

Genové technologie

Transgenní živočichové

Transgenní živočichové

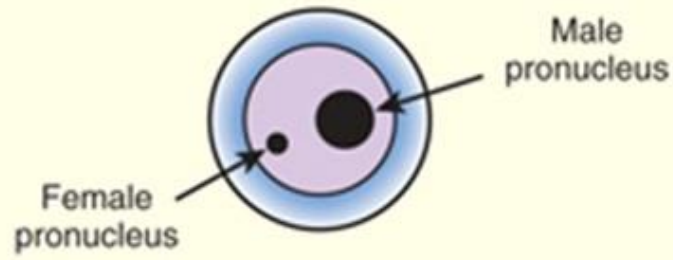
- Domestikace domácích zvířat – selektivní křížení
- Dnes příprava transgenních živočichů – myši, kozy, kočky, psi, ryby, opice atd.
- **Každá buňka transgenního živočicha nese novou genetickou informaci.**

Transgenní živočichové

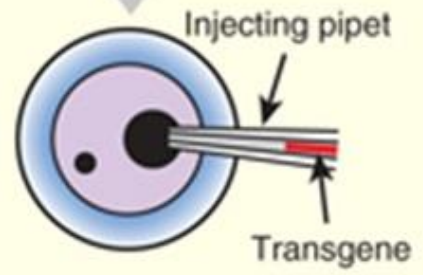
- **Transgeny** přenesené do transgenních živočichů mají původ v různých organizmech – stejného druhu, jiných druzích živočichů, ale i bakteriích, rostlinách, houbách...
- Samotné transgeny bývají před přenesením do živočicha různě upravovány, například bývá přidán vhodný promotor.

Tvorba transgenních živočichů

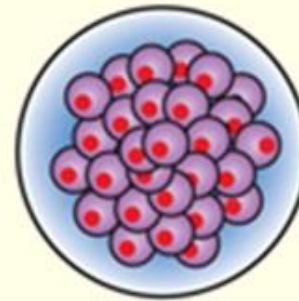
- **Mikroinjekce do jádra** – transgen se přenáší do oplozené vaječné buňky těsně po oplození, kdy obsahuje samičí a samčí projádro před fúzí obou projader.
- Mikroinjekce se provádí do samčího projádra.



TRANSGENE INJECTED



DIVISION TO FORM CLUSTER OF CELLS



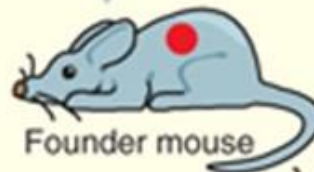
IMPLANT INTO FOSTER MOTHER



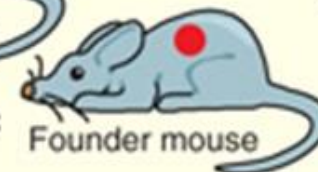
Transgene in embryo within foster mother

STABLE INTEGRATION

FAILURE



Founder mouse



Founder mouse

TRANSGENIC MICE

Stabilní integrace transgenu

Zakladatelka linie

Transgenní myši



Tvorba transgenních živočichů

- Zakladatelé linie mají pouze v jednom chromozómu transgen (jsou heterozygotní). Aby byla následující linie homogenně transgenní, je třeba křížit samce zakladatele a samice zakladatelky, abychom získali linii se dvěma kopiemi transgenu v genomu, které se pak kříží inbredně.

Tvorba transgenních živočichů

- Někdy vznikají chimérní živočichové – pokud nedojde k začlenění transgenu do všech tělních buněk, je živočich mozaikou.
- Někdy se do DNA začlení více kopií transgenu.

Tvorba transgenních živočichů

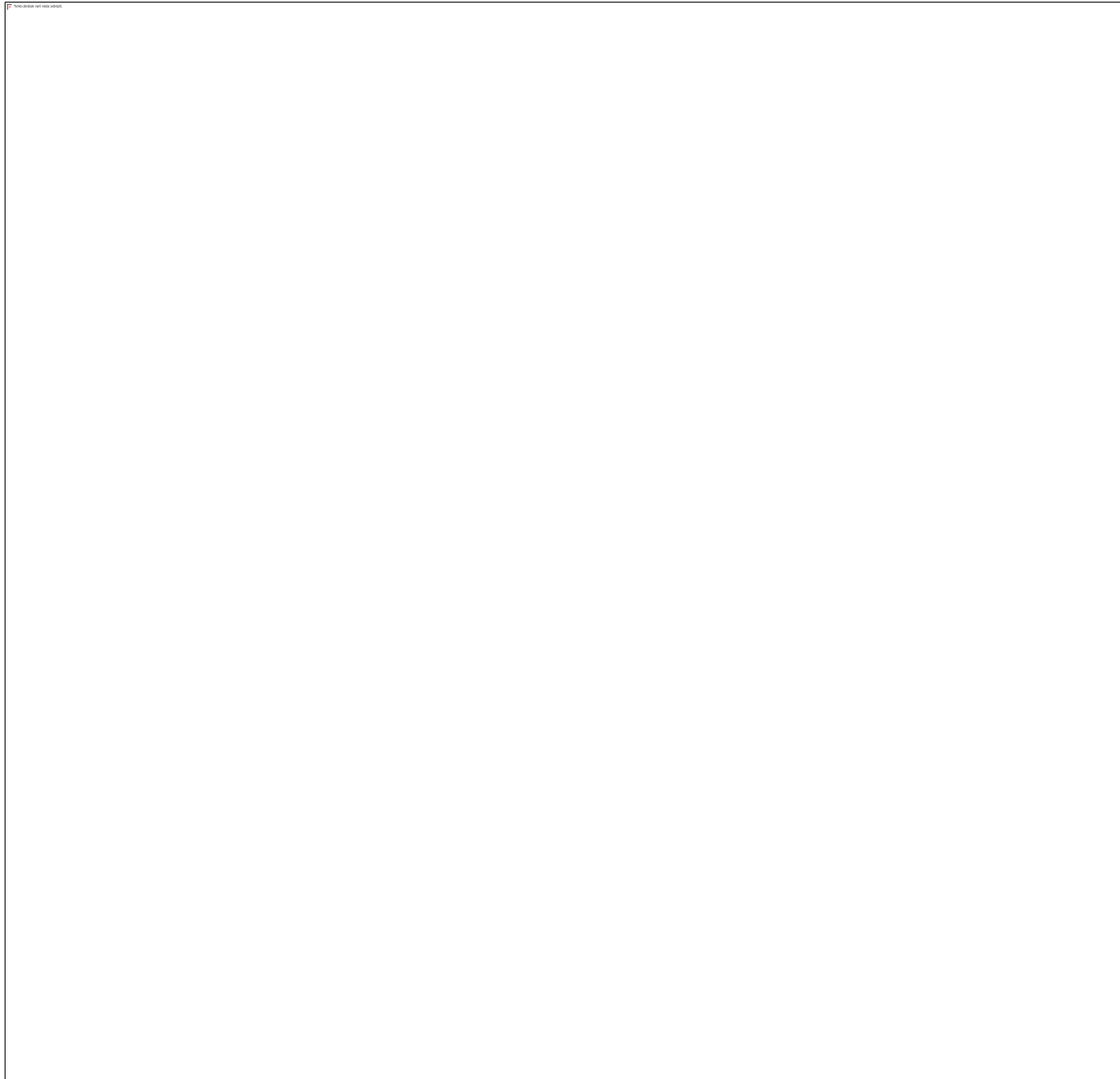
- K začlenění transgenu do genomové DNA dochází na náhodných místech, často tam, kde dochází ke spontánním chromozomálním zlomům.

Tvorba transgenních živočichů

- K prvnímu začlenění funkčního genu do transgenní myši došlo v roce 1982.
- Potkaní gen pro somatotropin (růstový hormon) byl vnesen do genomu myši.
- Gen pro somatotropin byl vnesen do genomu pod kontrolou promotoru z genu pro metallothionein, jehož exprese běžně probíhá v játrech.

Tvorba transgenních živočichů

- Namísto, aby byl somatotropin produkován šišinkou, byl produkován v játrech. Přestože k expresi docházelo na špatném místě v těle, myši vyrostly a byly téměř 2x tak velké.



Published in final edited form as:

Nature. 1982 December 16; 300(5893): 611–615.

Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes

Richard D. Palmiter^{*}, Ralph L. Brinster[†], Robert E. Hammer[†], Myrna E. Trumbauer[†], Michael G. Rosenfeld[‡], Neal C. Birnberg[§], and Ronald M. Evans[§]

^{*}Department of Biochemistry, Howard Hughes Medical Institute, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA

[†]Laboratory of Reproductive Physiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA

[‡]School of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093, USA

[§]Tumor Virology Laboratory, The Salk Institute, San Diego, California 92138, USA

Abstract

A DNA fragment containing the promoter of the mouse metallothionein-I gene fused to the structural gene of rat growth hormone was microinjected into the pronuclei of fertilized mouse eggs. Of 21 mice that developed from these eggs, seven carried the fusion gene and six of these grew significantly larger than their littermates. Several of these transgenic mice had extraordinarily high levels of the fusion mRNA in their liver and growth hormone in their serum. This approach has implications for studying the biological effects of growth hormone, as a way to accelerate animal growth, as a model for gigantism, as a means of correcting genetic disease, and as a method of farming valuable gene products.

THE introduction of foreign genes into mammalian embryos could form the basis of a powerful approach for studying gene regulation and the genetic basis of development. Recent studies have clearly established the feasibility of introducing foreign DNA into the mammalian genome by microinjection of DNA molecules of interest into pronuclei of fertilized eggs, followed by insertion of the eggs into the reproductive tracts of foster

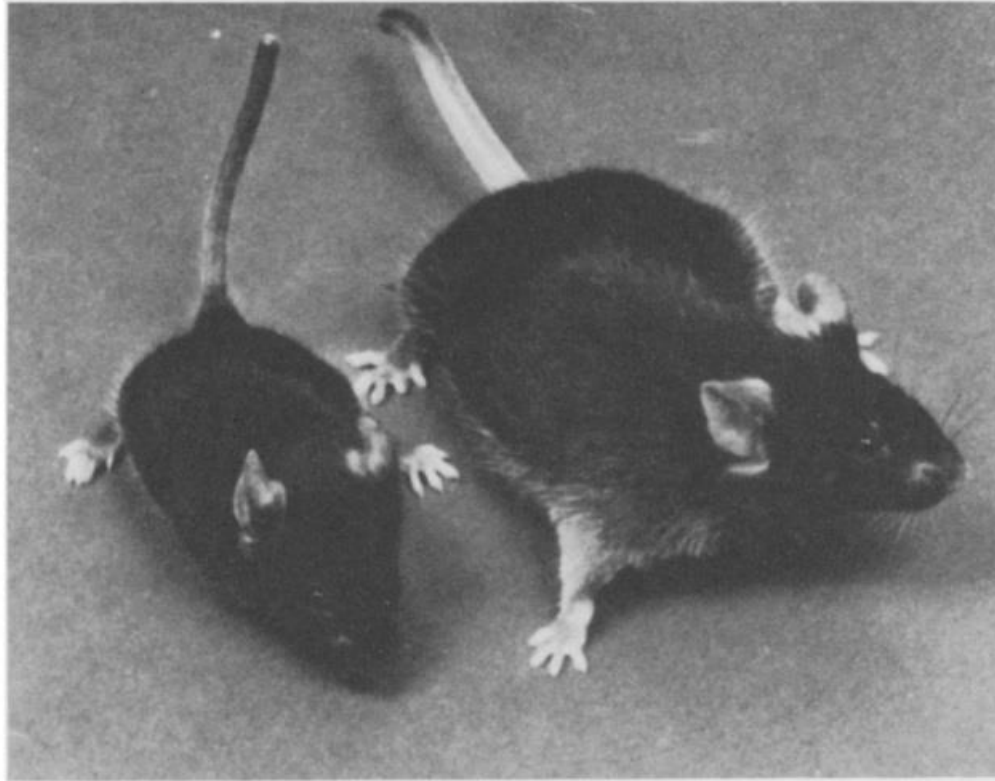
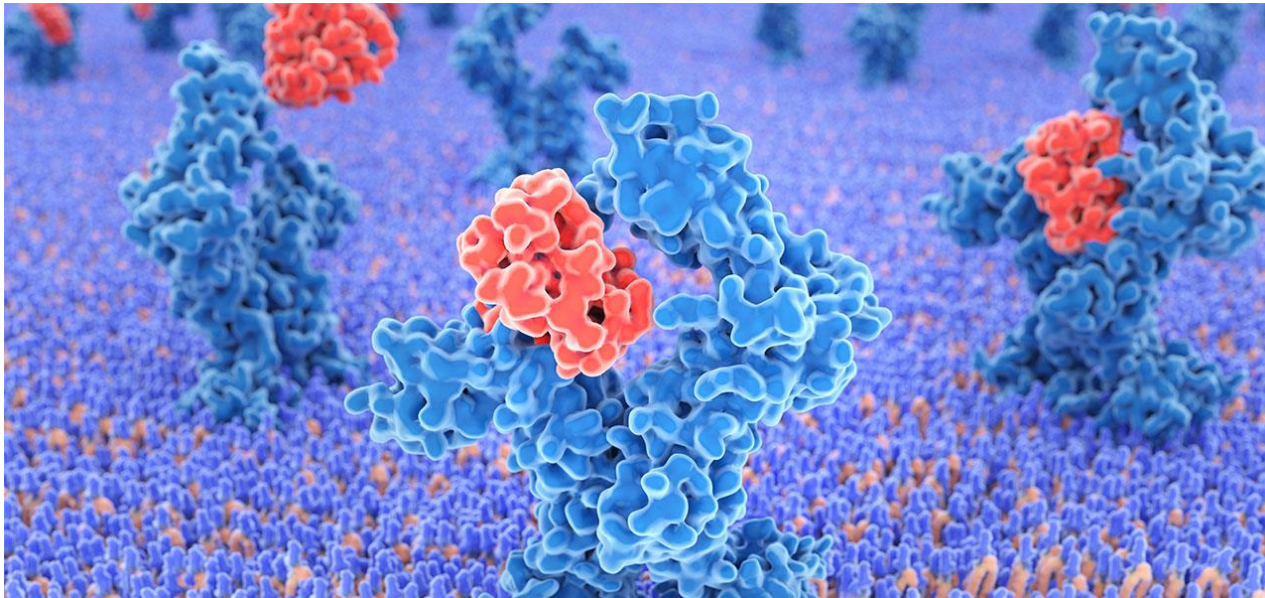


FIGURE 2. Correction of small size in mutant little mouse by introducing a new gene into the germ line (Hammer *et al.* 1984).

Mouse on left is a male mutant little mouse weighing 12 g. On the right is a male littermate weighing 32 g that has inherited the *MT-rGH* gene from the father of both mice. The gene had been injected into the pronucleus of the egg from which the father developed. The father was large and was mated to a homozygous mutant *lit/lit* mouse to produce these two littermates. The new gene results in a marked increase in size when it is present in this line of animals even though they are homozygous for the *lit/lit* gene.

Příprava rekombinantních proteinů v transgenních organismech



Příprava rekombinantních proteinů v transgenních organismech

- Baktérie *E. coli* je dnes hojně využívána pro produkci rekombinantních proteinů.
- Např. rekombinantní bovinní somatotropin je produkován v transgenních baktériích a je injikován dojícím kravám, které pak produkují větší množství mléka.

Příprava rekombinantních proteinů v transgenních organismech

- Produkce rekombinantních proteinů v bakteriích je náročná a začínají být využívány transgenní kozy, které produkují rekombinantní proteiny do mléka, ze kterého se proteiny mnohem snáze izolují. Připravuje se tak např. tkáňový aktivátor plasminogenu, který je používán pro rozpouštění krevních sraženin.

Příprava rekombinantních proteinů v transgenních organismech

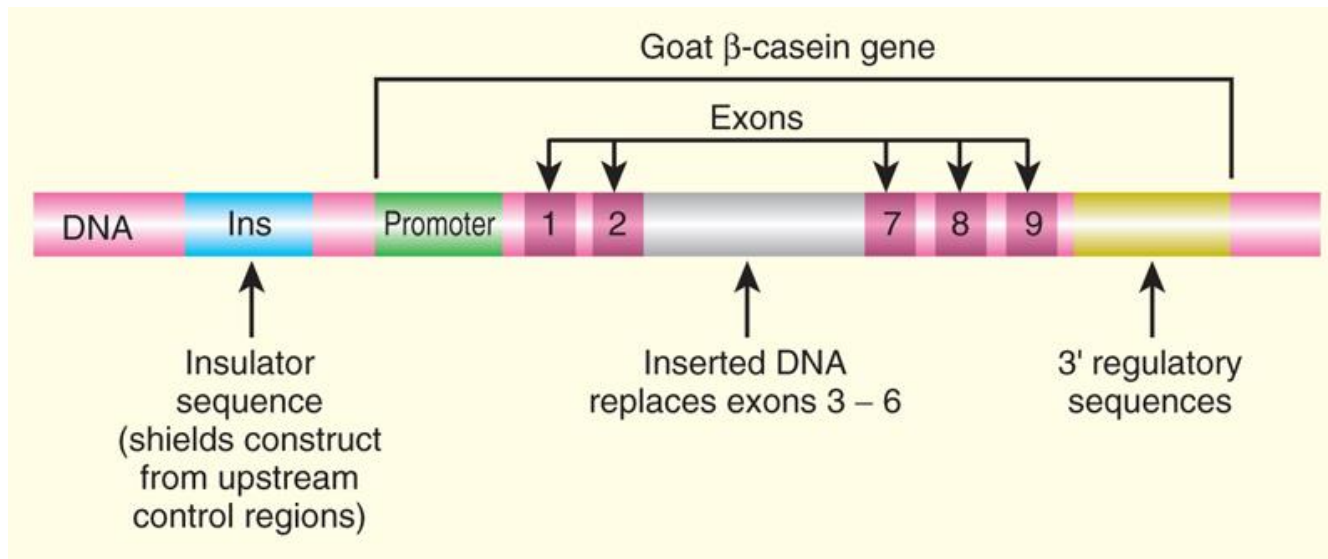
- Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) je dnes nejvíce používaným trombolytikem. Přípravek se nazývá altepláza, což je rekombinantní lidský tkáňový aktivátor plazminogenu (rhu t-PA). Tento rhu t-PA je serinová proteáza (o hmotnosti 70 kDa), která je specifickým aktivátorem plazminogenu.



Příprava rekombinantních proteinů v transgenních organismech

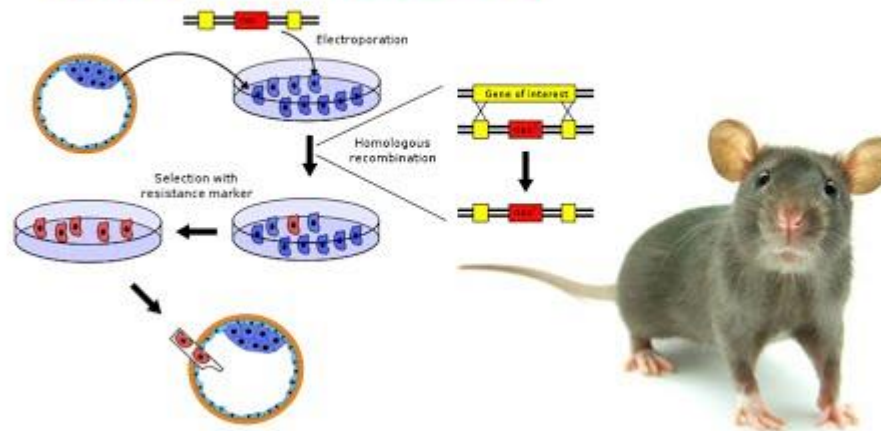
- Váže se specificky s fibrinem, kde dochází k přeměně navázaného plazminogenu na aktivní proteázu plazmin. Nevýhodou rhu t-PA je jeho poměrně krátký poločas, asi jen 3,5 minuty až 5 minut. Proto se rhu t-PA musí podávat v udržovací infuzi.

Gen je inzertován do genu pro beta-kasein, který je běžně produkován mléčnou žlázou do mléka. Tím se zajistí tvorba proteinu mléčnou žlázou a jeho vylučování do mléka. Konkrétně endogenní promotor a 3' regulační oblast zajistí expresi rekombinantního proteinu do mléka.



Příprava knockout myši pro výzkum

KNOCKOUT MICE



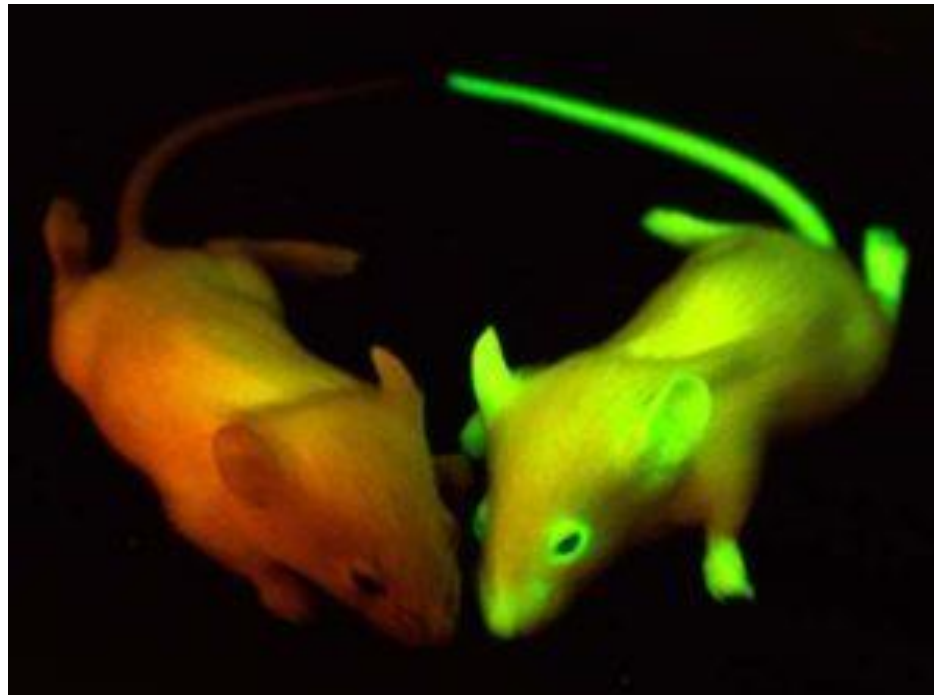
Příprava knockout myši pro výzkum

- Za účelem zjištění funkce genů ve fyziologických procesech bývají vytvářeny transgenní myši s tzv. knockoutem.
- Při knockoutu se z funkce vyřazuje určitý gen. Cílový gen je nejprve klonován v bakteriích. Do genu se uměle zavede DNA sekvence např. gen pro rezistenci k antibiotikům.

Příprava knockout myši pro výzkum

- Tím se stává gen nefunkční a poté se zavádí do stejným způsobem jako transgeny do živočichů.
- Některé knockouty způsobují zkrácení života nebo myši se vůbec nenarodí.

Alternativní způsoby přípravy transgenních živočichů



Alternativní způsoby přípravy transgenních živočichů

A) retroviry – práce s nimi je snadnější.

- Retrovirus nesoucí transgenní konstrukt je přidán k oplozenému vajíčku. Vajíčko je pak přeneseno do náhradní matky.

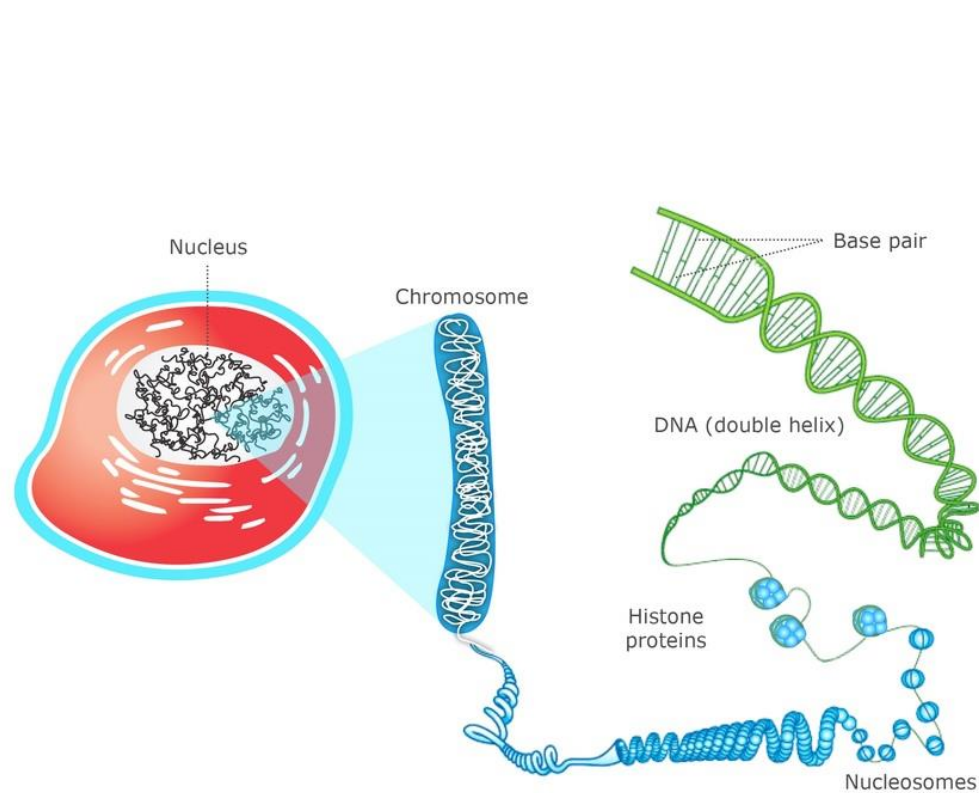
Alternativní způsoby přípravy transgenních živočichů

- Nevýhody používání retrovirů
 - retroviry vkládají do genomové DNA navíc i své sekvence
 - omezené množství vkládané DNA
 - často takto vznikají chiméry

Alternativní způsoby přípravy transgenních živočichů

B) Embryonální kmenové buňky – získávají se z blastocysty. Do těchto buněk se může vložit DNA jako do buněčných kultur a pak jsou vráceny do embrya. Vše musí být za podmínek, že buňky nebudou diferencovat. Vznikají tak genetické chiméry.

Vliv místa začlenění transgenu na jeho expresi



Vliv místa začlenění transgenu na jeho expresi

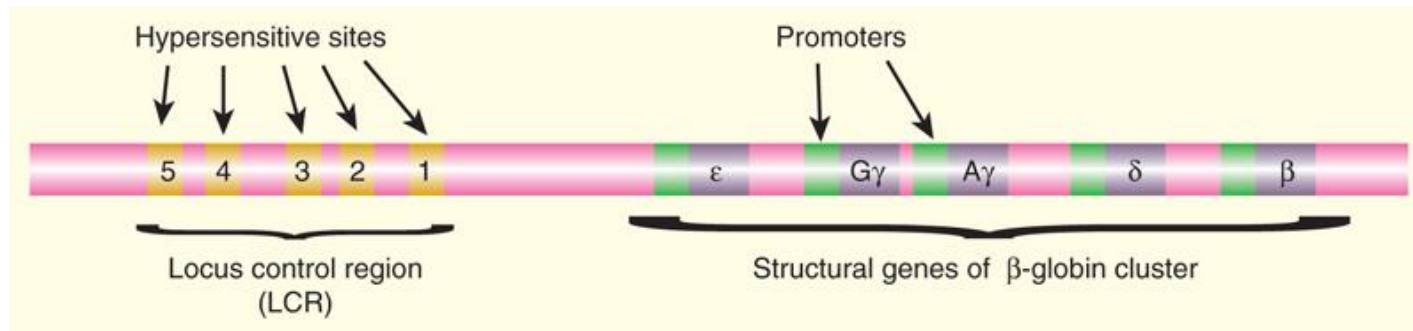
Transgeny jsou začleňovány náhodně. Pokud se začlení do místa, které je v dané tkáni součástí heterochromatinu, tak nedochází k jeho expresi.

Tomu se lze vyhnout několika způsoby:

Vliv místa začlenění transgenu na jeho expresi

Tomu se lze vyhnout několika způsoby:

- a) Použití enhancerových sekvencí, které se dávají na začátek transgenu a mohou pak zajistit na chromozomální pozici nezávislou expresi – např. kontrolní oblast lokusu



Vliv místa začlenění transgenu na jeho expresi

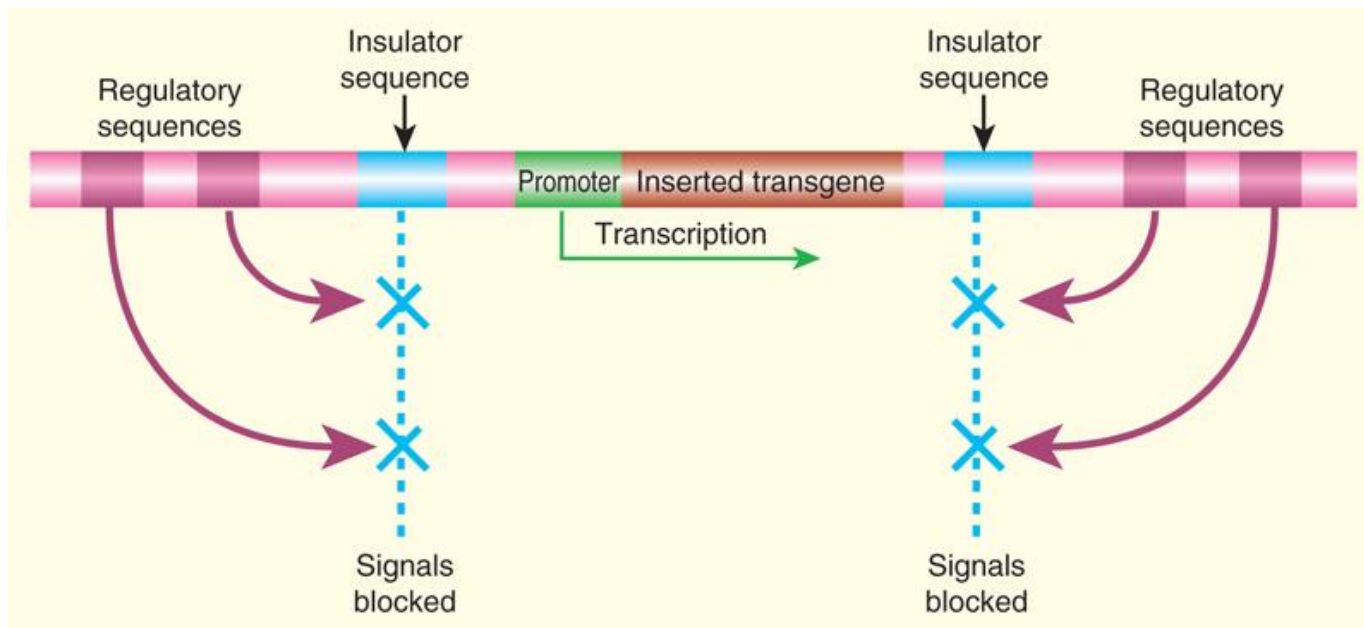
Tomu se lze vyhnout několika způsoby:

- b) Použití izolačních sekvencí, které blokují aktivitu ostatních regulačních elementů. Tyto sekvence pak způsobí vznik nezávislé smyčky, která se vymezuje z heterochromatinu.

Vliv místa začlenění transgenu na jeho expresi

Tomu se lze vyhnout několika způsoby:

b) Použití izolačních sekvencí



Vliv místa začlenění transgenu na jeho expresi

Tomu se lze vyhnout několika způsoby:

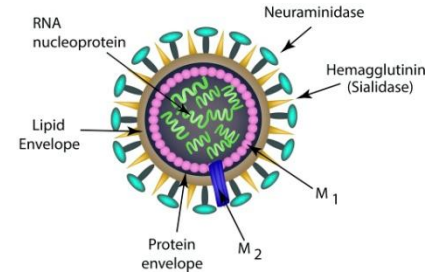
c) Použití přirozených transgenů. Většinou transgeny postrádají introny, čímž se liší od přirozených genů – jsou kratší. Přirozené geny s plnou délkou sekvence jsou často více rezistentní pro efekt pozice na expresi transgenu.

Praktické využití transgenních živočichů



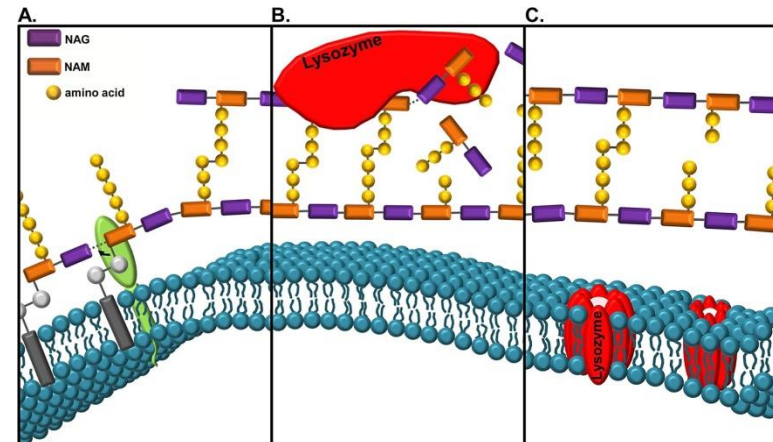
Praktické využití transgenních živočichů

- Transgenní živočichové v boji proti chorobám
 - transgenní kuřata odolná proti viru ptačí chřipky – obsahují transgen kódující RNA vlásenku. Ta se váže na virovou RNA polymerázu a brání její funkci. Infikovaná kuřata sice zemřela, ale nepřenesla virus na ostatní kuřata.



Praktické využití transgenních živočichů

- Transgenní živočichové v boji proti chorobám
 - transgenní krávy a kozy byly upraveny tak, že vylučují do mléka lysozym. Ten pak zamezuje bakteriálním infekcím trávicího traktu způsobeným např. *E. coli*.



Praktické využití transgenních živočichů

- Transgenní živočichové v boji proti chorobám
 - transgenní krávy a kozy mohou vytvářet vakcíny, které budou přijímány přímo pitím mléka

Praktické využití transgenních živočichů

- Transgenní živočichové v boji proti chorobám



- transgenní komáři mohou bojovat proti přenosu protozoálních i virových infekcí
- malárii (rod *Plasmodium*) přenáší komár rodu *Anopheles*. Byli vytvořeni komáři, kteří obsahují transgen pro defensin A, fosfolipázu nebo protilátky proti plasmodiím, které brání přenosu plasmodií

Praktické využití transgenních živočichů

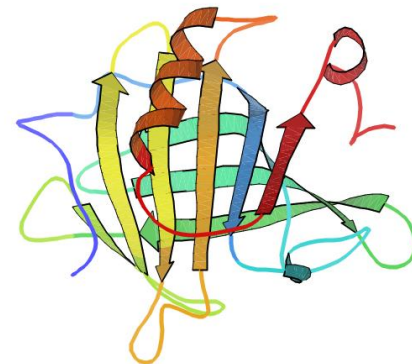
- Transgenní živočichové v boji proti hladu
 - Transgenní lososi rostou dvakrát rychleji než divocí lososi, protože obsahují EO-1 alpha transgen kódující růstový hormon. Tyto transgenní ryby jsou triploidní a pouze samice, aby se zabránilo rozšíření v přírodě.

Praktické využití transgenních živočichů



Praktické využití transgenních živočichů

- Transgenní živočichové v boji proti hladu
 - Transgenní prasata a ovce mohou produkovat tuky bohatší na nenasycené mastné kyseliny
 - Transgenní krávy mohou produkovat mléko bez alergenu – beta-laktoglobulinu



Praktické využití transgenních živočichů

- Transgenní živočichové v boji proti hladu
 - Transgenní prasata mohou do slin vylučovat enzym fytázu, který štěpí inositol hexafosfát (kyselina fytová) a tato ekologická prasata nepotřebují dodávat do stravy fosfáty a vylučují o 60% méně fosfátů než běžná prasata, což chrání povrchové vody před znečištěním.



Praktické využití transgenních živočichů

- Transgenní živočichové v praxi
 - Transgenní bourec morušový produkuje fluorescentní hedvábné vlákno. Vědci použili jako transgen zelený fluorescenční protein z medůzy nebo červený fluorescenční protein z korálů pod kontrolou promotoru pro řetězec fibroinu H, základního řetězce pro hedvábné vlákno. Po ozáření modrým světlem hedvábní vlákna fluoreskují.





Aplikace RNA technologie v transgenetice

Jednou z možností je použití tzv. antisense transgenu. Jedná se o převrácenou sekvenci DNA daného genu. Výsledkem je tvorba antisense RNA, která se váže na RNA originálního genu a tím je inhibována genová exprese.

Lze také použít transgen pro ribozymy

Přirozená transgeneze a DNA ingesce

