

Zakaj GS živali?

Izboljšujemo lahko proizvodnjo mleka, značilnosti volne, hitrost pridobivanja teže, nesnost. Z vnosom genov, ki stimulirajo rast, bo žival zrasla hitreje in do zakola pojedla manj krme kot izhodiščna žival.

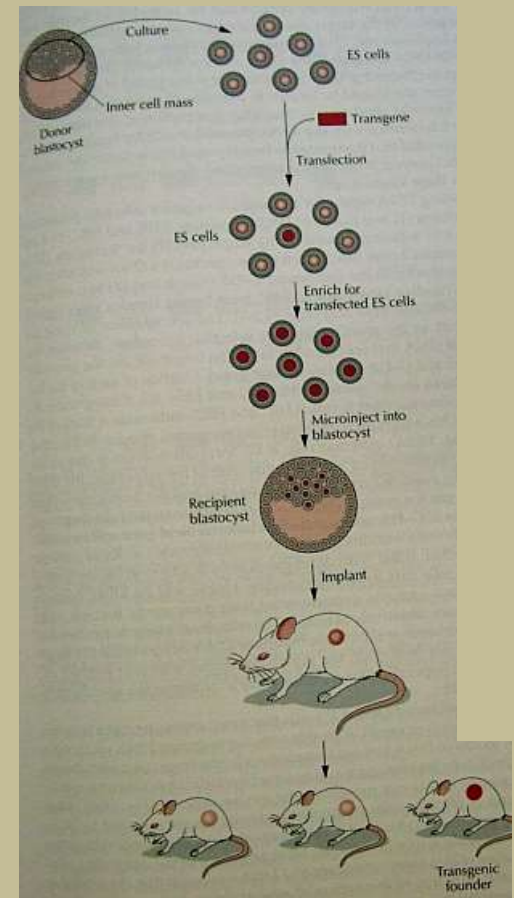
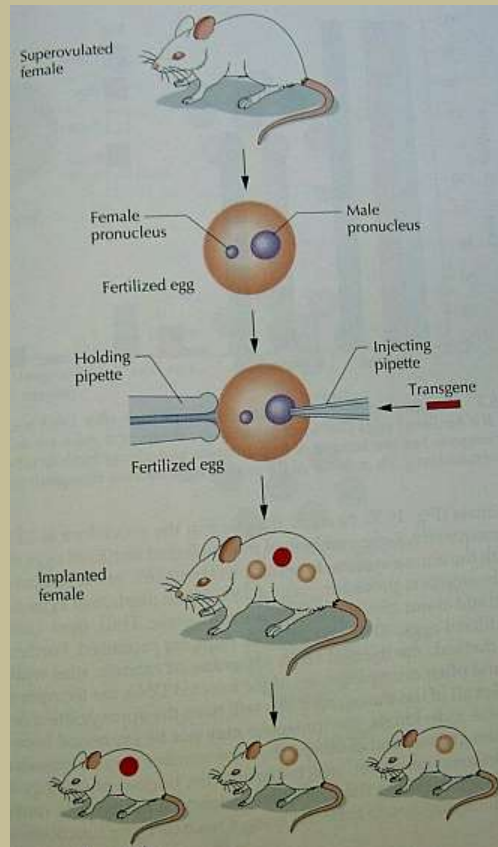
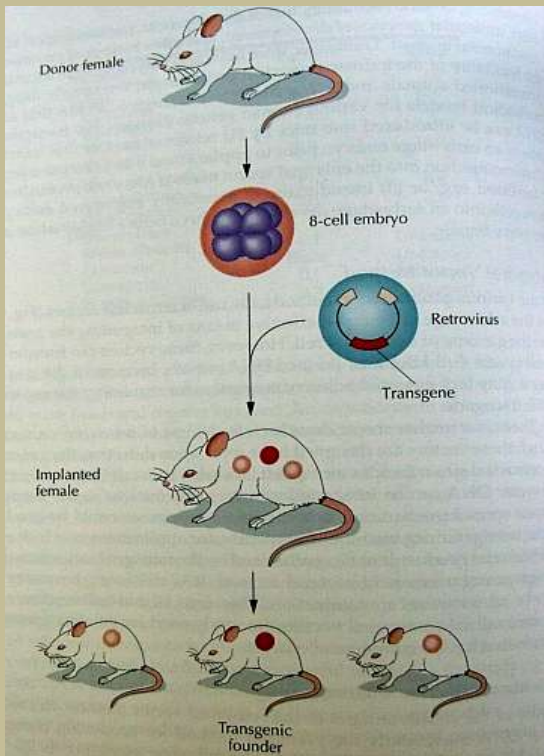
Pri raziskavah enako tehnologijo izkoriščamo za analizo izražanja genov in pripravo živalskih modelov humanih bolezni.

Možno je tudi pridobivanje farmacevtsko pomembnih proteinov v mleku ('pharming'). Izločanje proteina v mleko načeloma ne vpliva na ostale fiziološke procese, količina proteina je lahko velika, izolacija pa enostavna zaradi malo različnih proteinov, ki jih sicer vsebuje mleko.

Novo lastnost uvedemo preko transgena, najpogosteje s homologno rekombinacijo na tarčno mesto v genomu → transgeneza.

Trije osnovni pristopi za pripravo Tg živali:

- s pomočjo retrovirusov
(inficirajo zgodnji embrij pred vnosom v samico)
- z mikroinjiciranjem gena v moško projedro oplojenega jajčeca
- z vnosom genetsko spremenjenih embrionalnih izvornih celic v embrio pred implantacijo v samico



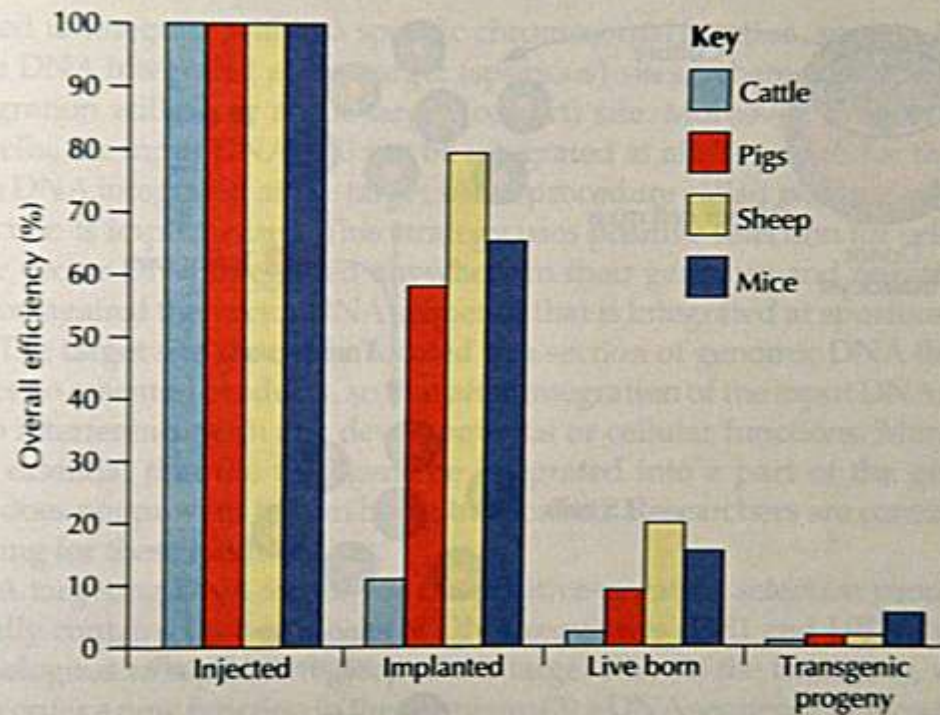
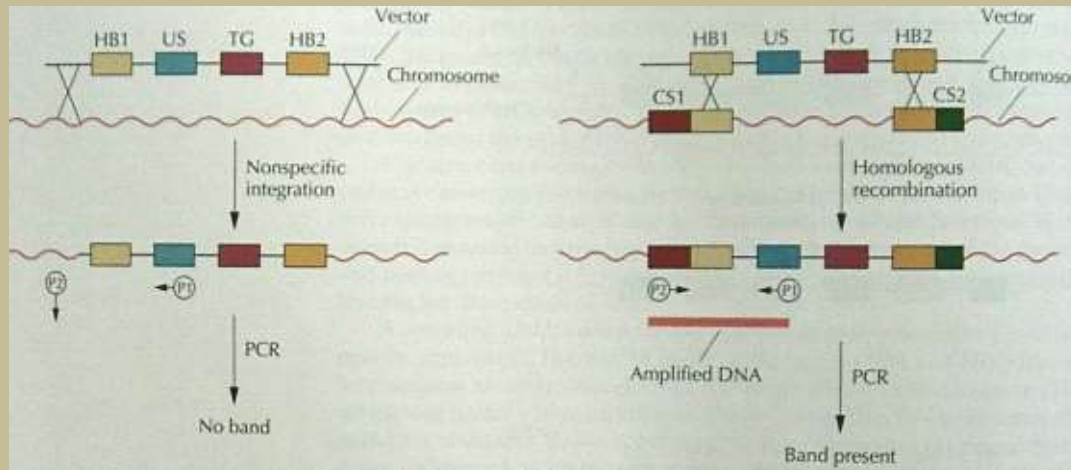


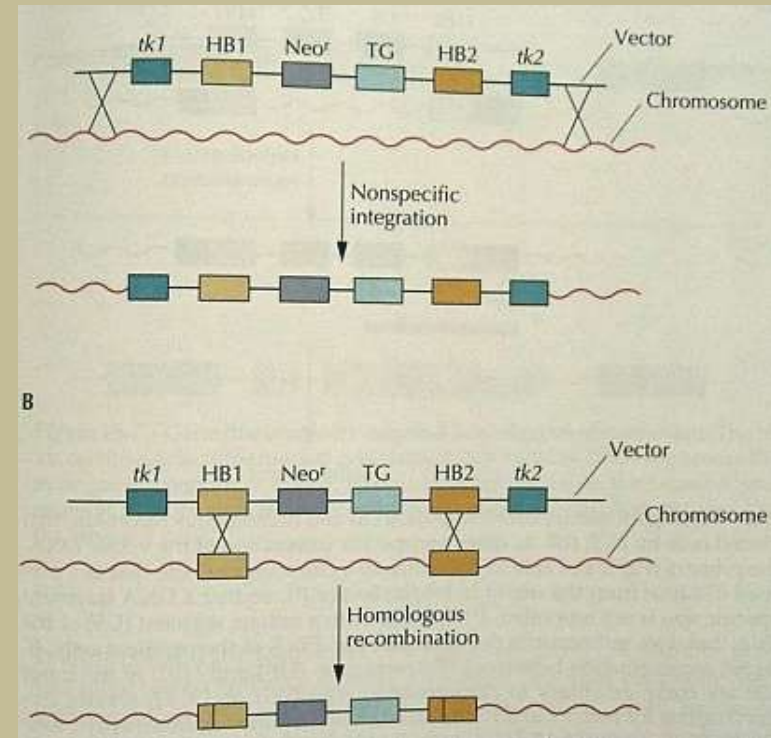
Figure 19.3 Overall efficiency of the transgenesis process after DNA microinjection. All the fertilized eggs (100%) of cattle, pigs, sheep, and mice are inoculated with a transgene, but the success of implantation and giving birth to offspring is much lower, and only 5% or fewer of the treated eggs become transgenic progeny.

Uspešnost transgeneze:

- analiza specifičnosti vgradnje (PCR)



- pozitivno-negativna selekcija



Izbijanje genov

Npr. inaktivacija gena za (rod)opsin pri miših privede do razvoja nefunkcionalnih paličnic v mrežnici, kar je podobno kot pri bolezni retinitis pigmentosa pri človeku.

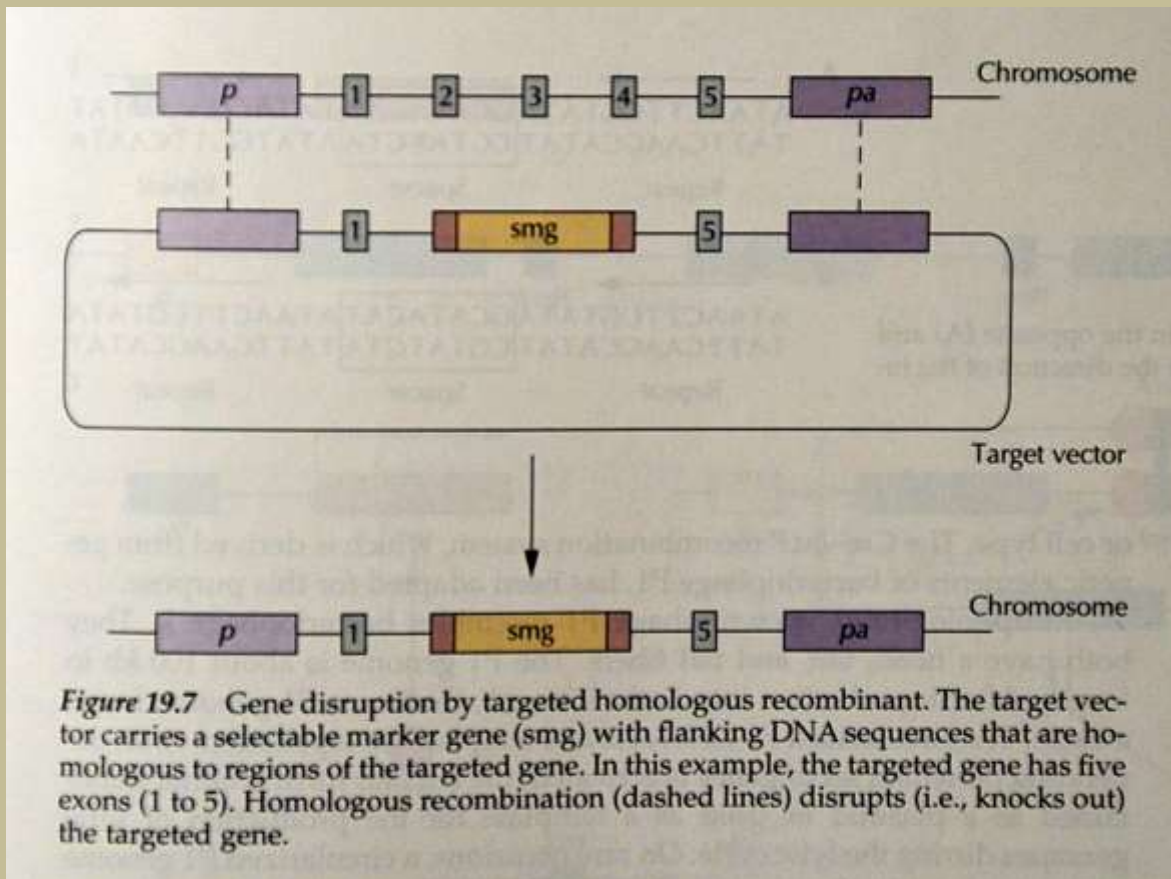
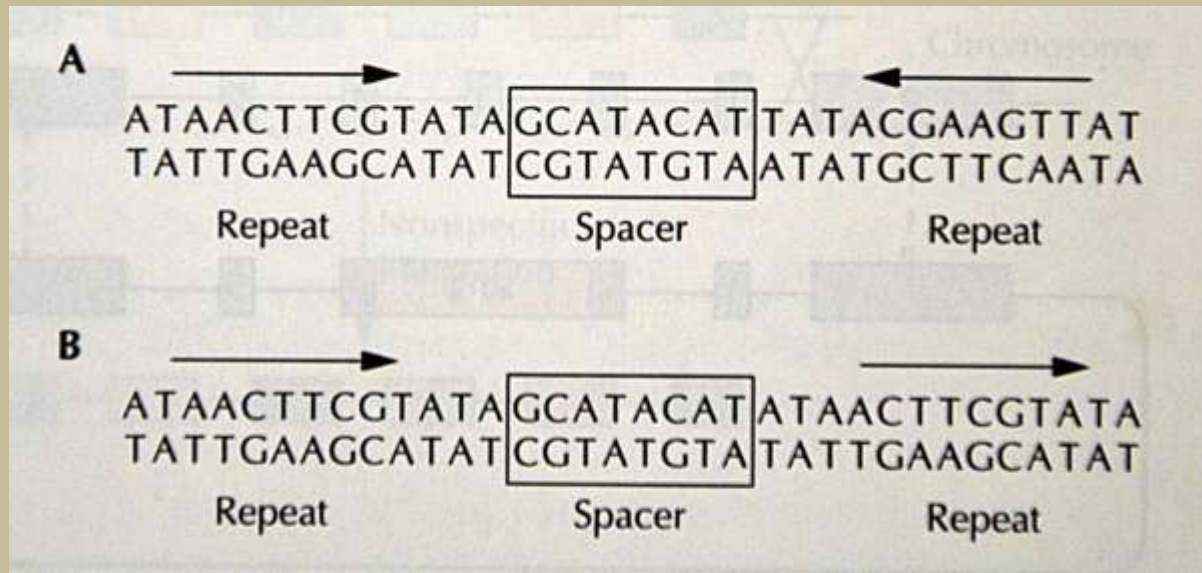
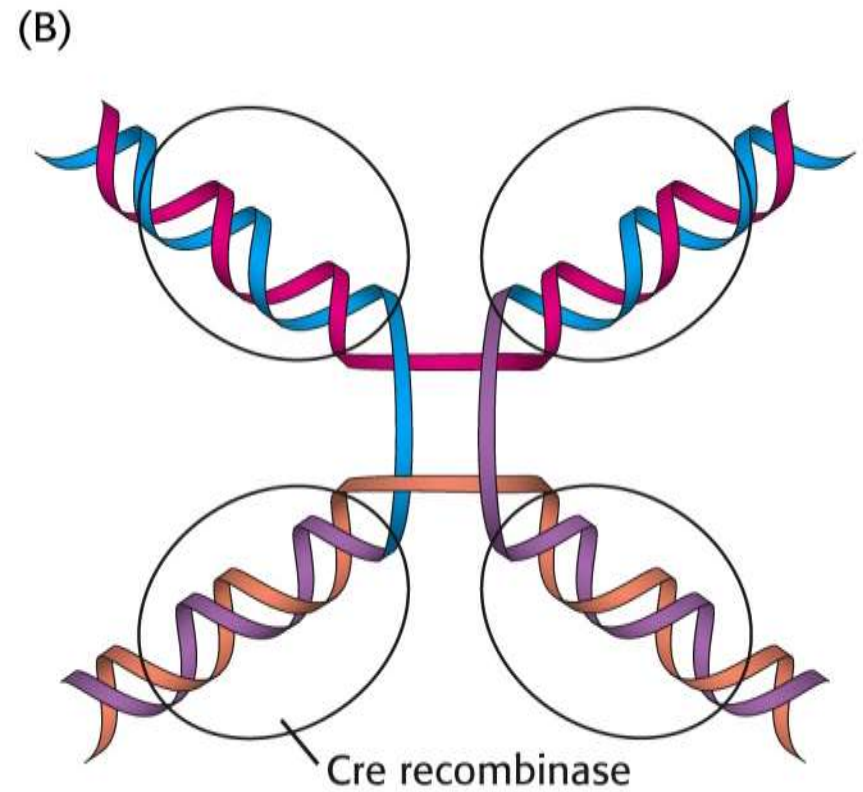
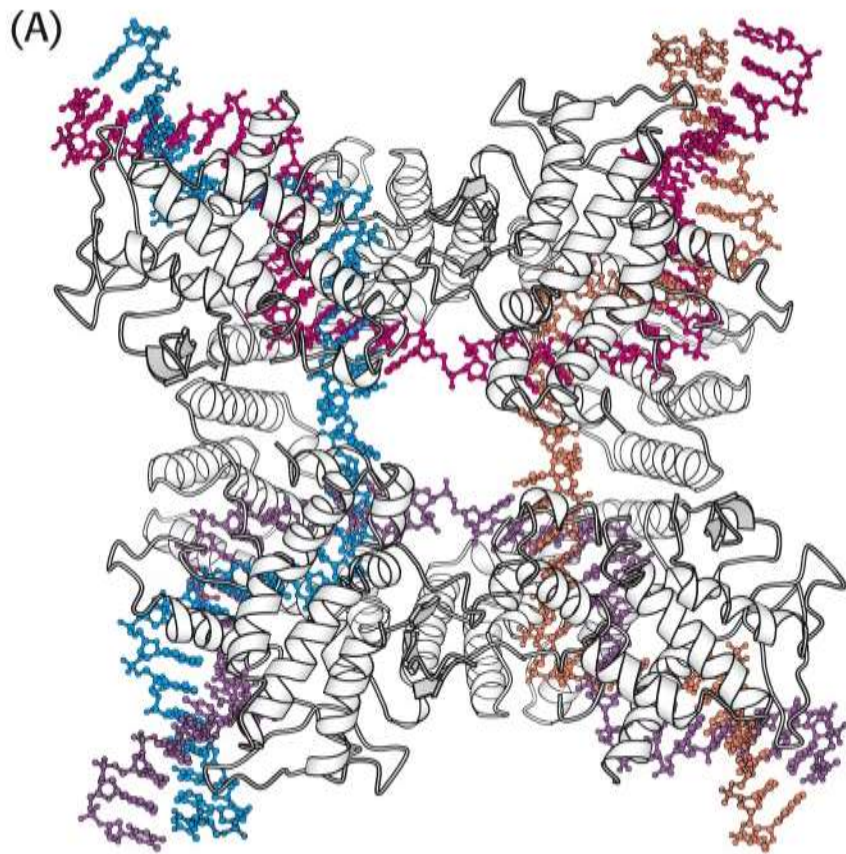


Figure 19.7 Gene disruption by targeted homologous recombination. The target vector carries a selectable marker gene (*smg*) with flanking DNA sequences that are homologous to regions of the targeted gene. In this example, the targeted gene has five exons (1 to 5). Homologous recombination (dashed lines) disrupts (i.e., knocks out) the targeted gene.

Genetsko spreminjanje z rekombinacijskim sistemom Cre - lox

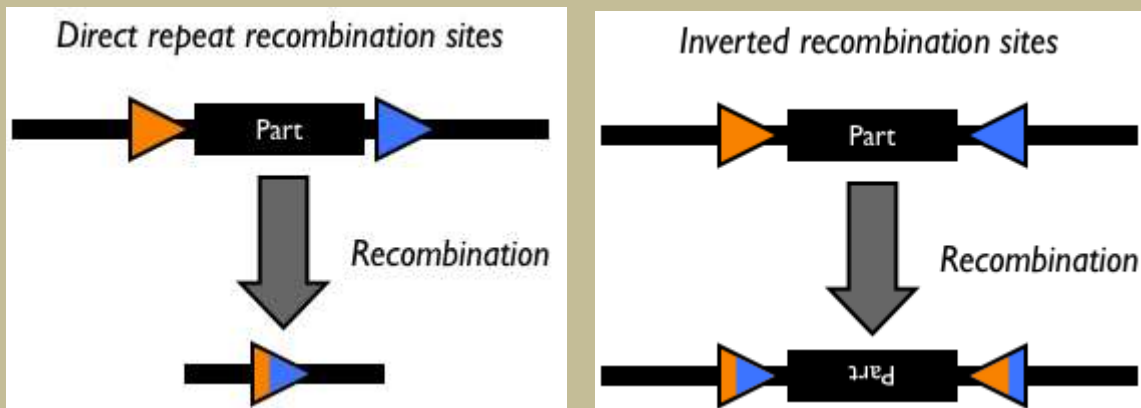
Tg miši praviloma izražajo transgen v vseh svojih tkivih, kar pa ni vedno smiselno. Rešitev ponuja sistem Cre – lox, ki je izveden iz bakteriofaga P1. Ta fag v citoplazmi lahko vzdržuje krožno obliko (kot plazmid), ki se z aktivacijo določenih promotorjev aktivira in začne proizvajati kopije, ki se v litičnem ciklu pakirajo v proteinske ovoje. Alternativno pa se fag lahko integrira v genom okužene bakterijske celice ob delovanju rekombinaze Cre, ki cilja tarčna mesta loxP. Ta sestavljata po dve ponovitvi 13 bp z 8 bp dolgim distančnikom.





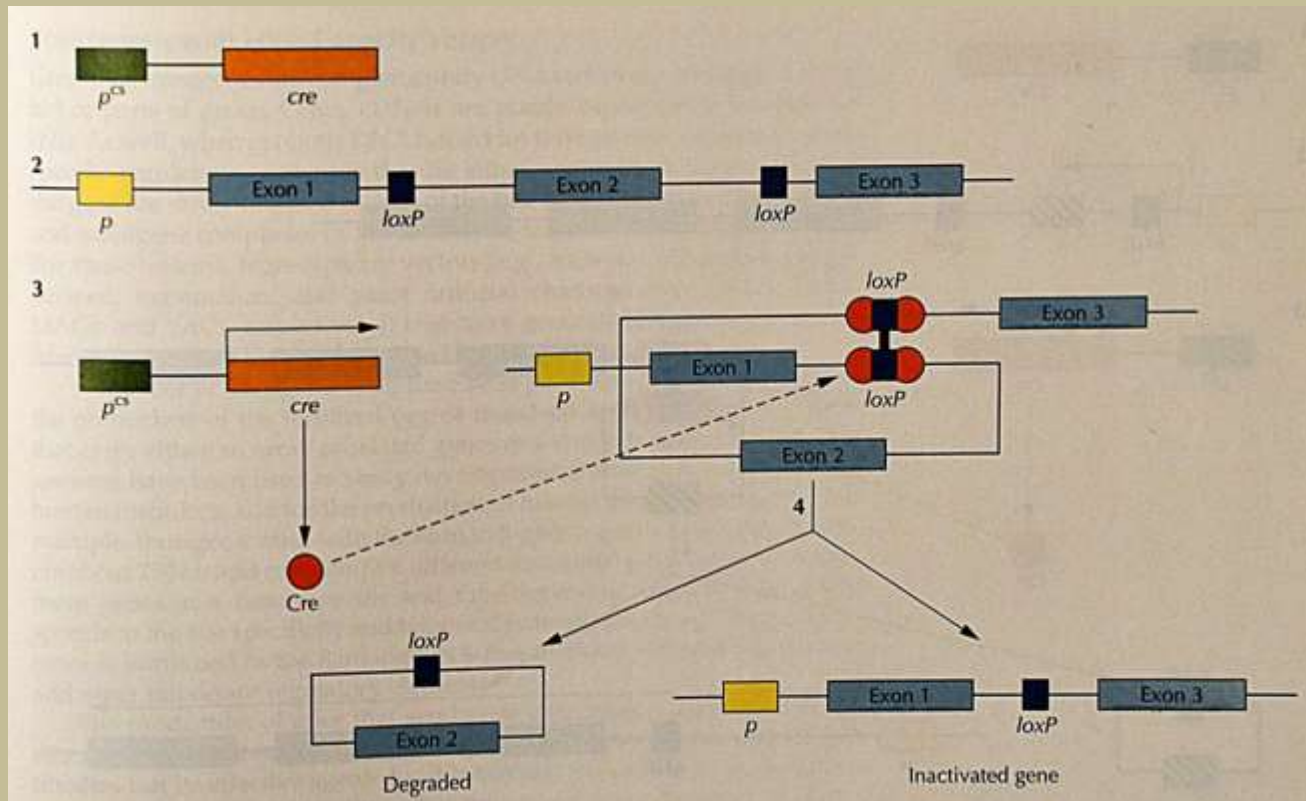
Cre iz faga P1 deluje na tarčna mesta loxP (34 bp)

Dve oddaljeni mesti *loxP*, vsaka s po dvema Cre, se stakneta. Cre cepi zaporedje znotraj distančnika, nato pa pride do izmenjave verig in s tem do rekombinacije. Če sta ponovitvi znotraj *loxP* v isti smeri, pride do delecije vmesne regije, če sta v inverzni orientaciji, pa se zaporedje med njima obrne. Pri fagu P1 sta ponovitvi praviloma obrnjeni. Ko se odloča o cirkularizaciji genoma P1, sta v proces vključeni mesti *loxP*, ki sta med seboj oddaljeni 100 kb.



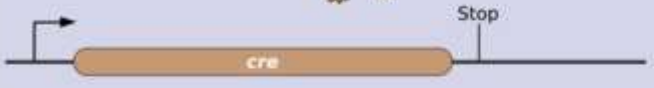
http://parts.igem.org/Recombination/Bacteriophage_P1-derived_Cre-lox

Za delo z mišjimi celicami so naravni sistem spremenili. Gen *cre* so vstavili pod kontrolo tkivno specifičnega promotorja in pripravili transgenske miši. Nato so pripravili transgenske miši, pri katerih je bil transgen (1 ali več) obdan z mestoma *loxP* z enako orientacijo – tak segment DNA je ‚*floxed*‘ in lahko vključuje selekcijski marker ter del genoma, ki ga želimo izbiti. Vstavimo ga v kromosom embrionalne izvorne celice s homologno rekombinacijo. Vzgojimo transgensko linijo miši s ‚*floxed*‘ regijo in jih parimo z linijo, ki ima transgen s tkivno specifično izraženim Cre. DNA med mestoma *loxP* se izreže, če se je v dvojno transgenskem organizmu izrazil Cre. To pa se zgodi samo v tkivu, za katerega je bil promotor specifičen.



F₀ Generation

Cre Mouse



LoxP (Floxed) Mouse

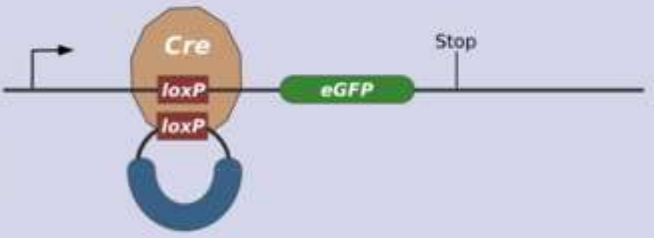


Cre LoxP Mouse



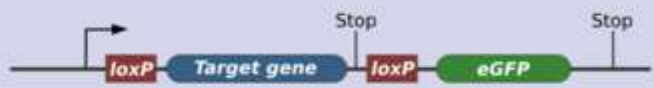
F₁ Generation

Cells with active Cre recombinase



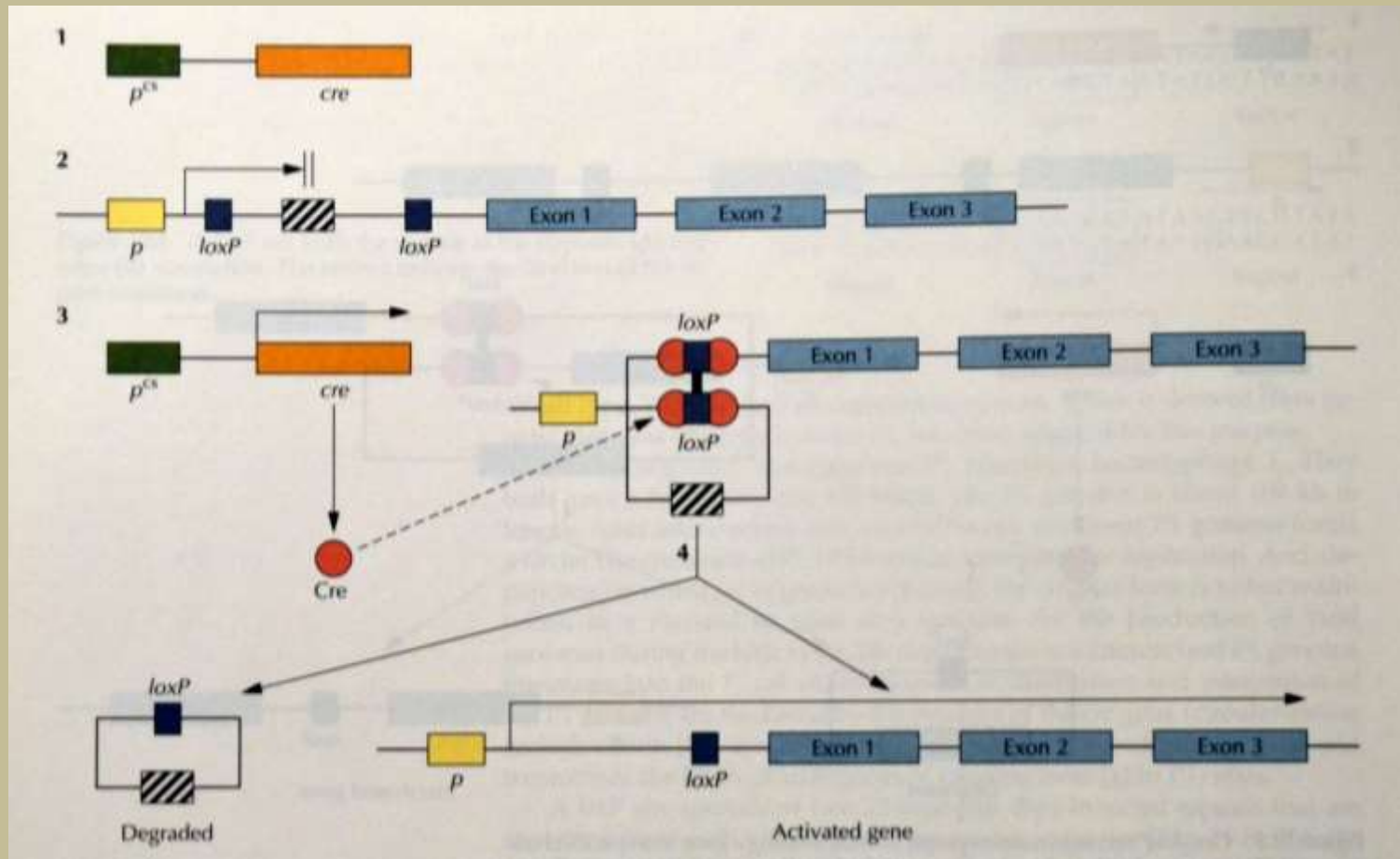
Original gene function is disrupted, a reporter gene is transcribed instead.

Cells lacking active Cre recombinase



Original gene function is untouched.

Alternativni sistem, ki prav tako temelji na delovanju rekombinaze, uporabimo za aktivacijo transgena v točno določenem tkivu. ‚Floksirani‘ konstrukt vsebuje zaporedje, ki preprečuje transkripcijo, stavimo pa ga med promotor in kodirajoče zaporedje gena, ki nas zanima. Ko se izrazi Cre, se DNA, ki preprečuje transkripcijo, izreže, s tem pa omogoči transkripcijo transgena.



Primeri uporabe:

Raziskave tkivno specifične inaktivacije genov za pripravo modelnih miši za retinitis pigmentosa pri človeku. Selektivna odstranitev gena za kinezin II, ki se izraža samo v fotoreceptorskih celicah mrežnice → akumuliranje opsina in arestina → celična smrt. Bolezenski znaki so zelo podobni kot pri človeku z r. p., zato lahko na takih modelnih miših preučujemo patofiziologijo bolezni.

DiGeorgeov sindrom pri človeku je posledica obsežne delecije na 22. kromosomu, ki vključuje veliko različnih genov in ni jasno, kateri so ključni, da se razvijejo simptomi, med drugim okvare kardiovaskularnega sistema. Pripravili so miši z deletirano primerljivo regijo in na njih testirali vnos nove kopije transkripcijskega faktorja, ki je sicer zapisan na deletirani regiji in je specifičen za kardiovaskularni sistem. Simptomi so se nekoliko izboljšali.

Transgeneza z visokokapacitetnimi vektorji

Včasih se cDNA v organizmu šibko izraža, zato lahko v genom vstavimo celotne gene. Mali geni (<20 kb) sicer omogočajo standardne načine vnosa, za večje, ki lahko vključujejo tudi regulatorne elemente, in za multigenске komplekse (>100 kb) pa uporabljamo visokokapacitetne vektorje: umetne kromosome (PAC, BAC, YAC, MAC) s kapaciteto od 100 do 1000 kb.

Gruča genov za β -globin obsega 250 kb in vsebuje 5 funkcionalnih genov za globine, ki se izražajo tkivno in časovno specifično, za kar so odgovorna robna zaporedja. Gene so preko YAC z mikroinjiciranjem vnesli v moško projedro in pridobili transgenske miši.

Zanimiva je priprava transgenskih miši, ki bi izražale samo človeška protitelesa. V njih pridobljena mAb bi bila bolj uporabna v boju proti npr. tumorskim Ag kot mišja mAb. Geni za lahko in težko verigo obsegajo pri človeku 2- 3 Mb. Treba je odstraniti ustrezne mišje lokuse in vstaviti človeške preko več konstruktov YAC. Najprej so postopno odstranjevali segmente, ki zapisujejo za lahko in težko verigo. Vzporedno so v humani YAC-knjižnici identificirali dva klon, ki sta zapisovala za dele imunoglobulinskih genov (in selekcijski marker). Izvedli so fuzijo protoplastiranih kvasovk (s po enim YAC) in ES-celic. Nastale celice so gojili v selekcijskih pogojih in preverili vsebnost novih regij s PCR, nato pa s temi celicami injicirali blastociste in vzgojili transgenske miši. Te so parili z mišmi brez lastnih genov za Ig. Če te miši imunizirajo z nekim Ag, razvijejo človeška Ab. Spekter Ab je bil omejen, ker so nekateri segmenti v YAC manjkali, zato so jih dodali naknadno.

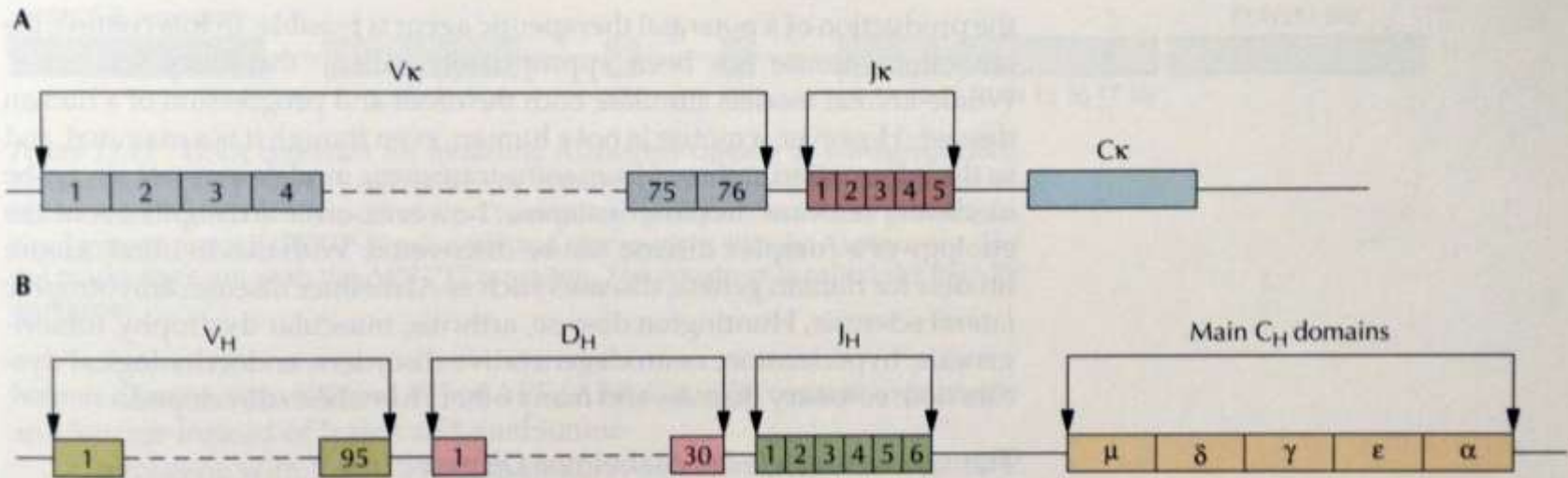


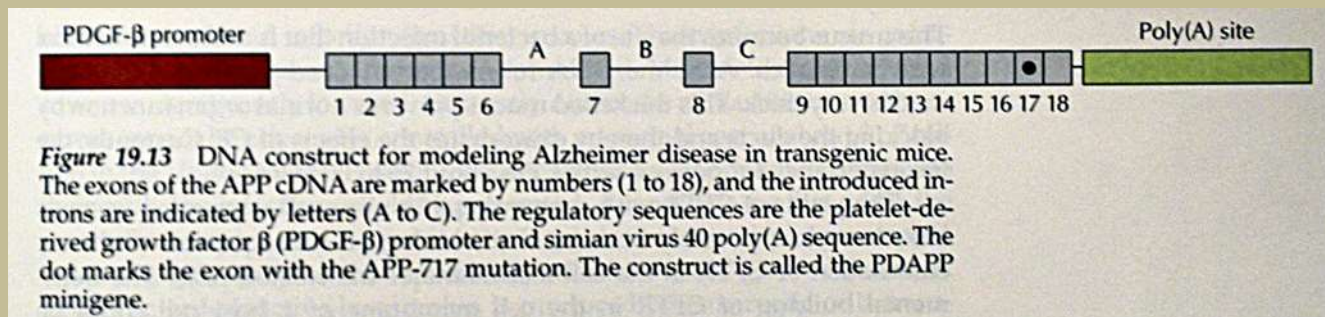
Figure 19.11 Schematic representation of the κ and H human immunoglobulin genes. **A.** Germ line version of the κ chain immunoglobulin gene. The dashed line represents a contiguous set of domains that are not shown. A functional κ chain gene such as V κ 8–J κ 4–C κ is formed in a B cell after a series of DNA rearrangements that combine these immunoglobulin DNA domains. This final rearranged gene represents 1 of about 380 possibilities. **B.** Germ line version of the H chain immunoglobulin gene. The dashed lines represent contiguous sets of domains that are not shown. A functional H chain gene such as V_H33–D_H26–J_H4–C α is formed in a B cell after a series of DNA rearrangements that combine these immunoglobulin DNA domains. This final rearranged gene represents 1 of about 85,500 possibilities. Although only one C γ domain is shown here, there are four types of C γ domains (C γ 1, C γ 2a, C γ 2b, and C γ 3).

Transgenski mišji model za Alzheimerjevo bolezen

Pod kontrolo promotorja, ki je aktiven samo v nevronih, so pripravili več konstruktov z variantami wt gena za APP. Miši so le redko razvile histološke značilnosti pacientov z Alzheimerjevo boleznijo, še največkrat, če so uporabili samo del gena, ki zapisuje za C-končnih 100 ak. Pripravili so tudi konstrukte z mutiranim genom, pri čemer so kot mutacije vnesli tiste spremembe, ki so jih opazili v genomih pacientov z dedno obliko bolezni, ki se izrazi zgodaj v življenju (pri <50 letih), npr. mutacija ,717' (Val→Phe) in APP-670/671 (Lys→Asn, Met→Leu).

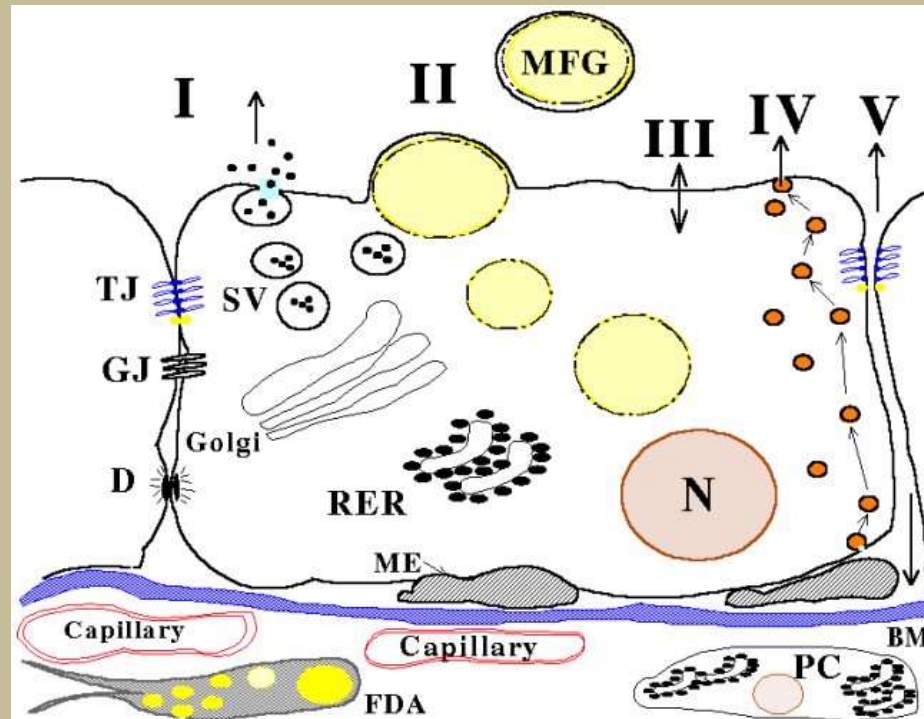
Mutant ,717': v cDNA za APP so vključevali introne, ki si sicer med eksoni 6/7, 7/8 in 8/9, kar se je izkazalo, da poveča raven transkripcije ob uporabi promotorja, ki je značilen za možgansko tkivo (PDGF- β : trombocitni rastni faktor beta) → minigen. Amiloidne plake so zaznali pri miših s ~40 kopijami minigena pri >6 mesecih starosti, neurofibrilarnih vozlov pa niso opazili.

Na podoben način so vstavili v mišji genom tudi gene za nekatere druge proteine, ki naj bi vplivali na razvoj Alzheimerjeve bolezni.



Proizvodnja rekombinantnega CFTR

Za razvoj cistične fibroze je ključna mutacija v genu za transmembranski regulator CF (CFTR), ki je kloridni kanal. Da bi lastnosti tega proteina bolje preučili, so ga pripravili v velikem merilu. Običajni celični sistemi za to niso primerni, saj pride do spremenjenega transporta kloridnih ionov. Možna izbira so mlečne žleze, kjer žlezne celice neprestano sproščajo dele membrane kot maščobne kroglice.

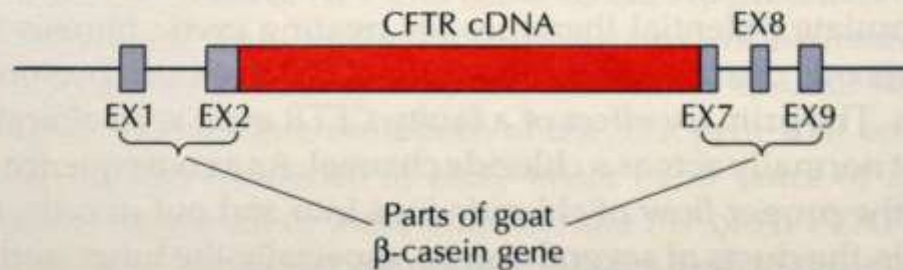


<http://mammary.nih.gov/reviews/lactation/Neville001/>

Proizvodnja CFTR v mleku

Celotno cDNA za CFTR so vstavili v okvarjen gen za kozji beta kazein (delecija od konca eksona 2 do začetka eksona 7). Pri transgenskih miših niso opazili stranskih znakov, npr. pri mladičih, ki sesajo mleko s CFTR, niti pri samicah. Glikozilacija CFTR je bila pravilna in protein so izolirali iz mastne frakcije mleka. Na podoben način so pripravili tudi druge transmembranske proteine, za večje količine v večjih živalskih vrstah.

Figure 19.14 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 β -casein gene are retained.



Proizvodnja rekombinantnih proteinov v mleku

Table 19.2 Milk production and estimated recombinant protein yields from organisms used for the expression of transgenes in mammary glands

Organism	Annual milk yield (liters)	Estimated recombinant protein per female (kg/yr)
Rabbit	5	0.02
Pig	300	1.5
Sheep	500	2.5
Goat	900	4
Cow	10,000	60

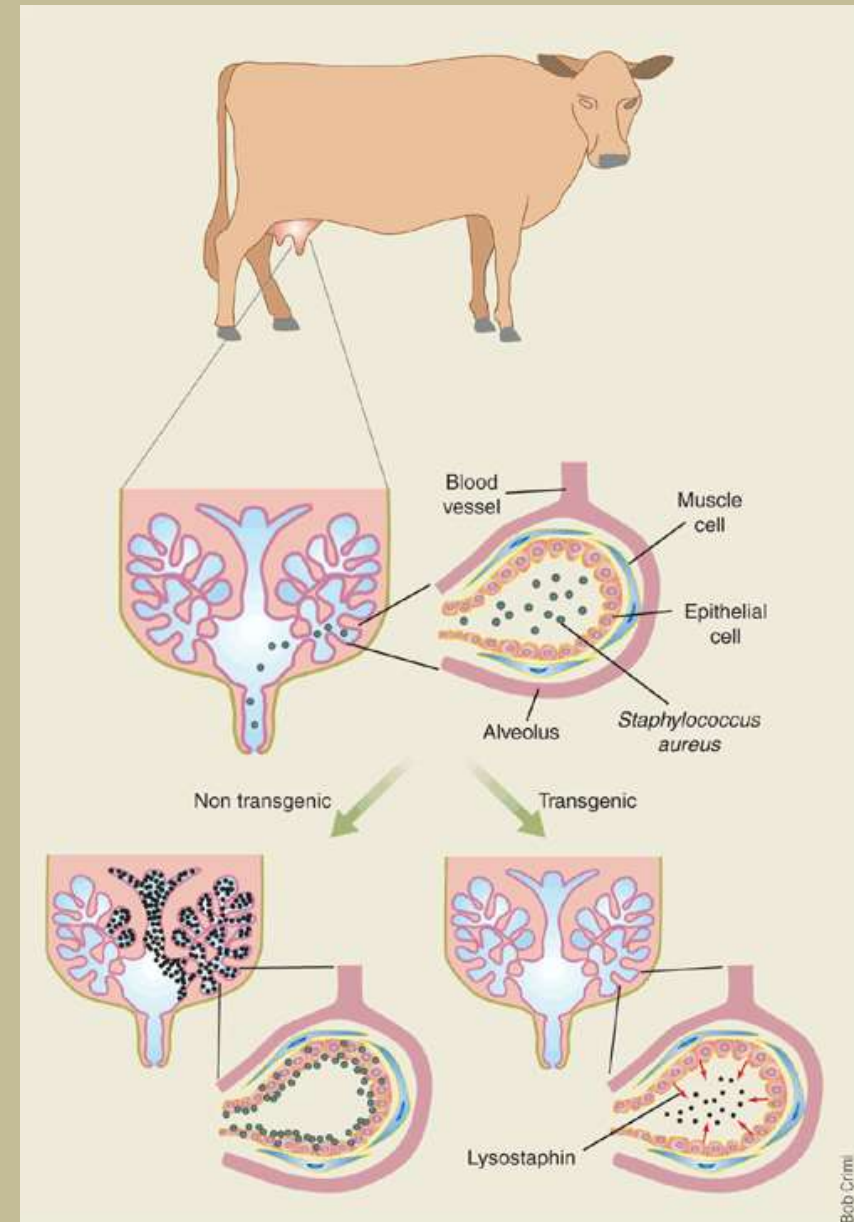
Table 19.3 Some exogenous proteins that have been expressed in the mammary glands of transgenic animals

Antithrombin III
 Calcitonin
 Erythropoietin
 Factor IX
 Factor VIII
 Fibrinogen
 Glucagon-like peptide
 Granulocyte colony-stimulating factor
 Growth hormone
 Hemoglobin
 Human serum albumin
 Insulin
 Insulin-like growth factor 1
 Interleukin 2
 Lactoferrin
 Lysozyme
 Monoclonal antibodies
 Nerve growth factor β
 Protein C
 Superoxide dismutase
 Tissue plasminogen activator
 α 1-Antitrypsin
 α -Glucosidase
 α -Lactalbumin

Transgenско govedo za večjo odpornost proti mastitisu

Za zdravljenje vnetja vimen v ZDA letno porabijo 1,7 mrd USD. Vnetje, ki povzroči tudi manjšo mlečnost, povzroča bakterija *Staphylococcus aureus*. Protein lizostafin (*S. simulans*) deluje kot hidrolaza na celično steno *S. aureus*. V transgenskih živalih lizostafin ni aktiven, ker se dva Asn glikozilirata, zato so ju mutirali v Gln.

Gen so vstavili pod kontrolo promotorja za ovčji beta laktoglobulin in pripravili transgenske miši. Tiste z najvišjo ravno izražanja so bile v celoti zaščitene pred okužbo v eksperimentalnih pogojih, pa tudi pri nižjem izražanju je raven zadoščala pri okužbi s takim številom celic, kot je to običajno v naravi.



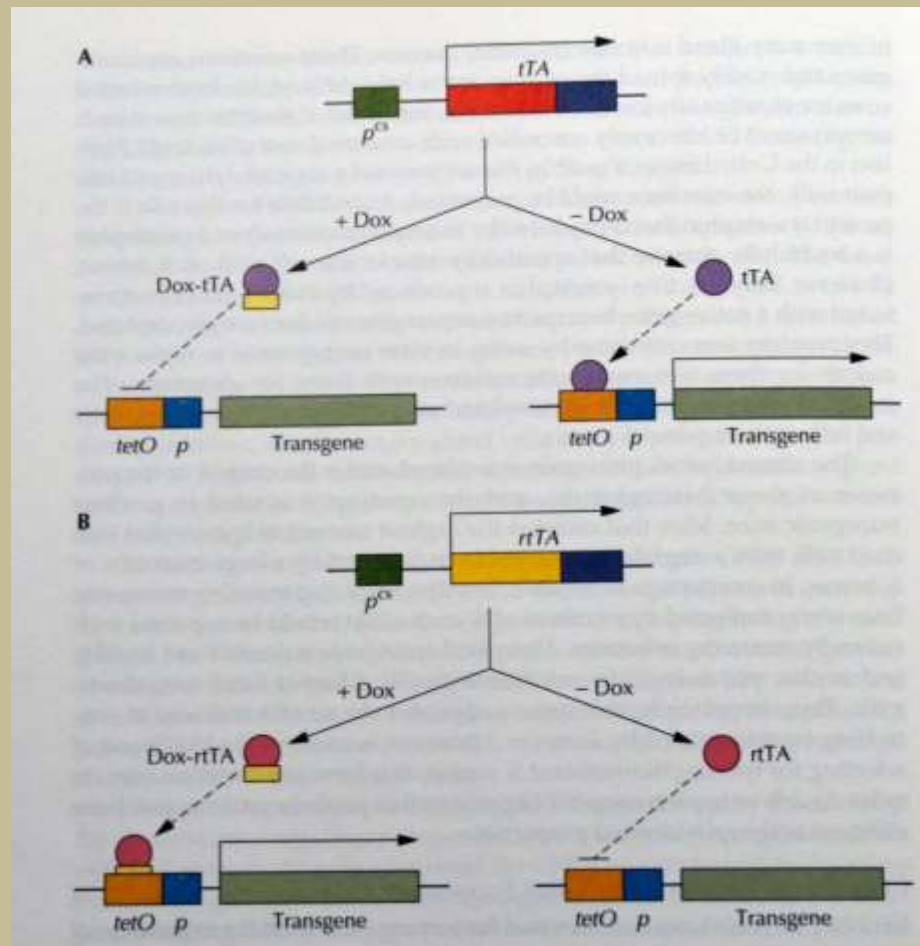
Pogojno uravnavanje izražanja genov: tet-off / tet-on

Tetraciklinski indukcijski sistem: v isti celici imamo dve transkripcijski enoti, pri čemer produkt prve uravnava izražanje druge.

Tet-off (A): dodatek doksiciklina prekine izražanje transgena s tem, da vpliva na delovanje himernega proteina tTA (tetraciklinski transaktivator). Ta je pod kontrolo za celice specifičnega promotorja. Transgen pa je pod kontrolo tetraciklinskega operatorja (tetO), na katerega se tTA veže, in s tem sproži transkripcijo transgena. Če se na tTA veže Dox, do vezave na operator ne pride, zato se transgen ne prepisuje.

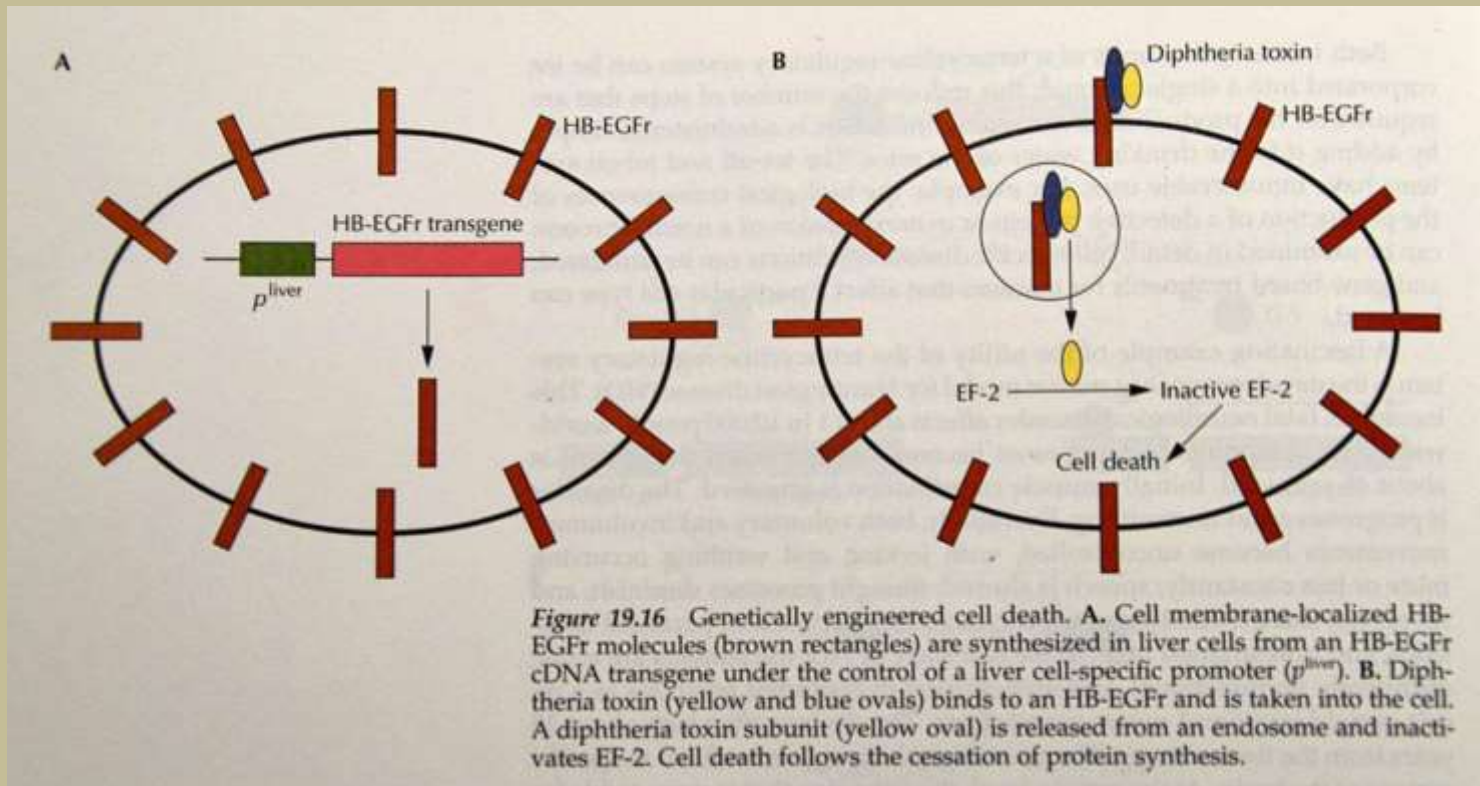
Tet-on (B): himerni protein je mutiran (rtTA – reverzni transaktivator), zato se sam ne more vezati na operator in v odsotnosti Dox ni transkripcije transgena. Vezava Dox na mutirani protein pa spremeni njegovo konformacijo, zato ponovno dobi sposobnost vezave na operator in stem inducira transkripcijo transgena.

Dox lahko dodajo v pitno vodo za miši in s tem sprožijo oz. zavrejo izražanje transgena v točno določenih tipih celic (promotor za tTA oz. rtTA). Tako so npr. pripravili modelne miši za Huntingtonovo bolezen: transgenski konstrukt je imel 94 ponovitev CAG in se ni izražal. Ker so breje miši pile vodo z Dox, so se skotili normalni mladiči, nato pa so jim dali piti običajno vodo in s tem vplivali na razvoj bolezni.



Pogojno uravnavanje celične smrti

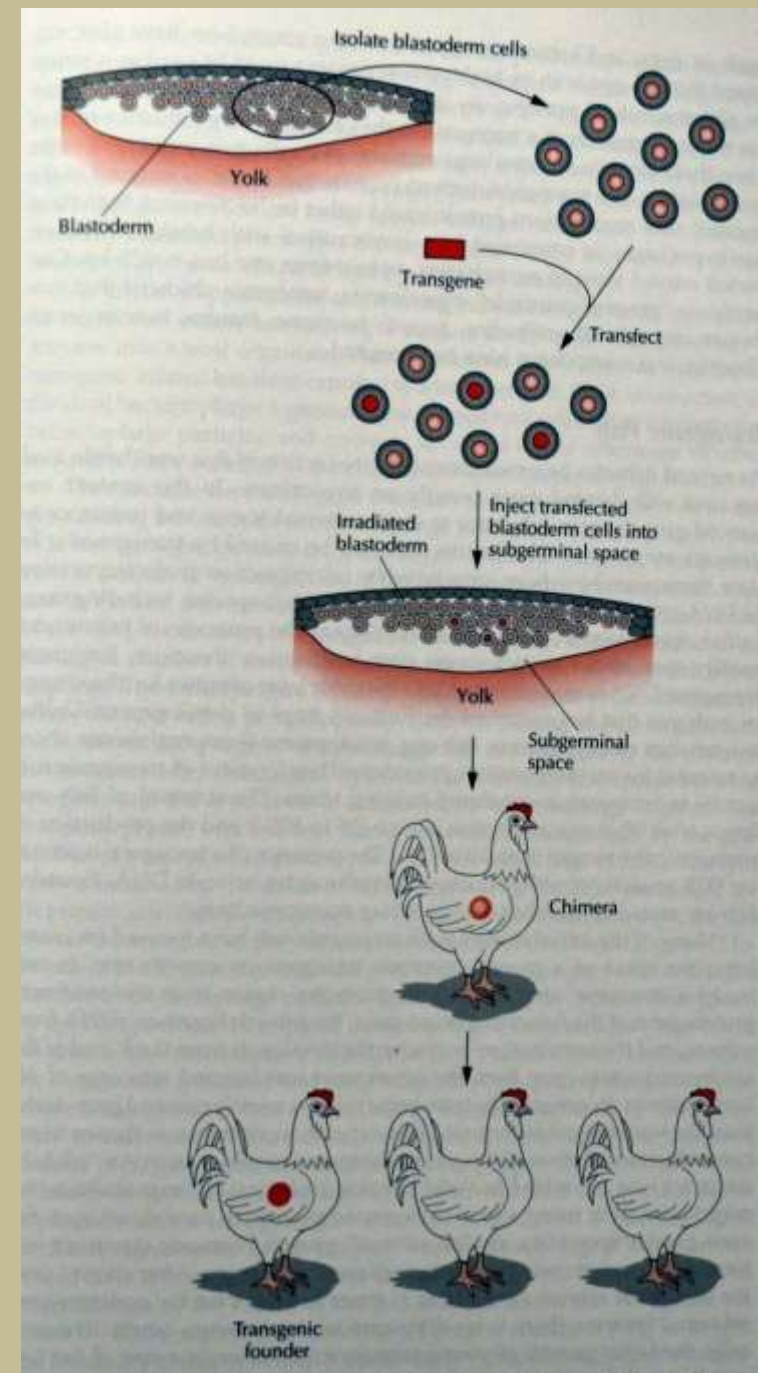
Za raziskave odpovedi organov so razvili transgenske miši. Pod kontrolo za jetra specifičnega promotorja (npr. albuminski) so vstavili gen za receptor za heparin vezavni epidermalni rastni faktor (HB-EGFr; tega sicer miši nimajo). Ta veže difterijatoksin, kar povzroči internalizacijo kompleksa v endosome. Toksična podenota toksina se sprosti v citosol, kjer se veže na EF-2, kar ustavi translacijo, to pa sproži celično smrt.



Transgenske ptice

Pri pticah je vnos transgena z mikroinjiciranjem nemogoč, ker v jajčno celico hkrati vstopi več spermijev in ne vemo, katero pojedro se bo spojilo z jedrom jajčne celice. Razen tega so zgodnje faze razvoja drugačne kot pri sesalcih, saj se hitro obda s togo membrano, debelo plastjo albumina in zametki lupine. Edino izvedljiva podobna metoda je z vnosom transgena v germinalni disk (regija na rumenjaku, kjer sta moško in žensko pojedro) preden se začne razvijati lupina. Ta zatrdi, ko ima zarodek 30.000 do 60.000 celic (razvit je blastoderm). V tej fazi razvoja je možna okužba z retrovirusnim vektorjem.

Zaradi majhne kapacitete in pomislekov glede varnosti so razvili alternativno metodo s transpozicijskimi elementi drozofile *mariner*. Transgen vnesejo v pluripotentne celice, izolirane iz blastoderma enega zarodka, in jih vrnejo na ustrezno mesto drugega zarodka. Razvijejo se himerni piščanci, ki jih nato križajo.



Testni sistem mutagenosti *in vivo* na osnovi gena *cII* faga lambda

Test mutagenosti na večceličnih organizmih ima številne prednosti pred bakterijskimi sistemi ali celičnimi kulturami. Tak sistem so razvili s tandemsko vstavitvijo fagnih genomov v genom testne živali. Žival izpostavimo testnim pogojem in čez nekaj časa izolirajo fagne genome in jih vstavijo v fagne glave. Če je prišlo do mutacije v genu *cII* (300 bp), se to odraža v neuspešni negativni regulaciji gena *cl* (represor litičnega cikla). Mutacije v *cII* pomenijo manjšo verjetnost za vstop v lizogeni stadij virusnega cikla → litični cikel.

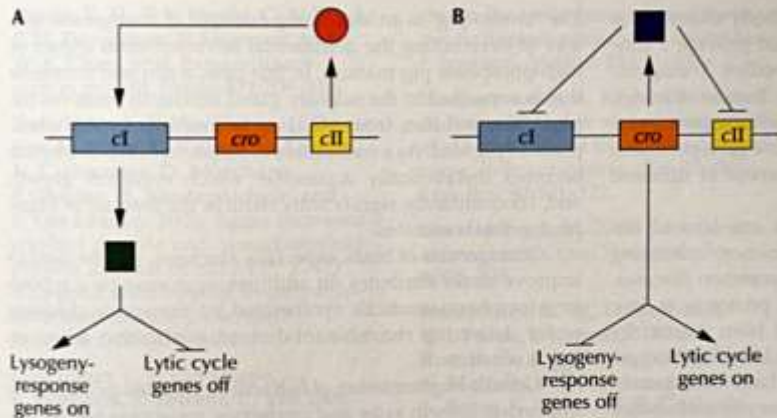


Figure 19.22 Lysogenic (A) and lytic (B) response systems after infection of *E. coli* with bacteriophage λ . A. The *cII* protein (red circle) activates the *cl* gene. The *cl* protein (green square) turns off the genes that initiate the lytic cycle and turns on the genes that are necessary for lysogeny. B. The Cro protein (blue square) prevents transcription of the *cl* and *cII* genes; this prevents transcription of the lysogeny-response genes and favors the expression of the genes that are required for the lytic cycle. An angled line ending with a horizontal line denotes the inhibition of gene activity.

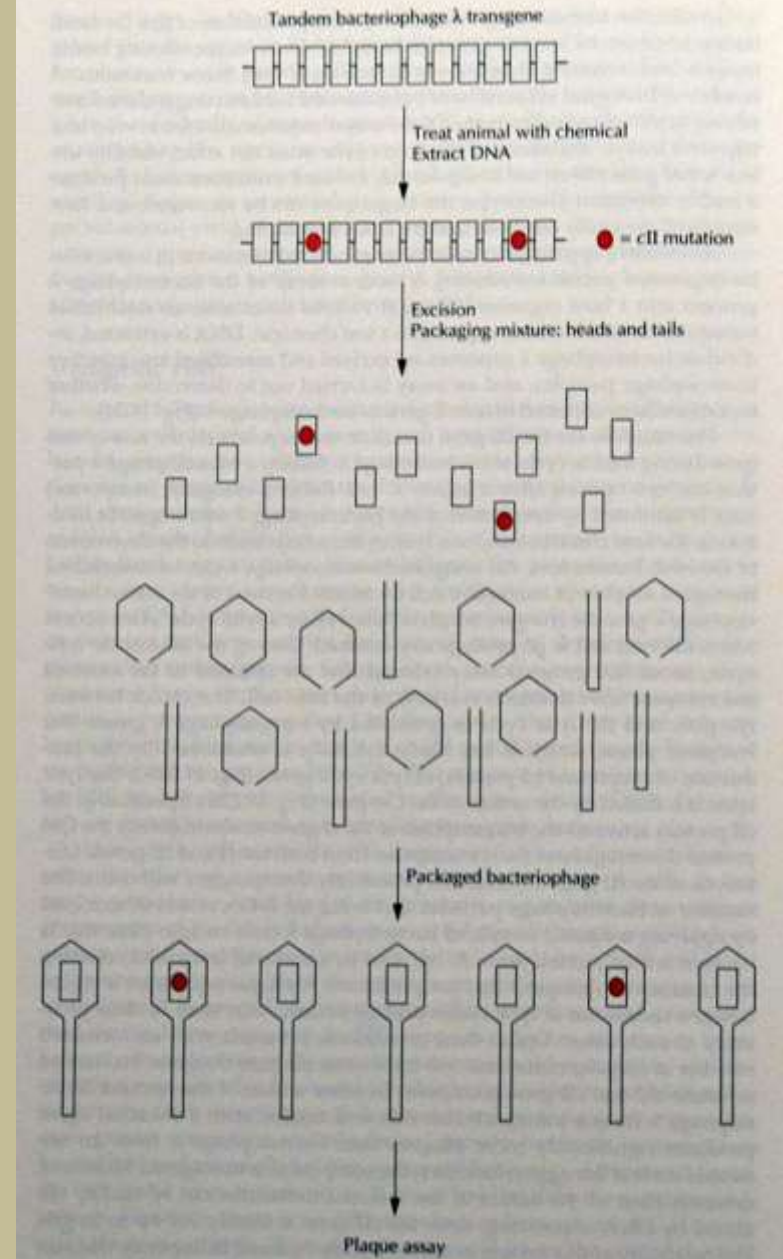


Figure 19.21 Schematic representation of the bacteriophage λ *cII* gene *in vivo* mutagenesis assay. Induced mutations are designated with a red circle. It is extremely likely that a bacteriophage λ with a mutant *cII* gene will enter the lytic cycle.

Figure 1a.

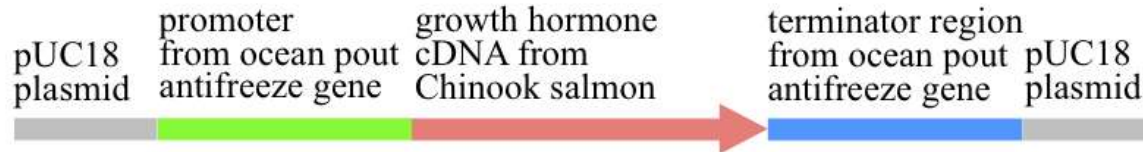
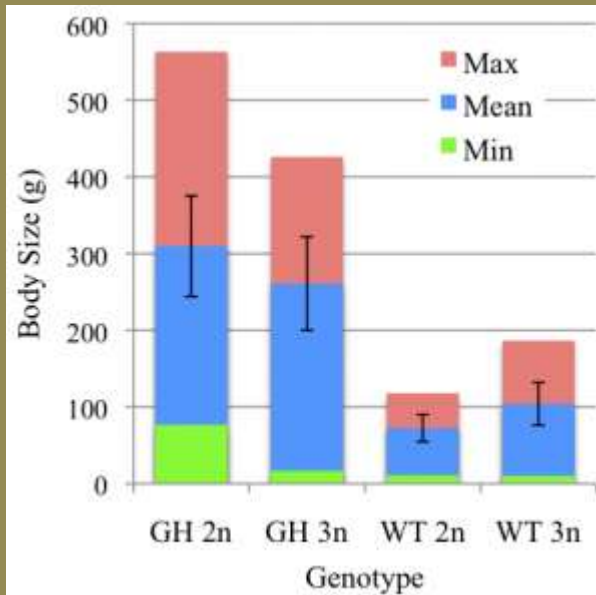
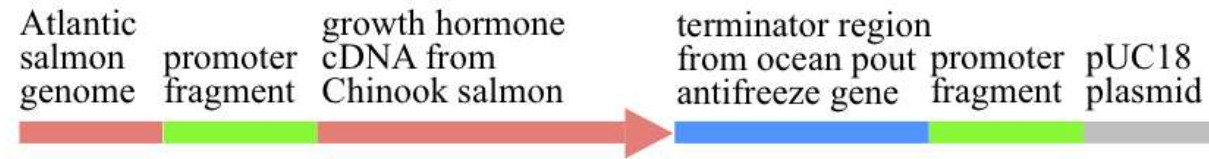
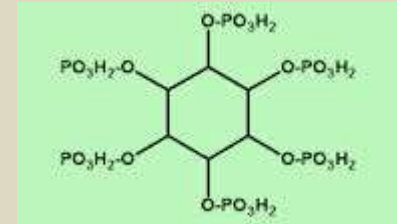


Figure 1b.



Mean body size with standard deviation, maximum, and minimum body size in grams of four groups of salmon: diploid and triploid AquaAdvantage salmon expressing transgenic growth hormone and diploid and triploid wild type salmon. N = 309, 369, 306, and 464 respectively.

„enviropig“ – Yorkshirska pasma z bolj učinkovito presnovo rastlinske hrane, ki vsebuje fosfor (fitinsko kislino): manj onesnaževanja, večja izraba krme. Svinje izločajo v slini encim fitazo, ki je aktiven tudi v želodcu. V rastlinah je več kot pol fosforja v obliki fitinske kisline.



„pig 26“ – Roslinov inštitut 2013: nova tehnika „gene editing“ (TALEN / cinkovi prsti), ki ni klasična transgeneza in ne vključuje genov za odpornost proti antibiotikom, uspešnost pa je ~15 %.

Prašič naj bi bil odporen proti afriški svinjski mrzlici, vstavili pa so mu gen iz divjega afriškega sorodnika, ki je naravno imun, a se ne more križati z evropsko svinjo.

