

Molekulární biotechnologie č.14

Využití poznatků molekulární biotechnologie. Transgenní živočichové

Transgenní živočichové

- Živočišné buňky hmyzu
- Ptáků
- Obojživelníků (žába *Xenopus*)
- Savců

Cizí geny

- se vnášejí buď do buněk pěstovaných v kulturách *in vitro* nebo
- do zárodečných buněk

Vektory

- Jako vektory se využívají bakulovirové vektory (pro přenos do hmyzích buněk)
- vektory odvozené z viru SV40, vakcinia viru, adenovirů a zejména
- retrovirů (např. virus Rousova sarkomu RSV).

Metody přenosu DNA do buněk

- Cizorodá DNA se do buněk přenáší
- transfekcí (volná DNA)
- elektroporací
- lipofekcí
- mikroinjekcí

Příprava transgenních savců

- Cizorodá DNA se přenáší do zárodečných buněk (vajíčka, raná embrya, embryonální kmenové buňky)
- U savců se jako modelový organismus používá myš

Přenos DNA do oplozených vajíček myší

- mikroinjekcí
- vajíčko se kultivuje *in vitro*
- ve stadiu moruly nebo blastuly se přenese do náhradní matky, v níž jeho vývoj pokračuje
- V případě, že došlo k úspěšnému přenosu transgenu do genomu vajíčka
- bude ho potomstvo obsahovat začleněný v náhodném místě
- Došlo-li k začlenění transgenu do zárodečných buněk, bude se stabilně přenášet do dalších generací

Mikroinjekce

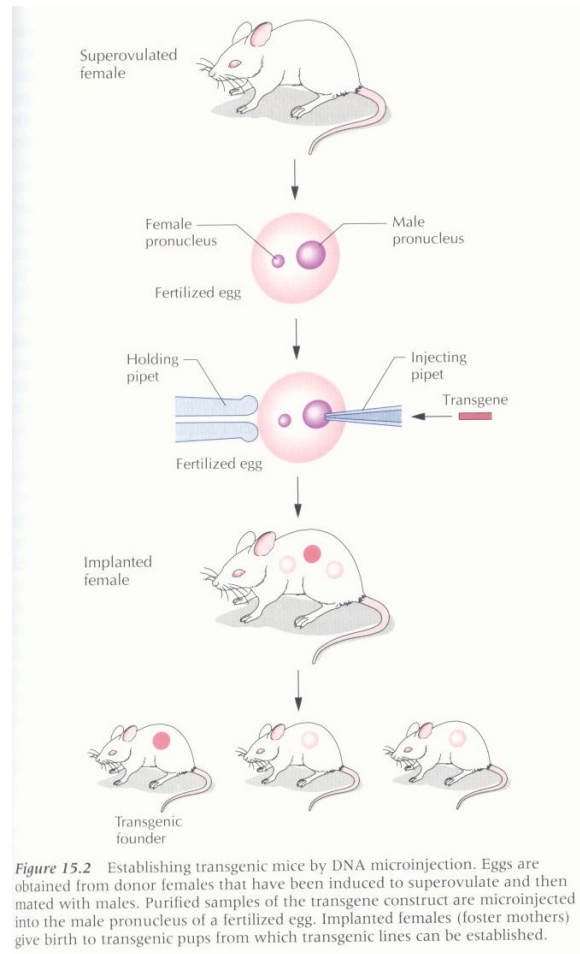
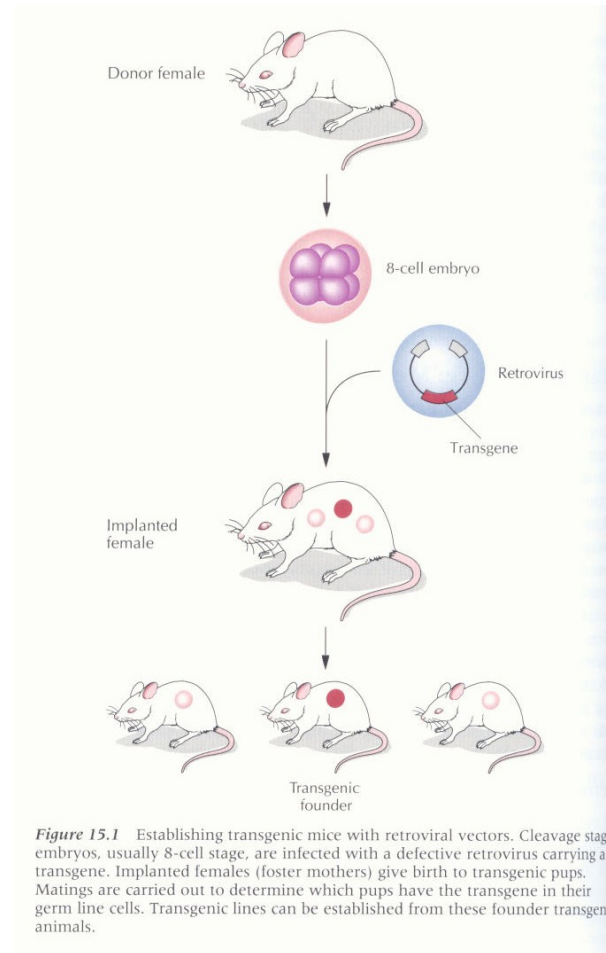


Figure 15.2 Establishing transgenic mice by DNA microinjection. Eggs are obtained from donor females that have been induced to superovulate and then mated with males. Purified samples of the transgene construct are microinjected into the male pronucleus of a fertilized egg. Implanted females (foster mothers) give birth to transgenic pups from which transgenic lines can be established.

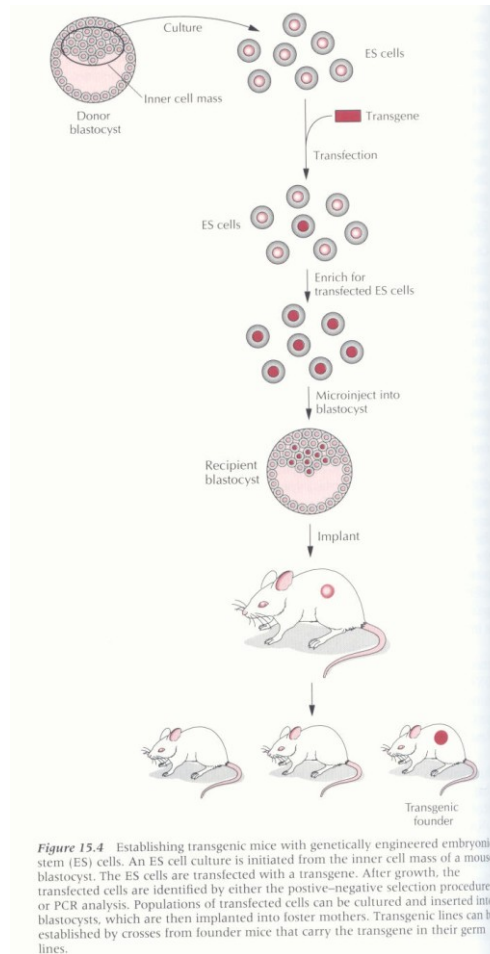
Využití retrovirového vektoru



Přenos DNA do embryonálních kmenových buněk myši

- Embryonální kmenové buňky se připravují z raných zárodků
- Snadno se kultivují *in vitro*
- Provede se transfekce a
- selektují se buňky, v nichž se přenesený transgen začlenil do genomu homologní rekombinací

Využití embryonálních kmenových buněk



Lze zaměřovat

- standardní alely genů za jejich mutantní formy a
- sledovat pak přímo mutačně pozměněný fenotyp u vyvíjejícího se zárodku nebo dospělého zvířete

Vhodným křížením

- heterozygotních myší (obsahujících 1 kopii transgenu a 1 kopii původního genu)
- se získá potomstvo, které bude mít transgen v homozygotním stavu,
- což je zvláště výhodné pro studium recesivních mutací

Využití transgenních živočichů

- Studium genetické kontroly vývoje organismu (časová a tkáňově specifická regulace genové exprese během jednotlivých fází embryonálního vývoje) tj. studium embryogeneze a diferenciacce buněk.
- Při objasňování příčin vzniku nádorových onemocnění,
- poruch imunitního systému
- Transgenní linie myší s mutovanými geny slouží jako model pro studium analogických mutací u člověka (např. u genetických chorob)

Transgenní hospodářská zvířata

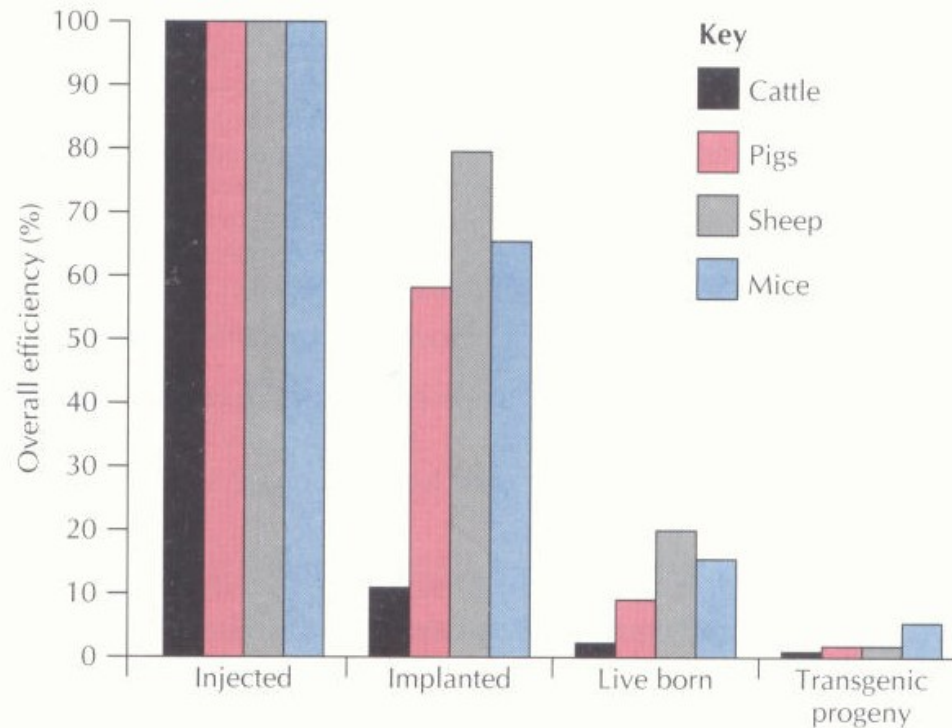
- Cílem je příprava zvířat s lepšími užitkovými vlastnostmi – změnou biochemických drah, hormonální rovnováhy nebo tvorbou zcela nových proteinových produktů.
- Výsledkem je např. účinnější využívání krmiva a tím i rychlejší růst, nebo pozměněné složení tkání a tělních struktur:
- např. prasata s nižším obsahem tuku v mase,
- ovce, jejichž vlna má výhodnější chemické složení.
- Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu ve vaječném bílku
- Ryby vyznačující se tolerancí ke změnám obsahu solí ve vodě, velmi rychlým růstem nebo odolností vůči výkyvům teploty.

Účinnost

- Transgenose u živočichů
- Je velmi nízká
- A liší se v závislosti na použitém druhu

Účinnost přenosu cizorodého genu je nízká

Figure 15.3 Overall efficiency of the transgenesis process after DNA microinjection. One hundred percent of the fertilized eggs (100%) of cattle, pigs, sheep, and mice are inoculated with a transgene, but the success of implantation and giving birth to offspring are much lower, and only 5% or less of the treated eggs become transgenic progeny.



Za perspektivní se považují transgenní zvířata

- Z jejichž tělních tekutin nebo tkání (např. mléka, moče a krve) lze získávat farmakologicky významné látky.
- Při konstrukci transgenů se využívají tkáňově specifické promotory – např. při použití promotoru pro beta-laktoglobulin dochází ke genové expresi pouze v mléčné žláze a
- výchozí produkt přechází do mléka,
- odkud jej lze snadno izolovat.

Využití genů kódujících kasein v expresní jednotce

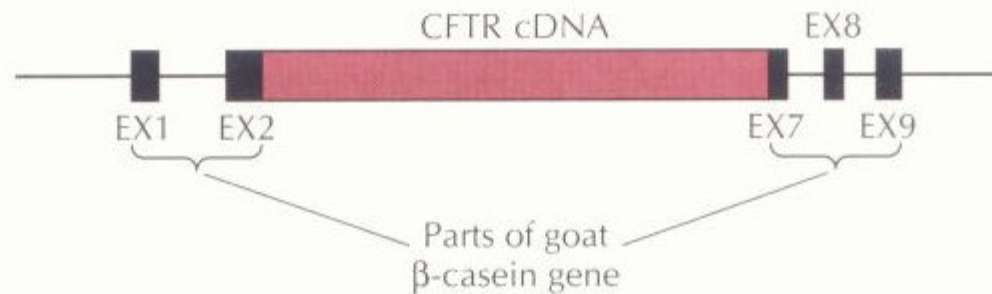


Figure 15.8 Goat β -casein gene–CFTR cDNA expression construct. The full-length cDNA for CFTR was cloned between exon 2 (EX2) and exon 7 (EX7) of the goat β -casein gene. The promoter and transcription termination sequences and exons 1, 8, and 9 (EX1, EX8, and EX9) of the casein gene are retained.

Transgeny a promotorové sekvence

Table 15.2 Mammary gland transgenes, promoter sequences, and recipient organisms.

Transgene	Promoter	Transgenic species
Longer acting tissue plasminogen activator	Whey acidic protein	Goat
α_1 -Antitrypsin	β -Lactoglobulin	Sheep
Clotting factor IX	β -Lactoglobulin	Sheep
Soluble CD4 protein	Whey acidic protein	Mouse
Lactoferrin	α_{s1} -Casein	Cattle
Urokinase	α_{s1} -Casein	Mouse
CFTR	β -Casein	Mouse
Interleukin-2	β -Casein	Rabbit

Byly připraveny transgenní ovce

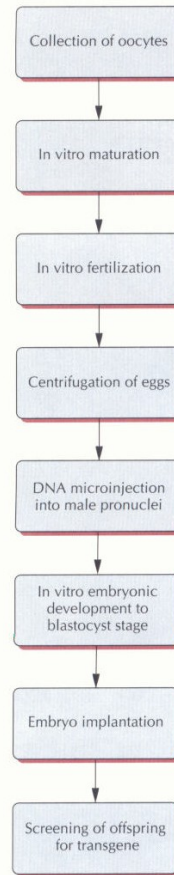
- jejichž mléko obsahuje vysoké % lidského faktoru pro srážení krve (faktor X), který se používá pro léčbu hemofilie.
- Velkochovy takových zvířat („živé továrny“) mohou být zdrojem látek, jejichž získání v požadovaném množství a čistotě je jinými postupy mnohem nákladnější nebo které nelze v aktivní formě z jiných organismů získat.

Klonování ovce s využitím přenosu jádra

- Klonování celých zvířat
- Z vajíčka bylo vyňato jádro
- Vaječná buňka bez jádra byla fúzována s
- buňkou mléčné žlázy (po indukci do Go fáze)
- Uměle připravená zygota byla aktivována
- Došlo k dělení buněk
- Embryo ve fázi blastuly bylo implantováno do pseudopregnantní matky
- Narodila se klonovaná ovce

Příprava transgenního skotu – jednotlivé kroky

Figure 15.9 Steps in the development of transgenic cattle.



Úspěšně byla zkonstruovány

- transgenní drůbež

Transgenní drůbež

