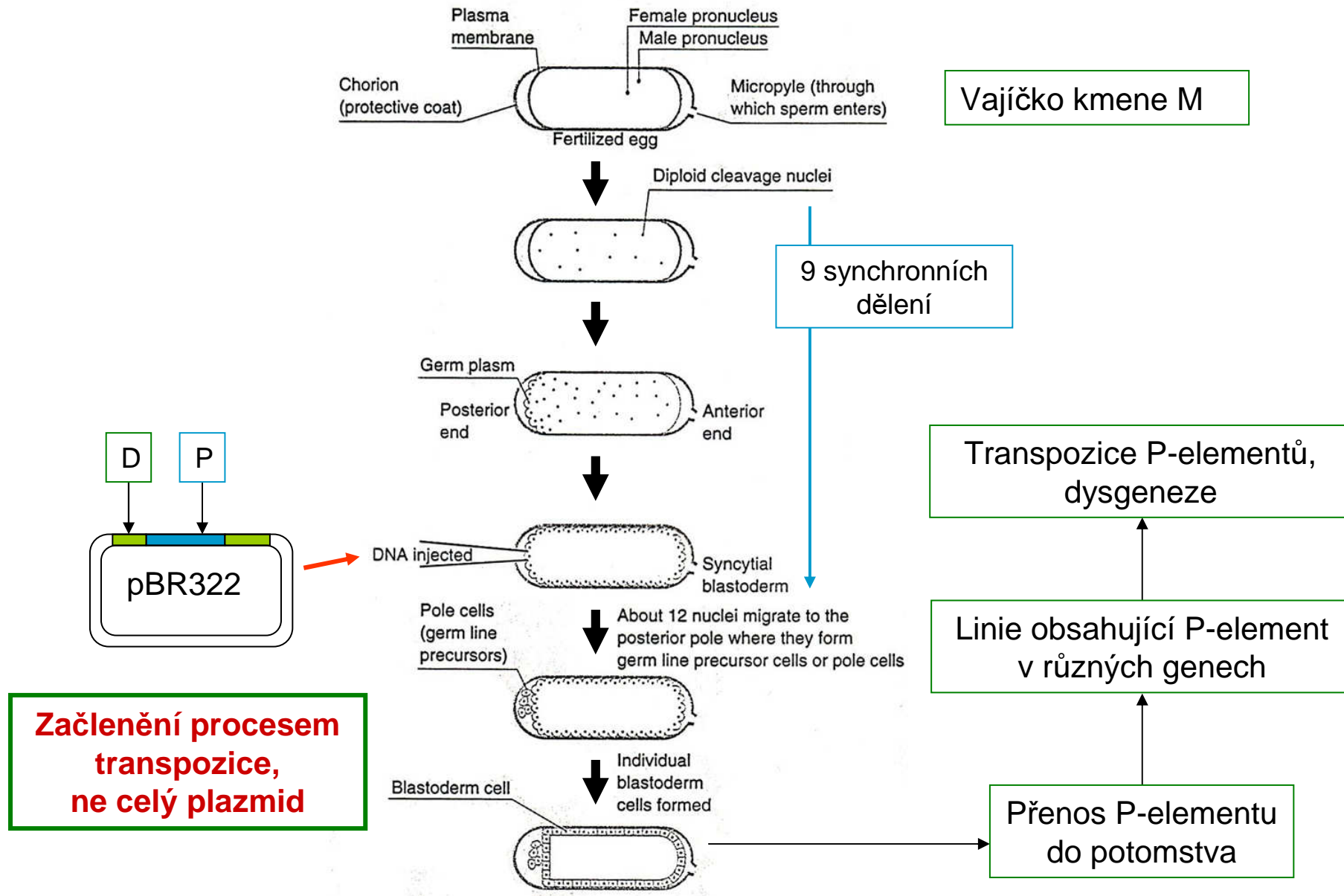
Channels

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

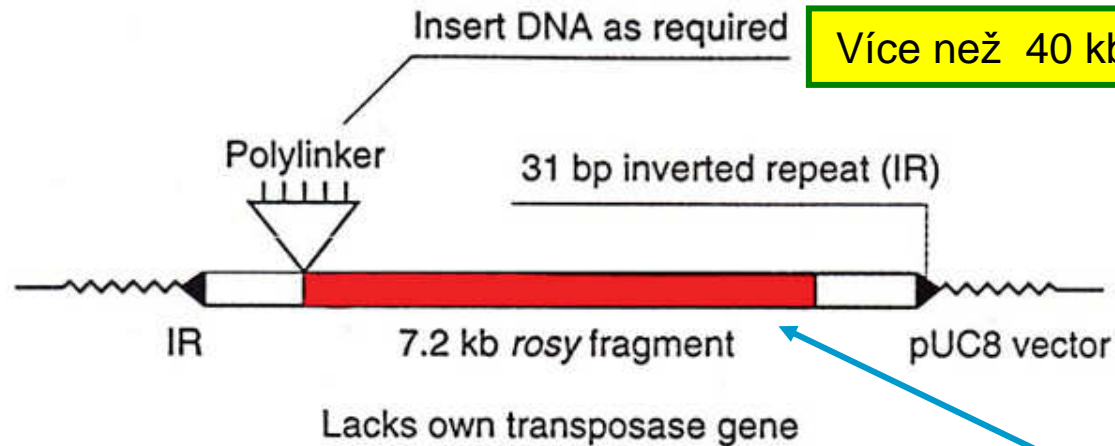


Časná embryogeneze u drosofily, přenos P-elementů do zárodků



Vektory odvozené z P-elementů

Structure of P-element derivative: Carnegie



Více než 40 kb

rosy = xantin dehydrogenáza

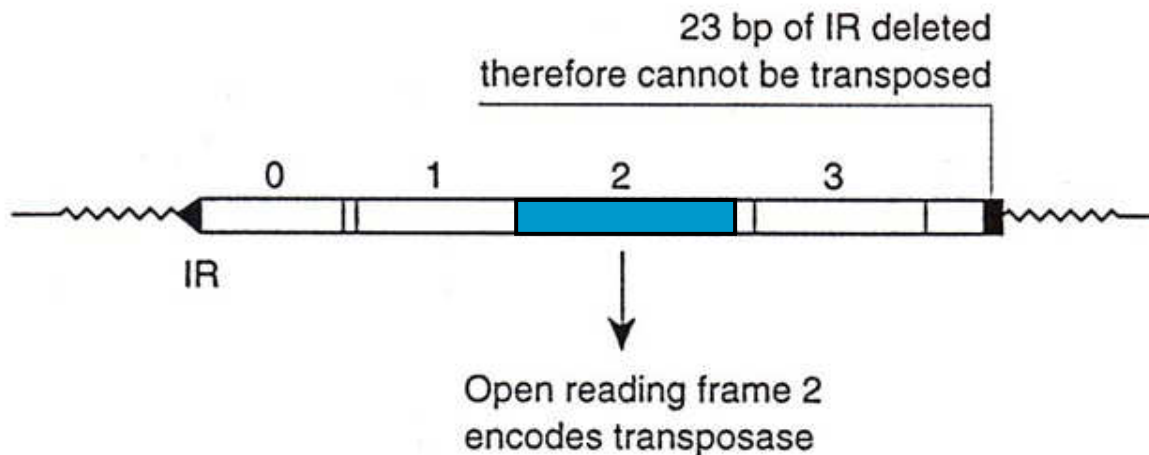
Selekční markery

rosy+

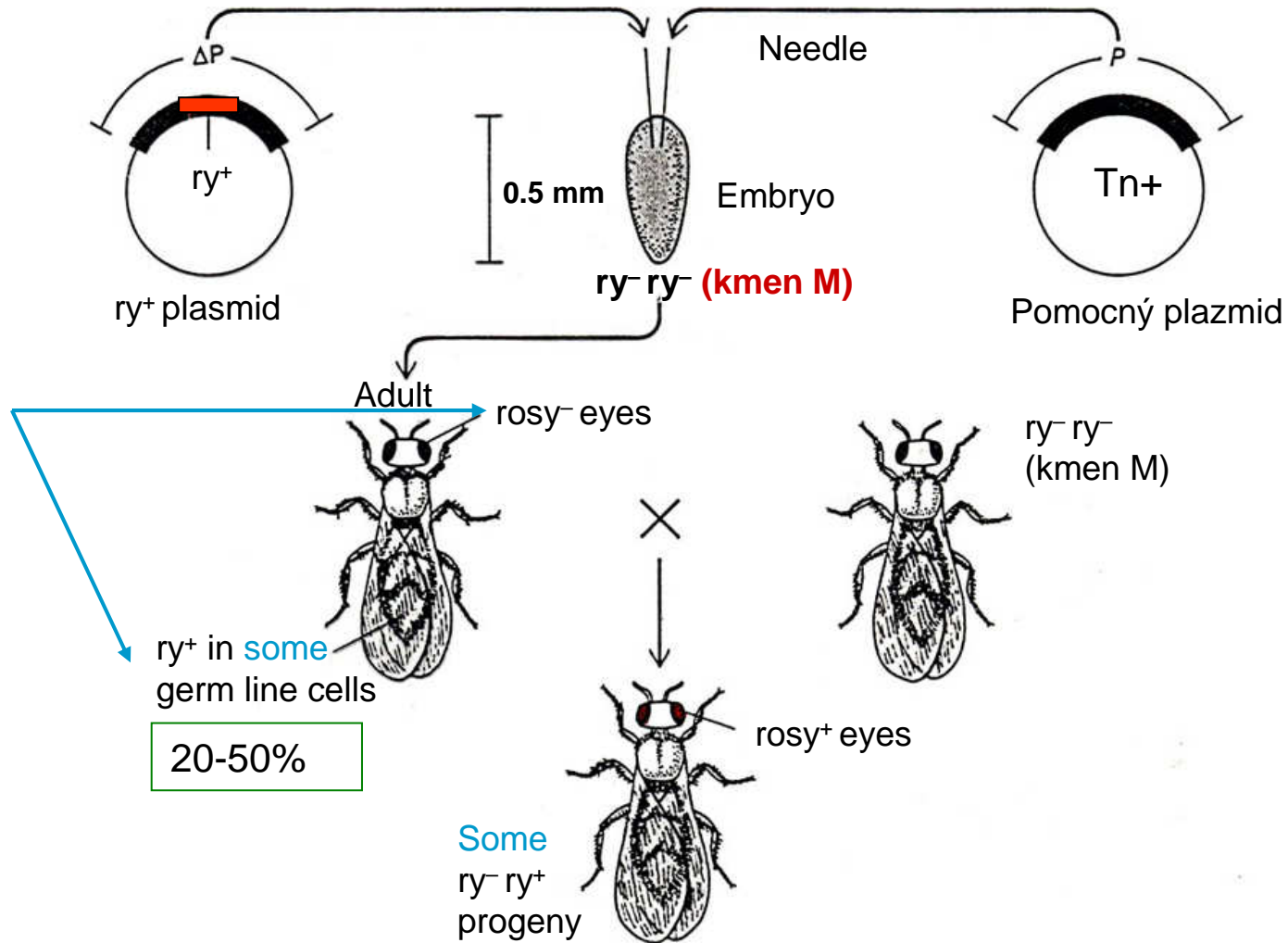
adh ...etanol

neoR ...G418

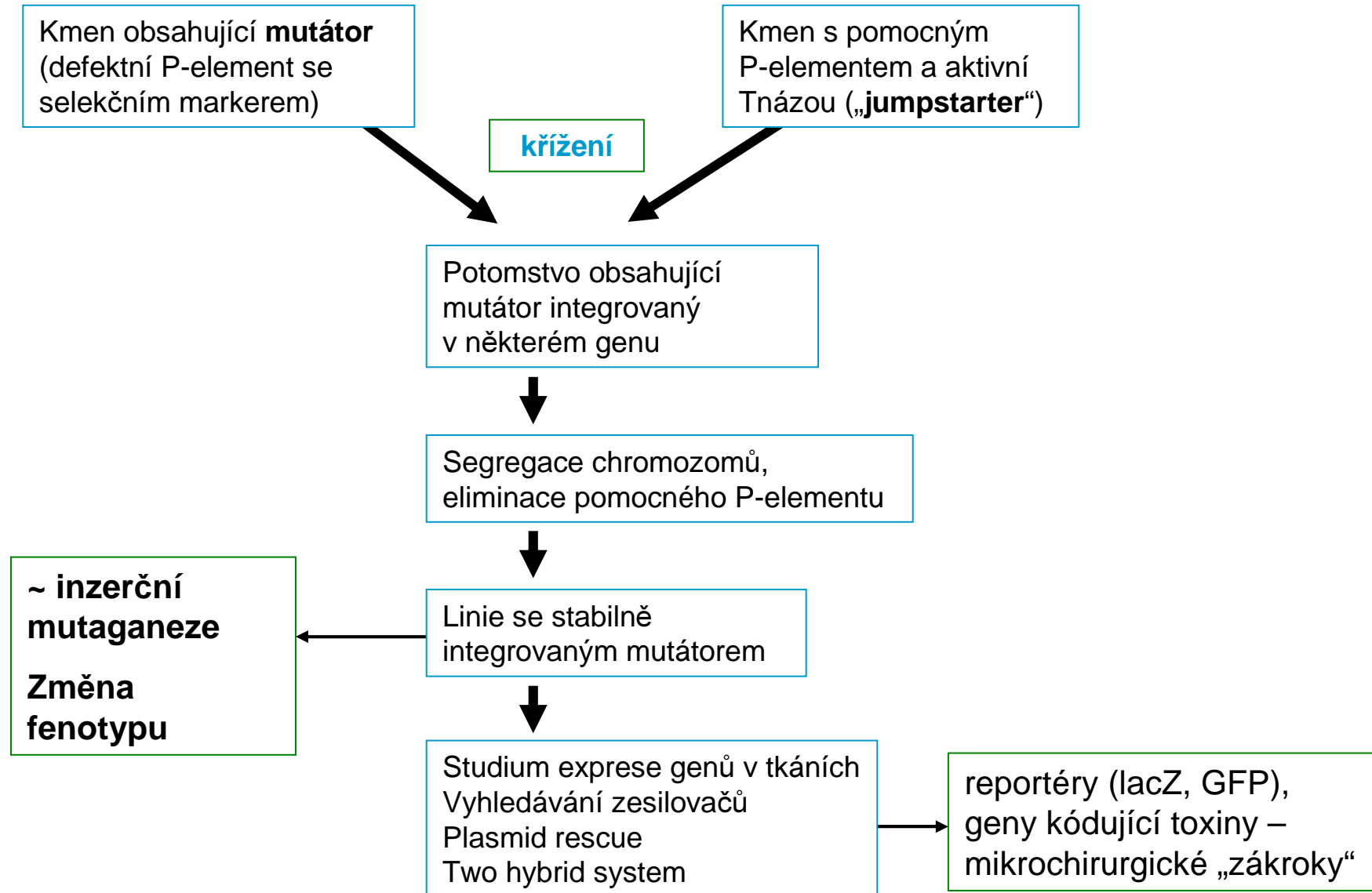
Struktura pomocného P-elementu: p π 25.7 wings clipped



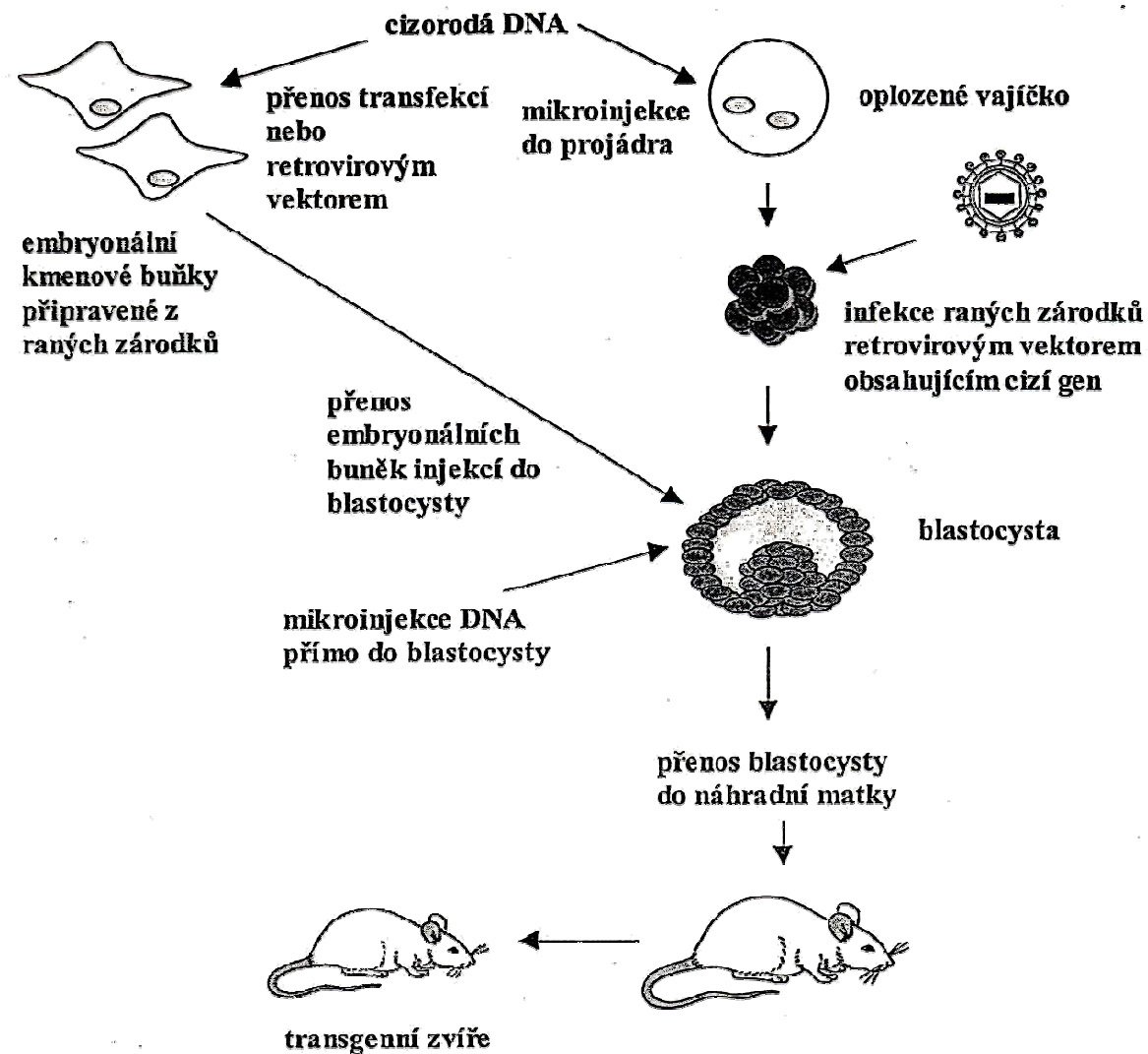
Přenos genů do drosofily zprostředkovaný P-elementy



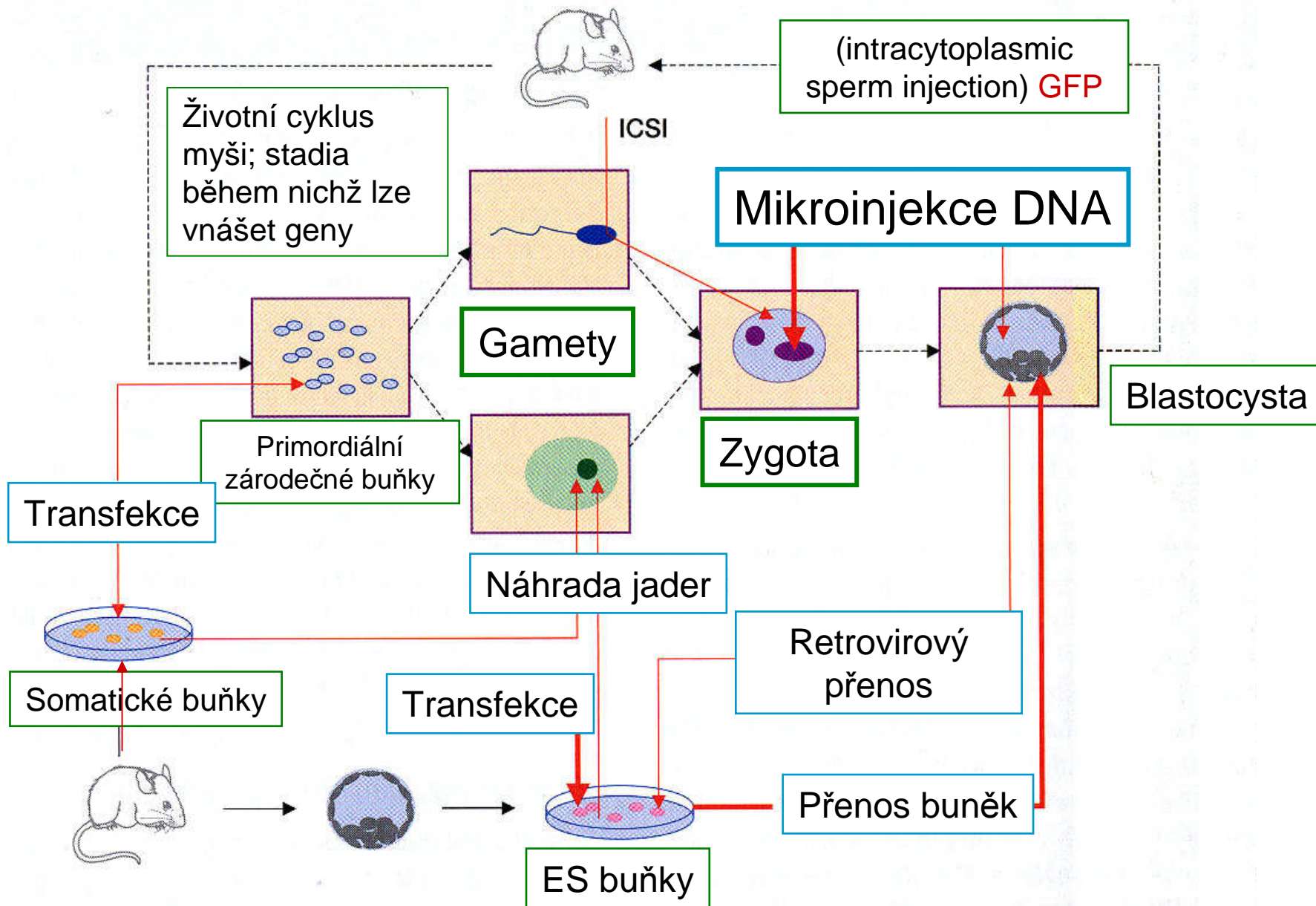
Využití P-elementů jako mutátorů



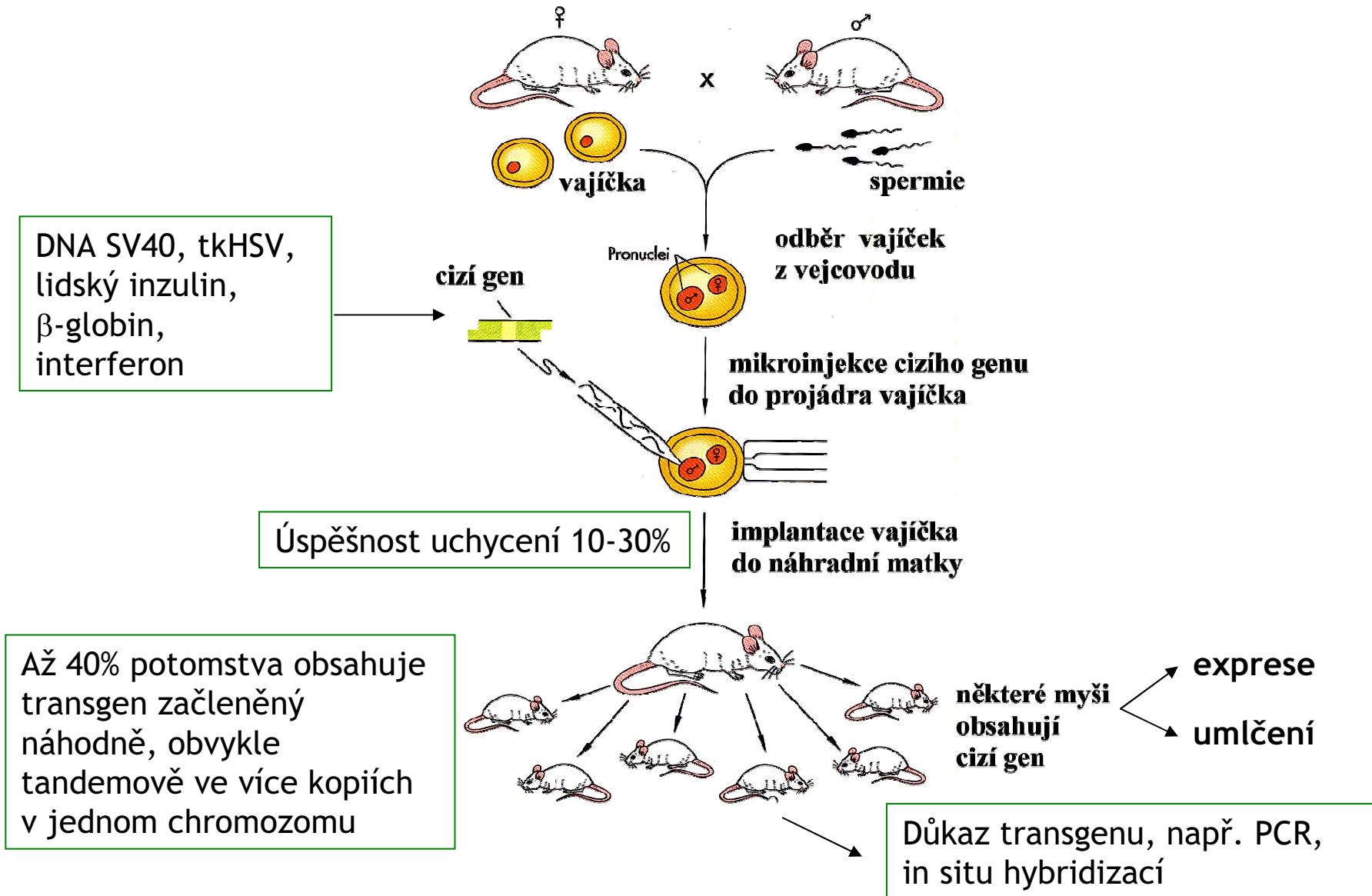
Příprava transgenních savců



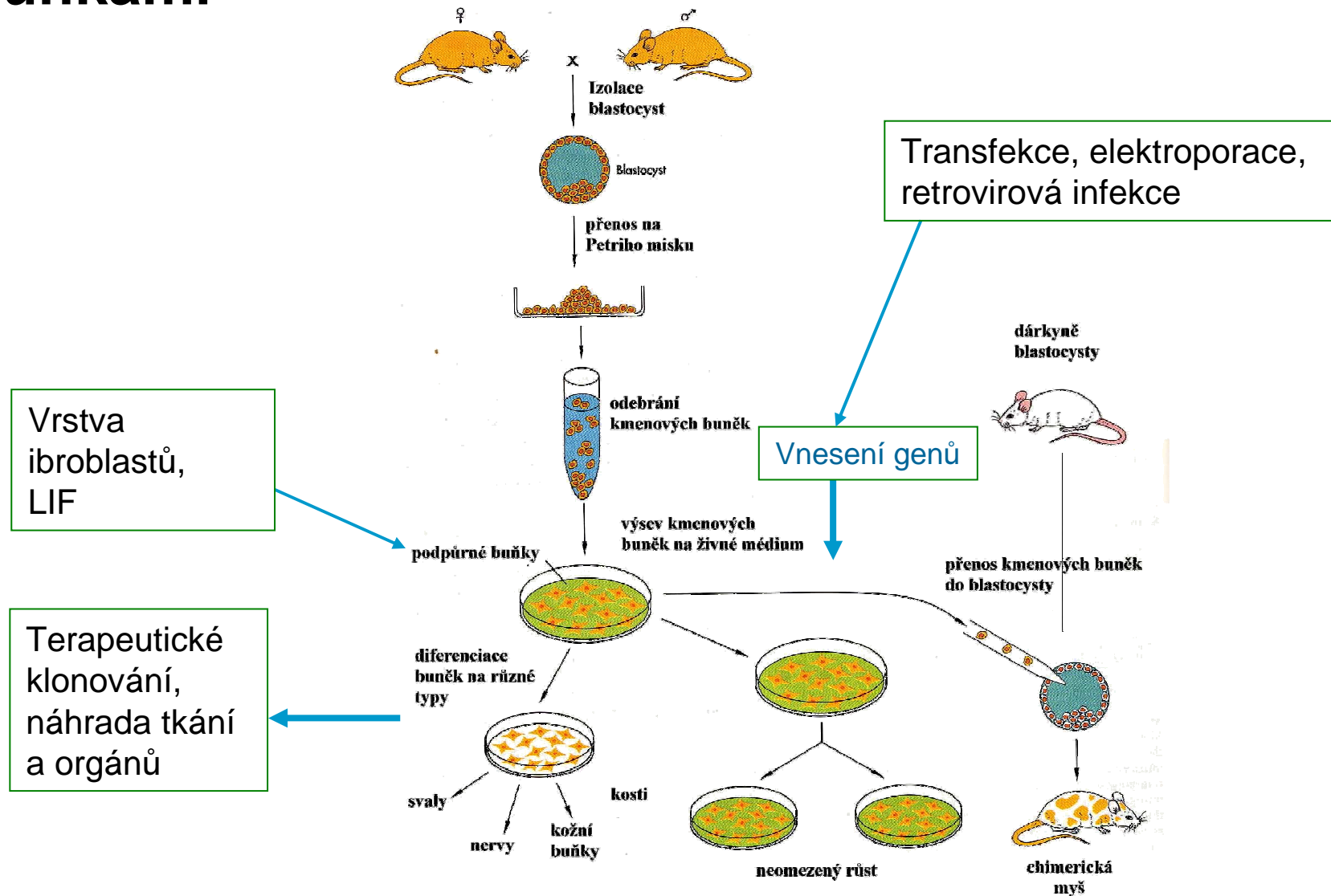
Možnosti přípravy geneticky modifikovaných myší



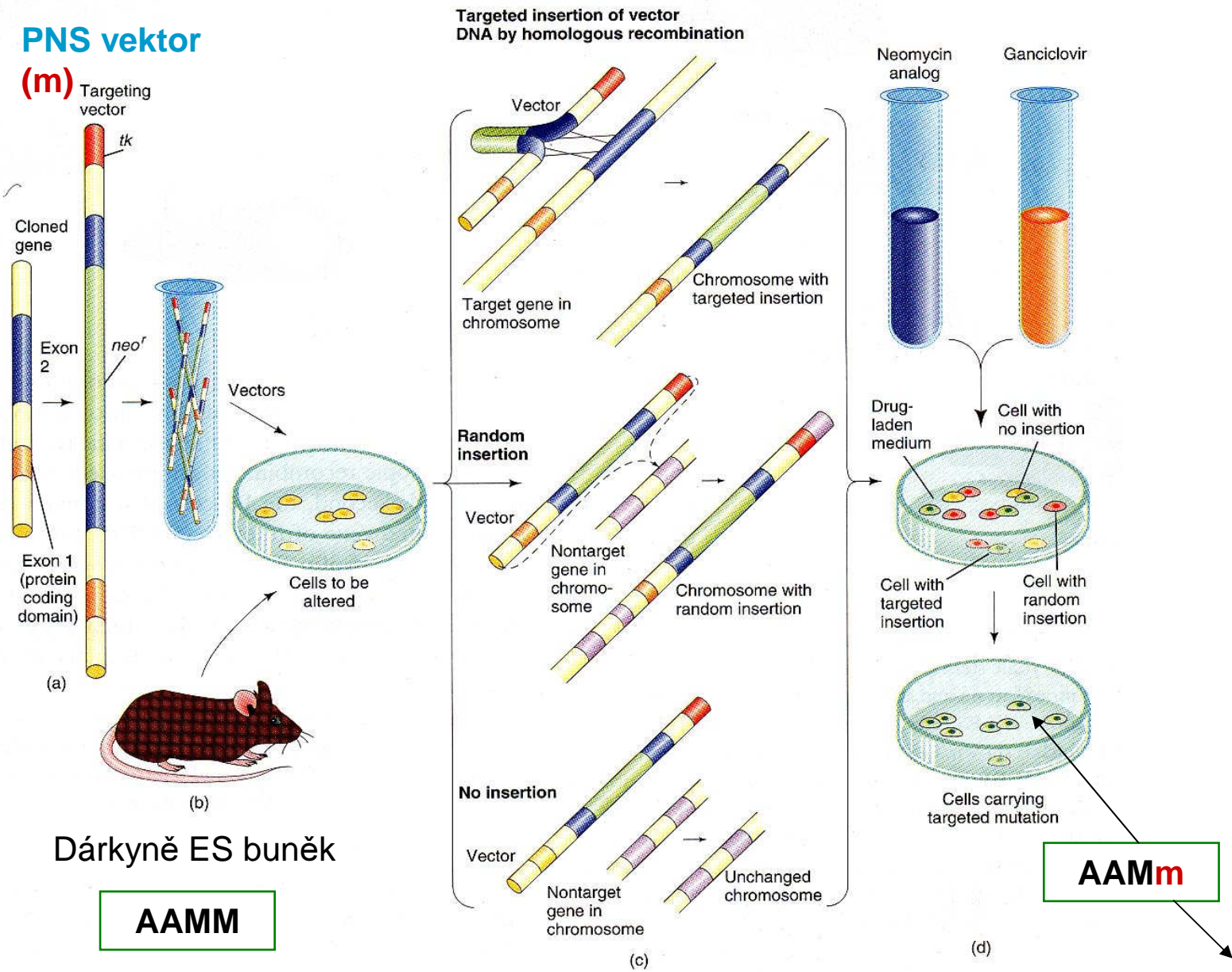
Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka



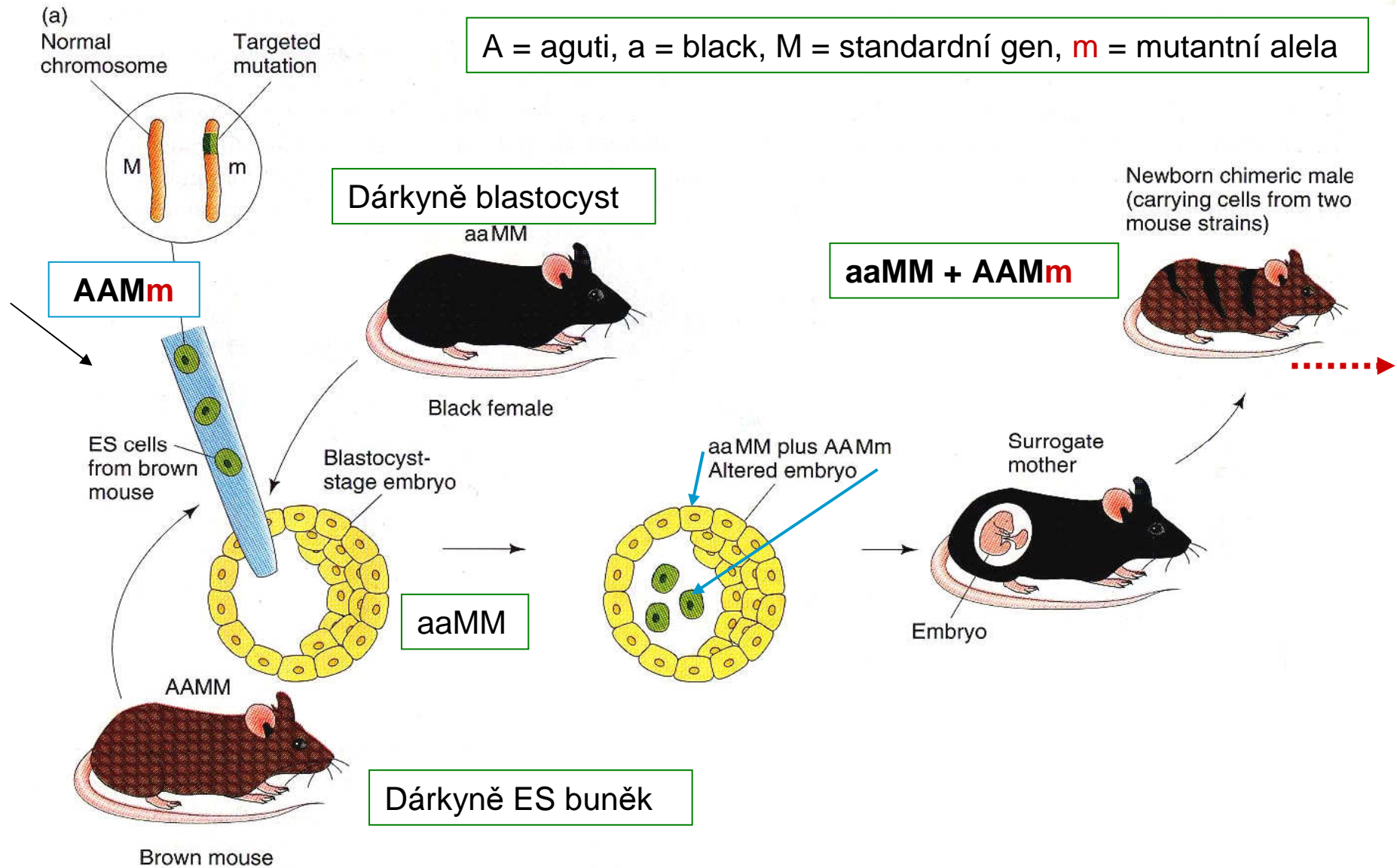
Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami



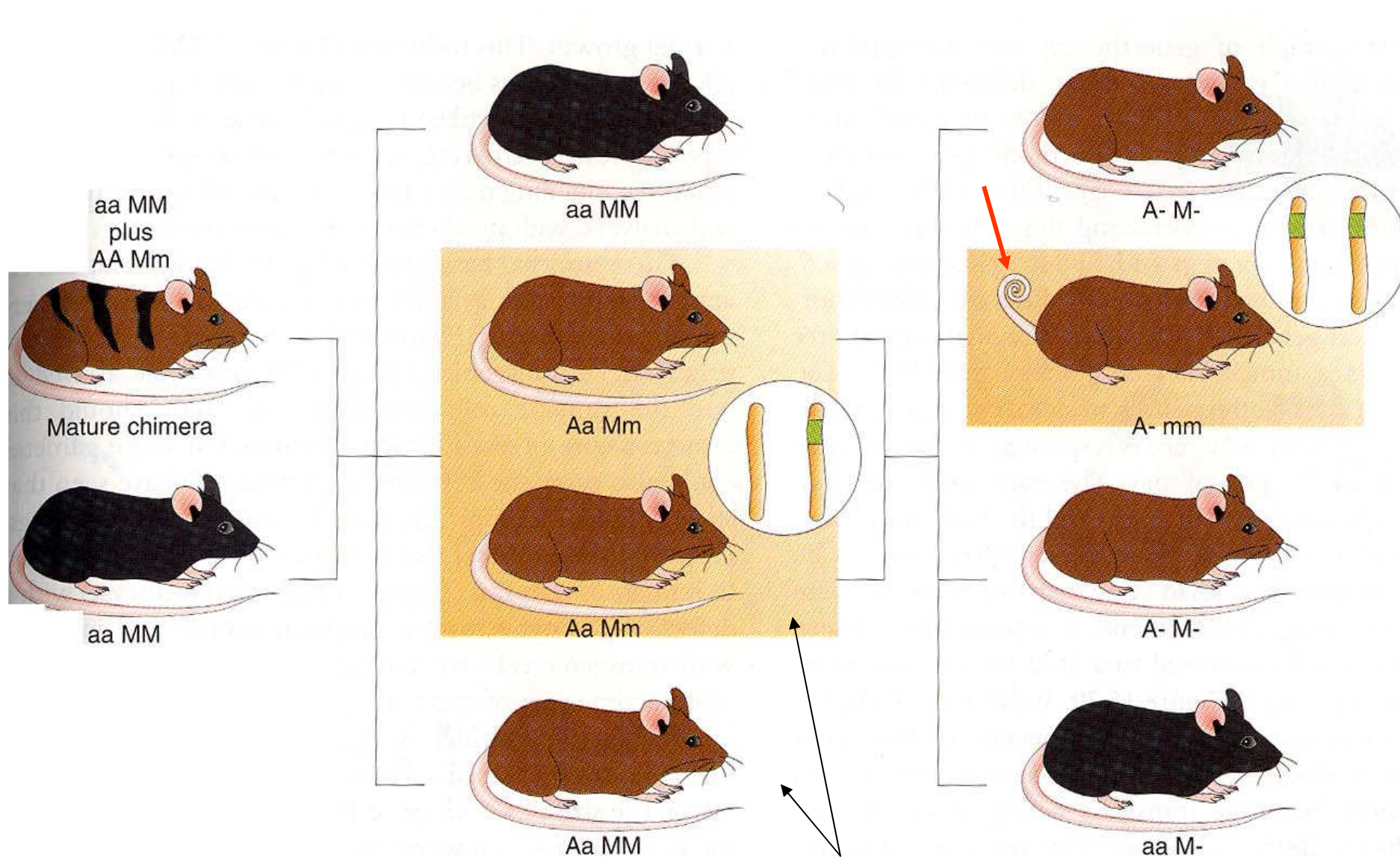
Příprava ES buněk s geny knokautovanými homologní rekombinací



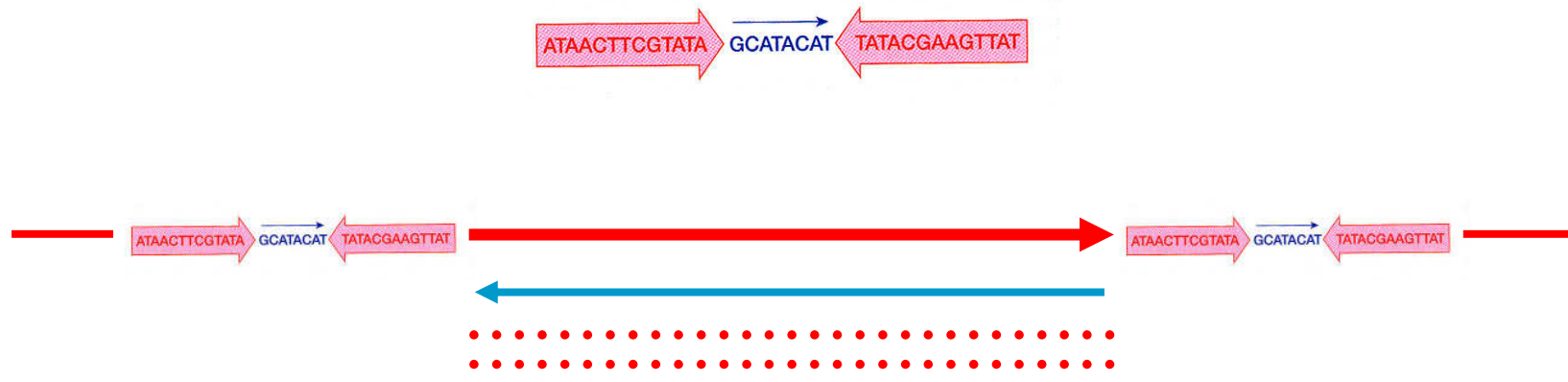
Vytvoření myši nesoucí knokautovaný gen



Pokračování - vytvoření myši s knokautovaným genem

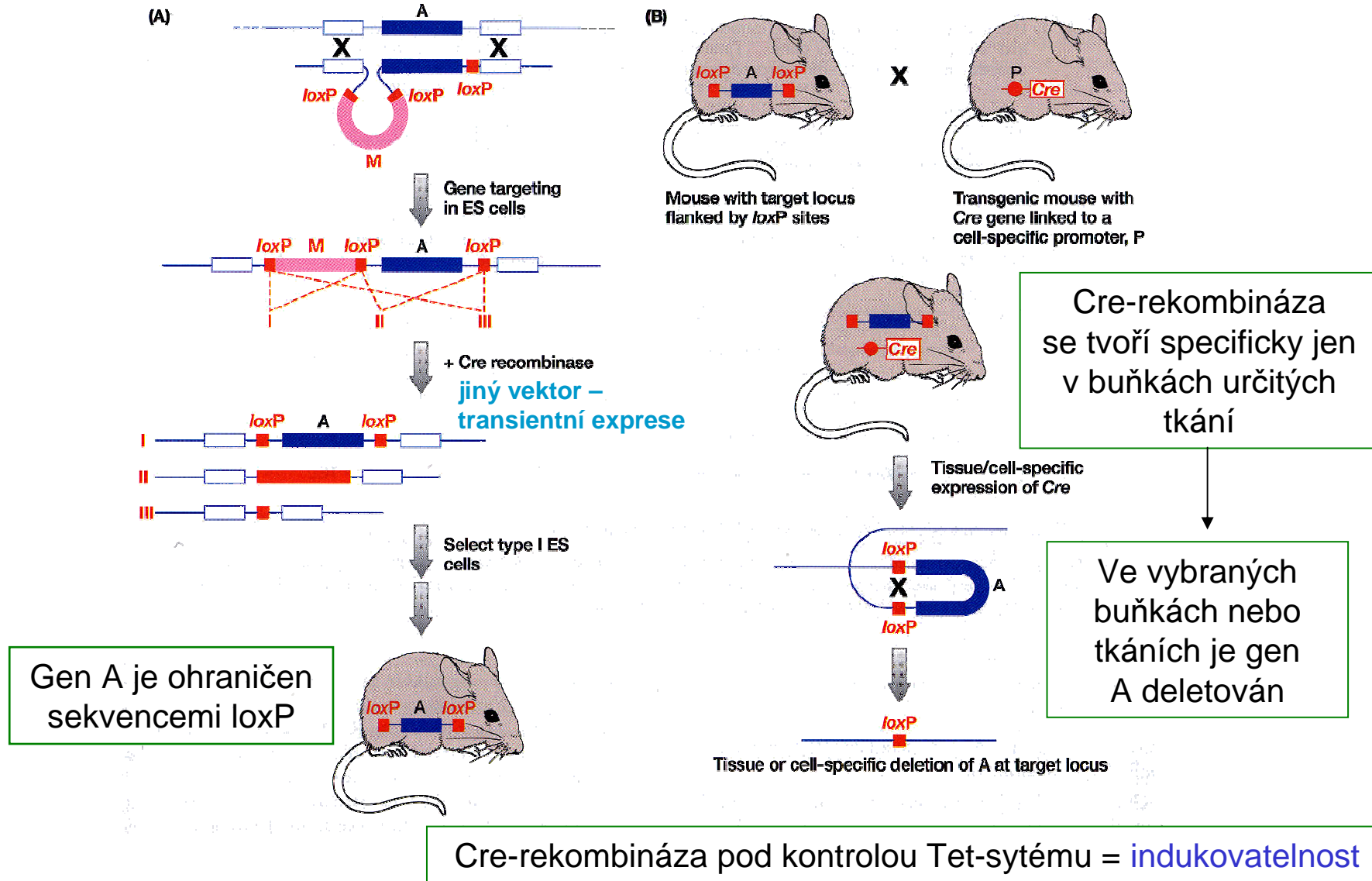


Struktura rozpoznávací sekvence lox P fága P1



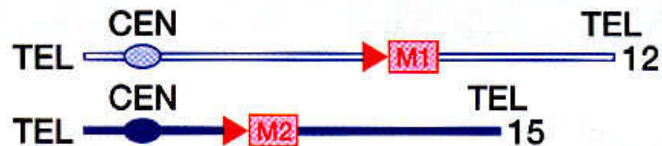
Podle orientace loxP sekvencí je úsek DNA mezi nimi místně specifickou rekombinací prostřednictvím Cre-rekombinázy buď deletován nebo invertován

Využití Cre-loxP rekombinačního systému k selektivní inaktivaci (deleci) genů

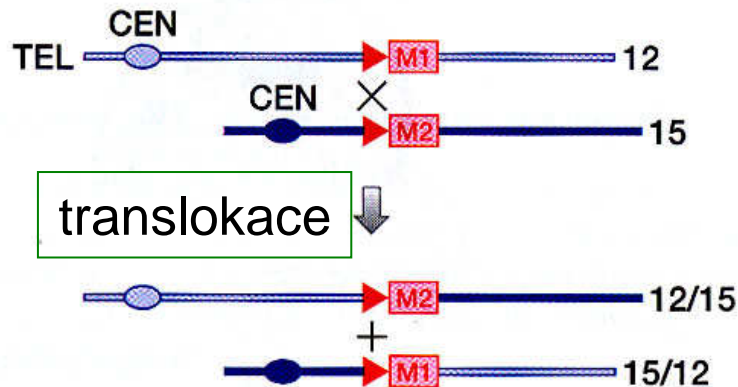


Inženýrství chromozomů s využitím rekombinačního systému Cre-LoxP

- (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

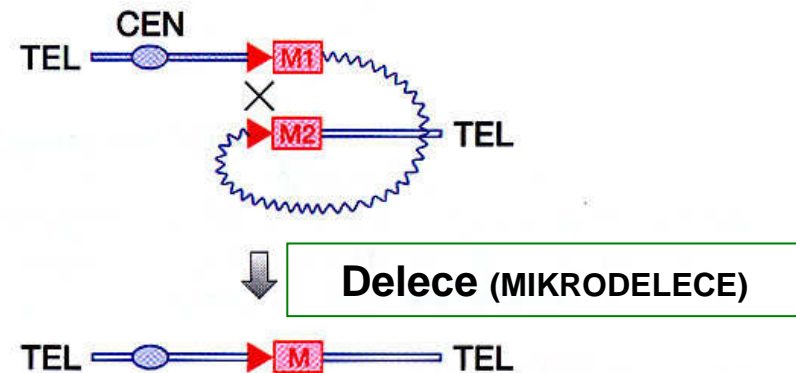


M1 = neo, M2 = puro

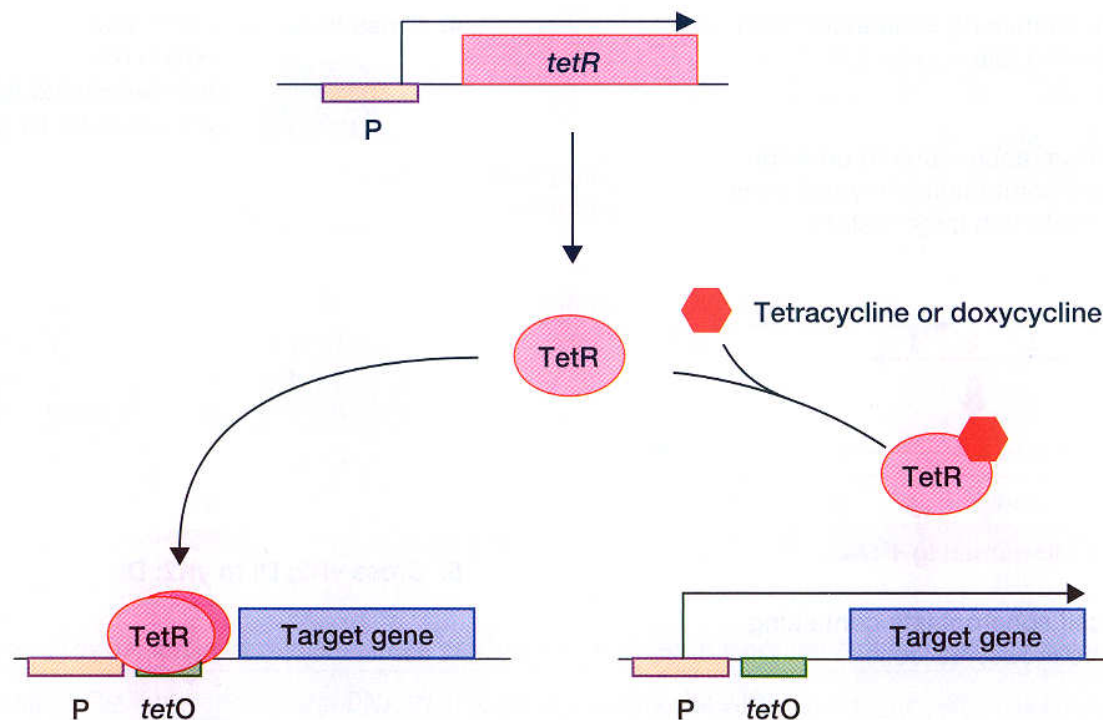
- (B) 1. Use sequential gene targeting to introduce *loxP* site plus a marker gene into two desired locations flanking chromosomal region to be deleted (wavy line)



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



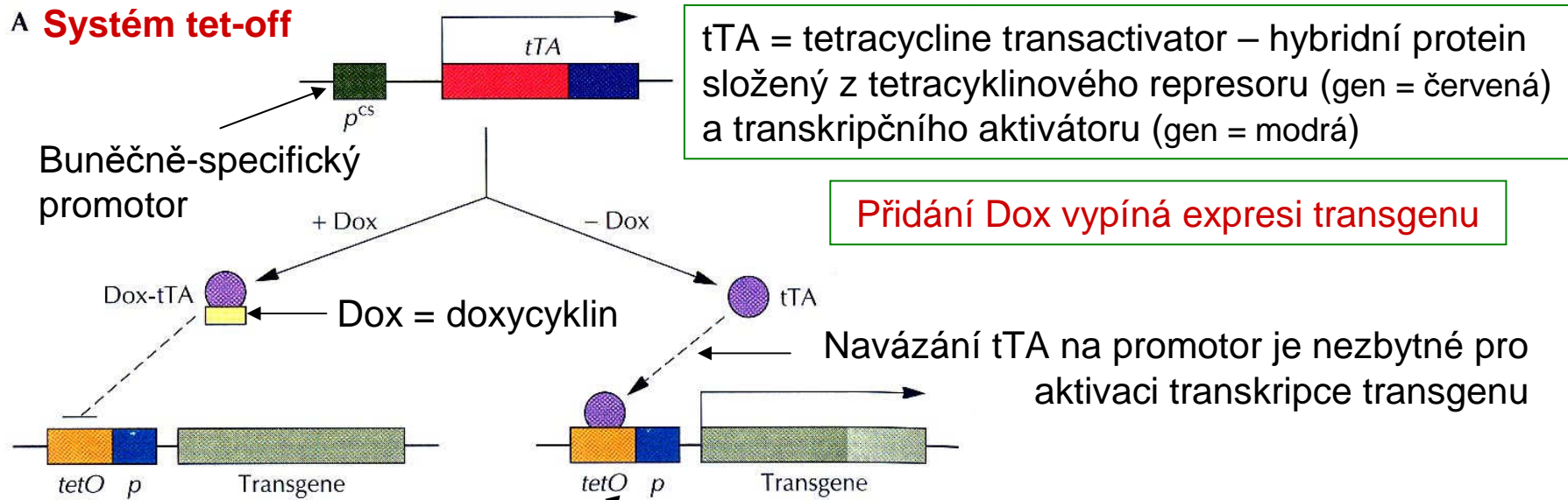
Základ expresního systému indukovatelného tetracyklinem



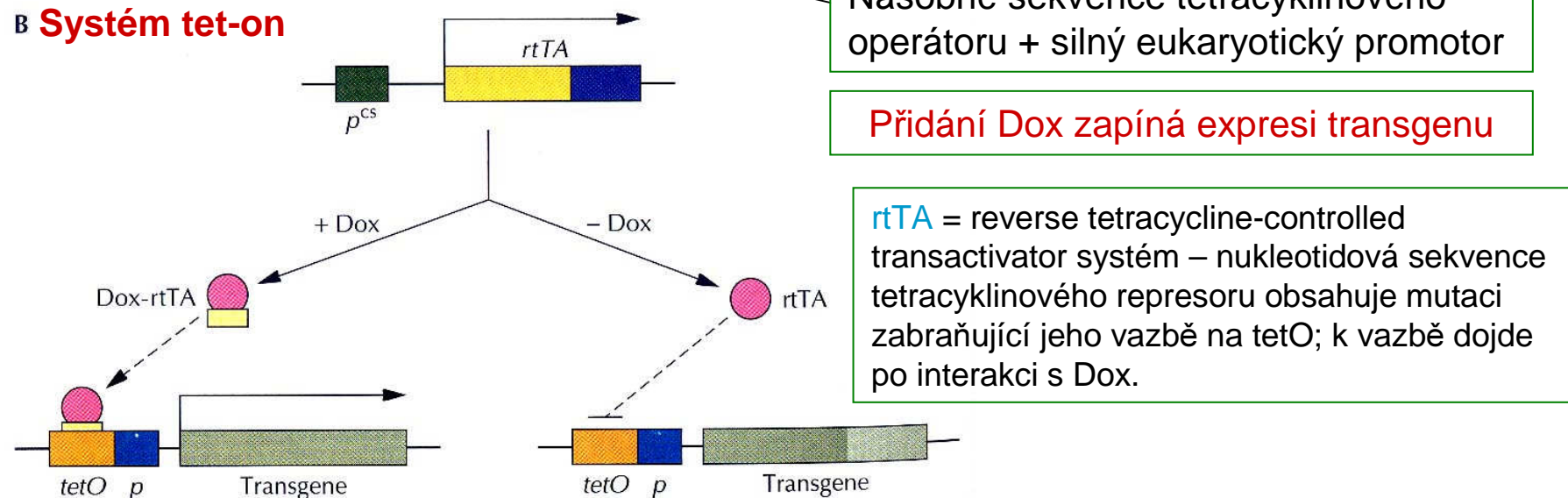
Konstitutivní exprese TetR povede k inaktivaci jakéhokoli transgenu, který obsahuje sekvenci operátoru, k níž se TetR váže. Po přidání tetracyklinu (nebo jeho analogu doxycyklinu) dojde k jeho navázání na TetR, jehož konformace se změní a není schopen se vázat operátor, což vede k navození exprese transgenu.

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
- Sledování dopadu nadprodukce určitého normálního proteinu (simulace buněčně specifických poruch)
- Testování exprese genů u chorob, ovlivňujících jen určitý buněčný typ
- Regulovaná tvorba cre-rekombinázy

Výhoda: oproti rekombinační inaktivaci (cre-lox systém) umožňuje tet systém reverzibilní vypínání/zapínání genů

Přehled metod k potlačení exprese genů bez nutnosti vytvářet jejich mutace	
Interference na úrovni RNA	Interference na úrovni proteinů
Antisense RNA	Dominant negatives *
Antisense oligonucleotidy	protilátky, intrabodies **
Ribozymy nebo maxizymy	Aptamers, intramers ***
Deoxyribozymes	
Sense RNA (kosuprese)	
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; peptidový aptamer: peptid vázající se na cílový protein. Intramer: totéž jako aptamer, ale exprimovaný z genu uvnitř buňky

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

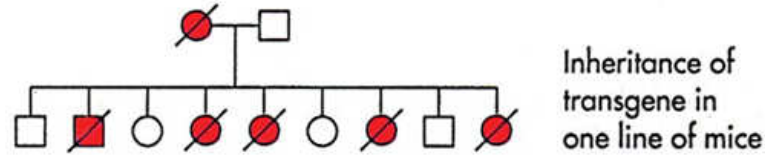
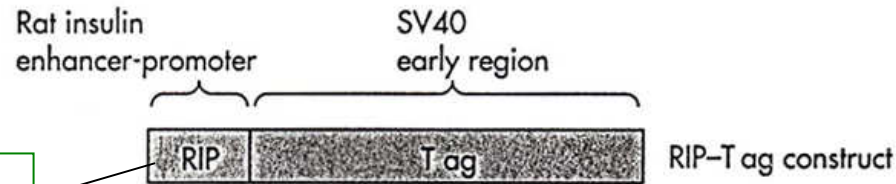
Toxiny: difterický toxin, T-antigen SV40, ricin (lektin)

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.

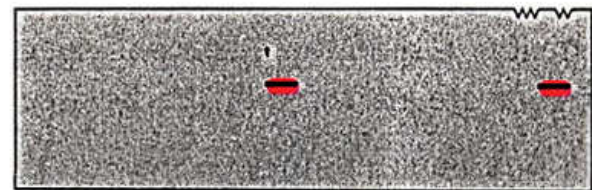
Cílená exprese genu ve specifické tkáni

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

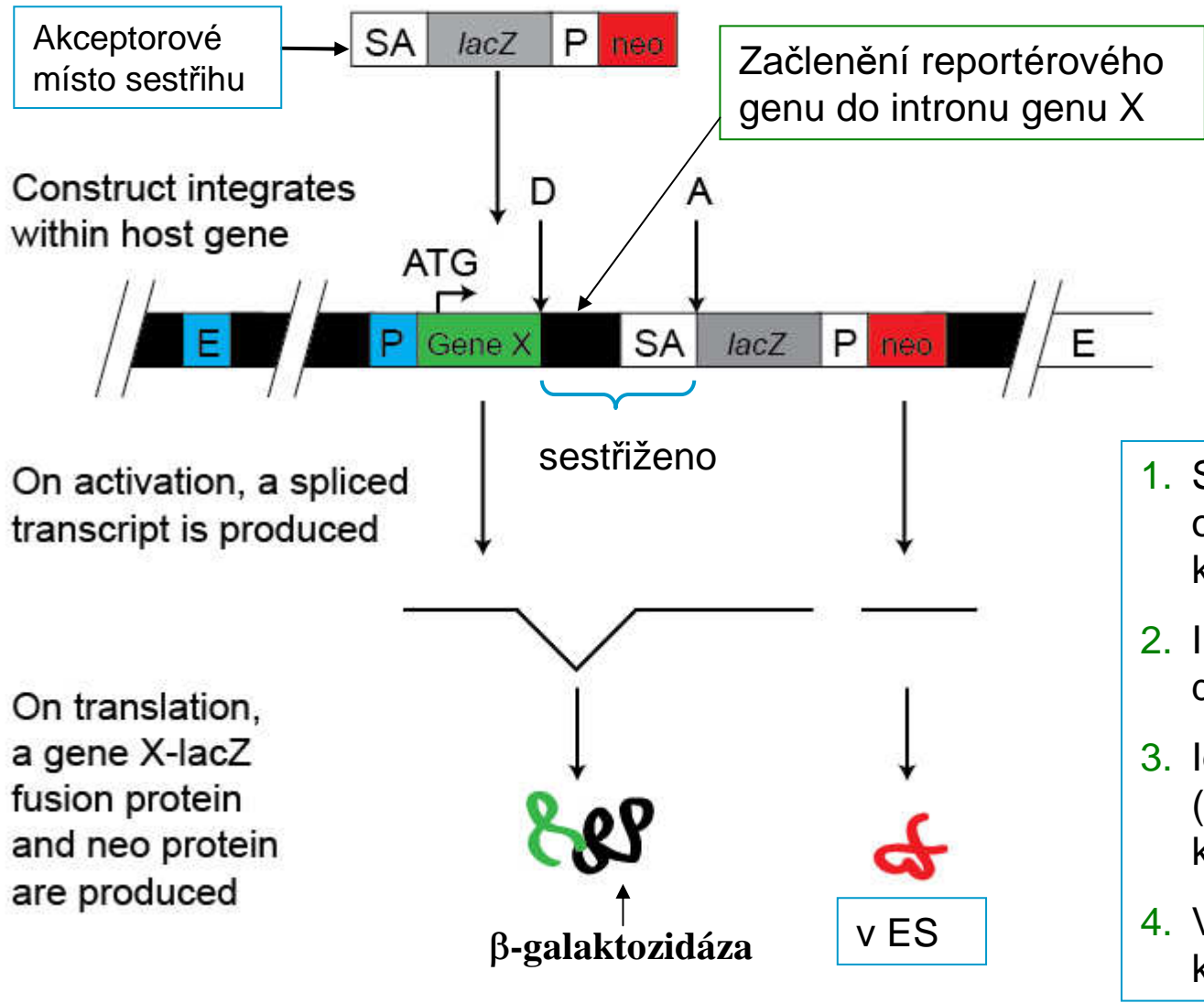
Intestine
Kidney
Liver
Lung
Muscle
Pancreas
Skin
Spleen
Stomach
Testes
Thymus
COS cells

Konstitutivní tvorba T-ag

Tkáňově specifická exprese transgenu

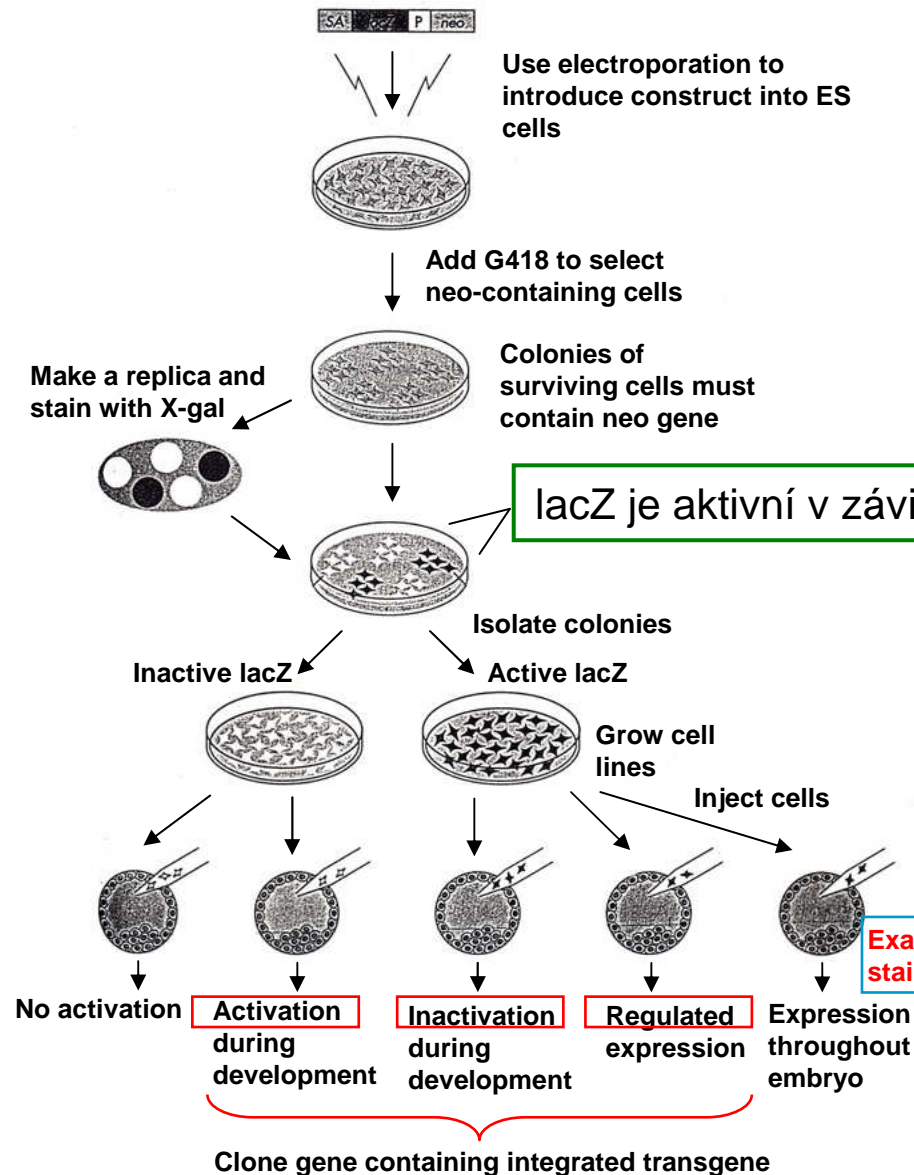
Transgeny jako reportérové geny pro sledování exprese genů hostitele

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

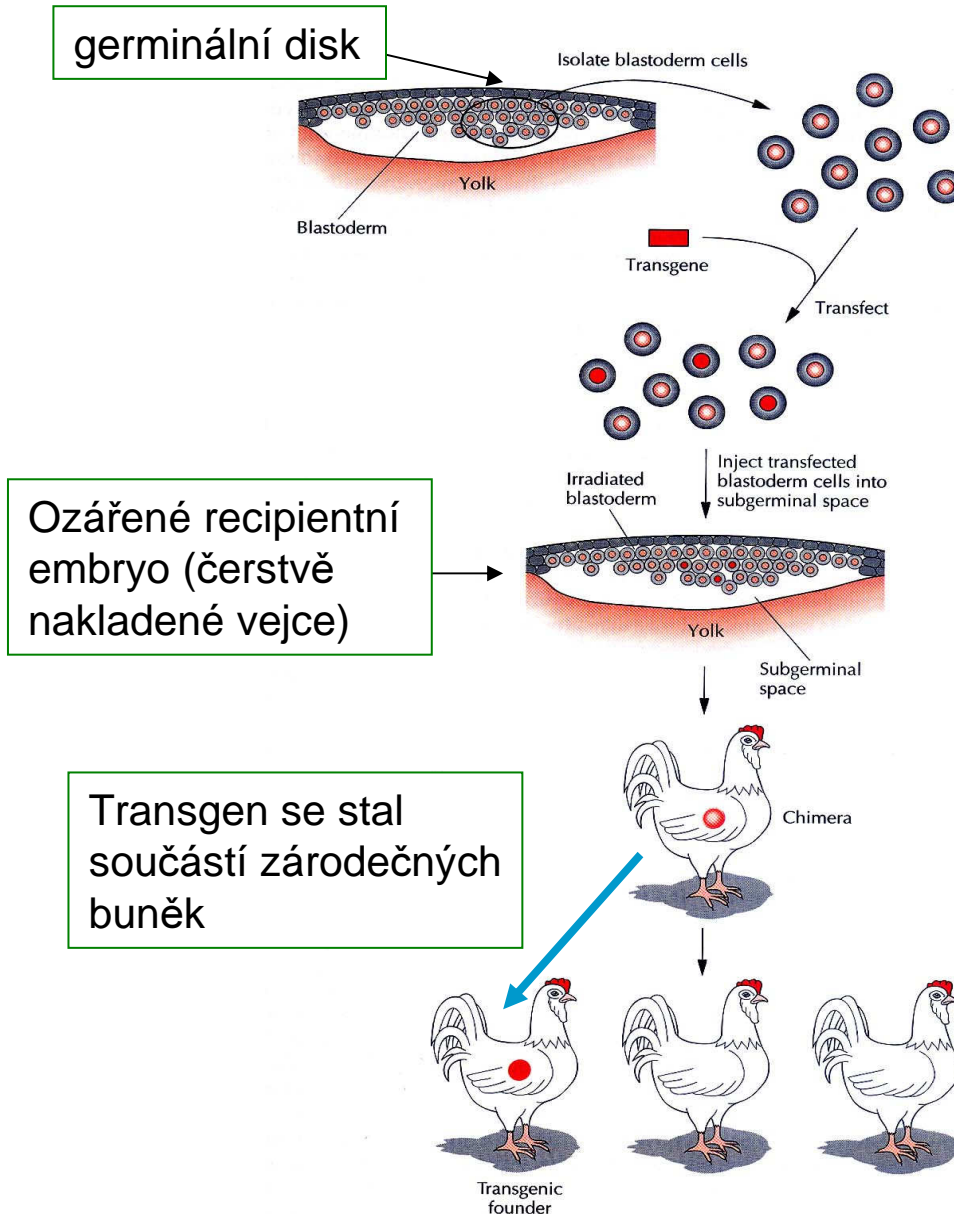
lacZ je aktivní v závislosti na místě začlenění

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



germinální disk

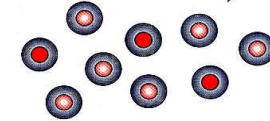
Isolate blastoderm cells

Yolk

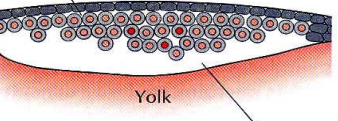
Blastoderm

Transgene

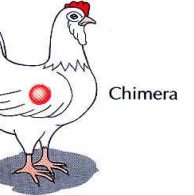
Transfect



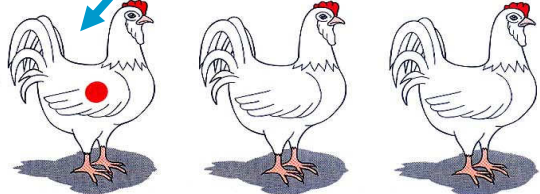
Inject transfected blastoderm cells into subgerminal space



Subgerminal space



Chimera



Transgenic founder

Ozářené recipientní embryo (čerstvě nakladené vejce)

Transgen se stal součástí zárodečných buněk

Pluripotentní buňky (blastodermální a primordiální) pěstované *in vitro*

Cíle transgenoze 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)

Transgenic rodent (esp. mouse) models of disease

mice that produce human hybrid immunoglobulin

a model of malignant skin melanoma

IL-2 deficient mice that suggest IL-2 is not so important in immune response as suggested by in vitro studies

IL-4 deficient mice are resistant to murine AIDS

Mice with altered spatial learning

studies looking at genes that can prevent diabetes in non-obese diabetic mouse models

mice with altered brown fat deposits and their role in obesity research

mice with central nervous system damage by expression of a HIV protein

mice expressing gamma interferon in the liver get chronic active hepatitis

a commercially available genetically engineered mice that expresses the human plasma enzyme, cholesterol ester transfer protein, which may accelerate heart disease

transgenic mice for human disease include: deficiencies in the homeobox gene Msx1 cause palate, craniofacial and tooth development abnormalities

a model for Menkes disease

epilepsy in mice was found to be associated with a defect in the ceruloplasmin gene

sensory and sympathetic neuropathies due to a disrupted Trk/NGF gene

sensory defects with a lack of neurotrophic factor

various physiological changes result from loss of plasminogen activator gene

altered muscle growth and movements from disrupted neurotrophin 3 receptor gene

altered spleen development from changing the homeobox gene Hox11 - this gene controls the genesis of the whole spleen, one gene one organ?

Mice lacking type IX collagen develop noninflammatory degenerative joint disease

A mutation in the ryanodine receptor gene that is thought to be a calcium channel for release of calcium from the sarcoplasmic reticulum in muscle that prevents muscle action, and causes early depressed mice

aggressive mice

slow-learning mice

modified dopamine receptors,

mice lacking estrogen receptors,

models of prion disease

Mouse models for Alzheimer's disease

mice lacking p53 tumour suppressor gene are predisposed to cancer

A mouse model of hemophilia A was made by targeted disruption of the mouse factor VIII gene

a model for Helicobacter pylori infection, that is associated with ulcers

Studies on obesity and insulin processing

A model for Down's syndrome

Mouse models and breast cancer,

Absence of DNA excision repair gene XPA increases susceptibility to UV-B and carcinogens,

Genetic control of mating behaviour

Human disease models: heart and lung disease in transgenic mice

tuberculosis for vaccine development,

Mouse models of atherosclerosis can be effected by apolipoprotein A-IV

High-level expression of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice - up to 100% of the protein was incorporated into fully functional fibrinogen hexamers.

A new genetically engineered strain of mice that suffers both brain degeneration and memory deficits, and develops the same brain deposits of a protein called amyloid that are seen in human sufferers, should allow researchers to test the idea that the amyloid deposition actually causes the brain changes that leads to memory loss in Alzheimer's

Over 1200 mutations have now been catalogued in mice, with a wide range of phenotypes

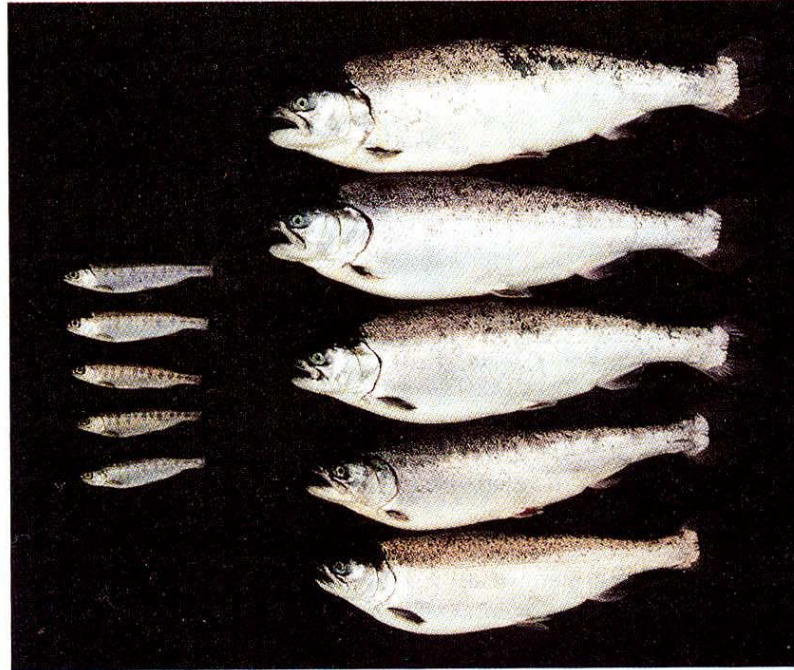


Figure 11.18 Normal coho salmon (left) and genetically engineered coho salmon (right) containing a sockeye salmon growth-hormone gene driven by the regulatory region from a metallothionein gene. The transgenic salmon average 11 times the weight of the nontransgenic fish. The smallest

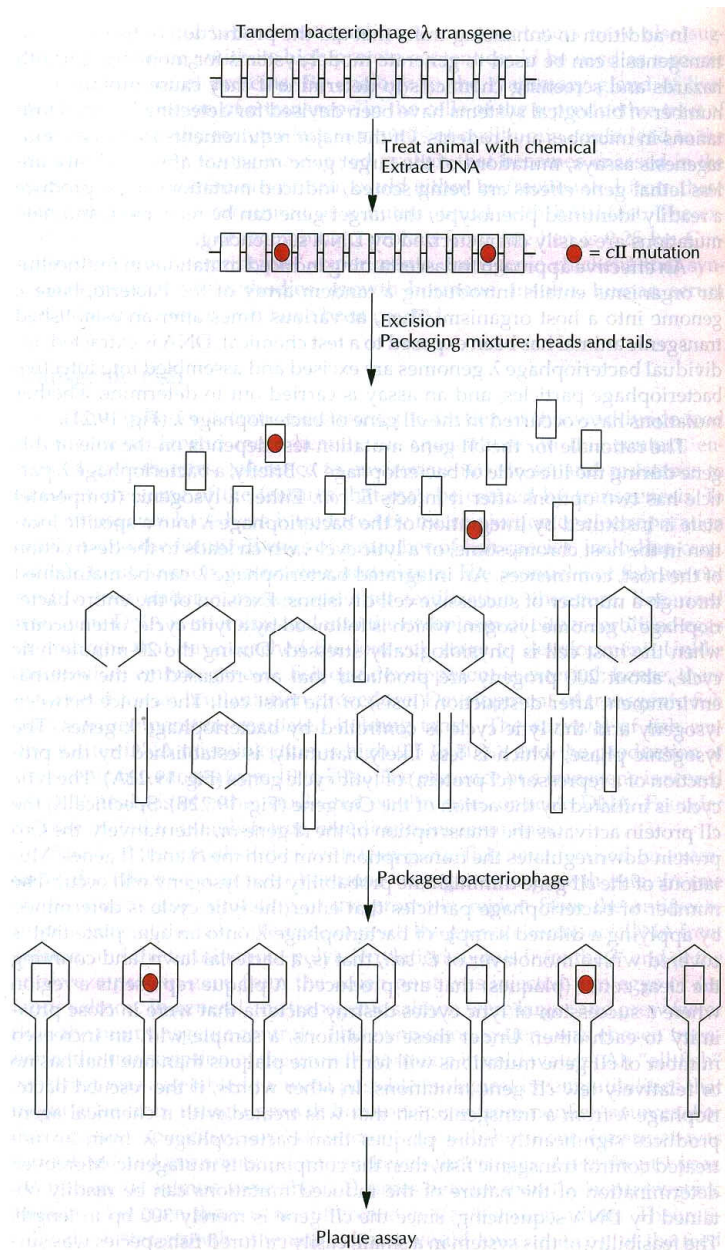
fish on the left is about 4 inches long. [Courtesy of R. H. Devlin. Reprinted by permission from *Nature* 371: 209, R. H. Devlin, T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, E. M. Donaldson, P. Swanson, and W. K. Chan. Copyright 1994 Macmillan Magazines Ltd.]

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“ – stimule am.

Využití ryb ke sledování mutagenních látek v prostředí: transgen: mutantní gen pro rezistenci k antibiotikům nebo mutantní gen cII fága lambda

Mutagenese *in vivo*: mutace genů fága lambda začleněného v genomu ryb

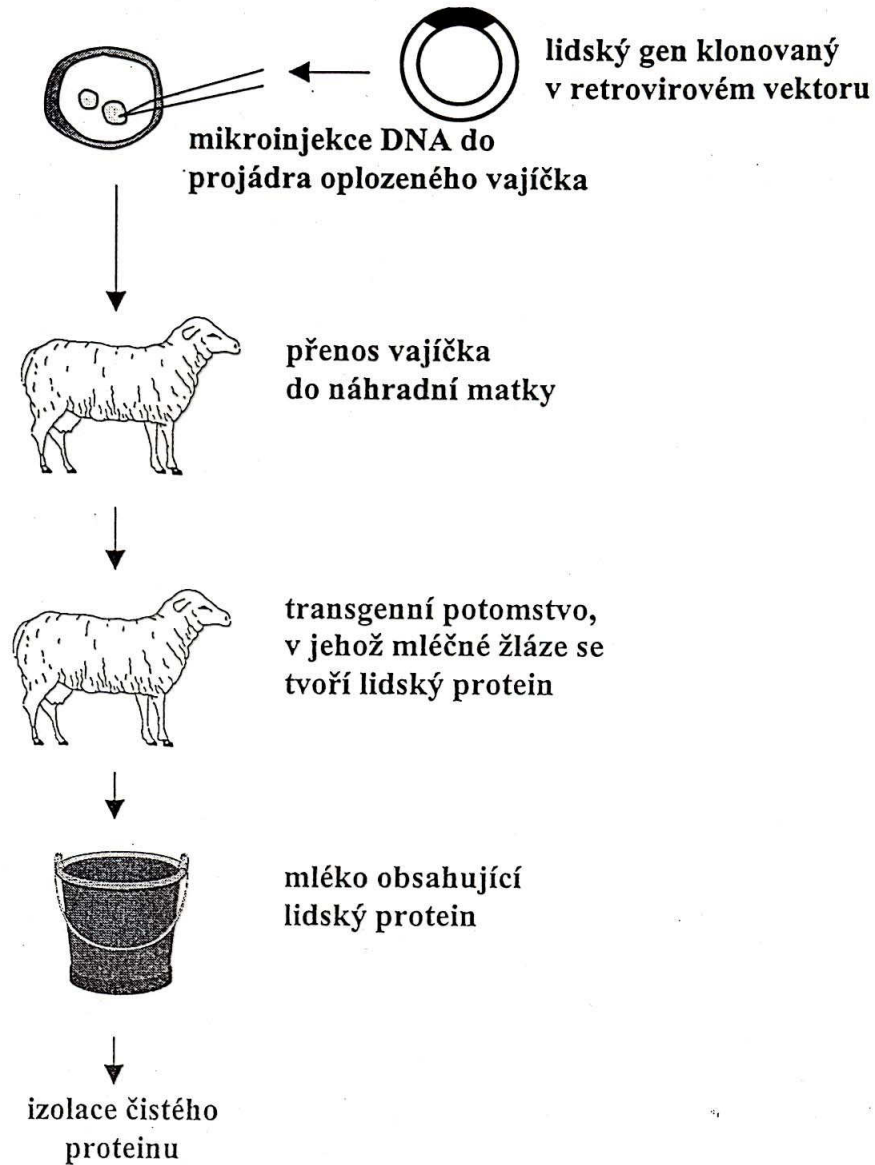


Mutace genu *cII* snižuje pravděpodobnost, že nastane lyzogenizace.

Vzorek fágů se zvýšeným počtem mutací v genu *cII* bude tvořit více plak než vzorek s fágů bez mutací v *cII*.

Jiný systém testování mutagenů na transgenních rybách používá plazmidový transgen s genem citlivým k antibiotikům jako cílem pro mutační působení. *E. coli* je transformována plazmidovou DNA, která je izolována z ryb ovlivněných mutagenem. Zvýšená frekvence kolonií rezistentních k antibiotikům (srovnání izolátů z ryb na nichž bylo a nebo nebylo působeno mutagenem) odráží sílu mutagenu.

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.

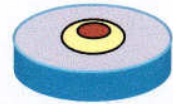
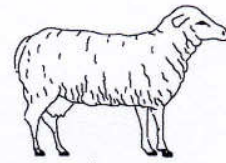
kráva – lysozym v mléce

New genes introduced into farm animals to alter growth characteristics

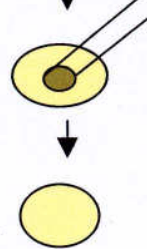
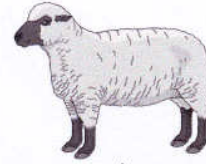
Species	Regulatory element	Structural gene
Pig	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone
Pig	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone
Sheep	Mouse metallothionein promoter	Human growth hormone
Pig	Mouse metallothionein promoter	Bovine growth hormone
Pig	Human metallothionein promoter	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

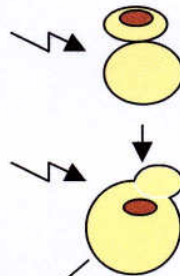
Odebrání buněk z mléčné žlázy bílé ovce a jejich přenos do media se sníženou koncentrací živin



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

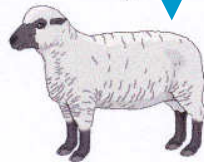
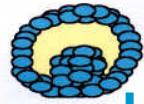


Umístění obou buněk do těsné blízkosti a navození jejich splynutí elektrickým impulzem. Další impulz nastartuje buněčné dělení

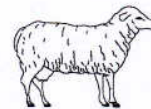


Možnost přenosu cizích genů

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

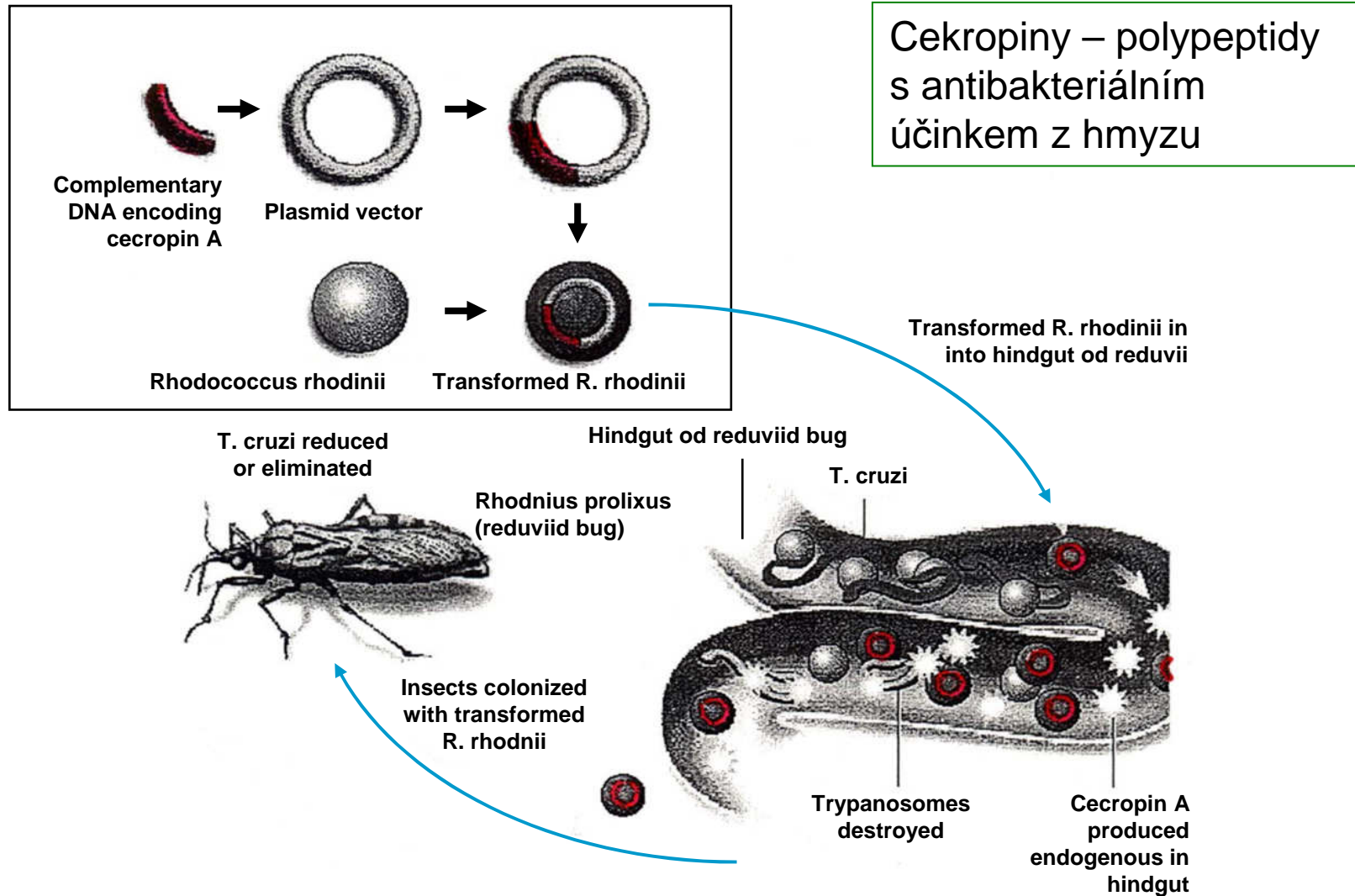


Polly

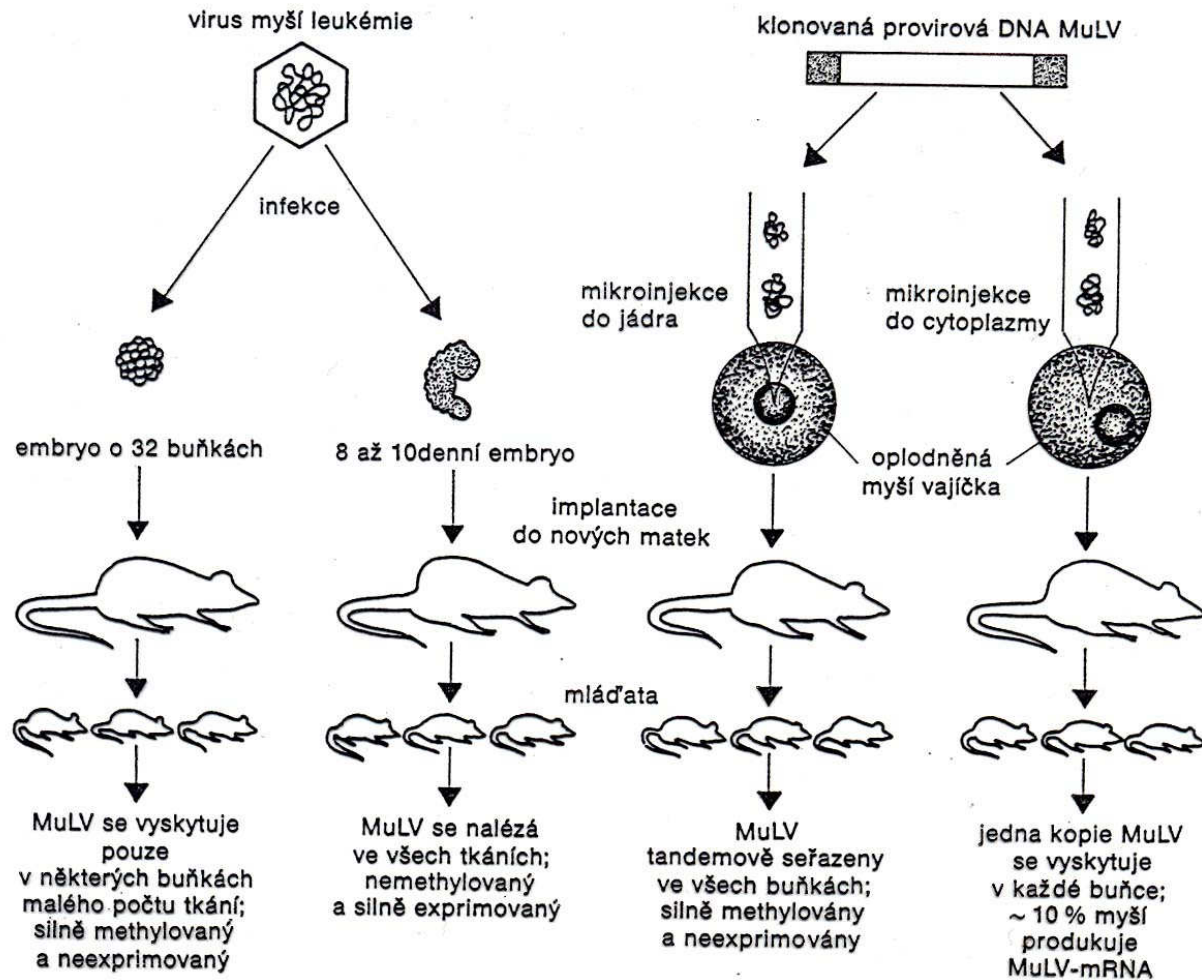


Narozené jehně Dolly má stejnou výbavu chromozomů jako bílá ovce, z jejíž mléčné žlázy byla buňka odebrána

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

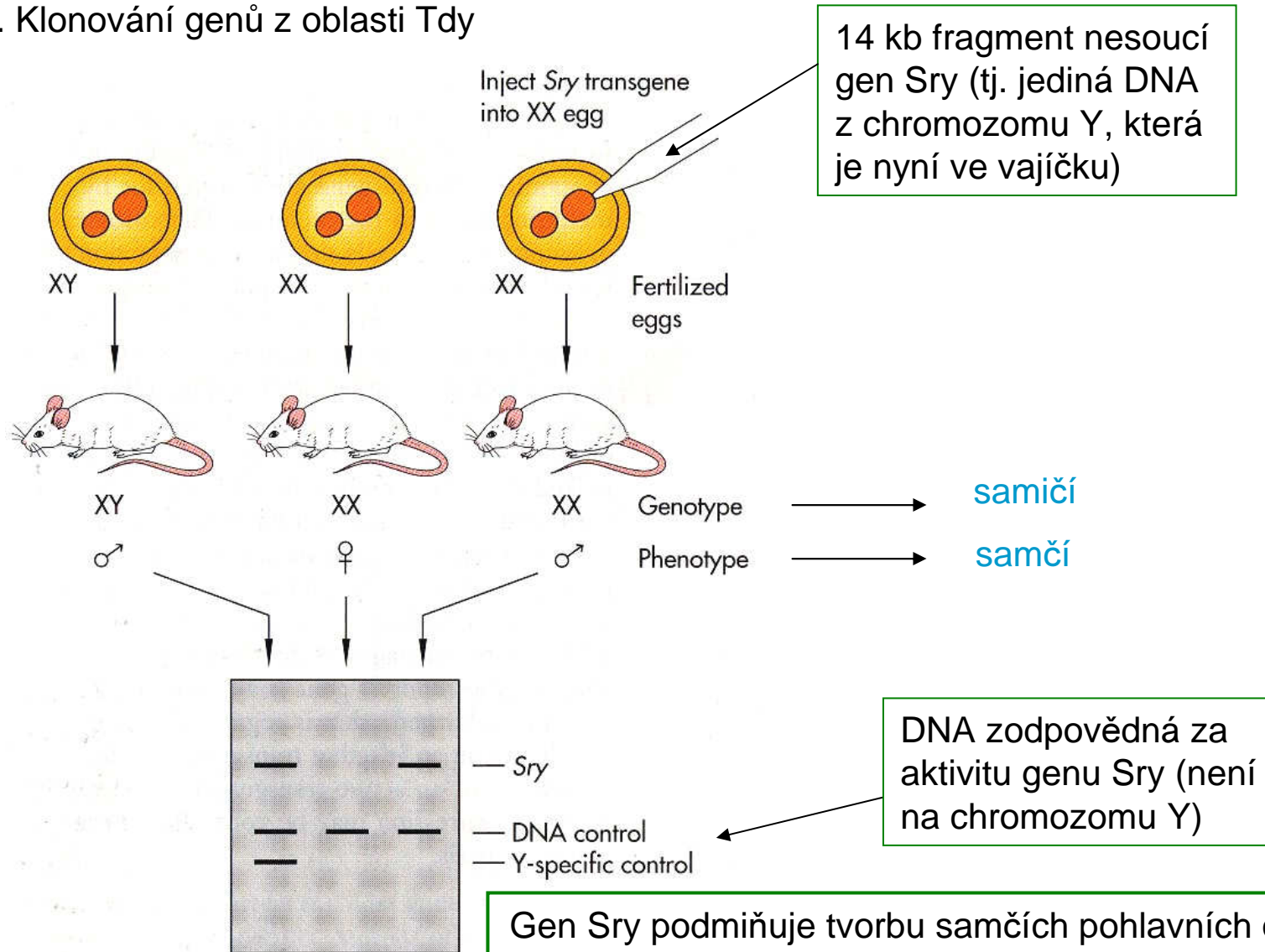
Virus působí
jako infekční
agens

20-40 kopií
v jednom
chromozomu

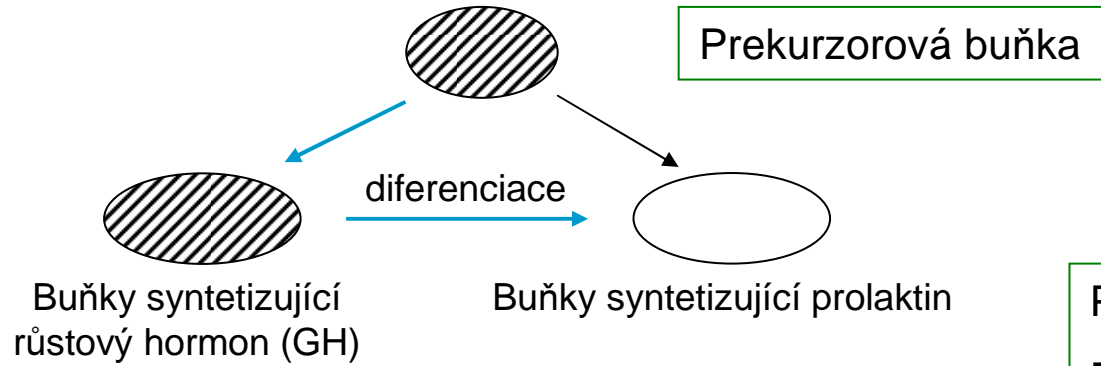
Tkáňově
specifická
exprese

Analýza sexuální determinace – funkce genu sry

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

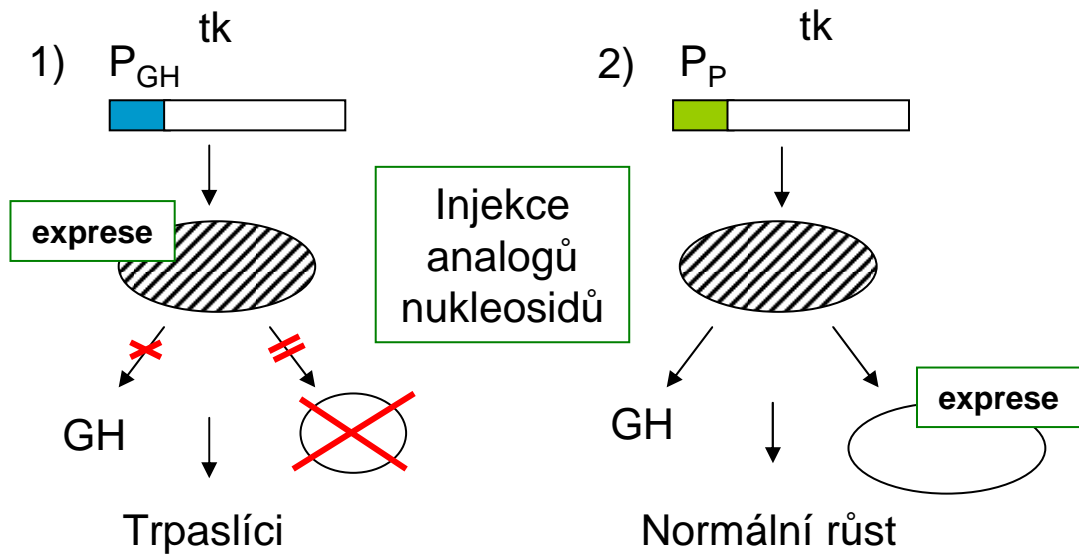


Objasnění vývojových vztahů mezi buňkami hypofýzy



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 dělící se buňky exprimující daný gen.

Závěry:

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