Příprava transgenních savců

– přenos genů do buněk, které musí být schopny dát vznik celému jedinci

- využití zárodečných buněk (x rostliny – somatické buňky)
- je potřeba mít vhodný systém selekce

- celá řada možností jak připravit transgenní myš

V praxi se používají především 2:

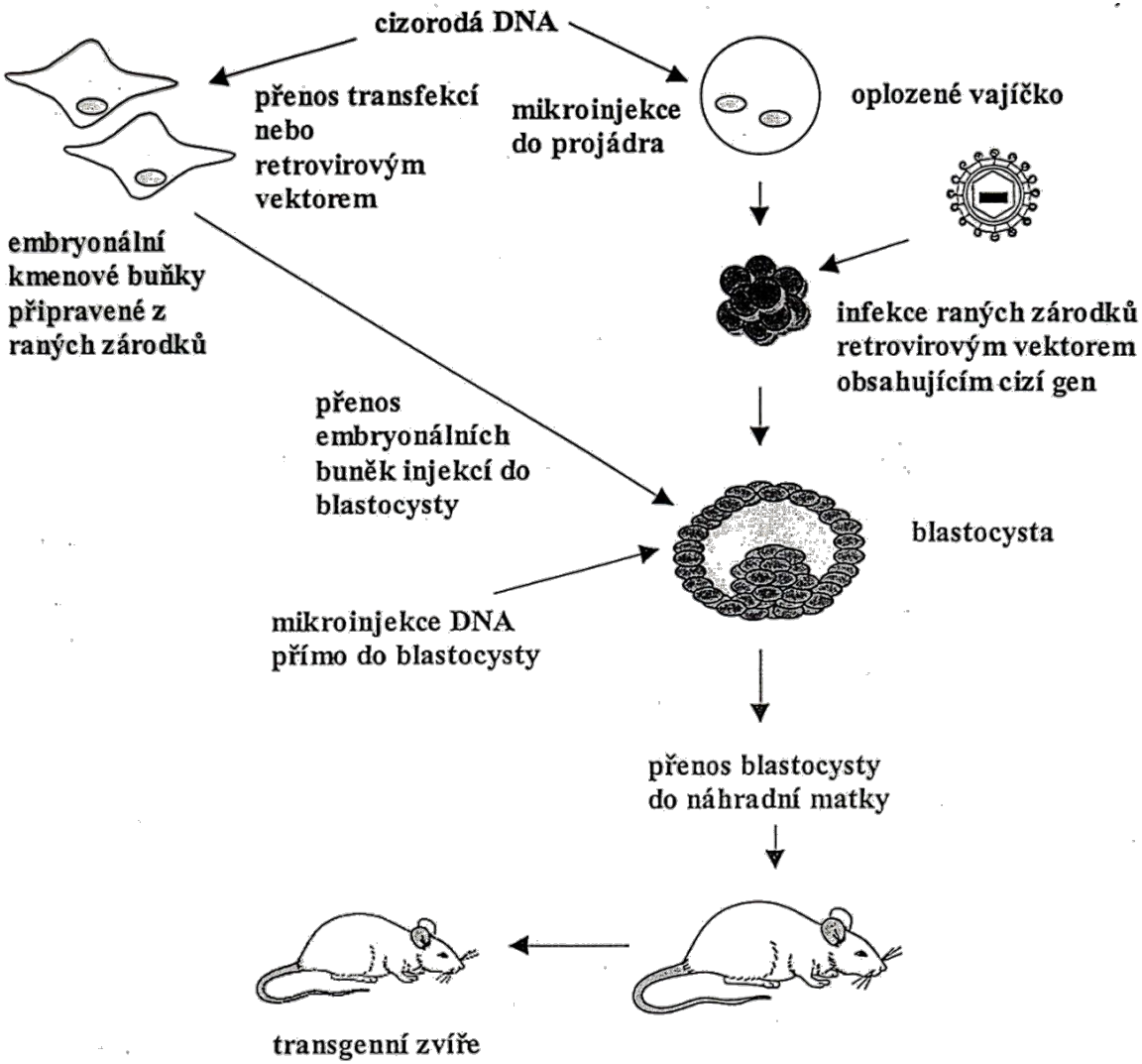
a) přímá mikroinjekce cizorodé DNA pro prvojádra oplozeného vajíčka

- obvykle samčí prvojádro – větší a blíže povrchu
- přenos do pseudopregnantní samice (hormony, kopulace se steril. samečkem)

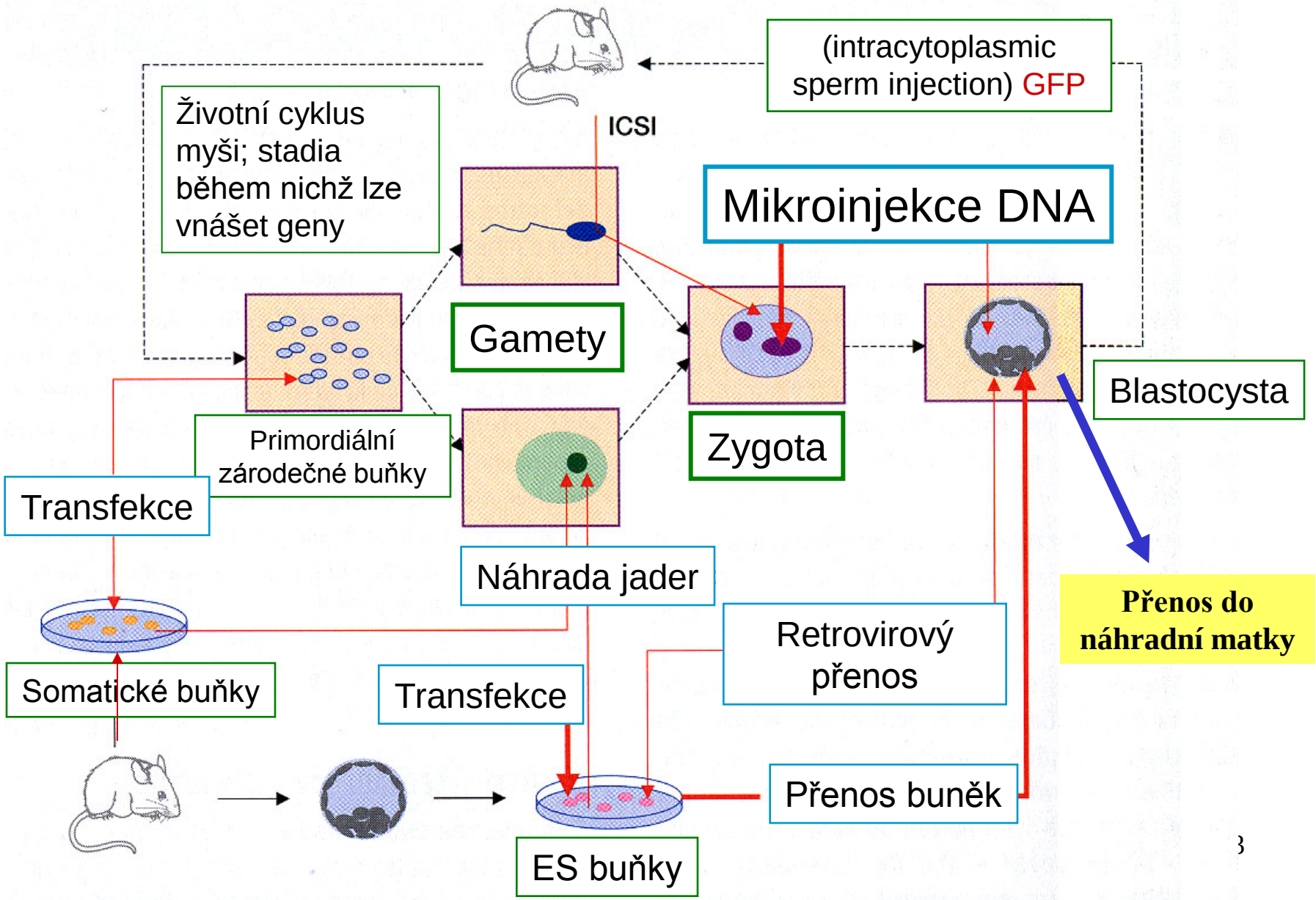
b) genové manipulace s ESC a injekce do blastocysty

- přesné (cílené) modifikace genomu – lze provádět selekci in vitro (HR)
- přenos zpět do blastocysty a poté do náhradní matky

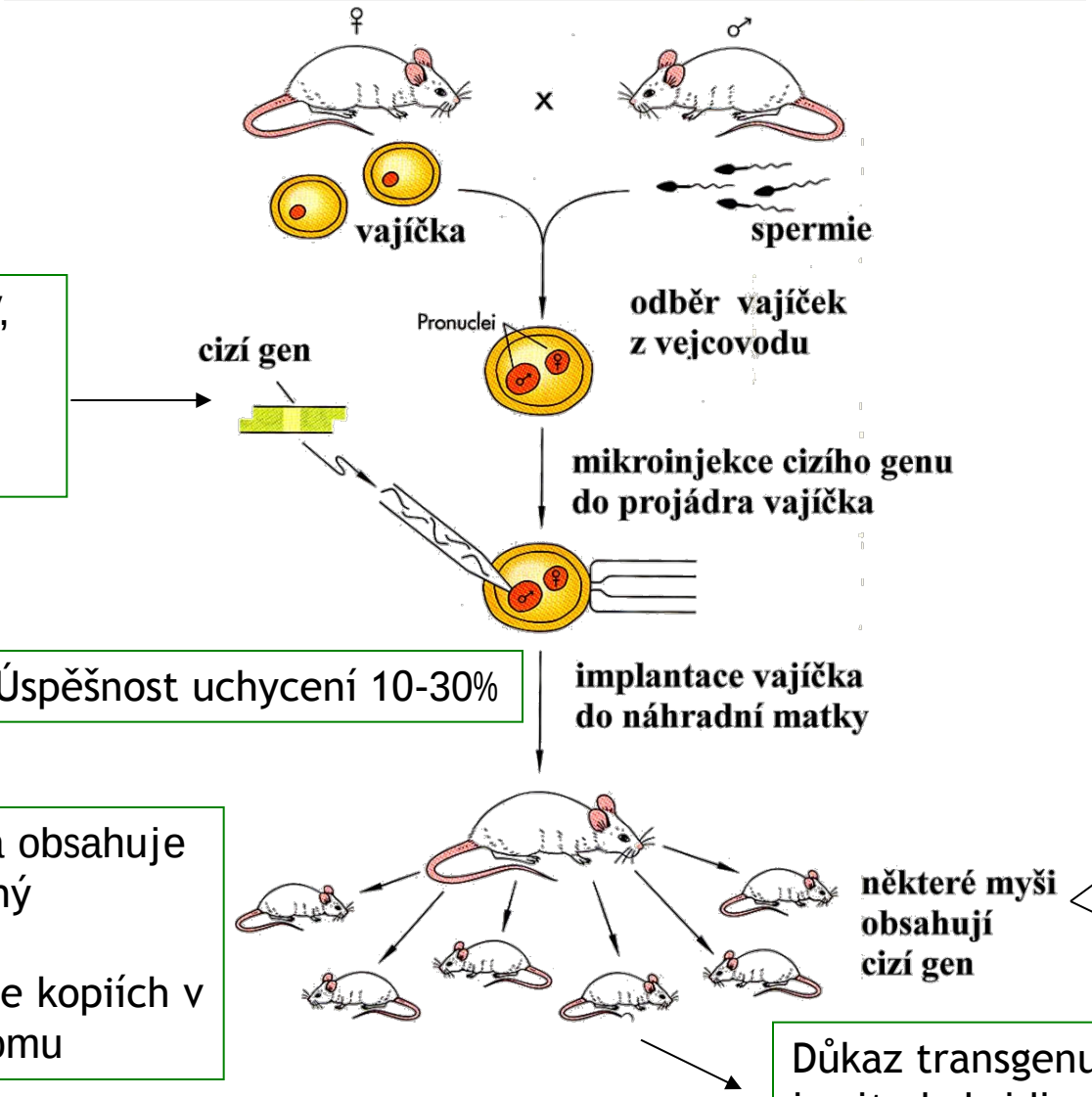
Příprava transgenních savců



Možnosti přípravy geneticky modifikovaných myší



Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka



DNA SV40, tkHSV, lidský inzulin, β-globin, interferon

Úspěšnost uchycení 10-30%

Až 40% potomstva obsahuje transgen začleněný náhodně, obvykle tandemově ve více kopiích v jednom chromozomu

Důkaz transgenu, např. PCR, in situ hybridizací

Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami

ESC – pluripotentní kmenové buňky vnitřní buněčné masy blastocysty

- izolace a propagace myších – poprvé Evans 1981

letters to nature

Nature **292**, 154 - 156 (09 July 1981); doi:10.1038/292154a0

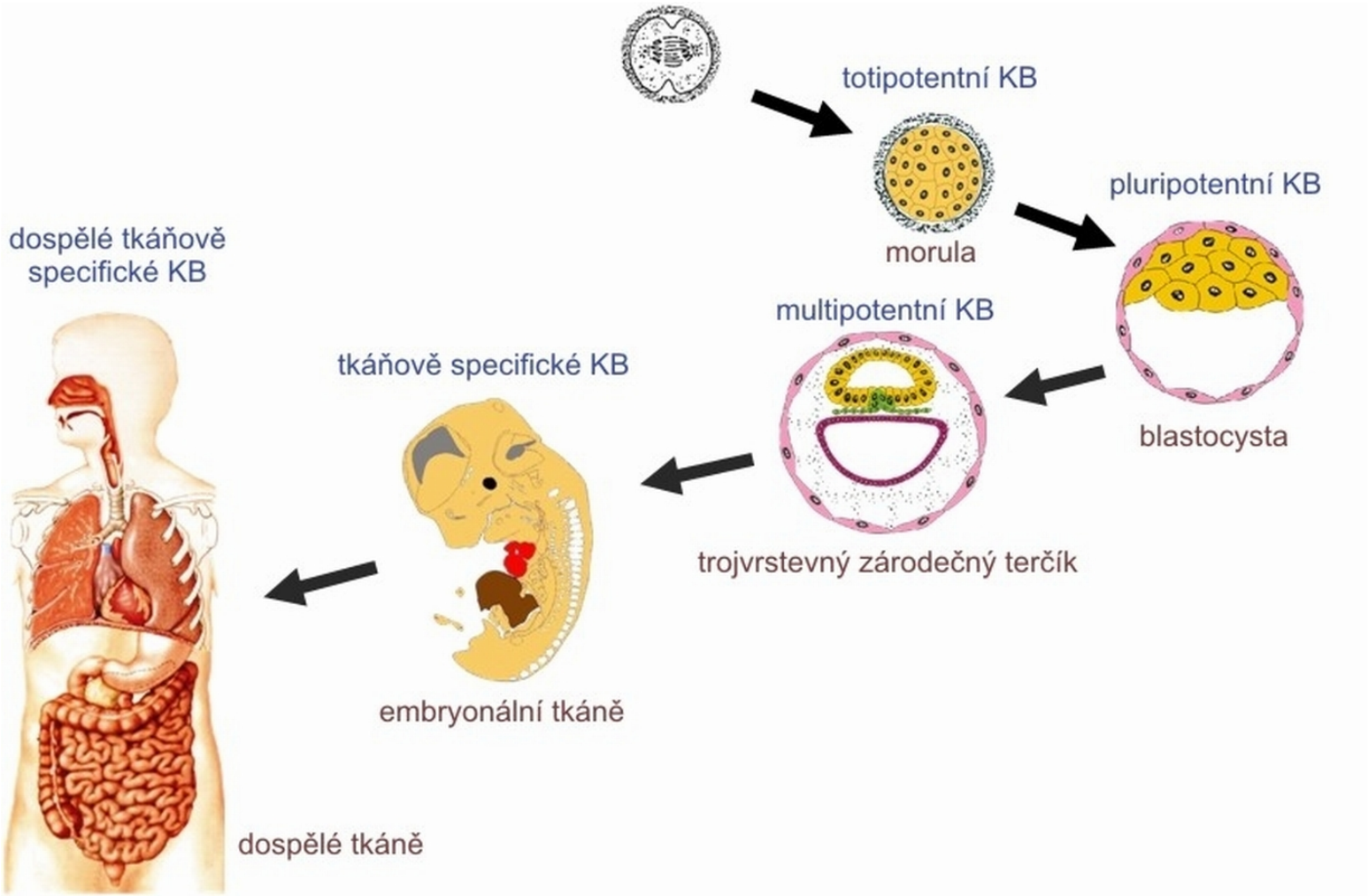
Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos

M. J. EVANS* & M. H. KAUFMAN†

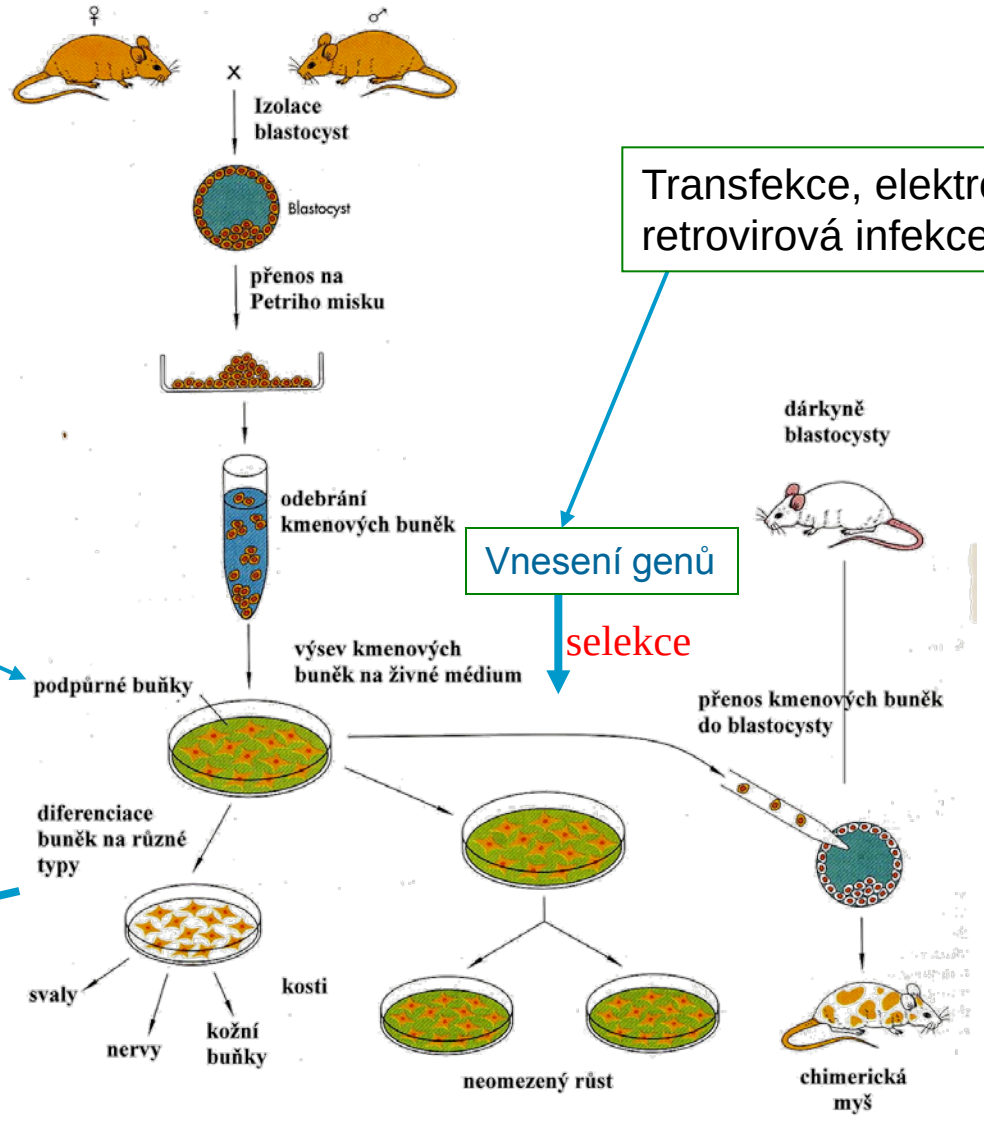
Departments of Genetics* and Anatomy†, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EH, UK

- odebrání blastocyst (4-6 dní po oplození)
- enzymatická/mechanická disociace buněk vnitřní buněčné masy
- kokultivace s podpůrnými buňkami (fibroblasty)

Typy kmenových buněk



Manipulace s embryonálními kmenovými buňkami

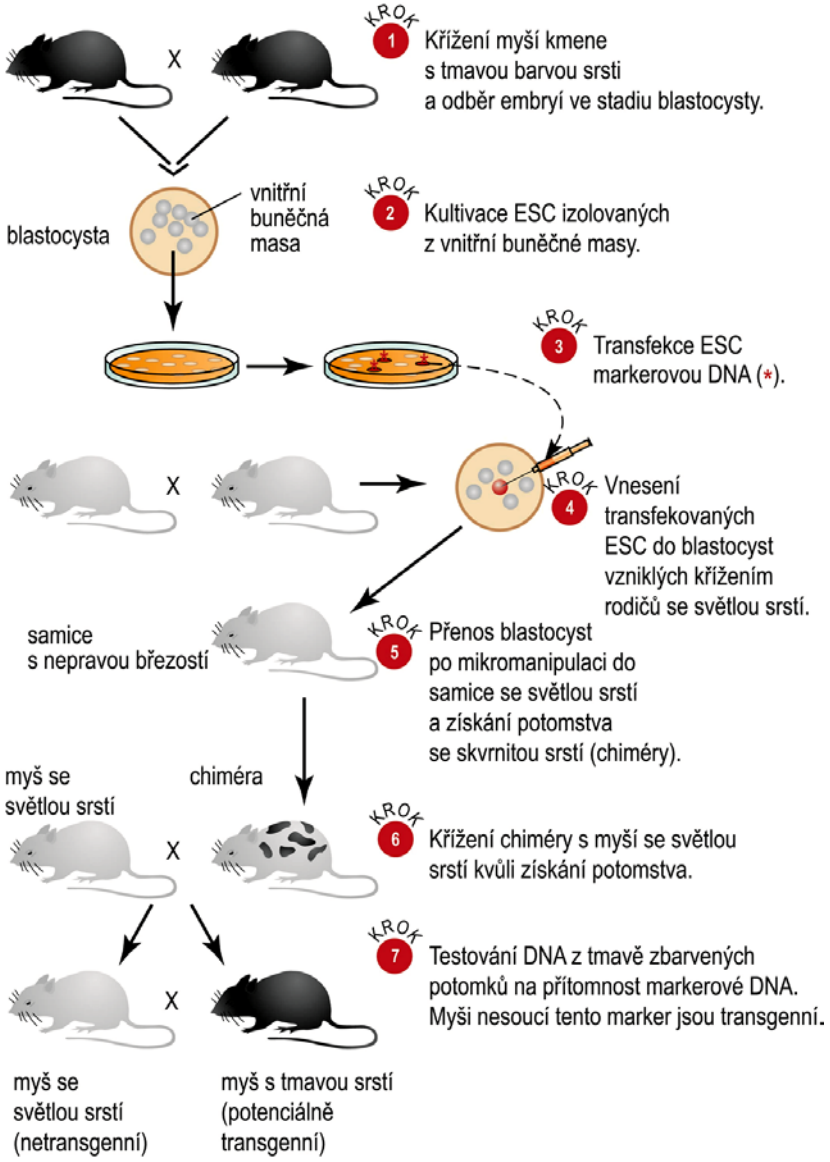


Transfekce, elektroporace, retrovirová infekce

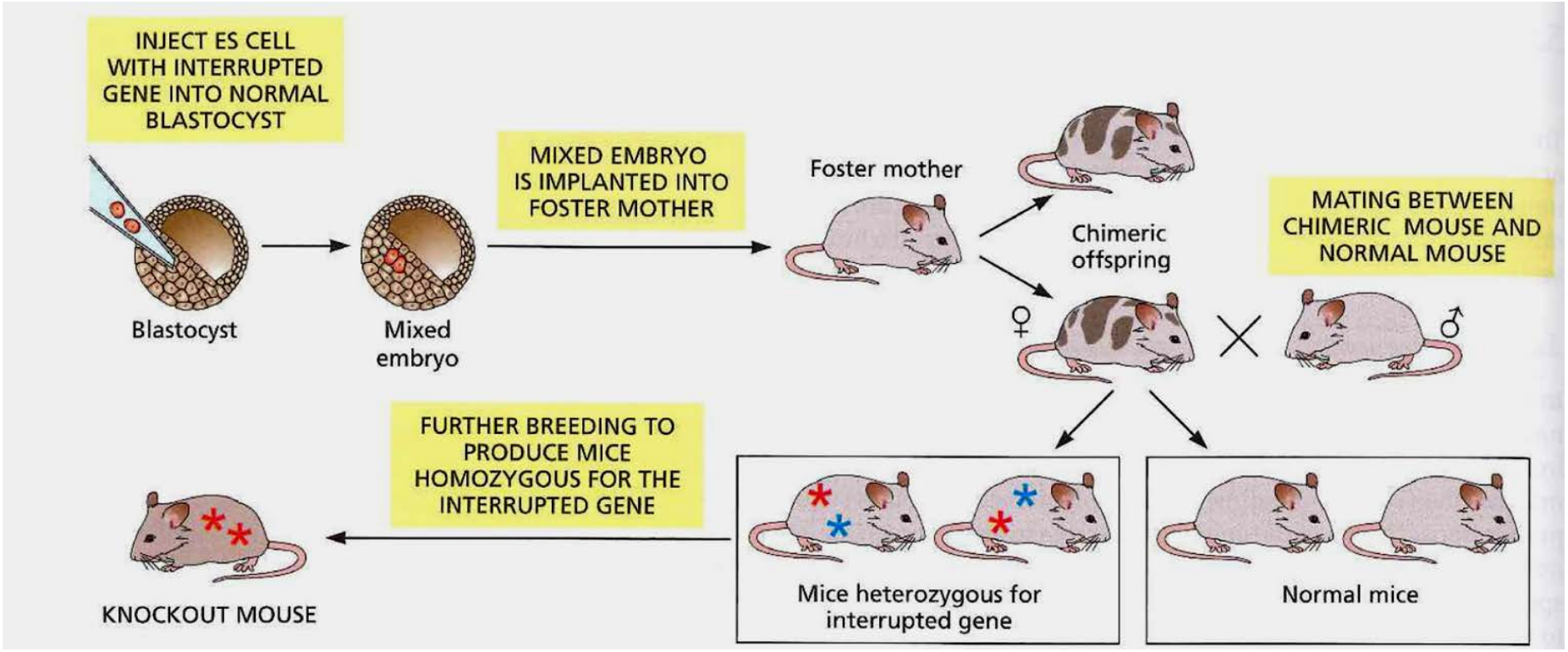
Vrstva fibroblastů (produkce růstových faktorů - LIF, BMPs)

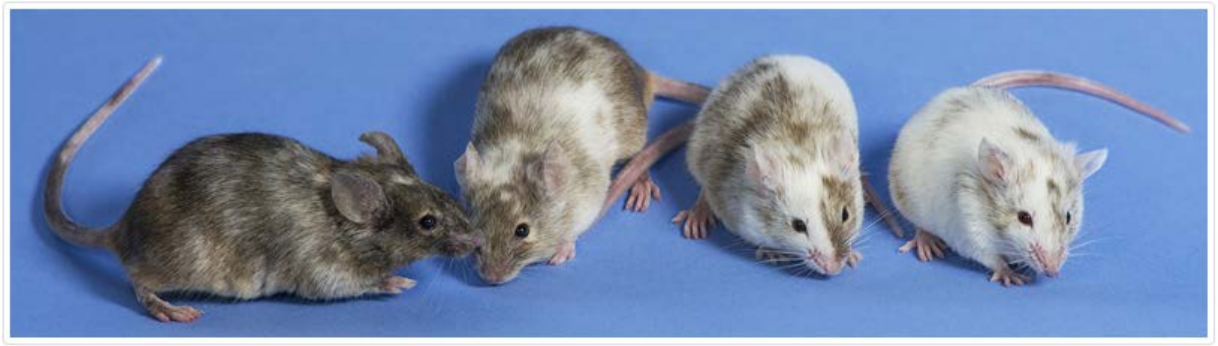
Terapeutické klonování, náhrada tkání a orgánů

Příprava transgenních myší přenosem genů do embryonálních kmenových buněk (ESC)



Příprava knokautovaných myší po přenosu genů do ES buněk





Nejčastěji používané myší kmeny – řada různých kombinací

129 – black agouti (hnědá), chinchilla (šedá), white (bílá)

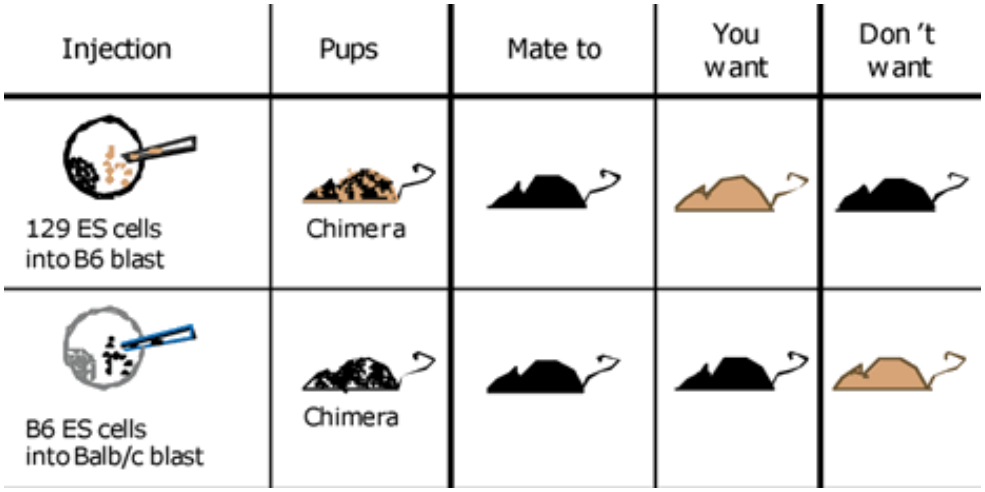
C57BL/6 – black (černá)

Balb/c – white (bílá) (v kombinaci s black C57BL/6 pigmentem je agouti)

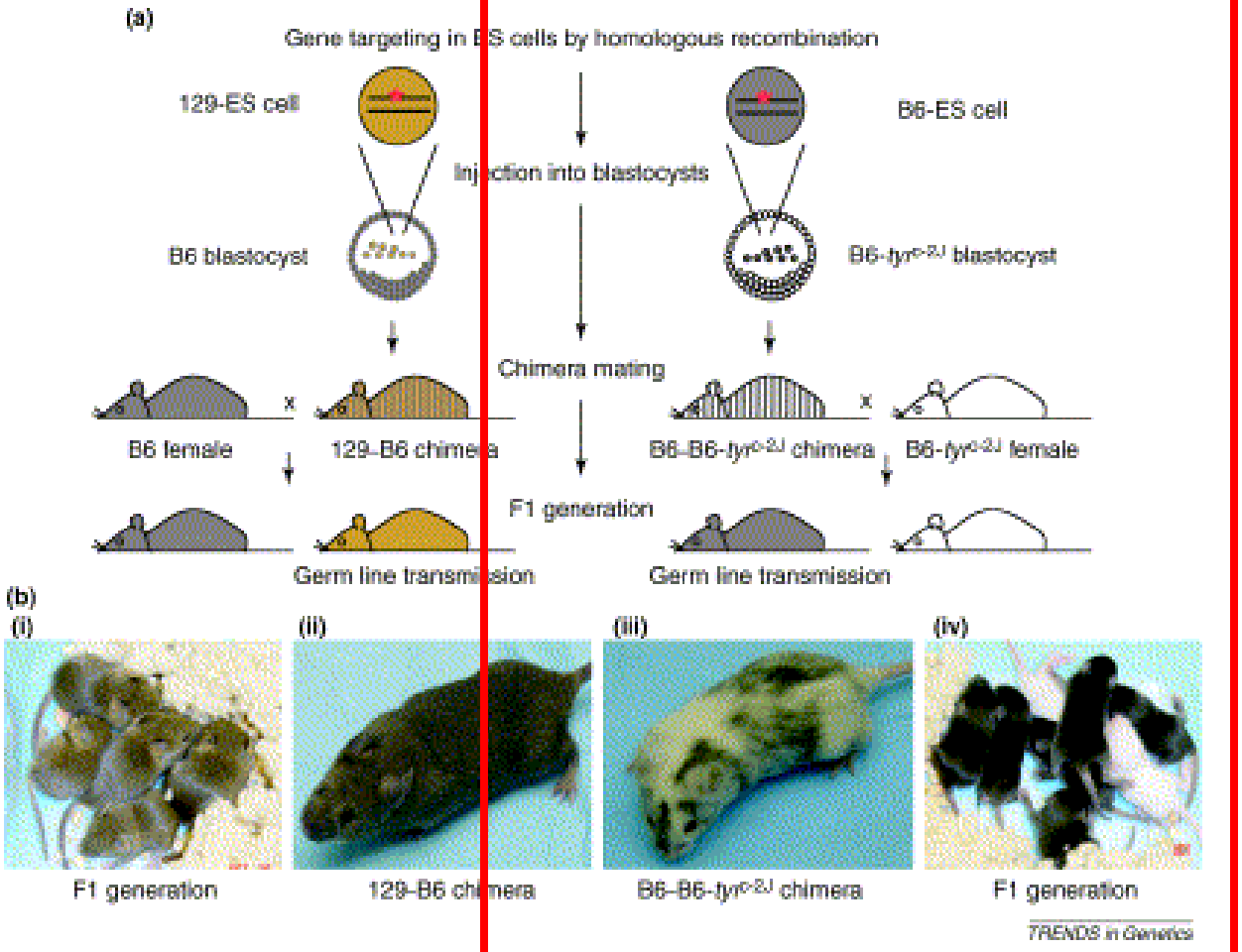
- kmeny se liší robustností ESC/dospělců, znalostí genomu, produkcí potomků (C57BL/6 pojídají svá mláďata), úspěšností ESC začlenit dát vznik potomkům na určitém genet. pozadí, …

Agouti 129 - dominantní nad black C57BL/6

Black C57BL/6 dominantní nad Balb/c white

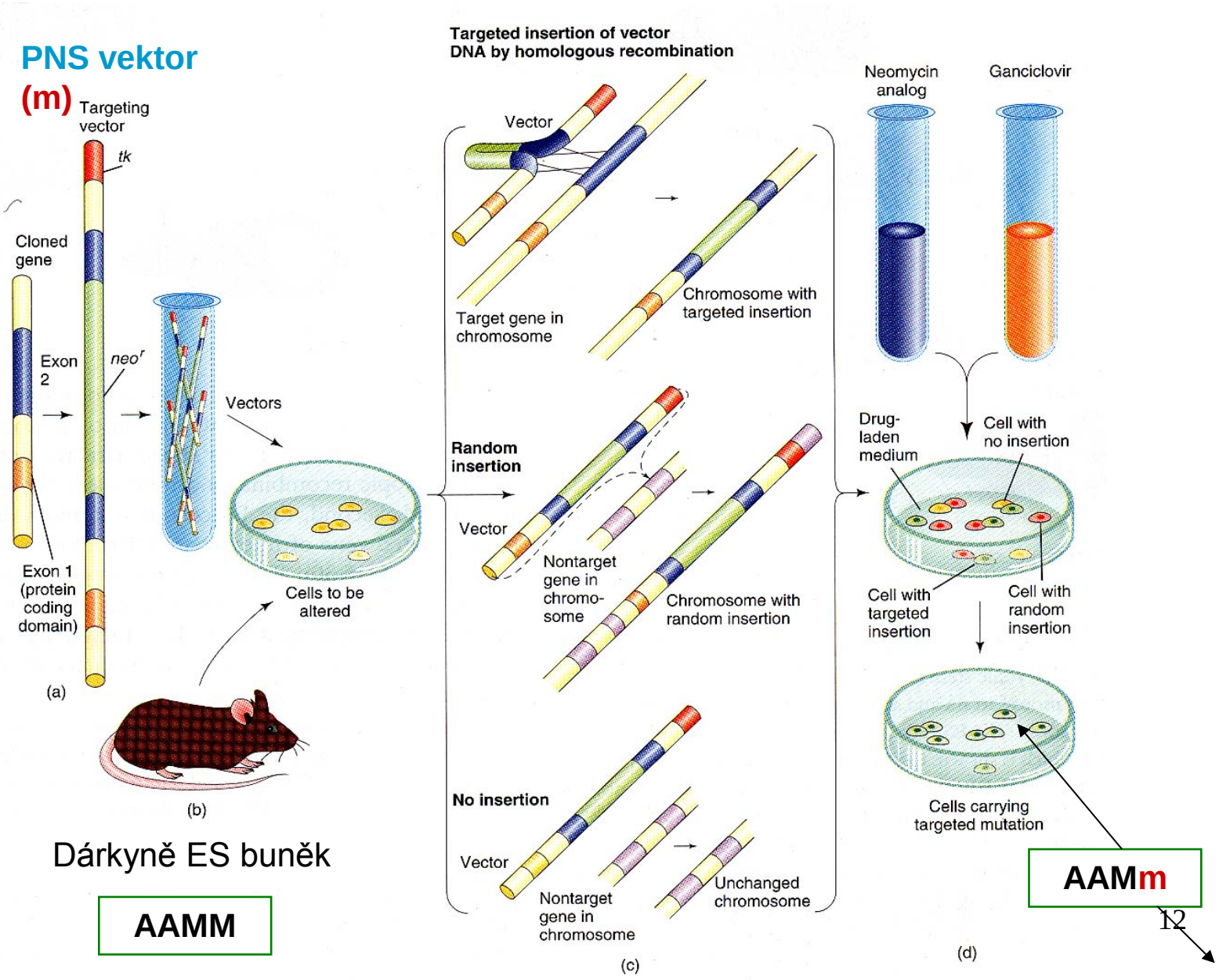


- ale i další možné kombinace


(a)
Gene targeting in ES cells by homologous recombination
129-ES cell
B6-ES cell
Injection into blastocysts
B6 blastocyst
B6-tyrc-2J blastocyst
Chimera mating
B6 female
129–B6 chimera
B6–B6-tyrc-2J chimera
B6-tyrc-2J female
F1 generation
Germ line transmission
Germ line transmission
(b)
(i)
(ii)
(iii)
(iv)
F1 generation
129–B6 chimera
B6–B6-tyrc-2J chimera
F1 generation
TRENDS in Genetics

Příprava ES buněk s geny knokautovanými homologní rekombinací

PNS vektor (m)

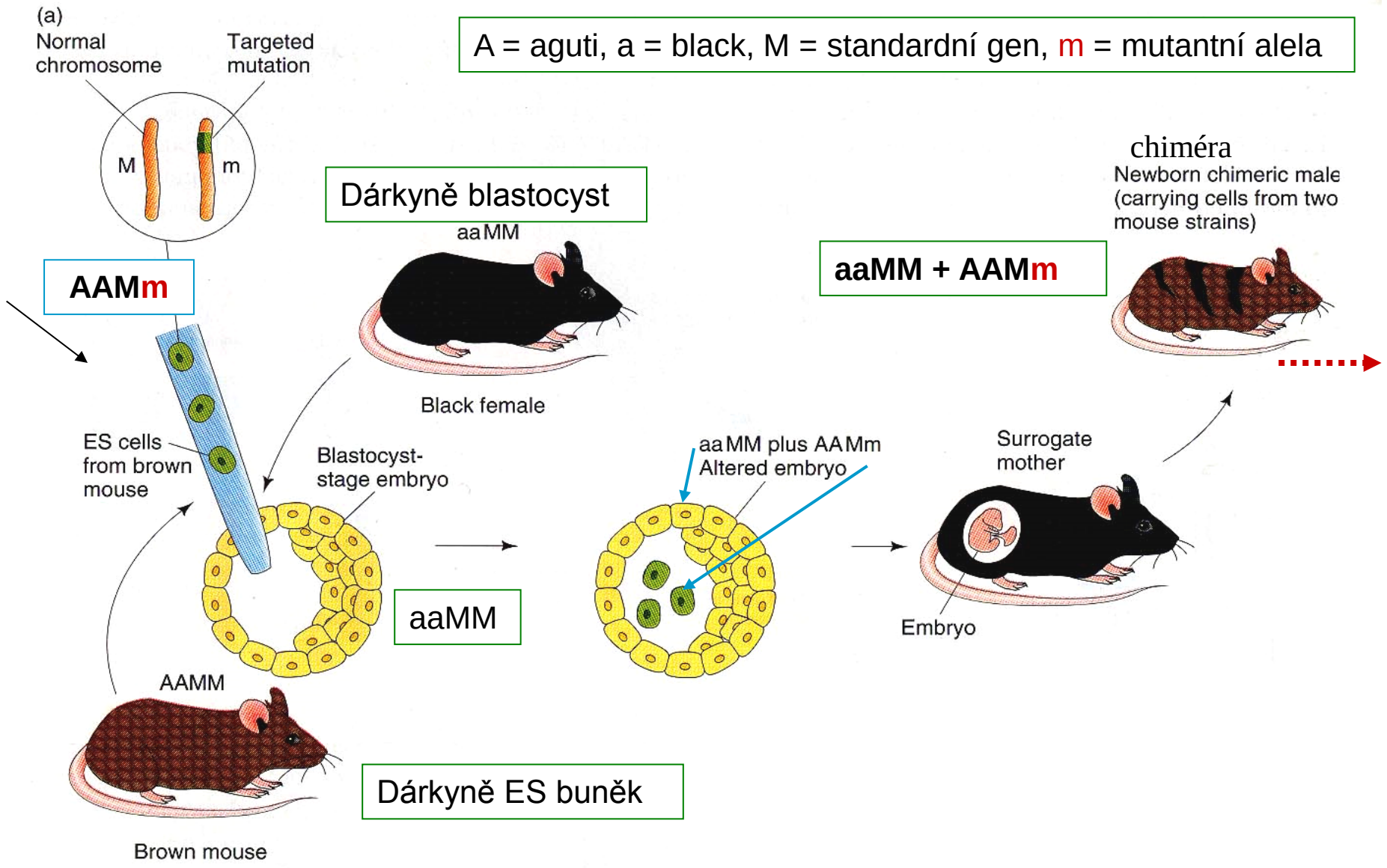


Dárkyně ES buněk

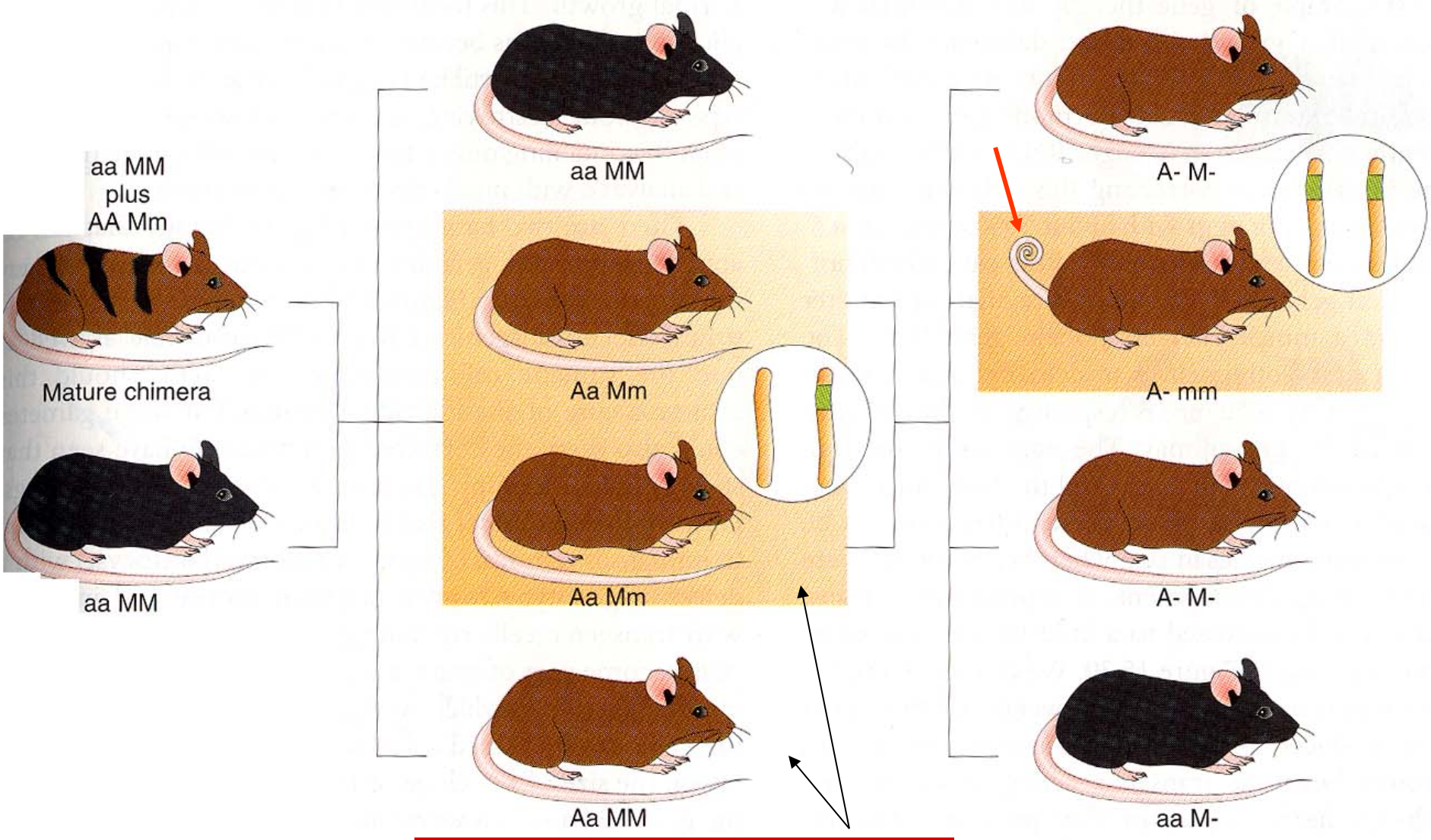
AAMM

AAMm

Vytvoření myši nesoucí knokautovaný gen

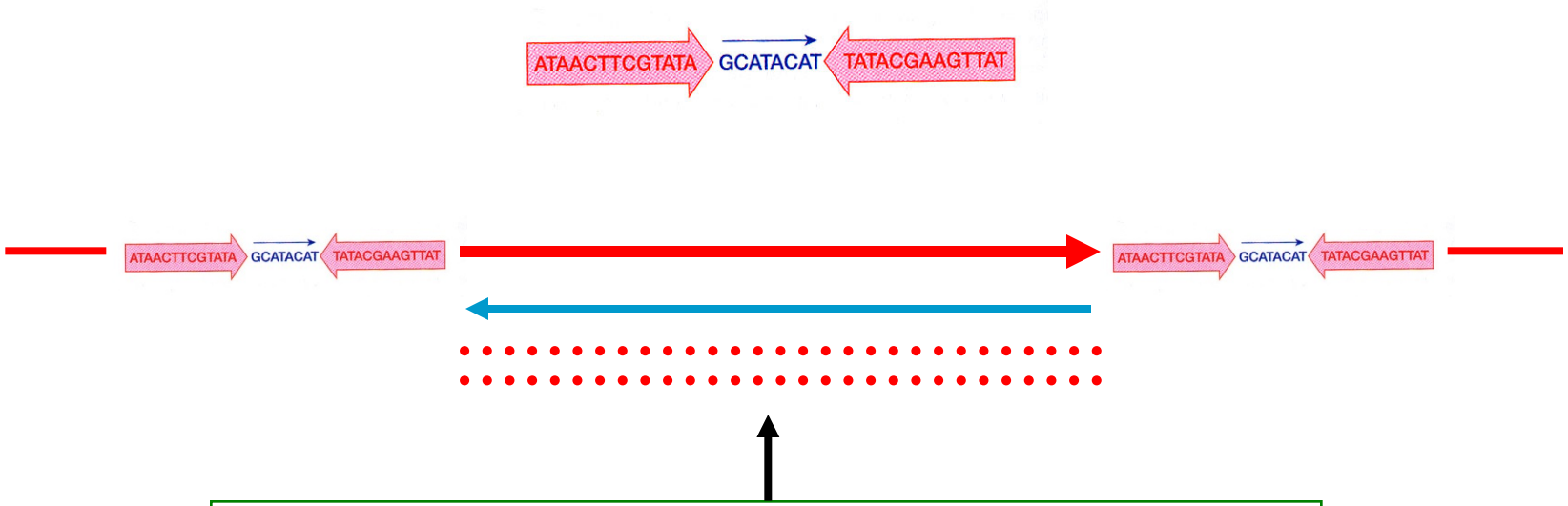


Pokračování - vytvoření myši s knokautovaným genem



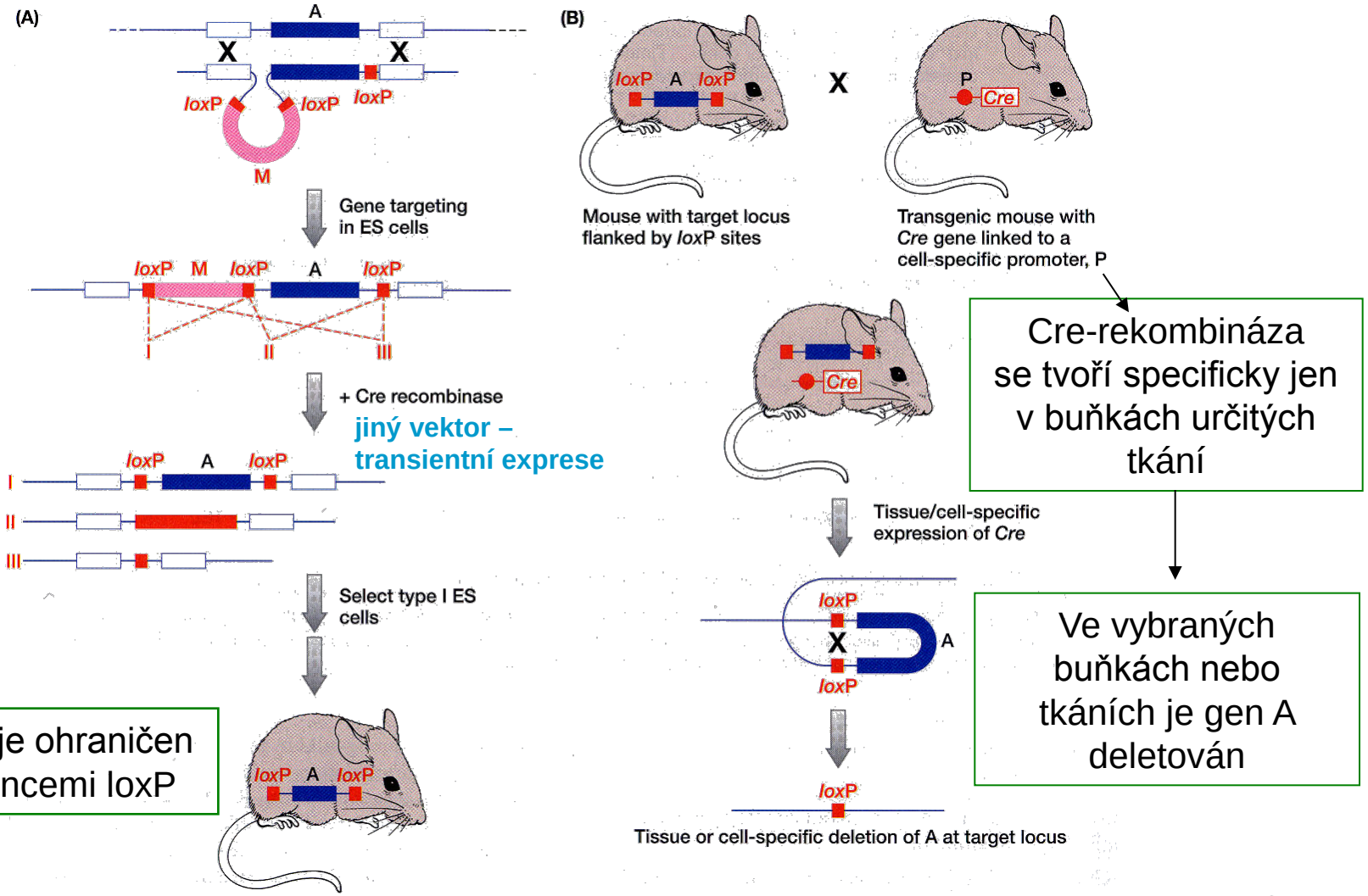
Stanovení genotypu analýzou DNA

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 (deleci) genů



Cre-rekombináza se tvoří specificky jen v buňkách určitých tkání

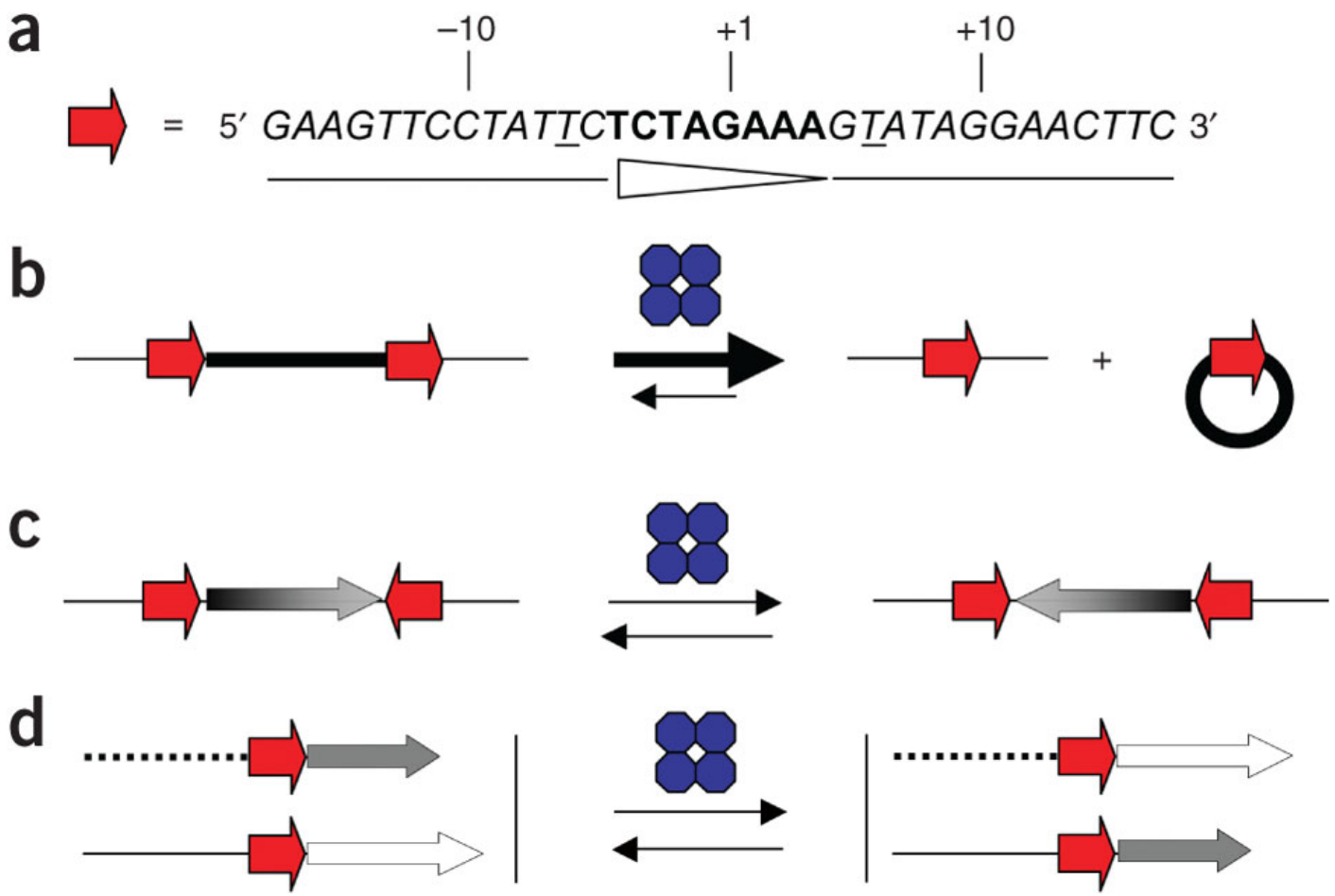
Ve vybraných buňkách nebo tkáních je gen A deletován

Gen A je ohraničen sekvencemi loxP

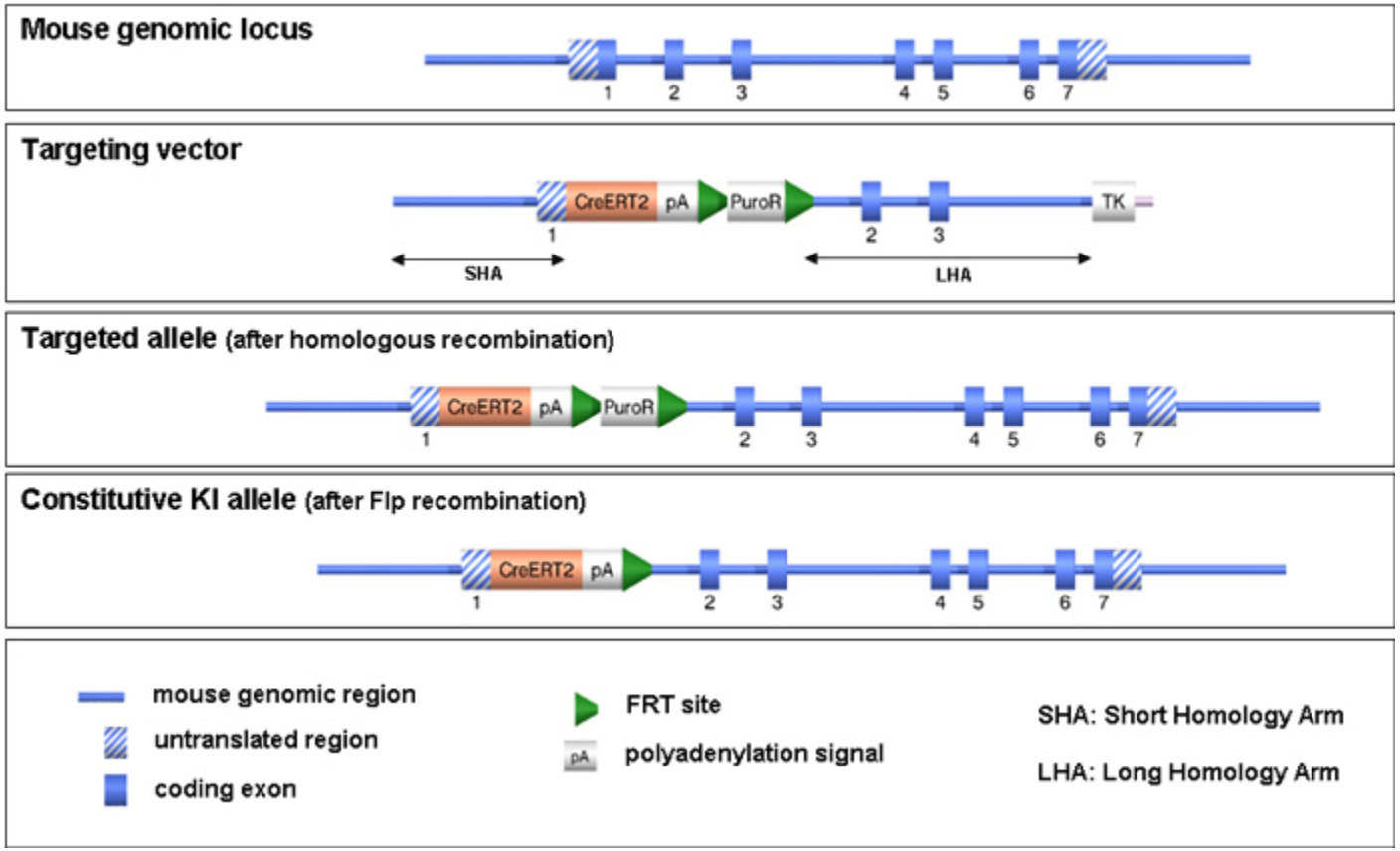
Cre-rekombináza pod kontrolou Tet-systému = indukovatelnost

FLP-FRT systém

- kvasinkový enzym Flp rekombináza (flipáza), 34 bp FRT sekvence
- různé typy FRT sekvencí – rekombinace pouze mezi stejnými typy



Vytvoření knock-in myší

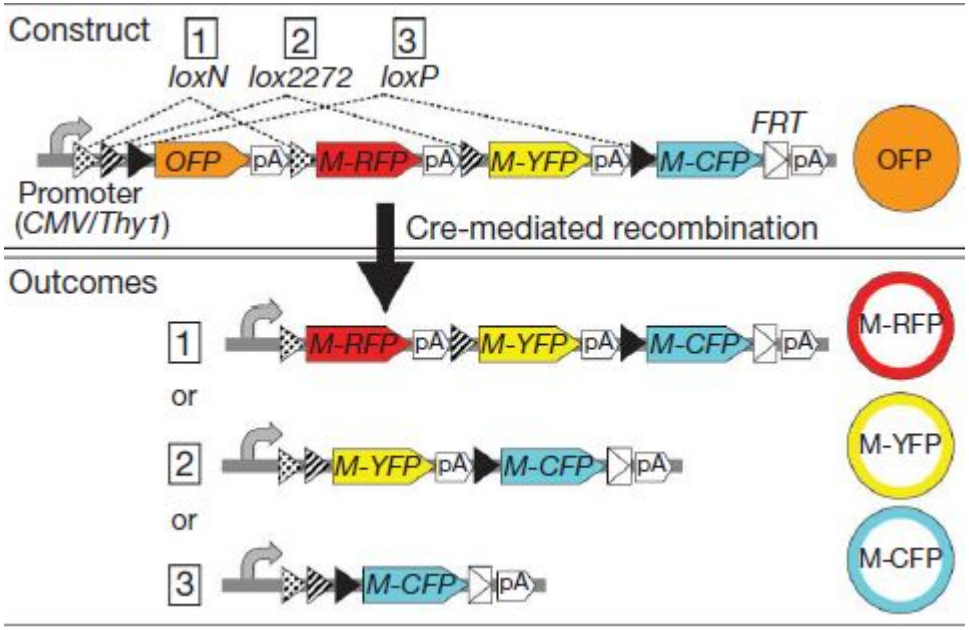


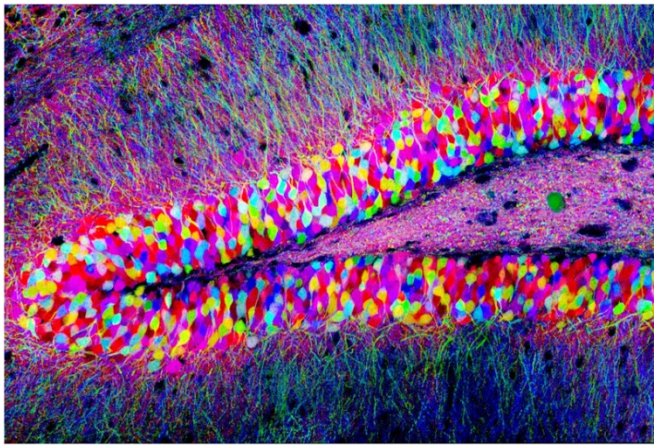
Takto lze připravit nejen knock-in myš (myš exprimující někjaký „nový gen“) …

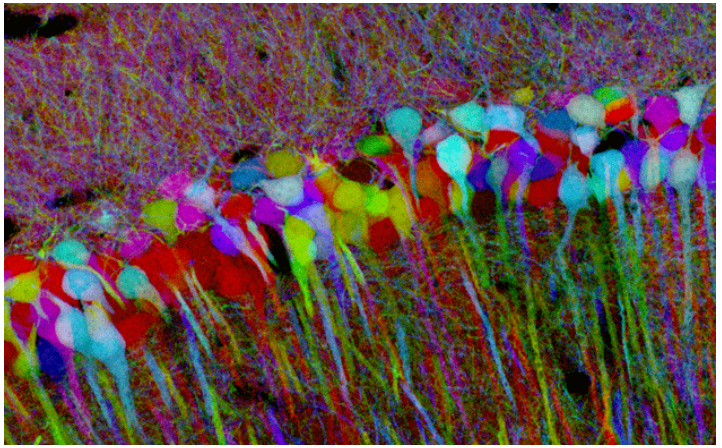
– umístěn obvykle do nekritického regionu

… ale i měnit sekvence genů (oprava mutací, zavádění mutací, …)

BRAINBOW myš

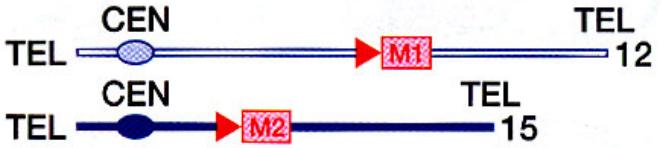




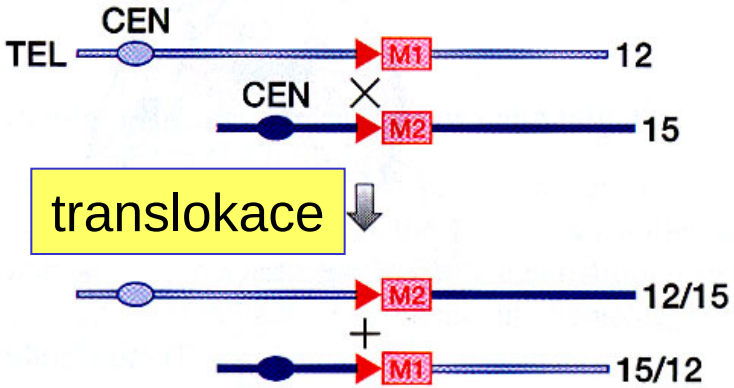


Inženýrství chromozomů s využitím rekombinačního systému Cre-LoxP

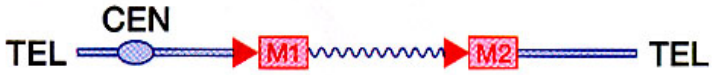
(A) 1. Use sequential gene targeting to introduce *loxP* site (▶) plus a marker gene (M) into two desired locations on different chromosomes



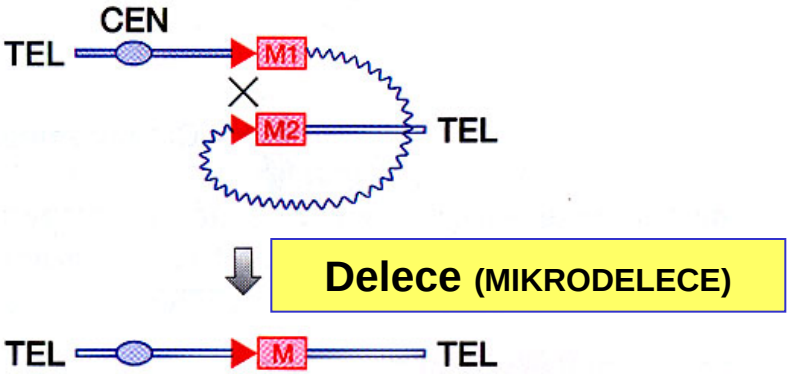
2. Expose *loxP*-containing chromosomes to Cre recombinase



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



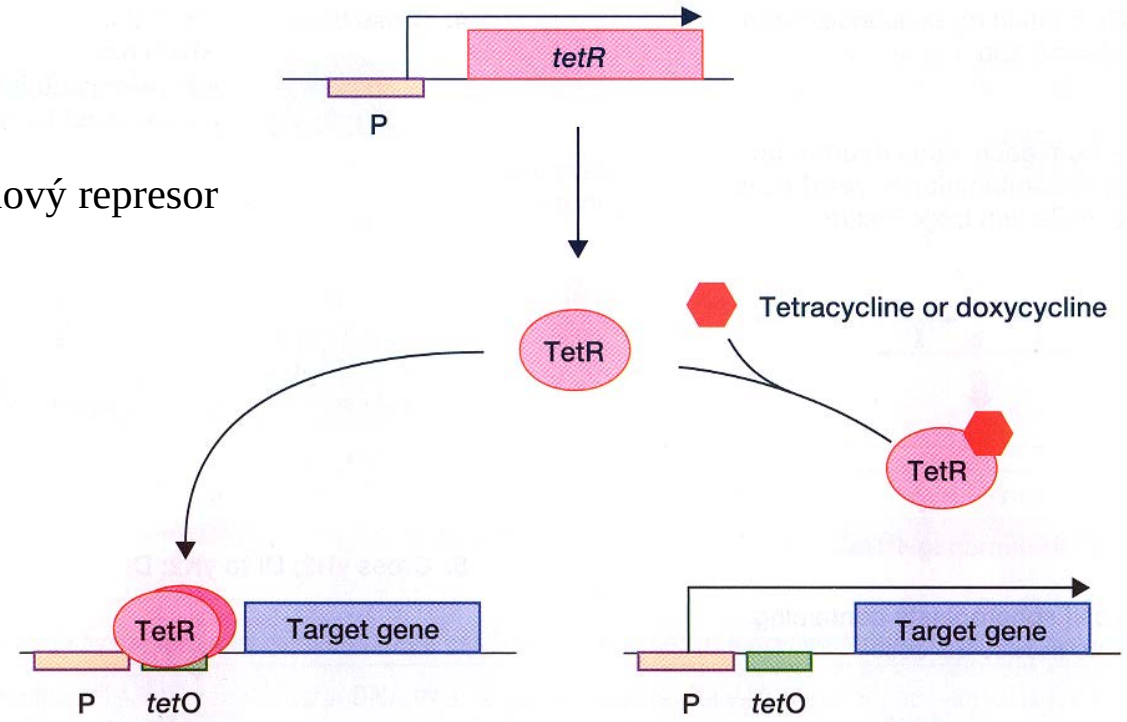
2. Allow to undergo intrachromosomal 'recombination' in presence of Cre recombinase



M1 = neo, M2 = puro

Základ expresního systému indukovatelného tetracyklinem

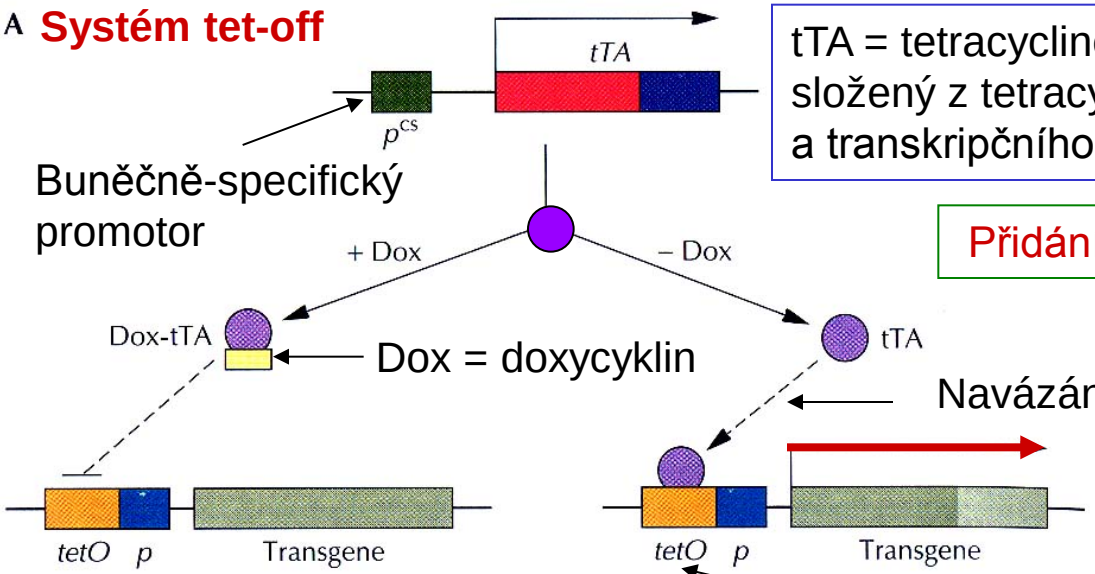
tetR = teracyklinový represor



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 na operátor, což vede k navození exprese transgenu.

Genová exprese regulovaná tetracyklinem

A Systém tet-off



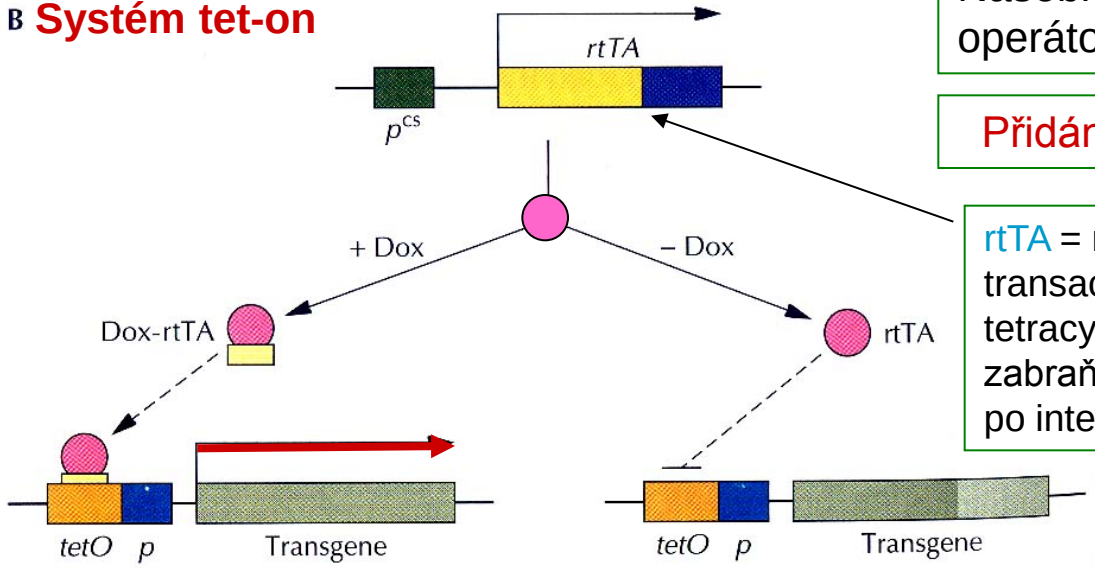
tTA = tetracycline transactivator – hybridní protein složený z tetracyklinového represoru (gen = červená) a transkripčního aktivátoru (gen = modrá)

Přidání Dox vypíná expresi transgenu

Navázání tTA na promotor je nezbytné pro aktivaci transkripce transgenu

Násobné sekvence tetracyklinového operátoru + silný eukaryotický promotor

B Systém tet-on



Přidání Dox zapíná expresi transgenu

rtTA = reverse tetracycline-controlled transactivator systém – nukleotidová sekvence tetracyklinového represoru obsahuje mutaci zabraňující jeho vazbě na tetO; k vazbě dojde po interakci s Dox.

Tetracyklinový systém regulace

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

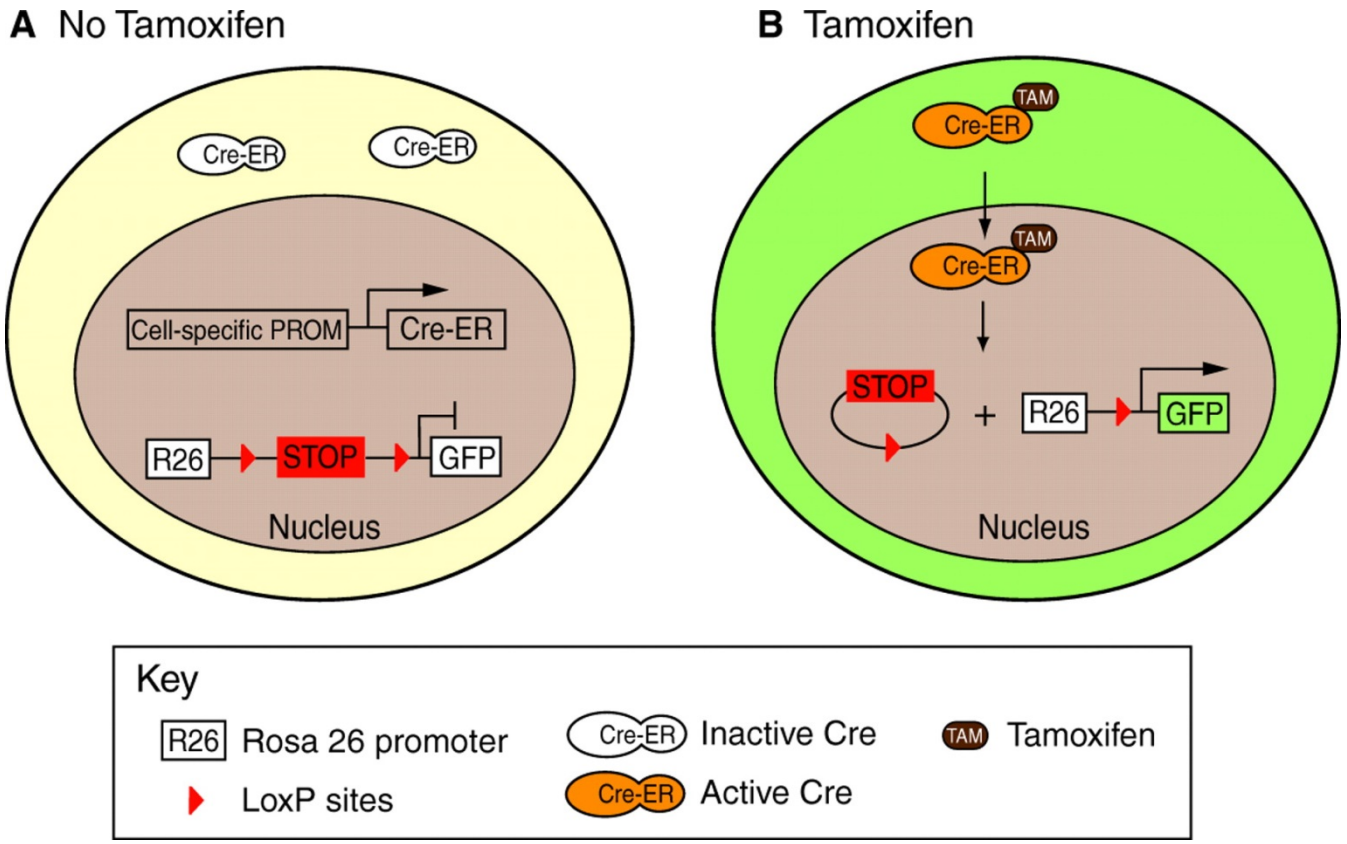
Využití:

- 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 (tTA/rtTA pod buněčně specifickým promotorem)
- Regulace tvorby cre-rekombinázy/flipázy

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

I jiné inducibilní systémy u eukaryot:

- indukce tamoxifenem, ecdysonem, mifepristone …



Hybridní rekombináza s vazebnou doménou estrogenového receptoru

- k aktivaci enzymatické aktivity dochází po vazbě tamoxifenu

Využití transgenů k usmrcování specifických buněčných typů (mikrochirurgické zásahy)

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

Toxiny: difterický toxin, ricin, Pseudomonas exotoxin A, …

Problém: exprese genu pro toxin v okamžiku aktivace endogenu (např. v časné 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.

- obdoba i cytidin-deamináza + 5-fluorocytosin → 5-fluorouracil

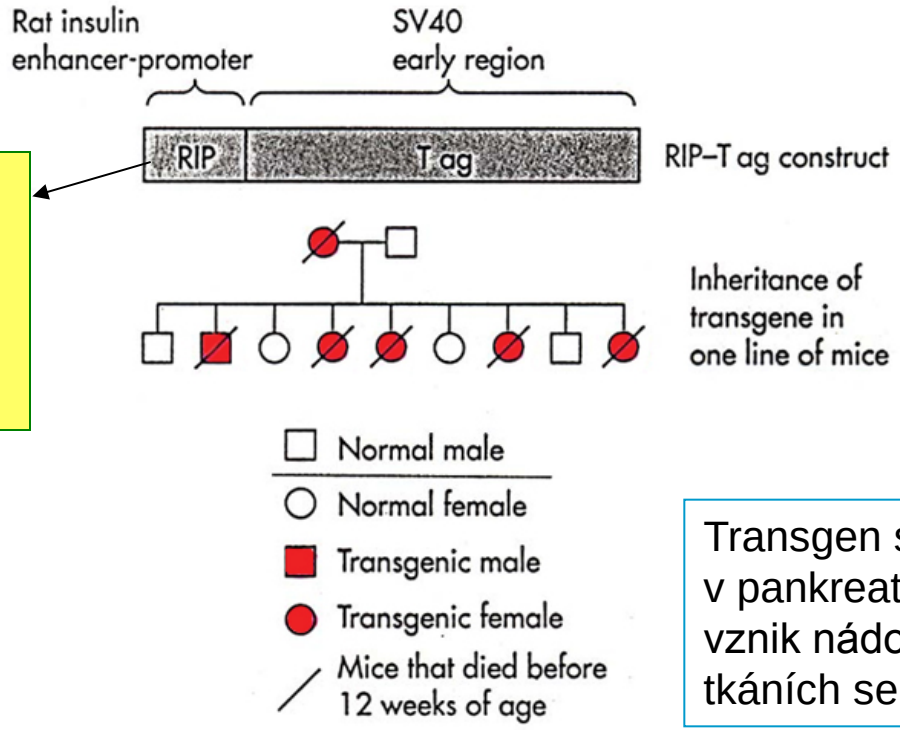
Přehled metod k potlačení exprese genů bez nutnosti vytvářet jejich mutace	
Interference na úrovni RNA	**Interference na úrovni proteinů**
Antisense RNA	Dominant negatives *
Antisense oligonukleotidy	protilátky, intrabodies **
Ribozymy nebo maxizymy	Aptamers, intramers ***
Deoxyribozymes	
Sense RNA (kosuprese)	
dsRNA (RNA interference)	
siRNA (RNA interference)	
miRNA	

* Mutantní forma genu, jehož produkt vytváří spolu s produktem endogenu nefunkční dimer (inaktivní komplex, např. receptor), i DNA-vazebné domény TF

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

***Aptamer: DNA/RNA oligonukleotid vázající se na cílovou molekulu a inhibující jeho aktivitu; peptidový aptamer: peptid vázající se na cílový protein. Intramer: totéž jako aptamer, ale exprimovaný z genu uvnitř buňky

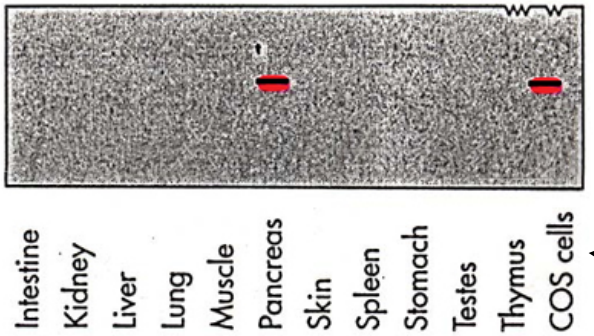
Cílená exprese genu ve specifické tkáni



Řídí tkáňově specifickou expresi klonovaného genu do beta-buněk pankreatu

T-antigen SV40 – významný onkogen – schopnost transformace

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

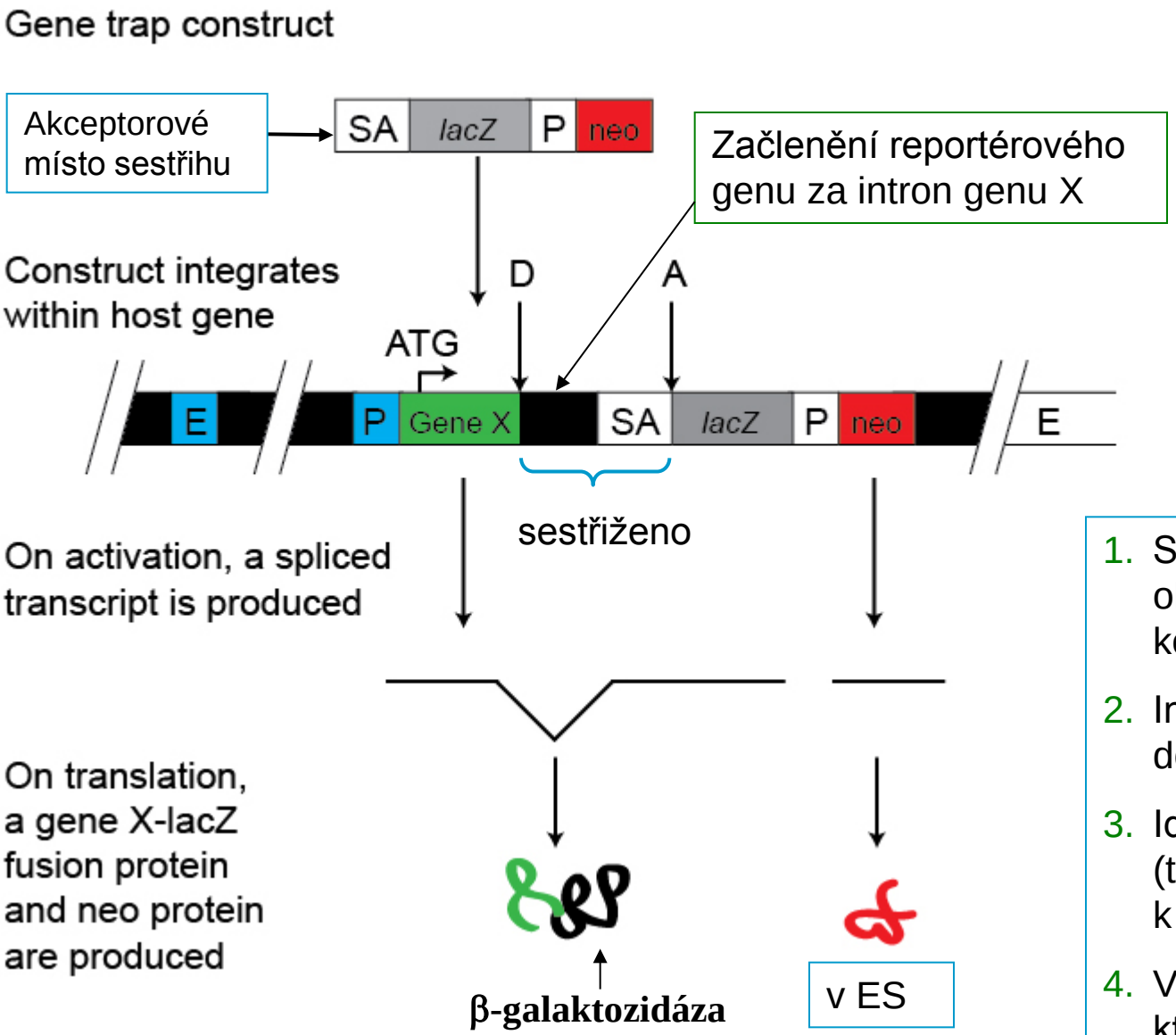


Detekce protilátkou

Konstitutivní tvorba T-ag

Tkáňově specifická exprese transgenu

Transgeny jako reportérové geny pro sledování exprese genů hostitele



1. Selekce 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

Analogie fly-trap systému u Drozofily

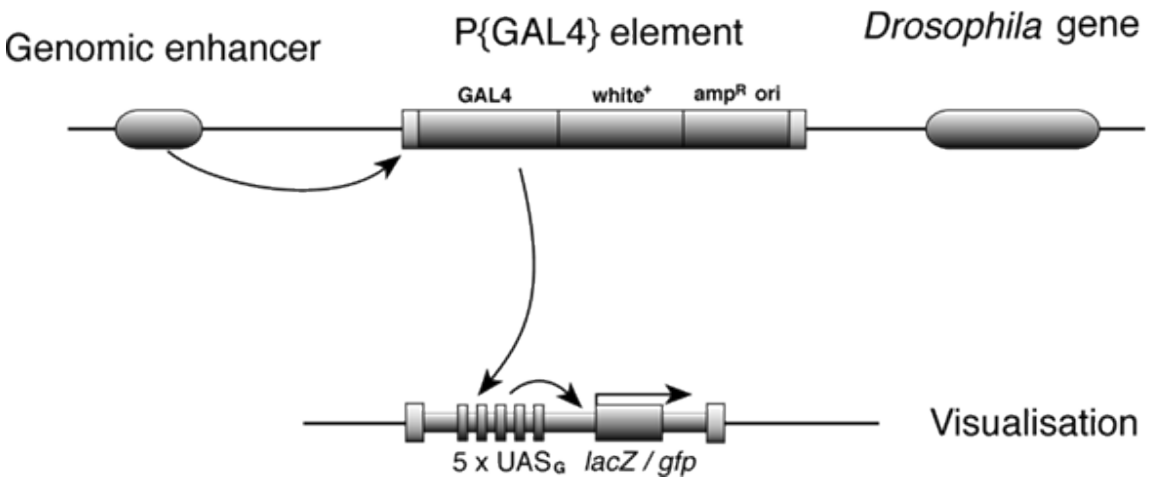
- reportérové konstrukty – P{GAL4} systém - www.fly-trap.org

  - náhodná inzerce GAL4 (kvasinkový TF) – může se dostat pod kontrolu endogenního promotoru/enhanceru

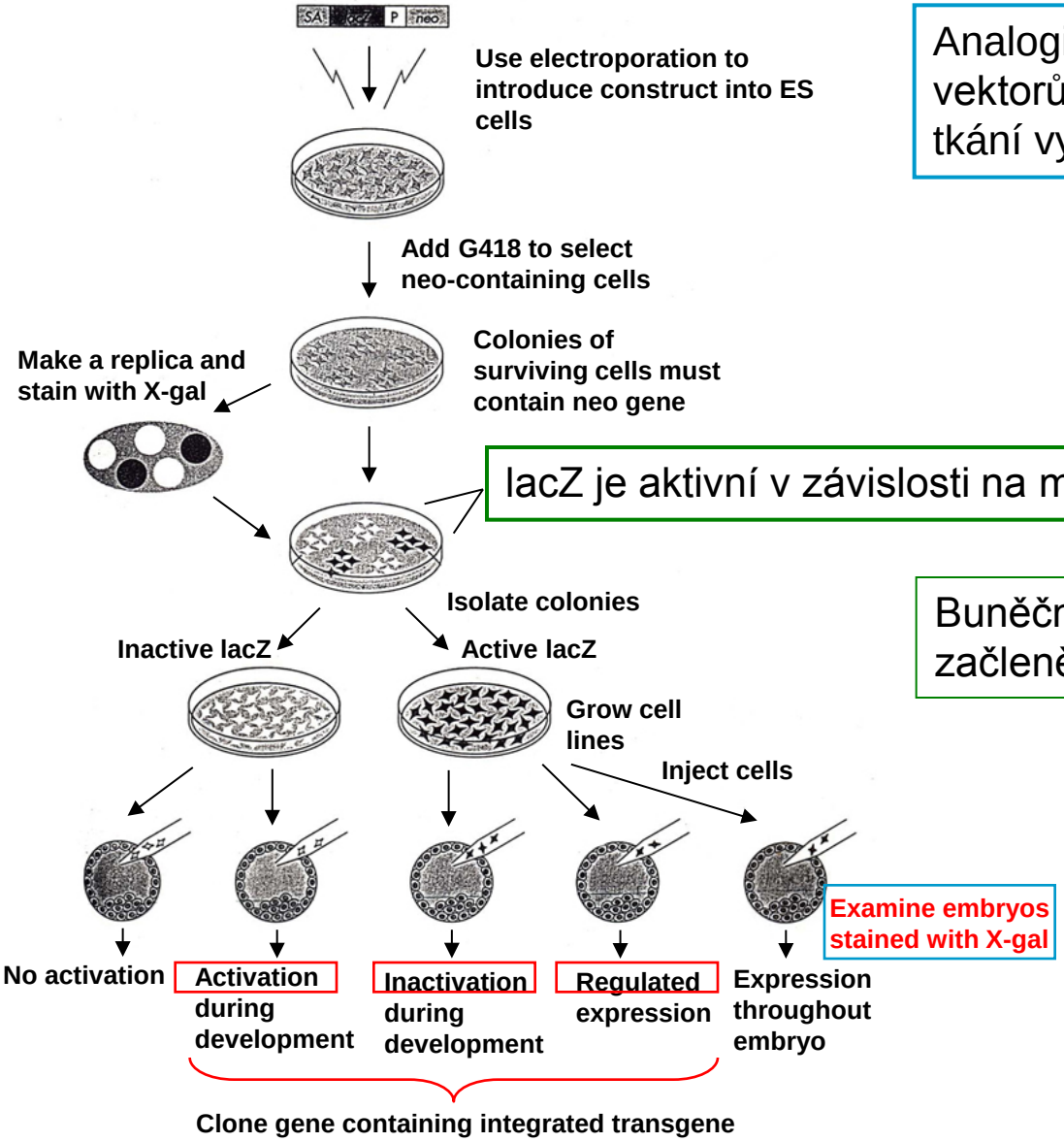
  - místo a čas exprese GAL4 lze studovat po křížení s kmenem, kde exprese reportérového genu (lacZ, GFP) – charakterizace promotoru/enhanceru

    - kdy a kde a za jakých podmínek je aktivní

    - tyto promotory pak využity pro cílenou expresi v určité tkáni v určitém čase



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

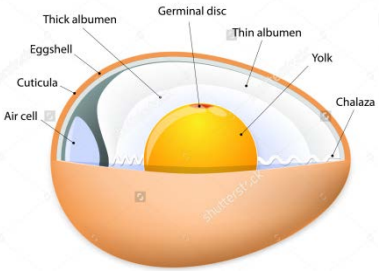
Buněčná linie obsahující transgen (lacZ) začleněný v konkrétním místě (genu)

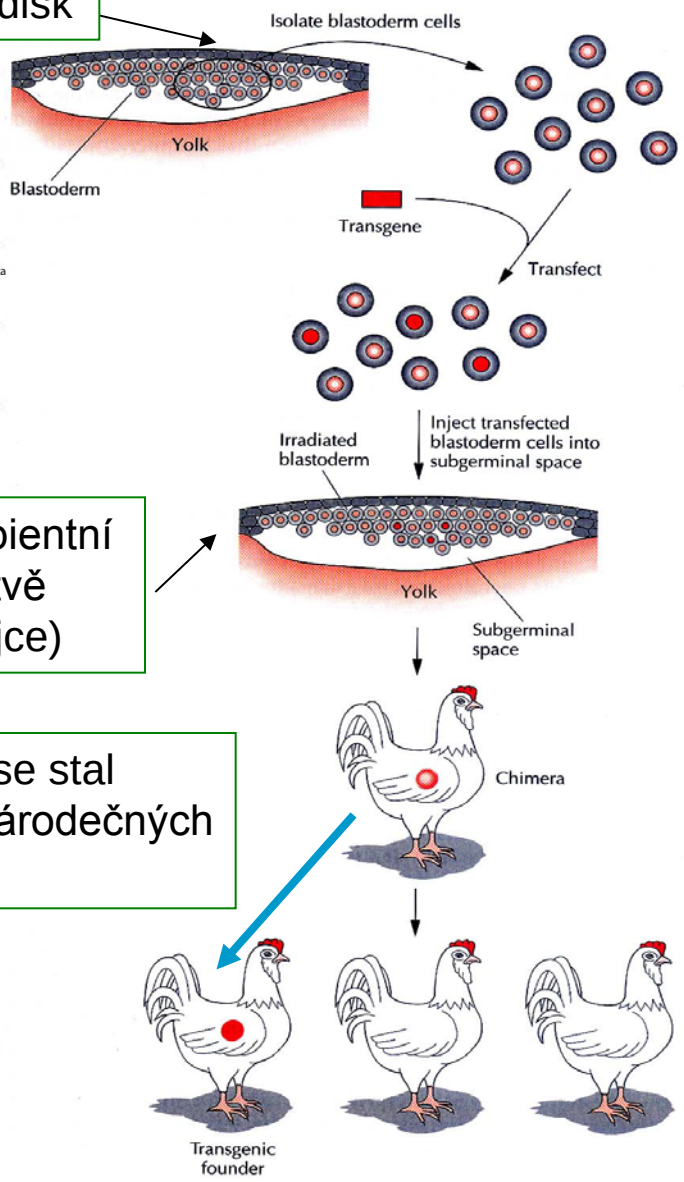
Sledování exprese genu během vývoje embrya

Inzerční inaktivace genů vede k pozměněným fenotypům, izolace těchto genů

Příprava transgenních ptáků

germinální disk





Ozářené recipientní embryo (čerstvě nakladené vejce)

Transgen se stal součástí zárodečných buněk

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

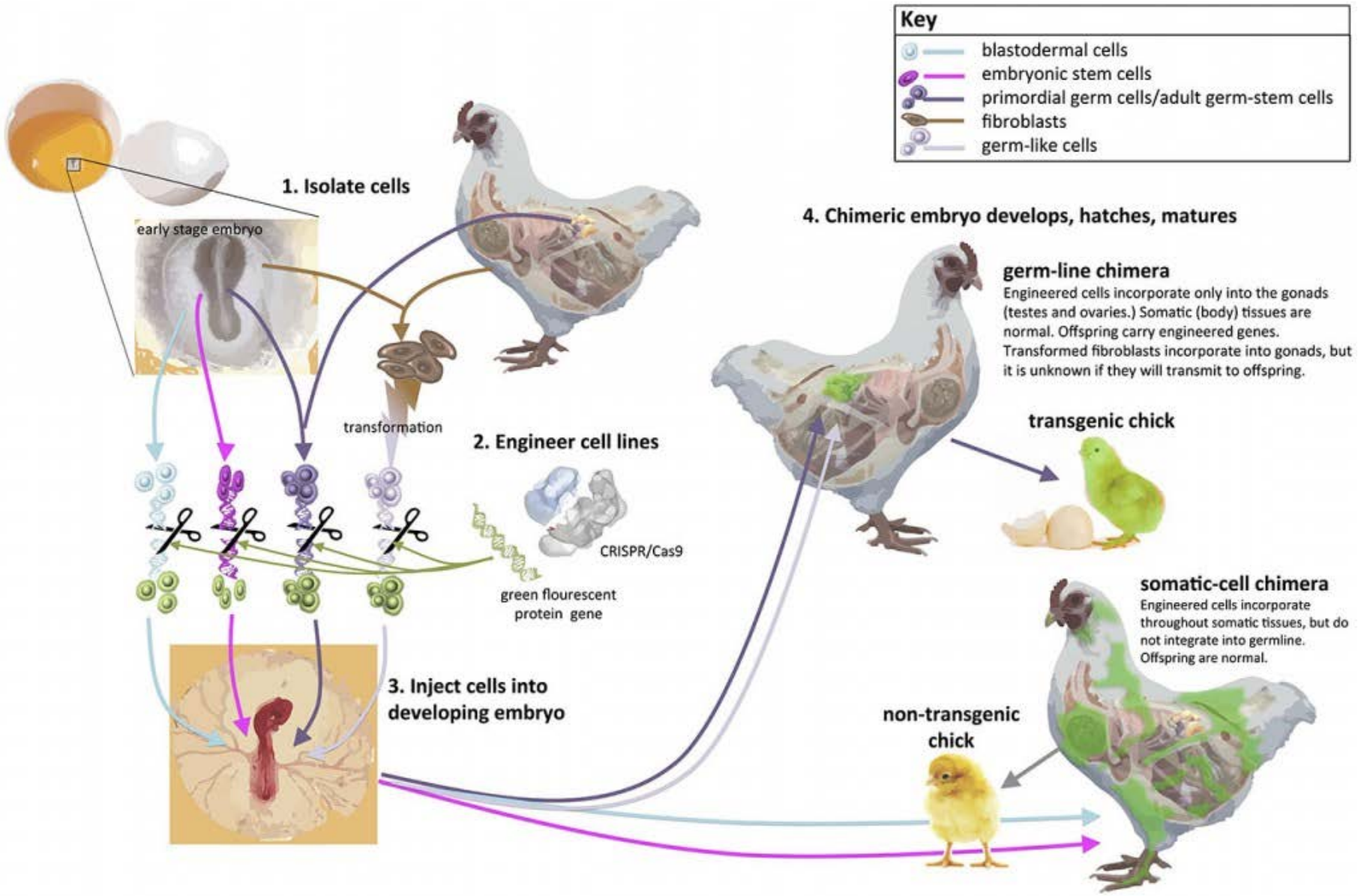
Cíle transgenoze u drůbeže

Odolnost proti virovým a bakteriálním chorobám, proti kokcidióze

Nižší obsah tuku a cholesterolu ve vejcích, vyšší kvalita masa

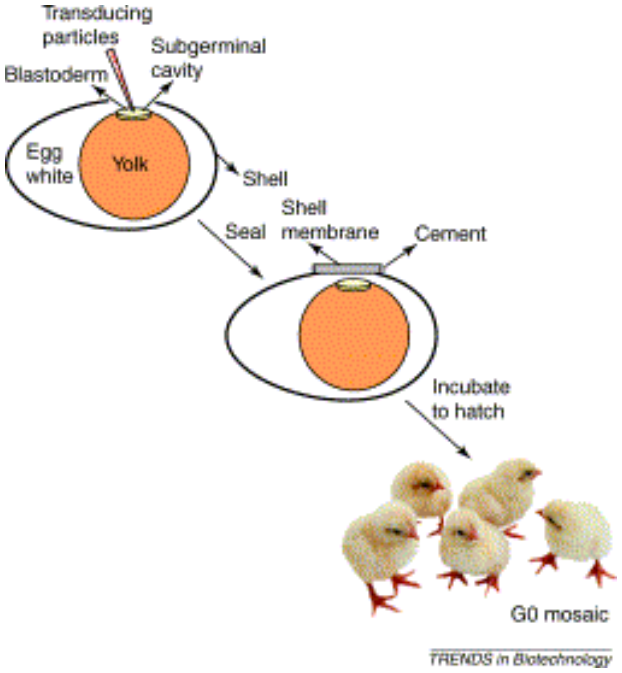
Příprava rekombinantních proteinů: monoklonální protilátky, růstový hormon, inzulin, HSA, interferon, lysozym

Methods of creating transgenic birds



Příprava transgenních ptáků

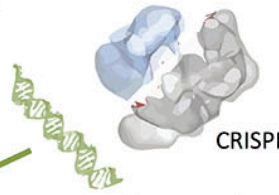
- i postupy s infekcí blastodermu retroviry
- případně i infekce časného embrya (12-14 den)



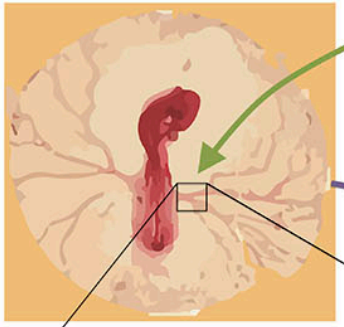
- nelze z bezpečnostních důvodů aplikovat při produkci drůbeže pro jídlo

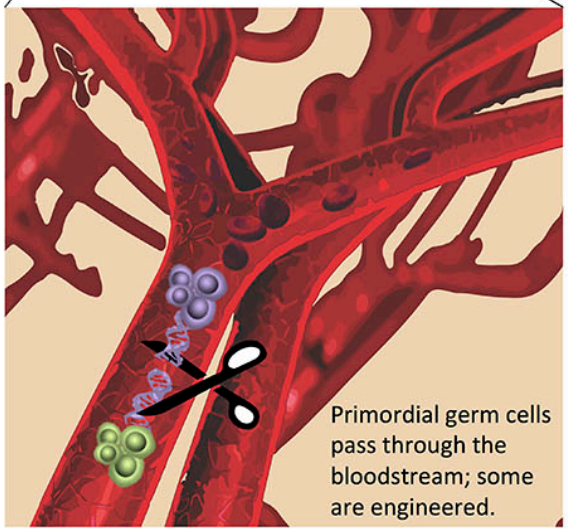
A new method of creating transgenic birds

1. Inject engineering complex into developing embryo's bloodstream.

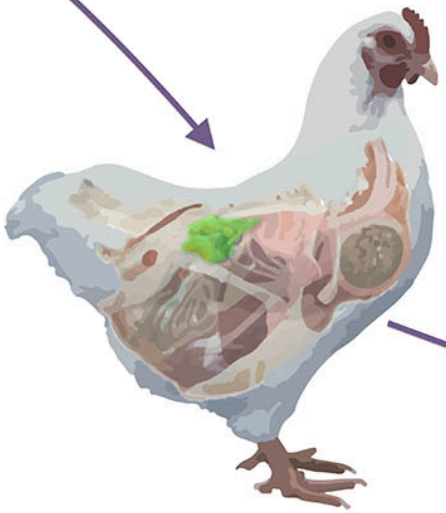


green flourescent protein gene



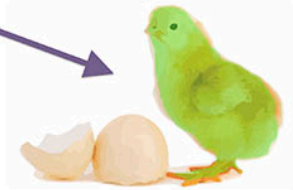


2. Chimeric embryo develops, hatches, matures



germ-line chimera
In this chimera, a portion of the sperm or eggs carry the engineered genes. These genes are passed on to offspring.

transgenic chick



Primordial germ cells – migrují krví do gonád

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 redukují toxicitu některých rostlin (rozšíření potenciálu krmiv)
- Drůbež s pozměněnými trávicími schopnostmi (celulóza, lignin, tuky)
- Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu ve vejcích (antibakteriální účinky - využití v průmyslu (vejce déle vydrží) a farmakologii)
- Ovce s vylepšenou srstí
- Myši s pozměněnými nebo inaktivovanými geny
  - studium lidských genetických poruch: neurodegerativní, 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 transfůze, 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, osteoartritis, s receptory pro viry /HIV/ a řada jiných.
- Modifikace trávicích enzymů savců
  - Příprava myší, které depolymerizují celulózu v tenkém střevě – nepřežvykující savci schopni trávit celulózu.
- Transgenní kmeny myší - „pomalejší stárnutí“ – dlouhověkost
- Fosfoenolpyruvátkarboxykináza (PEPCK-C) – vyšší metabolická aktivita, vyšší aktivita (pořád běhají), rodí i v pozdním věku, žijí déle …

Ovce, myš – KO prionového genu

Myši – knokaut genu pro myostatin (chybění myostatinu vede k růstu svalů) – belgický modrý skot (mutace v genu pro myostatin), 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, kyselé deště)
  - rezistentní vůči chorobám
  - zvýšení přírustku ryb zavedením genu pro chimerický všeobecný růstový hormon (losos – 13-ti násobné přírustky 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 lose of plasminogen activator gene

altered muscle growth and movements from disrupted neurotrophin 3 receptor gene

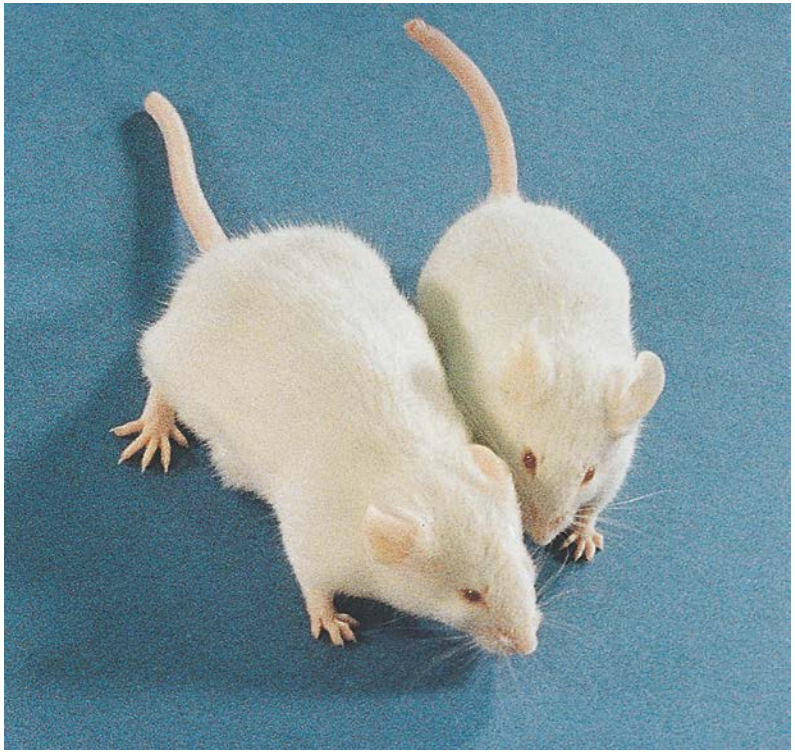
altered spleen development from changing the homeobox gene Hox11 - this gene controls the genesis of the whole spleen, one gene one organ?

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 targetted 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

Transgenní myš (vlevo) obsahující gen pro lidský růstový hormon



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§

Pěstování ryb v akvalkulturách

Kapr, losos, siven, tilapia (okonouvec)

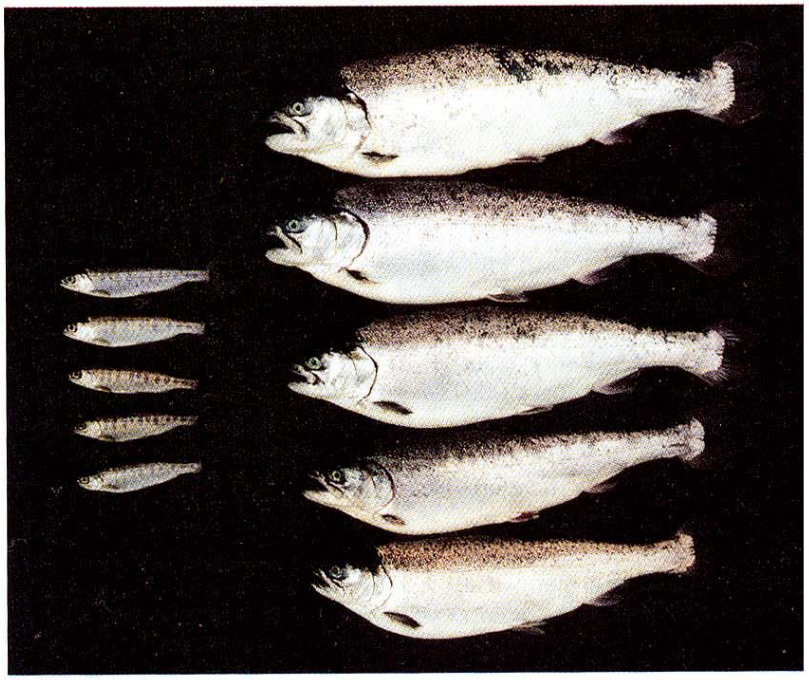
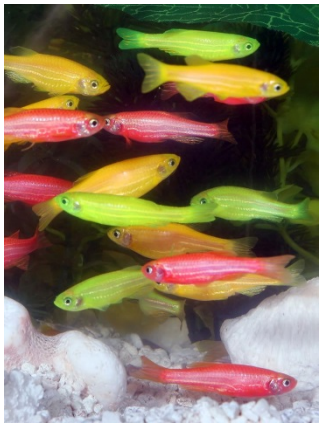


Figure 11.18 Normal coho salmon (left) and genetically engineered coho salmon (right) containing a sockeye salmon growth-hormone gene driven by the regulatory region from a metallothionein gene. The transgenic salmon average 11 times the weight of the nontransgenic fish. The smallest fish on the left 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 (elektroporací, liposomy, pomocí samčích pohlavních buněk) přenesena DNA, zisk chimerické ryby, pak křížení transgenních ryb – ustavení transgenních linií ryb

Růstový hormon (all-fish n. all- salmon) – rychlejší růst

Využití



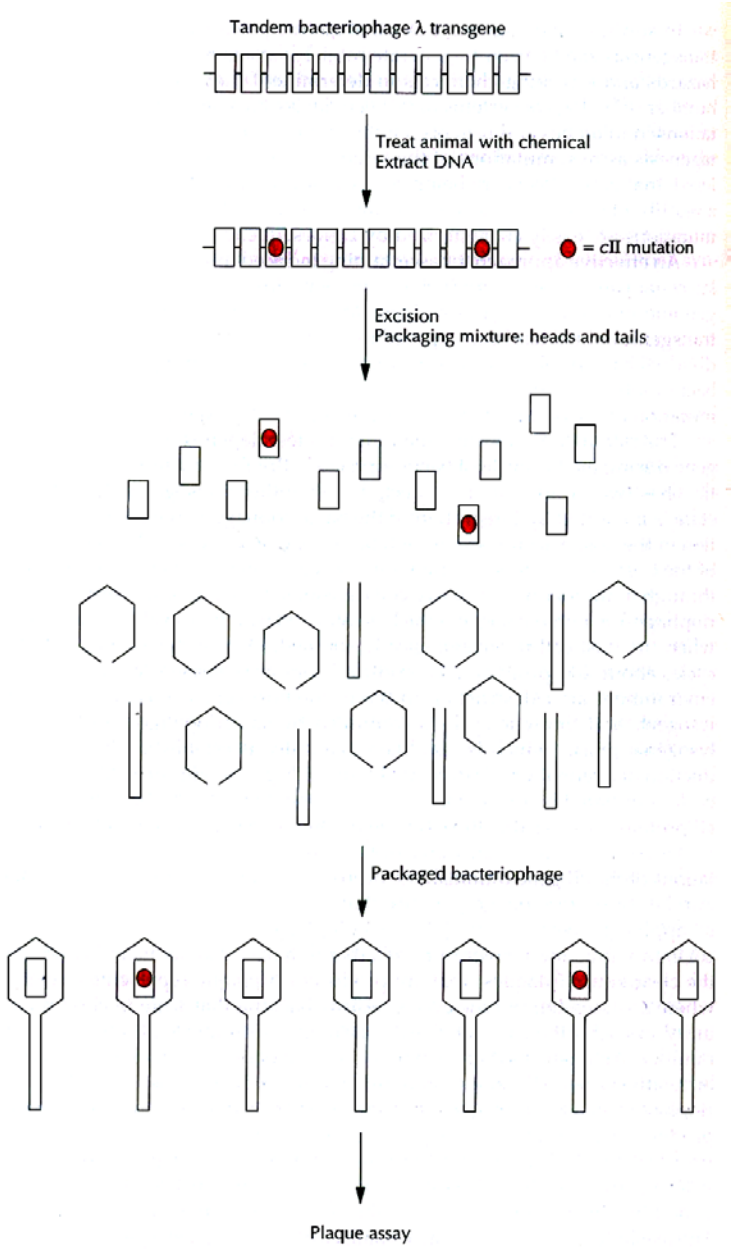
GloFish – exprese různých barevných proteinů

AquAdvantage losos – schválen FDA 2015 pro komerční produkci a konzumaci (růstový hormon)

Sledování znečištění prostředí

- luc gen pod kontrolou promotorů aktivovanými těžkými kovy
- sledování mutageních látek v prostředí (mutace v transgenech lacl, cII, …)

Mutageneze *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 fágy bez mutací v cII.

Jiný systém testování mutagenů na transgenních rybách používá plazmidový transgen zodpovědný za citlivost k antibiotikům jako cíle 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 něž bylo a nebo nebylo působeno mutagenem) odráží sílu mutagenu.**

Zvířata jako živé továrny („animal farming“)

pharming

Promotor genu pro lactoglobulin – produkce transgenu v mléce

Příklady látek vytvářených v transgenních zvířatech

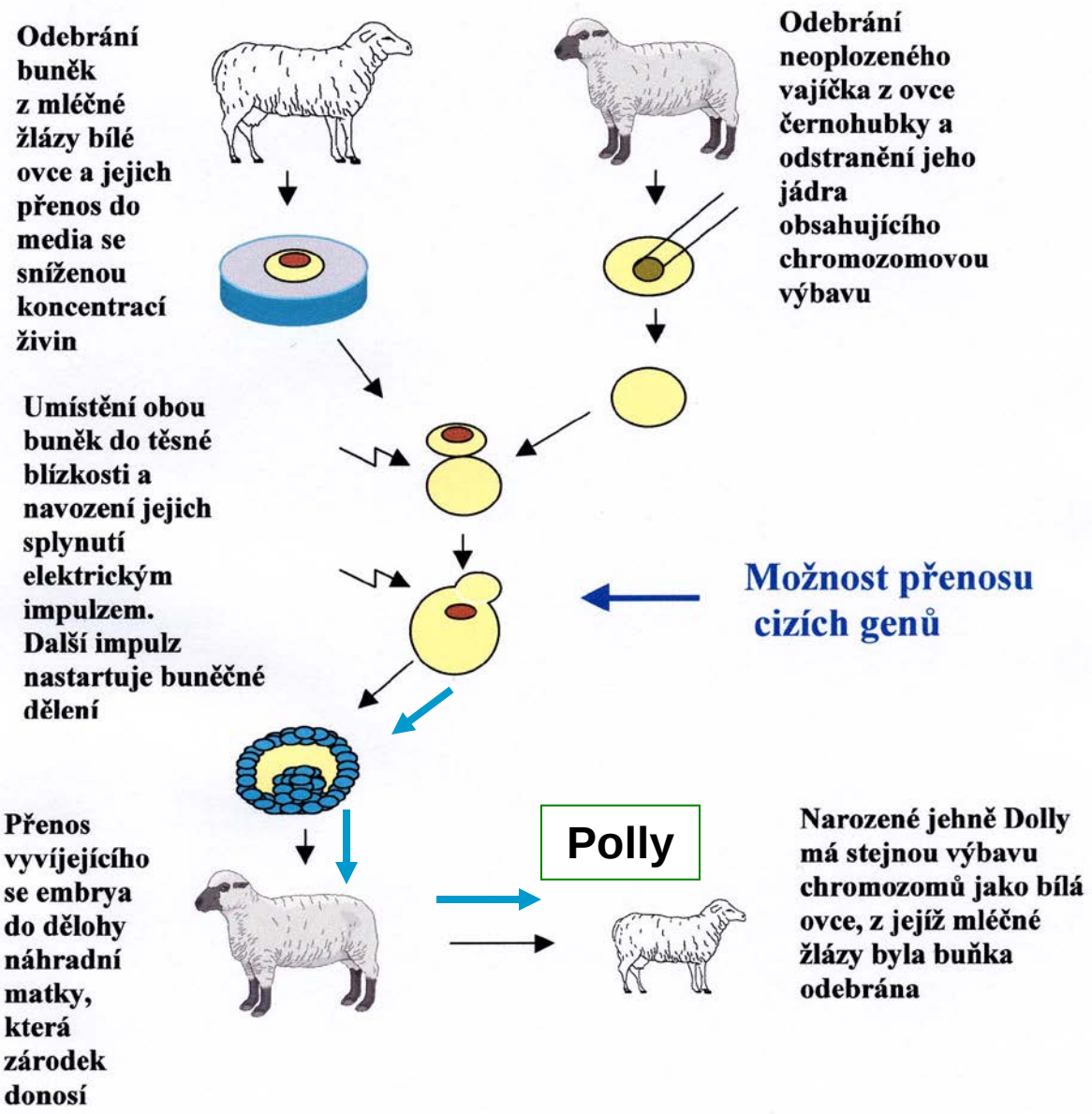
Zvíře	Látka	Využití
ovce	Alfa-1-antitrypsin	Léčba rozedmy plic
koza	Tkáňový aktivátor plazminogenu	Rozpouštění krevních sraženin
ovce	Faktor pro srážení krve VIII, IX	Navození srážení krve
prase	hemoglobin	Náhražka krve při transfúzi
koza	Lidský růstový hormon	Léčba nanismu
ovce, myš	Regulátor CFTR	Léčba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

koza – protein pavoučího vlákna v mléce, atp.
kráva – lysozym nebo lysostafin v mléce

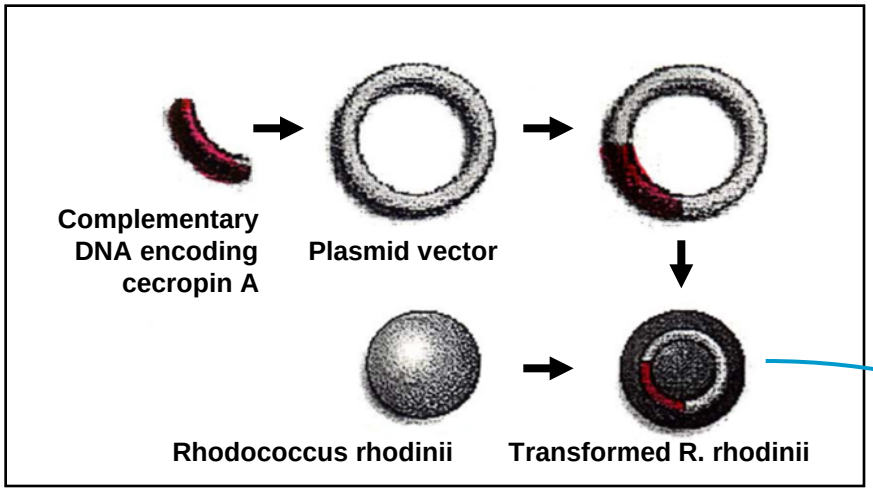
New genes introduced into farm animals to alter growth chatacteristics

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 termina 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 termina repeat	Chicken SKI
Cow	Chicken skeletal actin promoter	Human insulin-like growth factor I

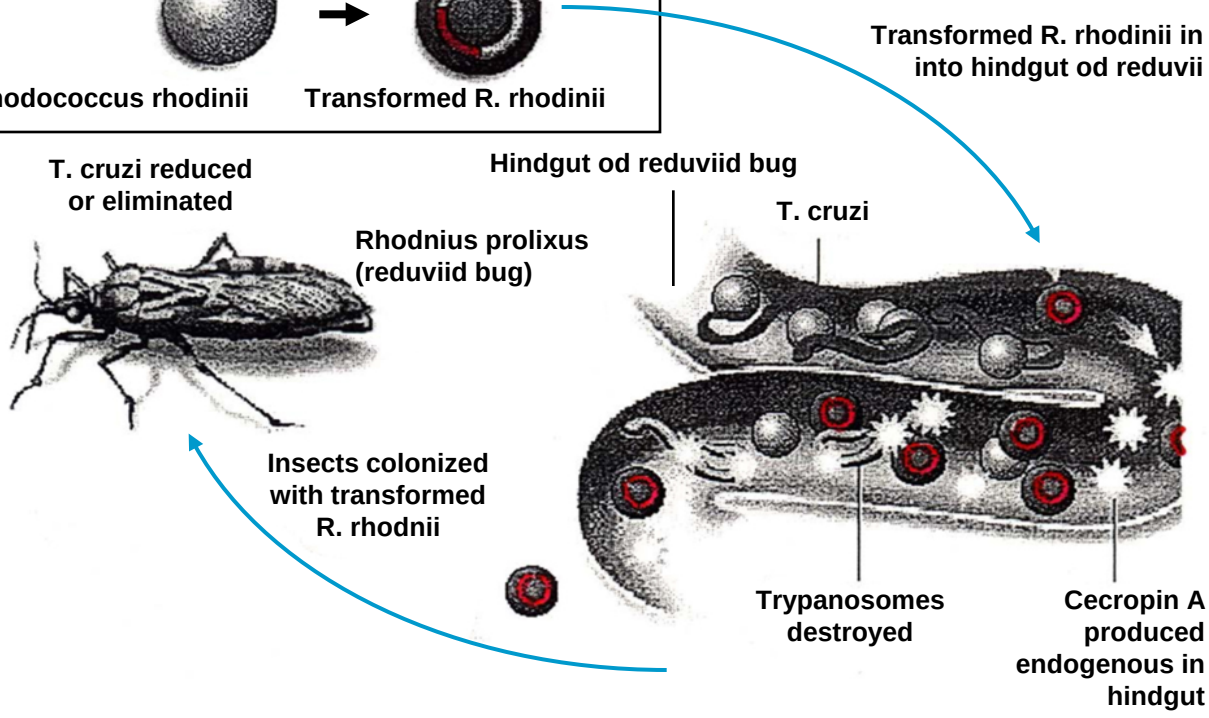
Klonování savců



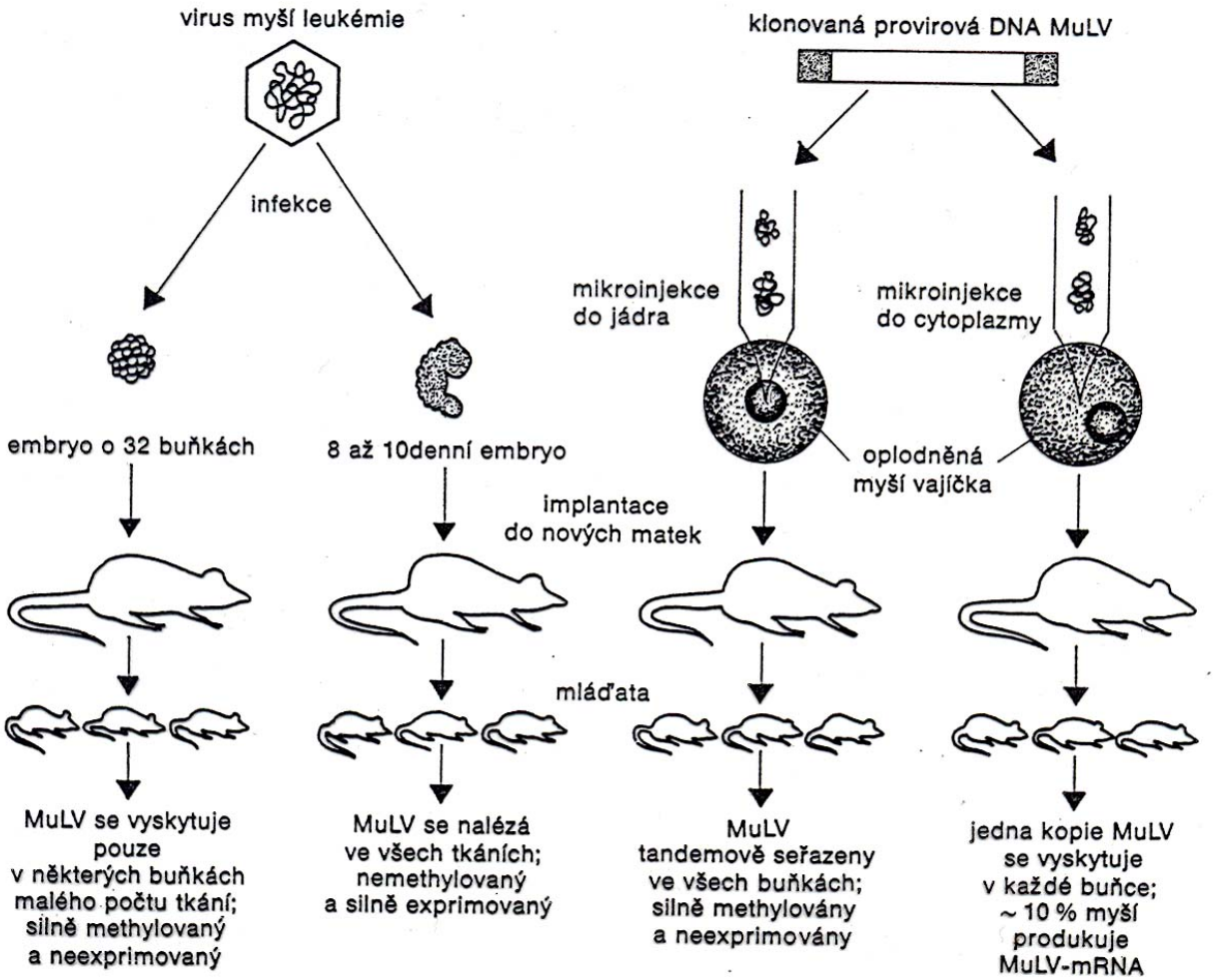
Transgenní bakterie (Rhodococcus) produkující toxin (cekropin) usmrcující trypanozomy ve střevě ploštic



Cekropiny – polypeptidy s antibakteriálním účinkem z hmyzu (složka imunity)



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

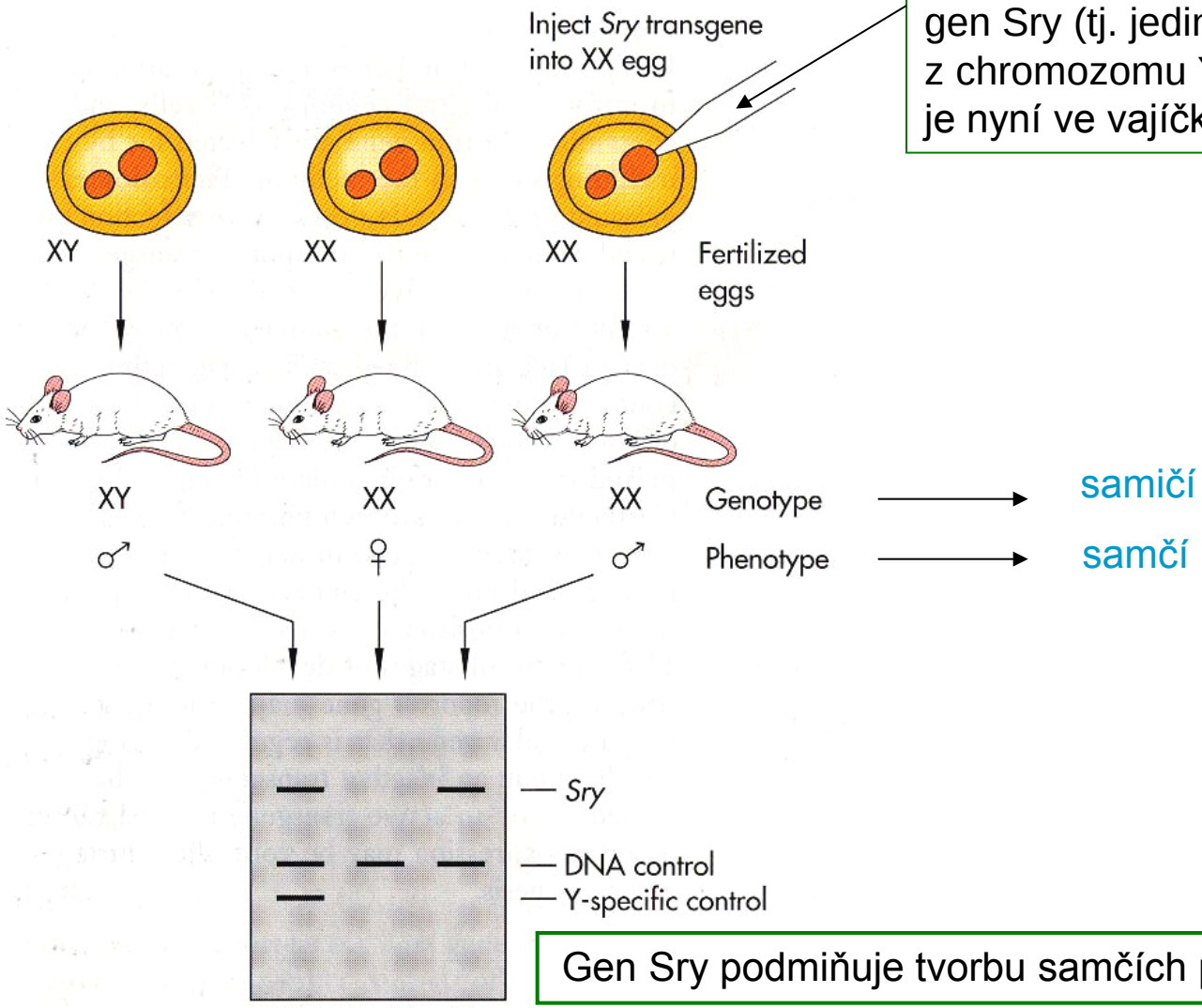


Mozaikovitost, 1 kopie integrovaná v různých místech	Virus působí jako infekční agens	20-40 kopií v jednom chromozomu	Tkáňově specifická exprese

Analýza sexuální determinace – funkce genu sry

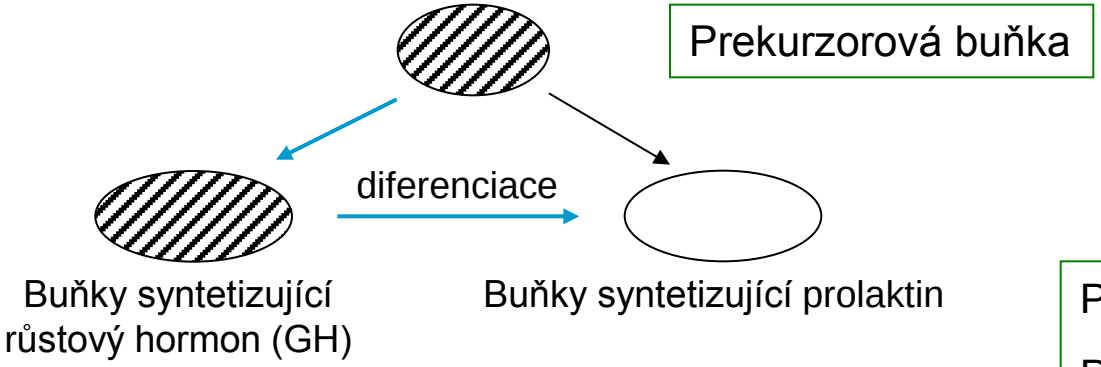
1. Lokalizace genu Tdy (Sry) na chromozomu
2. 2. Klonování genů z oblasti Tdy

14 kb fragment nesoucí gen Sry (tj. jediná DNA z chromozomu Y, která je nyní ve vajíčku)



Gen Sry podmiňuje tvorbu samčích pohlavních orgánů

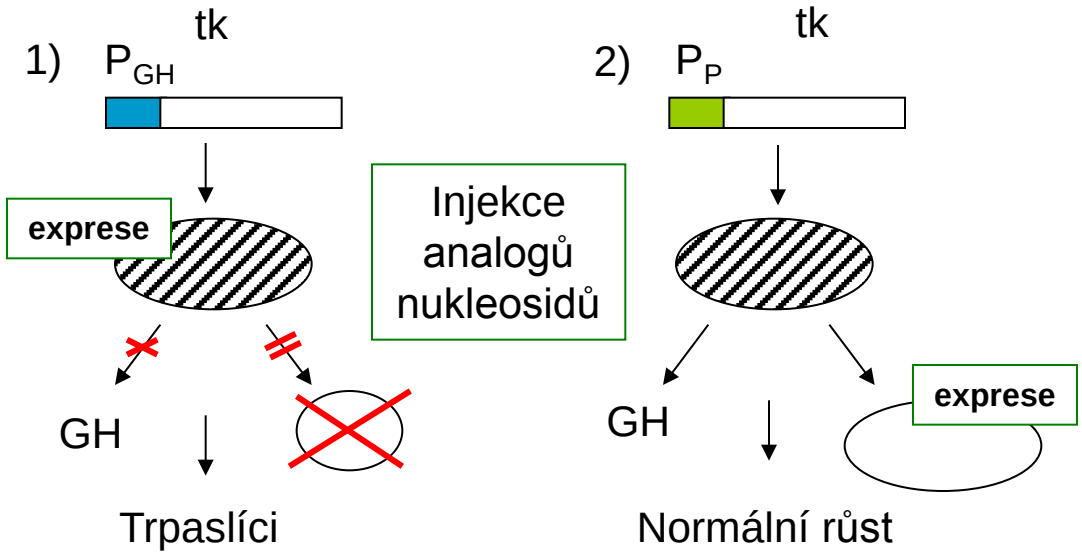
Objasnění vývojových vztahů mezi buňkami hypofýzy



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